

Sorbonne Université

Ecole doctorale de Physiologie, Physiopathologie et Thérapeutique

Institut de la Vision

**La sérine protéase HTRA1 et l'inflammation
sous-rétinienne dans le contexte de la
Dégénérescence Maculaire Liée à l'Age**

Thèse de Doctorat

Soutenue publiquement le 9 Mars 2018 par :

Fanny BEGUIER

Devant le jury composé de :

Professeur Isabelle AUDO	Présidente du jury
Professeur Stephen MOSS	Rapporteur
Docteur Neeraj DHAUN	Rapporteur
Docteur Stéphane GERMAIN	Examineur
Docteur Annabelle REAUX LE GOAZIGO	Examinatrice
Docteur Florian SENNLAUB	Directeur de thèse

A mes grands-pères,

Jojo, Loulou, Alain

ABBREVIATIONS

AG : Atrophie Géographique

APOE : Apolipoprotéine E

ARMS2 : Age Related Maculopathy Susceptibility-2

CARASIL : Cerebral autosomal recessive arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy

CCR2 : C-C Chemokine Receptor type 2

CD14/16/22 : Cluster of Differentiation 14/16/22

CFH : Complement Factor H

CX3CR1/CX3CL1 : C-X3-C motif Chemokine Receptor/Ligand 1

PDGF : Platelet-Derived Growth Factor

PDZ : Post-synaptic density protein 95 (PSD-95), Drosophila disc large tumor suppressor (Dlg1), zona occludens 1 (ZO-1)

DMLA : Dégénérescence Maculaire Liée à l'Age

EPR : Epithélium Pigmentaire Rétinien

ENCODE : Encyclopedia of DNA Elements

FasL : Fas Ligand

FGF : Fibroblast Growth Factor

GLUT1/3 : Glucose Transporter 1/3

GMPC : Guanosine Monophosphate Cyclique

GTex : Genome-Tissue Expression

HTRA1 : High-Temperature Requirement A Serine Peptidase 1

IBA1 : Ionized calcium-Binding Adapter molecule 1

IGF : Insulin-like Growth Factor

IGFBP5 : Insulin Like Growth Factor Binding Protein 5

IL-6 : Interleukine-6

iMΦs : Macrophages inflammatoires dérivés des monocytes

IIRC : Innate Immunity Receptor Cluster

IRBP : Interphotoreceptor Retinoid-Binding Protein

kB : kilo Bases

kDa : kilo Dalton

LAP : Latency Associated Peptide

LPS : Lipopolysaccharide

MC : Monocyte Commun

MEC : Matrice Extra-Cellulaire

MI : Monocyte Intermédiaire

MLA : Maculopathie Liée à l'Age

MMP : Matrix Metalloproteinase

MNC : Monocyte Non Commun

Mos : Monocytes

M M : Macrophages

μ m : micro-mètre

nm : nano-mètre

NO : monoxyde d'azote

NVC : Néovascularisation Choroïdienne

OR : Odds Ratio

PEDF : Pigment Epithelium-Derived Factor

PLEKHA1 : Pleckstrin Homology domain-containing family A member 1

PM : Phagocyte Mononucléé

rMPh : Macrophages résidents

ROS : Reactive Oxygen Species

SIRPa : Signal Regulatory Protein α

SNC : Système Nerveux Central

SNP : Single Nucleotide Polymorphism

TGF- β : Transforming Growth Factor- β

TIMP : Tissue Inhibitor of Metalloproteinases

TLR4 : Toll-Like Receptor 4

TSP-1 : Thrombospondine-1

VEGF : Vascular endothelial growth factor

VVM : Valine-Valine-Méthionine

TABLE DES MATIERES

ABBREVIATIONS.....	6
INTRODUCTION.....	11
CHAPITRE 1: ANATOMIE ET PHYSIOLOGIE DE L'ŒIL ET LA RETINE.....	12
A. La rétine neurale.....	13
1) Les photorécepteurs.....	14
a) Les bâtonnets.....	15
b) Les cônes.....	16
2) Les cellules bipolaires.....	17
3) Les cellules ganglionnaires.....	17
4) La glie rétinienne.....	18
a) Les cellules gliales de Müller.....	18
b) Les astrocytes.....	18
c) Les cellules microgliales.....	18
B. L'épithélium pigmentaire rétinien.....	19
1) Organisation cellulaire.....	19
2) Rôles biologiques de l'EPR.....	20
a) Protection contre la photo-oxydation.....	20
b) Le transport de nutriments.....	20
i. Transport de la circulation sanguine vers la rétine.....	21
ii. Transport de l'espace sous-rétinien vers la circulation	
sanguine.....	21
c) Recyclage du photopigment.....	21
d) La phagocytose des segments externes des photorécepteurs.....	22
e) Fonctions sécrétrices.....	22
CHAPITRE 2: LA DEGENERESCENCE MACULAIRE LIEE A L'AGE	24
A. Définition.....	24
B. Formes cliniques de la maladie.....	24
1) La maculopathie liée à l'âge : forme précoce de la maladie.....	25
a) Altérations pigmentaires de l'EPR.....	25
b) Drusen.....	26
2) La DMLA exsudative (ou forme humide).....	28
3) L'atrophie géographique (ou forme sèche).....	28
C. Epidémiologie.....	29
D. Facteurs de risque.....	30
1) Facteurs environnementaux.....	30
a) Age.....	30
b) L'exposition à la lumière.....	30
c) Tabac.....	31
c) Obésité.....	31

2)	Facteurs génétiques.....	32
a)	Polymorphisme du facteur H du complément.....	32
b)	L'apolipoprotéine E.....	33
c)	Locus 10q26.....	34
i.	Pleckstrin homology domain containing, family A.....	36
ii.	Age-related maculopathy susceptibility-2.....	37
iii.	High temperature requirement protein A1.....	38
E.	Traitements de la DMLA.....	38

CHAPITRE 3: L'INFLAMMATION ET LE SYSTEME DES PHAGOCYTES

MONONUCLEES.....40

A.	L'inflammation.....	40
B.	Le système des phagocytes mononucléés.....	41
1)	Les monocytes.....	41
a)	Les monocytes humains.....	41
i.	Les monocytes classiques : CD14++CD16-.....	43
ii.	Les monocytes non-classiques : CD14+CD16++.....	42
iii.	Les monocytes intermédiaires : CD14++CD16+.....	42
b)	Les monocytes murins.....	43
i.	Les monocytes inflammatoires :	
	Ly6C ^{high} CCR2+/CX3CR1 ^{low}	43
ii.	Les monocytes résidents : Ly6C ^{low} CCR2-/CX3CR1 ^{high}	43
3)	Les macrophages.....	44
4)	Les cellules microgliales : macrophages résidents du système nerveux central.....	45
C.	La rétine : zone de privilège immun.....	46
1)	Les signaux inhibiteurs de la rétine.....	47
2)	L'EPR immunosuppresseur.....	48
a)	La signalisation FasL/Fas.....	49
b)	La signalisation Thrombospondine-1/CD47.....	49
D.	Inflammation et DMLA.....	50

CHAPITRE 4: LA SIGNALISATION THROMBOSPONDINE-1/CD47..... 55

A.	La Thrombospondine-1.....	54
1)	Aspects structurels.....	54
2)	Ligands et fonctions biologiques de TSP-1.....	56
a)	Le TGF- β et son peptide de latence associé.....	56
b)	Le récepteur CD36.....	57
B.	Le récepteur CD47.....	58
1)	Aspects structurels.....	58
2)	Ligands et activités biologiques.....	59
a)	Signal regulatory protein α et γ	59
b)	Les intégrines.....	60
c)	TSP-1.....	60
C.	Le peptide 4N1K : activateur de CD47.....	61
D.	La signalisation TSP-1/CD47 et DMLA.....	62

CHAPITRE 5: LA SERINE PROTEASE HTRA1	64
A. Aspects structurels.....	64
B. Fonctions biologiques.....	65
1) Substrats.....	65
2) Implications pathologiques.....	67
a) Maladies due à un déficit de HTRA1.....	67
i. Cerebral Autosomal Recessive Arteriopathy with Subcortical Infarcts and Leukoencephalopathy (CARASIL).....	67
ii. Cancers.....	68
iii. La maladie d'Alzheimer.....	68
b) Rôles délétères de HTRA1.....	69
i. Arthrose.....	69
ii. Dystrophie musculaire de Duchenne.....	70
C. HTRA1 et DMLA.....	70
OBJECTIFS.....	74
DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....	77
CONCLUSION.....	87
BIBLIOGRPAHIE.....	89
ARTICLES SUPPLEMENTAIRES.....	127
Complement Factor H inhibits CD47-mediated resolution of inflammation.....	128
Activated monocytes resist elimination by retinal pigment epithelium and downregulate their OTX2 expression via TNF- α	140
RESUME.....	150

INTRODUCTION

I. Anatomie et physiologie de l'œil et la rétine

Les cinq sens incluent le goût, le toucher, l'ouïe, l'odorat et la vue. L'œil est l'organe hautement spécialisé de la photo-réception, processus par lequel l'énergie lumineuse de l'environnement est convertie en impulsion électrique. Ce signal électrique est transmis au cerveau, via le nerf optique, qui l'analyse et crée l'image que nous percevons. Les données anatomiques développées dans ce chapitre sont tirées de l'ouvrage de « The Eye 4th Edition » par Forrester J., Dick A., McMenemy P., Roberts F et Pearlman E. Chez l'humain, le globe oculaire a un diamètre d'environ 25mm et est composé de trois enveloppes, ou tuniques (Figure 1). On peut notamment citer :

- la tunique fibreuse externe composée du tissu sclérotique opaque et prolongé au niveau antérieur par la cornée transparente. Cette enveloppe très rigide permet de protéger l'œil et maintenir sa forme,
- la tunique médiane, composée par l'iris en avant, les corps ciliaires et la choroïde en arrière,
- la tunique interne, composée de la rétine qui tapisse le fond de l'œil, et du nerf optique. Leur rôle est de convertir l'information lumineuse en signal électrique.

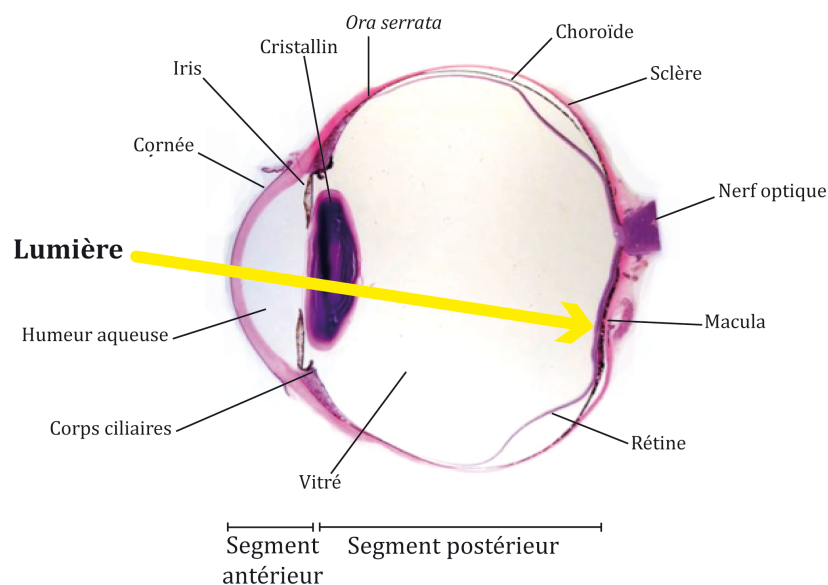


Figure 1: Anatomie de l'œil humain.

Les rayons lumineux (flèche jaune) traversent la cornée, l'humeur aqueuse, le cristallin et le vitré pour être finalement captés par la rétine au niveau de la macula.

L'œil est classiquement divisé en deux parties, qu'on appelle le segment antérieur, délimité par la cornée et le cristallin, et le segment postérieur. Dans cette étude, nous ne nous intéresserons qu'au segment postérieur. Le corps vitré est le constituant majoritaire du segment postérieur, il s'agit d'un liquide gélifié transparent, qui remplit les deux-tiers de la cavité oculaire, du cristallin jusqu'à la rétine. Son rôle principal est de maintenir le volume de l'œil ; sa transparence permet de ne pas créer d'interférences pour le signal lumineux. Il est attaché au niveau du nerf optique, pour maintenir le vitré plaqué sur la rétine ; et en arrière des corps ciliaires, au niveau de l'*ora serrata*. Le segment postérieur est entouré par la sclère, membrane externe de l'œil, extrêmement résistante. Elle assure la protection de l'œil contre les lésions, et particulièrement pour les deux tuniques qui tapissent le fond de l'œil : la choroïde et la rétine. En arrière de l'œil, elle est traversée par le nerf optique ; en avant de l'œil, la sclère est en continuité avec la cornée. La choroïde est un tissu pigmenté et très vascularisé, situé entre la sclère et la rétine. Sa principale fonction est d'apporter de l'oxygène et des nutriments aux couches externes de la rétine qui ne sont pas vascularisées.

La rétine est la couche la plus interne des trois tuniques de l'œil. Il s'agit du tissu neurosensoriel dont la fonction est de capter les informations lumineuses de l'environnement et les convertir en impulsions nerveuses qui sont transmises au cerveau, via le nerf optique, pour initier le traitement de l'image.

L'épaisseur moyenne de la rétine est d'environ 250 μ m et elle est constituée de dix couches. De la surface de la rétine à l'arrière de l'œil, les couches sont les suivantes (Figure 2) :

- la couche de cellules ganglionnaires,
- la couche plexiforme interne contient les synapses entre cellules ganglionnaires et les cellules bipolaires ou amacrines,
- la couche nucléaire interne contient les cellules amacrines bipolaires et horizontales,
- la couche plexiforme externe contient les synapses entre les cellules bipolaires, horizontales et les photorécepteurs,
- la couche nucléaire externe contient les corps cellulaires des photorécepteurs,
- la couche réceptrice contient les segments externes et internes des photorécepteurs
- l'épithélium pigmentaire rétinien (EPR).

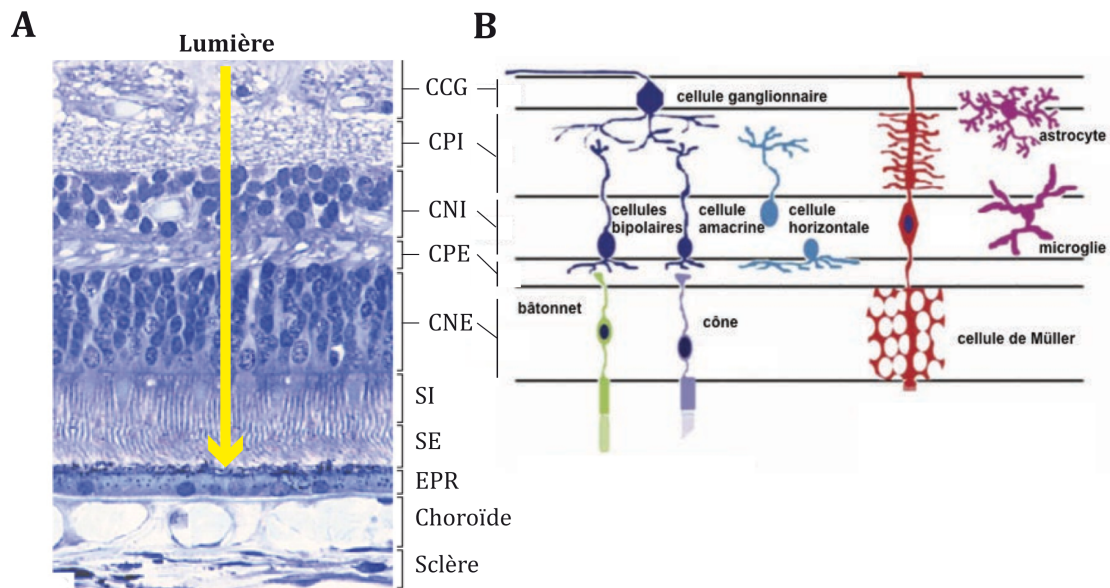


Figure 2: Les différentes couches de la rétine.

A : Coupe de rétine humaine - Marquage bleu de toluidine (modifié d'après <https://embryology.med.unsw.edu.au>). CCG : couche des cellules ganglionnaires ; CPI : couche plexiforme interne ; CNI : couche nucléaire interne ; CPE : couche plexiforme externe ; CNE : couche nucléaire externe ; SI : segments internes des photorécepteurs ; SE : segments externes des photorécepteurs. B : Les cellules de la rétine (modifié d'après West et al., 2009).

On peut séparer ces couches en deux tissus distincts : la rétine neurale, qui est le siège de la phototransduction, et l'épithélium pigmentaire rétinien (EPR).

A. LA RETINE NEURALE

La rétine neurale est une fine couche transparente de cellules superposées. C'est ce tissu qui capte les informations lumineuses de l'environnement et les convertit en influx nerveux, on parle de phototransduction. Les influx nerveux sont ensuite transmis au cerveau *via* les axones des cellules ganglionnaires dans le nerf optique. La rétine neurale est constituée de plusieurs types cellulaires parmi lesquelles on retrouve principalement des cellules neuronales, mais également des cellules gliales.

Les photorécepteurs absorbent et convertissent les photons en signaux neuronaux, qui sont ensuite traités à travers le réseau de cellules bipolaires, horizontales, amacrines et ganglionnaires. Les axones des cellules ganglionnaires forment la couche de fibres nerveuses qui se rejoignent et forment l'entrée du nerf optique. Ce sont les interconnexions complexes des différentes cellules neuronales de la rétine qui complètent le premier traitement de l'information visuelle envoyée au cerveau.

1) LES PHOTORECEPTEURS

Il existe deux types de photorécepteurs dans la rétine des organismes vertébrés: les bâtonnets et les cônes. Ils sont localisés du côté externe de la rétine. En 1935, Osterberg a estimé le nombre de photorécepteurs dans la rétine humaine et a observé entre 110 et 125 millions de bâtonnets, et entre 6,3 et 6,8 millions de cônes (Osterberg 1935). Des études plus récentes ont estimé que la rétine humaine contient entre 80 et 110 millions de bâtonnets, (90 à 95% des photorécepteurs) ; et entre 4 et 5 millions de cônes, (entre 5 et 10% des photorécepteurs) (Farber et al. 1985; C. A. Curcio et al. 1990).

Les photorécepteurs de type bâtonnet sont responsables de la vision à l'obscurité, à la différence des photorécepteurs de type cône qui favorisent la vision précise et la distinction des couleurs. Chez l'humain et les primates supérieurs, la composition en photorécepteurs n'est pas la même sur toute la rétine. En effet, les bâtonnets sont extrêmement majoritaires au niveau de la rétine périphérique ; au niveau de la macula, la densité des cônes augmente très fortement. La fovea, au centre de la macula, étant composée exclusivement de cônes (Figure3). Chez les rongeurs, la rétine est composée presque exclusivement de bâtonnets (99%); en revanche, les deux types de photorécepteurs sont répartis uniformément sur toute la rétine (LaVail 1976).

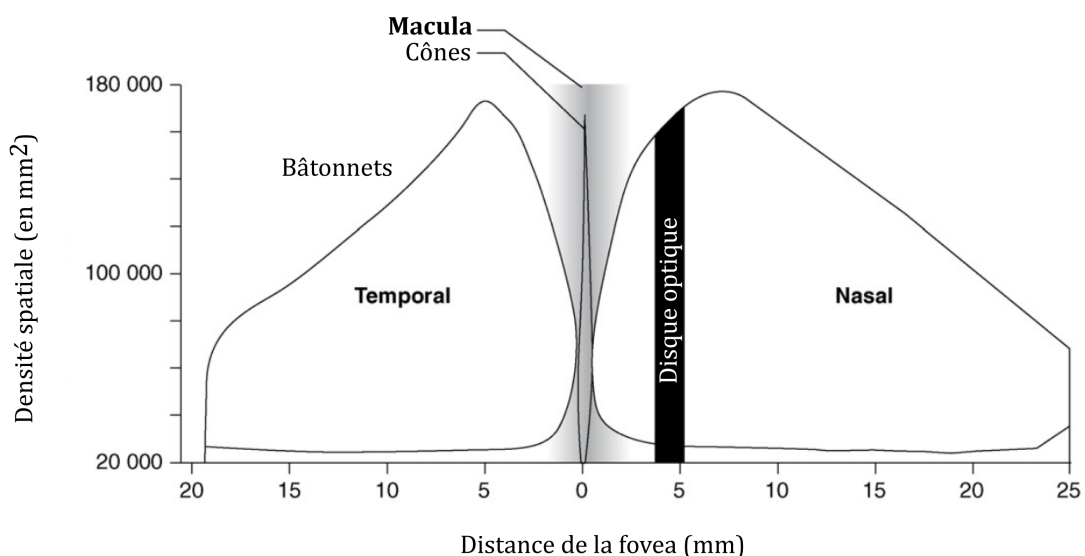


Figure 3: Distribution spatiale des photorécepteurs dans la rétine humaine.
(modifié d'après Marmorstein et al., 2007)

Les deux types de photorécepteurs ont la forme d'une longue cellule étroite qui comprend un segment interne et un segment externe reliés par un cil connecteur. Ces segments sont séparés du corps cellulaire par une membrane limitante externe (Figure 4). Le noyau des photorécepteurs est localisé dans la couche nucléaire externe de la rétine et les axones passent à travers la couche plexiforme externe où ils forment des terminaisons synaptiques (appelées pédicules pour les cônes et sphérules pour les bâtonnets) avec les cellules bipolaires et les cellules horizontales (Figure 2). Les segments externes des photorécepteurs contiennent les pigments visuels nécessaires à l'absorption des photons lumineux et à l'initiation du signal électrique (J.V. Forrester et al. 2015).

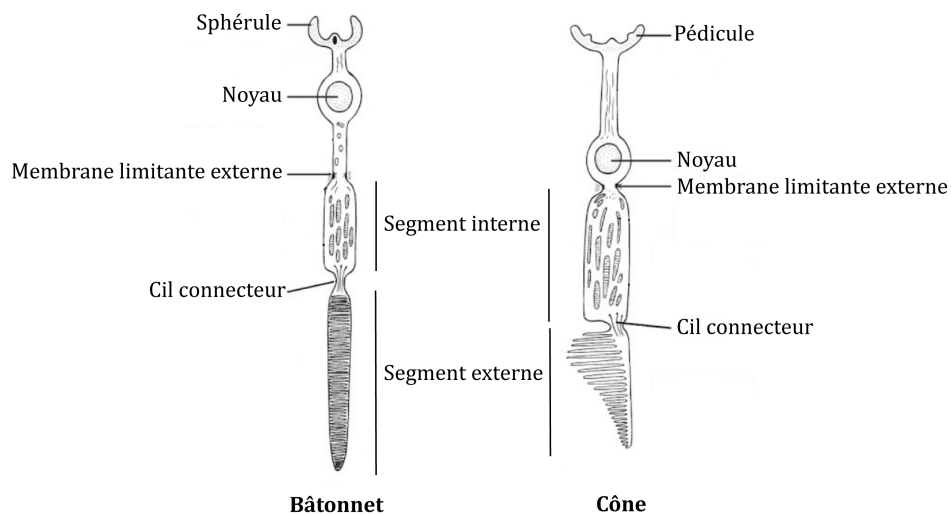


Figure 4: Les photorécepteurs de type cône et bâtonnet.

(modifié d'après Forrester et al., 2016). Les photorécepteurs sont constitués d'une terminaison synaptique, d'un noyau, d'un segment interne et d'un segment externe.

a) Les bâtonnets

Les photorécepteurs de type bâtonnets mesurent entre 100 et 120 μm de long. Leur pigment visuel, appelé rhodopsine, est localisé au niveau du segment externe, au sein de disques empilés les uns sur les autres et entourés d'une membrane plasmique (Figure 4). Les disques sont continuellement produits au niveau du cil connecteur et migrent jusqu'à l'extrémité du segment externe où ils seront phagocytés par les cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien. Ce point sera développé ultérieurement.

Les bâtonnets sont des photorécepteurs extrêmement sensibles à la lumière, et sont capables de répondre à un faible stimulus (un photon). Ils permettent la vision scotopique, c'est-à-dire en condition de faible luminosité, et ont un pic d'absorption maximal après une stimulation lumineuse de longueur d'ondes d'environ 500nm (Figure 5).

b) Les cônes

Les cônes sont généralement plus courts que les bâtonnets, et mesurent entre 60 et 75µm de long. A la différence des bâtonnets, c'est la membrane qui s'invagine sur elle-même plusieurs fois afin de créer une structure en lamelles étroitement empilées pour former le segment externe qui contient les pigments visuels.

Chez la plupart des être vivants diurnes, deux types de cônes existent : un type sensible aux faibles longueurs d'ondes, et un sensible aux grandes longueurs d'ondes. Chez l'humain et les primates supérieurs, un troisième type de cône existe ; on parle alors de rétine trichromatique. Les cônes sont classés en fonction des types de pigments visuels qu'ils contiennent, on distingue :

- les cônes S « bleus » (entre 5 et 10% des cônes), contiennent une majorité d'opsines spécifiques des longueurs d'ondes basses aux alentours de 420nm,
- les cônes M « verts », contiennent une majorité d'opsines spécifiques des longueurs d'ondes moyennes, aux alentours de 534nm,
- les cônes L « rouges », contiennent une majorité d'opsines spécifiques des grandes longueurs d'ondes aux alentours de 564nm.

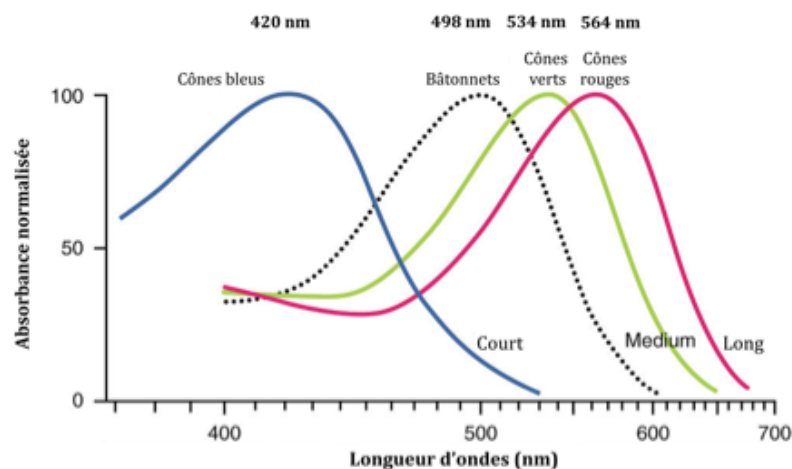


Figure 5: Longueurs d'ondes d'absorption des photorecepteurs chez l'Homme.
(modifié d'après Bowmaker et al., 1980)

Les photorécepteurs sont le siège des premières étapes de la phototransduction. Leurs pigments visuels captent les photons de l'environnement, ce qui induit une cascade d'activations biochimiques qui va aboutir à la formation d'un influx nerveux, transmis *via* les synapses des dendrites des photorécepteurs aux cellules bipolaires.

2) LES CELLULES BIPOLAIRES

Les cellules bipolaires sont les neurones qui reçoivent l'influx nerveux des photorécepteurs pour le transmettre aux cellules ganglionnaires.

Leurs corps cellulaires sont localisés au niveau de la couche nucléaire interne (Figure 2). Leurs dendrites forment majoritairement des synapses avec les photorécepteurs (mais aussi avec les cellules horizontales), alors que leurs axones forment des synapses avec les cellules ganglionnaires et les cellules amacrines.

Dans la fovea, chaque cellule bipolaire forme une synapse avec un seul cône, mais dans la rétine périphérique, une cellule bipolaire peut recevoir des informations provenant de 50 à 100 bâtonnets différents (J.V. Forrester et al. 2015).

3) LES CELLULES GANGLIONNAIRES

Les cellules bipolaires transmettent l'influx nerveux aux cellules ganglionnaires, qui sont les premières cellules à transmettre l'information sous forme d'un potentiel d'action au système nerveux central via le nerf optique. Leurs corps cellulaires sont localisés entre la couche des fibres nerveuses et la couche plexiforme interne (Figure 2).

Les axones des cellules ganglionnaires constituent les fibres nerveuses qui vont former le nerf optique. Les cellules ganglionnaires forment des synapses avec les cellules du corps genouillé latéral, partie du cerveau qui traite l'information visuelle.

La signalisation photorécepteur – cellules bipolaires – cellules ganglionnaires représente les connections verticales. Il existe également des connections horizontales, qui sont assurées par les cellules amacrines et horizontales. Ces connections permettent de faire le lien entre différentes régions de la rétine, et donc de modifier le message. Ces cellules permettent ainsi d'améliorer le contraste et la définition du stimulus visuel en inhibant ou en activant les cellules.

La couche de la rétine neurale est également composée de cellules qui ont un rôle de soutien et de protection du tissu nerveux qu'on appelle glie rétinienne.

4) LA GLIE RETINIENNE

Ces cellules ne participent pas à la transmission de l'influx nerveux mais ont un rôle de soutien et « d'entretien » du tissu. Parmi ces cellules, on retrouve les cellules gliales de Müller, les astrocytes et les microglies.

a) Les cellules gliales de Müller

Ce sont les principales cellules de support de la rétine neurale. Les noyaux des cellules gliales de Müller sont localisés dans la couche nucléaire interne, mais on retrouve leurs expansions cellulaires sur l'épaisseur de la rétine neurale jusqu'au niveau de la membrane limitante externe. Elles ont un rôle de soutien et favorisent une meilleure conduction de l'influx nerveux en isolant les cellules les unes des autres. Elles régulent également le taux de neurotransmetteurs au niveau des synapses (en particulier le glutamate) et participent au recyclage des photopigments des cônes.

b) Les astrocytes

Les astrocytes sont des cellules présentes principalement dans la couche des cellules ganglionnaires et la couche plexiforme interne. Grâce à leurs longs prolongements en forme d'étoiles, les astrocytes sont en contact avec les cellules ganglionnaires, mais également avec les vaisseaux sanguins. Ces cellules font parti de la barrière hémato-rétinienne : le recouvrement des vaisseaux rétiniens par les prolongements des astrocytes limite les échanges entre la circulation sanguine et la rétine. Ils participent également à l'absorption de produits du métabolisme neuronal.

c) Les cellules microgliales

Les microglies sont les principales cellules immunitaires résidentes du système nerveux central (Perry et Gordon 1988). En conditions pathologiques, elles migrent vers le tissu lésé et initient un processus d'inflammation et de réparation (Cuenca et al. 2014). Elles sont impliquées dans la clairance des neurones apoptotiques, ainsi que dans le développement des synapses rétiniennes. Elles sont aussi nécessaires à la maintenance des structures synaptiques dans la rétine adulte et participent aux transmissions synaptiques qui ont lieu pendant le cycle visuel normal (X. Wang et al. 2016). Le rôle des cellules microgliales sera développé plus en détails dans la suite de l'étude.

B. L'ÉPITHÉLIUM PIGMENTAIRE RÉTINIEN (EPR)

L'EPR constitue la couche la plus externe de la rétine. Il sert notamment de support métabolique pour les segments externes des photorécepteurs. La capacité des photorécepteurs à détecter la lumière dépend de leur interaction avec les cellules pigmentées de l'EPR.

1) ORGANISATION CELLULAIRE

L'EPR est constitué d'une monocouche de cellules hexagonales, pigmentées, connectées entre elles par des jonctions serrées, qui contiennent les organites nécessaires pour la phagocytose des segments externes des photorécepteurs. Les cellules de l'EPR forment un épithélium polarisé : sa membrane apicale fait face aux segments externes des photorécepteurs, et se prolonge grâce à deux types de microvillosités : de longs microvilli qui augmentent la surface d'échanges de la membrane et de courts microvilli qui contribuent à la phagocytose rétinienne quotidienne (Boulton et Dayhaw-Barker 2001). Ces microvillosités permettent d'étendre la surface de l'EPR de près de 30 fois, ce qui facilite ses interactions avec les photorécepteurs (Boulton et Dayhaw-Barker 2001; Cuenca et al. 2014). Du côté de sa membrane basale, les cellules de l'EPR sont en contact avec la membrane de Bruch, qui représente une zone d'interactions entre l'EPR et les vaisseaux sanguins de la choroïde.

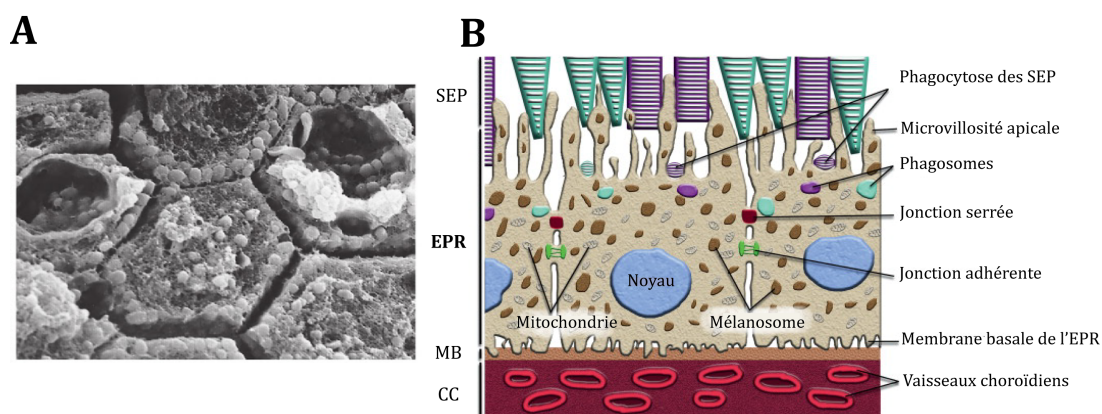


Figure 6: L'épithélium pigmentaire rétinien.

A : Photo de microscopie électronique à balayage de la surface apicale d'épithélium pigmentaire rétinien (d'après Forrester et al., 2016). B : Représentation schématique des interactions entre l'épithélium pigmentaire rétinien (modifié d'après Carr et al., 2013). EPR : épithélium pigmentaire rétinien ; SEP : segments externes des photorécepteurs ; MB : membrane de Bruch ; CC : choriocapilaire.

2) ROLES BIOLOGIQUES DE L'EPR

L'EPR est un tissu aux multiples fonctions ; il protège la rétine contre la photo-oxydation, transporte des nutriments, recycle le photopigment du cycle visuel, phagocyte les segments externes des photorécepteurs, sécrète de nombreuses molécules et enfin régule l'inflammation de l'espace sous-rétinien (Strauss 2005).

a) Protection contre la photo-oxydation

La rétine est le seul tissu neuronal directement exposé à la lumière. Ce contexte favorise la photo-oxydation des lipides, qui sont très toxiques pour les cellules rétiniennes (Girotti et Kriska 2004). De plus, les photorécepteurs sont des cellules à forte activité métabolique ; ils nécessitent un apport important en nutriments et en oxygène (Yu et al., 2001), ce qui génère la formation d'espèces réactives de l'oxygène, également toxiques (Miceli, Liles, et Newsome 1994).

L'EPR participe à la défense efficace de la rétine contre les radicaux libres, l'exposition photo-oxydante et l'énergie lumineuse via trois mécanismes. Les mélanosomes, constituants des cellules de l'EPR, sont capables d'absorber la lumière et de limiter sa réflexion dans l'œil (Boulton et Dayhaw-Barker 2001). L'EPR produit des enzymes antioxydantes (comme la superoxide dismutase et la catalase) ainsi des antioxydants non-enzymatiques (comme le glutathion, l'ascorbate, l' α -tocophérol, des caroténoïdes et de la mélanine) qui vont neutraliser les espèces réactives de l'oxygène (Liles, Newsome, et Oliver 1991; Beatty et al. 2000).

Malgré ces différentes étapes de contrôles, les dommages oxydatifs sont inévitables. Les cellules de l'EPR sont également capables de reconnaître les lipides, protéines ou acides nucléiques endommagés, afin de les réparer ou de les remplacer (Arking 1998).

b) Le transport de nutriments

Grâce à ses jonctions serrées, l'EPR participe à la barrière hémato-rétinienne et empêche tout contact entre les vaisseaux de la choroïde et les segments externes des photorécepteurs. Cette fonction de barrière implique un isolement de l'espace sous-rétinien face aux vaisseaux sanguins. Le transport épithélial permet donc de fournir des nutriments aux photorécepteurs, de contrôler l'homéostasie ionique de l'espace sous-rétinien et d'éliminer l'eau et les métabolites du côté rétinien.

i. Transport de la circulation sanguine vers la rétine

Les photorécepteurs ont besoin d'un apport de métabolites essentiels à leur fonctionnement. Pour transporter le glucose qui permet un apport en énergie, l'EPR exprime fortement les transporteurs au glucose GLUT1 et GLUT3 (Ban et Rizzolo 2000; Senanayake et al. 2006). Les acides gras, et particulièrement l'acide docosahexaénoïque, sont des constituants importants des membranes des neurones et des photorécepteurs (R. E. Anderson et al. 1992). Les photorécepteurs étant incapables de synthétiser ces acides gras, ils sont fournis par l'EPR depuis la circulation sanguine (Bazan et Gordon 1992). Tous ces nutriments sont transportés depuis la circulation sanguine vers les photorécepteurs par l'EPR. L'EPR transporte également de l'oxygène.

ii. Transport de l'espace sous-rétinien vers la circulation sanguine

En fonctionnant, les photorécepteurs produisent de l'eau et de l'acide lactique (Marmor 1999) qui s'accumulent dans la rétine. L'élimination constante de l'eau est nécessaire pour le bon fonctionnement de la rétine (Hamann 2002).

L'eau présente au niveau de la rétine interne est transportée par les cellules de Müller, et celle présente dans l'espace sous-rétinien par l'EPR (Moseley et al. 1984; Nagelhus et al. 1999). Elle est éliminée de l'espace sous-rétinien grâce à des canaux spécifiques : les aquaporines-1, situées dans les membranes basales et apicales de l'EPR (Hamann et al. 1998; Stamer et al. 2003). Ces mouvements d'eau sont couplés à un transport d'ions Cl⁻ et K⁺ (Hamann 2002; J. G. Hu et al. 1996). C'est la présence de pompes Na⁺/K⁺ ATPases dans la membrane apicale de l'EPR qui va créer un gradient ionique permettant le passage d'ions et d'eau à travers les cellules de l'EPR vers la choroïde (Rizzolo 1998).

c) Recyclage du photopigment

Les photorécepteurs initient la phototransduction via l'isomérisation du 11-cis rétinol en tout-trans rétinol. Cette étape est suivie de la cascade d'activations biochimiques de la phototransduction. Une fois ce cycle réalisé, les photorécepteurs sont incapables de ré-isomériser le tout-trans rétinol ; ils sont donc momentanément insensibles à la lumière (Okada et al. 2001). Afin de procéder au recyclage du photopigment, le tout-trans rétinol est transporté dans l'EPR grâce à la protéine IRBP (Carlson et Bok 1992). Une fois dans l'EPR, le tout-trans rétinol est re-isomérisé en 11-cis rétinol grâce à une cascade d'activations biochimiques, puis est renvoyé vers les photorécepteurs. On appelle ce processus le cycle visuel du rétinol (Lamb et Pugh 2004).

Il a lieu dans l'EPR pour le photopigment des bâtonnets (Zimmerman 1974) ; concernant les cônes, le processus est moins clair : une partie du photopigment serait recyclée dans l'EPR, et une autre partie dans les cellules gliales de Müller (Mata et al. 2002).

d) La phagocytose des segments externes des photorécepteurs

Les photorécepteurs, exposés à une forte intensité lumineuse, sont soumis à des dommages oxydatifs ; la concentration en éléments photo-toxiques augmente dans ces cellules (Beatty et al. 2000). Afin de maintenir l'homéostasie, leurs segments externes sont continuellement renouvelés à partir du cil connecteur (Bok 1993); Nguyen-Legros and Hicks et al., 2000). La partie la plus externe du segment externe, qui a accumulé le plus de toxicité est phagocytée par l'EPR, et dégradée en molécules essentielles comme l'acide docosahexaénoïque ou le rétinol qui seront redistribués aux photorécepteurs (Bibb et Young 1974). Ce processus suit le rythme circadien : il a été montré que la quantité de phagosomes dans les cellules de l'EPR atteint son maximum 2h après exposition à la lumière ; cette quantité étant restreinte le reste du temps (LaVail 1976). Les phénomènes de renouvellement et de phagocytose des segments externes ont lieu de sorte que la taille du segment externe reste constante. Chaque cellule de l'EPR interagit avec 20 à 30 photorécepteurs (I. Bhutto et Luty 2012). On estime que sur une durée de vie de 70 ans, une cellule d'EPR ingère et dégrade environ 300 000 000 de disques (J. Marshall 1987). Chez l'humain, la totalité d'un segment externe de photorécepteur est phagocytée en 10 jours environ (R. W. Young 1967).

e) Fonctions sécrétrices

L'EPR est un tissu capable de produire et sécréter de nombreux facteurs (Tanihara et al. 1993) aussi bien pour la maintenance de l'intégrité structurelle de la rétine (Cao et al. 1999; Steele et al. 1993) que pour la choroïde (Witmer et al. 2003). Parmi ces messagers, on peut notamment citer le pigment epithelium derived factor (PEDF) (D. W. Dawson et al. 1999; King et Suzuma 2000), le Vascular endothelial growth factor (VEGF) (Adams et al. 1993; Lu et al. 1998; Witmer et al. 2003), des fibroblastes growth factors (FGF-1, FGF-2, and FGF-5) (Sternfeld et al. 1989; Kitaoka et al., 1994), le transforming factor beta (TGF- β) (Tanihara et al. 1993; Matsumoto et al., 1994), l'insulin-like growth factor-1 (IGF-1) (Martin et al., 1992), le platelet-derived growth factor (PDGF) (Campochiaro et al. 1989; Campochiaro et al. 1994), des membres de la famille des interleukines (Wenkel et Streilein 2000; Streilein et al. 2002) ou encore différents

inhibiteurs de métalloprotéases matricielles (TIMP) (Alexander et al. 1990; Ruiz et al. 1996; Della et al. 1996).

A l'état physiologique, certains facteurs sont constamment exprimés et permettent le maintien et l'intégrité structurelle des tissus voisins. Par exemple, le PEDF est un facteur neurotrophique, qui est sécrété depuis la membrane apicale des cellules de l'EPR, vers la rétine (King et Suzuma 2000). Son rôle est de stabiliser la rétine neurale en prévenant son apoptose (Cayouette et al. 1999; Becerra et al. 2004). En revanche, le VEGF et les TIMP sont sécrétés du côté basal et sont requis pour réguler la structure de l'endothélium de la choroïde (Witmer et al. 2003). D'autres facteurs sont, quand à eux, exprimés lorsque la rétine ou la choroïde sont soumis à des conditions de stress, comme l'hypoxie ou le stress métabolique. L'EPR secrète également des cytokines pro ou anti-inflammatoires, et joue un rôle de régulateur immunitaire extrêmement important pour l'homéostasie de la rétine. Ce rôle particulier de l'EPR sera développé ultérieurement.

Toutes ces fonctions sont essentielles et un défaut de l'une d'entre elles peut conduire à la mort des photorécepteurs, à la dégénérescence rétinienne, à la perte de la vision pouvant conduire à la cécité (Cuenca et al. 2014).

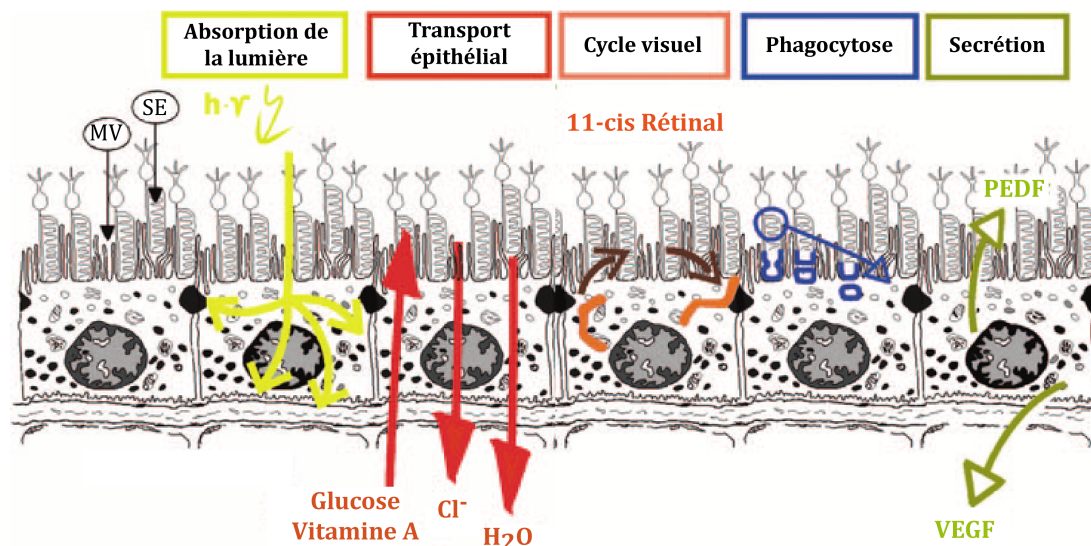


Figure 7: Fonctions biologiques de l'épithélium pigmentaire rétinien.

(modifié d'après Strauss et al., 2005). MV : microvillosités ; SE : segments externes des photorécepteurs.

II. La dégénérescence maculaire liée à l'âge

La DMLA est une pathologie oculaire chronique et dégénérative qui affecte la macula. Elle est multifactorielle, et les principales causes sont l'âge, la génétique et les facteurs de risques environnementaux. Malgré le développement de nouvelles molécules thérapeutiques, elle représente l'une des premières causes de handicap visuel chez les personnes âgées dans nos sociétés (Bourne et al. 2014; Wong et al. 2014).

A. DEFINITION

La DMLA a été décrite pour la première fois en 1875 comme étant une « maladie choroïdo-rétinienne centrale symétrique chez les personnes âgées » (Hutchinson 1875). Aujourd'hui, on parle d'une maladie dégénérative rétinienne invalidante, d'évolution chronique, qui se manifeste cliniquement après l'âge de 50 ans. Elle est définie comme une altération lésionnelle irréversible de la macula, petite zone de diamètre entre 2 et 5mm, au centre de la rétine qui conduit à la destruction des cellules neurosensorielles et à une baisse de l'acuité visuelle (Curcio et al., 1996).

Les problèmes visuels causés par la DMLA sont en général de deux types qui peuvent se combiner : un scotome (tâche noire) central peut apparaître dans le champs visuel ainsi que des métamorphopsies (déformations des images perçues). En revanche, la vision périphérique reste intacte, les patients atteints de DMLA ne deviennent jamais totalement aveugles.

B. FORMES CLINIQUES DE LA MALADIE

Actuellement, on différencie le stade précoce de la maladie, qu'on appelle maculopathie liée à l'âge (MLA) des stades tardifs. La MLA peut évoluer ou non en DMLA tardive, pour laquelle il existe deux formes cliniques distinctes : la DMLA sèche ou atrophique ; et la DMLA humide ou exsudative.

Une des caractéristiques communément observée dans les formes précoces et tardives de la DMLA est la rupture de l'immunosuppressivité physiologique de l'espace sous-rétinien ; et l'accumulation des Phagocytes Mononuclées (PMs) dans cet espace (Guillonnet et al. 2017). Ce point sera développé dans le chapitre suivant.

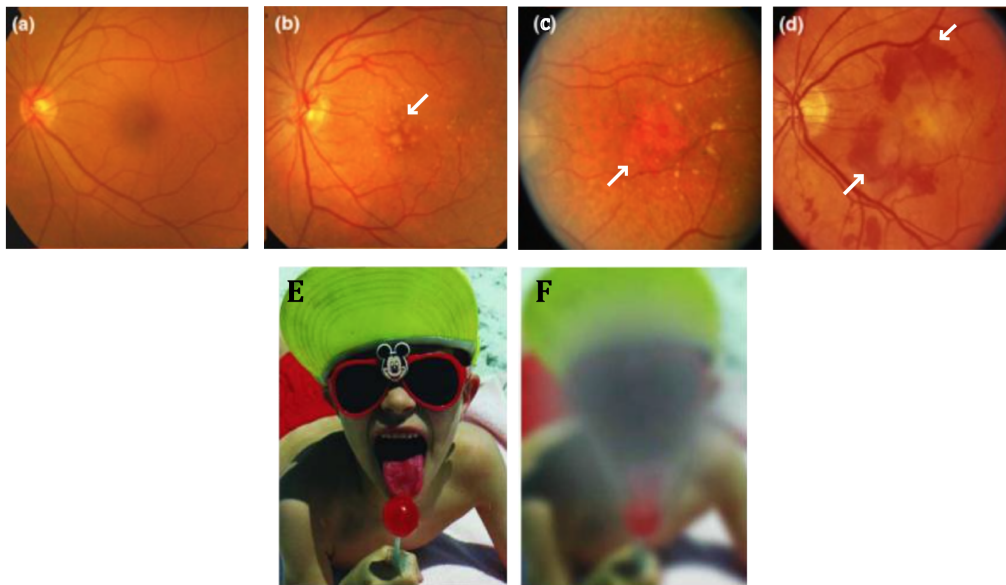


Figure 8: Les différents stades de la dégénérescence maculaire liée à l'âge.

Fig. A-D : fond d'œil de patients à différents stades de la maladie. A : patient sain. B : patient atteint de MLA avec une présence de petits drusen sur la rétine (flèche). C : patient atteint d'AG avec la présence d'une zone d'atrophie importante (flèche) D : patient atteint de DMLA exsudative avec une présence importante de néovaisseaux (flèches). (modifiées d'après Cheung et al., 2014). E : vision d'un patient sain. F : vision d'un patient atteint d'une forme tardive de DMLA (modifiées d'après Chen et al., 2007).

1) LA MACULOPATHIE LIEE A L'AGE : FORME PRECOCE DE LA MALADIE

Le stade précoce de la maladie, aussi appelé MLA (Bird et al. 1995), est caractérisé par des hypo ou hyper pigmentations de l'EPR, et par une accumulation de dépôts jaunâtres, appelés drusen, sous les cellules de l'EPR (Figure 8).

Ces protrusions déforment la rétine et peuvent causer des métamorphopsies. On note également une diminution locale de la couche des photorécepteurs (Schuman et al. 2009) ; ainsi qu'une perte de sensibilité (Miden et al. 1994). A ce stade, il n'y a pas de diminution significative de fonctions visuelles.

a) Altérations pigmentaires de l'EPR

De nombreuses observations ont été faites dans des cellules humaines d'EPR : avec la sénescence, elles accumulent de la lipofuscine (Yin 1996; Boulton et al. 2004). Il s'agirait d'une granule auto-fluorescente, composée principalement de débris de phagocytose des segments externes des photorécepteurs et qui contiendrait notamment des protéines et des lipides oxydés (Chio et al. 1969; Eldred et Katz 1988; Chowdhury et al. 2004). Le rôle de l'accumulation de lipofuscine dans les cellules de l'EPR dans le développement de la DMLA reste encore à définir. Plusieurs études ont montré que la lipofuscine pourrait induire la génération d'espèces radicalaires (Gaillard et al. 1995;

Rózanowska et al. 1995). D'autres expériences ont montré que l'exposition de cellules de l'EPR en culture à la lipofuscine entraîne une peroxydation lipidique, une oxydation des protéines, une perte de l'intégrité lysosomale et finalement la mort des cellules de l'EPR (Davies et al. 2001; Shamsi et Boulton 2001).

La lipofuscine pourrait également interférer avec les propriétés anti-oxydantes de la mélanine (Boulton et al. 1993; Rózanowska et al. 1995; Schütt et al. 2002). Si la corrélation entre la lipofuscine 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). Ces phénomènes d'accumulation de lipofuscine dans les cellules de l'EPR semblent être à l'origine des zones d'hyper-pigmentation observées lors de l'examen clinique.

Des phénomènes d'hypo-pigmentation de l'EPR peuvent également être observés et résultent d'une diminution d'expression de mélanine. Il a été démontré que la concentration en lipofuscine est inversement proportionnelle avec la teneur en mélanine. Ces plages d'hypo-pigmentation peuvent évoluer vers des zones d'atrophie, caractéristiques de la forme atrophique de la DMLA (Bressler et al. 1990; Klein et al. 1991).

b) Drusen

Décrits pour la première fois en 1855 (Donders 1855), les drusen correspondent à des amas de matériaux extracellulaires, de couleur jaunâtre et localisés entre la membrane basale de l'EPR et la couche interne de la membrane de Bruch sous la rétine centrale (Curcio et al., 1999; Sarks 1976). Ils sont principalement constitués de débris de membranes ou de lipoprotéines, mais leur composition exacte reste à ce jour incertaine. On distingue plusieurs types de drusen, classés en fonction de leur taille et de leur morphologie:

- les « petits » drusen, ou drusen miliaires, de taille inférieure à 63µm. Ils sont de forme ronde, aux bords bien délimités. Ces types de drusen sont le plus souvent simplement associés aux signes de vieillesse (Sarks et al. 1999). On les retrouve sur toute la surface de la rétine périphérique (Rudolf et al. 2008).
- les « gros » drusen, ou drusen séreux, de taille supérieure à 125µm. On les appelle aussi « drusen diffus » : ils ont une forme irrégulière et leurs contours sont flous.

Ces drusen ne sont présents qu'au niveau de la macula et sont très symptomatiques de la MLA (Gass 1973; Klein et al. 2004).

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

Les yeux des patients qui contiennent des drusen séreux ($>125 \mu\text{m}$) peuvent progresser et développer une DMLA (environ 15% d'après la Beaver Dam Study sur 10 ans (Klein et al. 2007) ; 30% d'après la Blue Mountain Study sur 6 ans (Mitchell et al. 1996)), régresser (environ 25% d'après la Beaver Dam Study), ou bien rester stable pendant des années (Klein et al. 2004; Wang et al. 2003).

Cette classification morphologique a également fait naître la catégorie des drusen « réticulaires », localisés sur la membrane apicale des cellules de l'EPR, et donc en contact direct avec les photorécepteurs. Ce type de drusen est fortement associé à la DMLA (Klein et al. 2008).

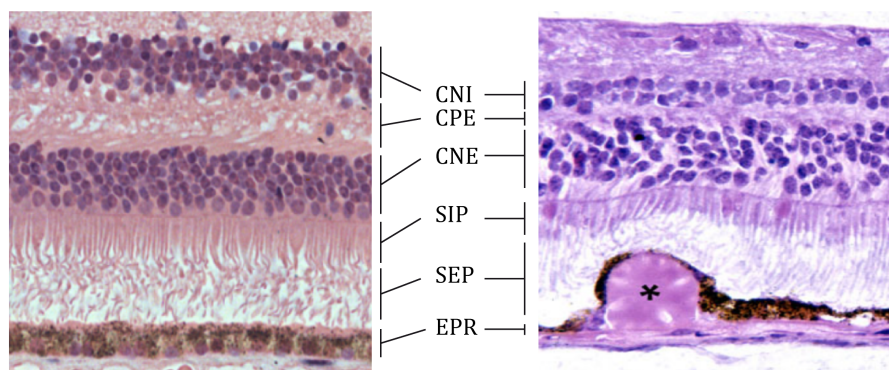


Figure 9: Drusen et maculopathie liée à l'âge.

Coupes transversales de rétines humaines, coloration hémoxyciline/éosine. A gauche : rétine saine. A droite : présence d'un drusen sous l'épithélium pigmentaire rétinien (astérisque). EPR : épithélium pigmentaire rétinien, SEP : segments externes des photorécepteurs, SIP : segments internes des photorécepteurs, CNE : couche nucléaire externe, CPE : couche plexiforme externe, CNI : couche nucléaire interne. (modifiées d'après Ramirez et al., 2014 et Hageman et al., 2007)

A ce jour, environ 11% de la population européenne est atteinte de MLA (Wong et al. 2014). Les raisons pour lesquelles certains patients vont progresser ou non à des stades avancés de la maladie ne sont pas encore complètement connues. Les interactions entre

certaines variantes génétiques protecteurs ou prédisposant pour la maladie, associés aux facteurs environnementaux jouent un rôle dans cette progression (Yu et al. 2012).

2) LA DMLA EXSUDATIVE (OU FORME HUMIDE)

La DMLA exsudative se caractérise par la prolifération de vaisseaux sanguins qui envahissent la rétine neurale. Ces néovaisseaux peuvent être localisés à deux endroits :

- sous l'EPR, les vaisseaux sont dits occultes car ils sont invisibles en examen du fond d'œil (mais on peut les révéler par une angiographie au vert d'indocyanine). Ils sont issus de la choroïde, traversent la membrane de Bruch et prolifèrent sous l'EPR, sans le traverser. Ils représentent la très large majorité (85%) des néovascularisations observées (Gass 1984; Lafaut et al. 2000),
- sur l'EPR, les vaisseaux sont dits classiques : ils sont issus de la choroïde et traversent l'EPR pour proliférer au sein de la rétine neurale. Ils sont facilement identifiables à l'examen du fond d'œil (Gass 1973).

Ces vaisseaux anormaux sont pour la plupart originaires de la choroïde, il s'agit de néovascularisation choroïdienne (NVC). Mais pour 10 à 15% des cas de DMLA exsudative, la néovascularisation provient du réseau vasculaire rétinien, on parle alors de prolifération angiomateuse rétinienne (Yannuzzi et al. 2001).

Les néovascularisations sont constituées de capillaires immatures extrêmement fragiles qui laissent échapper du liquide et se rompent facilement ; la forme exsudative de la DMLA est communément associée à des œdèmes rétiniens et à des exsudations sous-rétiniennes aussi bien de sang que de lipides. Ces exsudations sont fréquemment la cause de décollements de rétine ou d'EPR. Non traitée, la DMLA exsudative conduit à la formation d'une membrane fibreuse néovasculaire et de cicatrices disciformes sous-rétiniennes (Sarks et al. 1988). Toutes ces perturbations peuvent entraîner des baisses de vision très sévères et brutales, en l'espace de quelques jours seulement.

3) L'ATROPHIE GEOGRAPHIQUE (OU FORME SECHE)

L'AG se caractérise par la formation de zones d'atrophies : les cellules de l'EPR dégèrent progressivement, ce qui entraîne des dommages collatéraux pour la choroïde mais également pour la couche des photorécepteurs qui va aussi dégénérer (Sarks 1976). Tous ces phénomènes aboutissent à une perte de vision importante, lente et progressive.

La lésion initiale se développe le plus souvent en périphérie de la fovea (Sarks et al. 1988) et s'étend lentement à travers la rétine centrale et éventuellement la fovea. Dans les zones d'atrophie, malgré l'absence d'EPR, quelques cônes résiduels (et dans une moindre mesure des bâtonnets) survivent ; mais il leur manque leurs segments internes et externes, nécessaires à la perception de la lumière (Bird et al. 2014; Eandi et al. 2016). Dans les zones de transition des lésions, directement périphériques aux aires de dégénérescence de l'EPR, le nombre de bâtonnets décroît dramatiquement en comparaison aux régions plus distantes de la lésion, malgré la présence d'EPR (Bird et al. 2014; Eandi et al. 2016). Ces changements anatomiques se traduisent cliniquement par une perte de sensibilité rétinienne (Meleth et al. 2011). Le nombre de cônes change peu dans les zones de transition, mais ils perdent leurs segments externes (Bird et al. 2014; Eandi et al. 2016).

Cliniquement, les lésions de l'AG provoquent des scotomes, qui affectent sévèrement l'acuité visuelle lorsque la lésion touche la fovea.

Dans les deux formes de cette pathologie, le lien physique et fonctionnel entre l'EPR et les photorécepteurs d'une part, et l'EPR et la choroïde d'autre part, est altéré, ce qui conduit à la mort cellulaire des tissus via des mécanismes d'apoptose (Bhutto et al. 2012).

C. EPIDEMIOLOGIE

Toutes formes confondues, la DMLA représentent environ 8% des cas de handicaps visuels dans le monde ; elle fait partie des premières causes de handicap visuel dans les pays industrialisés chez les personnes de plus de 60 ans (Wong et al. 2014).

Grâce aux données combinées de trois études majeures (Klein et al. 2007; Hofman et al. 2015; Mitchell et al. 1996), on estime la prévalence des DMLA tardives entre 0 et 2% chez les personnes âgées de 55 à 64 ans. Cette prévalence augmente très fortement pour atteindre 13% chez les personnes de plus de 85 ans.

La différence de prévalence de la DMLA en fonction du sexe n'a jamais été clairement démontrée à ce jour (Wong et al. 2014; Klein et al. 2007; Hofman et al. 2015; Mitchell et al. 1996). En revanche, il semble y avoir un effet de l'origine géographique dans la prévalence de toutes les formes de DMLA. En effet, la prévalence de la MLA atteint 11,2% pour la population européenne, alors qu'elle se situe entre 6 et 8% pour la

population asiatique. On retrouve cette tendance en prenant en compte toutes les formes de DMLA. La population européenne présente une prévalence plus importante pour une DMLA atrophique en comparaison aux autres populations (africaine, asiatique ou hispanique). La prévalence pour la forme exsudative est la même pour toutes les populations (Wong et al. 2014).

Les modèles prédictifs indiquent que le nombre de personnes atteintes de DMLA (toutes formes confondues) atteindra 196 millions en 2020 et jusqu'à 288 millions de cas en 2040 dans le monde (Wong et al. 2014). En France, les projections de l'institut national de la statistique et des études économiques (INSEE) estimaient en 2005 que le nombre de cas de DMLA augmenterait de 50 % en vingt ans et doublerait en trente ans, atteignant ainsi 1,2 million de cas (étude INSEE, 2005).

D. FACTEURS DE RISQUE

La DMLA est une maladie complexe et multifactorielle qui résulte des interactions entre l'âge, des facteurs de risque génétique et des facteurs de risque environnementaux.

1) FACTEURS ENVIRONNEMENTAUX

L'âge, le tabac, l'obésité et possiblement l'exposition à la lumière représentent les principaux facteurs de risque environnementaux ; mais d'autres facteurs comme l'hypertension pourraient également avoir un rôle dans la survenue de la maladie (Adams et al. 2011; Chakravarthy et al. 2010; Schick et al. 2016).

a) Age

Comme décrit ci-dessus, l'âge est le principal facteur de risque de la DMLA. L'implication de l'âge dans la survenue de la DMLA est observé par toutes les études épidémiologiques : le risque de développer la maladie augmente exponentiellement avec l'âge. En effet, si les premiers signes cliniques sont observables à partir de 50 ans, très peu de personnes déclarent la maladie. En revanche, environ 15% de la population de plus de 80 ans est atteinte de DMLA (Klein et al. 2004).

b) Exposition à la lumière

Il a été suggéré que la lumière excessive, bien qu'elle soit difficile à quantifier, soit associée à la survenue des formes précoces et tardives de la DMLA (Fletcher et al. 2008; Schick et al. 2016). Le fait de subir une intervention chirurgicale de la cataracte pourrait

également constituer un facteur de risque : l'exposition de la rétine à la lumière se retrouve subitement augmentée (Chakravarthy et al. 2010).

Chez les sujets âgés, qui combinent plusieurs facteurs de risque, l'exposition à une lumière trop intense (comme le soleil se reflétant sur la neige ou sur l'eau), pourrait avoir un rôle dans le déclenchement de la maladie.

c) Tabac

Le tabac représente l'un des facteurs majeurs. Il a été montré que le fait de fumer régulièrement augmente de 1,7 à 3,4 fois le risque de développer une DMLA (Chakravarthy et al. 2010). On ne sait pas encore quel rôle joue le tabac dans la survenue de la maladie. En revanche, des observations ont révélé que l'exposition à la cigarette exacerbe certaines maladies auto-inflammatoires et auto-immunes (Arnsperger et al. 2010), suggérant que le tabac affecte les voies de signalisation de l'inflammation.

A ce jour, on ne sait pas si les lésions dues au tabac touchent d'abord les cellules oculaires ou les cellules inflammatoires ; ainsi que le rôle de cette dérégulation dans la pathologie de la DMLA.

d) Obésité

Depuis les années 1980, l'incidence de l'obésité a plus que doublé dans le monde. Les estimations indiquaient qu'en 2014, plus de 1,9 milliard de personnes seraient en surpoids, parmi lesquels 600 millions considérées obèses (World Health Organisation, 2015). Les conséquences liées à l'obésité sont multiples, on peut notamment citer le syndrome métabolique, le diabète de type 2 ou encore les maladies cardiovasculaires ; et sont devenues un réel problème de santé mondiale (Taubes 2009). Plus récemment, les liens entre obésité et maladies neurodégénératives (comme la maladie de Parkinson, ou les scléroses multiples (Hu et al. 2006; Marrie et Beck 2014), ont été établis. Plusieurs études épidémiologiques ont également fait le lien entre obésité et DMLA, en utilisant le ratio taille/hanche comme une mesure de l'obésité abdominale. Par exemple, la Melbourne Collaborative Cohort Study a montré que chez les hommes, une augmentation de 0,1 dans le ratio taille/hanche était associée à une augmentation de 13% de risque de développer une MLA et à une augmentation de 75% de développer une DMLA (Adams et al. 2011). Similairement, une autre étude a montré qu'une diminution de ce ratio de 3% ou plus était associée à une diminution de 29% de risque de développer une DMLA après 6 ans de suivi (Peeters et al. 2008).

Ces études suggèrent que l'obésité chez les hommes, et particulièrement l'obésité viscérale, pourrait représenter le deuxième facteur de risque pour la DMLA après le tabac. Chez les patients obèses, un grand nombre d'adipocytes sont nécrotiques. La présence de ces cellules mourrantes attire les macrophages qui vont les phagocyter (Cinti et al. 2005). Le nombre de macrophages présents augmente dans cet espace, et notamment dans la graisse viscérale qui entoure les organes internes (Greenberg and Obin, 2006; Odegaard and Chawla, 2013), où ils vont sécréter des facteurs pro-inflammatoires comme CCL2, IL-6, TNF- α ou encore IL-1 β (Li et al., 2010; Park et al., 2005). De plus, il a été récemment montré que la composition du microbiote intestinal était associée à la DMLA (Zinkernagel et al., 2017). Le régime riche en graisse, favorisant la sécrétion de facteurs pro-inflammatoires, change la composition du microbiote intestinal, qui favorise la diffusion de composants bactériens dans le sang (Andriessen et al., 2016). Ces composés sont capables d'activer le système de l'immunité innée, et exacerbent la neuro-inflammation observée dans la DMLA. Un mécanisme similaire a cependant été observé de façon indépendante à l'obésité (Zinkernagel et al. 2017), ce qui suggère que ce mécanisme ne toucherait pas que les patients en surpoids.

2) FACTEURS GENETIQUES

L'importance des facteurs génétiques s'illustre par le fait que le risque de développer la maladie augmente de 5 à 10 fois si un parent ou un proche est atteint (Chakravarthy et al. 2010; Shahid et al. 2012).

Des polymorphismes du facteur H du complément (CFH), des isoformes de l'apolipoprotéine E, ou encore du chromosome 10q26 (situé sur les gènes high temperature requirement A serine peptidase 1 [*HTRA1*], age related maculopathy susceptibility 2 [*ARMS2*] et Pleckstrin homology domain-containing family A member 1 [*PLEKHA1*]), sont les facteurs génétiques majeurs prédisposant à la DMLA (Swaroop et al., 2007).

a) Polymorphisme du facteur H du complément

Un variant du gène du facteur H du complément (*CFH*) a été identifié comme étant le facteur génétique majeur qui prédispose à la DMLA (The AMD Gene Consortium 2013; Fritsche et al. 2014; Magnusson et al. 2005).

Le CFH a été décrit pour sa capacité à inhiber la voie alternative du complément. La voie du complément fait parti du système immunitaire inné, utile pour neutraliser les

pathogènes, et notamment les bactéries, grâce à une cascade d'activation de facteurs. Chez l'humain, le gène du *CFH* est localisé sur le chromosome 1q32. La DMLA est associée à un variant du à un polymorphisme d'un seul nucléotide (SNP) du gène du *CFH* : le rs1061170 (Edwards et al. 2005; Hageman et al. 2005; Haines et al. 2005; Klein et al. 2005). Ce SNP induit la substitution de l'histidine 402 en tyrosine (Y402H). L'association avec la DMLA a été observée pour les deux formes de DMLA, mais de façon plus prononcée pour l'AG (The AMD Gene Consortium 2013; Seddon et al. 2007).

Notre équipe a récemment révélé un des rôle de CFH dans la physiopathologie de la DMLA : le variant Y402H associé à la DMLA a une capacité augmentée d'inhiber l'élimination de PMs, ce qui entraîne une inflammation chronique dans l'espace sous-rétinien (Calippe et al. 2017). L'inflammation de l'espace sous-rétinien jouant un rôle critique dans le développement de la maladie ; ce point sera développé ultérieurement.

b) L'apolipoprotéine E

Chez l'humain, le gène de l'apolipoprotéine E (APOE) comporte trois variants génétiques communs : APOE2, APOE3 et APOE4. APOE est exprimée par le foie et est la principale lipoprotéine du cerveau et de la rétine (Anderson et al. 2001; Mahley et Rall 2000). Elle est donc fortement exprimée par les hépatocytes, mais également par les cellules de l'EPR (Ishida et al. 2004) et par les phagocytes mononucléés (PMs), comme les macrophages (MΦs) ou les cellules microgliales (Levy et al. 2015; Peri et Nüsslein-Volhard 2008). APOE joue un rôle majeur dans le métabolisme des lipides et notamment dans le transport du cholestérol.

Récemment, notre équipe a montré qu'un excès d'APOE peut déstabiliser les radeaux lipidiques, qui séparent les différents composants du cluster de récepteurs de l'immunité innée (IIRC) à l'état physiologique, et inhiber ainsi leur auto-activation. Ainsi, APOE induit la sécrétion de l'interleukine-6 (IL-6), en l'absence du ligand de IIRC par les PMs dans l'espace sous-rétinien (Levy et al. 2015). Cette cytokine pro-inflammatoire maintient les conditions inflammatoires de l'espace sous-rétinien, ce qui perturbe l'homéostasie du tissu. Plusieurs études ont montré que les porteurs de l'allèle APOE2 présentent un risque accru de développer une DMLA, tandis que l'allèle APOE4 protège contre la DMLA par rapport à l'allèle APOE3, le plus courant (Mahley et Rall 2000; McKay et al. 2011). En accord avec ces publications, les travaux récents de l'équipe ont

révélé que l'allèle APOE2 induit une augmentation de la concentration de APOE par les PMs en comparaison à l'allèle APOE4.

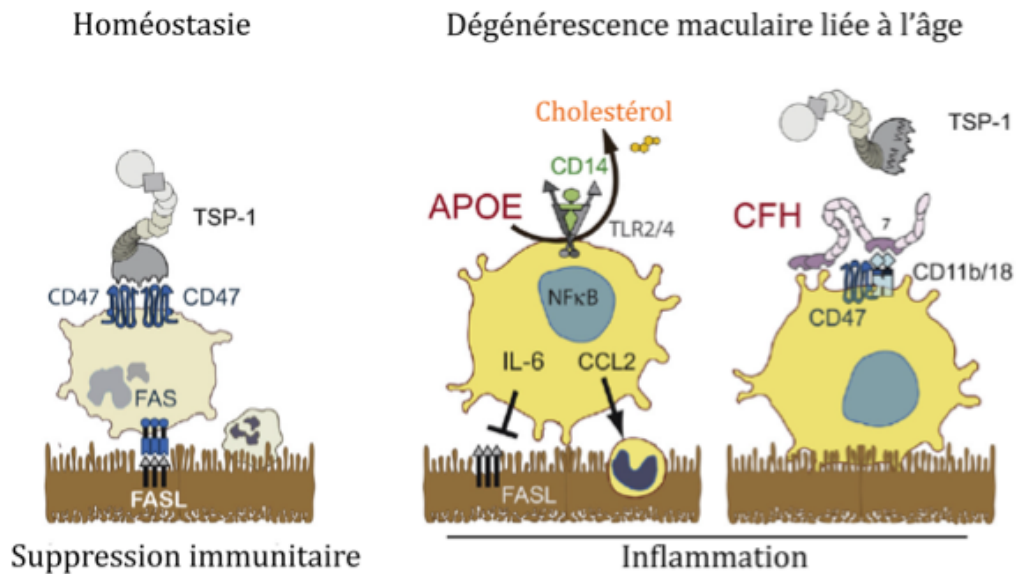


Figure 10: Représentation schématique de l'implication de l'APOE et du CFH dans l'accumulation des phagocytes mononucléés sous-rétiniens

(modifié d'après Guillonnet al., 2017). Physiologiquement, l'activation de CD47 par TSP-1 sensibilise les PM à la mort cellulaire et à leur élimination par l'EPR qui exprime FasL. La présence excessive d'APOE déstabilise les ponts lipidiques des PM, ce qui active le cluster de récepteurs de l'immunité innée (IIRC) et induit l'expression de cytokines inflammatoires comme IL-6. IL-6 inhibe l'expression de FasL et donc empêche l'élimination des PM par l'EPR. L'isoforme APOE2 associé à la DMLA conduit à des concentrations intracellulaires excessives d'APOE, alors que l'isoforme APOE4 est associé à des concentrations plus faibles d'APOE ainsi qu'une capacité diminuée à activer IIRC. Le CFH se lie à l'intégrine CD11b/CD18, et inhibe stériquement l'activation de CD47 par TSP-1, nécessaire pour l'élimination des PM. Le variant CFH402H associé à la DMLA a une capacité plus importante d'inhiber l'élimination des PM régulée par TSP-1.

c) Locus 10q26

De nombreuses études ont fait le lien entre un haplotype à risque du locus 10q26 et la DMLA (Fritsche et al. 2015; Swaroop et al. 2007; Yang et al. 2006). Cet haplotype à risque est fortement associé à la survenue de la DMLA exsudative (OR=3, porteurs hétérozygotes), mais il est aussi associé à l'AG (OR=2,5, porteurs hétérozygotes) (The AMD Gene Consortium 2013).

Trois gènes se trouvent dans la région du chromosome 10q26, sur une distance de 100kb. Ces gènes sont : *pleckstrin homology domain-containing family A member 1* (*PLEKHA1*, aussi appelé *TAPP1*), *age-related maculopathy susceptibility-2* (*ARMS2*, aussi appelé *LOC387715*), and *high temperature requirement A serine peptidase 1* (*HTRA1*,

aussi appelé *PRSS11*) (Jakobsdottir et al. 2005; Rivera et al. 2005). Il y a une région intergénique d'environ 22kb entre *PLEKHA1* et *ARMS2* et d'environ 5kb entre *ARMS2* et *HTRA1* (Liao et al. 2017).

On retrouve au sein de ce locus une série de 34 SNPs. Un de ces SNPs, le rs10490929, modifie la séquence codante de *ARMS2* (G au lieu d'un T, Ala69Ser). Neuf autres SNPs sont en fort déséquilibre de liaison avec le rs10490929. Certains sont localisés dans l'intron de *ARMS2*, dans la région promoteur de *HTRA1* ou dans son premier intron (Liao et al. 2017). Le déséquilibre de liaison entre les différents SNPs de l'haplotype à risque fait qu'il est difficile de déterminer lequel de ces SNPs et de ces trois gènes a un rôle dans la pathogenèse de la DMLA.

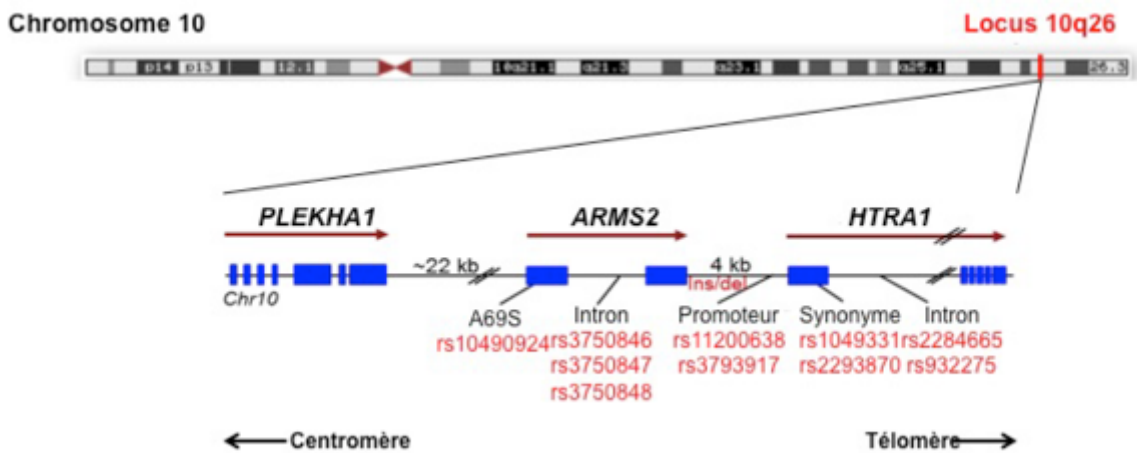


Figure 11: Région 10q26 et polymorphismes associés à la dégénérescence maculaire liée à l'âge. (modifié d'après Liao et al., 2017 et Wang et al., 2013)

Les individus homozygotes pour l'haplotype à risque du locus 10q26 ont environ 10 fois plus de risque de développer une DMLA en comparaison aux individus ne présentant pas l'haplotype à risque (DeWan et al. 2006).

A ce jour, on ne sait pas comment ces SNPs affectent l'expression ou la fonction des gènes de ce locus, et quel est leur rôle dans la pathogenèse de la DMLA (Wang 2014; Friedrich et al. 2011). En 2005, l'équipe de Jakobsdottir a analysé différents variants codants du locus et a reporté que *PLEKHA1* et *ARMS2* pourraient contribuer majoritairement au risque de développer la DMLA (Jakobsdottir et al. 2005). D'autres études ont mis en évidence une forte association entre la DMLA et le SNP rs10490924,

suggérant que *ARMS2* semble être le principal acteur de cet haplotype (Rivera et al. 2005; Schmidt et al. 2006). Enfin, d'autres équipes ont trouvé un lien entre la pathogenèse de la maladie et le gène *HTRA1*, et particulièrement le SNP rs11200638 (Yang et al. 2006) ; et les premières études fonctionnelles ont démontré un effet du SNP sur l'expression de *HTRA1* ainsi que la présence de la protéine dans les drusen de patients DMLA.

i. Pleckstrin homology domain containing, family A

PLEKHA1 fait parti de la famille des PLEKHA, contenant sept isoformes (1-7), et caractérisé par la présence d'un domaine d'homologie à la pleckstrine (PH) (Eisele et al. 2015). Le domaine PH pourrait être un régulateur des propriétés de liaison au phosphoinositide, et a été associé à quelques fonctions intracellulaires, comme le métabolisme du phosphoinositide, la phosphorylation de protéines ou encore l'organisation du cytosquelette (Lemmon 2004; Cozier et al. 2004).

Le gène *PLEKHA1* mesure environ 60kb et son codon terminal (du côté télomère) se trouve à environ 12kb du centre de l'haplotype à risque (Liao et al. 2017).

A ce jour, très peu d'informations sont connues à propos de la protéine codée par le gène *PLEKHA1*. Elle est localisée à la membrane plasmique où elle va spécifiquement se lier au phosphatidylinositol 3,4-bisphosphate (Landego et al. 2012). Une autre équipe a montré que dans les cellules B, *PLEKHA1* migre vers la membrane plasmique, en réponse à une stimulation à un antigène ; ceci serait corrélé à la formation de phosphatidylinositol 3,4-bisphosphate (Marshall et al. 2002).

Dans une étude très récente, Liao et ses collègues ont analysé l'expression de *PLEKHA1* dans la base de données *Genome Tissue Expression* (GTEx) dans une multitude de tissus de patients porteurs de l'haplotype à risque comparé aux mêmes tissus de patients porteurs de l'haplotype normal. Ils ont trouvé que dans une majorité de tissus (32 tissus sur 53 testés), l'expression de *PLEKHA1* semble légèrement diminuée chez les patients à risque. Par contre, le gène *PLEKHA1* contient un très grand nombre de SNPs qui diminuent son expression mais qui ne sont pas associés à la DMLA, ce qui suggère que *PLEKHA1* n'est pas impliqué dans la pathogenèse de la maladie (Liao et al. 2017).

ii. Age-related maculopathy susceptibility-2

Le gène *ARMS2*, seulement constitué de deux exons, code pour une petite protéine sécrétée de 107 acides aminés et de 12kDa. La séquence codante de *ARMS2* est entièrement comprise au sein de l'haplotype à risque. La protéine *ARMS2* contient neuf sites de phosphorylation (Tong et al. 2010). *ARMS2* est un gène présent uniquement chez l'humain et chez quelques primates supérieurs (Francis et al. 2008; Pahl et al. 2012). Le manque de gènes homologues dans les modèles non-primates, et notamment chez la souris, rend l'étude fonctionnelle de ce gène difficile. Les fonctions biologiques de base de *ARMS2* sont très peu connues à ce jour. Il semble que soit un des composants de la matrice extracellulaire de l'œil (Kortvely et al. 2010).

Un des SNPs présents dans l'haplotype à risque entraîne la modification de la séquence codante de *ARMS2* (G au lieu de T, Ala69Ser) : il s'agit du rs10490929. Ce SNP est le plus cité dans toutes les études portant sur cet haplotype à risque (The AMD Gene Consortium 2013; Micklisch et al. 2017; Liao et al. 2017). Il semblerait que cette protéine colocalise avec des protéines mitochondriales (Kanda et al. 2007) et pourrait être associée à la membrane externe de la mitochondrie, qui est un organe très impliqué dans les processus apoptotiques et oxydatifs (Lin et Beal 2006).

Pourtant, dans leur étude, Liao et ses collègues ont évalué les niveaux d'expression de *ARMS2* dans la série d'échantillons humains précédemment citée. Les niveaux d'expression de *ARMS2* sont très faibles, voir indétectables dans un grand nombre de ces tissus. Dans les tissus où *ARMS2* est détecté, il semblerait que les tissus provenant des patients homozygotes à risque expriment moins de *ARMS2* que les patients contrôles, ce qui pourrait expliquer le potentiel rôle de *ARMS2* dans les mécanismes de pathogenèse de la maladie (Liao et al. 2017). Il existe pourtant de très nombreux SNPs au sein de ce gène qui ne sont pas associés à la DMLA (Liao et al. 2017).

Une autre équipe a récemment montré que *ARMS2* était exprimé par les monocytes et les microglies chez l'humain. Micklisch et ses collègues montrent également une diminution de l'expression de *ARMS2* par les monocytes de patients porteurs de l'haplotype à risque. Ils montrent enfin que *ARMS2* serait capable de se lier à la surface des cellules mortes ; cette liaison induirait l'activation du complément afin de faciliter la phagocytose et d'éviter l'accumulation de débris cellulaires (Micklisch et al. 2017). Dans cette publication, *ARMS2* semble avoir un rôle majeur dans la maintenance de

l'homéostasie rétinienne. Cependant, nous avons essayé de reproduire ce résultat en utilisant les mêmes primers et conditions décrites dans cet article ; mais nous avons été incapables de détecter le transcrit de *ARMS2* dans les monocytes humains.

iii. High temperature requirement A serine peptidase 1

HTRA1 est le troisième gène touché par l'haplotype à risque du chromosome 10q26. Nous développerons sa structure et ses potentielles fonctions dans la pathogenèse de la DMLA dans le chapitre 5 de ce manuscrit.

E. TRAITEMENTS DE LA DMLA

A ce jour, aucun traitement n'existe pour la DMLA atrophique. La prévention est donc la première approche pour limiter la perte de la vision. Le contrôle des facteurs de risque comme le tabac et l'obésité pourrait réduire le risque de développer une DMLA (Tomany et al. 2004). Des suppléments nutritionnels en antioxydants et vitamines (vitamine C, vitamine E et β -carotène) pourraient également retarder l'apparition de la maladie ; mais cette formulation n'est pas recommandée pour les fumeurs car le β -carotène augmente le risque de développer des cancers du poumon (Age-Related Eye Disease Study Research Group 2001).

Concernant la DMLA exsudative, plusieurs moyens thérapeutiques ont été développés depuis les années 1960 afin de limiter la perte de vision liée à la pousse de néovaisseaux anormaux. Cependant, aucun de ces traitements ne permet une guérison définitive de la DMLA. La photocoagulation par laser et la thérapie photodynamique sont les premiers traitements à avoir été développés. Ils ne sont plus utilisés aujourd'hui.

Depuis une dizaine d'années, les traitements pour la forme exsudative de la DMLA ont énormément progressé avec le développement de thérapies anti-angiogéniques. Suite à la découverte du vascular endothelial growth factor A (VEGF-A), un puissant facteur de croissance pro-angiogénique et un inducteur de la perméabilité vasculaire (Leung et al. 1989; Ferrara et al. 1991), les recherches sur les thérapies anti-angiogéniques se sont développées. Grâce à la création de molécules spécifiques, les chercheurs ont pu cibler le VEGF-A afin de le bloquer (Chen et al. 1999; Ruckman et al. 1998; Ferrara 2005). Ces molécules diminuent la perméabilité des néovaisseaux et inhibent leur formation ; ce qui permet donc de diminuer les changements dégénératifs qui leur sont associés (Aiello

et al. 1994; Adamis et al. 1994). Les injections d'anti-VEGF sont aujourd'hui le traitement de référence pour la DMLA exsudative.

En 2006, le ranibizumab (commercialisé sous le nom de Lucentis par Novartis) reçoit son autorisation de mise sur le marché. Il s'agit d'un anticorps monoclonal humanisé qui neutralise toutes les formes actives de VEGF-A (Rosenfeld et al., 2006). Les résultats de Rosenfeld montrent que l'administration intra-vitréenne de ranibizumab sur une période de deux ans prévient la perte de vision et peut même améliorer l'acuité visuelle chez les patients atteints de DMLA. Au même moment, le bevacizumab (commercialisé sous le nom d'Avastin par Genentech) est développé. Il s'agit d'un anticorps monoclonal qui lie et bloque tous les isoformes de VEGF. Cette molécule a obtenu son autorisation de mise sur le marché pour le traitement de cancers colorectaux et du glioblastome multiforme (Gordon et Cunningham 2005). En 2010, l'efficacité du bevacizumab dans le traitement de la DMLA exsudative a été démontrée (Tufail et al. 2010). L'étude qui a comparé les effets du bevacizumab du ranibizumab a montré que les deux molécules ont une efficacité équivalente. En revanche, une dose de ranibizumab coûte près de 40 fois plus cher qu'une dose de bevacizumab (CATT research group 2011). Depuis 2015, le bevacizumab bénéficie d'une recommandation temporaire d'utilisation en France, pour son utilisation dans le traitement de la DMLA exsudative (décision n° 2015.0178/DC/SEM de la haute autorité de santé).

Ces thérapies permettent d'inhiber la croissance des néovaisseaux anormaux. En revanche, elles n'interrompent pas les processus dégénératifs indépendants des vaisseaux, et le déclin des fonctions visuelles persiste chez 30% des patients à long terme (Rofagha et al. 2013).

Il faut également noter que de plus en plus de patients semblent développer une résistance aux traitements actuels. Ces résistances aux thérapies se caractérisent par une recrudescence de néovascularisation accompagnée par une baisse d'acuité visuelle (Keane et al. 2008). Le développement de nouveaux traitements pour améliorer la prise en charge des patients atteints de DMLA exsudative et pour traiter les patients atrophiques est en plein essor.

III. L'INFLAMMATION ET LE SYSTEME DES PHAGOCYTES MONONUCLEES

Ces dernières années, les recherches sur la pathogenèse de la DMLA s'orientent de plus en plus sur le rôle de l'inflammation. En effet, la survenue de la DMLA a été associée à une rupture de l'immunosuppressivité de l'espace sous-rétinien, ainsi qu'à une infiltration de cellules inflammatoires dans cet espace (Sennlaub et al. 2013). Ces mécanismes pourraient représenter une des clés des mécanismes pathologiques qui conduisent à la maladie.

A. L'INFLAMMATION

L'inflammation est définie comme étant une réponse adaptative à un stimulus ou à des conditions nocives, comme le sont l'infection ou la lésion d'un tissu (Medzhitov 2008). La réponse inflammatoire contrôlée est généralement bénéfique puisqu'elle permet à l'organisme de se protéger, mais elle peut devenir délétère lorsqu'elle est dérégulée et conduit à un état d'inflammation pathologique.

La réaction inflammatoire se déroule en plusieurs étapes. La première étape consiste en la reconnaissance d'un agent pathogène par les macrophages résidents ($rM\Phi$ s) et les mastocytes; ce qui va déclencher la production d'une multitude de régulateurs inflammatoires comme les chimiokines, les cytokines, des composés vaso-actifs, ... Ces composés vont former un exsudat inflammatoire local et permettre le recrutement de protéines plasmatiques et de leucocytes, principalement des neutrophiles, sur le site de l'infection. Les neutrophiles vont alors s'activer, soit par contact direct avec le pathogène ou *via* l'action des cytokines secrétées par les $rM\Phi$ s, et neutraliser l'agent pathogène en libérant le contenu toxique de leurs granules (Nathan 2006). La réponse inflammatoire est complète lorsque l'agent pathogène est éliminé, et que le tissu est réparé. Cette étape de réparation se fait grâce aux $rM\Phi$ s et aux macrophages recrutés de la circulation sanguine (Serhan et Savill 2005) (d'après Medzhitov et al., 2006).

Ces réactions inflammatoires font intervenir de nombreux acteurs et notamment les cellules du système des PMs.

B. LE SYSTEME DES PHAGOCYTES MONONUCLEES

La famille des PMs est un lignage myéloïde dérivant de progéniteurs de la moelle osseuse et comprenant plusieurs types cellulaires. Parmi ces cellules, on peut citer les monocytes (Mos), les macrophages inflammatoires dérivés des monocytes (iMΦs), les cellules dendritiques et les macrophages tissulaires résidents (rMΦs), comme le sont les cellules microgliales spécifiques du cerveau (Chow et al. 2011; Gautier et al. 2013; Ransohoff et Cardona 2010; Wynn et al. 2013). Les PMs sont essentiels au maintien de l'homéostasie de l'organisme via leur activité de régulation de la réponse inflammatoire et immune.

Ces cellules forment des populations très hétérogènes qui peuvent se différencier en plusieurs sous-populations. Bien que ces différentes sous-populations aient été identifiées, un grand nombre de questions subsiste encore concernant leurs développements, leurs homéostasies et leurs fonctions. Nous ne nous intéresserons ici qu'aux Mos ainsi qu'aux rMΦs et iMΦs.

1) LES MONOCYTES

Les Mos sont une sous-population de leucocytes circulants, qui représentent 5 à 10% de la totalité des leucocytes chez l'humain, et environ 2 à 3% chez la souris (Nichols et al. 1971). Les Mos circulant dérivent de progéniteurs de la moelle osseuse (van Furth et Cohn 1968) et ont la capacité de se différencier en MΦs ou en cellules dendritiques (Auffray et al. 2009).

Depuis les années 1980, plusieurs populations de Mos ont été observées (notamment en fonction des différences de tailles ou de densités) ; mais c'est le développement de la cytométrie en flux qui a permis d'identifier ces sous-populations (Passlick et al. 1989). Chez l'humain, on distingue trois sous-populations de Mos ; chez la souris, deux types de Mos sont actuellement connus.

a) Les monocytes humains

Les Mos humains sont actuellement divisés en trois sous-populations, en fonction des différences d'expression de leurs marqueurs de surface spécifiques CD14 et CD16 (Ziegler-Heitbrock 2007). Ces sous-populations de Mos expriment chacune différentes chimiokines, immunoglobulines, et récepteurs (Gordon et Taylor 2005). Elles se

différencient aussi par leur activité phagocytaire ainsi que par leur distribution au sein des tissus lors des phases d'inflammation (Wong et al. 2011).

i. Les monocytes classiques : CD14⁺⁺CD16⁻

Les Mos appartenant à cette catégorie sont qualifiés de « classiques » (Ziegler-Heitbrock et al. 2010). Ils sont le sous-type majoritaire dans le sang et représentent 80 à 90% des Mos totaux circulants (Soehnlein et Lindbom 2010; Strauss-Ayali et al. 2007). Ces Mos expriment fortement CD14, mais pas CD16 ; ils expriment aussi à leur surface préférentiellement CCR2, et très peu de CX3CR1 (Passlick et al. 1989). Ils ont une forte activité de phagocytose, produisent une grande quantité d'espèces réactives de l'oxygène et développent une réponse cytotoxique dépendante des anticorps (Connor et al. 1990).

Ces Mos sont induits lors d'infections (Fingerle et al. 1993; Thieblemont et al. 1995) et assurent en première ligne la défense de l'organisme contre les pathogènes. Plusieurs études ont montré la présence précoce de ces Mos dans les maladies inflammatoires (Chuluundorj et al. 2014; Reed-Geaghan et al. 2010).

ii. Les monocytes non-classiques : CD14⁺CD16⁺⁺

Ce sous-type de Mos représente environ 10% de la population de Mos (Strauss-Ayali et al. 2007). Ce sont des cellules qui expriment fortement CD16, et plus faiblement CD14 (Passlick et al. 1989). A la différence des Mos classiques, les Mos non-classiques expriment très peu de CCR2, mais beaucoup de CX3CR1 (Weber et al. 2000; Ancuta et al. 2003). Ces Mos n'ont pas d'activité de phagocytose, et après stimulation au LPS, ils ne secrètent pas de cytokines pro-inflammatoires. Les travaux de l'équipe de Geissmann ont montré que ces Mos patrouillent le long des vaisseaux sanguins, de façon dépendante de CX3CR1, afin de favoriser le recrutement de neutrophiles en cas d'inflammation, de la même façon que pour les Mos murins (Auffray et al. 2009).

iii. Les monocytes intermédiaires : CD14⁺⁺CD16⁺

Enfin, une troisième catégorie de Mos a été mise à jour en 2000 (Grage-Griebenow et al. 2000; Grage-Griebenow et al. 2001): les Mos intermédiaires, dont les caractéristiques se situent entre celles des Mos classiques et des Mos non-classiques. En effet, ces Mos expriment à la fois CD14, mais également CD16. Ils représentent environ 5% des Mos totaux circulants et sont des producteurs importants de IL-10 (Auffray et al. 2009). Les fonctions biologiques de cette troisième catégorie de Mos restent encore peu connues.

L'étude des Mos humains se révèle assez compliquée *in vitro*, en effet, les Mos se différencient au moindre stimulus et s'activent très facilement. C'est l'étude des Mos murins a permis de mieux caractériser cette population de cellules.

2) Les monocytes murins

Chez la souris, on distingue actuellement deux sous-populations de Mos. Les Mos murins sont une population de cellules assez rares en comparaison avec les Mos humains ; en effet, ils ne représentent que 2% de la population totale des leucocytes. Les différentes sous-populations de Mos murins sont actuellement classées en fonction de leurs expressions en Ly6C, CCR2 et CX3CR1 (Palframan et al. 2001; Geissmann et al. 2003).

i. Les monocytes inflammatoires : Ly6C^{high}CCR2⁺/CX3CR1^{low}

Ces Mos inflammatoires sont les analogues des Mos classiques (CD14⁺⁺CD16⁻) chez l'humain. Ils représentent entre 2 et 5% des leucocytes circulants dans une souris en conditions physiologiques. Ils sont rapidement recrutés au niveau du site d'inflammation lors d'une infection (Geissmann et al. 2003). La délétion en CCR2 réduit de façon importante la migration de ces Mos au niveau du site de l'inflammation, ce qui indique un rôle déterminant du récepteur à cette chimiokine dans la migration de ces Mos (Kurihara et al. 1997; Kuziel et al. 1997). Ce sont les principaux acteurs de la réponse inflammatoire, ils sont capables de sécréter une grande diversité de cytokines pro-inflammatoires : on retrouve une forte expression de Toll Like Receptor 4 (TLR4), récepteur au lipopolysaccharide (LPS) à leur membrane (Cros et al. 2010).

ii. Les Monocytes résidents : Ly6C^{low}CCR2⁻/CX3CR1^{high}

Ce sous-type de Mos est l'analogue des Mos non-classiques (CD14⁺CD16⁺⁺) chez l'humain. Bien qu'ils ne fassent pas partie des Mos rapidement mobilisables, les Mos résidents sont néanmoins importants à la réponse à l'inflammation (Geissmann et al. 2010). En effet, il a été montré que les Mos résidents patrouillent le long des vaisseaux sanguins de façon CX3CR1 dépendante et favorisent le recrutement rapide des neutrophiles puis des Mos inflammatoires en cas d'agression (Auffray et al. 2007). De plus, la capacité importante des Mos résidents pour la phagocytose leur confère un grand rôle dans la clairance des tissus endommagés.

3) LES MACROPHAGES

Lors de la phase inflammatoire, les Mos circulants, à courte durée de vie et exprimant très fortement le récepteur à la chimiokine CCR2, sont recrutés sur le site inflammatoire où ils vont se différencier en MΦs.

Les MΦs participent à de nombreux processus biologiques comme le maintien de l'homéostasie du tissu *via* l'élimination de cellules apoptotiques ; la production de facteurs de croissance, le remodelage tissulaire ou encore la réparation et la résolution de la réponse inflammatoire (Lawrence et Natoli 2011; Gordon 2007). Afin de réaliser ces fonctions, les MΦs possèdent une machinerie cellulaire beaucoup plus développée que celle des Mos, avec notamment les constituants suivants : des lysosomes, des vacuoles de phagocytoses ou encore l'appareil de golgi. Ces organites permettent aux MΦs d'être plus performants dans la migration, la phagocytose et la production de cytokines. Les MΦs sont également des cellules présentatrices d'antigènes (Lawrence et al. 2002; Gordon 2002).

Ce sont des cellules qui présentent une grande hétérogénéité autant sur le plan fonctionnel que sur le plan morphologique (Mantovani et al. 2002; Geissmann et al. 2010). Une nomenclature a été établie en analogie avec le système immunitaire adaptatif afin de classer les MΦs en deux catégories. On distingue les MΦs de type M1, qui ont été identifiés comme « pro-inflammatoires » (Allavena et Mantovani 2012), et les MΦs de type M2 associés à des phénomènes plutôt « anti-inflammatoires » et plutôt associés à des phénomènes de réparation tissulaire (Martinez et al. 2008).

Classiquement, des MΦs cultivés *in vitro* et activés par du LPS par exemple sont classés comme des MΦs de type M1. Ils sont inflammatoires, antimicrobiens, anti-angiogéniques et sécrètent des facteurs comme IL-1 β , TNF- α , IL-6 ou CCL2. De la même façon, l'activation des MΦs de type M2 est induite par IL-4 et IL-13, ce qui polarise les MΦs dans un phénotype plutôt anti-inflammatoire. Ils favorisent alors la phagocytose, la néovascularisation ou encore la réparation tissulaire. Mais dans les modèles *in vivo*, les PMs sous-rétiniens expriment à la fois des marqueurs de type M1 et de type M2 (Camelo et al. 2012; Horie et al. 2013; Liu et al. 2013); tout comme ils peuvent être à la fois pro-inflammatoires et promouvoir l'angiogénèse.

Dans les modèles d'inflammation sous-rétinienne, il semble donc que cette classification ne soit pas appropriée, elle ne reflète en tous cas pas la diversité des réponses aux différents types d'activation. (D'après Guillonnet al., 2017).

Il existe une autre catégorie de $M\Phi$ s : il s'agit des macrophages résidents ($rM\Phi$ s), qui infiltrerent les organes pendant l'embryogenèse. En conditions physiologiques, ils sont capables de s'auto-renouveler de façon indépendante du recrutement monocyttaire (Tarling et al. 1987; Jenkins et al. 2011). On peut notamment citer les ostéoclastes, $rM\Phi$ s spécifiques des tissus osseux (Udagawa et al. 1990) ; les cellules de Kupffer, spécifiques du foie (Crofton et al. 1978) ou encore les cellules microgliales, spécifiques du système nerveux central (Saijo et Glass 2011).

4) LES CELLULES MICROGLIALES : MACROPHAGES RESIDENTS DU SYSTEME NERVEUX CENTRAL

Les $rM\Phi$ s, ont un rôle aussi bien trophique que de sentinelle, et sont présents dans tous les organes du corps humain. Ils se développent pendant les premiers stades de l'embryogénèse à partir des macrophages embryonnaires, retrouvés dans le sac vitellin, ou à partir des monocytes embryonnaires du foie (Gautier et al. 2014).

Dans la rétine, les $rM\Phi$ s sont appelés microglies et sont spécifiques du SNC. Les cellules microgliales représentent entre 5 et 20% des cellules totales du SNC (Ransohoff et Cardona 2010). Ces cellules sont impliquées dans la clairance des neurones apoptotiques ainsi que dans la genèse des synapses rétiniennes au cours du développement (Bessis et al. 2007). Physiologiquement, elles sont nécessaires à la maintenance des structures synaptiques dans la rétine adulte et participent également aux transmissions synaptiques qui ont lieu pendant le cycle visuel normal (Wang et al. 2016). Les microglies sont caractérisées par le fait qu'elles n'expriment pas CCR2 (Mizutani et al. 2012; Saederup et al. 2010), mais elles expriment très fortement CX3CR1 (Checchin et al. 2006; Combadière et al. 2007; Jung et al. 2000). Les neurones exprimant la forme membranaire et soluble de CX3CL1, permettent de contrôler l'état d'activation des microglies (Harrison et al. 1998; Ransohoff 2007; Raoul et al. 2010).

Les cellules microgliales sont activées par une grande variété de signaux ; il peut s'agir de cytokines, de facteurs du complément, de protéines plasmatiques ou de molécules pathogènes comme les composants bactériens ou viraux. Les neurones endommagés

sont également capables d'activer les microglies via une libération d'ATP ; afin d'activer leur phagocytose. Lorsqu'elles sont activées, les microglies ont un rôle dans l'amplification de la réponse immunitaire, mais également à la réparation tissulaire et à la dégénérescence neuronale (González-Scarano et Baltuch 1999).

Les conditions inflammatoires vont permettre à des M Φ de différentes origines de cohabiter. Mais très peu de choses sont connues quant à leurs spécificités ou leurs modes d'action. A la fin de la réponse inflammatoire, les iM Φ s disparaissent du site, contrairement aux rM Φ s qui vont permettre au tissu lésé de retrouver son état physiologique.

Pour résumer, différents types de PMs, résidents ou infiltrant, possèdent différentes fonctions pendant le développement, l'inflammation et l'homéostasie d'un tissu. A ce jour, il est difficile d'évaluer les rôles de chaque sous-population de cellules, ceci étant du aux limites des outils immunohistochimiques disponible : ces populations de cellules expriment ou induisent des marqueurs très similaires (Gautier et al. 2012; Ransohoff et Cardona 2010).

C. LA RETINE : ZONE DE PRIVILEGE IMMUN

Quelques organes du corps humain (œil, cerveau, testicule, ovaire) sont considérés comme des zones de privilège immun, c'est à dire que les réponses immunitaires innées et adaptatives sont atténuées ou supprimées dans ces tissus. Le fait que ces organes soient particulièrement vulnérables aux dommages collatéraux induits par l'inflammation (Streilein 2003) ; et que ces dommages mettent en péril les aptitudes de l'individu (survie ou capacité de reproduction) ont possiblement poussé l'évolution dans ce sens. Tous les tissus peuvent potentiellement être attaqués par des pathogènes. La réponse immunitaire consiste donc à établir une balance entre la neutralisation et l'élimination rapide et efficace des pathogènes, et éviter les dommages collatéraux pour le tissu, qui pourraient interférer avec ses fonctions vitales pour l'organisme.

La rétine et le cerveau sont particulièrement vulnérables aux dommages immuno-pathogéniques. Ceci est du au fait que ces deux tissus ont des capacité de régénération extrêmement limitées. Ces tissus sont dotés de structures qui les protègent remarquablement bien de l'infection directe (crâne, sclère, paupière), mais également des invasions microbiennes provenant du sang (barrières sang-tissu). De plus, il faut

souligner qu'étant des zones de privilèges immuns, ces tissus sont davantage protégés des dommages liés aux réactions inflammatoires.

D'après sa définition, le terme privilège immun décrit tout d'abord les observations de Medawar en 1948 qui a montré que les allogreffes cutanées introduites dans un site de privilège immun (comme le cerveau ou la chambre antérieure de l'œil) n'entraînent pas de réponse immunitaire et ne sont pas non plus rejetées, sauf si l'animal utilisé a déjà été immunisé contre la greffe (Medawar 1948). A ce jour, le terme de privilège immun est souvent utilisé plus largement pour décrire les organes ou les sites où la réaction immunitaire innée ou adaptative est diminuée et l'inflammation réduite.

Les facteurs qui déterminent le privilège immun incluent l'absence de PMs, l'absence d'un système de drainage lymphatique (par exemple dans l'œil ou le cerveau) par lequel les cellules présentatrices d'antigène vont migrer jusqu'aux ganglions lymphatiques ; l'absence de vaisseaux sanguins par lesquels les cellules effectrices s'infiltrent dans le tissu (par exemple dans la cornée ou l'espace sous-rétinien), ainsi que par la production locale de facteurs qui vont induire une tolérance immunitaire.

Dans la rétine, cette zone de privilège est également régulée par des signaux inhibiteurs toniques qui fixent le seuil d'activation élevé et la clairance des cellules inflammatoires infiltrantes particulièrement efficace (Streilein et al. 2002). Ainsi, les potentielles cellules présentatrices d'antigènes et les cellules effectrices (lymphocytes, $M\Phi$ s) peuvent être neutralisées avant qu'elles ne développent leur cytotoxicité.

1) LES SIGNAUX INHIBITEURS DE LA RETINE

A l'état physiologique, les neurones expriment un grand nombre de facteurs qui vont continuellement réprimer l'activation des cellules microgliales, on peut notamment citer Cx3cl1, CD200L, SIRP1 α , CD22 (Galea et al. 2007), ainsi que la protéine translocatrice (Karlstetter et al. 2014; Wang et al. 2014).

Dans l'œil, la forme transmembranaire de CX3XL1 est constitutivement exprimée par les neurones rétiniens internes (Zieger et al. 2014). Plusieurs équipes dont la notre ont montré que la délétion génétique de CX3CR1, récepteur unique de CX3CL1, chez la souris induit une accumulation accélérée et dépendante de l'âge des PMs sous-rétinien dans les animaux pigmentés Cx3cr1^{-/-} knockout (Combadière et al. 2007) ainsi que chez les souris Cx3cr1^{GFP/GFP} knockin (Chinnery et al. 2012; Combadière et al. 2007; Levy et

al. 2015; Sennlaub et al. 2013), en comparaison aux animaux sauvages élevés dans les mêmes conditions conventionnelles de lumière (~250lux). La délétion de CX3CR1 induit aussi une augmentation de l'accumulation des PMs dans les yeux de jeunes souris albino (Chinnery et al. 2012; Combadière et al. 2007) et dans les souris pigmentées exposées à une lumière non toxique qui n'induit pas de dégénérescence chez les souris contrôles (Levy et al. 2015; Sennlaub et al. 2013). L'accumulation des PMs sous-rétiniens chez les souris déficientes en CX3CR1 n'est en revanche pas associée au développement de drusen ou à l'atrophie de l'EPR. Mais cette accumulation, combinée à la dégénérescence des bâtonnets et des cônes observée chez ces souris est très similaire aux zones de transition chez les patients atteints de la forme GA de DMLA (Eandi et al. 2016).

Pour résumer, la répression constitutive de l'activation des PMs par des signaux neuronaux inhibiteurs est essentielle pour l'homéostasie de la rétine. La perte de l'un de ces signaux, comme observé chez les souris déficientes pour CX3CR1, peut être suffisante pour déclencher un cercle vicieux d'inflammation chronique et ses dommages collatéraux sous des conditions de vieillissement normales (qui ne causent pas de dégénérescence significative chez les souris âgées).

2) L'EPR IMMUNOSUPPRESSEUR

En plus des signaux toniques inhibiteurs de la rétine interne, qui restreignent l'activation des cellules microgliales rétinienne, l'espace sous-rétinien constitue un environnement très immunosuppresseur. L'espace sous-rétinien abrite les segments externes des photorécepteurs et est protégé du tissu environnant par les jonctions serrées de l'EPR et de la *zonula adherens* entre les photorécepteurs et les cellules gliales de Müller qui forment la membrane limitante externe (van de Pavert et al. 2004).

Cet espace est dépourvu de vaisseaux sanguins et lymphatiques qui facilitent l'infiltration des leucocytes et leur relargage dans d'autres tissus. Enfin, l'EPR exprime des signaux immunosuppresseurs qui vont induire la mort des cellules immunitaires infiltrantes. Parmi ces signaux immunosuppresseurs, on retrouve la signalisation FasL/Fas ; ainsi que l'interaction entre la Thrombospondine-1 et son récepteur CD47.

a) La signalisation FasL/Fas

La capacité immunosuppressive de l'EPR est dépendante de son expression de FasL. En effet, des expériences ont permis de montrer que les allogreffes d'EPR sont capable de survivre dans des hôtes non-immunosupprimés pendant des périodes de temps prolongées ; même si elles sont greffées sur des sites qui ne sont pas des privilèges immuns, comme les capsules rénales par exemple. En revanche, l'allogreffe d'EPR déficient en FasL (obtenu à partir des souris FasL^{gld/gld} chez lesquelles FasL est inactif) est rapidement détruit dans les mêmes conditions (Wenkel et Streilein 2000). L'expression de FasL par les allogreffes d'EPR semble être un facteur nécessaire mais pas suffisant pour échapper au rejet immun (Kang et al. 1997) ; et d'autres facteurs exprimés par l'EPR ou les PMs doivent donc être impliqués.

En accord avec les expériences de transplantations décrites ci-dessus, notre équipe a montré que les souris déficientes en FasL (FasL^{gld/gld}) et celles déficientes en Fas (Fas^{lpr/lpr}) développent une accumulation de PMs sous-rétiniens significative après stimulation lumineuse (créée pour induire une petite inflammation et pas de dommages chez les souris sauvages) (Levy et al. 2015). Cette augmentation du nombre de PMs sous-rétiniens est principalement le résultat d'un défaut d'élimination : les PMs injectés dans l'espace sous-rétinien survivent mieux lorsque la signalisation FasL/Fas est déficiente (Levy et al. 2015).

De façon intéressante, lors de la phase de résolution après une lésion pulmonaire *in vivo*, FasL élimine préférentiellement les iMΦs et pas les rMΦs (Janssen et al. 2011) ; un agoniste de Fas induit l'apoptose des Mos mais pas des MΦs *in vitro* dans nos laboratoires (Levy et al. 2015). Au contraire, nos expériences ont montré que les Mos, les MΦs et les cellules microgliales entrent tous en apoptose lorsqu'ils subissent un transfert adoptif dans l'espace sous-rétinien ; ce qui suggère qu'une synergie de différents facteurs est nécessaire pour éliminer physiologiquement tous les types de PMs en contact avec l'EPR (Levy et al. 2015).

b) La signalisation Thrombospondine-1/CD47

De façon similaire aux souris FasL^{gld/gld} et Fas^{lpr/lpr}, les souris déficientes en Thrombospondine-1 (TSP-1) présentent une inflammation sous-rétinienne prolongée avec l'âge, et après lésion induite par stimulation lumineuse ou par laser (Ng et Streilein 2001; Wang et al. 2012). Ces souris présentent aussi des uvéites plus sévères (Chen et al.

2012) et elles développent également une inflammation plus importante dans plusieurs maladies périphériques (pneumonie aigue extensive, leucocytose, pancréatite, et infiltrats enflammés dans les glandes lacrymales) (Lopez-Dee et al. 2011).

Cette voie de signalisation sera développée en détails dans le chapitre suivant.

C. INFLAMMATION ET DMLA

Le segment postérieur de l'œil contient plusieurs types de PMs en conditions physiologiques. En effet, un grand nombre de $rM\Phi$ s sont retrouvés dans la choroïde, des cellules microgliales forment un réseau dans les couches internes de la rétine et des $rM\Phi$ s périvasculaires sont localisés le long des vaisseaux rétiniens et choroïdiens. En revanche, les cellules dendritiques sont plus rares au niveau de la rétine (Forrester et al. 2010; Kumar et al. 2014; Streilein 2003).

C'est en 1916 que la première association entre la présence de leucocytes sous-rétiniens et la DMLA exsudative a été décrite après des observations histologiques (Hegner, 1916). Depuis, de nombreuses publications ont validé cette association (Penfold et al. 2001): des cellules inflammatoires, notamment des PMs, mais aussi des lymphocytes, sont observés sur des membranes néovasculaires prélevées sur des patients atteints de DMLA exsudative (Gehrs et al. 1992; Lopez et al. 1991; Oh et al. 1999; Seregard et al. 1994).

Il est maintenant admis que la DMLA s'accompagne d'une rupture de l'immunosuppressivité de l'espace sous-rétinien ainsi que d'une infiltration et accumulation de PMs dans cet espace. Ces cellules infiltrantes peuvent provenir soit des cellules microgliales rétiniennes, des Mos circulants ou des $rM\Phi$ s de la choroïde ou des corps ciliaires. Des lymphocytes infiltrant ont également été observés dans des membranes néovasculaires de patients atteints de DMLA (Ezzat et al. 2008; Lopez et al. 1991; Penfold et al. 1984; Penfold et al. 1985). Des prélèvements sur des patients atteints d'AG ont aussi montré la présence de mastocytes choroïdaux dégranulés (Bhutto et al. 2016).

La plupart des études portant sur l'accumulation des PMs chez les patients DMLA et dans les modèles animaux ne permettent pas de différencier les différents types et origines des PMs, étant donné qu'ils expriment ou induisent des marqueurs très similaires (Gautier et al. 2012; Ransohoff et Cardona 2010). Il n'est également pas

possible actuellement de différencier les PMs dérivés des Mos ou des cellules microgliales sur des critères morphologiques (Chen et al. 2012). La distinction entre les rMΦs ou les iMΦs dérivés des Mos pourrait être très importante. En effet, il a été montré que la présence des iMΦs, dont le rôle est de neutraliser les pathogènes, pouvait également avoir un rôle dans les processus neurodégénératifs, comme dans la sclérose en plaque ou encore dans les accidents vasculaires cérébraux (Conductier et al. 2010; Ransohoff 2009).

Un marqueur moléculaire permet de différencier les Mos inflammatoires des iMΦs dérivés des cellules microgliales. Il s'agit de CCR2, le récepteur de la chimiokine majeure CCL2 (Geissmann et al. 2010). A la différence des cellules microgliales, les Mos inflammatoires expriment des taux très importants de CCR2 (Geissmann et al. 2010; Mizutani et al. 2012; Sennlaub et al. 2013) ; et CCR2 ne peut pas être induit dans les cellules microgliales (Saederup et al. 2010; Sennlaub et al. 2013). CCR2 n'est également pas constitutivement exprimé ou induit (après stimulation lumineuse) dans les cellules de l'EPR, ceci a été clairement démontré par l'absence de protéine rouge fluorescente (RFP) dans l'EPR de souris *Ccr2^{RFP/RFP}* (Sennlaub et al. 2013). CCR2 est donc un bon marqueur pour identifier les MΦs sous-rétiniens dérivés des Mos, mais sous-estime probablement cette population car la transcription de *Ccr2* est rapidement dérégulée lorsqu'un Mo se différencie en MΦ (Sennlaub et al. 2013; Wong 1997).

En ce qui concerne l'AG, un certain nombre d'équipes ont observé la présence de PMs au niveau des zones atrophiques sur les cellules de l'EPR des zones de transition et sur les drusen (Combadiere et al., 2007; Eandi et al., 2016; Gupta et al., 2003; Lad et al., 2015; Levy et al., 2015; Penfold et al., 2001). Le nombre de PMs présents sur les choroïdes prélevées sur des patients atteints d'AG est augmenté par rapport à ceux présents sur les choroïdes des patients contrôles (McLeod et al. 2016). Dans toutes ces expériences, les PMs ont été identifiés grâce au ciblage de plusieurs marqueurs comme Ricinus communis agglutinin-I (Gupta et al. 2003), CX3CR1 (Combadière et al. 2007), CD18 (Combadière et al. 2007; Levy et al. 2015; Sennlaub et al. 2013), IBA1 (Sennlaub et al. 2013), CCR2 (Sennlaub et al. 2013), CD163 (Lad et al. 2015) ou encore CD14 (Eandi et al. 2016). Dans notre équipe, nous avons utilisé le marqueur IBA-1 pour visualiser les PMs sous-rétiniens sur des sections centrales d'EPR humains. Ces marquages ont révélé que chez les donneurs sains et chez les donneurs présentant des drusen qui ne sont pas associés à la

DMLA, la présence des cellules positives à IBA-1 est très rare (Eandi et al. 2016; Levy et al. 2015). En revanche, des PMs ont été observé dans toutes les sections d'EPR provenant de donneurs atteints d'AG et qui présentent de larges drusen, notamment au niveau des zones atrophiques ainsi que sur la face apicale de l'EPR et dans les zones de transitions adjacentes aux lésions de l'AG (Levy, Calippe, et al. 2015) (Figure 11).

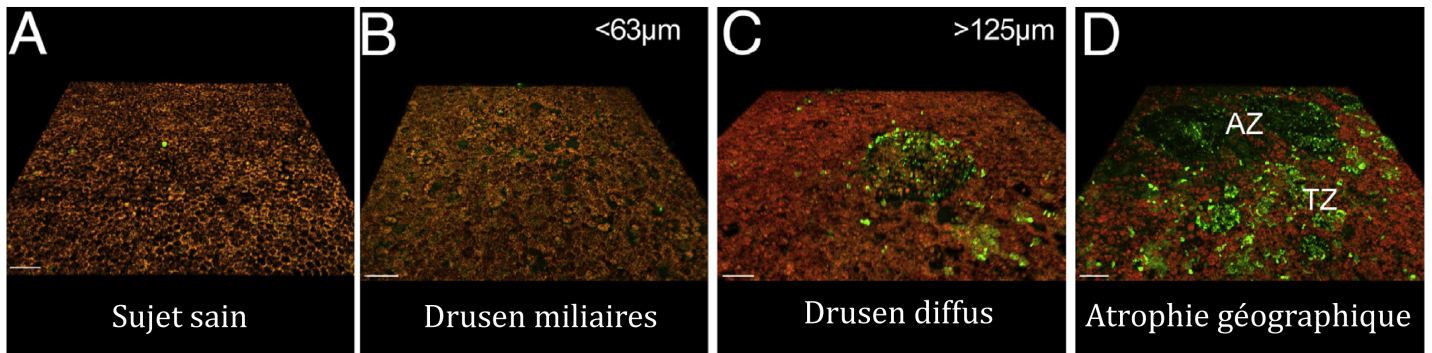


Figure 12 : Les phagocytes mononucléés s'accumulent sur l'épithélium pigmentaire rétinien de patients atteints d'atrophie géographique.

(d'après Guillonnet et al., 2017). Images de microscopie confocale ; immunohistochimie de IBA-1 (vert) sur des montages à plat d'EPR (l'auto-fluorescence de l'EPR est orange car l'EPR auto-fluoresce dans le rouge et dans le vert). A : EPR d'un donneur sain ; B : EPR d'un donneur présentant des petits drusen qui ne sont pas associés à la DMLA ; C : EPR d'un donneur présentant des gros drusen associé à la DMLA ; D : EPR d'un donneur atteint d'AG et présentant des lésions atrophiques. AZ : zone atrophique, TZ : zone de transition.

Toutes ces observations nous indiquent que les PMs sont retrouvés dans l'espace sous-rétinien en association avec les lésions induites par la DMLA.

De plus, la concentration intraoculaire de CCL2, chimiokine qui attire les Mos au niveau du tissu lésé, est augmentée chez les patients atteints de DMLA exsudative (Fauser et al. 2015; Jonas et al. 2010; Kramer et al. 2012; Rezar-Dreindl et al. 2016), mais aussi chez les patients atteints d'AG (Newman et al. 2012; Sennlaub et al. 2013). Dans un contexte plus général, il a été montré que les patients dont les Mos expriment des taux importants de TNF- α ont plus de risques de développer une DMLA exsudative (Cousins et al. 2004). De plus, les Mos des patients malades expriment fortement CCL2, IL-8 et VEGF (Lechner et al. 2017); les Mos de patients atteints de DMLA exsudative présentent des niveaux de IL-6 augmentés (Lechner et al. 2017), et leur signature de transcription immunitaire est généralement altérée (Grunin et al. 2016). Enfin, plusieurs équipes ont révélé que les niveaux d'expression de IL-6 sont corrélés à l'incidence de la MLA (Klein et al. 2014) et de la DMLA tardive (Klein et al. 2014; Seddon et al. 2005).

En résumé, les populations de PMs qui infiltrent la couche des photorécepteurs et l'espace sous-rétinien sont préférentiellement constitués de $M\Phi$ s résidents comme les cellules microgliales et possiblement les $rM\Phi$ s choroïdiens ; mais également des $iM\Phi$ s dérivés de la circulation sanguine, comme cela a été observé dans les modèles animaux de la maladie (Sennlaub et al. 2013). Les données expérimentales d'un nombre de modèles « secondaires » d'inflammation sous-rétinienne, où l'inflammation apparaît après lésion de l'EPR ou des photorécepteurs, démontrent que la présence chronique des $iM\Phi$ s dérivés des Mos aggrave la dégénérescence des photorécepteurs, en plus de promouvoir la NVC.

Pour résumer, la DMLA semble être associée à une pré-activation systémique des Mos circulants ainsi qu'à une infiltration locale de PMs dans l'espace sous-rétinien autour des drusen de grande taille ; dans et autour des lésions d'AG ainsi qu'aux alentours des zones de néovascularisation choroïdienne. Cette présence les place au bon moment et au bon endroit pour éventuellement prendre part aux changements pathogènes précoces de la DMLA, à la croissance de la lésion de l'AG et finalement à la formation de néovaisseaux. (D'après Guillonnet et al., 2017).

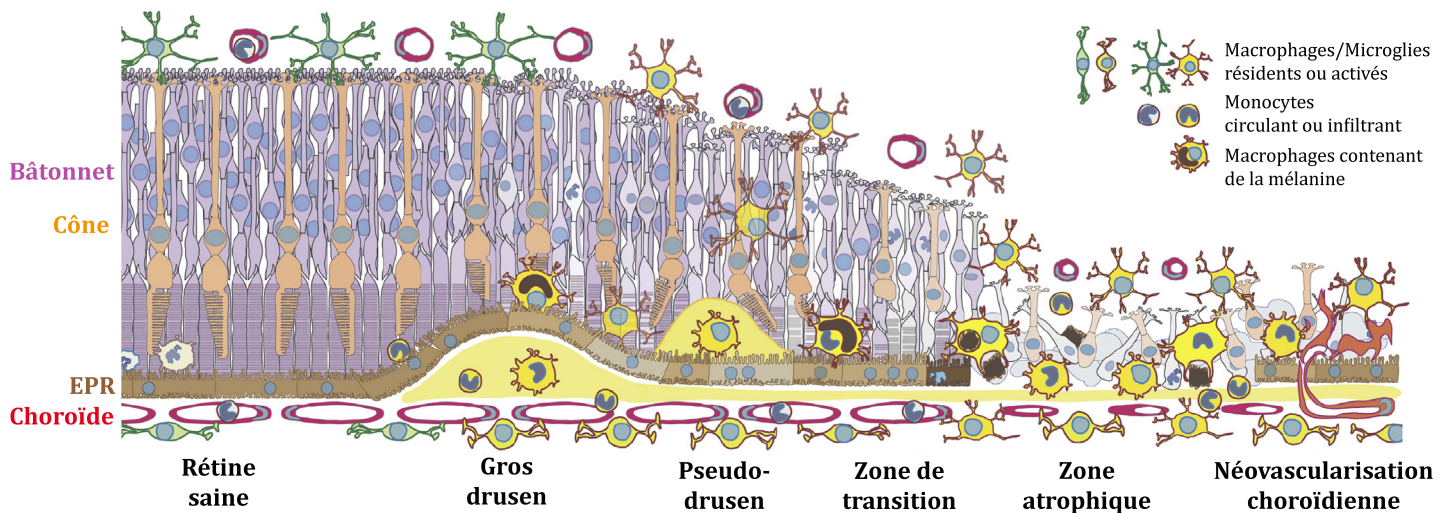


Figure 13 : Représentation schématique de l'évolution de l'accumulation des phagocytes mononucléés dans l'espace sous-rétinien.

(modifié d'après Guillonnet et al., 2017). En conditions physiologiques, la couche des photorécepteurs et l'espace sous-rétinien sont dépourvus de PMs. La DMLA s'accompagne de l'infiltration et l'accumulation de PMs dans l'espace sous-rétinien, autour des zones de néovascularisation et des zones d'atrophies. Parmi les PMs infiltrant, on compte les Mos circulants, les macrophages résidents et les cellules microgliales.

IV. LA SIGNALISATION THROMBOSPONDINE-1/CD47

Comme nous l'avons évoqué dans le chapitre précédent, la TSP-1, notamment via l'interaction avec son récepteur CD47, semble avoir un rôle majeur dans la maintenance de l'homéostasie de l'espace sous-rétinien. A ce jour, son mécanisme d'action reste inconnu.

A. LA THROMBOSPONDINE-1

TSP-1 a été décrite pour la première fois en 1971 (Baenziger et al. 1971) comme étant une glycoprotéine plaquettaire sensible à la thrombine et participant à la coagulation dépendante de la thrombine. Des études complémentaires ont révélé que TSP-1 est le principal constituant des granules α des plaquettes (Lawler et al. 1978). Depuis, il est admis qu'elle est synthétisée par une grande variété de types cellulaires (Lahav 1993), notamment par l'EPR (Miyajima-Uchida et al. 2000), les $iM\Phi$ s (Fordham et al. 2012) et les $rM\Phi$ s (Gautier et al. 2013) ; et qu'elle participe à de nombreux processus biologiques, comme la phagocytose, l'angiogenèse, la progression tumorale ou encore la régulation immunitaire (Bornstein 2009; Housset et Sennlaub 2015; Lopez-Dee et al. 2011).

1) ASPECTS STRUCTURELS

Les TSPs sont des glycoprotéines multimériques secrétées, localisées à la surface des cellules et dans la matrice extracellulaire (MEC) chez les vertébrés. Cette famille est constituée de cinq membres chez l'humain : TSP-1, TSP-2, TSP-3, TSP-4 et TSP-5, et est sous divisée en deux groupes, basés sur leurs domaines d'oligomérisation et leurs tailles (Adams et Lawler 1993).

TSP-1 et TSP-2 forment le groupe A et sont constituées de trois chaînes protéiques de 145kDa, qui s'associent via leur extrémité N-ter globulaire en homotrimères reliés entre eux *via* les ponts disulfure du côté C-terminal de la protéine (Lawler et Hynes 1986; Bornstein 1992) (Figure 14). Le groupe B est composé de TSP-3, TSP-4 et TSP-5. Ces protéines sont comparativement plus courtes et s'associent en homopentamère ou hétéropentamère (Bornstein et al. 1993). Contrairement à TSP-1 et TSP-2 qui ont une expression plutôt ubiquitaire (Iruela-Arispe et al. 1993; Wight et al. 1985), les TSPs du groupe B (TSP-3, TSP-4 et TSP-5) ont des distributions tissulaires beaucoup plus

spécifiques. En effet, TSP-3 est très exprimée par la peau et les poumons (Vos et al. 1992) ; TSP-4 par les muscles squelettiques cardiaques (JAdams et Lawler 1993) alors que TSP-5 est particulièrement présente au niveau des cartilages et des tendons (DiCesare et al. 1994).

Nous ne développerons dans cette étude que TSP-1, qui semble avoir un rôle critique dans la pathogenèse de la DMLA.

Le domaine N-terminal de TSP-1 peut se lier aux protéoglycanes de type héparane sulfate (Lawler et Slayter 1981; Dixit et al. 1984), mais aussi à la protéine low density lipoprotein receptor-related protein 1. TSP-1 contient un domaine Willebrand de type C (cWC), nécessaire pour sa trimérisation (Pimanda et al. 2002). Ce domaine est suivi par 3 motifs répétés properdin-like (TSRs), qui incluent les régions de liaison au CD36 et au peptide de latence associé à la protéine de liaison au TGF- β latent (LAP). TSP-1 peut donc se lier au CD36 (Asch et al. 1993) et au LAP afin de libérer le TGF- β actif (Bornstein 2001; J. Lawler et Hynes 1986). On retrouve ensuite trois domaines de motifs répétés de type 2 (ou EGF) puis sept domaines répétés de type 3 capables de fixer le calcium ; et finalement le domaine de liaison cellulaire en C-terminal de TSP-1. Ce domaine C-terminal contient 2 séquences valine-valine-méthionine (VVM) qui peuvent chacune interagir avec un récepteur CD47 (Bornstein 2001; Lawler et Hynes 1986; Gao et al. 1996) (Figure 14). TSP-1 peut aussi se lier à diverses intégrines ($\alpha 4 \beta 1$, $\alpha 6 \beta 1$, $\alpha 9 \beta 1$, $\alpha 2B \beta 3$ et $\alpha 5 \beta 3$), à des facteurs de croissance (FGFs et VEGFs), ainsi qu'à des enzymes comme les métalloprotéinases (MMP-2 et 9) (Frazier 1991; Adams et Lawler 1993).

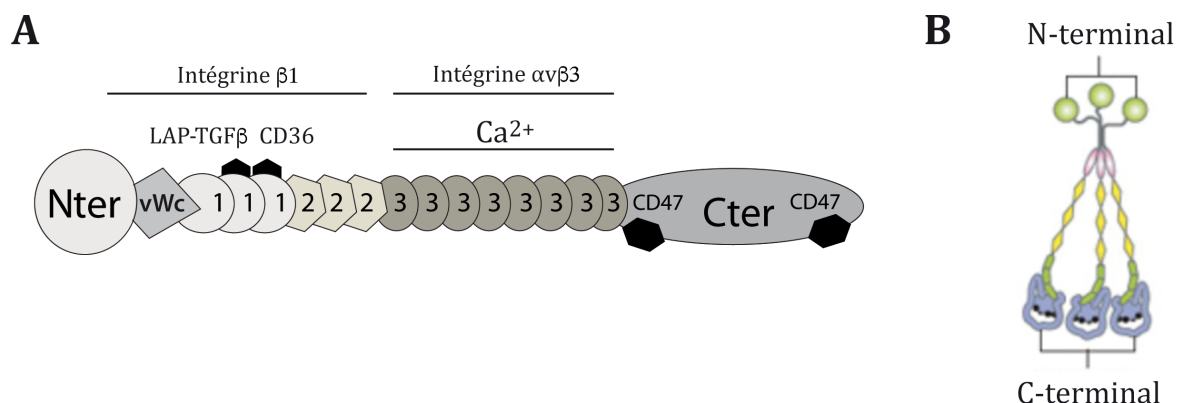


Figure 8: Représentations schématiques de TSP-1 et localisation de ses sites de liaison.

A : représentation schématique d'un monomère de TSP-1. Les motifs répétés de type 1 se lient à l'intégrine $\beta 1$, au récepteur CD36 et au Latency Associated Peptide (LAP) : peptide de latence associé au TGF- β . Les motifs répétés de type 3 peuvent se lier aux ions calcium et à l'intégrine $\alpha v \beta 3$. Le domaine C-terminal peut interagir avec deux récepteurs CD47 (modifié d'après Beguier et al, manuscrit soumis). B : représentation schématique de l'assemblage en trimère de TSP-1 (modifié d'après Kerrigan, 2008).

2) LIGANDS ET FONCTIONS BIOLOGIQUES DE TSP-1

La glycoprotéine TSP-1 est capable de se lier à de nombreux ligands ou récepteurs. La diversité de ses interactions est à l'origine de ses fonctions multiples. En effet, cette protéine a un rôle dans l'aggrégation des plaquettes, possède des propriétés anti-angiogéniques, pro-apoptotiques ou encore immunorégulatrices. TSP-1 est également un activateur endogène du facteur TGF- β .

a) Le TGF- β et peptide de latence associé au TGF- β

TSP-1 est un activateur endogène des trois isoformes du TGF- β (Schultz-Cherry et al. 1993; Souchelnitskiy et al. 1995; Crawford et al. 1998). Le TGF- β est sécrété par les cellules sous la forme de pro-TGF- β , associé à un peptide latent (LAP : Latency Associated Peptide) qui contient une séquence LSKL, lié de manière non covalente au peptide contenant le domaine actif du TGF- β (Gentry et al. 1987; Böttinger et al. 1996; McMahon et al. 1996). Cette association maintient le TGF- β dans une forme latente, incapable d'interagir avec ses récepteurs (Young et Murphy-Ullrich 2004). TSP-1, en se reconnaissant le peptide KRFK via ses motifs WxxW, riches en tryptophane et situés dans le TSR1, forme un trimère avec le TGF- β 1 mature et le LAP. Cette fixation induit un changement de conformation, qui va libérer l'accès de TGF- β à ses récepteurs (Schultz-Cherry et al. 1995; Murphy-Ullrich et al. 2000).

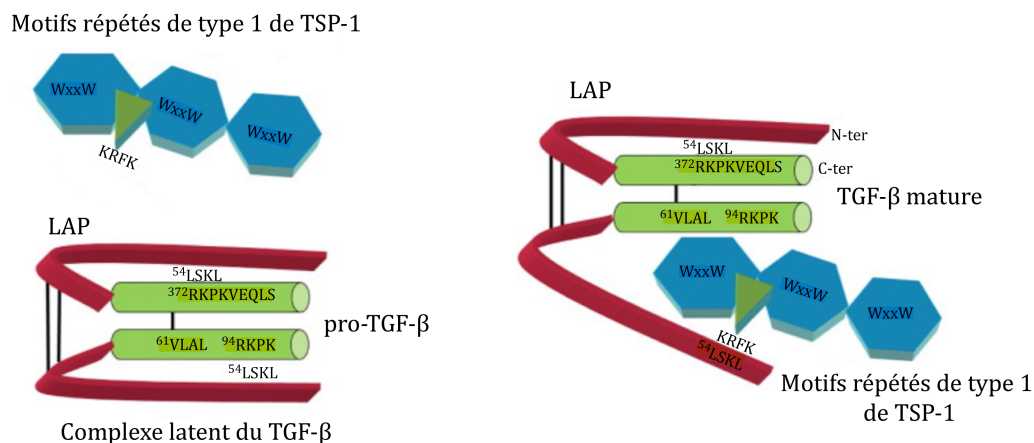


Figure 9: Activation du TGF- β latent par la Thrombospondine-1.

(modifié d'après Murphy-Ullrich et al., 2017).

b) Le récepteur CD36

TSP-1 est l'un des premiers inhibiteurs endogènes de l'angiogenèse découvert: TSP-1 inhibe la migration des cellules endothéliales et leur prolifération *in vitro*; elle inhibe également le processus de néovascularisation cornéenne induite par le basic fibroblast growth factor (bFGF) et le vascular endothelium growth factor (VEGF) (Good et al. 1990). Pour réguler l'angiogenèse, TSP-1 peut agir soit directement en inhibant la migration des cellules endothéliales et en induisant leur apoptose; soit de manière indirecte en agissant sur divers facteurs de croissance, cytokines et protéases qui régulent l'angiogenèse (Zhang et Lawler 2007).

C'est l'interaction de TSP-1 avec son récepteur CD36 (Simantov et Silverstein 2003) et avec les intégrines (Short et al. 2005) qui inhibent la migration des cellules endothéliales. CD36 est une glycoprotéine transmembranaire exprimé par une grande diversité de cellules ou de tissus. On peut citer par exemple l'endothélium microvasculaire, les cellules dendritiques, les Mos/MΦs, les précurseurs érythroïdes, ainsi que les épithéliums spécialisés de la rétine et du sein (Albert et al. 1998; Ryeom et al. 1996; Swerlick et al. 1992).

CD36 se lie à TSP-1 au niveau du troisième motif répété de type 1 ce qui induit la régulation négative du récepteur 2 du VEGF (VEGFR2) via la régulation de cascades de transduction parmi lesquelles on retrouve les protéines kinases p38, c-Jun et la caspase 3 (Jiménez et al. 2000), induites par VEGFA. *In vitro*, cette interaction inhibe la prolifération, la migration des cellules endothéliales en induisant leur apoptose (Dawson et al. 1997; Jiménez et al. 2000). Il a été montré que ces interactions antagonisent la fonction du VEGF (Primo et al. 2005).

Un lien a été établi entre l'interaction TSP-1/CD36 et l'apoptose dépendante du système FasL/Fas des cellules endothéliales (Rege et al. 2009; Volpert et al. 2002). Ces données confirment que la liaison de TSP-1 sur son récepteur CD36 est un régulateur négatif majeur de l'angiogenèse, jouant un rôle dans les processus biologiques qui impliquent la néovascularisation (Silverstein et al. 2009).

Grâce à sa liaison au récepteur CD36, TSP-1 promeut la phagocytose des cellules endommagées (Ortiz-Masià et al. 2012). En effet, le récepteur CD36 peut reconnaître, lier et internaliser les neutrophiles apoptotiques (Febbraio et al. 2001; Baranova et al. 2008). En conditions hypoxiques, l'expression de TSP-1 est augmentée par les MΦs. Il a été décrit que CD36, via sa liaison à TSP-1, forme un complexe phagocytaire actif, qui régule la phagocytose des neutrophiles (Savill et al. 1992). Les résultats des études sur CD36 et hypoxie sont à ce jour assez contradictoires (Oda et al. 2006; Fang et al. 2009).

TSP-1 peut également se lier au récepteur CD47, que nous allons traiter plus en détails.

B. LE RECEPTEUR CD47

Le récepteur CD47 a été identifié pour la première fois en 1990 comme étant une protéine de la membrane des leucocytes et du placenta, et associé à l'intégrine $\alpha v \beta 3$ (Brown 1990). C'est la raison pour laquelle, il a d'abord été nommé integrin associated protein (IAP). Des études plus récentes ont montré que son expression est finalement ubiquitaire dans l'organisme (Reinhold et al. 1995).

1. ASPECTS STRUCTURELS

Il s'agit d'une glycoprotéine membranaire de 50kDa. Structurellement, le récepteur CD47 est une protéine extrêmement bien conservée, et est composé d'un domaine extracellulaire N-terminal unique immunoglobuline-like, rattaché à cinq domaines transmembranaires ainsi qu'à une courte extrémité cytoplasmique, qui peut être composée de 3 à 36 acides aminés, et qui est le lieu d'épissage alternatif (Lindberg 1993). En effet, il existe quatre isoformes différents de CD47 très conservés chez l'humain et la souris, et dont la distribution varie en fonction de la localisation cellulaire (Reinhold et al. 1995). L'isoforme numéro 2 étant le plus prédominant, et est exprimé aussi bien par les cellules d'origine hématopoïétique que les cellules épithéliales ou endothéliales. Quand à l'isoforme 4 (le plus long), il est principalement exprimé par les neurones, les cellules intestinales ou encore les testicules (Figure 16).

Le domaine extracellulaire de CD47 est indispensable pour les interactions avec ses différents ligands.

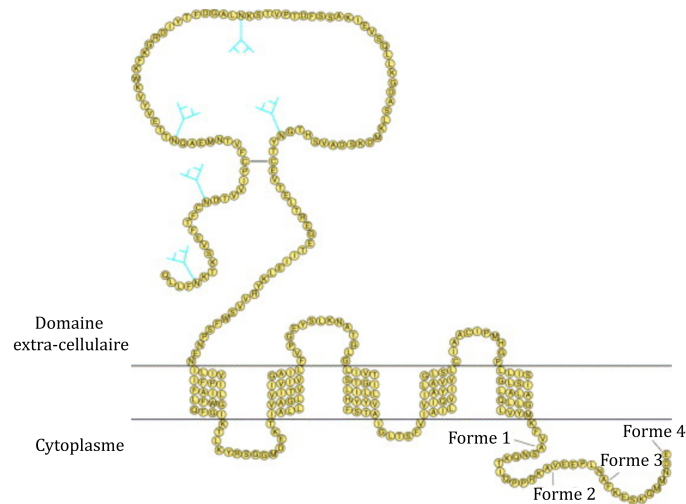


Figure 10: Représentation schématique de la structure de CD47 et de ses différents isoformes.
(modifié d'après Brown et al., 2001)

a) LIGANDS ET ACTIVITES BIOLOGIQUES

Les interactions de CD47 avec ses partenaires ont un rôle dans de nombreux processus biologiques. On peut notamment citer l'activation, la migration, la prolifération, l'adhésion ou encore l'apoptose cellulaire.

i. Signal regulatory protein (SIRP) α et γ

Le récepteur CD47 peut se lier aux isoformes de SIRP α (aussi appelé SHPS1 (Fujioka et al. 1996), p84 ou encore CD172a) (Jiang et al. 1999) et SIRP γ (aussi appelé CD172g ou SIRP β 2). Ces protéines font parti de la superfamille des immunoglobulines et diffèrent par leurs domaines cytoplasmiques.

La liaison de SIRP α au CD47 semble réguler une multitude d'interactions cellulaires, comme par exemple dans le système immunitaire où elle régule l'homéostasie des lymphocytes (Legrand et al. 2011; Sato-Hashimoto et al. 2011), la maturation et l'activation des cellules dendritiques (Latour et al. 2001), ainsi que la transmigration cellulaire (de Vries et al. 2002; Y. Liu et al. 2002). Cette liaison a aussi un rôle dans le remodelage osseux (Lundberg et al. 2007; Maile et al. 2011).

CD47 fonctionne comme un marqueur du soi, et sa délétion entraîne l'inhibition de la signalisation de différents facteurs de croissance (Kharitononkov et al. 1997). En effet, il a été montré que chez les souris déficientes en CD47, les cellules circulantes sont rapidement éliminées par les M Φ s de la rate car il manque le signal inhibiteur de la

liaison entre CD47 et SIRP α ; et la liaison des cellules sanguines avec les M Φ s semble suffisante pour induire un signal pro-phagocytaire (Oldenborg et al. 2000).

En revanche, le rôle de l'interaction CD47/SIRP γ est très peu connu : *in vitro*, elle induit la migration transendothéliale des lymphocytes T (Stefanidakis et al. 2008).

ii. Les intégrines

CD47 a été pour la première fois découvert associé à l'intégrine $\alpha v \beta 3$ (Brown 1990). Il a été montré que cette liaison induit l'activation des neutrophiles par la MEC. Les neutrophiles déficients en CD47 ne s'activent pas en réponse aux ligands de l'intégrine de la MEC (Lindberg et al. 1996). Il a également été montré que CD47 peut interagir et réguler l'adhésion et la réponse à la MEC avec les intégrines $\alpha 2 \beta 1$ et $\alpha 2 \beta 3$ sur les plaquettes (Chung et al. 1997; Chung et al. 1999) ; l'intégrine $\alpha 2 \beta 1$ sur les muscles lisses (Wang et al. 1998) ; l'intégrine $\alpha 4 \beta 1$ sur les globules rouges et sur les lymphocytes (Brittain et al. 2004; Yoshida et al. 2000); l'intégrine $\alpha 6 \beta 1$ sur la microglie (Koenigsnecht et Landreth 2004); et l'intégrine $\alpha 5$ sur les chondrocytes (Orazizadeh et al. 2008). Très récemment, notre équipe a montré que CD47 forme également un cluster de récepteurs avec l'intégrine Cd11b/CD18 exprimée à la surface des PMs notamment (Calippe et al. 2017).

iii. TSP-1

Un second mécanisme important dans la régulation de l'angiogenèse a été découvert *via* l'interaction entre TSP-1 et son récepteur CD47. Cette liaison induit l'inhibition de la réponse des cellules vasculaires au monoxyde d'azote (NO) (Isenberg et al. 2006). Le NO est une molécule produite par les cellules endothéliales et est impliqué dans une multitude de processus vasculaires. Il inhibe notamment l'apoptose et favorise la prolifération des cellules endothéliales (Dimmeler et al. 1999), ainsi que leur migration (Ziche et al. 1994; Murohara et al. 1999). C'est la liaison du facteur pro-angiogénique VEGF-A sur son récepteur VEGFR2 qui induit la production de NO après une cascade d'activations (Papapetropoulos et al. 1997; Fulton et al. 1999; Dimmeler et al. 1999). Une fois secrété, le NO a la propriété d'activer la synthèse de GMP cyclique (Roy et Garthwaite 2006) ; une cascade d'activation dépendant de GMP cyclique va induire la perméabilité et la prolifération des cellules endothéliales *in vitro* (Hood et al. 1998) ; et l'angiogenèse *in vivo* (Fulton et al. 2001). Le NO semble également capable d'activer la

transcription de VEGF grâce à l'induction de la synthèse de HIF-1 α (Kasuno et al. 2004). TSP-1 est un antagoniste très important de la voie de signalisation du NO, et inhibe ses propriétés pro-inflammatoires, notamment par l'activation du récepteur CD47 (Isenberg et al. 2009). La liaison de TSP-1 au CD47 induit la production de signaux régulateurs, qui vont inhiber la synthèse de GMP cyclique (Suchard et Mansfield 1996), et interrompre l'activité pro-angiogénique de la voie de signalisation du NO.

Il semblerait que TSP-1 induit également la transmigration des neutrophiles via sa liaison au récepteur CD47 (Y. Liu et al. 2001) et favorise l'inflammation. En effet, en conditions inflammatoires, les neutrophiles migrent à travers l'endothélium vasculaire, la matrice cellulaire et les surfaces des muqueuses en réponse à des signaux chimiques. Dans ces conditions, les neutrophiles libèrent des espèces réactives de l'oxygène, des enzymes protéolytiques et des médiateurs inflammatoires qui induisent la lésion du tissu infiltré (Stockley 1995).

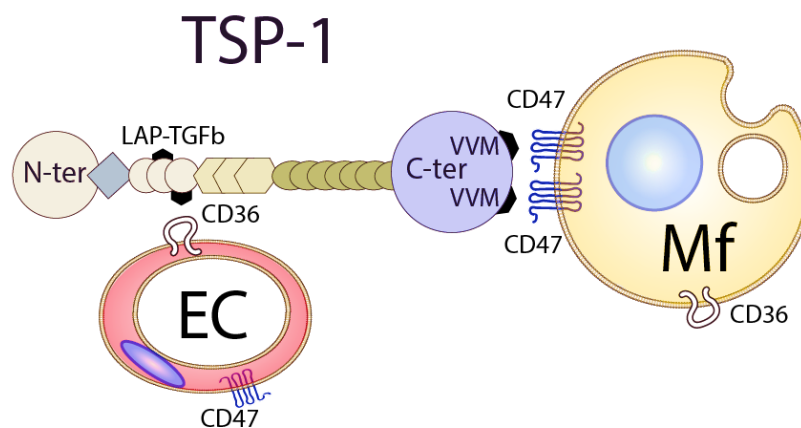


Figure 11: Représentation schématique des interactions entre la Thrombospondine-1 et ses différents ligands.

(illustration de F. Sennlaub)

C. LE PEPTIDE 4N1K : ACTIVATEUR DE CD47

Comme développé précédemment, le domaine C-terminal de TSP-1, et plus particulièrement entre les acides aminés 964 et 1170, a été identifié comme étant le site d'interaction avec TSP-1 (Kosfeld et al. 1993; Gao et al. 1994; Gao et al. 1996). Les séquences VVM de TSP-1 nécessaires à l'activation de CD47 peuvent être mimées par le peptide 4N1K dérivé de TSP-1 (Martinez-Torres et al. 2015). 4N1K est un fragment peptidique, mis au point dans les années 1990 (Kosfeld et al. 1993; Gao et al. 1994), qui mime le domaine globulaire C-terminal de TSP-1. Ce peptide est composé de dix acides

aminés : KRFYVVMWKK, et fonctionne à des concentrations molaires 100 fois plus importantes que TSP-1 (McDonald et al. 2003).

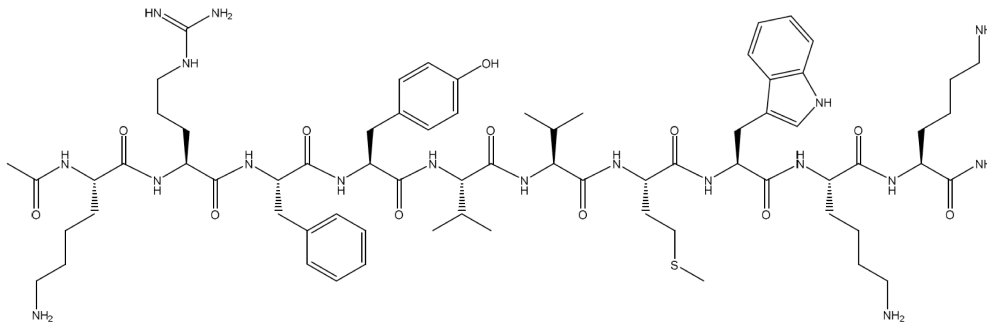


Figure 12: Structure du peptide 4N1K, activateur de CD47

Plusieurs études ont montré que le peptide 4N1K régule les fonctions d'adhésion relatives aux intégrines dans plusieurs systèmes cellulaires. On peut notamment citer les études dans lesquelles 4N1K diminue l'adhésion cellulaire aux TSP immobilisées (Anilkumar et al. 2002; Rock et al. 2010), aux monocouches d'endothélium (Ticchioni et al. 2001), ainsi qu'aux substrats se liant aux intégrines comme la laminine (Kosfeld et al. 1993) et le collagène (Wang et al. 1999). En revanche, d'autres travaux ont montré que 4N1K pouvait augmenter l'adhésion de certains de ces mêmes ligands (Brittain et al. 2001, 2004; Barazi et al. 2002).

D. LA SIGNALISATION TSP-1/CD47 ET DMLA

TSP-1 et ses trois récepteurs, CD36, CD47 et LRP1, sont tous exprimés par l'endothélium vasculaire (Bornstein 2001), l'EPR (Miyajima-Uchida et al. 2000; Uno et al. 2006) et les MΦs (Fordham et al. 2012; Gautier et al. 2013), les trois types cellulaires qui semblent jouer un rôle dans la survenue de la DMLA. Leurs interactions régulent différentes fonctions dépendantes de la cellule et de la présence d'autres ligands et co-récepteurs.

Dans les tissus adultes sains, TSP-1 est faiblement exprimée ; mais elle figure parmi les 5% des protéines les plus exprimées par l'EPR (Strunnikova et al. 2010). Grâce à l'immunohistochimie, Uno et ses collègues ont observé un marquage de TSP-1 important dans la membrane de Bruch mais également dans la membrane basale de l'EPR, la choriocapillaire et sur les parois des vaisseaux choroïdiens. Ils ont également observé

que cette expression était plus forte dans la rétine centrale en comparaison à la rétine périphérique (Uno et al. 2006).

Dans les yeux DMLA CNV, l'expression de TSP-1 est fortement réduite dans la rétine centrale et dans la plupart des localisations, à l'exception de la membrane des cellules de l'EPR (Uno et al. 2006). Il n'est pour l'heure pas clair si l'expression de TSP-1 est affectée dès les premiers stades de la DMLA. Dans les yeux GA, l'expression semble diminuée au sein des lésions, ce qui semble logique car les cellules de l'EPR (qui expriment TSP-1) ont disparu. Toujours grâce aux fonctions anti-angiogéniques de TSP-1, les souris *Thbs1^{-/-}*, déficientes en TSP-1, développent des CNV plus importantes après uvéites ou après inflammation laser.

Notre équipe a récemment confirmé que les souris *Thbs1^{-/-}* développent une accumulation sous-rétinienne de PMS avec l'âge et après stimulus lumineux ou par laser. De façon intéressante, ce phénotype est partagé avec les souris *CD47^{-/-}* mais pas avec les souris *CD36^{-/-}* (Calippe et al. 2017). Les cellules microgliales issues de souris *Thbs1^{-/-}* et *CD47^{-/-}* transférées dans l'espace sous-rétinien de receveurs sauvages résistent significativement à l'élimination observée dans les cellules microgliales normales. L'ajout de TSP-1 recombinant accélère très significativement l'élimination des cellules microgliales, reverse le phénotype des cellules microgliales *Thbs1^{-/-}* mais n'a pas d'effet sur les cellules microgliales *CD47^{-/-}*. Ces observations suggèrent que les interactions entre TSP-1 et CD47 régulent l'élimination des macrophages sous-rétiniens (Calippe et al. 2017).

V. LA SERINE PROTEASE HTRA1 (OU PRSS11)

Comme nous l'avons vu dans le chapitre 2, le gène de la protéase HTRA1, fait parti des trois gènes affectés par l'haplotype à risque du chromosome 10q26 prédisposant pour la DMLA. Dans cette partie, nous allons détailler HTRA1 et son possible rôle dans les mécanismes de pathogenèse de la DMLA.

La famille des protéines Htra est composée de sérines protéases, indépendantes de l'ATP et très conservées entre les espèces. Elles sont exprimées très largement, des organismes procaryotes aux organismes eucaryotes, des bactéries aux mammifères, y compris par l'humain. Ce sont des homologues à la protéase Htra/DegP induite par choc thermique de la bactérie *Escherichia coli*, découverte à la fin des années 1980 (Lipinska et al. 1988).

La fonction principale des protéines HtrA est de reconnaître les protéines mal formées ou mal localisées, qui présentent des domaines hydrophobes exposés, et de les dégrader (Strauch et Beckwith 1988). En ce sens, ces protéases sont très importante pour l'homéostasie : elles empêchent l'accumulation de protéines mal conformées, mal formées ou endommagées. Certaines Htra ont également un rôle de chaperonne et favorisent le repliement des protéines.

A. ASPECTS STRUCTURELS

Chez l'humain, il existe quatre protéines homologues HtrA : HtrA1, HtrA2, HtrA3 et HtrA4. Zumbrunn et ses collègues ont décrit pour la première fois HtrA1 en 1996 (Zumbrunn et Trueb 1996). La caractéristique principale des membres de la famille des HtrA est la présence d'un domaine protéase et d'un ou deux domaines PDZ (postsynaptic density of 95 kDa, Discs large and zonula occludens 1) en C-terminal. La région N-terminale est plus variable et contient des motifs régulateur et signal. Au niveau tridimensionnel, les protéines HtrA forment des homotrimères de forme pyramidale lors de leur activation (Krojer et al. 2008).

Les deux isoformes les plus documentés sont HtrA1 et HtrA2. Ces deux isoformes possèdent plusieurs similarités comme le domaine protéase et le domaine PDZ. En revanche, HtrA2 n'existe que sous la forme de protéine intracellulaire alors qu'HtrA1 peut aussi être sécrétée grâce à son peptide signal.

Nous ne nous intéresserons dans la suite de ce manuscrit qu'à l'isoforme HTRA1, qui est affecté par l'haplotype à risque du chromosome 10q26 et qui pourrait avoir un potentiel rôle dans la pathogenèse de la DMLA. En effet, HTRA1 est fortement exprimé par l'EPR et les PMs, les deux types cellulaires impliqués dans la rupture de l'immunosuppressivité de l'espace sous-rétinien. De plus, de nombreuses études ont fait le lien entre HTRA1 et DMLA.

B. FONCTIONS BIOLOGIQUES

HTRA1 est une sérine protéase : c'est une enzyme qui hydrolyse les liaisons peptidiques en utilisant les sites actifs des résidus sérine comme nucléophile (Hedstrom 2002). Elle est exprimée de façon ubiquitaire (De Luca et al. 2003), mais ses fonctions biologiques précises sont encore largement inconnues.

A ce jour, nous savons que HTRA1 est présente dans deux localisations cellulaires

- dans le milieu extra-cellulaire, HTRA1 est notamment impliquée dans l'homéostasie de la MEC (Canfield et al. 2007)
- au sein de la cellule, HTRA1 a été localisée dans le cytoplasme où elle joue un rôle dans la dégradation de protéines qui vont réguler entre autres la prolifération et la croissance cellulaire (Campioni et al. 2010) ainsi que dans les microtubules (Chien et al. 2009) et le noyau (Clawson et al. 2008)

De plus, HTRA1 régule la signalisation des protéines de la famille du TGF- β (Oka et al. 2004), ainsi que des facteurs de croissance des fibroblastes (Kim et al. 2012; Zhang et al. 2012), le plus souvent via des interactions physiques protéine-protéine.

1) SUBSTRATS

Un grand nombre de protéines ont été identifiées comme étant des substrats de HTRA1. La liaison d'un substrat à HTRA1 induit un changement de conformation de la protéase, de son état au repos à son état activé (Truebestein et al. 2011). Le tableau suivant présente une liste des différents substrats de HTRA1 connus à ce jour :

Substrats de HTRA1	Rôles	Références
Décorine	Protéoglycane de la matrice cellulaire	(Hadfield et al. 2008; Tsuchiya et al. 2005)

Vitronectine	Glycoprotéine plasmatique	(An et al. 2010)
Fibronectine	Glycoprotéine de la matrice extracellulaire	(Hadfield et al. 2008; Vierkotten, Muether, et Fauser 2011)
Clusterine	Protéine chaperonne	(Hadfield et al. 2008)
Protéine de matrice Gla	Inhibiteur de la calcification vasculaire	(Hadfield et al. 2008)
α 2-macroglobuline	Glycoprotéine plasmatique	(An et al. 2010)
Collagène de type II	Composant de la matrice extracellulaire	(Tsuchiya et al. 2005)
Aggrécane	Protéoglycane du cartilage articulaire	(Tsuchiya et al. 2005; Chamberland et al. 2009)
Fibromoduline	Protéoglycane de la matrice extracellulaire hépatique	(Tsuchiya et al. 2005; An et al. 2010)
Elastine	Protéine structurale de la matrice extracellulaire	(S. Kumar et al. 2017)
Nidogène	Protéine de la matrice extracellulaire	(Vierkotten, Muether, et Fauser 2011)
Fibuline	Glycoprotéine de la matrice extracellulaire	(Vierkotten, Muether, et Fauser 2011)
ADAM9	Protéine membranaire, rôle dans les interactions cellulaires	(An et al. 2010)
Taline	Protéine du cytosquelette	(An et al. 2010)
Fascine	Protéine du cytosquelette	(An et al. 2010)
Sialo-protéine osseuse	Protéine matricellulaire de la minéralisation osseuse	(Tiaden et al. 2012)
Protéine Tau	Protéine associée aux microtubules	(Tennstaedt et al. 2012)
APOE4	Transporteur de lipides	(Chu et al. 2016)

IGFBP5	Facteur de croissance de l'insuline	(J. Hou, Clemmons, et Smeekens 2005)
--------	-------------------------------------	--------------------------------------

2) IMPLICATIONS PATHOLOGIQUES

Du fait du rôle de HTRA1 dans de très nombreux processus biologiques différents, cette protéase est impliquée dans de diverses pathologies sévères, comme le cancer, la maladie d'Alzheimer, la dystrophie musculaire de Duchenne, l'arthrose ou encore la maladie ischémique héréditaire des petits vaisseaux cérébraux (CARASIL). Dans la plupart de ces maladies, des fragments de protéines ou des agrégats produits ou dégradés par HTRA1, sont soit une des causes de la maladie, soit un des facteurs prédisposant pour la maladie. De plus HTRA1 fait parti des trois gènes qui composent l'haplotype à risque du chromosome 10q26 associé à la DMLA.

A ce jour, pour chacune de ces pathologies, les fonctions biologiques précises de HTRA1 restent à établir.

a) Maladies due à un déficit de HTRA1

i. Cerebral Autosomal Recessive Arteriopathy with Subcortical Infarcts and Leukoencephalopathy (CARASIL)

CARASIL est une maladie héréditaire qui touche les petits vaisseaux cérébraux. Elle est caractérisée par des troubles de la marche qui apparaissent précocement, une alopecie prématurée du cuir chevelu, des épisodes ischémiques, des douleurs lombaires et des troubles cognitifs progressifs entraînant une démence sévère (Fukutake 2011).

HTRA1 est a ce jour le seul gène impliqué dans la survenue de la maladie (Hara et al. 2009). Les mutations du gène retrouvées chez les patients malades conduisent toutes à une protéine ayant une activité protéase extrêmement réduite et qui ne serait plus capable de réprimer la signalisation du TGF- β (Hara et al. 2009). Les hypothèses actuelles se fondent donc sur le fait que, HTRA1 ne pouvant plus cliver les membres de la famille TGF- β , TGF- β s'accumule au niveau des petites artères cérébrales des patients (Hara et al. 2009). Il a également été retrouvé une accumulation de fibronectine et de versicane (Yanagawa et al., 2002), protéines induites par TGF- β . Toutes ces protéines de la MEC favorisent le processus de fibrose. Il est a noter que la fibronectine est également un substrat de HTRA1 en conditions physiologiques (Grau et al. 2005).

Mais l'étude de cette maladie est particulièrement compliquée, du fait du très faible nombre de patients concernés : seulement 60 à 70 ont été diagnostiqués à ce jour dans le monde, et presque exclusivement au Japon (Bianchi et al. 2014).

ii. Cancers

De nombreux éléments prouvent que HTRA1 fonctionne en tant que suppresseur de tumeur, et donc promeut la mort des cellules cancéreuses (Baldi et al. 2002). La diminution de l'expression de *HTRA1* contribue à la survie des cellules cancéreuses, et donc facilite la croissance de la tumeur, et l'apparition de métastases.

L'expression de HTRA1 est fréquemment diminuée, notamment dans les tumeurs ovariennes (Chien et al. 2004), dans les mélanomes métastatiques (Baldi et al. 2002), dans les cancers de l'endomètre (Mullany et al. 2011) ou encore du poumon (Esposito et al. 2006).

Une équipe a suggéré que le traitement prolongé aux estrogènes pourrait induire une délétion d'un fragment du gène de HTRA1 (Zurawa-Janicka et al. 2008)(Zurawa-Janicka et al., 2008) ; une autre équipe que le locus de HTRA1 était sujet à une inactivation épigénétique (Chien et al. 2004). L'hyperméthylation de l'ADN ainsi qu'une exposition prolongée aux estrogènes pourrait être un des mécanismes de l'extinction du gène HTRA1. Lorsque des lignées cellulaires de mélanome métastatique sont traitées avec HTRA1, la prolifération cellulaire est inhibée *in vitro* et *in vivo* pour la croissance tumorale sur des souris nu/nu (Baldi et al. 2002).

Le mécanisme moléculaire du fonctionnement de HTRA1 comme suppresseur de tumeur n'est pas encore élucidé. Cependant, il est clair que HTRA1 promeut la mort des cellules cancéreuses via une signalisation pro-apoptotique.

iii. La maladie d'Alzheimer

Il a été suggéré que HTRA1 pourrait être impliqué dans le développement de la maladie d'Alzheimer. En effet, *in vitro*, HTRA1 dégrade divers fragments de protéines précurseurs de l'amyloïde (Ab), qui sont les composants majeurs des plaques neurotoxiques séniles dans le cerveau de patients atteints (Grau et al. 2005; Campioni et al. 2010). L'inhibition de l'activité protéase de HTRA1 résulte en l'accumulation d'amyloïde Ab dans le surnageant de lignées cellulaires d'astrocytes humains U373. Des analyses immunohistochimiques ont révélé que les astrocytes et les neurones corticaux

expriment fortement HTRA1 ; et que HTRA1 colocalise avec les dépôts d'amyloïde dans les cerveaux de patients. Toutes ces observations suggèrent que HTRA1 est impliquée dans le métabolisme de l'amyloïde β et prévient la formation de dépôts Ab dans le cerveau, et donc le protège contre le développement de la maladie d'Alzheimer (Grau et al. 2005).

Une étude d'association génétique a montré une association entre l'haplotype à risque du chromosome 10q26 et la maladie d'Alzheimer (Gatta et al. 2008) ; cependant, l'association entre HTRA1 et maladie d'Alzheimer reste controversée, un autre étude n'a retrouvé aucun lien entre la protéine et la maladie (Turunen et al. 2011). Des études complémentaires sont donc nécessaires afin de déterminer si l'expression de HTRA1 est associée à la maladie d'Alzheimer.

b) Rôles délétères de HTRA1

i. Arthrose

L'arthrose est caractérisée par une perte de cartilage articulaire qui s'accompagne de la dégénérescence des tissus jointifs, comme la synovie ou l'os sous-chondral.

Ces dernières années, l'étude de la part inflammatoire dans les mécanismes de pathogenèse de la maladie est devenue de plus en plus importante, et plusieurs études ont noté une augmentation de cytokines pro-inflammatoires et de MMP (Lohmander et al. 1993; Szekanecz et al. 2010), par les fibroblastes synoviaux dans le cartilage des patients atteints (Murphy et al. 2002; Troeberg et al. 2012). En 1998, la première association entre HTRA1 et arthrose a été faite : l'expression de HTRA1 (en ARNm et en protéine) est augmentée dans des explants de cartilages de patients malades (Hu et al. 1998). Cette observation a depuis été largement confirmée.

A ce jour, plusieurs hypothèses sont faites concernant le rôle de HTRA1 dans la maladie. Les protéines TGF- β sont physiologiquement impliquées dans la maintenance des cartilages, principalement en empêchant la différenciation hypertrophique des chondrocytes en cellules osseuses (Serra et al. 1997). HTRA1 inhibe la signalisation de TGF- β ; ce qui permet la différenciation des chondrocytes et donc le remplacement de cartilage articulaire en os (Tsuchiya et al. 2005). De plus, HTRA1 pourrait également contribuer à la dégénérescence du cartilage via la protéolyse d'une multitude de protéines de la MEC, qui sont les constituants majeurs du cartilage ; on peut notamment

citer l'aggrécane, la décorine, la fibromoduline, la fibronectine, le collagène de type II ou encore la protéine de matrice Gla (Grau et al. 2005; Hadfield et al. 2008). Enfin, HTRA1 facilite la destruction de la MEC en activant les MMP1 et 3 (Grau et al. 2005). Les hauts niveaux de HTRA1 détectés dans les cartilages et le fluide synovial des patients atteints d'arthrose pourraient donc être la cause de l'aggravation de la maladie.

ii. Dystrophie musculaire de Duchenne

La dystrophie musculaire de Duchenne est une maladie neuromusculaire causée par une mutation du gène de la dystrophine qui conduit à une dégénérescence des muscles lisses, squelettiques et cardiaques. Dans cette maladie, les fibres musculaires sont peu à peu remplacées par du tissu adipeux et fibreux.

Une étude a fait l'observation de niveaux de HTRA1 augmentés 4 à 5 fois dans les muscles des patients atteints comparé aux muscles de patients contrôle (Bakay et al. 2002). Bien qu'aucune étude fonctionnelle n'ait été réalisée à ce jour, il est spéculé que des hauts niveaux de HTRA1 chez les patients malades pourraient contribuer indirectement à la dégénérescence musculaire via l'inactivation de l'IGFBP5, un substrat de HTRA1. En effet, IGFBP5 est considéré comme étant un régulateur positif de la régénération musculaire, notamment grâce à sa capacité d'activer la signalisation de l'IGF-1 (Kuemmerle et al. 2002).

C. HTRA1 ET DMLA

De nombreuses études d'association génétiques ont fait le lien entre HTRA1 et la DMLA (Fritsche et al. 2014; Swaroop et al. 2007; Yang et al. 2006). Comme nous l'avons vu précédemment, l'haplotype à risque du chromosome 10q26 est également situé sur les gènes *PLEKHA1* et *ARMS2*. A ce jour, aucune étude fonctionnelle n'a pu déterminer le rôle de ces trois gènes dans les mécanismes de pathogenèse de la DMLA.

Plusieurs études semblent montrer que HTRA1 serait l'acteur majeur au sein de l'haplotype à risque dans la survenue de la DMLA.

En effet, Yang et ses collègues ont montré que le SNP au sein du promoteur de HTRA1 est associé à une augmentation de l'expression du gène *HTRA1* dans les lymphocytes et l'EPR de patients atteints de DMLA (Yang et al. 2006). Cependant, cette étude n'a été réalisée que sur 3 patients porteurs de l'haplotype à risque. Une autre étude a montré

que le variant sur le promoteur de *HTRA1* est associé à une activation de la transcription de *HTRA1* dans les cellules en culture (DeWan et al. 2006).

Ces résultats n'ont pas fait l'unanimité dans la communauté scientifique, et Kanda et ses collègues ont montré que le variant sur le promoteur de *HTRA1* n'affectait l'expression de *HTRA1* ni dans les cellules en culture, ni dans la rétine de patients DMLA (Kanda et al. 2007). De la même façon, aucune association entre le SNP affectant *HTRA1* et son niveau d'ARNm n'a été retrouvée dans les lymphocytes de patients atteints de DMLA dans une autre étude (Chowers et al., 2008).

Finalement, une équipe a suggéré que ce serait la diminution de l'expression de *ARMS2* associée à l'augmentation d'expression de *HTRA1* qui pourrait être à l'origine de la maladie (Yang et al. 2010). Il a été suggéré que cette augmentation observée chez les porteurs de l'haplotype à risque était principalement due au SNP rs11200638 localisé sur le promoteur de *HTRA1*. Ce SNP affecte un motif CG au sein d'un îlot CpG (région riche en GC qui chevauchent les régions promotrices et le premier exon de nombreux gènes ; site de méthylation de l'ADN) du promoteur du gène *HTRA1* (Wang 2014). Mais la différence d'expression de *HTRA1* observée pourrait également être due aux interférences liées aux nombreux SNPs de cet haplotype.

Indépendamment du génotype, la concentration de *HTRA1* est significativement augmentée dans l'humeur aqueuse de patients atteints de DMLA (Tosi et al. 2017), *HTRA1* est fortement présent dans les drusen (Yang et al. 2006; Tuo et al. 2008), et les souris qui sur-expriment *HTRA1* développent un phénotype similaire à la DMLA (Iejima et al. 2015; Jones et al. 2011). *In vitro*, le traitement des PMs avec du lipopolysaccharide (LPS) induit l'augmentation d'expression de *HTRA1* (Y. Hou et al. 2013).

Enfin, la dernière étude publiée très récemment de Liao et ses collègues montre que l'ARNm de *HTRA1* est exprimé ubiquitairement et près de 400 fois plus que l'est *ARMS2*, et 8,5 fois plus que *PLEKHA1* dans la moyenne des tissus évalués. Dans plus de la moitié des tissus testés, l'expression de *HTRA1* est plus forte chez les patients homozygotes à risque. Ils ajoutent également que, grâce à l'étude de la base de données ENCODE, les cellules de l'EPR des patients homozygotes à risque présentent des sites d'ouverture de la chromatine au niveau des SNP affectant le promoteur de *HTRA1* ; ce qui favorise l'accès des facteurs de transcription au gène *HTRA1*. De plus, contrairement aux gènes

PLEKHA1 et *ARMS2*, assez peu de SNPs sont présents au niveau du gène *HTRA1* ; et ces SNPs sont pour la plupart très associés à la DMLA (Liao et al. 2017)

Toutes ces données suggèrent que *HTRA1* pourrait avoir un rôle majeur dans la pathogenèse de la DMLA.

OBJECTIFS

La couche des photorécepteurs et l'espace sous-rétinien, localisé entre l'épithélium pigmentaire rétinien (EPR) et les segments externes des photorécepteurs, est une zone immunosuppressive qui fait partie d'un privilège immun. Cette zone est caractérisée par l'absence de vaisseaux lymphatiques et sanguins, mais aussi de phagocytes mononucléés (PMs, famille de cellules qui comprend les monocytes (Mos), les M Φ résidents (rM Φ s) et inflammatoires (iM Φ s) et les cellules dendritiques). L'immunosuppressivité de cet espace est maintenue par des signaux exprimés par l'EPR qui induisent l'apoptose de cellules infiltrantes (PMs, leucocytes et cellules vasculaires). Parmi ces signaux, on retrouve la voie de signalisation FasL/Fas mais également l'interaction entre TSP-1 et CD47. La DMLA est associée à une rupture de l'immunosuppression de l'espace sous-rétinien et à une infiltration de PMs dans cet espace (Sennlaub et al., 2003). Les PMs contribuent en effet à la néovascularisation choroïdienne (DMLA exsudative) ainsi qu'à la dégénérescence des photorécepteurs (DMLA atrophique) (Sennlaub et al., 2003 ; Combadiere et al., 2007). Nous avons récemment montré que l'activation de CD47 par TSP-1 était nécessaire à l'élimination des PMs infiltrant l'espace sous-rétinien (Calippe et al., 2017).

Des études d'associations génétiques ont montré qu'un variant du CFH, le Y402H, et un haplotype de la région du chromosome 10q26 représentent la majeure part du risque génétique pour la DMLA (Fritsche et al., 2014; Swaroop et al., 2007; Yang et al., 2006). L'haplotype à risque (minor Haplotype, mH) du chromosome 10q26 est caractérisé par un groupe de SNPs qui sont en fort déséquilibre de liaison. On peut notamment citer le rs1120063812, le rs1049331, le rs2293870, le rs3793917, le rs10490924 et le rs3750846. Ces SNPs se situent à proximité des régions codantes de trois gènes : *PLEKHA1*, *ARMS2* et *HTRA1* (Liao et al., 2017). Les individus homozygotes pour cet haplotype (mH/mH) présentent environ 10 fois plus de risques de développer une MLA ou une forme tardive de DMLA comparé aux porteurs homozygote de l'haplotype commun (common Haplotype : cH/cH). Il a été suggéré que le génotype à risque augmente les niveaux d'ARNm de *HTRA1* dans les lymphocytes et l'EPR dans des études de très petite taille (3 porteurs homozygotes) (Chan et al., 2007) et plus récemment dans une étude utilisant la banque de donnée Genotype tissue expression project (GTEx) (Liao et al., 2017).

Indépendamment du génotype, la concentration de HTRA1 est significativement augmentée dans l'humeur aqueuse de patients atteints de DMLA (Tosi et al., 2017), HTRA1 est fortement présent dans les drusen (Yang et al., 2006 ; Tuo et al., 2008), et les souris qui sur-expriment HTRA1 développent un phénotype similaire à la DMLA (Iejima et al., 2015 ; Jones et al., 2011). Toutes ces données suggèrent que HTRA1 pourrait avoir un rôle majeur dans la pathogenèse de la DMLA.

HTRA1 est une sérine protéase fortement exprimée par l'EPR (Yang et al., 2006) et les PMs activés (Hou et al., 2013). Cette protéase peut notamment dégrader des protéines de la matrice extracellulaire (Hollander et al., 1995 ; Grau et al., 2005 ; An et al., 2010), mais aussi le TGF- β (Launay et al., 2008), molécule capable d'induire l'apoptose des PMs (Singhal et al., 2000) et d'inhiber l'expression d'IL-6 dans les Mos humains en conditions physiologiques (Musso et al., 1990).

L'objectif de ma thèse était (i) d'évaluer l'influence de l'haplotype de 10q26 sur l'expression de *PLEKHA1*, *ARMS2* et *HTRA1* dans les lymphocytes et les monocytes de 18 sujets à risque mH/mH et 18 individus porteurs de l'haplotype commun cH/cH, ; ce qui représente la plus grande étude de ce type à ce jour ; (ii) d'évaluer l'expression de HTRA1 dans des tissus de donneurs sains et atteints de DMLA ; (iii) d'étudier l'influence de HTRA1 sur l'environnement immunosuppresseur de l'espace sous-rétinien.

Dans une première partie, l'étude des sujets mH/mH et cH/cH, dont les génotypes étaient connus suite à leur participation à l'étude GWAS du Centre National d'Ophtalmologie des Quinze-Vingts, nous indique que les Mos des individus mH/mH expriment significativement plus de *HTRA1* que les individus porteurs de l'haplotype commun. La transcription de *HTRA1* dans les Mos est 100 fois supérieure aux taux de HTRA1 exprimés par les lymphocytes. *PLEKHA1* est exprimé d'une manière similaire chez tous les sujets et *ARMS2* n'était pas détectable. Par la suite, nous montrons que les PMs retrouvés dans l'espace sous-rétinien et dans la rétine interne de donneurs atteints de formes tardives de DMLA expriment fortement HTRA1, indépendamment de leur génotype.

D'un point de vue mécanique, nous montrons pour la première fois que TSP-1 est un substrat de la protéase HTRA1 ; HTRA1 clive TSP-1 en deux fragments majeurs et plusieurs autres fragments mineurs. Parmi ces sites de clivages, les deux coupures responsables de la formation des deux fragments majeurs sont retrouvées entre les deux

séquences VVM du domaine C-terminal de TSP-1, qui sont nécessaires à la dimérisation et à l'activation efficace de CD47. Grâce à un modèle *in vitro* de co-culture de cellules primaires d'EPR et de Mos, et à un modèle *in vivo* d'inflammation sous-rétinienne induite par traitement laser, nous montrons que TSP-1 perd sa capacité à éliminer les PMs lorsqu'elle est digérée par HTRA1. De plus, le fait qu'en l'absence de TSP-1, HTRA1 n'influe plus sur l'élimination de PMs démontre l'importance pathogénique de ce mécanisme. Enfin, l'utilisation d'agonistes du récepteur CD47, contenant un seul ou deux sites VVM similaires à la TSP-1 native, nous a permis d'annuler les effets pro-inflammatoires de la protéase HTRA1, à la fois dans le modèle *in vitro*, mais également *in vivo*, sur le modèle murin. Ces expériences démontrent la perte d'efficacité d'une molécule comportant un seul site VVM comparé à une molécule à deux sites VVM, et expliquent la perte d'efficacité de TSP-1 après hydrolyse par HTRA1

Cette étude confirme, dans un groupe de patients plus important, que l'haplotype à risque du 10q26 est associé à une augmentation de l'expression de *HTRA1*, mais pas de *PLEKHA1*, ni de *ARMS2*. Elle révèle l'expression importante de HTRA1 dans les PMs circulant et dans les tissue atteints. Nous montrons pour la première fois que TSP-1 est un substrat de HTRA1 et comment les coupures de TSP-1 interfèrent avec sa capacité à activer le CD47 et à éliminer les PMs. L'activation thérapeutique de CD47 semble être une voie particulièrement intéressante pour restaurer l'immunosuppression dans l'espace sous-rétinien, et inhiber l'inflammation pathogène.

Les résultats détaillés de cette étude sont présentés dans le paragraphe suivant, dans l'article que je signe en premier co-auteur.

Discussion et perspectives

Les travaux présentés ci-dessus révèlent que les PMs et les Mos circulant, qui infiltrent l'espace sous-rétinien dans les yeux de donneurs atteints de formes tardives de DMLA expriment fortement la protéase HTRA1. Cette observation est en accord avec les sites d'ouverture de la chromatine au niveau du promoteur de *HTRA1* retrouvés dans les Mos (sites d'hypersensibilité à la DNase I ; retrouvés sur la base de données ENCODE) : les individus porteurs de l'haplotype à risque présentent plus de sites d'ouverture de la chromatine, ce qui facilite l'accès des facteurs de transcription au promoteur du gène. Ce résultat est également en accord avec les résultats obtenus sur l'expression de *HTRA1* par les iMΦ dans le contexte de l'arthrose (Milner et al. 2008 ; Hou et al. 2013 ; Hou et al. 2014).

Grâce à la précédente participation du Centre Hospitalier National d'Ophtalmologie des Quinze-Vingts (Paris, France) à l'étude GWAS-DMLA, nous avons eu la chance d'avoir accès à une cohorte comportant 1129 individus, parmi lesquels 107 sont homozygotes pour l'haplotype à risque du chromosome 10q26 (mH/mH), 412 individus sont hétérozygotes (mH/cH) et 610 individus sont porteurs de l'haplotype commun (cH/cH) (Fritsche et al., 2013). Dans le cadre de notre étude, nous avons réinvité 18 individus mH/mH pour un nouvel examen ophtalmologique et effectué un prélèvement sanguin. Seuls 18 patients mH/mH ont pu être convoqués de nouveau ; en effet, l'âge moyen des participants à l'étude initiale GWAS-DMLA était déjà avancé en 2013, certains sont donc décédés et d'autres vivaient trop loin du centre d'étude pour se déplacer. Ce groupe est composé de 9 sujets contrôles et de 9 patients atteints de DMLA exsudative. Un groupe de composition similaire de 18 individus cH/cH a également été recruté en parallèle pour notre étude. L'haplotype à risque du chromosome 10q26 représente le risque majeur de prédisposition pour la DMLA (Fritsche et al., 2014), les patients porteurs de l'haplotype mH/mH ont environ 10 fois plus de risques de développer une forme de la maladie (Tong et al., 2010 ; Chong et al., 2015 ; Chen et al., 2009 ; Jakobsdottir et al., 2005). Cet haplotype est défini par dix SNPs, qui incluent rs10490924, rs3750846, rs3750847, rs3750848, rs11200638, rs3793917, rs1049331, rs2293870, rs2284665, et rs932275 (Liao et al., 2017). Tous ces SNP sont en fort déséquilibre de liaison et sont situés à proximité des promoteurs de trois gènes : *PLEKHA1*, *ARMS2* et *HTRA1*. Notre analyse de l'expression des trois gènes cibles de l'haplotype à risque a révélé que l'expression de *HTRA1* par les Mos circulant est significativement augmentée chez les patients mH/mH par rapport aux patients cH/cH. Nous avons également mesuré la

quantité de HTRA1 secrétée par les Mos dans le milieu de culture, qui est aussi significativement plus importante chez les patients mH/mH. En revanche, l'haplotype à risque n'a pas eu d'effet sur l'expression de *PLEKHA1* par les Mos de notre cohorte, et l'expression de *ARMS2* par les Mos circulant n'a pas été détectée en PCR, ce qui correspond à l'absence de sites d'ouverture de la chromatine dans les régions de *ARMS2* des Mos. Ensemble, ces résultats nous indiquent que l'haplotype à risque du chromosome 10q26, augmente l'expression de *HTRA1* par les Mos ; HTRA1 pourrait avoir un rôle dans la pathogenèse de la DMLA. Suite à ces premiers résultats, nous ne nous sommes intéressés qu'à l'étude de la protéase HTRA1.

Mécaniquement, nous montrons dans cet article que HTRA1 hydrolyse TSP-1, une protéine de la matrice extracellulaire ayant des propriétés anti-inflammatoires et anti-angiogéniques très importantes. A l'état physiologique, TSP-1 empêche l'accumulation excessive et dépendante de l'âge des PMs sous-rétiniens, et inhibe aussi les processus de néovascularisation (Calippe et al. 2017 ; Wang et al. 2012 ; Ng et al. 2009), deux phénomènes caractéristiques des formes tardives de la DMLA. L'analyse des fragments de TSP-1 clivée a été réalisée par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS) des peptides semi-tryptiques. Cette étude nous a permis de mettre à jour deux sites de clivage majeurs entre les deux motifs VVM en C-terminal de TSP-1, motifs essentiels pour la liaison de TSP-1 à son récepteur CD47. Les expériences de western blot sur la TSP-1 recombinante entière et sur la protéine recombinante de son domaine C-terminal ont confirmé ces résultats : les deux sites de coupure majeurs entre les motifs VVM sont responsables de l'apparition des fragments de TSP-1 clivée prédominants. Des tests précédemment réalisés sur l'activation de CD47 par une protéine TSP-1 recombinante à laquelle il manque un motif VVM ont montré que l'activation de CD47 était fortement (50 fois) diminuée (McDonald et al. 2003). On retrouve cette activation moins efficace de CD47 avec TSP-2, isoforme de TSP-1, qui ne contient qu'un motif VVM dans sa séquence (Isenberg et al. 2009). Ces résultats nous font penser que, dans notre étude, lorsque TSP-1 est clivée, entre ses deux motifs VVM, cela pourrait réduire de façon importante sa capacité à activer son récepteur CD47, et donc diminuer l'élimination des PMs dans l'espace sous-rétinien (Calippe et al. 2017).

Nous avons donc réalisé une étude fonctionnelle afin de vérifier cette hypothèse. Pour se faire, nous avons utilisé un modèle *in vitro* de co-culture d'EPR primaires de porc sur lesquels nous cultivons des Mos circulants primaires humains fraîchement isolés, ainsi

qu'un modèle d'inflammation sous-rétinienne induite par laser *in vivo*. Nous avons retrouvé dans ces deux modèles que HTRA1 supprime l'élimination immunitaire physiologique de l'EPR sur les PMs. Cet effet n'a été retrouvé que lorsque TSP-1 était initialement présente. En effet, l'injection intra-vitréenne de HTRA1 sur des souris déficientes en TSP-1 après traitement laser n'augmente pas l'inflammation sous-rétinienne. Ces effets pro-inflammatoires de HTRA1 se sont également révélés être similaires à la délétion de TSP-1 ou de CD47 : le traitement par des anticorps bloquants spécifiques de TSP-1 ou CD47 induit la survie des Mos sur l'EPR dans notre modèle de co-culture, de façon similaire à l'ajout de HTRA1.

Il est également intéressant de noter que l'inhibition de la voie de signalisation du TGF- β par HTRA1 ne semble pas jouer un rôle dans l'accumulation des PMs dans l'espace sous-rétinien, bien que cette signalisation ait été précédemment décrite comme étant un régulateur important des effets pro-inflammatoires de HTRA1 (Clausen et al., 2011). Nous avons utilisé un anticorps bloquant du récepteur CD36 dans nos co-cultures, l'activation de CD36 étant nécessaire pour la séparation de LAP (dépendant de TSP-1) et permettre l'activation du TGF- β (Yehualaeshet et al., 1999) ; ainsi qu'un antagoniste pharmacologique du récepteur au TGF- β . Aucun de ces deux inhibiteurs n'a eu d'effet sur l'élimination des Mos *in vitro* ; et plutôt que d'inhiber les phénomènes de néovascularisation, il a été montré que TGF- β la favoriserait *in vivo* (Wang et al., 2017).

L'utilisation d'un peptide agoniste du récepteur CD47, le 4N1K, a permis de renverser complètement les effets pro-inflammatoires de HTRA1 en rétablissant la suppression immunitaire de l'EPR *in vitro* et significativement *in vivo*.

Toutes ces expériences valident le fait que l'élimination des PMs dans l'espace sous-rétinien est dépendante de l'activation de CD47 par TSP-1. Nous montrons ici que HTRA1, dont l'expression est augmentée chez les patients porteurs de l'haplotype à risque du chromosome 10q26, clive TSP-1, qui ne peut plus activer son récepteur CD47 ; ce qui promeut la survie des PM dans l'espace sous-rétinien, et perturbe l'homéostasie sous-rétinienne.

TSP-1 fait parti des premières protéines régulatrices de l'angiogenèse identifiées (Good et al. 1990). L'interaction avec son récepteur CD36 sur les cellules endothéliales représente le principal mécanisme par lequel elle régule l'angiogenèse (Dawson et al. 1997) : la liaison de TSP-1 à CD36 induit l'apoptose des cellules endothéliales et des

cellules adjacentes (Jimenez et al. 2000). Un second mécanisme important dans la régulation de l'angiogenèse a été découvert *via* l'interaction entre TSP-1 et son récepteur CD47. Cette liaison induit l'inhibition de la réponse des cellules vasculaires au monoxyde d'azote (NO) (Isenberg et al. 2006). Le NO est une molécule produite par les cellules endothéliales et est impliqué dans une multitude de processus vasculaires. Il inhibe notamment l'apoptose et favorise la prolifération des cellules endothéliales (Dimmeler et al. 1999 ; Rossig et al. 1999), ainsi que leur migration (Ziche et al. 1994 ; Murohara et al. 1999). C'est la liaison du facteur pro-angiogénique VEGF-A sur son récepteur VEGFR2 qui induit la production de NO après une cascade d'activations (Papapetropoulos et al. 1997 ; Fulton et al. 1999 ; Dimmeler et al. 1999). Une fois secrété, le NO a la propriété d'activer la synthèse de GMP cyclique (Roy and Garthwhaite et al. 2006) ; une cascade d'activation dépendant de GMP cyclique va induire la perméabilité et la prolifération des cellules endothéliales *in vitro* (Hood et al. 1998 ; Menger et al. 2002) ; et l'angiogenèse *in vivo* (Fulton et al. 2001). Le NO semble également capable d'activer la transcription de VEGF grâce à l'induction de la synthèse de HIF-1 α (Kasuno et al. 2004). TSP-1 est un antagoniste très important de la voie de signalisation du NO, et inhibe ses propriétés pro-inflammatoires, notamment par l'activation du récepteur CD47 (Isenberg et al. 2009a). La liaison de TSP-1 au CD47 induit la production de signaux régulateurs, qui vont inhiber la synthèse de GMP cyclique (Suchard et al. 1996), et interrompre l'activité pro-angiogénique de la voie de signalisation du NO.

Dans notre étude, nous montrons que TSP-1 est un nouveau substrat de HTRA1, et que TSP-1 est clivée entre ses deux motifs VVM, qui sont nécessaires à sa liaison avec son récepteur CD47. Nous pouvons donc penser que, lorsqu'elle est clivée par HTRA1, TSP-1 perd à la fois ses propriétés anti-inflammatoires mais également ses propriétés anti-angiogéniques. En effet, TSP-1 clivée ne peut plus se lier au CD47 ; elle ne peut donc plus inhiber l'angiogenèse dépendante du NO, comme développé ci-dessus. Ceci pourrait expliquer la raison pour laquelle l'haplotype à risque du chromosome 10q26 prédispose à la fois pour la forme atrophique de la DMLA, mais également pour la forme exsudative.

HTRA1 est exprimée par de très nombreux types cellulaires et est impliquée dans diverses pathologies. Parmi ces pathologies, on peut notamment citer l'arthrose, maladie qui affecte le cartilage et pour laquelle la part inflammatoire représente un processus pathogène majeur. En effet, plusieurs équipes ont noté une augmentation de cytokines

pro-inflammatoires et de MMP (Lohmander et al. 1993 ; Kageyama et al. 2000), sécrétées par les fibroblastes synoviaux dans le cartilage des patients malades (Murphy et al. 2002 et Troeberg et al. 2012). Il est aujourd'hui admis que l'expression de HTRA1 est augmentée dans le cartilage (Hu et al. 1998) et le fluide synovial des patients atteints d'arthrose (Grau et al. 2005). TSP-1 est exprimée par les chondrocytes à l'état physiologique (Miller et al. 1988 ; DiCesare et al. 1994) ; et plusieurs équipes ont observé une diminution significative de son expression chez les patients atteints d'arthrose sévère (Pfander et al. 2000). Jusqu'à présent, les hypothèses de pathogenèse de la maladie reposent sur la signalisation du TGF- β . En effet, à l'état physiologique, TGF- β est impliqué dans la maintenance des cartilages, principalement en empêchant la différenciation hypertrophique des chondrocytes en cellules osseuses (Serra et al. 1997). Comme HTRA1 inhibe la signalisation de TGF- β ; la différenciation des chondrocytes et donc le remplacement de cartilage articulaire en os serait favorisé (Tsuchiya et al. 2005). Or, grâce au mécanisme moléculaire que nous révélons dans cette étude, nous pouvons imaginer que l'augmentation de HTRA1 pourrait induire une augmentation du clivage de TSP-1 ; qui perd alors ses propriétés anti-inflammatoires et promeut la survie des macrophages synoviaux au niveau des cartilages. La persistance et l'accumulation de ces macrophages vont augmenter la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires et des MMP et maintenir un environnement inflammatoire favorisant le développement de la maladie. Cette hypothèse doit néanmoins être vérifiée. En effet, d'autres équipes affirment que TGF- β et TSP-1 seraient des facteurs favorisant l'inflammation et les retrouvent augmentés dans le plasma de patients atteints d'arthrose (Rico et al. 2008 ; Pohlers et al. 2007). Ces observations restent contradictoires et doivent être vérifiées. Dans le cadre de résultats supplémentaires de l'étude de notre cohorte de patients, nous avons pu quantifier TSP-1 dans le plasma de nos patients et nous ne retrouvons pas de différences de concentration entre nos différents groupes, contrairement à l'équipe de Rico et ses collègues, qui montre que TSP-1 n'est quasiment pas exprimé dans le plasma de leurs patients contrôles.

Dans un tout autre contexte, la protéase HTRA1 est également impliquée dans une pathologie rare causant une artériopathie cérébrale autosomale récessive, appelée CARASIL, et caractérisée par une dégénérescence micro-vasculaire et des ischémies (Fukutake et al. 2011). *HTRA1* est à ce jour le seul gène impliqué dans la survenue de la maladie (Hara et al. 2009). Les mutations du gène retrouvées chez les patients malades

conduisent toutes à une protéine ayant une activité protéase extrêmement réduite et qui ne serait plus capable de réprimer la signalisation du TGF- β (Hara et al., 2009). Les hypothèses actuelles se fondent donc sur le fait que, HTRA1 ne pouvant plus cliver les membres de la famille TGF- β , TGF- β s'accumule au niveau des petites artères cérébrales des patients (Hara et al. 2009). Il a également été retrouvé une accumulation de fibronectine et de versicane (Yanagawa et al. 2002), protéines induites par TGF- β . Toutes ces protéines de la MEC favorisent le processus de fibrose. Il est à noter que la fibronectine est également un substrat de HTRA1 en conditions physiologiques (Grau et al. 2005). Mais grâce à notre étude, nous pouvons également imaginer que l'augmentation de TGF- β retrouvée au niveau des micro-vaisseaux cérébraux ne serait finalement que le résultat final de la perte de TSP-1. En effet, comme nous le montrons, à l'état physiologique, HTRA1 clive TSP-1. Dans le contexte de CARASIL, HTRA1 ne clive plus TSP-1, qui va s'accumuler et activer en grande quantité TGF- β , ce qui est retrouvé dans les différentes études sur le sujet. A ce jour, aucune étude n'a encore fait le lien entre expression de TSP-1 et CARASIL. Il serait intéressant d'étudier ce point. Mais l'étude de cette maladie est particulièrement compliquée, du fait du très faible nombre de patients concernés : seulement 60 à 70 ont été diagnostiqués à ce jour dans le monde, et presque exclusivement au Japon (Bianchi et al. 2014).

Grâce à l'identification d'un nouveau substrat de HTRA1, le mécanisme que nous mettons à jour dans cette étude pourrait donc possiblement avoir un rôle dans plusieurs pathologies, et notamment les pathologies inflammatoires. La signalisation TSP-1/CD47 semble être en effet au centre de très nombreux processus biologiques, et l'activation pharmacologique du récepteur CD47 pourrait permet d'inhiber les effets pro-inflammatoires de HTRA1. Plusieurs stratégies existent actuellement pour développer des agonistes de CD47, que nous allons développer brièvement.

L'utilisation du peptide 4N1K est très efficace dans notre modèle *in vitro*, mais il est utilisé à des doses trop importantes pour imaginer une application thérapeutique de ce peptide. L'avantage principal de l'utilisation des peptides en thérapeutique réside dans le fait qu'ils ne sont composés que de la partie active de la molécule qu'ils miment. Ils sont donc particulièrement efficaces et spécifiques (Hummel et al. 2006 ; Ahrens et al. 2012 ; Craik et al. 2013). Les peptides ne sont également constitués que d'acides aminés, le plus souvent linéaire. Leur élimination par l'organisme est donc grandement facilitée, et les risques de toxicité réduits en comparaison à d'autres molécules chimiques (Loffet

et al. 2002). Cette caractéristique des peptides non modifiés à être très facilement dégradés résulte en un temps de demi-vie très court (quelques heures maximum) (Di et al. 2014), ce qui fait qu'ils ne s'accumulent pas dans les tissus cibles. Ce point représente néanmoins un aspect négatif pour leur utilité en thérapeutique : leur administration doit être réalisée plus fréquemment. Les peptides thérapeutiques doivent être améliorés, afin de maximiser leur temps de demi-vie dans l'organisme.

Dans la suite de cette étude, nous avons donc créé un double peptide 4N1K : deux 4N1K reliés entre eux par huit glycines, ou par du polyéthylène glycol. Etant donné que TSP-1 possède deux séquences VVM en C-terminal, l'utilisation d'un double peptide permettra de lier ces deux motifs simultanément. Suite au traitement de co-cultures d'EPR de porc et de Mos circulant humains par HTRA1 et le double peptide, nous avons observé que celui-ci était 50 fois plus efficace que le 4N1K simple pour antagoniser les effets de HTRA1 sur la survie des Mos. Cette expérience nous confirme que la séparation des deux motifs VVM de TSP-1 par HTRA1 peut être suffisante pour diminuer très significativement sa capacité à activer son récepteur CD47, et promouvoir l'accumulation des PM dans l'espace sous-rétinien. TSP-1 forme un homo-trimère lorsqu'elle est activée à l'état physiologique (Adams and Lawler et al. 1993). Trois molécules de TSP-1 peuvent donc théoriquement se lier simultanément à six de leurs récepteurs CD47. Une fois la fonctionnalité du double peptide validé *in vitro* et *in vivo*, nous avons développé un hexapeptide 4N1K. Les premiers tests *in vitro* sur notre modèle de co-culture sont actuellement en cours, afin de valider ou non son efficacité dans l'élimination des Mos sur l'EPR en présence de HTRA1 recombinant. Le but de cette expérience étant d'augmenter l'efficacité du peptide activateur de CD47 au maximum.

Une multitude de stratégies a été développée pour contrer les limites des peptides thérapeutiques. Parmi elles, on trouve notamment le peptibody, molécule chimérique constituée d'une protéine fusionnée avec un fragment Fc d'immunoglobuline (Kontermann et al. 2009 ; Roopenian et al. 2007). Les avantages principaux des peptibodies sont qu'ils présentent une demi-vie plus longue d'environ trois semaines (Wang et al. 2011) que les peptides classiques, et leur solubilité est augmentée. Le premier prototype approuvé par la United-States Food and Drugs Administration en 2008 et par l'Agence Européenne des Médicaments en 2009 était un peptibody développé pour le traitement du purpura thrombopénique immunologique (Molineux et al. 2010), maladie auto-immune de la coagulation.

Le domaine peptidique du peptibody représente la partie thérapeutique de la molécule. Trois axes de modification sont envisageables pour maximiser l'efficacité du peptibody. Dans un premier temps, le peptide peut être fixé directement au fragment Fc, mais l'introduction de « spaceurs » ou de séquences de liaison peuvent améliorer son activité (Shimamoto et al. 2012) ; l'orientation de la séquence peptidique peut également être modifiée (Shimamoto et al. 2012), tout comme la nature du domaine Fc (Shimamoto et al. 2012) : sa dimérisation peut augmenter le nombre de peptides disponibles. Un autre avantage de cette molécule est son faible poids moléculaire, inférieur à 70kDa (Cavaco et al. 2017) comparé à 450kDa de la TSP-1 trimérique.

Enfin, la dernière stratégie d'activation du récepteur CD47 afin de contrer les effets pro-inflammatoires de HTRA1 pourrait être le développement d'une protéine recombinante TSP-1 modifiée et résistante à HTRA1. En effet, grâce aux expériences de spectrométrie de masse que nous avons réalisées, nous connaissons les sites de clivages de HTRA1 sur TSP-1. Nous avons fait développer une série de protéines recombinantes reprenant le domaine C-terminal de TSP-1, domaine qui contient ses deux motifs VVM : une TSP-1 C-ter non modifiée ; une TSP-1 C-ter où les acides aminés reconnus par HTRA1 pour le clivage ont été retirés ; et une TSP-1 C-ter où les acides aminés reconnus par HTRA1 pour le clivage ont été remplacés par d'autres acides aminés. La protéine recombinante TSP-1 C-ter non modifiée a pu être amplifiée et sécrétée par des cellules HEK293. Cette protéine mutant possède les mêmes caractéristiques que la protéine TSP-1 entière : elle est clivée par HTRA1 et favorise l'élimination des Mos sur l'EPR sur notre modèle de co-culture *in vitro*. Malheureusement, les deux protéines mutant que nous avons construites sont exprimées dans les deux types cellulaires que nous avons testé (HEK293 et CHO), mais ne sont pas sécrétées par ces cellules. Nous n'avons donc pas pu les purifier. Suite à ce premier essai, nous avons développé de nouveaux mutants qui comportent un peptide signal plus fort, ce qui pourrait favoriser leurs sécrétions. Malgré ce nouveau changement, les protéines mutant n'ont toujours pas été sécrétées, dans les HEK293 comme dans les CHO. Nous pouvons penser que le changement d'acides aminés au sein du domaine C-terminal de TSP-1 modifie possiblement sa structure, ce qui l'empêche peut-être d'être sécrétée. Ces premiers résultats *in vitro* valident nos sites de clivage pour la protéine TSP-1 C-ter non modifiée, mais ne sont pas encourageants pour les protéines modifiées.

Toutes ces différentes stratégies sont actuellement testées au laboratoire afin de valider celle qui présentera la meilleure efficacité d'activation de CD47, afin de restaurer l'immunosuppression de l'EPR.

CONCLUSION

Les résultats de cette étude décrivant l'inactivation de TSP-1 induite par HTRA1 décrivent un mécanisme totalement nouveau sur la promotion de l'inflammation par HTRA1 ; et comment TSP-1 est mécaniquement inactivé durant cette phase inflammatoire.

L'augmentation significative de l'expression de HTRA1 par les Mos des individus porteurs de l'haplotype à risque du chromosome 10q26 favorise une réaction inflammatoire plus importante. Cette augmentation liée à l'haplotype à risque pourrait s'expliquer par le fait qu'elle favorisait la survie face à certaines maladies infectieuses au cours de l'évolution, ce qui a conduit à sa fréquence relativement importante observée aujourd'hui. L'inflammation sous-rétinienne est observée à la fois dans la forme précoce de la maladie, mais aussi dans les formes tardives (forme atrophique et exsudative) (Guillonnet al., 2017) ; ceci pourrait expliquer la raison pour laquelle cet haplotype à risque ne prédispose pas plus pour une forme en particulier (Fritsche et al., 2013). Ces résultats renforcent fortement le lien entre HTRA1 et pathogenèse de la DMLA.

Il est également intéressant de souligner que la variant du CFH associé à la DMLA (Y402H), l'autre principal variant prédisposant à la maladie, inhibe également l'élimination homéostatique des PM infiltrant dépendante de CD47. Nous avons récemment montré que la liaison du CFH à son récepteur CD11B/CD18, associé au CD47, bloquait stériquement l'activation de CD47 (Calippe et al., 2017). La convergence des deux variants prédisposant majoritairement à la DMLA à inhiber une seule voie de signalisation moléculaire pourrait être la raison pour laquelle ces deux variants sont associés de façon similaires à toutes les formes de la DMLA.

L'activation de CD47 par un agoniste semble donc être un axe très prometteur pour le développement de potentielles molécules thérapeutiques pour le traitement de la DMLA, et particulièrement pour la forme atrophique pour laquelle il n'existe actuellement pas de traitement.

BIBLIOGRAPHIE

Adamis, A. P., Joan W. Miller, Maria-Teresa Bernal, Donald J. D'Amico, Judah Folkman, Tet-Kin Yeo, et Kiang-Teck Yeo. 1994. « Increased Vascular Endothelial Growth Factor Levels in the Vitreous of Eyes With Proliferative Diabetic Retinopathy ». *American Journal of Ophthalmology* 118 (4): 445-50.

Adamis, A. P., D. T. Shima, K. T. Yeo, T. K. Yeo, L. F. Brown, B. Berse, P. A. Damore, et J. Folkman. 1993. « Synthesis and Secretion of Vascular Permeability Factor/Vascular Endothelial Growth Factor by Human Retinal Pigment Epithelial Cells ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 193 (2): 631-38.

Adams, Josephine, et Jack Lawler. 1993. « The thrombospondin family ». *Current Biology* 3 (3): 188-90.

Adams, Madeleine K. M., Julie A. Simpson, Khin Zaw Aung, Galina A. Makeyeva, Graham G. Giles, Dallas R. English, John Hopper, Robyn H. Guymer, Paul N. Baird, et Liubov D. Robman. 2011. « Abdominal Obesity and Age-related Macular Degeneration ». *American Journal of Epidemiology* 173 (11): 1246-55.

Age-Related Eye Disease Study Research Group. 2001. « A Randomized, Placebo-Controlled, Clinical Trial of High-Dose Supplementation With Vitamins C and E, Beta Carotene, and Zinc for Age-Related Macular Degeneration and Vision Loss: AREDS Report No. 8 ». *Archives of ophthalmology* 119 (10): 1417-36.

Aiello, Lloyd Paul, Robert L. Avery, Paul G. Arrigg, Bruce A. Keyt, Henry D. Jampel, Sabera T. Shah, Louis R. Pasquale, et al. 1994. « Vascular Endothelial Growth Factor in Ocular Fluid of Patients with Diabetic Retinopathy and Other Retinal Disorders ». *New England Journal of Medicine* 331 (22): 1480-87.

Albert, Matthew L, SFrieda A Pearce, Loise M Francisco, Birthe Sauter, Pampa Roy, Roy L Silverstein, et Nina Bhardwaj. 1998. « Immature Dendritic Cells Phagocytose Apoptotic Cells via α (v) β (5) and CD36, and Cross-present Antigens to Cytotoxic T Lymphocytes ». *The Journal of Experimental Medicine* 188 (7): 1359-68.

Alexander, J P, J M Bradley, J D Gabourel, et T S Acott. 1990. « Expression of matrix metalloproteinases and inhibitor by human retinal pigment epithelium. » *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 31 (12): 2520.

Allavena, P, et 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 (2): 195-205.

An, Eunkyung, Supti Sen, Sung Kyu Park, Heather Gordish-Dressman, et Yetrib Hathout. 2010. « Identification of Novel Substrates for the Serine Protease HTRA1 in the Human RPE Secretome ». *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 51 (7): 3379-86.

Ancuta, Petronela, Ravi Rao, Ashlee Moses, Andrew Mehle, Sunil K Shaw, F William Luscinskas, et Dana Gabuzda. 2003. « Fractalkine Preferentially Mediates Arrest and

Migration of CD16(+) Monocytes ». *The Journal of Experimental Medicine* 197 (12): 1701-7.

Anderson, D. H, Shiro Ozaki, Matthew Nealon, Jay Neitz, Robert F Mullins, Gregory S Hageman, et Lincoln V Johnson. 2001. « Local cellular sources of apolipoprotein E in the human retina and retinal pigmented epithelium: implications for the process of drusen formation ». *American Journal of Ophthalmology* 131 (6): 767-81.

Anderson, R. E., P. J. O'Brien, R. D. Wiegand, C. A. Koutz, et A. M. Stinson. 1992. « Conservation of Docosahexaenoic Acid in the Retina ». In *Neurobiology of Essential Fatty Acids*, édité par Nicolas G. Bazan, Mary G. Murphy, et Gino Toffano, 285-294. Boston, MA: Springer US.

Anilkumar, Narayanapanicker, Douglas S. Annis, Deane F. Mosher, et Josephine C. Adams. 2002. « Trimeric assembly of the C-terminal region of Thrombospondin-1 or Thrombospondin-2 is necessary for cell spreading and fascin spike organisation ». *Journal of Cell Science* 115 (11): 2357.

Arking, R. 1998. *Biology of Aging: Observations and Principles*. Oxford University Press, Incorporated.

Arnson, Yoav, Yehuda Shoenfeld, et Howard Amital. 2010. « Effects of tobacco smoke on immunity, inflammation and autoimmunity ». *Journal of Autoimmunity* 34 (3): J258-65.

Asch, AS, I Liu, FM Briccetti, JW Barnwell, F Kwakye-Berko, A Dokun, J Goldberger, et M Pernambuco. 1993. « Analysis of CD36 binding domains: ligand specificity controlled by dephosphorylation of an ectodomain ». *Science* 262 (5138): 1436.

Auffray, C, Darin Fogg, Meriem Garfa, Gaelle Elain, Olivier Join-Lambert, Samer Kayal, Sabine Sarnacki, Ana Cumano, Gregoire Lauvau, et Frederic Geissmann. 2007. « Monitoring of Blood Vessels and Tissues by a Population of Monocytes with Patrolling Behavior ». *Science* 317 (5838): 666.

Auffray, C, et M. H Sieweke. 2009. « Blood Monocytes: Development, Heterogeneity, and Relationship with Dendritic Cells ». *Annual Review of Immunology* 27 (1): 669-92.

Baenziger, Nancy Lewis, G N Brodie, et Philip W Majerus. 1971. « A Thrombin-Sensitive Protein of Human Platelet Membranes ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 68 (1): 240-43.

Bakay, Marina, Po Zhao, Josephine Chen, et Eric P Hoffman. 2002. « A web-accessible complete transcriptome of normal human and DMD muscle ». *Neuromuscular Disorders* 12: S125-41.

Baldi, Alfonso, Antonio De Luca, Monica Morini, Tullio Battista, Armando Felsani, Feliciano Baldi, Caterina Catricalà, et al. 2002. « The HtrA1 serine protease is down-regulated during human melanoma progression and represses growth of metastatic melanoma cells ». *Oncogene* 21 (septembre): 6684.

Ban, Yuriko, et Lawrence J. Rizzolo. 2000. « Regulation of glucose transporters during development of the retinal pigment epithelium ». *Developmental Brain Research* 121 (1): 89-95.

Baranova, Irina N, Roger Kurlander, Alexander V Bocharov, Tatyana G Vishnyakova, Zhigang Chen, Alan T Remaley, Gyorgy Csako, Amy P Patterson, et Thomas L Eggerman. 2008. « Role of Human CD36 in Bacterial Recognition, Phagocytosis and Pathogen-Induced C-Jun N-Terminal Kinase (JNK) - Mediated Signaling () ». *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 181 (10): 7147-56.

Barazi, Heba O., Zhuqing Li, Jo Anne Cashel, Henry C. Krutzsch, Douglas S. Annis, Deane F. Mosher, et David D. Roberts. 2002. « Regulation of Integrin Function by CD47 Ligands: DIFFERENTIAL EFFECTS ON $\alpha v \beta 3$ AND $\alpha 4 \beta 1$ INTEGRIN-MEDIATED ADHESION ». *Journal of Biological Chemistry* 277 (45): 42859-66.

Bazan, N G, et W C Gordon. 1992. « Docosahexaenoic Acid Uptake and Metabolism in Photoreceptors: Retinal Conservation By an Efficient Retinal Pigment Epithelial Cell-Mediated Recycling Process ». In *Neurobiology of Essential Fatty Acids*, édité par Nicolas G. Bazan et Gino Toffano, 295–306. Boston, MA: Springer US.

Beatty, Stephen, Hui-Hiang Koh, M Phil, David Henson, et Michael Boulton. 2000. « The Role of Oxidative Stress in the Pathogenesis of Age-Related Macular Degeneration ». *Survey of Ophthalmology* 45 (2): 115-34.

Becerra, S. Patricia, Robert N. Fariss, Yan Q. Wu, Luis M. Montuenga, Paul Wong, et Bruce A. Pfeffer. 2004. « Pigment epithelium-derived factor in the monkey retinal pigment epithelium and interphotoreceptor matrix: apical secretion and distribution ». *Experimental Eye Research* 78 (2): 223-34.

Bessis, Alain, Catherine Béchade, Delphine Bernard, et Anne Roumier. 2007. « Microglial control of neuronal death and synaptic properties ». *Glia* 55 (3): 233–238.

Bhutto, Imran A, D Scott McLeod, Tian Jing, Janet S Sunness, Johanna M Seddon, et Gerard A Lutty. 2016. « Increased choroidal mast cells and their degranulation in age-related macular degeneration ». *The British journal of ophthalmology* 100 (5): 720-26.

Bhutto, Imran, et Gerard 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 (4): 295-317.

Bianchi, Silvia, Chiara Di Palma, Gian Nicola Gallus, Ilaria Taglia, Antonella Poggiani, Francesca Rosini, Alessandra Rufa, et al. 2014. « Two novel HTRA1 mutations in a European CARASIL patient ». *Neurology* 82 (10): 898.

Bibb, Carol, et Richard W. Young. 1974. « Renewal of fatty acids in the membranes of visual cell outer segments ». *The Journal of Cell Biology* 61 (2): 327.

Bird, A.C., N.M. Bressler, S.B. Bressler, I.H. Chisholm, G. Coscas, M.D. Davis, P.T.V.M. de

Jong, et al. 1995. « An international classification and grading system for age-related maculopathy and age-related macular degeneration ». *Survey of Ophthalmology* 39 (5): 367-74.

Bird, AC, RL Phillips, et Hageman GS. 2014. « Geographic atrophy: A histopathological assessment ». *JAMA Ophthalmology* 132 (3): 338-45.

Bok, Dean. 1993. « The retinal pigment epithelium: a versatile partner in vision ». *Journal of Cell Science* 1993 (Supplement 17): 189.

Bornstein, Paul. 1992. « Thrombospondins: structure and regulation of expression ». *FASEB J*, 1992, 14 édition, sect. 6.

Bornstein, Paul, Sreelekha Devarayalu, Susanne Edelhoff, et Christine M. Disteché. 1993. « Isolation and Characterization of the Mouse Thrombospondin 3 (Thbs3) Gene ». *Genomics* 15 (3): 607-13.

Böttinger, E P, V M Factor, M L Tsang, J A Weatherbee, J B Kopp, S W Qian, L M Wakefield, A B Roberts, S S Thorgeirsson, et M B Sporn. 1996. « The recombinant proregion of transforming growth factor beta1 (latency-associated peptide) inhibits active transforming growth factor beta1 in transgenic mice ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93 (12): 5877.

Boulton, Mike, et Pierrette Dayhaw-Barker. 2001. « The role of the retinal pigment epithelium: Topographical variation and ageing changes ». *Eye* 15 (mai): 384.

Boulton, Mike, Alexander Dontsov, John Jarvis-Evans, Mikhail Ostrovsky, et Dimitri Svistunenko. 1993. « Lipofuscin is a photoinducible free radical generator ». *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 19 (3): 201-4.

Boulton, Mike, Malgorzata Rozanowska, Bartosz Rozanowski, et Tim Wess. 2004. « The photoreactivity of ocular lipofuscin ». *Photochem. Photobiol. Sci.* 3 (8): 759-64.

Bourne, Rupert R A, Jost B Jonas, Seth R Flaxman, Jill Keeffe, Janet Leasher, Kovin Naidoo, Maurizio B Parodi, et al. 2014. « Prevalence and causes of vision loss in high-income countries and in Eastern and Central Europe: 1990–2010 ». *British Journal of Ophthalmology* 98 (5): 629.

Bressler, SB, MG Maguire, NM Bressler, et SL Fine. 1990. « Relationship of drusen and abnormalities of the retinal pigment epithelium to the prognosis of neovascular macular degeneration ». *Archives of Ophthalmology* 108 (10): 1442-47.

Brittain, Julia E., Jaewon Han, Kenneth I. Ataga, Eugene P. Orringer, et Leslie V. Parise. 2004. « Mechanism of CD47-induced $\alpha 4 \beta 1$ Integrin Activation and Adhesion in Sickle Reticulocytes ». *Journal of Biological Chemistry* 279 (41): 42393-402.

Brittain, Julia E, Kathryn J Mlinar, Christopher S Anderson, Eugene P Orringer, et Leslie V Parise. 2001. « Activation of sickle red blood cell adhesion via integrin-associated

protein/CD47-induced signal transduction ». *Journal of Clinical Investigation* 107 (12): 1555-62.

Brown, E. 1990. « Integrin-associated protein: a 50-kD plasma membrane antigen physically and functionally associated with integrins ». *The Journal of Cell Biology* 111 (6): 2785-94.

Bertrand Calippe, Sebastien Augustin, Fanny Beguier, Hugo Charles-Messance, Lucie Poupel, Jean-Baptiste Conart, Shulong J. Hu, et al. 2017. « Complement Factor H Inhibits CD47-Mediated Resolution of Inflammation ». *Immunity* 46 (2): 261-72.

Serge Camelo, William Raoul, Sophie Lavalette, Bertrand Calippe, Brunella Cristofaro, Olivier Levy, Marianne Houssier, et al. 2012. « Delta-like 4 inhibits choroidal neovascularization despite opposing effects on vascular endothelium and macrophages ». *Angiogenesis* 15 (4): 609-22.

Campioni, Mara, Anna Severino, Lucrezia Manente, Ioana L. Tuduce, Stefano Toldo, Michele Caraglia, Stefania Crispi, et al. 2010. « The Serine Protease HtrA1 Specifically Interacts and Degrades the Tuberous Sclerosis Complex 2 Protein ». *Molecular Cancer Research* 8 (9): 1248.

Campochiaro, P.A., S.F. Hackett, S.A. Vinores, J. Freund, C. Csaky, W. LaRochelle, J. Henderer, M. Johnson, I.R. Rodriguez, et Z. Friedman. 1994. « Platelet-derived growth factor is an autocrine growth stimulator in retinal pigmented epithelial cells ». *Journal of Cell Science* 107 (9): 2459.

Campochiaro, Peter A., Roberta Sugg, Gary Grotendorst, et Leonard M. Hjelmeland. 1989. « Retinal pigment epithelial cells produce PDGF-like proteins and secrete them into their media ». *Experimental Eye Research* 49 (2): 217-27.

Canfield, A.E., K.D. Hadfield, C.F. Rock, E.C. Wylie, et F.L. Wilkinson. 2007. « HtrA1: a novel regulator of physiological and pathological matrix mineralization? ». *Biochemical Society Transactions* 35 (4): 669.

Cao, W., J. Tombran-Tink, W. Chen, D. Mrazek, R. Elias, et J.F. McGinnis. 1999. « Pigment epithelium-derived factor protects cultured retinal neurons against hydrogen peroxide-induced cell death ». *Journal of Neuroscience Research* 57 (6): 789-800.

Carlson, Anne, et Dean Bok. 1992. « Promotion of the release of 11-cis-retinal from cultured retinal pigment epithelium by interphotoreceptor retinoid-binding protein ». *Biochemistry* 31 (37): 9056-62.

CATT research group. 2011. « Ranibizumab and Bevacizumab for Neovascular Age-Related Macular Degeneration ». *New England Journal of Medicine* 364 (20): 1897-1908.

Cayouette, Michel, Sylvia B. Smith, S. Patricia Becerra, et Claude Gravel. 1999. « Pigment Epithelium-Derived Factor Delays the Death of Photoreceptors in Mouse Models of Inherited Retinal Degenerations ». *Neurobiology of Disease* 6 (6): 523-32.

Chakravarthy, Usha, Tien Y. Wong, Astrid Fletcher, Elisabeth Piau, Christopher Evans, Gergana Zlateva, Ronald Buggage, Andreas Pleil, et Paul Mitchell. 2010. « Clinical risk factors for age-related macular degeneration: a systematic review and meta-analysis ». *BMC Ophthalmology* 10 (1): 31.

Chamberland, Angela, Eunice Wang, Aled R Jones, Lisa A Collins-Racie, Edward R LaVallie, Ying Huang, Lin Liu, Elisabeth A Morris, Carl R Flannery, et Zhiyong Yang. 2009. « Identification of a Novel HtrA1-susceptible Cleavage Site in Human Aggrecan: EVIDENCE FOR THE INVOLVEMENT OF HtrA1 IN AGGREGAN PROTEOLYSIS IN VIVO ». *The Journal of Biological Chemistry* 284 (40): 27352-59.

Checchin, Daniella, Florian Sennlaub, Etienne Levavasseur, Martin Leduc, et Sylvain Chemtob. 2006. « Potential Role of Microglia in Retinal Blood Vessel Formation ». *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 47 (8): 3595-3602.

Chen, Mei, David A. Copland, Jiawu Zhao, Jian Liu, John V. Forrester, Andrew D. Dick, et Heping Xu. 2012. « Persistent Inflammation Subverts Thrombospondin-1-Induced Regulation of Retinal Angiogenesis and Is Driven by CCR2 Ligation ». *The American Journal of Pathology* 180 (1): 235-45.

Chen, Yvonne, Christian Wiesmann, Germaine Fuh, Bing Li, Hans W. Christinger, Patrick McKay, Abraham M. de Vos, et Henry B. Lowman. 1999. « Selection and analysis of an optimized anti-VEGF antibody: crystal structure of an affinity-matured fab in complex with antigen11 Edited by I. A. Wilson ». *Journal of Molecular Biology* 293 (4): 865-81.

Chien, Jeremy, Takayo Ota, Giovanni Aletti, Ravi Shridhar, Mariarosaria Boccellino, Lucio Quagliuolo, Alfonso Baldi, et Viji Shridhar. 2009. « Serine Protease HtrA1 Associates with Microtubules and Inhibits Cell Migration ». *Molecular and Cellular Biology* 29 (15): 4177-87.

Chien, Jeremy, Julie Staub, Shou-Ih Hu, Michele R Erickson-Johnson, Fergus J Couch, David I Smith, Robert M Crowl, Scott H Kaufmann, et Viji Shridhar. 2004. « A candidate tumor suppressor HtrA1 is downregulated in ovarian cancer ». *Oncogene* 23 (janvier): 1636.

Chinnery, Holly R., Samuel McLenachan, Timothy Humphries, Jelena M. Kezic, Xiangting Chen, Marc J. Ruitenberg, et Paul G. McMenamin. 2012. « Accumulation of murine subretinal macrophages: effects of age, pigmentation and CX3CR1 ». *Neurobiology of Aging* 33 (8): 1769-76.

Chio, K. S., U. Reiss, B. Fletcher, et A. L. Tappel. 1969. « Peroxidation of Subcellular Organelles: Formation of Lipofuscinlike Fluorescent Pigments ». *Science* 166 (3912): 1535.

Chow, Andrew, Brian D. Brown, et Miriam Merad. 2011. « Studying the mononuclear phagocyte system in the molecular age ». *Nature Reviews Immunology* 11 (octobre): 788.

Chowdhury, Prमित K., Mintu Haider, Prमित K. Choudhury, George A. Kraus, Meera J. Desai, Daniel W. Armstrong, Thomas A. Casey, Mark A. Rasmussen, et Jacob W. Petrich. 2004. « Generation of Fluorescent Adducts of Malondialdehyde and Amino Acids: Toward an Understanding of Lipofuscin » *Photochemistry and Photobiology* 79 (1): 21–25.

Chu, Qian, Jolene K Diedrich, Joan M Vaughan, Cynthia J Donaldson, Michael F Nunn, Kuo-Fen Lee, et Alan Saghatelian. 2016. « HtrA1 Proteolysis of ApoE in vitro is Allele Selective » *Journal of the American Chemical Society* 138 (30): 9473-78.

Chuluundorj, Delgertsetseg, Scott Harding, David Abernethy, et Anne Flamme. 2014. *Expansion and preferential activation of the CD14+CD16+ monocyte subset during multiple sclerosis*. Vol. 92.

Chung, Jun, Ai-Guo Gao, et William A. Frazier. 1997. « Thrombospondin Acts via Integrin-associated Protein to Activate the Platelet Integrin α IIb β 3 » *Journal of Biological Chemistry* 272 (23): 14740-46.

Chung, Jun, Xue-Qing Wang, Frederik P. Lindberg, et William A. Frazier. 1999. « Thrombospondin-1 Acts Via IAP/CD47 to Synergize With Collagen in α 2 β 1-Mediated Platelet Activation » *Blood* 94 (2): 642.

Clawson, Gary A., Vuong Bui, Ping Xin, Ning Wang, et Weihua Pan. 2008. « Intracellular localization of the tumor suppressor HtrA1/Prss11 and its association with HPV16 E6 and E7 proteins » *Journal of Cellular Biochemistry* 105 (1): 81–88.

Combadière, Christophe, Charles Feumi, William Raoul, Nicole Keller, Mathieu Rodéro, Adeline Pézard, Sophie Lavalette, et al. 2007. « CX3CR1-dependent subretinal microglia cell accumulation is associated with cardinal features of age-related macular degeneration » *The Journal of Clinical Investigation* 117 (10): 2920-28.

Conductier, Grégory, Nicolas Blondeau, Alice Guyon, Jean-Louis Nahon, et Carole Rovère. 2010. « The role of monocyte chemoattractant protein MCP1/CCL2 in neuroinflammatory diseases » *Journal of Neuroimmunology* 224 (1): 93-100.

Connor, R I, L Shen, et 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. » *The Journal of Immunology* 145 (5): 1483.

Cousins SW, Espinosa-Heidmann DG, et Csaky KG. 2004. « Monocyte activation in patients with age-related macular degeneration: A biomarker of risk for choroidal neovascularization? » *Archives of Ophthalmology* 122 (7): 1013-18.

Cozier, G. E., J. Carlton, D. Bouyoucef, et P. J. Cullen. 2004. « Membrane Targeting by Pleckstrin Homology Domains ». In *Phosphoinositides in Subcellular Targeting and Enzyme Activation*, édité par Harald Stenmark, 49–88. Berlin, Heidelberg: Springer

Berlin Heidelberg.

Crawford, Susan E, Veronica Stellmach, Joanne E Murphy-Ullrich, Solange M.F Ribeiro, Jack Lawler, Richard O Hynes, Gregory P Boivin, et Noël Bouck. 1998. « Thrombospondin-1 Is a Major Activator of TGF- β 1 In Vivo ». *Cell* 93 (7): 1159-70.

Crofton, RW, MMC Diesselhoff-Denk, et RV Furth. 1978. « The origin, kinetics, and characteristics of the kupffer cells in the normal steady state ». *The Journal of Experimental Medicine* 148 (1): 1.

Cros, Jérôme, Nicolas Cagnard, Kevin Woollard, Natacha Patey, Shen-Ying Zhang, Brigitte Senechal, Anne Puel, et al. 2010. « Human CD14(dim) Monocytes Patrol and Sense Nucleic Acids and Viruses via TLR7 and TLR8 Receptors ». *Immunity* 33 (3): 375-86.

Cuenca, Nicolás, Laura Fernández-Sánchez, Laura Campello, Victoria Maneu, Pedro De la Villa, Pedro Lax, et Isabel Pinilla. 2014. « Cellular responses following retinal injuries and therapeutic approaches for neurodegenerative diseases ». *Progress in Retinal and Eye Research* 43: 17-75.

Curcio, C A, N E Medeiros, et C L Millican. 1996. « Photoreceptor loss in age-related macular degeneration. » *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 37 (7): 1236.

Curcio, C A, Kenneth R. Sloan, Robert E. Kalina, et Anita E. Hendrickson. 1990. « Human photoreceptor topography ». *Journal of Comparative Neurology* 292 (4): 497-523.

Curcio, CA, et C Millican. 1999. « Basal linear deposit and large drusen are specific for early age-related maculopathy ». *Archives of Ophthalmology* 117 (3): 329-39.

Davies, Sallyanne, Michael H. Elliott, Eric Floor, T. George Truscott, Mariusz Zareba, Tadeusz Sarna, Farrukh A. Shamsi, et Michael E. Boulton. 2001. « Photocytotoxicity of lipofuscin in human retinal pigment epithelial cells ». *Free Radical Biology and Medicine* 31 (2): 256-65.

Dawson, D. W., O. V. Volpert, P. Gillis, S. E. Crawford, H.-J. Xu, W. Benedict, et N. P. Bouck. 1999. « Pigment Epithelium-Derived Factor: A Potent Inhibitor of Angiogenesis ». *Science* 285 (5425): 245.

Dawson, David W, S Frieda A Pearce, Ruiqin Zhong, Roy L Silverstein, William A Frazier, et Noël P Bouck. 1997. « CD36 Mediates the In Vitro Inhibitory Effects of Thrombospondin-1 on Endothelial Cells ». *The Journal of Cell Biology* 138 (3): 707-17.

De Luca, De Falco, Severino, Mara Campioni, Daniele Santini, Feliciano Baldi, Marco G. Paggi, et Alfonso Baldi. 2003. « Distribution of the Serine Protease HtrA1 in Normal Human Tissues ». *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 51 (10): 1279-84.

Della, N G, P A Campochiaro, et D J Zack. 1996. « Localization of TIMP-3 mRNA expression to the retinal pigment epithelium. » *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 37 (9): 1921.

DeWan, Andrew, Mugen Liu, Stephen Hartman, Samuel Shao-Min Zhang, David T. L. Liu, Connie Zhao, Pancy O. S. Tam, et al. 2006. « HTRA1 Promoter Polymorphism in Wet Age-Related Macular Degeneration ». *Science* 314 (5801): 989.

DiCesare, Paul E., Matthias Mörgelin, Karlheinz Mann, et Mats Paulsson. 1994. « Cartilage oligomeric matrix protein and thrombospondin 1 ». *European Journal of Biochemistry* 223 (3): 927-937.

Dimmeler, Stefanie, Ingrid Fleming, Beate Fisslthaler, Corinna Hermann, Rudi Busse, et Andreas M. Zeiher. 1999. « Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation ». *Nature* 399 (juin): 601.

Dixit, V M, G A Grant, S A Santoro, et W A Frazier. 1984. « Isolation and characterization of a heparin-binding domain from the amino terminus of platelet thrombospondin. » *Journal of Biological Chemistry* 259 (16): 10100-105.

Donders, FC. 1855. *Beitrage zur normalen und pathologischen Anatomie des Auges*. Verlag von Wilhelm Engelmann.

Eandi, Chiara M, Hugo Charles Messance, Sébastien Augustin, Elisa Dominguez, Sophie Lavalette, Valérie Forster, Shulong Justin Hu, et al. 2016. « Subretinal mononuclear phagocytes induce cone segment loss via IL-1 β ». Édité par Jeremy Nathans. *eLife* 5 (juillet): e16490.

Edwards, Albert O., Robert Ritter, Kenneth J. Abel, Alisa Manning, Carolien Panhuysen, et Lindsay A. Farrer. 2005. « Complement Factor H Polymorphism and Age-Related Macular Degeneration ». *Science* 308 (5720): 421.

Eisele, Sylvia C., Corey M. Gill, Ganesh M. Shankar, et Priscilla K. Brastianos. 2015. « PLEKHA5: A Key to Unlock the Blood-Brain Barrier? » *Clinical Cancer Research* 21 (9): 1978.

Eldred, Graig E., et Martin L. Katz. 1988. « Fluorophores of the human retinal pigment epithelium: Separation and spectral characterization ». *Experimental Eye Research* 47 (1): 71-86.

Esposito, V, M Campioni, ANTONIO DE LUCA, ENRICO P. SPUGNINI, FELICIANO BALDI, ROBERTO CASSANDRO, ALESSANDRO MANCINI, et al. 2006. « Analysis of Htra1 Serine Protease Expression in Human Lung Cancer ». *Anticancer Research* 26 (5A): 3455-59.

Ezzat, M-K, C R Hann, S Vuk-Pavlovic, et J S Pulido. 2008. « Immune cells in the human choroid ». *British Journal of Ophthalmology* 92 (7): 976.

Fang, Hsin-Yu, Russell Hughes, Craig Murdoch, Seth Coffelt, Subhra K Biswas, Adrian L Harris, Randall S Johnson, et al. 2009. « Hypoxia inducible factors 1 and 2 are important transcriptional effectors in primary macrophages experiencing hypoxia ». *Blood* 114 (4): 844-59.

- Farber, D B, J G Flannery, R N Lolley, et D Bok. 1985. « Distribution patterns of photoreceptors, protein, and cyclic nucleotides in the human retina. » *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 26 (11): 1558.
- Fausser, Sascha, Ulrike Viebahn, et Philipp S. Muether. 2015. « Intraocular and systemic inflammation-related cytokines during one year of ranibizumab treatment for neovascular age-related macular degeneration ». *Acta Ophthalmologica* 93 (8): 734–738.
- Febbraio, Maria, David P Hajjar, et Roy L Silverstein. 2001. « CD36: a class B scavenger receptor involved in angiogenesis, atherosclerosis, inflammation, and lipid metabolism ». *Journal of Clinical Investigation* 108 (6): 785-91.
- Ferrara, N. 2005. « VEGF as a Therapeutic Target in Cancer ». *Oncology* 69(suppl 3) (Suppl. 3): 11-16.
- Ferrara, Napoleone, Keith A. Houck, Lyn B. Jakeman, Jane Winer, et David W. Leung. 1991. « The vascular endothelial growth factor family of polypeptides ». *Journal of Cellular Biochemistry* 47 (3): 211–218.
- Fingerle, G, A Pforte, B Passlick, M Blumenstein, M Strobel, et HW Ziegler- Heitbrock. 1993. « The novel subset of CD14+/CD16+ blood monocytes is expanded in sepsis patients ». *Blood* 82 (10): 3170.
- Fletcher, AE, GC Bentham, M Agnew, et et al. 2008. « Sunlight exposure, antioxidants, and age-related macular degeneration ». *Archives of Ophthalmology* 126 (10): 1396-1403.
- Fordham, Jezrom B., Jing Hua, Sarah R. Morwood, Lauren P. Schewitz-Bowers, David A. Copland, Andrew D. Dick, et Lindsay B. Nicholson. 2012. « Environmental conditioning in the control of macrophage thrombospondin-1 production ». *Scientific Reports* 2 (juillet): 512.
- Forrester, John V., Heping Xu, Lucia Kuffová, Andrew D. Dick, et Paul G. McMenamin. 2010. « Dendritic cell physiology and function in the eye ». *Immunological Reviews* 234 (1): 282–304.
- Forrester, J.V., A.D. Dick, P.G. McMenamin, F. Roberts, et E. Pearlman. 2015. *The Eye E-Book: Basic Sciences in Practice*. Elsevier Health Sciences.
- Francis, Peter J, Hong Zhang, Andrew DeWan, Josephine Hoh, et Michael L Klein. 2008. « Joint effects of polymorphisms in the HTRA1, LOC387715/ARMS2, and CFH genes on AMD in a Caucasian population ». *Molecular Vision* 14: 1395-1400.
- Frazier, William A. 1991. « Thrombospondins ». *Current Opinion in Cell Biology* 3 (5): 792-99.
- Friedrich, Ulrike, Connie A. Myers, Lars G. Fritsche, Andrea Milenkovich, Armin Wolf, Joseph C. Corbo, et Bernhard H.F. Weber. 2011. « Risk- and non-risk-associated variants at the 10q26 AMD locus influence ARMS2 mRNA expression but exclude pathogenic

effects due to protein deficiency ». *Human Molecular Genetics* 20 (7): 1387-99.

Fritsche, Lars G., Robert N. Fariss, Dwight Stambolian, Gonçalo R. Abecasis, Christine A. Curcio, et Anand Swaroop. 2014. « Age-Related Macular Degeneration: Genetics and Biology Coming Together ». *Annual Review of Genomics and Human Genetics* 15 (1): 151-71.

Fritsche, Lars G, Wilmar Igl, Jessica N Cooke Bailey, Felix Grassmann, Sebanti Sengupta, Jennifer L Bragg-Gresham, Kathryn P Burdon, et al. 2015. « A large genome-wide association study of age-related macular degeneration highlights contributions of rare and common variants ». *Nature Genetics* 48 (décembre): 134.

Fujioka, Y, T Matozaki, T Noguchi, A Iwamatsu, T Yamao, N Takahashi, M Tsuda, T Takada, et M Kasuga. 1996. « A novel membrane glycoprotein, SHPS-1, that binds the SH2-domain-containing protein tyrosine phosphatase SHP-2 in response to mitogens and cell adhesion. » *Molecular and Cellular Biology* 16 (12): 6887-99.

Fukutake, Toshio. 2011. « Cerebral Autosomal Recessive Arteriopathy with Subcortical Infarcts and Leukoencephalopathy (CARASIL): From Discovery to Gene Identification ». *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases* 20 (2): 85-93.

Fulton, David, Jean-Philippe Gratton, Timothy J McCabe, Jason Fontana, Yasushi Fujio, Kenneth Walsh, Thomas F Franke, Andreas Papapetropoulos, et William C Sessa. 1999. « Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt ». *Nature* 399 (6736): 597-601.

Fulton, David, Jean-Philippe Gratton, et William C. Sessa. 2001. « Post-Translational Control of Endothelial Nitric Oxide Synthase: Why Isn't Calcium/Calmodulin Enough? » *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 299 (3): 818.

Furth, Ralph van, et Zanvil A Cohn. 1968. « The origin and kinetics of mononuclear phagocytes ». *The Journal of Experimental Medicine* 128 (3): 415-35.

Gaillard, Elizabeth R., Stephen J. Atherton, Graig Eldred, et James Dillon. 1995. « PHOTOPHYSICAL STUDIES ON HUMAN RETINAL LIPOFUSCIN ». *Photochemistry and Photobiology* 61 (5): 448-453.

Galea, Ian, Ingo Bechmann, et V. Hugh Perry. 2007. « What is immune privilege (not)? » *Trends in Immunology* 28 (1): 12-18.

Gao, A G, et W A Frazier. 1994. « Identification of a receptor candidate for the carboxyl-terminal cell binding domain of thrombospondins. » *Journal of Biological Chemistry* 269 (47): 29650-57.

Gao, Ai-Guo, Frederik P. Lindberg, Mary Beth Finn, Scott D. Blystone, Eric J. Brown, et William A. Frazier. 1996. « Integrin-associated Protein Is a Receptor for the C-terminal Domain of Thrombospondin ». *Journal of Biological Chemistry* 271 (1): 21-24.

Gass, J D. 1984. « Pathogenesis of tears of the retinal pigment epithelium. » *British Journal of Ophthalmology* 68 (8): 513.

Gass, JM. 1973. « Drusen and disciform macular detachment and degeneration ». *Archives of Ophthalmology* 90 (3): 206-17.

Gatta, L., M. Vitali, A. Zanola, E. Venturelli, C. Fenoglio, D. Galimberti, E. Scarpini, et D. Finazzi. 2008. « Polymorphisms in the LOC387715/ARMS2 Putative Gene and the Risk for Alzheimer's Disease ». *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders* 26 (2): 169-74.

Gautier, E. L, Stoyan Ivanov, Philippe Lesnik, et Gwendalyn J Randolph. 2013. « Local apoptosis mediates clearance of macrophages from resolving inflammation in mice ». *Blood* 122 (15): 2714-22.

Gautier, Emmanuel L, Tal Shay, Jennifer Miller, Melanie Greter, Claudia Jakubzick, Stoyan Ivanov, Julie Helft, et al. 2012. « Gene expression profiles and transcriptional regulatory pathways underlying mouse tissue macrophage identity and diversity ». *Nature immunology* 13 (11): 1118-28.

Gautier, Emmanuel L., et Laurent Yvan-Charvet. 2014. « Understanding macrophage diversity at the ontogenic and transcriptomic levels ». *Immunological Reviews* 262 (1): 85-95.

Gehrs KM, Heriot WJ, de Juan E, et Jr. 1992. « Transmission electron microscopic study of a subretinal choroidal neovascular membrane due to age-related macular degeneration ». *Archives of Ophthalmology* 110 (6): 833-37.

Geissmann, Frederic, Steffen Jung, et Dan R. Littman. 2003. « Blood Monocytes Consist of Two Principal Subsets with Distinct Migratory Properties ». *Immunity* 19 (1): 71-82.

Geissmann, Frederic, Markus G Manz, Steffen Jung, Michael H Sieweke, Miriam Merad, et Klaus Ley. 2010. « Development of monocytes, macrophages and dendritic cells ». *Science (New York, N.Y.)* 327 (5966): 656-61.

Gentry, L E, N R Webb, G J Lim, A M Brunner, J E Ranchalis, D R Twardzik, M N Lioubin, H Marquardt, et A F Purchio. 1987. « Type 1 transforming growth factor beta: amplified expression and secretion of mature and precursor polypeptides in Chinese hamster ovary cells. » *Molecular and Cellular Biology* 7 (10): 3418-27.

Girotti, Albert W., et Tamas Kriska. 2004. « Role of Lipid Hydroperoxides in Photo-Oxidative Stress Signaling ». *Antioxidants & Redox Signaling* 6 (2): 301-10.

González-Scarano, F., et Gordon Baltuch. 1999. « Microglia as mediators of inflammatory and degenerative diseases ». *Annual Review of Neuroscience* 22 (1): 219-40.

Good, D J, P J Polverini, F Rastinejad, M M Le Beau, R S Lemons, W A Frazier, et N P Bouck. 1990. « A tumor suppressor-dependent inhibitor of angiogenesis is immunologically and functionally indistinguishable from a fragment of

thrombospondin. » *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87 (17): 6624-28.

Gordon, M.S., et D. Cunningham. 2005. « Managing Patients Treated with Bevacizumab Combination Therapy ». *Oncology* 69(suppl 3) (Suppl. 3): 25-33.

Gordon, Siamon. 2002. « Pattern Recognition Receptors: Doubling Up for the Innate Immune Response ». *Cell* 111 (7): 927-30.

Gordon, Siamon, et Philip R. Taylor. 2005. « Monocyte and macrophage heterogeneity ». *Nature Reviews Immunology* 5 (décembre): 953.

Grage-Griebenow, E, Hans-Dieter Flad, Martin Ernst, Mągorzata Bzowska, Joanna Skrzeczyńska, et Juliusz Pryjma. 2000. « Human MO Subsets as Defined by Expression of CD64 and CD 16 Differ in Phagocytic Activity and Generation of Oxygen Intermediates ». *Immunobiology* 202 (1): 42-50.

Grage-Griebenow, E., H.-D. Flad, et M. Ernst. 2001. « Heterogeneity of human peripheral blood monocyte subsets ». *Journal of Leukocyte Biology* 69 (1): 11-20.

Grau, Sandra, Alfonso Baldi, Rossana Bussani, Xiaodan Tian, Raluca Stefanescu, Michael Przybylski, Peter Richards, et al. 2005. « Implications of the serine protease HtrA1 in amyloid precursor protein processing ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (17): 6021-26.

Grunin, Michelle, Shira- Hagbi-Levi, Batya Rinsky, Yoav Smith, et Itay Chowers. 2016. « Transcriptome Analysis on Monocytes from Patients with Neovascular Age-Related Macular Degeneration ». *Scientific Reports* 6: 29046.

Guillonneau, Xavier, Chiara M. Eandi, Michel Paques, José-Alain Sahel, Przemyslaw Sapięha, et Florian Sennlaub. 2017. « On phagocytes and macular degeneration ». *Progress in Retinal and Eye Research* 61 (novembre): 98-128.

Gupta, Nisha, Kimberly E Brown, et Ann H Milam. 2003. « Activated microglia in human retinitis pigmentosa, late-onset retinal degeneration, and age-related macular degeneration ». *Experimental Eye Research* 76 (4): 463-71.

Hadfield, Kristen D., Claire Farrington Rock, Colette A. Inkson, Sarah L. Dallas, Laure Sudre, Gillian A. Wallis, Raymond P. Boot-Handford, et Ann E. Canfield. 2008. « HtrA1 Inhibits Mineral Deposition by Osteoblasts: REQUIREMENT FOR THE PROTEASE AND PDZ DOMAINS ». *Journal of Biological Chemistry* 283 (9): 5928-38.

Hageman, Gregory S., Don H. Anderson, Lincoln V. Johnson, Lisa S. Hancox, Andrew J. Taiber, Lisa I. Hardisty, Jill L. Hageman, et al. 2005. « A common haplotype in the complement regulatory gene factor H (HF1/CFH) predisposes individuals to age-related macular degeneration ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (20): 7227.

Haines, Jonathan L., Michael A. Hauser, Silke Schmidt, William K. Scott, Lana M. Olson, Paul Gallins, Kylee L. Spencer, et al. 2005. « Complement Factor H Variant Increases the Risk of Age-Related Macular Degeneration ». *Science* 308 (5720): 419.

Hamann, Steffen. 2002. « Molecular mechanisms of water transport in the eye ». In *Molecular Mechanisms of Water Transport Across Biological Membranes*, 215:395–431. International Review of Cytology. Academic Press.

Hamann, Steffen, Thomas Zeuthen, Morten La Cour, Erlend A. Nagelhus, Ole Petter Ottersen, Peter Agre, et Søren Nielsen. 1998. « Aquaporins in complex tissues: distribution of aquaporins 1–5 in human and rat eye ». *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 274 (5): C1332-45.

Hara, Kenju, Atsushi Shiga, Toshio Fukutake, Hiroaki Nozaki, Akinori Miyashita, Akio Yokoseki, Hirotohi Kawata, et al. 2009. « Association of HTRA1 Mutations and Familial Ischemic Cerebral Small-Vessel Disease ». *New England Journal of Medicine* 360 (17): 1729-39.

Harrison, Jeffrey K, Yan Jiang, Shizong Chen, Yiyang Xia, Dominique Maciejewski, Robert K McNamara, Wolfgang J Streit, et al. 1998. « Role for neuronally derived fractalkine in mediating interactions between neurons and CX3CR1-expressing microglia ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (18): 10896-901.

Hedstrom, Lizbeth. 2002. « Serine Protease Mechanism and Specificity ». *Chemical Reviews* 102 (12): 4501-24.

Hofman, Albert, Guy G. O. Brusselle, Sarwa Darwish Murad, Cornelia M. van Duijn, Oscar H. Franco, André Goedegebure, M. Arfan Ikram, et al. 2015. « The Rotterdam Study: 2016 objectives and design update ». *European Journal of Epidemiology* 30 (8): 661–708.

Holz, Frank G., Almut Bindewald-Wittich, Monika Fleckenstein, Jens Dreyhaupt, Hendrik P.N. Scholl, et Steffen Schmitz-Valckenberg. 2007. « Progression of Geographic Atrophy and Impact of Fundus Autofluorescence Patterns in Age-related Macular Degeneration ». *American Journal of Ophthalmology* 143 (3): 463-472.e2.

Hood, John D., Cynthia J. Meininger, Marina Ziche, et Harris J. Granger. 1998. « VEGF upregulates eNOS message, protein, and NO production in human endothelial cells ». *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 274 (3): H1054–58.

Horie, Shintaro, Scott J Robbie, Jian Liu, Wei-Kang Wu, Robin R Ali, James W Bainbridge, Lindsay B Nicholson, Manabu Mochizuki, Andrew D Dick, et David A Copland. 2013. « CD200R signaling inhibits pro-angiogenic gene expression by macrophages and suppresses choroidal neovascularization ». *Scientific Reports* 3: 3072.

Hou, J., D.R. Clemmons, et S. Smekens. 2005. « Expression and characterization of a serine protease that preferentially cleaves insulin-like growth factor binding protein-5 ».

Journal of Cellular Biochemistry 94 (3): 470–484.

Hou, Yuzhu, Haijiang Lin, Linnan Zhu, Zhaoting Liu, Fanlei Hu, Jianfeng Shi, Tao Yang, et al. 2013. « Lipopolysaccharide Increases the Incidence of Collagen-Induced Arthritis in Mice Through Induction of Protease HTRA-1 Expression ». *Arthritis & Rheumatism* 65 (11): 2835–2846.

Housset, Michael, et Florian Sennlaub. 2015. *Thrombospondin-1 and Pathogenesis of Age-Related Macular Degeneration*. Vol. 31.

Hu, G., P. Jousilahti, A. Nissinen, R. Antikainen, M. Kivipelto, et J. Tuomilehto. 2006. « Body mass index and the risk of Parkinson disease ». *Neurology* 67 (11): 1955.

Hu, Jane G., RON P. GALLEMORE, DEAN BOK, et DONALD A. FRAMBACH. 1996. « Chloride Transport in Cultured Fetal Human Retinal Pigment Epithelium ». *Experimental Eye Research* 62 (4): 443-48.

Hu, Shou-Ih, Marc Carozza, Melissa Klein, Pascale Nantermet, Daniel Luk, et Robert M. Crowl. 1998. « Human HtrA, an Evolutionarily Conserved Serine Protease Identified as a Differentially Expressed Gene Product in Osteoarthritic Cartilage ». *Journal of Biological Chemistry* 273 (51): 34406-12.

Hutchinson, Jonathan. 1875. « Symmetrical central choroido-retinal disease occurring in senile persons ». *Ophthalmic hospital reports and journal of the Royal London Ophthalmic Hospital* 8: 231 – 244.

Iejima, D, M Nakayama, et T Iwata. 2015. *HTRA1 overexpression induces the exudative form of agerelated macular degeneration*. Vol. 10.

Iruela-Arispe, M. Luisa, DeAnn J. Liska, E. Helene Sage, et Paul Bornstein. 1993. « Differential expression of thrombospondin 1, 2, and 3 during murine development ». *Developmental Dynamics* 197 (1): 40–56.

Isenberg, Jeff S, Gema Martin-Manso, Justin B Maxhimer, et David D Roberts. 2009. « Regulation of nitric oxide signaling by thrombospondin-1: implications for anti-angiogenic therapies ». *Nature reviews. Cancer* 9 (3): 182-94.

Isenberg, Jeff S., David A. Wink, et David D. Roberts. 2006. « Thrombospondin-1 antagonizes nitric oxide-stimulated vascular smooth muscle cell responses ». *Cardiovascular Research* 71 (4): 785-93.

Ishida, Brian Y., Kathy R. Bailey, Keith G. Duncan, Robert J. Chalkley, A. L. Burlingame, John P. Kane, et Daniel M. Schwartz. 2004. « Regulated expression of apolipoprotein E by human retinal pigment epithelial cells ». *Journal of Lipid Research* 45 (2): 263-71.

Jakobsdottir, Johanna, Yvette P. Conley, Daniel E. Weeks, Tammy S. Mah, Robert E. Ferrell, et Michael B. Gorin. 2005. « Susceptibility Genes for Age-Related Maculopathy on Chromosome 10q26 ». *The American Journal of Human Genetics* 77 (3): 389-407.

Janssen, William J, Lea Barthel, Alaina Muldrow, Rebecca E Oberley-Deegan, Mark T Kearns, Claudia Jakubzick, et Peter M Henson. 2011. « Fas Determines Differential Fates of Resident and Recruited Macrophages during Resolution of Acute Lung Injury ». *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 184 (5): 547-60.

Jenkins, Stephen J, Dominik Ruckerl, Peter C Cook, Lucy H Jones, Fred D Finkelman, Nico van Rooijen, Andrew S MacDonald, et Judith E Allen. 2011. « Local macrophage proliferation, rather than recruitment from the blood, is a signature of Th2 inflammation ». *Science (New York, N.Y.)* 332 (6035): 1284-88.

Jiang, Peihua, Carl F. Lagenaur, et Vinodh Narayanan. 1999. « Integrin-associated Protein Is a Ligand for the P84 Neural Adhesion Molecule ». *Journal of Biological Chemistry* 274 (2): 559-62.

Jiménez, Benilde, Olga V. Volpert, Susan E. Crawford, Maria Febbraio, Roy L. Silverstein, et Noël Bouck. 2000. « Signals leading to apoptosis-dependent inhibition of neovascularization by thrombospondin-1 ». *Nature Medicine* 6 (janvier): 41.

Johnson, L. V, S Ozaki, M. K Staples, P. A Erickson, et D. H Anderson. 2000. « A Potential Role for Immune Complex Pathogenesis in Drusen Formation ». *Experimental Eye Research* 70 (4): 441-49.

Jonas JB, Tao Y, Neumaier M, et Findeisen P. 2010. « Monocyte chemoattractant protein 1, intercellular adhesion molecule 1, and vascular cell adhesion molecule 1 in exudative age-related macular degeneration ». *Archives of Ophthalmology* 128 (10): 1281-86.

Jones, Alex, Sandeep Kumar, Ning Zhang, Zongzhong Tong, Jia-Hui Yang, Carl Watt, James Anderson, et al. 2011. « Increased expression of multifunctional serine protease, HTRA1, in retinal pigment epithelium induces polypoidal choroidal vasculopathy in mice ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (35): 14578-83.

Jung, Steffen, Julio Aliberti, Petra Graemmel, Mary Jean Sunshine, Georg W Kreutzberg, Alan Sher, et Dan R Littman. 2000. « Analysis of Fractalkine Receptor CX3CR1 Function by Targeted Deletion and Green Fluorescent Protein Reporter Gene Insertion ». *Molecular and Cellular Biology* 20 (11): 4106-14.

Kanda, Atsuhiko, Wei Chen, Mohammad Othman, Kari E. H. Branham, Matthew Brooks, Ritu Khanna, Shirley He, Robert Lyons, Gonçalo R. Abecasis, et Anand Swaroop. 2007. « A variant of mitochondrial protein LOC387715/ARMS2, not HTRA1, is strongly associated with age-related macular degeneration ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104 (41): 16227.

Kang, Sang-Mo, Darren B. Schneider, Zhonghua Lin, Douglas Hanahan, David A. Dichek, Peter G. Stock, et Steinunn Baekkeskov. 1997. « Fas ligand expression in islets of Langerhans does not confer immune privilege and instead targets them for rapid destruction ». *Nature Medicine* 3 (juillet): 738.

Karlstetter, Marcus, Caroline Nothdurfter, Alexander Aslanidis, Katharina Moeller, Felicitas Horn, Rebecca Scholz, Harald Neumann, Bernhard H. F. Weber, Rainer Rupprecht, et Thomas Langmann. 2014. « Translocator protein (18 kDa) (TSPO) is expressed in reactive retinal microglia and modulates microglial inflammation and phagocytosis ». *Journal of Neuroinflammation* 11 (1): 3.

Kasuno, Kenji, Satoshi Takabuchi, Kazuhiko Fukuda, Shinae Kizaka-Kondoh, Junji Yodoi, Takehiko Adachi, Gregg L. Semenza, et Kiichi Hirota. 2004. « Nitric Oxide Induces Hypoxia-inducible Factor 1 Activation That Is Dependent on MAPK and Phosphatidylinositol 3-Kinase Signaling ». *Journal of Biological Chemistry* 279 (4): 2550-58.

Keane, Pearse A., Sandra Liakopoulos, Sharel C. Ongchin, Florian M. Heussen, Sandeep Msutta, Karen T. Chang, Alexander C. Walsh, et Srinivas R. Sadda. 2008. « Quantitative Subanalysis of Optical Coherence Tomography after Treatment with Ranibizumab for Neovascular Age-Related Macular Degeneration ». *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 49 (7): 3115-20.

Kharitonov, Alexei, Zhengjun Chen, Irmis Sures, Hongyang Wang, James Schilling, et Axel Ullrich. 1997. « A family of proteins that inhibit signalling through tyrosine kinase receptors ». *Nature* 386 (mars): 181.

Kim, Goo-Young, Ho-Young Kim, Hyun-Taek Kim, Jeong-Mi Moon, Cheol-Hee Kim, Seongman Kang, et Hyangshuk Rhim. 2012. « HtrA1 Is a Novel Antagonist Controlling Fibroblast Growth Factor (FGF) Signaling via Cleavage of FGF8 ». *Molecular and Cellular Biology* 32 (21): 4482-92.

King, George L., et Kiyoshi Suzuma. 2000. « Pigment-Epithelium-Derived Factor — A Key Coordinator of Retinal Neuronal and Vascular Functions ». *New England Journal of Medicine* 342 (5): 349-51.

Kitaoka, T, A E Aotaki-Keen, et L M Hjelmeland. 1994. « Distribution of FGF-5 in the rhesus macaque retina. » *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 35 (8): 3189.

Klein, Michael L., Frederick L. Ferris III, Jane Armstrong, Thomas S. Hwang, Emily Y. Chew, Susan B. Bressler, et Suresh R. Chandra. 2008. « Retinal Precursors and the Development of Geographic Atrophy in Age-Related Macular Degeneration ». *Ophthalmology* 115 (6): 1026-31.

Klein, Robert J., Caroline Zeiss, Emily Y. Chew, Jen-Yue Tsai, Richard S. Sackler, Chad Haynes, Alice K. Henning, et al. 2005. « Complement Factor H Polymorphism in Age-Related Macular Degeneration ». *Science* 308 (5720): 385.

Klein, Ronald, Matthew D. Davis, Yvonne L. Magli, Paul Segal, Barbara E. K. Klein, et Larry Hubbard. 1991. « The Wisconsin Age-related Maculopathy Grading System ». *Ophthalmology* 98 (7): 1128-34.

Klein, Ronald, Barbara E.K. Klein, Michael D. Knudtson, Stacy M. Meuer, Maria Swift, et Ronald E. Gangnon. 2007. « Fifteen-Year Cumulative Incidence of Age-Related Macular Degeneration ». *Ophthalmology* 114 (2): 253-62.

Klein, Ronald, Chelsea E Myers, Karen J Cruickshanks, Ronald E Gangnon, Lorraine G Danforth, Theru A Sivakumaran, Sudha K Iyengar, Michael Y Tsai, et Barbara E K Klein. 2014. « Markers of Inflammation, Oxidative Stress, and Endothelial Dysfunction and the 20-year Cumulative Incidence of Early Age-related Macular Degeneration: The Beaver Dam Eye Study ». *JAMA ophthalmology* 132 (4): 446-55.

Klein, Ronald, Tunde Peto, Alan Bird, et Mylan R. Vannewkirk. 2004. « The epidemiology of age-related macular degeneration ». *American Journal of Ophthalmology* 137 (3): 486-95.

Koenigsknecht, Jessica, et Gary Landreth. 2004. « Microglial Phagocytosis of Fibrillar β - Amyloid through a β ₁ Integrin-Dependent Mechanism ». *The Journal of Neuroscience* 24 (44): 9838.

Kortvely, Elod, Stefanie M. Hauck, Gabriele Duetsch, Christian J. Gloeckner, Elisabeth Kremmer, Claudia S. Alge-Priglinger, Cornelia A. Deeg, et Marius Ueffing. 2010. « ARMS2 Is a Constituent of the Extracellular Matrix Providing a Link between Familial and Sporadic Age-Related Macular Degenerations ». *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 51 (1): 79-88.

Kosfeld, M D, et W A Frazier. 1993. « Identification of a new cell adhesion motif in two homologous peptides from the COOH-terminal cell binding domain of human thrombospondin. » *Journal of Biological Chemistry* 268 (12): 8808-14.

Kramer, Michal, Murat Hasanreisoglu, Anna Feldman, Ruth Axer-Siegel, Paulina Sonis, Idit Maharshak, Yehudit Monselise, Michael Gurevich, et Dov Weinberger. 2012. « Monocyte chemoattractant protein-1 in the aqueous humour of patients with age-related macular degeneration ». *Clinical & Experimental Ophthalmology* 40 (6): 617-625.

Krojer, Tobias, Justyna Sawa, Eva Schäfer, Helen R. Saibil, Michael Ehrmann, et Tim Clausen. 2008. « Structural basis for the regulated protease and chaperone function of DegP ». *Nature* 453 (mai): 885.

Kuemmerle, John F., et Huiping Zhou. 2002. « Insulin-like Growth Factor-binding Protein-5 (IGFBP-5) Stimulates Growth and IGF-I Secretion in Human Intestinal Smooth Muscle by Ras-dependent Activation of p38 MAP Kinase and Erk1/2 Pathways ». *Journal of Biological Chemistry* 277 (23): 20563-71.

Kumar, Anil, Lian Zhao, Robert N Fariss, Paul G McMenamin, et Wai T Wong. 2014. « Vascular Associations and Dynamic Process Motility in Perivascular Myeloid Cells of the Mouse Choroid: Implications for Function and Senescent Change ». *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 55 (3): 1787-96.

Kumar, Sandeep, Hiroyuki Nakashizuka, Alex Jones, Alyssia Lambert, Xuchen Zhao, Megan Shen, Mackenzie Parker, et al. 2017. « Proteolytic Degradation and Inflammation Play Critical Roles in Polypoidal Choroidal Vasculopathy ». *The American Journal of Pathology* 187 (12): 2841-57.

Kurihara, Takao, Glenn Warr, James Loy, et Rodrigo Bravo. 1997. « Defects in Macrophage Recruitment and Host Defense in Mice Lacking the CCR2 Chemokine Receptor ». *The Journal of Experimental Medicine* 186 (10): 1757-62.

Kuziel, William A, Sharon J Morgan, Tracey C Dawson, Stephanie Griffin, Oliver Smithies, Klaus Ley, et Nobuyo Maeda. 1997. « Severe reduction in leukocyte adhesion and monocyte extravasation in mice deficient in CC chemokine receptor 2 ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94 (22): 12053-58.

Lad, Eleonora M, Scott W Cousins, John S Van Arnem, et Alan D Proia. 2015. « Abundance of infiltrating CD163+ cells in the retina of postmortem eyes with dry and neovascular age-related macular degeneration ». *Graefes' archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv fur klinische und experimentelle Ophthalmologie* 253 (11): 1941-45.

Lafaut, B A, S Aisenbrey, C Vanden Broecke, et K U Bartz-Schmidt. 2000. « Clinicopathological correlation of deep retinal vascular anomalous complex in age related macular degeneration ». *British Journal of Ophthalmology* 84 (11): 1269.

Lahav, Judith. 1993. « The functions of thrombospondin and its involvement in physiology and pathophysiology ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1182 (1): 1-14.

Lamb, T. D., et E. N. Pugh. 2004. « Dark adaptation and the retinoid cycle of vision ». *Progress in Retinal and Eye Research* 23 (3): 307-380.

Landego, Ivan, Nipun Jayachandran, Stephan Wullschleger, Ting-ting Zhang, Ian W. Gibson, Angela Miller, Dario R. Alessi, et Aaron J. Marshall. 2012. « Interaction of TAPP adapter proteins with phosphatidylinositol (3,4)-bisphosphate regulates B-cell activation and autoantibody production ». *European Journal of Immunology* 42 (10): 2760-2770.

Latour, Sylvain, Hiroyuki Tanaka, Christian Demeure, Véronique Mateo, Manuel Rubio, Eric J. Brown, Charles Maliszewski, et al. 2001. « Bidirectional Negative Regulation of Human T and Dendritic Cells by CD47 and Its Cognate Receptor Signal-Regulator Protein- α : Down-Regulation of IL-12 Responsiveness and Inhibition of Dendritic Cell Activation ». *The Journal of Immunology* 167 (5): 2547.

LaVail, MM. 1976. « Rod outer segment disk shedding in rat retina: relationship to cyclic lighting ». *Science* 194 (4269): 1071.

Lawler, J., et Richard O Hynes. 1986. « The structure of human thrombospondin, an

adhesive glycoprotein with multiple calcium-binding sites and homologies with several different proteins ». *The Journal of Cell Biology* 103 (5): 1635-48.

Lawler, John W., et Henry S. Slayter. 1981. « The release of heparin binding peptides from platelet thrombospondin by proteolytic action of thrombin, plasmin and trypsin ». *Thrombosis Research* 22 (3): 267-79.

Lawler, JW, HS Slayter, et JE Coligan. 1978. « Isolation and charcteriation of a high molecular weight glycoprotein from human blood platelets ». *J Biol Chem.*, 1978, 253 édition, sect. 23.

Lawrence, Toby, et Gioacchino Natoli. 2011. « Transcriptional regulation of macrophage polarization: enabling diversity with identity ». *Nature Reviews Immunology* 11 (octobre): 750.

Lawrence, Toby, Derek A. Willoughby, et Derek W. Gilroy. 2002. « Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation ». *Nature Reviews Immunology* 2 (octobre): 787.

Lechner, Judith, Mei Chen, Ruth E Hogg, Levente Toth, Giuliana Silvestri, Usha Chakravarthy, et Heping Xu. 2017. « Peripheral blood mononuclear cells from neovascular age-related macular degeneration patients produce higher levels of chemokines CCL2 (MCP-1) and CXCL8 (IL-8) ». *Journal of Neuroinflammation* 14: 42.

Legrand, Nicolas, Nicholas D Huntington, Maho Nagasawa, Arjen Q Bakker, Remko Schotte, Hélène Strick-Marchand, Sandra J de Geus, et al. 2011. « Functional CD47/signal regulatory protein alpha (SIRP α) interaction is required for optimal human T- and natural killer- (NK) cell homeostasis in vivo ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (32): 13224-29.

Lemmon, M.A. 2004. « Pleckstrin homology domains: not just for phosphoinositides ». *Biochemical Society Transactions* 32 (5): 707. <https://doi.org/10.1042/BST0320707>.

Leung, DW, G Cachianes, WJ Kuang, DV Goeddel, et N Ferrara. 1989. « Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen ». *Science* 246 (4935): 1306.

Levy, Olivier, Bertrand Calippe, Sophie Lavalette, Shulong J Hu, William Raoul, Elisa Dominguez, Michael Housset, et al. 2015. « Apolipoprotein E promotes subretinal mononuclear phagocyte survival and chronic inflammation in age - related macular degeneration ». *EMBO Molecular Medicine* 7 (2): 211.

Levy, Olivier, Sophie Lavalette, Shulong J. Hu, Michael Housset, William Raoul, Chiara Eandi, José-Alain Sahel, Patrick M. Sullivan, Xavier Guillonnet, et Florian Sennlaub. 2015. « APOE Isoforms Control Pathogenic Subretinal Inflammation in Age-Related Macular Degeneration ». *The Journal of Neuroscience* 35 (40): 13568.

Liao, Sha-Mei, Wei Zheng, Jiang Zhu, Casey A Lewis, Omar Delgado, Maura A Crowley, Natasha M Buchanan, Bruce D Jaffee, et Thaddeus P Dryja. 2017. « Specific correlation

between the major chromosome 10q26 haplotype conferring risk for age-related macular degeneration and the expression of HTRA1 ». *Molecular Vision* 23: 318-33.

Liles, MR, DA Newsome, et PD Oliver. 1991. « Antioxidant enzymes in the aging human retinal pigment epithelium ». *Archives of Ophthalmology* 109 (9): 1285-88.

Lin, Michael T., et M. Flint Beal. 2006. « Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases ». *Nature* 443 (octobre): 787.

Lindberg, F P, H D Gresham, M I Reinhold, et E J Brown. 1996. « Integrin-associated protein immunoglobulin domain is necessary for efficient vitronectin bead binding. » *The Journal of Cell Biology* 134 (5): 1313.

Lindberg, FP. 1993. « Molecular cloning of integrin-associated protein: an immunoglobulin family member with multiple membrane-spanning domains implicated in alpha v beta 3-dependent ligand binding ». *The Journal of Cell Biology* 123 (2): 485-96.

Lipinska, B, S Sharma, et C Georgopoulos. 1988. « Sequence analysis and regulation of the htrA gene of Escherichia coli: a sigma 32-independent mechanism of heat-inducible transcription. » *Nucleic Acids Research* 16 (21): 10053-67.

Liu, Chao-Ying, Juan-Ying Xu, Xiao-Yan Shi, Wei Huang, Ting-Yan Ruan, Ping Xie, et Jun-Li Ding. 2013. « M2-polarized tumor-associated macrophages promoted epithelial-mesenchymal transition in pancreatic cancer cells, partially through TLR4/IL-10 signaling pathway ». *Laboratory Investigation* 93 (juin): 844.

Liu, Yuan, Hans-Jörg Bühring, Ke Zen, Stephanie L. Burst, Frederick J. Schnell, Ifor R. Williams, et Charles A. Parkos. 2002. « Signal Regulatory Protein (SIRP α), a Cellular Ligand for CD47, Regulates Neutrophil Transmigration ». *Journal of Biological Chemistry* 277 (12): 10028-36.

Liu, Yuan, Didier Merlin, Stephanie L. Burst, Mildred Pochet, James L. Madara, et Charles A. Parkos. 2001. « The Role of CD47 in Neutrophil Transmigration: Increased rate of migration correlated with increased cell surface expression of CD47 ». *Journal of Biological Chemistry* 276 (43): 40156-66.

Lohmander, L. Stefan, Lori A. Hoerrner, et Michael W. Lark. 1993. « Metalloproteinases, tissue inhibitor, and proteoglycan fragments in knee synovial fluid in human osteoarthritis ». *Arthritis & Rheumatism* 36 (2): 181-189.

Lopez, Pedro F., Hans E. Grossniklaus, H. Michael Lambert, Thomas M. Aaberg, Antonio Capone Jr., Paul Sternberg Jr., et Nancy L'Hernault. 1991. « Pathologic Features of Surgically Excised Subretinal Neovascular Membranes in Age-related Macular Degeneration ». *American Journal of Ophthalmology* 112 (6): 647-56.

Lopez-Dee, Zenaida, Kenneth Pidcock, et Linda Gutierrez. 2011. *Thrombospondin-1: Multiple Paths to Inflammation*. Vol. 2011.

- Lu, M., M. Kuroki, S. Amano, M. Tolentino, K. Keough, I. Kim, R. Bucala, et A. P. Adamis. 1998. « Advanced glycation end products increase retinal vascular endothelial growth factor expression. » *The Journal of Clinical Investigation* 101 (6): 1219-24.
- Lundberg, Pernilla, Cecilia Koskinen, Paul A. Baldock, Hanna Löthgren, Åsa Stenberg, Ulf H. Lerner, et Per-Arne Oldenborg. 2007. « Osteoclast formation is strongly reduced both in vivo and in vitro in the absence of CD47/SIRP α -interaction ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 352 (2): 444-48.
- Magnusson, Kristinn P, Shan Duan, Haraldur Sigurdsson, Hjorvar Petursson, Zhenglin Yang, Yu Zhao, Paul S Bernstein, et al. 2005. « CFH Y402H Confers Similar Risk of Soft Drusen and Both Forms of Advanced AMD ». *PLOS Medicine* 3 (1).
- Mahley, Robert W., et Jr. Stanley C. Rall. 2000. « Apolipoprotein E: Far More Than a Lipid Transport Protein ». *Annual Review of Genomics and Human Genetics* 1 (1): 507-37.
- Maile, Laura A, Victoria E DeMambro, Christine Wai, Ariel W Aday, Byron E Capps, Wesley G Beamer, Clifford J Rosen, et David R Clemmons. 2011. « An essential role for the association of CD47 to SHPS-1 in skeletal remodeling ». *Journal of Bone and Mineral Research* 26 (9): 2068-81.
- Mantovani, Alberto, Silvano Sozzani, Massimo Locati, Paola Allavena, et Antonio Sica. 2002. « Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes ». *Trends in Immunology* 23 (11): 549-55.
- Marmor, Michael F. 1999. « Mechanisms of fluid accumulation in retinal edema ». *Documenta Ophthalmologica* 97 (3): 239-249.
- Marrie, Ruth Ann, et Christopher A. Beck. 2014. « Obesity and HLA in multiple sclerosis ». *Neurology* 82 (10): 826.
- Marshall, Aaron J, Allyson K Krahn, Kewei Ma, Vincent Duronio, et Sen Hou. 2002. « TAPP1 and TAPP2 Are Targets of Phosphatidylinositol 3-Kinase Signaling in B Cells: Sustained Plasma Membrane Recruitment Triggered by the B-Cell Antigen Receptor ». *Molecular and Cellular Biology* 22 (15): 5479-91.
- Marshall, John. 1987. « The ageing retina: Physiology or pathology ». *Eye* 1 (mars): 282.
- Martin, Donna M., Douglas Yee, et Eva L. Feldman. 1992. « Gene expression of the insulin-like growth factors and their receptors in cultured human retinal pigment epithelial cells ». *Molecular Brain Research* 12 (1): 181-86.
- Martinez-Torres, Ana-Carolina, Claire Quiney, Tarik Attout, Heloïse Boulet, Linda Herbi, Laura Vela, Sandrine Barbier, et al. 2015. « CD47 Agonist Peptides Induce Programmed Cell Death in Refractory Chronic Lymphocytic Leukemia B Cells via PLC γ 1 Activation: Evidence from Mice and Humans ». *PLOS Medicine* 12 (3): e1001796.
- Mata, Nathan L., Roxana A. Radu, Richard S. Clemmons, et Gabriel H. Travis. 2002.

« Isomerization and Oxidation of Vitamin A in Cone-Dominant Retinas: A Novel Pathway for Visual-Pigment Regeneration in Daylight ». *Neuron* 36 (1): 69-80.

Matsumoto, M, N Yoshimura, et Y Honda. 1994. « Increased production of transforming growth factor-beta 2 from cultured human retinal pigment epithelial cells by photocoagulation. » *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 35 (13): 4245.

McDonald, J. F., J. M. Dimitry, et W. A. Frazier. 2003. « An Amyloid-Like C-Terminal Domain of Thrombospondin-1 Displays CD47 Agonist Activity Requiring Both VVM Motifs ». *Biochemistry* 42 (33): 10001-11.

McKay, Gareth J., Chris C. Patterson, Usha Chakravarthy, Shilpa Dasari, Caroline C. Klaver, Johannes R. Vingerling, Lintje Ho, et al. 2011. « Evidence of association of APOE with age-related macular degeneration - a pooled analysis of 15 studies ». *Human Mutation* 32 (12): 1407-1416.

McLeod, D Scott, Imran Bhutto, Malia M Edwards, Rachel E Silver, Johanna M Seddon, et Gerard A Luty. 2016. « Distribution and Quantification of Choroidal Macrophages in Human Eyes With Age-Related Macular Degeneration ». *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 57 (14): 5843-55.

McMahon, Grainne A., John D. Dignam, et Larry E. Gentry. 1996. « Structural characterization of the latent complex between transforming growth factor β 1 and β 1-latency-associated peptide ». *Biochemical Journal* 313 (1): 343.

Medawar, P B. 1948. « Immunity to Homologous Grafted Skin. III. The Fate of Skin Homographs Transplanted to the Brain, to Subcutaneous Tissue, and to the Anterior Chamber of the Eye ». *British Journal of Experimental Pathology* 29 (1): 58-69.

Medzhitov, Ruslan. 2008. « Origin and physiological roles of inflammation ». *Nature* 454 (juillet): 428.

Meleth, Annal D., Pradeep Mettu, Elvira Agrón, Emily Y. Chew, Srinivas R. Sadda, Frederick L. Ferris, et Wai T. Wong. 2011. « Changes in Retinal Sensitivity in Geographic Atrophy Progression as Measured by Microperimetry ». *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 52 (2): 1119.

Miceli, Michael V., Mark R. Liles, et David A. Newsome. 1994. « Evaluation of Oxidative Processes in Human Pigment Epithelial Cells Associated with Retinal Outer Segment Phagocytosis ». *Experimental Cell Research* 214 (1): 242-49.

Micklisch, Sven, Yuchen Lin, Saskia Jacob, Marcus Karlstetter, Katharina Dannhausen, Prasad Dasari, Monika von der Heide, et al. 2017. « Age-related macular degeneration associated polymorphism rs10490924 in ARMS2 results in deficiency of a complement activator ». *Journal of Neuroinflammation* 14: 4.

Midena, Edoardo, Tatiana Segato, Maria Chiara Blarzino, et Claudia Degli Angeli. 1994. « Macular drusen and the sensitivity of the central visual field ». *Documenta*

Ophthalmologica 88 (2): 179–185.

Mitchell, Paul, Wayne Smith, Karin Attebo, et Paul R. Healey. 1996. « Prevalence of Open-angle Glaucoma in Australia ». *Ophthalmology* 103 (10): 1661-69.

Miyajima–Uchida, Hiroko, Hideyuki Hayashi, Richiko Beppu, Motomu Kuroki, Mitsue Fukami, Fumiko Arakawa, Yoshihiro Tomita, Masahide Kuroki, et Kenji Oshima. 2000. « Production and Accumulation of Thrombospondin-1 in Human Retinal Pigment Epithelial Cells ». *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 41 (2): 561-67.

Mizutani, Makiko, Paula A Pino, Noah Saederup, Israel F Charo, Richard M Ransohoff, et Astrid E Cardona. 2012. « The fractalkine receptor but not CCR2 is present on microglia from embryonic development throughout adulthood ». *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 188 (1): 29-36.

Moseley, H., W. S. Foulds, D. Allan, et P. M. Kyle. 1984. « Routes of clearance of radioactive water from the rabbit vitreous. » *British Journal of Ophthalmology* 68 (3): 145.

Mullany, Sally A, Mehdi Moslemi-Kebria, Ramandeep Rattan, Ashwani Khurana, Amy Clayton, Takayo Ota, Andrea Mariani, Karl C Podratz, Jeremy Chien, et Viji Shridhar. 2011. « Expression and Functional Significance of HtrA1 Loss in Endometrial Cancer ». *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research* 17 (3): 427-36.

Murohara, Toyooki, Bernhard Witzenbichler, Ioakim Spyridopoulos, Takayuki Asahara, Bo Ding, Alison Sullivan, Douglas W. Losordo, et Jeffrey M. Isner. 1999. « Role of Endothelial Nitric Oxide Synthase in Endothelial Cell Migration ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 19 (5): 1156.

Murphy, Gillian, Vera Knäuper, Susan Atkinson, George Butler, William English, Mike Hutton, Jan Stracke, et Ian Clark. 2002. « Matrix metalloproteinases in arthritic disease ». *Arthritis Research* 4 (Suppl 3): S39-49.

Murphy-Ullrich, Joanne E, et Maria Poczatek. 2000. « Activation of latent TGF- β by thrombospondin-1: mechanisms and physiology ». *Cytokine & Growth Factor Reviews* 11 (1): 59-69.

Nagelhus, Erlend A., Yoshiyuki Horio, Atsushi Inanobe, Akikazu Fujita, Finn - m. Haug, Søren Nielsen, Yoshihisa Kurachi, et Ole Petter Ottersen. 1999. « Immunogold evidence suggests that coupling of K⁺ siphoning and water transport in rat retinal Müller cells is mediated by a coenrichment of Kir4.1 and AQP4 in specific membrane domains ». *Glia* 26 (1): 47–54.

Nathan, Carl. 2006. « Neutrophils and immunity: challenges and opportunities ». *Nature Reviews Immunology* 6 (février): 173.

Newman, Aaron M, Natasha B Gallo, Lisa S Hancox, Norma J Miller, Carolyn M Radeke,

Michelle A Maloney, James B Cooper, et al. 2012. « Systems-level analysis of age-related macular degeneration reveals global biomarkers and phenotype-specific functional networks ». *Genome Medicine* 4 (2): 16-16.

Ng, Tat Fong, et J. Wayne Streilein. 2001. « Light-Induced Migration of Retinal Microglia into the Subretinal Space ». *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 42 (13): 3301-10.

Nichols, Barbara A, Dorothy Ford Bainton, et Marilyn G Farquhar. 1971. « Differentiation of monocytes : Origin, Nature, and Fate of Their Azurophil Granules ». *The Journal of Cell Biology* 50 (2): 498-515.

Oda, Tomoyuki, Kiichi Hirota, Kenichiro Nishi, Satoshi Takabuchi, Seiko Oda, Hiroko Yamada, Toshiyuki Arai, et al. 2006. « Activation of hypoxia-inducible factor 1 during macrophage differentiation ». *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 291 (1): C104-13.

Oh, Hideyasu, Hitoshi Takagi, Chikako Takagi, Kiyoshi Suzuma, Atsushi Otani, Kazuhiro Ishida, Miyo Matsumura, Yuichiro Ogura, et Yoshihito Honda. 1999. « The Potential Angiogenic Role of Macrophages in the Formation of Choroidal Neovascular Membranes ». *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 40 (9): 1891-98.

Oka, Chio, Rumi Tsujimoto, Miwa Kajikawa, Kazuko Koshiba-Takeuchi, Junko Ina, Masato Yano, Akiho Tsuchiya, et al. 2004. « HtrA1 serine protease inhibits signaling mediated by Tgf β family proteins ». *Development* 131 (5): 1041.

Okada, Tetsuji, Oliver P. Ernst, Krzysztof Palczewski, et Klaus Peter Hofmann. 2001. « Activation of rhodopsin: new insights from structural and biochemical studies ». *Trends in Biochemical Sciences* 26 (5): 318-24.

Oldenborg, Per-Arne, Alex Zheleznyak, Yi-Fu Fang, Carl F. Lagenaur, Hattie D. Gresham, et Frederik P. Lindberg. 2000. « Role of CD47 as a Marker of Self on Red Blood Cells ». *Science* 288 (5473): 2051.

Orazizadeh, Mahmoud, Herng Sheng Lee, Bianca Groenendijk, S Jane Millward Sadler, Malcolm O Wright, Frederik P Lindberg, et Donald M Salter. 2008. « CD47 associates with alpha 5 integrin and regulates responses of human articular chondrocytes to mechanical stimulation in an in vitro model ». *Arthritis Research & Therapy* 10 (1): R4-R4.

Ortiz-Masià, Dolores, Irene Díez, Sara Calatayud, Carlos Hernández, Jesús Cosín-Roger, Joaquín Hinojosa, Juan V Esplugues, et María D Barrachina. 2012. « Induction of CD36 and Thrombospondin-1 in Macrophages by Hypoxia-Inducible Factor 1 and Its Relevance in the Inflammatory Process ». Édité par Holger K Eltzschig. *PLoS ONE* 7 (10): e48535.

Osterberg, G. 1935. *Topography of the Layer of Rods and Cones in the Human Retina*. Acta

ophthalmologica: Supplementum. A. Busck.

Pahl, Lisa, Astrid Spangenberg, Stephanie Schubert, Uwe Schönmann, Jörg Schmidtke, et Manfred Stuhmann. 2012. « Characterization of the 10q26-orthologue in rhesus monkeys corroborates a functional connection between ARMS2 and HTRA1 ». *Experimental Eye Research* 98: 75-78.

Palframan, Roger T, Steffen Jung, Guiying Cheng, Wolfgang Weninger, Yi Luo, Martin Dorf, Dan R Littman, et al. 2001. « Inflammatory Chemokine Transport and Presentation in HEV: A Remote Control Mechanism for Monocyte Recruitment to Lymph Nodes in Inflamed Tissues ». *The Journal of Experimental Medicine* 194 (9): 1361-74.

Papapetropoulos, A, G García-Cardena, J A Madri, et W C Sessa. 1997. « Nitric oxide production contributes to the angiogenic properties of vascular endothelial growth factor in human endothelial cells. » *Journal of Clinical Investigation* 100 (12): 3131-39.

Passlick, B, D Flieger, et HW Ziegler-Heitbrock. 1989. « Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood ». *Blood* 74 (7): 2527.

Pavert, Serge A. van de, Albena Kantardzhieva, Anna Malysheva, Jan Meuleman, Inge Versteeg, Christiaan Levelt, Jan Klooster, et al. 2004. « Crumbs homologue 1 is required for maintenance of photoreceptor cell polarization and adhesion during light exposure ». *Journal of Cell Science* 117 (18): 4169.

Peeters A, Magliano DJ, Stevens J, Duncan BB, Klein R, et Wong TY. 2008. « Changes in abdominal obesity and age-related macular degeneration: The atherosclerosis risk in communities study ». *Archives of Ophthalmology* 126 (11): 1554-60.

Penfold, P. L., M. C. Killingsworth, et S. H. Sarks. 1985. « Senile macular degeneration: The involvement of immunocompetent cells ». *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology* 223 (2): 69-76.

Penfold, P. L, Murray, et SHIRLEY SARKS FRACO. 1984. « An ultrastructural study of the role of leucocytes and fibroblasts in the breakdown of bruch's membrane ». *Australian Journal of Ophthalmology* 12 (1): 23-31.

Penfold, Philip L, Michele C Madigan, Mark C Gillies, et Jan M Provis. 2001. « Immunological and Aetiological Aspects of Macular Degeneration ». *Progress in Retinal and Eye Research* 20 (3): 385-414.

Peri, Francesca, et Christiane Nüsslein-Volhard. 2008. « Live Imaging of Neuronal Degradation by Microglia Reveals a Role for v0-ATPase a1 in Phagosomal Fusion In Vivo ». *Cell* 133 (5): 916-27.

Perry, V. Hugh, et Siamon Gordon. 1988. « Macrophages and microglia in the nervous system ». *Trends in Neurosciences* 11 (6): 273-77.

Pimanda, John E., Douglas S. Annis, Mark Raftery, Deane F. Mosher, Colin N. Chesterman, et Philip J. Hogg. 2002. « The von Willebrand factor-reducing activity of thrombospondin-1 is located in the calcium-binding/C-terminal sequence and requires a free thiol at position 974 ». *Blood* 100 (8): 2832.

Primo, Luca, Chiara Ferrandi, Cristina Roca, Serena Marchiò, Laura di Blasio, Massimo Alessio, et Federico Bussolino. 2005. « Identification of CD36 molecular features required for its in vitro angiostatic activity ». *The FASEB Journal* 19 (12): 1713-15.

Ransohoff, R. M, et A. E Cardona. 2010. « The myeloid cells of the central nervous system parenchyma ». *Nature* 468 (novembre): 253.

Ransohoff, Richard M. 2007. « Microgliosis: the questions shape the answers ». *Nature Neuroscience* 10 (décembre): 1507.

Raoul, William, Constance Auvynet, Serge Camelo, Xavier Guillonnet, Charles Feumi, Christophe Combadière, et Florian Sennlaub. 2010. « CCL2/CCR2 and CX3CL1/CX3CR1 chemokine axes and their possible involvement in age-related macular degeneration ». *Journal of Neuroinflammation* 7 (1): 87.

Reed-Geaghan, Erin G, Quillan W Reed, Paige E Cramer, et Gary E Landreth. 2010. « Deletion of CD14 attenuates AD pathology by influencing the brain's inflammatory milieu ». *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 30 (46): 15369-73.

Rege, Tanya A, Jerry Stewart, Brian Dranka, ETTY N Benveniste, Roy L Silverstein, et Candace L Gladson. 2009. « Thrombospondin-1-induced apoptosis of brain microvascular endothelial cells can be mediated by TNF-R1 ». *Journal of cellular physiology* 218 (1): 94-103.

Reinhold, M.I., F.P. Lindberg, D. Plas, S. Reynolds, M.G. Peters, et E.J. Brown. 1995. « In vivo expression of alternatively spliced forms of integrin-associated protein (CD47) ». *Journal of Cell Science* 108 (11): 3419.

Rezar-Dreindl, Sandra, Stefan Sacu, Katharina Eibenberger, Andreas Pollreis, Wolf Bühl, Michael Georgopoulos, Christoph Krall, Günther Weigert, et Ursula Schmidt-Erfurth. 2016. « The Intraocular Cytokine Profile and Therapeutic Response in Persistent Neovascular Age-Related Macular Degeneration ». *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 57 (10): 4144-50.

Rivera, Andrea, Sheila A. Fisher, Lars G. Fritsche, Claudia N. Keilhauer, Peter Lichtner, Thomas Meitinger, et Bernhard H.F. Weber. 2005. « Hypothetical LOC387715 is a second major susceptibility gene for age-related macular degeneration, contributing independently of complement factor H to disease risk ». *Human Molecular Genetics* 14 (21): 3227-36.

Rizzolo, Lawrence J. 1998. « Polarization of the Na⁺, K⁺-ATPase in Epithelia Derived

from the Neuroepithelium ». In, édité par Kwang W. Jeon, 185:195-235. International Review of Cytology. Academic Press.

Rock, Matthew J, Paul Holden, William A Horton, et Daniel H Cohn. 2010. « Cartilage oligomeric matrix protein promotes cell attachment via two independent mechanisms involving CD47 and $\alpha V \beta 3$ integrin ». *Molecular and cellular biochemistry* 338 (1-2): 215-24.

Rofagha, Soraya, Robert B. Bhisitkul, David S. Boyer, Srinivas R. Sadda, et Kang Zhang. 2013. « Seven-Year Outcomes in Ranibizumab-Treated Patients in ANCHOR, MARINA, and HORIZON ». *Ophthalmology* 120 (11): 2292-99.

Roy, Brijesh, et John Garthwaite. 2006. « Nitric oxide activation of guanylyl cyclase in cells revisited ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (32): 12185-90.

Rózanowska, Malgorzata, John Jarvis-Evans, Witold Korytowski, Mike E. Boulton, Janice M. Burke, et Tadeusz Sarna. 1995. « Blue Light-induced Reactivity of Retinal Age Pigment: IN VITRO GENERATION OF OXYGEN-REACTIVE SPECIES ». *Journal of Biological Chemistry* 270 (32): 18825-30.

Ruckman, Judy, Louis S. Green, Jim Beeson, Sheela Waugh, Wendy L. Gillette, Dwight D. Henninger, Lena Claesson-Welsh, et Nebojsa Janjic. 1998. « 2'-Fluoropyrimidine RNA-based Aptamers to the 165-Amino Acid Form of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF165): INHIBITION OF RECEPTOR BINDING AND VEGF-INDUCED VASCULAR PERMEABILITY THROUGH INTERACTIONS REQUIRING THE EXON 7-ENCODED DOMAIN ». *Journal of Biological Chemistry* 273 (32): 20556-67.

Rudolf, Martin, Mark E. Clark, Melissa F. Chimento, Chuan-Ming Li, Nancy E. Medeiros, et Christine A. Curcio. 2008. « Prevalence and Morphology of Druse Types in the Macula and Periphery of Eyes with Age-Related Maculopathy ». *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 49 (3): 1200.

Ruiz, Alberto, Peterson Brett, et Dean Bok. 1996. « TIMP-3 Is Expressed in the Human Retinal Pigment Epithelium ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 226 (2): 467-74.

Ryeom, Sandra W., Roy L. Silverstein, Anthony Scotto, et Janet R. Sparrow. 1996. « Binding of Anionic Phospholipids to Retinal Pigment Epithelium May Be Mediated by the Scavenger Receptor CD36 ». *Journal of Biological Chemistry* 271 (34): 20536-39.

Saederup, Noah, Astrid E Cardona, Kelsey Croft, Makiko Mizutani, Anne C Coteleur, Chia-Lin Tsou, Richard M Ransohoff, et Israel F Charo. 2010. « Selective Chemokine Receptor Usage by Central Nervous System Myeloid Cells in CCR2-Red Fluorescent Protein Knock-In Mice ». Édité par Derya Unutmaz. *PLoS ONE* 5 (10): e13693.

Saijo, Kaoru, et Christopher K. Glass. 2011. « Microglial cell origin and phenotypes in

health and disease ». *Nature Reviews Immunology* 11 (octobre): 775.

Sarks, J P, S H Sarks, et M C Killingsworth. 1988. « Evolution of geographic atrophy of the retinal pigment epithelium ». *Eye* 2 (septembre): 552.

Sarks, S H. 1976. « Ageing and degeneration in the macular region: a clinico-pathological study. » *British Journal of Ophthalmology* 60 (5): 324–341.

Sarks, S H, J J Arnold, M C Killingsworth, et J P Sarks. 1999. « Early drusen formation in the normal and aging eye and their relation to age related maculopathy: a clinicopathological study ». *British Journal of Ophthalmology* 83 (3): 358–368.

Sato-Hashimoto, Miho, Yasuyuki Saito, Hiroshi Ohnishi, Hiroko Iwamura, Yoshitake Kanazawa, Tetsuya Kaneko, Shinya Kusakari, et al. 2011. « Signal Regulatory Protein α Regulates the Homeostasis of T Lymphocytes in the Spleen ». *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 187 (1): 291-97.

Savill, J, N Hogg, Y Ren, et C Haslett. 1992. « Thrombospondin cooperates with CD36 and the vitronectin receptor in macrophage recognition of neutrophils undergoing apoptosis. » *Journal of Clinical Investigation* 90 (4): 1513-22.

Schick, Tina, Lebriz Ersoy, Yara T. E. Lechanteur, Nicole T. M. Saksens, Carel B. Hoyng, Anneke I. den Hollander, Bernd Kirchhof, et Sascha Fauser. 2016. « History of sunlight exposure is a risk factor for age-related macular degeneration ». *RETINA* 36 (4).

Schmidt, Silke, Michael A. Hauser, William K. Scott, Eric A. Postel, Anita Agarwal, Paul Gallins, Frank Wong, et al. 2006. « Cigarette Smoking Strongly Modifies the Association of LOC387715 and Age-Related Macular Degeneration ». *The American Journal of Human Genetics* 78 (5): 852–864. <https://doi.org/10.1086/503822>.

Schultz-Cherry, S, et JE Murphy-Ullrich. 1993. « Thrombospondin causes activation of latent transforming growth factor- β secreted by endothelial cells by a novel mechanism [published erratum appears in J Cell Biol 1993 Sep;122(5):following 1143] ». *The Journal of Cell Biology* 122 (4): 923-32.

Schultz-Cherry, Stacey, Hui Chen, Deane F. Mosher, Tina M. Misenheimer, Henry C. Kruttsch, David D. Roberts, et Joanne E. Murphy-Ullrich. 1995. « Regulation of Transforming Growth Factor- β Activation by Discrete Sequences of Thrombospondin 1 ». *Journal of Biological Chemistry* 270 (13): 7304-10.

Schuman, Stefanie G., Anjum F. Koreishi, Sina Farsiou, Sin-ho Jung, Joseph A. Izatt, et Cynthia A. Toth. 2009. « Photoreceptor Layer Thinning over Drusen in Eyes with Age-Related Macular Degeneration Imaged In Vivo with Spectral-Domain Optical Coherence Tomography ». *Ophthalmology* 116 (3): 488-496.e2.

Schütt, F., M. Bergmann, J. Kopitz, et F. G. Holz. 2002. « Detergent-like effects of the lipofuscin retinoid component A2-E in retinal pigment epithelial cells ». *Der Ophthalmologe* 99 (11): 861–865.

Seddon JM, Francis PJ, George S, Schultz DW, Rosner B, et Klein ML. 2007. « Association of CFH Y402H and loc387715 A69S with progression of age-related macular degeneration ». *JAMA* 297 (16): 1793-1800.

Seddon JM, George S, Rosner B, et Rifai N. 2005. « Progression of age-related macular degeneration: Prospective assessment of c-reactive protein, interleukin 6, and other cardiovascular biomarkers ». *Archives of Ophthalmology* 123 (6): 774-82.

Senanayake, Preenie deS, Anthony Calabro, Jane G. Hu, Vera L. Bonilha, Aniq Darr, Dean Bok, et Joe G. Hollyfield. 2006. « Glucose utilization by the retinal pigment epithelium: Evidence for rapid uptake and storage in glycogen, followed by glycogen utilization ». *Experimental Eye Research* 83 (2): 235-46.

Sennlaub, Florian, Constance Auvynet, Bertrand Calippe, Sophie Lavalette, Lucie Poupel, Shulong J. Hu, Elisa Dominguez, et al. 2013. « CCR2+ monocytes infiltrate atrophic lesions in age - related macular disease and mediate photoreceptor degeneration in experimental subretinal inflammation in Cx3cr1 deficient mice ». *EMBO Molecular Medicine* 5 (11): 1775.

Seregard, Stefan, Peep V. Algvere, et Lennart Berglin. 1994. « Immunohistochemical characterization of surgically removed subfoveal fibrovascular membranes ». *Graefes Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology* 232 (6): 325-29.

Serhan, Charles N, et John Savill. 2005. « Resolution of inflammation: the beginning programs the end ». *Nature Immunology* 6 (novembre): 1191.

Serra, Rosa, Mahlon Johnson, Ellen H Filvaroff, James LaBorde, Daniel M Sheehan, Rik Derynck, et Harold L Moses. 1997. « Expression of a Truncated, Kinase-Defective TGF- β Type II Receptor in Mouse Skeletal Tissue Promotes Terminal Chondrocyte Differentiation and Osteoarthritis ». *The Journal of Cell Biology* 139 (2): 541-52.

Shahid, Humma, Jane C Khan, Valentina Cipriani, Tiina Sepp, Baljinder K Matharu, Catey Bunce, Simon P Harding, David G Clayton, Anthony T Moore, et John R W Yates. 2012. « Age-related macular degeneration: the importance of family history as a risk factor ». *British Journal of Ophthalmology* 96 (3): 427.

Shamsi, Farrukh A., et Mike Boulton. 2001. « Inhibition of RPE Lysosomal and Antioxidant Activity by the Age Pigment Lipofuscin ». *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 42 (12): 3041.

Short, Sarah M, Alexandrine Derrien, Radha P Narsimhan, Jack Lawler, Donald E Ingber, et Bruce R Zetter. 2005. « Inhibition of endothelial cell migration by thrombospondin-1 type-1 repeats is mediated by β (1) integrins ». *The Journal of Cell Biology* 168 (4): 643-53.

Silverstein, Roy L, et Maria Febbraio. 2009. « CD36, a Scavenger Receptor Involved in Immunity, Metabolism, Angiogenesis, and Behavior ». *Science signaling* 2 (72): re3-re3.

- Simantov, Ronit, et Roy Silverstein. 2003. *CD36: A critical anti-angiogenic receptor*. Vol. 8.
- Soehnlein, Oliver, et Lennart Lindbom. 2010. « Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation ». *Nature Reviews Immunology* 10 (juin): 427.
- Souchelnitskiy, S, E M Chambaz, et J J Feige. 1995. « Thrombospondins selectively activate one of the two latent forms of transforming growth factor-beta present in adrenocortical cell-conditioned medium ». *Endocrinology* 136 (11): 5118-26.
- Stamer, W. Daniel, Dean Bok, Jane Hu, Glenn J. Jaffe, et Brian S. McKay. 2003. « Aquaporin-1 Channels in Human Retinal Pigment Epithelium: Role in Transepithelial Water Movement ». *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 44 (6): 2803.
- Steele, F R, G J Chader, L V Johnson, et J Tombran-Tink. 1993. « Pigment epithelium-derived factor: neurotrophic activity and identification as a member of the serine protease inhibitor gene family. » *Proceedings of the National Academy of Sciences* 90 (4): 1526.
- Stefanidakis, Michael, Gail Newton, Winston Y Lee, Charles A Parkos, et Francis W Lusinskas. 2008. « Endothelial CD47 interaction with SIRP γ is required for human T-cell transendothelial migration under shear flow conditions in vitro ». *Blood* 112 (4): 1280-89.
- Sternfeld, M, J Robertson, G Shipley, J Tsai, et J.T Rosenbaum. 1989. « Cultured human retinal pigment epithelial cells express basic fibroblast growth factor and its receptor ». *Current Eye Research* 8 (10): 1029-37.
- Stockley, Robert A. 1995. « Role of inflammation in respiratory tract infections ». *The American Journal of Medicine* 99 (6): 8S-13S.
- Strauch, K L, et J Beckwith. 1988. « An Escherichia coli mutation preventing degradation of abnormal periplasmic proteins. » *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85 (5): 1576-80.
- Strauss, Olaf. 2005. « The Retinal Pigment Epithelium in Visual Function ». *Physiological Reviews* 85 (3): 845-81.
- Strauss-Ayali, Dalit, Sean M. Conrad, et David M. Mosser. 2007. « Monocyte subpopulations and their differentiation patterns during infection ». *Journal of Leukocyte Biology* 82 (2): 244-252.
- Streilein, J. Wayne. 2003. « Ocular immune privilege: therapeutic opportunities from an experiment of nature ». *Nature Reviews Immunology* 3 (novembre): 879.
- Streilein, J. Wayne, Naili Ma, Hartmut Wenkel, Tat Fong Ng, et Parisa Zamiri. 2002. « Immunobiology and privilege of neuronal retina and pigment epithelium transplants ». *Vision Research* 42 (4): 487-95.

Strunnikova, NV, A Maminishkis, JJ Barb, F Wang, C Zhi, Y Sergeev, W Chen, et al. 2010. « Transcriptome analysis and molecular signature of human retinal pigment epithelium ». *Human Molecular Genetics* 19 (12): 2468-86.

Suchard, Suzanne J., et Pamela J. Mansfield. 1996. « Neutrophil thrombospondin receptors are linked to GTP-binding proteins ». *Journal of Cellular Physiology* 168 (1): 217-227.

Swaroop, Anand, Kari EH Branham, Wei Chen, et Goncalo Abecasis. 2007. « Genetic susceptibility to age-related macular degeneration: a paradigm for dissecting complex disease traits ». *Human Molecular Genetics* 16 (R2): R174-82.

Swerlick, R A, K H Lee, T M Wick, et T J Lawley. 1992. « Human dermal microvascular endothelial but not human umbilical vein endothelial cells express CD36 in vivo and in vitro. » *The Journal of Immunology* 148 (1): 78.

Szekanecz, Zoltan, Aniko Vegvari, Zoltan Szabo, et Alisa E Koch. 2010. « Chemokines and chemokine receptors in arthritis ». *Frontiers in bioscience (Scholar edition)* 2 (janvier): 153-67.

Tanihara, H, M Yoshida, M Matsumoto, et N Yoshimura. 1993. « Identification of transforming growth factor-beta expressed in cultured human retinal pigment epithelial cells. » *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 34 (2): 413.

Tarling, John D., Hsiu-san Lin, et Shin Hsu. 1987. « Self-Renewal of Pulmonary Alveolar Macrophages: Evidence From Radiation Chimera Studies ». *Journal of Leukocyte Biology* 42 (5): 443-446.

Taubes, Gary. 2009. « Prosperity's Plague ». *Science* 325 (5938): 256-260.

Tennstaedt, Annette, Simon Pöpsel, Linda Truebestein, Patrick Hauske, Anke Brockmann, Nina Schmidt, Inga Irle, et al. 2012. « Human High Temperature Requirement Serine Protease A1 (HTRA1) Degrades Tau Protein Aggregates ». *The Journal of Biological Chemistry* 287 (25): 20931-41.

The AMD Gene Consortium. 2013. « Seven new loci associated with age-related macular degeneration ». *Nature Genetics* 45 (mars): 433.

Thieblemont, Nathalie, Laurence Weiss, Hoss M. Sadeghi, Claudia Estcourt, et Nicole Haeffner-Cavaillon. 1995. « CD14^{low}CD16^{high}: A cytokine-producing monocyte subset which expands during human immunodeficiency virus infection ». *European Journal of Immunology* 25 (12): 3418-3424.

Tiaden, André N., Maike Breiden, Ali Mirsaidi, Fabienne A. Weber, Gregor Bahrenberg, Stephan Glanz, Paolo Cinelli, Michael Ehrmann, et Peter J. Richards. 2012. « Human Serine Protease HTRA1 Positively Regulates Osteogenesis of Human Bone Marrow-derived Mesenchymal Stem Cells and Mineralization of Differentiating Bone-forming Cells Through the Modulation of Extracellular Matrix Protein ». *STEM CELLS* 30 (10):

2271–2282.

Ticchioni, M., V Raimondi, LAURENCE LAMY, JOHN WIJDENES, FREDERIK P. LINDBERG, ERIC J. BROWN, et ALAIN BERNARD. 2001. « Integrin-associated protein (CD47/IAP) contributes to T cell arrest on inflammatory vascular endothelium under flow ». *The FASEB Journal* 15 (2): 341-50.

Tomany, Sandra C., Jie Jin Wang, Redmer van Leeuwen, Ronald Klein, Paul Mitchell, Johannes R. Vingerling, Barbara E.K. Klein, Wayne Smith, et Paulus T.V.M. de Jong. 2004. « Risk factors for incident age-related macular degeneration ». *Ophthalmology* 111 (7): 1280-87.

Tong, Yu, Jing Liao, Yuan Zhang, Jing Zhou, Hengyu Zhang, et Meng Mao. 2010. « LOC387715/HTRA1 gene polymorphisms and susceptibility to age-related macular degeneration: A HuGE review and meta-analysis ». *Molecular Vision* 16: 1958-81.

Tosi, Gian Marco, Elena Caldi, Giovanni Neri, Elisabetta Nuti, Davide Marigliani, Stefano Baiocchi, Claudio Traversi, et al. 2017. « HTRA1 and TGF- β 1 Concentrations in the Aqueous Humor of Patients With Neovascular Age-Related Macular Degeneration ». *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 58 (1): 162-67.

Troeberg, Linda, et Hideaki Nagase. 2012. « Proteases involved in cartilage matrix degradation in osteoarthritis ». *Biochimica et biophysica acta* 1824 (1): 133-45.

Truebestein, Linda, Annette Tennstaedt, Timon Mönig, Tobias Krojer, Flavia Canellas, Markus Kaiser, Tim Clausen, et Michael Ehrmann. 2011. « Substrate-induced remodeling of the active site regulates human HTRA1 activity ». *Nature Structural & Molecular Biology* 18 (février): 386.

Tsuchiya, Akiho, Masato Yano, Jiraporn Tocharus, Hisae Kojima, Manabu Fukumoto, Masashi Kawaichi, et Chio Oka. 2005. « Expression of mouse HtrA1 serine protease in normal bone and cartilage and its upregulation in joint cartilage damaged by experimental arthritis ». *Bone* 37 (3): 323-36.

Tufail, Adnan, Praveen J Patel, Catherine Egan, Philip Hykin, Lyndon da Cruz, Zdenek Gregor, Jonathan Dowler, et al. 2010. « Bevacizumab for neovascular age related macular degeneration (ABC Trial): multicentre randomised double masked study ». *BMJ* 340 (juin).

Tuo, Jingsheng, Robert J Ross, George F Reed, Qing Yan, Jie Jin Wang, Christine M Bojanowski, Emily Y Chew, et al. 2008. « The HtrA1 promotor polymorphism, smoking, and age-related macular degeneration in multiple case-control samples ». *Ophthalmology* 115 (11): 1891-98.

Turunen, Mari, Saira Vepsäläinen, Petra Mäkinen, Seppo Helisalmi, Annakaisa Haapasalo, Hilikka Soininen, et Mikko Hiltunen. 2011. « No association between high temperature requirement 1 (HTRA1) gene polymorphisms and Alzheimer's disease ». *Neurobiology of*

Aging 32 (3): 547.e7-547.e9.

Udagawa, N, N Takahashi, T Akatsu, H Tanaka, T Sasaki, T Nishihara, T Koga, T J Martin, et 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. » *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87 (18): 7260-64.

Uno, K, I A Bhutto, D S McLeod, C Merges, et G A Luttly. 2006. « Impaired expression of thrombospondin - 1 in eyes with age related macular degeneration ». *The British Journal of Ophthalmology* 90 (1): 48-54.

Vierkotten, Sarah, Philipp S Muether, et Sascha Fauser. 2011. « Overexpression of HTRA1 Leads to Ultrastructural Changes in the Elastic Layer of Bruch's Membrane via Cleavage of Extracellular Matrix Components ». Édité par Alfred Lewin. *PLoS ONE* 6 (8): e22959.

Volpert, Olga V., Tetiana Zaichuk, Wei Zhou, Frank Reiher, Thomas A. Ferguson, P. Michael Stuart, Mohammad Amin, et Noel P. Bouck. 2002. « Inducer-stimulated Fas targets activated endothelium for destruction by anti-angiogenic thrombospondin-1 and pigment epithelium-derived factor ». *Nature Medicine* 8 (avril): 349.

Vos, H L, S Devarayalu, Y de Vries, et P Bornstein. 1992. « Thrombospondin 3 (Thbs3), a new member of the thrombospondin gene family. » *Journal of Biological Chemistry* 267 (17): 12192-96.

Vries, Helga E. de, Jerome J. A. Hendriks, Henk Honing, Chantal Renardel de Lavalette, Susanne M. A. van der Pol, Erik Hooijberg, Christine D. Dijkstra, et Timo K. van den Berg. 2002. « Signal-Regulatory Protein α -CD47 Interactions Are Required for the Transmigration of Monocytes Across Cerebral Endothelium ». *The Journal of Immunology* 168 (11): 5832.

Wang, Gaofeng. 2014. « Chromosome 10q26 locus and age-related macular degeneration: A progress update ». *Experimental Eye Research* 119: 1-7.

Wang J, Foran S, Smith W, et Mitchell P. 2003. « Risk of age-related macular degeneration in eyes with macular drusen or hyperpigmentation: The blue mountains eye study cohort ». *Archives of Ophthalmology* 121 (5): 658-63.

Wang, Minhua, Xu Wang, Lian Zhao, Wenxin Ma, Ignacio R Rodriguez, Robert N Fariss, et Wai T Wong. 2014. « Macrogliia-Microglia Interactions via TSPO Signaling Regulates Microglial Activation in the Mouse Retina ». *The Journal of Neuroscience* 34 (10): 3793-3806.

Wang, Shoujian, Christine M Sorenson, et Nader Sheibani. 2012. « Lack of Thrombospondin-1 and Exacerbation of Choroidal Neovascularization ». *Archives of Ophthalmology* 130 (5): 615-20.

- Wang, Xu, Lian Zhao, Jun Zhang, Robert N. Fariss, Wenxin Ma, Friedrich Kretschmer, Minhua Wang, et al. 2016. « Requirement for Microglia for the Maintenance of Synaptic Function and Integrity in the Mature Retina ». *The Journal of Neuroscience* 36 (9): 2827.
- Wang, Xue-Qing, et William A Frazier. 1998. « The Thrombospondin Receptor CD47 (IAP) Modulates and Associates with $\alpha 2 \beta 1$ Integrin in Vascular Smooth Muscle Cells ». Édité par Richard Hynes. *Molecular Biology of the Cell* 9 (4): 865-74.
- Wang, Xue-Qing, Frederik P Lindberg, et William A Frazier. 1999. « Integrin-Associated Protein Stimulates $\alpha 2 \beta 1$ -Dependent Chemotaxis via GI-Mediated Inhibition of Adenylate Cyclase and Extracellular-Regulated Kinases ». *The Journal of Cell Biology* 147 (2): 389-400.
- Weber, Christian, Kai-Uwe Belge, Philipp von Hundelshausen, Georg Draude, Birgit Steppich, Mathias Mack, Marion Frankenberger, Kim S. C. Weber, et H. W Löms Ziegler-Heitbrock. 2000. « Differential chemokine receptor expression and function in human monocyte subpopulations ». *Journal of Leukocyte Biology* 67 (5): 699–704.
- Wenkel, Hartmut, et J. Wayne Streilein. 2000. « Evidence that Retinal Pigment Epithelium Functions as an Immune-Privileged Tissue ». *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 41 (11): 3467.
- Wight, TN, GJ Raugi, S M Mumby, et P Bornstein. 1985. « Light microscopic immunolocation of thrombospondin in human tissues. » *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 33 (4): 295-302.
- Witmer, A. N., G. F. J. M. Vrensen, C. J. F. Van Noorden, et R. O. Schlingemann. 2003. « Vascular endothelial growth factors and angiogenesis in eye disease ». *Progress in Retinal and Eye Research* 22 (1): 1-29.
- Wong. 1997. « Organization and differential expression of the human monocyte chemoattractant protein 1 receptor gene ». *J Biol Chem.*, 1997, 272 édition.
- Wong, Kok Loon, June Jing-Yi Tai, Wing-Cheong Wong, Hao Han, Xiaohui Sem, Wei-Hseun Yeap, Philippe Kourilsky, et Siew-Cheng Wong. 2011. « Gene expression profiling reveals the defining features of the classical, intermediate, and nonclassical human monocyte subsets ». *Blood* 118 (5): e16.
- Wong, Wan Ling, Xinyi Su, Xiang Li, Chui Ming G Cheung, Ronald Klein, Ching-Yu Cheng, et Tien Yin Wong. 2014. « Global prevalence of age-related macular degeneration and disease burden projection for 2020 and 2040: a systematic review and meta-analysis ». *The Lancet Global Health* 2 (2): e106-16.
- Wynn, T. A, A Chawla, et Jeffrey W. Pollard. 2013. « Macrophage biology in development, homeostasis and disease ». *Nature* 496 (avril): 445.
- Yanagawa, Sohei, Nobuo Ito, Kunimasa Arima, et Shu-ichi Ikeda. 2002. « Cerebral autosomal recessive arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy ».

Neurology 58 (5): 817.

Yang, Zhenglin, Nicola J. Camp, Hui Sun, Zongzhong Tong, Daniel Gibbs, D. Joshua Cameron, Haoyu Chen, et al. 2006. « A Variant of the HTRA1 Gene Increases Susceptibility to Age-Related Macular Degeneration ». *Science* 314 (5801): 992.

Yang, Zhenglin, Zongzhong Tong, Yuhong Chen, Jiexi Zeng, Fang Lu, Xufang Sun, Chao Zhao, et al. 2010. « Genetic and Functional Dissection of HTRA1 and LOC387715 in Age-Related Macular Degeneration ». Édité par Gregory S Barsh. *PLoS Genetics* 6 (2): e1000836.

Yannuzzi, L. A, S Negrao, T Iida, C Carvalho, H Rodriguez-Coleman, JASON SLAKTER, K. BAILEY FREUND, JOHN SORENSON, DENNIS ORLOCK, et NATALIE BORODOKER. 2001. « Retinal angiomatous age-related macular degeneration ». *RETINA* 21 (5).

Yin, Dazhong. 1996. « Biochemical basis of lipofuscin, ceroid, and age pigment-like fluorophores ». *Free Radical Biology and Medicine* 21 (6): 871-88.

Yoshida, Hitoshi, Yoshiaki Tomiyama, Jun Ishikawa, Kenji Oritani, Itaru Matsumura, Masamichi Shiraga, Takafumi Yokota, et al. 2000. « Integrin-associated protein/CD47 regulates motile activity in human B-cell lines through CDC42 ». *Blood* 96 (1): 234.

Young, Geoffrey D., et Joanne E. Murphy-Ullrich. 2004. « Molecular Interactions That Confer Latency to Transforming Growth Factor- β ». *Journal of Biological Chemistry* 279 (36): 38032-39.

Young, Richard W. 1967. « The renewal of photoreceptor cell outer segments ». *The Journal of Cell Biology* 33 (1): 61.

Yu, Yi, Robyn Reynolds, Bernard Rosner, Mark J. Daly, et Johanna M. Seddon. 2012. « Prospective Assessment of Genetic Effects on Progression to Different Stages of Age-Related Macular Degeneration Using Multistate Markov Models ». *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 53 (3): 1548.

Zhang, Li, Siok Lam Lim, Hongjun Du, Ming Zhang, Igor Kozak, Gregory Hannum, Xiaolei Wang, et al. 2012. « High Temperature Requirement Factor A1 (HTRA1) Gene Regulates Angiogenesis through Transforming Growth Factor- β Family Member Growth Differentiation Factor 6 ». *The Journal of Biological Chemistry* 287 (2): 1520-26.

Zhang, Xuefeng, et Jack Lawler. 2007. « Thrombospondin-based Antiangiogenic Therapy ». *Microvascular research* 74 (2-3): 90-99.

Ziche, M, L Morbidelli, E Masini, S Amerini, H J Granger, C A Maggi, P Geppetti, et F Ledda. 1994. « Nitric oxide mediates angiogenesis in vivo and endothelial cell growth and migration in vitro promoted by substance P. » *Journal of Clinical Investigation* 94 (5): 2036-44.

Zieger, Marina, Peter K Ahnelt, et Pavel Uhrin. 2014. « CX3CL1 (Fractalkine) Protein

Expression in Normal and Degenerating Mouse Retina: In Vivo Studies ». Édité par Alexandre Hiroaki Kihara. *PLoS ONE* 9 (9): e106562.

Ziegler-Heitbrock, L. 2007. « The CD14⁺ CD16⁺ blood monocytes: their role in infection and inflammation ». *Journal of Leukocyte Biology* 81 (3): 584–592.

Ziegler-Heitbrock, L, Petronela Ancuta, Suzanne Crowe, Marc Dalod, Veronika Grau, Derek N. Hart, Pieter J. M. Leenen, et al. 2010. « Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood ». *Blood* 116 (16): e74.

Zimmerman, William F. 1974. « The distribution and proportions of vitamin A compounds during the visual cycle in the rat ». *Vision Research* 14 (9): 795-802.

Zumbrunn, Jürg, et Beat Trueb. 1996. « Primary structure of a putative serine protease specific for IGF-binding proteins ». *FEBS Letters* 398 (2-3): 187–192.

Zurawa-Janicka, Dorota, Jaroslaw Kobiela, Tomasz Stefaniak, Agnieszka Wozniak, Joanna Narkiewicz, Michał Wozniak, Janusz Limon, et Barbara Lipinska. 2008. *Changes in expression of serine proteases HtrA1 and HtrA2 during estrogen-induced oxidative stress and nephrocarcinogenesis in male Syrian hamster*. Vol. 55.

ARTICLES SUPPLEMENTAIRES

Complement Factor H Inhibits CD47-Mediated Resolution of Inflammation

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

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

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

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

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

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

⁶LFB Biotechnologies, 59000 Lille, France

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

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

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

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

¹¹Co-first author

¹²Lead Contact

*Correspondence: florian.sennlaub@inserm.fr

SUMMARY

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

INTRODUCTION

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

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

CFH is strongly secreted by mononuclear phagocytes (MP), such as microglial cells (MC) and macrophages (M ϕ) (Gautier et al., 2012; Luo et al., 2011; Schlaf et al., 2001), adding to the exudated plasma CFH and CFH produced by certain stromal cells such as the retinal pigment epithelium (RPE) in the eye (Anderson et al., 2010).

A genetic variant that results in the substitution of histidine 402 for tyrosine (Y402H) in the SCR7 domain of CFH is associated with the highest risk of AMD (Fritsche et al., 2014), as well as with other conditions such as smoking-associated lung cancer (Zhang et al., 2012) and increased mortality after cerebral hemorrhage (Appelboom et al., 2011). This genetic variant is associated with both early and advanced forms of AMD (Fritsche et al., 2014), suggesting that CFH(H402) may drive disease onset.

Early and advanced forms of AMD are associated with chronic accumulation of MPs in the subretinal space located between the RPE and photoreceptor outer segments (Combadière et al., 2007; Gupta et al., 2003; Lad et al., 2015; Levy et al., 2015a; Sennlaub et al., 2013). Functional studies in animal models suggest that subretinal MP accumulation plays a critical role in neovascularization and photoreceptor degeneration that characterizes late AMD (Cruz-Guilloty et al., 2013; Sennlaub et al., 2013; Tsutsumi et al., 2003). Similarly, non-resolving, low-grade inflammation and MP persistence contributes significantly to the pathogenesis of many chronic, age-related diseases such as metabolic diseases (obesity, atherosclerosis), neurodegenerative diseases, and cancers (Nathan and Ding, 2010). In these settings, MP persistence is not considered causal, but rather is associated with considerable collateral damage to host cells, which fuels further inflammation (Nathan and Ding, 2010).

Here, we examined the contribution of CFH to the etiology of AMD. We found a noncanonical role for CFH in the regulation of MP accumulation in chronic inflammation and in the resolution of acute inflammation. Our findings shed light on the mechanisms by which CFH(H402) drives sub-retinal inflammation and further suggest that the role for CFH in resolution of inflammation may be relevant in various settings.

RESULTS

CFH Deficiency Prevents Chronic Pathogenic Subretinal Inflammation

Physiologically, the subretinal space is devoid of immune cells, including resident MCs (Combadière et al., 2007; Levy et al., 2015a), due to the potent immunosuppressive proapoptotic factors produced by the RPE that eliminate infiltrating leukocytes (Griffith et al., 1995; Levy et al., 2015a). We have previously shown that high levels of Apolipoprotein E, as observed in subretinal MPs of AMD patients, *Cx3cr1*-deficient mice, and humanized transgenic mice expressing the AMD-risk APOE2 isoform (*TRE2*-mice), induce chronic, age-related, and pathogenic subretinal MP accumulation (Levy et al., 2015a, 2015b; Sennlaub et al., 2013). Indeed, *Cx3cr1*^{GFP/GFP} and *TRE2* mice model the age-dependent subretinal MP accumulation and associated photoreceptor degeneration observed in human AMD (Combadière et al., 2007; Levy et al., 2015b; Sennlaub et al., 2013). We therefore sought to determine whether *Cfh* deficiency would

alter disease onset and progression in *Cx3cr1*^{GFP/GFP} and *TRE2* mice. Quantification of subretinal IBA-1⁺ MPs on retinal and RPE flatmounts of 2- to 3-month- and 12-month-old animals showed that the age-related increase in subretinal MPs observed in both models was nearly completely blunted in the absence of CFH (Figures 1A and 1B). Micrographs revealed that *Cx3cr1*^{GFP/GFP} *Cfh*^{-/-} mice were protected against the thinning of the outer nuclear layer, which hosts photoreceptor nuclei, usually observed in *Cx3cr1*^{GFP/GFP} mice (Sennlaub et al., 2013) (Figure 1C). Photoreceptor nuclei row counts (Figure 1D) and calculation of the area under the curve showed *Cfh* deficiency protected against the photoreceptor cell loss observed in *Cx3cr1*^{GFP/GFP} mice (Figure 1E) and *TRE2* mice (Levy et al., 2015b) (Figure 1F), while no difference was observed in *Cfh*^{-/-} compared to control mice. Similarly, *Cfh* deficiency completely protected against cone loss observed on peanut agglutinin-, cone arrestin-double-stained labeled retinal flatmounts from 12-month-old *Cx3cr1*^{GFP/GFP} mice and *TRE2*-mice (Figures 1G–1J). CFH did not alter the secretion of key pathogenic cytokines by MPs in vitro (Figure S1), confirming that the numerical decrease of MPs, rather than an altered ability to produce inflammatory mediators, protected *Cfh* deficient animals against the degeneration. Thus, we showed that CFH was required for the chronic, age-related, subretinal MP accumulation and associated photoreceptor degeneration observed in both mouse models of AMD. A similar age- and CFH-dependent increase in MPs was also described in the choroid of *Cfh*^{+/-} compared to *Cfh*^{-/-} mice (Toomey et al., 2015). In humans, ocular CFH immunoreactivity is invariably stronger in AMD donor tissues (Hageman et al., 2005; Johnson et al., 2006; Weismann et al., 2011) and CFH autoantibodies are protective in AMD (Dhillon et al., 2010). Together with these observations, our results strongly suggest that CFH critically controls subretinal MP accumulation in AMD.

CFH Inhibits the Resolution of Acute Subretinal Inflammation

Next, to better understand how CFH controls subretinal inflammation, we evaluated its impact on acute light-induced stress. The intensity of the light-challenge model used herein was calibrated to induce substantial subretinal MP infiltration in AMD-prone *Cx3cr1*^{GFP/GFP} and *TRE2* mice, but not in controls (Levy et al., 2015b; Sennlaub et al., 2013). Quantification of subretinal IBA-1⁺ MPs revealed similar early subretinal MP accumulation in *TRE2* *Cfh*^{-/-} (Figure 2A) and *Cx3cr1*^{GFP/GFP} *Cfh*^{-/-} mice (Figure 2B) and their respective controls at the end of the 4-day light challenge. However, after an additional 10 days under normal light conditions to allow for MP clearance and inflammation resolution (Hu et al., 2015), subretinal MPs were eliminated significantly faster in *TRE2* *Cfh*^{-/-} and *Cx3cr1*^{GFP/GFP} *Cfh*^{-/-} mice compared to controls (Figures 2A and 2B). Thus, our data suggest that CFH controlled MP persistence at the inflammatory site rather than their initial accumulation.

Similar to *Cfh*^{-/-} mice (Pickering et al., 2002), *Cx3cr1*^{GFP/GFP} *Cfh*^{-/-} and *TRE2* *Cfh*^{-/-} mice have low circulating levels of complement factor C3 (Figure S2), likely due to uninhibited plasma complement activation and exhaustion. To test whether the systemic lack of C3 would accelerate the elimination of subretinal MPs as observed in *Cx3cr1*^{GFP/GFP} *Cfh*^{-/-} mice, we replaced

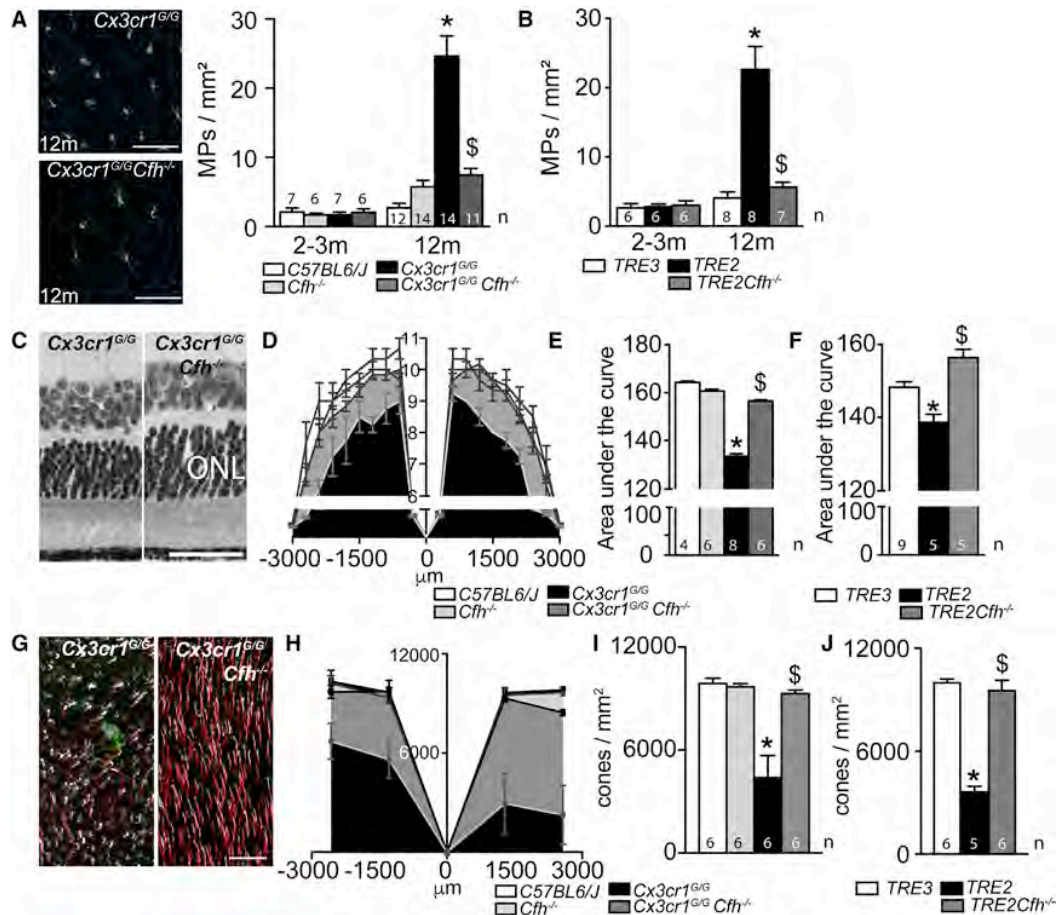


Figure 1. CFH Deficiency Prevents Chronic Pathogenic Subretinal Inflammation

(A and B) (A) Representative images of 12-month-old IBA-1 (green)-stained RPE flatmounts of *Cx3cr1*^{GFP/GFP} and *Cx3cr1*^{GFP/GFP} *Cfh*^{-/-} mice and (A and B) quantification of subretinal IBA-1⁺ MPs in 2- to 3-month- and 12-month-old mice of the indicated strains (A: one-way Anova/Bonferroni test **p* < 0.0001 versus all other groups, Mann-Whitney [§]*p* < 0.0001 versus *Cx3cr1*^{GFP/GFP} at 12 months of age; B: one-way Anova/Bonferroni test **p* < 0.0001 versus all other groups, Mann-Whitney [§]*p* = 0.0003 versus *TRE2* at 12 months of age).

(C–F) (C) Micrographs, taken 1,000 μm from the optic nerve, of 12-month-old *Cx3cr1*^{GFP/GFP} and *Cx3cr1*^{GFP/GFP} *Cfh*^{-/-} mice. (D) Photoreceptor nuclei rows at increasing distances (–3,000 μm: inferior pole, +3,000 μm: superior pole) from the optic nerve (0 μm) in 12-month-old mice. (E and F) Quantification of the area under the curve of photoreceptor nuclei row counts of 12-month-old mice of the indicated transgenic mouse strains (E: one-way Anova/Bonferroni test: **p* < 0.0001 versus all other groups; Mann-Whitney [§]*p* = 0.0024 versus *Cx3cr1*^{GFP/GFP} mice; F: one-way Anova/Bonferroni test: **p* < 0.001 versus all other groups; Mann-Whitney [§]*p* = 0.0158 versus *TRE2* mice).

(G–J) (G) Micrographs, taken in the superior periphery of peanut agglutinin (staining cone segments, red), cone arrestin (white), IBA-1 (green) triple-stained 12-month-old *Cx3cr1*^{GFP/GFP} and *Cx3cr1*^{GFP/GFP} *Cfh*^{-/-} mice. (H) Cone density quantifications on retinal flatmounts in peripheral and central, inferior, and superior retina (–3,000 μm: inferior pole, +3,000 μm: superior pole, optic nerve: 0 μm) and their average (I and J) in 12-month-old mice of the indicated transgenic mouse strains (I: one-way Anova/Bonferroni test: **p* < 0.0001 versus all other groups; Mann-Whitney [§]*p* = 0.0024 versus *Cx3cr1*^{GFP/GFP} mice; J: one-way Anova/Bonferroni test: **p* < 0.0001 versus all other groups; Mann-Whitney [§]*p* = 0.0158 versus *TRE2* mice).

TRE2 and *TRE3*: targeted replacement mice expressing human APOE 2 and 3 isoforms. ONL: outer nuclear layer; Scale bar A and C, 50 μm.

n, number of replicates indicated in the graphs; replicates represent quantifications of eyes from different mice of at least three different cages. All values are reported as mean ± SEM.

hepatic CFH using hydrodynamic injection of a plasmid encoding *Cfh* under the albumin promoter. Liver *Cfh* complementation restored circulating C3 concentrations in *Cx3cr1*^{GFP/GFP} *Cfh*^{-/-} mice to 40%–60% of the *Cx3cr1*^{GFP/GFP} levels over the 14 days of the experimental protocol (Figure 2C). However, the significant increase in circulating C3 levels did not affect the number of subretinal MPs in *Cx3cr1*^{GFP/GFP} *Cfh*^{-/-} mice at day 14 (Figure 2D).

The comparable subretinal MP counts at the beginning of acute inflammation (day 4) (Figures 2A and 2B) and the lack of influence of circulating C3 levels during the resolution phase (Figure 2D) suggested that systemic C3 was not involved in MP recruitment or their elimination. We next assessed relative *Cfh* mRNA levels in retinal and RPE and choroid tissue homogenates, bone marrow (BM-Mos), and circulating (Mos) monocytes, as well as MCs isolated from the brain and retina. Our

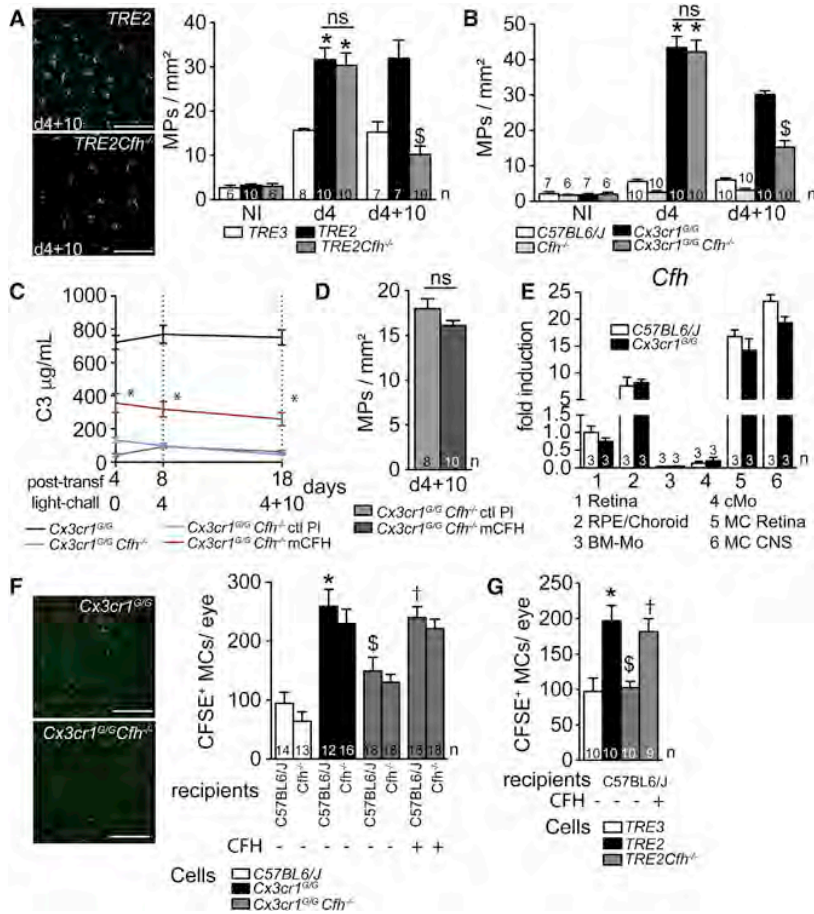


Figure 2. CFH Inhibits the Resolution of Acute Subretinal Inflammation

(A and B) (A) Representative images of IBA-1 (green)-stained RPE flatmounts of light-challenged *TRE2* and *TRE2 Cfh^{-/-}* mice and (A and B) quantification of subretinal IBA-1⁺ MPs in non-illuminated (NI), 4 days light challenged (d4), and 4 days light challenged followed by 10 days of recovery (d4 + 10) of 2- to 3-month-old mice of the indicated strains. (A: one-way Anova/Bonferroni test **p* < 0.0001 versus the NI groups and *TRE3* mice at d4, [§]*p* < 0.0001 versus *TRE2* d4 + 10; Mann-Whitney [§]*p* = 0.0004 versus *TRE2* at d4 + 10; B: one-way Anova/Bonferroni test **p* < 0.0001 versus the NI groups and C57BL6/J mice at d4, [§]*p* < 0.0001 versus *Cx3cr1^{GFP/GFP}* at d4 + 10; Mann-Whitney [§]*p* = 0.0002 versus *Cx3cr1^{GFP/GFP}* at d4 + 10).

(C) Quantification by ELISA of circulating plasma C3 in control animals and after hypervolemic liver transfection with a control plasmid (ctl PI) or a plasmid encoding murine CFH (mCFH) in 2- to 3-month-old *Cx3cr1^{GFP/GFP}* and *Cx3cr1^{GFP/GFP} Cfh^{-/-}* mice. Measurements were performed before (d0), at the end (d4), and 10 days after (d14) the light challenge. (one-way Anova/Bonferroni test at d0 **p* = 0.0003, d4 **p* = 0.0018, d4 + 10 **p* = 0.0009 compared to control plasmid injected mice at each time point).

(D) Quantification of subretinal IBA-1⁺ MPs/mm² in light-challenge model at day 14 in 2- to 3-month-old *Cx3cr1^{GFP/GFP}* and *Cx3cr1^{GFP/GFP} Cfh^{-/-}* mice after hypervolemic liver transfection of the empty plasmid or the plasmid encoding murine CFH. (Mann-Whitney = 0.1).

(E) Quantitative RT-PCR of *Cfh* mRNA normalized to *Rps26* mRNA expression in retina, choroid/RPE, circulating monocytes (cMo), bone marrow monocytes (BM-Mo), retinal microglia (MC Retina), and brain microglia from the indicated strains (n = replicates from individual mice except for retinal MCs which represent three preparations from five pooled mice each).

(F) Representative micrograph of CFSE⁺ MCs on RPE flatmounts of the indicated strains 24 hr after subretinal adoptive transfer to *Cfh^{-/-}* mice. Quantification of CFSE⁺ MCs of the indicated strains 24 hr after adoptive transfer to WT C57BL6/J or *Cfh^{-/-}* mice, with or without purified human CFH (one-way Anova/Bonferroni test **p* < 0.001 versus C57BL6/J CFSE⁺ MCs in C57BL6/J recipients, [§]*p* = 0.0043 versus *Cx3cr1^{GFP/GFP}* CFSE⁺ MCs in C57BL6/J recipients, [†]*p* = 0.0139 versus *Cx3cr1^{GFP/GFP} Cfh^{-/-}* CFSE⁺ MCs in C57BL6/J recipients; there were no significant differences between groups injected in WT C57BL6/J or *Cfh^{-/-}* recipients for each cell genotype).

(G) Quantification of subretinal CFSE⁺ MCs of the indicated strains 24 hr after adoptive transfer to C57BL6/J WT mice, with or without purified human CFH (one-way Anova/Bonferroni test, **p* = 0.0009 versus C57BL6/J CFSE⁺ MCs, [§]*p* = 0.0012 versus *TRE2* CFSE⁺ MCs, [†]*p* = 0.0085 versus *TRE2 Cfh^{-/-}* CFSE⁺ MCs). n = number of replicates presented in the graphs; for A, B, and D, n = replicates represent quantifications of eyes from different mice of at least three different cages; for F and G, n = replicates from individual mice from three experiments with three different cell preparations. *TRE2* and *TRE3*: targeted replacement mice expressing human APOE 2 and 3 isoforms; post-transf.: post-transfection; light-chall: light-challenge; ctlPL: control plasmid; mCFH: murine CFH plasmid; Scale bar A and F = 50 µm. All values are reported as mean ± SEM.

data showed that RPE and choroid and MCs expressed the highest levels of *Cfh* mRNA in wild-type (WT) and *Cx3cr1^{GFP/GFP}* mice (Figure 2E), in accordance with CFH protein localization around subretinal MPs in vivo (Figure S2). To evaluate whether MC- or RPE-derived CFH would impact subretinal MP elimination, we adoptively transferred CFSE-labeled MCs from different mouse strains into the subretinal space of either WT or *Cfh^{-/-}* mice. The surviving CFSE⁺ MCs were then enumerated 24 hr after injection. We previously showed that subretinally injected WT Mos, MCs, or Mφs quickly undergo apoptosis and are eliminated (Levy et al., 2015a), and that such clearance is significantly delayed when MPs lack CX3CR1 (Levy et al., 2015a). We found that *Cx3cr1^{GFP/GFP}* MCs lacking *Cfh* were eliminated faster

than controls (Figure 2F). This difference could be reversed by human CFH (Figure 2F). Experiments using BM-Mos revealed comparable results (Figure S3). Interestingly, recipient-derived CFH only had a very minor impact on MC elimination (Figure 2F), suggesting that MP-derived CFH is more important. Similarly, *TRE2 Cfh^{-/-}* MCs injected in WT recipients were eliminated faster than controls, and adding CFH protein again reversed the effect (Figure 2G).

In summary, our data showed that CFH did not influence initial MP recruitment but inhibited MP elimination during inflammation resolution. They also demonstrated that RPE- and liver-derived CFH had little influence on this phenotype. Indeed, MP-derived CFH was sufficient to inhibit MP clearance. Similar to our

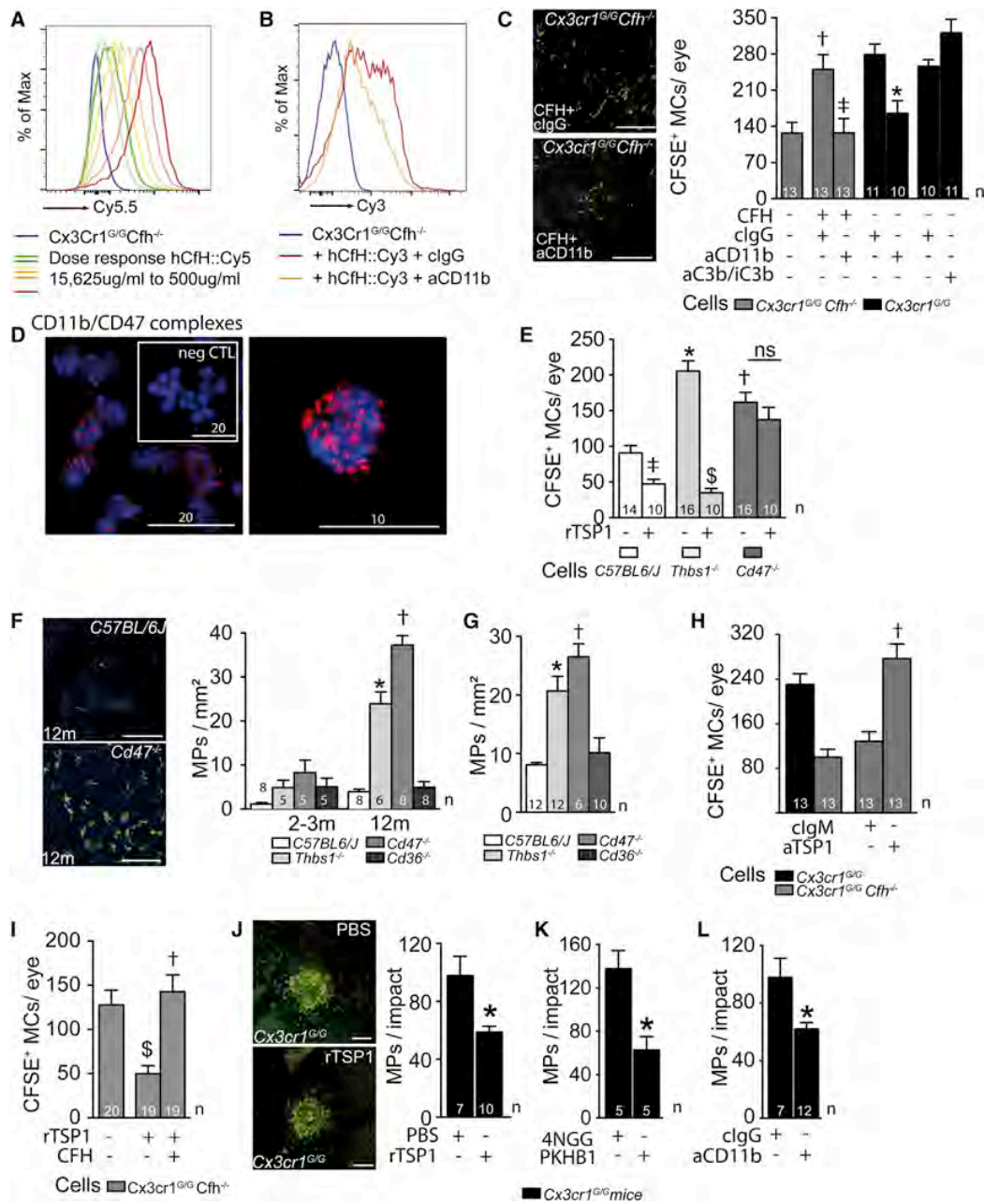


Figure 3. CFH Binding to CD11b Inhibits MP Elimination Mediated by TSP-1 Activation of CD47

(A and B) Representative cytometry plots of (A) sorted brain *Cx3cr1^{GFP/GFP} Cfh^{-/-}* microglial cells (gated on GFP^{high}) incubated with increasing dose of hCFH::Cy5.5 (15,625 μg/mL to 500 μg/mL) and (B) sorted *Cx3cr1^{GFP/GFP} Cfh^{-/-}* bone marrow monocytes pre-incubated with an isotype IgG or anti-CD11b IgG (5C6 clone) before hCFH::Cy3 or PBS incubation. Bone marrow monocytes were gated as GFP⁺ CD115⁺ Ly-6G⁻ cells (the experiments were repeated three times with similar results).

(C) Representative micrograph of subretinal *Cx3cr1^{GFP/GFP} Cfh^{-/-}* CFSE⁺ MCs on RPE flatmounts 24 hr after subretinal adoptive transfer injection together with CFH and control IgG or anti-CD11b IgG (clone 5C6) and *Cx3cr1^{GFP/GFP}* CFSE⁺ MCs with control IgG, anti-CD11b IgG (clone 5C6), or anti-C3b/iC3b/C3c IgG (clone 3/26) to WT C57BL/6/J mice and quantification of the indicated groups (Anova/Bonferroni test, † p = 0.0034 versus *Cx3cr1^{GFP/GFP} Cfh^{-/-}* CFSE⁺ MCs without CFH, * p = 0.0036 versus *Cx3cr1^{GFP/GFP} Cfh^{-/-}* + CFH + clgG, Mann-Whitney * p = 0.0083 versus clgG).

(D) Representative confocal micrographs of CD11b-CD47 complexes (red dots) detected by proximity ligation assay on freshly isolated brain *Cx3cr1^{GFP/GFP} Cfh^{-/-}* MCs counterstained with Hoechst nuclear stain (blue; negative control: omitting the primary antibodies; the experiment was repeated three times with similar results).

(legend continued on next page)

experiments, the observation that recipient, but not liver *Cfh* genotype, confers the AMD-risk in liver transplant patients (Khandhadia et al., 2013) suggests that plasma CFH is not involved in AMD pathogenesis and points to the importance of MP-derived CFH in the disease.

CFH Binding to CD11b Inhibits MP Elimination Mediated by TSP-1 Activation of CD47

CFH can act as a cofactor of complement factor I (CFI) to cleave C3b into iC3b, which reduces C3 convertase formation, formed by C3b and activated complement factor B (CFB) and opsonizes (iC3b) apoptotic bodies (Martin and Blom, 2016). However, we did not detect C3 or activated C3 fragments in subretinal MPs of *Cx3cr1^{GFP/GFP}* or *Cx3cr1^{GFP/GFP} Cfh^{-/-}* mice (Figure S3), and BM-Mos and MCs only expressed low and very low levels of C3 mRNA and no detectable levels of *Cfi* mRNA in both cell types (Figure S4). Together, these observations made a significant implication of locally produced C3, C3b, or iC3b in CFH-mediated inhibition of MP elimination unlikely.

CFH also binds directly to the integrin CD11b (DiScipio et al., 1998; Kang et al., 2012; Losse et al., 2010) that was strongly expressed by MPs with no detectable differences in our mouse strains (Figure S5). Flow cytometry analysis showed fluorescently labeled CFH bound dose-dependently to MCs (Figure 3A) and BM-Mos isolated from *Cx3cr1^{GFP/GFP} Cfh^{-/-}* mice (Figure 3B). Pre-incubation with an anti-CD11b antibody inhibited CFH binding (Figure 3B), as previously demonstrated for neutrophils (DiScipio et al., 1998). As shown above (Figure 2F), adding CFH to *Cx3cr1^{GFP/GFP} Cfh^{-/-}* MCs transferred subretinally in WT recipients delayed their elimination. This effect was no longer observed when transferred MPs were treated with the anti-CD11b antibody (Figure 3C). The antibody also significantly accelerated the elimination of CFH-competent *Cx3cr1^{GFP/GFP}* MCs. By contrast, an anti-C3b/iC3b/C3c antibody that inhibits complement-induced hemolysis (clone 3/26 (Mastellos et al., 2004) had no effect (Figure 3C). These results revealed that CFH binding to the CD11b integrin was necessary to inhibit MC elimination and suggested a C3-independent, non-canonical role of CFH in this mechanism.

CD11b co-localizes with the integrin-associated protein (IAP, CD47) in lipid rafts (Pfeiffer et al., 2001), a thrombospondin 1

(THBS1, TSP-1) receptor known to potentiate FasL-induced endothelial cell and T cell death (Manna et al., 2005; Quesada et al., 2005). We therefore investigated whether CFH binding to CD11b could limit CD47 activation and impair MP elimination in *Cx3cr1^{GFP/GFP}* and *TRE2* mice. First, we found the expression level of TSP-1 and CD47, as well as the plasma TSP-1 levels, were similar in our different mouse strains (Figure S5). Next, proximity ligation assay revealed numerous complexes formed by CD11b and CD47 on *Cx3cr1^{GFP/GFP} Cfh^{-/-}* MCs (Figure 3D). We next analyzed the role of CD47 in subretinal MC clearance in adoptive transfer experiments. Subretinally injected CFSE-labeled MCs from WT, *Thbs1^{-/-}*, or *Cd47^{-/-}* donors into WT recipients revealed that MCs lacking *Thbs1* or *Cd47* had slower elimination rates than WT MCs (Figure 3E). Co-injected recombinant TSP-1 accelerated the elimination of WT MCs and reversed the phenotype of *Thbs1*-deficient MCs, but had no effect on MCs lacking *Cd47* (Figure 3E), suggesting the interaction of TSP1 with CD47-mediated MC elimination. Moreover, analysis of *Thbs1^{-/-}* and *Cd47^{-/-}* mice revealed a significant age-related (Figure 3F) and light-induced (Figure 3G) increase in subretinal MPs in these strains as compared to controls, but not in mice lacking *Cd36*, an alternative TSP-1 receptor. Overall, our results pointed to TSP-1 activation of CD47 as central in the maintenance of subretinal immunosuppression. Our results also likely explained the previously reported increased and prolonged subretinal inflammation observed in *Thbs1^{-/-}* mice (Chen et al., 2012; Ng et al., 2009; Wang et al., 2012). Interestingly, binding of TSP-1 to CD36 that mediates endothelial cell apoptosis and is necessary for latent TGF- β activation (Febbraio et al., 2001) had no significant influence on subretinal MP accumulation, as observed here in *Cd36^{-/-}* mice.

Taking into account the opposing effects of TSP1 and CFH, we next evaluated their interaction in MP elimination. Using our adoptive transfer assay, we found that a TSP-1 blocking antibody reversed the accelerated elimination of *Cx3cr1^{GFP/GFP} Cfh^{-/-}* MCs compared to controls (Figure 3H). Furthermore, the faster elimination rate observed after supplementation of recombinant TSP-1 to *Cx3cr1^{GFP/GFP} Cfh^{-/-}* MCs was completely lost when purified CFH was concomitantly added (Figure 3I).

Next, we used the laser-injury model to test whether CFH binding to CD11b or CD47 activation can accelerate

(E) Quantification of subretinal CFSE⁺ MCs of the indicated strains 24 hr after adoptive transfer to WT C57BL6/J mice with and without recombinant TSP-1 (n = replicates from individual mice from experiments with three different cell preparations; one-way Anova/Bonferroni test [‡]p = 0.0359 versus C57BL6/J CFSE⁺ MCs without TSP-1; *p < 0.0001 versus C57BL6/J CFSE⁺ MCs without TSP-1; [§]p < 0.0001 versus *Tsp1^{-/-}* CFSE⁺ MCs without TSP-1; [†]p = 0.0002 versus C57BL6/J CFSE⁺ MCs without TSP-1).

(F and G) Representative images of 12-month-old IBA-1 (green)-stained RPE flatmounts of C57BL6/J and *Cd47^{-/-}* mice and quantification of subretinal IBA-1⁺ MPs of WT C57BL6/J, *Thbs1^{-/-}*, *Cd47^{-/-}* mice, and *Cd36^{-/-}* mice at (F) 2 to 3 months and 12 months and (G) after a 4-day light challenge, followed by 10 days of recovery (n = replicates represent quantifications of eyes from different mice of at least three different experiments and cages; one-way Anova/Bonferroni test F: *p < 0.0001 versus 2- to 3-month-old *Thbs1^{-/-}* mice and 12-month-old C57BL6/J mice; [†]p < 0.0001 versus 2- to 3-month-old *Cd47^{-/-}* mice and 12-month-old C57BL6/J mice; G: *p < 0.0001 versus C57BL6/J; [†]p < 0.0001 versus C57BL6/J).

(H and I) Quantification of subretinal *Cx3cr1^{GFP/GFP} Cfh^{-/-}* CFSE⁺ MCs with (H) control IgM or anti-TSP-1 IgM (clone A4.1) 24 hr after adoptive transfer (Mann-Whitney *p = 0.0002 IgM versus anti-TSP-1) or (I) recombinant TSP-1 (rTSP1) and rTSP1 + purified CFH (one-way Anova/Bonferroni test [§]p = 0.0024 versus *Cx3cr1^{GFP/GFP} Cfh^{-/-}* CFSE⁺ MCs without rTSP1; *p = 0.0003 versus *Cx3cr1^{GFP/GFP} Cfh^{-/-}* CFSE⁺ MCs + rTSP1).

(J-L) (J) Representative micrographs of RPE flatmounts of CD102 (red) and IBA-1 (green) immunohistochemistry and quantification of subretinal IBA-1⁺ MPs on the RPE counted at a distance of 0–500 μ m from CD102⁺ CNV 10 days after the laser-injury in 2-month-old *Cx3cr1^{GFP/GFP}* mice injected at day 4 and day 7 with (J) PBS or rTSP1, (K) control peptide 4NGG or CD47-activating peptide PKHB1, and (L) control IgG or anti-CD11b IgG (Mann-Whitney J *p = 0.0097; K *p < 0.0001; L *p = 0.0298).

Thbs: thrombospondin 1 gene; TSP-1: thrombospondin. n = number of replicates indicated in the graphs; for C, E, G, and H, n = replicates from individual mice from experiments with three different cell preparations; for F, I, and J, n = replicates represent quantifications of eyes from different mice of at least three different experiments and cages. Scale bar, C, F, and I = 50 μ m; D, left panels = 20 μ m, right panel = 10 μ m. All values are reported as mean \pm SEM.

inflammation resolution in CFH-competent *Cx3cr1^{GFP/GFP}* mice. Using this model, we take advantage of the fact that laser burn induces a thinning of the retina above the impact, facilitating diffusion of intravitreally injected molecules to the subretinal space. Our results showed that TSP-1 (Figure 3J), CD47-activating peptide PKHB1 (a derivative of the 4N1K CD47-agonist peptide with improved pharmacological properties [Denèfle et al., 2016], Figure 3K), or the anti-CD11b antibody (that blocks CFH binding to CD11b, Figure 3L), injected at the height of laser-induced subretinal inflammation (d4 and d7), all significantly accelerated subretinal MP elimination as compared to their controls.

Taken together, our data showed that CFH binding to the integrin CD11b inhibited subretinal MC elimination. We demonstrated that CD47 co-localized with CD11b on MPs and mediated the physiological role of TSP-1 in subretinal MP elimination. The observation that TSP-1 blockade reversed the effect of CFH deficiency and that recombinant CFH blocked the effect of TSP-1 on subretinal MP elimination strongly suggested that CFH binding to CD11b interfered with TSP-1 activation of CD47. We showed that TSP-1 and more specifically CD47 activation efficiently accelerated MP elimination similar to *Cfh* deficiency.

CFH Inhibits the Resolution of Acute Sterile Peritonitis

Non-resolving inflammation contributes significantly to the pathogenesis of many chronic, age-related diseases (Nathan and Ding, 2010). To test whether CFH influences inflammation resolution in other pathological contexts, we used a model of acute thioglycollate-induced peritonitis, characterized by an early accumulation of neutrophils, followed by recruited monocyte-derived inflammatory macrophages (recM ϕ), both experiencing an apoptosis-driven elimination at different kinetics (Gautier et al., 2013). Analysis of the ImmGen dataset (Gautier et al., 2012) (GenBank: GSE37448) showed that *Cfh* mRNA levels in thioglycollate-elicited peritoneal recM ϕ were approximately doubled compared to circulating blood Ly-6C⁺ Mo, from which they derive (Figure 4A). Thus, recM ϕ s likely participate to local CFH in peritonitis, in addition to extravasated plasma CFH. Quantification of recruited CD115⁺ F4/80⁺ ICAM2^{lo} recM ϕ s in *Cfh*^{-/-} mice and controls (Figure 4B) revealed a robust and similar early accumulation 1 day after peritonitis induction (Figure 4C). At day 3, however, while the numbers of recM ϕ s continued to rise in WT mice, they had receded by 50% in *Cfh*^{-/-} mice (Figure 4C). This observation was similar to the accelerated elimination of subretinal MPs observed in light-challenged *TRE2 Cfh*^{-/-} and *Cx3cr1^{GFP/GFP} Cfh*^{-/-} mice (Figures 2A and 2B). Human recombinant CFH injected into the peritoneal cavity of *Cfh*^{-/-} mice at day 1 significantly inhibited the enhanced clearance of recM ϕ s observed in this strain at day 2 as compared to heat-denatured CFH (Figure 4D), akin to the effect we observed in subretinally injected *Cx3cr1^{GFP/GFP} Cfh*^{-/-} MCs (Figure 2F). In addition, similar to our results in MCs (Figure 3D), a proximity ligation assay revealed numerous and specific complexes CD11b and CD47 in WT recM ϕ retrieved at day 1 (Figure 4E). Finally, a single intraperitoneal (i.p.) injection of recombinant TSP-1 or the CD47-specific activating peptide PKHB1 at day 1 significantly accelerated the elimination of recM ϕ s as observed at day 2 (Figure 4F).

In summary, our results showed that CFH inhibited recM ϕ elimination in sterile peritonitis, confirming findings for infiltrating MPs in the subretinal space. The observation that complexes of CD11b and CD47 were present on peritoneal recM ϕ and that CD47 activation accelerated recM ϕ elimination during peritonitis strongly suggested that CFH inhibited CD47-dependent inflammation resolution similarly in both the eye and the peritoneum.

The CFH(H402) Variant Inhibits Subretinal MC Elimination More Potently than the Common CFH(Y402)

The substitution of histidine 402 for tyrosine (Y402H) in the CFH sequence accounts for a major part of the genetic risk of AMD. To test whether the Y402H polymorphism influenced the elimination of distinct MPs differently, we transferred CFSE-labeled *Cx3cr1^{GFP/GFP} Cfh*^{-/-} MCs or BM-Mos to the subretinal space together with purified CFH(Y402) or the disease associated CFH(H402) to WT mice. CFSE⁺ cell counts after 24 hr revealed that both isoforms inhibited clearance of BM-Mos (Figure 5A) and MCs (Figure 5B) compared to cells injected without CFH. However, while CFH(Y402) and CFH(H402) had similar effects on BM-Mo elimination (Figure 5A), CFH(H402) limited MC clearance by 37% compared to CFH(Y402) (Figure 5B). In addition, recombinant CFH(Y402) reversed the accelerated elimination rate observed when subretinally injected *Cx3cr1^{GFP/GFP} Cfh*^{-/-} MCs were treated with recombinant TSP-1, and recombinant CFH(H402) was 50% more potent at inhibiting this phenomenon (Figure 5C).

Taken together, our results showed that CFH(H402) was significantly more potent to inhibit the subretinal elimination of certain MPs, such as MCs. The CFH(H402) variant might thereby spur non-resolving inflammation under the retina and thus explain its association with early and late AMD (Fritsche et al., 2014) where subretinal MPs accumulate (Lad et al., 2015; Levy et al., 2015a; Sennlaub et al., 2013).

DISCUSSION

We report the previously unknown ability of CFH to favor subretinal MP accumulation in mice developing chronic, non-resolving, age-related inflammation in the eye. We extended this finding to inflammation resolution in general by using models of acute inflammation in the peritoneum and the eye. Our work supports the long-standing association between CFH variant and AMD, and we uncovered the mechanisms by which CFH impacts MP infiltration independently from its action in the complement cascade.

The subretinal space is prone to MP infiltration due to light-induced oxidative stress and high metabolic activity (Combadière et al., 2007; Ng and Streilein, 2001), and this is physiologically counterbalanced by the expression of immunosuppressive factors by the RPE (Griffith et al., 1995; Levy et al., 2015a). We showed that CFH favored MP accumulation by inhibiting their elimination mediated by TSP-1 activation of CD47. Remarkably, *Thbs1*^{-/-} and *Cd47*^{-/-} mice developed age-related subretinal inflammation under normal living conditions. This can possibly be explained by the sensitizing role of TSP-1 on FasL-induced cell death (Manna et al., 2005; Quesada et al., 2005), as FasL expression by the RPE is necessary to

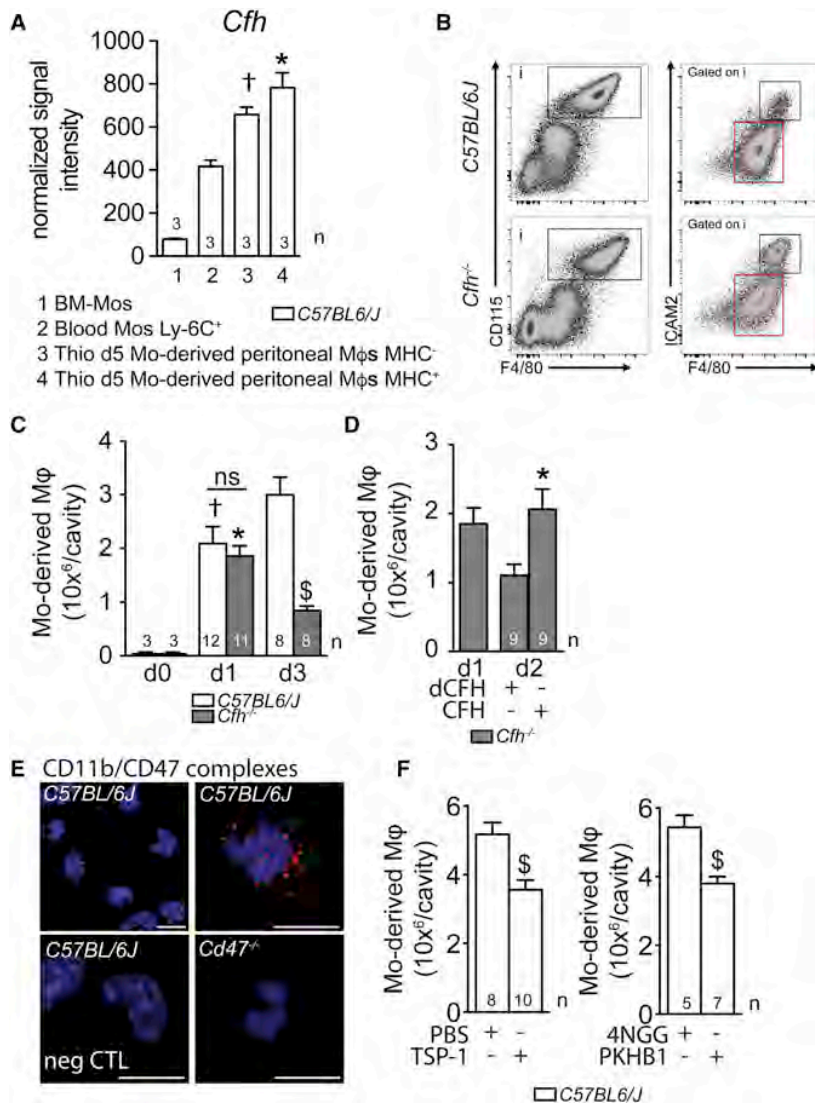


Figure 4. CFH Inhibits the Resolution of Acute Sterile Peritonitis

(A) Normalized signal intensity for Cfh mRNA levels extracted from Affymetrix transcription analysis of bone marrow monocytes (1), Ly-6C⁺ circulating blood marrow monocytes (2), MHC-II⁻ and MHC-II⁺ monocyte-derived peritoneal macrophages at day 5 of thioglycollate-induced peritonitis in 3-month-old WT C57BL/6J mice (3 and 4; one-way Anova/Bonferroni test [†]p = 0.0036 versus blood monocytes; *p = 0.0005 versus blood monocytes).

(B) Representative cytometry plots of WT C57BL/6J (upper panels) or *Cfh*^{-/-} mice (lower panels) three days after thioglycollate-induced peritonitis. CD115⁺ F4/80⁺ cells represents macrophages, with CD115⁺ F4/80⁺ ICAM-2^{lo} representing Mo-derived Mφ and CD115⁺ F4/80⁺ ICAM-2^{hi} representing resident macrophages.

(C) Quantification of CD115⁺ F4/80⁺ ICAM-2^{lo} Mo-derived Mφ in exudates of WT C57BL/6J and *Cfh*^{-/-} mice at indicated time points after thioglycollate-induced peritonitis (one-way Anova/Bonferroni test [†]p = 0.012 versus d0 WT C57BL/6J; *p = 0.005 versus d0 *Cfh*^{-/-}; p = 0.9697 between d1 groups; [§]p < 0.0001 versus d3 WT C57BL/6J).

(D) Quantification of CD115⁺ F4/80⁺ ICAM-2^{lo} Mo-derived Mφ in exudates of *Cfh*^{-/-} mice at day 2 (d2) after mice were injected with native (CFH) or heat-denatured (dCFH) purified CFH at day 1 (d1) (Mann-Whitney *p = 0.0087 versus dCFH).

(E) Representative confocal micrographs of CD11b-CD47 complexes (red dots) detected by proximity ligation assay on freshly harvested Mo-derived Mφ one day after thioglycollate injection in WT C57BL/6J and *Cd47*^{-/-} mice. Hoechst was used for nuclear stain (blue; negative control: omitting the primary antibodies; the experiment was repeated three times with similar results).

(F) Quantification of CD115⁺ F4/80⁺ ICAM-2^{lo} Mo-derived Mφ in exudates of WT C57BL/6J mice at d2 after mice were injected with PBS or rTSP-1 (Mann-Whitney [§]p = 0.0048), or control peptide 4NGG or CD47-activating peptide PKHB1 (Mann-Whitney [§]p = 0.0087) at day 1.

Mφ: macrophage; Mo: monocyte; Thio: thio-

glycollate; MHC: major histocompatibility complex; dCFH: heat-denatured CFH; negCTL: negative control. n = number of replicates indicated in the graphs; replicates represent quantifications of exudate cells from different mice of three (C) or two (E and F) different peritonitis inductions. Scale bar, E = 10 μm. All values are reported as mean ± SEM.

prevent subretinal MP accumulation (Griffith et al., 1995; Levay et al., 2015a).

CFH was expressed at high levels in MCs and Mo-derived Mφs in peritonitis, and we confirmed a stepwise binding interaction between CFH and CD11b (Gautier et al., 2012; Luo et al., 2011; Schlaf et al., 2001) and CD11b and CD47 (Pfeiffer et al., 2001) on MPs. The ligation of the sizeable CFH (1231 amino acids) to CD11b might thereby sterically hinder the ligation of the trimeric TSP-1 (3 × 1106 amino acids) to CD47 and increase MP lifespan. Although the exact mechanism remains to be elucidated, our data show that complement activation or CFH-dependent production of iC3b, an alternative ligand of CD11b, did not play a detectable role in the process: C3b, iC3b, or C3c fragments were not found in the subretinal space, and CFI

(necessary to produce iC3b) was not significantly transcribed in MPs. Lastly, a specific antibody that inhibits the alternative cascade (Mastellos et al., 2004) did not accelerate MP elimination.

In addition, we found that the AMD-associated CFH(H402) variant had an increased capacity to inhibit the elimination of certain MP populations, such as MCs, strengthening the causal link to AMD etiology. Although CFH(H402) affinity is decreased to certain GAG species, it is higher in particular to GAG sulfates (Clark et al., 2006). GAG sulfate profiles differ greatly between MPs and different microenvironments. For example, keratan sulfate proteoglycans (KPSG) are strongly present on ramified brain MCs, but not on blood Mos (Wilms et al., 1999). The differential expression of GAG sulfates, such as KPSG, on MCs might

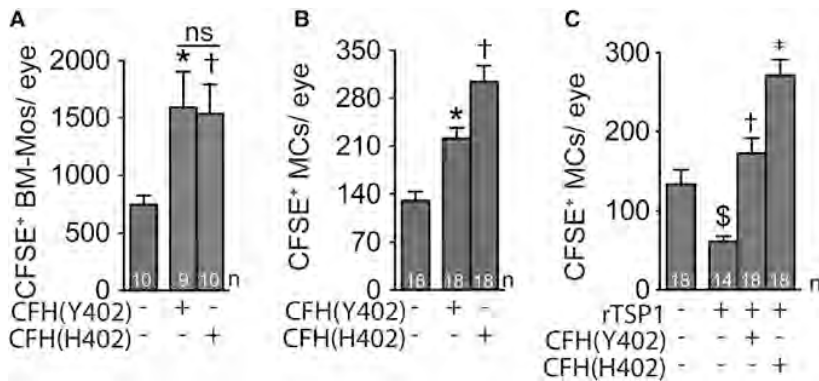


Figure 5. The CFH(H402) Variant Inhibits Subretinal MC Elimination More Potently than the CFH(Y402) Form

(A) Quantification of subretinal *Cx3cr1*^{GFP/GFP} *Cfh*^{-/-} CFSE⁺ monocytes on RPE and retinal flatmounts 24 hr after adoptive transfer to WT C57BL6/J mice with and without purified CFH(Y402) or CFH(H402) (Anova/Bonferroni test **p* < 0.0001).

(B) Quantification of subretinal *Cx3cr1*^{GFP/GFP} *Cfh*^{-/-} CFSE⁺ microglial cells on RPE and retinal flatmounts 24 hr after adoptive transfer to WT C57BL6/J mice with and without purified CFH(Y402) or CFH(H402) (Anova/Bonferroni test **p* = 0.0025 versus without CFH; †*p* = 0.0052 versus CFH(H402)).

(C) Quantification of subretinal *Cx3cr1*^{GFP/GFP}

Cfh^{-/-} CFSE⁺ microglial cells on RPE and retinal flatmounts 24 hr after adoptive transfer to WT C57BL6/J mice without or with recombinant TSP-1 (rTSP1), rTSP1 + recombinant CFH(Y402), or rTSP1 + recombinant CFH(H402) (Anova/Bonferroni test ‡*p* = 0.00236 versus without TSP-1; †*p* = 0.0002 versus with TSP-1; †*p* = 0.0005 versus with TSP-1 + CFH_{Y402}).

Mos: monocytes; MCs: microglial cells; rTSP1: recombinant TSP-1; n = number of replicates indicated in the graphs, replicates represent quantifications from individual mice from two (A) to three (B and C) experiments with three different cell preparations. All values are reported as mean ± SEM.

explain why CFH(H402) differentially influenced MC, but not BM-Mos, elimination. Subretinal MPs originating from infiltrating Mo and MCs (Sennlaub et al., 2013) invariably express KPSG strongly (Combadière et al., 2007; Ng and Streilein, 2001; Ng et al., 2009). This is also the case in spinal cord injury, but not in autoimmune neuritis (Jones and Tuszyński, 2002; Matsui et al., 2013). CFH(H402) might therefore have a particularly strong influence on subretinal inflammation observed in AMD, but not necessarily in other chronic inflammatory diseases. In human evolution, the limited elimination of MPs and the increased inflammatory reaction associated with CFH(H402) might have increased survival to certain infectious diseases, leading to its high frequency as observed today in certain populations. In AMD, CFH(H402) might be pathogenic, as it fuels subretinal inflammation and leads to chronic inflammation, which add to its decreased capacity to inhibit oxidative stress (Weismann et al., 2011) and to bind to Bruchs membrane (Clark et al., 2010) that protects the RPE against uncontrolled complement activation (Coffey et al., 2007; Toomey et al., 2015).

Current anti-inflammatory therapies, such as steroids, non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAID), or immunosuppressive drugs (Ciclosporin) can have paradoxical effects on macrophage function. They increase proinflammatory mediators (high-dose steroids) (Lim et al., 2007), upregulate toll-like receptors on macrophages (Ciclosporin) (Tedesco and Haragsim, 2012), and prolong macrophage infiltration (NSAID) (Gilroy et al., 1999), which might explain their lack of therapeutic effect in AMD. Our findings introduce a new strategy to directly induce the elimination of pathogenic macrophage accumulation in AMD, and possibly other conditions, by pharmacological activation of CD47.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Mice

Cfh^{-/-}, TRE2, and TRE3 mice were generous gifts from Mathew Pickering and Patrick Sullivan. *Cx3cr1*^{GFP/GFP}, *Thbs1*^{-/-}, *Cd47*^{-/-}, and *Cd36*^{-/-} mice were obtained for The Jackson laboratories, *Cx3cr1*^{GFP/GFP} *Cfh*^{-/-}, and TRE2

Cfh^{-/-} mouse strains were generated, all mice were either negative or backcrossed to eliminate the *Pde6b*^{rd1}, *Gnat2*^{cpfl3}, and *Crb1*^{rd8} mutations. The mice were kept to the indicated ages under specific pathogen-free condition in a 12 hr/12 hr light/dark (100 lux) cycle with no additional cover in the cage and with water and normal chow diet available ad libitum.

Aging, Light Challenge-, and Laser-Injury Model

Mice were exposed to green LED light (4500 Lux) for 4 days and subsequently kept in cyclic conditions (Sennlaub et al., 2013). Laser-coagulations were performed on male mice (Vitra Laser, 532 nm, 450 mW, 50 ms, and 250 μm), which were intravitreally injected (days 4 and 7) with 2 μL of PBS, recombinant human TSP-1 (10 μg/mL), the 4NGG control peptide or the PKHB1 CD47-activating peptide (200 μM), anti-CD11b antibody (50 μg/mL), and isotype control rat IgG2 (50 μg/mL) and sacrificed at day 10. All experimental procedures were approved by the local animal care ethics committee C2EA-05—Charles Darwin.

Histology and Immunohistochemistry

After fixation, the eyes were cryo-sectioned (10 μm) and stained with anti-C3-, anti-C3b/iC3b/C3c-, and anti-CFH-antibodies and appropriate secondary antibodies or dissected for flatmount preparations. The retinas and chorioids were incubated with peanut agglutinin, anti-IBA-1, anti-cone arrestin, or anti-CD102 antibodies as indicated, followed by appropriate conjugated secondary antibodies. IBA-1⁺ cells were counted on whole RPE/choroidal flatmounts and on the outer segment side of the retina. PA⁺ cone arrestin⁺ cells were counted on oriented retinal flatmounts. For histology, the eyes were fixed, embedded in Histo-resin, cut (5 μm sagittal sections), and stained with toluidin blue. Rows of nuclei in the outer nuclear layer (ONL) were counted at different distances from the optic nerve.

Hydrodynamic Injection

Empty pLIVE plasmid and coding for murine CFH was intravenously injected to mice, as previously described (Rayes et al., 2010). Four days later, mice were exposed to the light challenge model, and their blood was sampled to quantify plasma C3 concentration by ELISA.

Plasma and Mononuclear Phagocyte Preparations, Analysis, and Culture

Plasma C3 and TSP-1 levels were measured by ELISA. Mos from the blood and bone marrow were isolated by negative selection. MCs from brain and retina were isolated with anti-CD11b microbeads. No (CFH-containing) serum was used in any step of the purification. Cells were used for adoptive transfer experiments, analyzed by RT-qPCR or cultured for 24 hr in serum-free DMEM in the presence of recombinant human APOE3, and finally, their supernatants were analyzed by cytokine multiplex array.

Subretinal Adoptive Microglial Cell Transfer and Clearance

Brain MCs from male mice were sorted, labeled with CFSE, and injected in the subretinal space (verified by fundoscopy) of WT or *Cfh*^{-/-} male mice in 4 μ L of PBS, purified human or recombinant CFH, CFH(Y402), and CFH(H402) (500 μ g/mL), recombinant human TSP-1 (10 μ g/mL), and following antibodies (10 μ g/mL); anti-CD11b, anti-C3b/iC3b/C3c, isotype control rat IgG2, anti-TSP-1, and isotype control mouse IgM. After 24 hr, CFSE⁺ cells in the subretinal space were quantified on whole RPE/choroidal and retinal flatmounts.

Thioglycollate-Induced Peritonitis and Flow Cytometry

Peritonitis was induced by i.p. injections of 0.5 mL of 3% (weight/volume) thioglycollate broth in male mice. At 24 hr, mice were injected with 100 μ L of PBS containing native or heat inactivated purified commercial human CFH (500 μ g/mL), recombinant human TSP-1 (50 μ g/mL), the CD47-activating peptide PKHB1, or the 4NGG control peptide (500 μ M), and exudate cells were analyzed using a BD Fortessa flow cytometer.

CFH Binding Assay by Flow Cytometry

MCs from *Cx3cr1*^{GFP/GFP} *Cfh*^{-/-} were stained 30 min with Cy5.5-conjugated human CFH at 37°C and washed before acquisition on a BD Fortessa flow cytometer. Bone marrow monocytes were preincubated with control IgG or anti-CD11b antibody (clone 5C6) at 10 μ g/mL and incubated with hCFH-Cy3.

CD11b-CD47 Proximity Ligation Assay

Duolink PLA assay was performed following the manufacturer's instructions with rabbit anti-CD11b and goat anti-CD47 on day 1 thioglycollate elicited peritoneal M ϕ s and brain MCs.

Statistical Analysis

Graph Pad 7 (GraphPad Software) was used for data analysis and graphic representation. All values are reported as mean \pm SEM. Statistical analysis and variance analysis was performed by one-way ANOVA, followed by Bonferroni post-test (for multiple comparison) or Mann-Whitney U-test (two-group comparison) among means depending on the experimental design. The n and p values are indicated in the figure legends.

Please see [Supplemental Information](#) for more details.

SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental Information includes Supplemental Experimental Procedures and five figures and can be found with this article online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2017.01.006>.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

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

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from INSERM, ANR Geno 2009 (R09099DS), ANR MACLEAR (ANR-15-CE14-0015-01), LABEX LIFESENSES [ANR-10-LABX-65] supported by the ANR (Investissements d'Avenir programme [ANR-11-IDEX-0004-02]), Carnot, and ERC starting Grant (ERC-2007 St. G. 210345), the Association de Prévoyance Santé de ALLIANZ, and a generous donation by Doris and Michael Bunte.

REFERENCES

- Anderson, D.H., Radeke, M.J., Gallo, N.B., Chapin, E.A., Johnson, P.T., Curreli, C.R., Hancox, L.S., Hu, J., Ebricht, J.N., Malek, G., et al. (2010). The pivotal role of the complement system in aging and age-related macular degeneration: hypothesis re-visited. *Prog. Retin. Eye Res.* 29, 95–112.
- Appelboom, G., Piazza, M., Hwang, B.Y., Bruce, S., Smith, S., Bratt, A., Bagliella, E., Badjatia, N., Mayer, S., and Sander Connolly, E. (2011). Complement Factor H Y402H polymorphism is associated with an increased risk of mortality after intracerebral hemorrhage. *J. Clin. Neurosci.* 18, 1439–1443.
- Chen, M., Copland, D.A., Zhao, J., Liu, J., Forrester, J.V., Dick, A.D., and Xu, H. (2012). Persistent inflammation subverts thrombospondin-1-induced regulation of retinal angiogenesis and is driven by CCR2 ligation. *Am. J. Pathol.* 180, 235–245.
- Clark, S.J., Higman, V.A., Mulloy, B., Perkins, S.J., Lea, S.M., Sim, R.B., and Day, A.J. (2006). His-384 allotypic variant of factor H associated with age-related macular degeneration has different heparin binding properties from the non-disease-associated form. *J. Biol. Chem.* 281, 24713–24720.
- Clark, S.J., Perveen, R., Hakobyan, S., Morgan, B.P., Sim, R.B., Bishop, P.N., and Day, A.J. (2010). Impaired binding of the age-related macular degeneration-associated complement factor H 402H allotype to Bruch's membrane in human retina. *J. Biol. Chem.* 285, 30192–30202.
- Coffey, P.J., Gias, C., McDermott, C.J., Lundh, P., Pickering, M.C., Sethi, C., Bird, A., Fitzke, F.W., Maass, A., Chen, L.L., et al. (2007). Complement factor H deficiency in aged mice causes retinal abnormalities and visual dysfunction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104, 16651–16656.
- Combadière, C., Feumi, C., Raoul, W., Keller, N., Rodéro, M., Pézard, A., Lavalette, S., Houssier, M., Jonet, L., Picard, E., et al. (2007). CX3CR1-dependent subretinal microglia cell accumulation is associated with cardinal features of age-related macular degeneration. *J. Clin. Invest.* 117, 2920–2928.
- Cruz-Guilloty, F., Saeed, A.M., Echegaray, J.J., Duffort, S., Ballmick, A., Tan, Y., Betancourt, M., Viteri, E., Ramkellawan, G.C., Ewald, E., et al. (2013). Infiltration of proinflammatory m1 macrophages into the outer retina precedes damage in a mouse model of age-related macular degeneration. *Int. J. Inflamm.* 2013, 503725.
- Denèfle, T., Boulet, H., Herbi, L., Newton, C., Martinez-Torres, A.C., Guez, A., Pramil, E., Quiney, C., Pourcelot, M., Lévassieur, M.D., et al. (2016). Thrombospondin-1 Mimetic Agonist Peptides Induce Selective Death in Tumor Cells: Design, Synthesis, and Structure-Activity Relationship Studies. *J. Med. Chem.* 59, 8412–8421.
- Dhillon, B., Wright, A.F., Tufail, A., Pappworth, I., Hayward, C., Moore, I., Strain, L., Kavanagh, D., Barlow, P.N., Herbert, A.P., et al. (2010). Complement factor h autoantibodies and age-related macular degeneration. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 51, 5858–5863.
- DiScipio, R.G., Daffern, P.J., Schraufstatter, I.U., and Sriramarao, P. (1998). Human polymorphonuclear leukocytes adhere to complement factor H through an interaction that involves alphaMbeta2 (CD11b/CD18). *J. Immunol.* 160, 4057–4066.
- Febbraio, M., Hajjar, D.P., and Silverstein, R.L. (2001). CD36: a class B scavenger receptor involved in angiogenesis, atherosclerosis, inflammation, and lipid metabolism. *J. Clin. Invest.* 108, 785–791.
- Fritsche, L.G., Fariss, R.N., Stambolian, D., Abecasis, G.R., Curcio, C.A., and Swaroop, A. (2014). Age-related macular degeneration: genetics and biology coming together. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 15, 151–171.
- Gautier, E.L., Shay, T., Miller, J., Greter, M., Jakubzick, C., Ivanov, S., Helft, J., Chow, A., Elpek, K.G., Gordonov, S., et al.; Immunological Genome Consortium (2012). Gene-expression profiles and transcriptional regulatory pathways that underlie the identity and diversity of mouse tissue macrophages. *Nat. Immunol.* 13, 1118–1128.
- Gautier, E.L., Ivanov, S., Lesnik, P., and Randolph, G.J. (2013). Local apoptosis mediates clearance of macrophages from resolving inflammation in mice. *Blood* 122, 2714–2722.

- Gilroy, D.W., Colville-Nash, P.R., Willis, D., Chivers, J., Paul-Clark, M.J., and Willoughby, D.A. (1999). Inducible cyclooxygenase may have anti-inflammatory properties. *Nat. Med.* *5*, 698–701.
- Griffith, T.S., Brunner, T., Fletcher, S.M., Green, D.R., and Ferguson, T.A. (1995). Fas ligand-induced apoptosis as a mechanism of immune privilege. *Science* *270*, 1189–1192.
- Gupta, N., Brown, K.E., and Milam, A.H. (2003). Activated microglia in human retinitis pigmentosa, late-onset retinal degeneration, and age-related macular degeneration. *Exp. Eye Res.* *76*, 463–471.
- Hageman, G.S., Anderson, D.H., Johnson, L.V., Hancox, L.S., Taiber, A.J., Hardisty, L.I., Hageman, J.L., Stockman, H.A., Borchardt, J.D., Gehrs, K.M., et al. (2005). A common haplotype in the complement regulatory gene factor H (HF1/CFH) predisposes individuals to age-related macular degeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *102*, 7227–7232.
- Hu, S.J., Calippe, B., Lavalette, S., Roubeix, C., Montassar, F., Housset, M., Levy, O., Delarasse, C., Paques, M., Sahel, J.A., et al. (2015). Upregulation of P2RX7 in Cx3cr1-Deficient Mononuclear Phagocytes Leads to Increased Interleukin-1 β Secretion and Photoreceptor Neurodegeneration. *J. Neurosci.* *35*, 6987–6996.
- Johnson, P.T., Betts, K.E., Radeke, M.J., Hageman, G.S., Anderson, D.H., and Johnson, L.V. (2006). Individuals homozygous for the age-related macular degeneration risk-conferring variant of complement factor H have elevated levels of CRP in the choroid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *103*, 17456–17461.
- Jones, L.L., and Tuszynski, M.H. (2002). Spinal cord injury elicits expression of keratan sulfate proteoglycans by macrophages, reactive microglia, and oligodendrocyte progenitors. *J. Neurosci.* *22*, 4611–4624.
- Kang, Y.H., Urban, B.C., Sim, R.B., and Kishore, U. (2012). Human complement Factor H modulates C1q-mediated phagocytosis of apoptotic cells. *Immunobiology* *217*, 455–464.
- Khandhadia, S., Hakobyan, S., Heng, L.Z., Gibson, J., Adams, D.H., Alexander, G.J., Gibson, J.M., Martin, K.R., Menon, G., Nash, K., et al. (2013). Age-related macular degeneration and modification of systemic complement factor H production through liver transplantation. *Ophthalmology* *120*, 1612–1618.
- Kopp, A., Hebecker, M., Svobodová, E., and Józsi, M. (2012). Factor h: a complement regulator in health and disease, and a mediator of cellular interactions. *Biomolecules* *2*, 46–75.
- Lad, E.M., Cousins, S.W., Van Arnam, J.S., and Proia, A.D. (2015). Abundance of infiltrating CD163+ cells in the retina of postmortem eyes with dry and neovascular age-related macular degeneration. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* *253*, 1941–1945.
- Levy, O., Calippe, B., Lavalette, S., Hu, S.J., Raoul, W., Dominguez, E., Housset, M., Paques, M., Sahel, J.A., Bemelmans, A.P., et al. (2015a). Apolipoprotein E promotes subretinal mononuclear phagocyte survival and chronic inflammation in age-related macular degeneration. *EMBO Mol. Med.* *7*, 211–226.
- Levy, O., Lavalette, S., Hu, S.J., Housset, M., Raoul, W., Eandi, C., Sahel, J.A., Sullivan, P.M., Guillonnet, X., and Sennlaub, F. (2015b). APOE isoforms control pathogenic subretinal inflammation in age-related macular degeneration. *J. Neurosci.* *35*, 13568–13576.
- Lim, H.Y., Müller, N., Herold, M.J., van den Brandt, J., and Reichardt, H.M. (2007). Glucocorticoids exert opposing effects on macrophage function dependent on their concentration. *Immunology* *122*, 47–53.
- Losse, J., Zipfel, P.F., and Józsi, M. (2010). Factor H and factor H-related protein 1 bind to human neutrophils via complement receptor 3, mediate attachment to *Candida albicans*, and enhance neutrophil antimicrobial activity. *J. Immunol.* *184*, 912–921.
- Luo, C., Chen, M., and Xu, H. (2011). Complement gene expression and regulation in mouse retina and retinal pigment epithelium/choroid. *Mol. Vis.* *17*, 1588–1597.
- Manna, P.P., Dimitry, J., Oldenborg, P.A., and Frazier, W.A. (2005). CD47 augments Fas/CD95-mediated apoptosis. *J. Biol. Chem.* *280*, 29637–29644.
- Martin, M., and Blom, A.M. (2016). Complement in removal of the dead - balancing inflammation. *Immunol. Rev.* *274*, 218–232.
- Mastellos, D., Prechl, J., László, G., Papp, K., Oláh, E., Argyropoulos, E., Franchini, S., Tudoran, R., Markiewski, M., Lambris, J.D., and Erdei, A. (2004). Novel monoclonal antibodies against mouse C3 interfering with complement activation: description of fine specificity and applications to various immunoassays. *Mol. Immunol.* *40*, 1213–1221.
- Matsui, H., Ohgomori, T., Natori, T., Miyamoto, K., Kusunoki, S., Sakamoto, K., Ishiguro, N., Imagama, S., and Kadomatsu, K. (2013). Keratan sulfate expression in microglia is diminished in the spinal cord in experimental autoimmune neuritis. *Cell Death Dis.* *4*, e946.
- Nathan, C., and Ding, A. (2010). Nonresolving inflammation. *Cell* *140*, 871–882.
- Ng, T.F., and Streilein, J.W. (2001). Light-induced migration of retinal microglia into the subretinal space. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* *42*, 3301–3310.
- Ng, T.F., Turpie, B., and Masli, S. (2009). Thrombospondin-1-mediated regulation of microglia activation after retinal injury. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* *50*, 5472–5478.
- Pfeiffer, A., Böttcher, A., Orsó, E., Kapinsky, M., Nagy, P., Bodnár, A., Spreitzer, I., Liebisch, G., Drobnik, W., Gempel, K., et al. (2001). Lipopolysaccharide and ceramide docking to CD14 provokes ligand-specific receptor clustering in rafts. *Eur. J. Immunol.* *31*, 3153–3164.
- Pickering, M.C., Cook, H.T., Warren, J., Bygrave, A.E., Moss, J., Walport, M.J., and Botto, M. (2002). Uncontrolled C3 activation causes membranoproliferative glomerulonephritis in mice deficient in complement factor H. *Nat. Genet.* *31*, 424–428.
- Quesada, A.J., Nelius, T., Yap, R., Zaichuk, T.A., Alfranca, A., Filleur, S., Volpert, O.V., and Redondo, J.M. (2005). In vivo upregulation of CD95 and CD95L causes synergistic inhibition of angiogenesis by TSP1 peptide and metronomic doxorubicin treatment. *Cell Death Differ.* *12*, 649–658.
- Rayes, J., Hollestelle, M.J., Legendre, P., Marx, I., de Groot, P.G., Christophe, O.D., Lenting, P.J., and Denis, C.V. (2010). Mutation and ADAMTS13-dependent modulation of disease severity in a mouse model for von Willebrand disease type 2B. *Blood* *115*, 4870–4877.
- Rayes, J., Roumenina, L.T., Dimitrov, J.D., Repessé, Y., Ing, M., Christophe, O., Jokiranta, T.S., Halbwachs-Mecarelli, L., Borel-Derlon, A., Kaveri, S.V., et al. (2014). The interaction between factor H and VWF increases factor H cofactor activity and regulates VWF prothrombotic status. *Blood* *123*, 121–125.
- Sarks, S.H. (1976). Ageing and degeneration in the macular region: a clinicopathological study. *Br. J. Ophthalmol.* *60*, 324–341.
- Schlaf, G., Demberg, T., Beisel, N., Schieferdecker, H.L., and Götze, O. (2001). Expression and regulation of complement factors H and I in rat and human cells: some critical notes. *Mol. Immunol.* *38*, 231–239.
- Sennlaub, F., Auvynet, C., Calippe, B., Lavalette, S., Poupel, L., Hu, S.J., Dominguez, E., Camelo, S., Levy, O., Guyon, E., et al. (2013). CCR2(+) monocytes infiltrate atrophic lesions in age-related macular disease and mediate photoreceptor degeneration in experimental subretinal inflammation in Cx3cr1 deficient mice. *EMBO Mol. Med.* *5*, 1775–1793.
- Tedesco, D., and Haragsim, L. (2012). Cyclosporine: a review. *J. Transplant.* *2012*, 230386.
- Toomey, C.B., Kelly, U., Saban, D.R., and Bowes Rickman, C. (2015). Regulation of age-related macular degeneration-like pathology by complement factor H. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *112*, E3040–E3049.
- Tsutsumi, C., Sonoda, K.H., Egashira, K., Qiao, H., Hisatomi, T., Nakao, S., Ishibashi, M., Charo, I.F., Sakamoto, T., Murata, T., and Ishibashi, T. (2003). The critical role of ocular-infiltrating macrophages in the development of choroidal neovascularization. *J. Leukoc. Biol.* *74*, 25–32.
- Wang, S., Sorenson, C.M., and Sheibani, N. (2012). Lack of thrombospondin 1 and exacerbation of choroidal neovascularization. *Arch. Ophthalmol.* *130*, 615–620.

Weismann, D., Hartvigsen, K., Lauer, N., Bennett, K.L., Scholl, H.P., Charbel Issa, P., Cano, M., Brandstätter, H., Tsimikas, S., Skerka, C., et al. (2011). Complement factor H binds malondialdehyde epitopes and protects from oxidative stress. *Nature* 478, 76–81.

Wilms, H., Wollmer, M.A., and Sievers, J. (1999). In vitro-staining specificity of the antibody 5-D-4 for microglia but not for monocytes and macrophages indicates that microglia are a unique subgroup of the myelomonocytic lineage. *J. Neuroimmunol.* 98, 89–95.

Wong, W.L., Su, X., Li, X., Cheung, C.M., Klein, R., Cheng, C.Y., and Wong, T.Y. (2014). Global prevalence of age-related macular degeneration and disease burden projection for 2020 and 2040: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Glob. Health* 2, e106–e116.

Zhang, Z., Yu, D., Yuan, J., Guo, Y., Wang, H., and Zhang, X. (2012). Cigarette smoking strongly modifies the association of complement factor H variant and the risk of lung cancer. *Cancer Epidemiol.* 36, e111–e115.



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

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

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

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

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

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

Summary

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

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

Introduction

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

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

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

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

Results

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

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

Correspondence

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

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

Accepted for publication 25 August 2016

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

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

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

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

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

Activated Mos downregulate RPE OTX2 expression

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

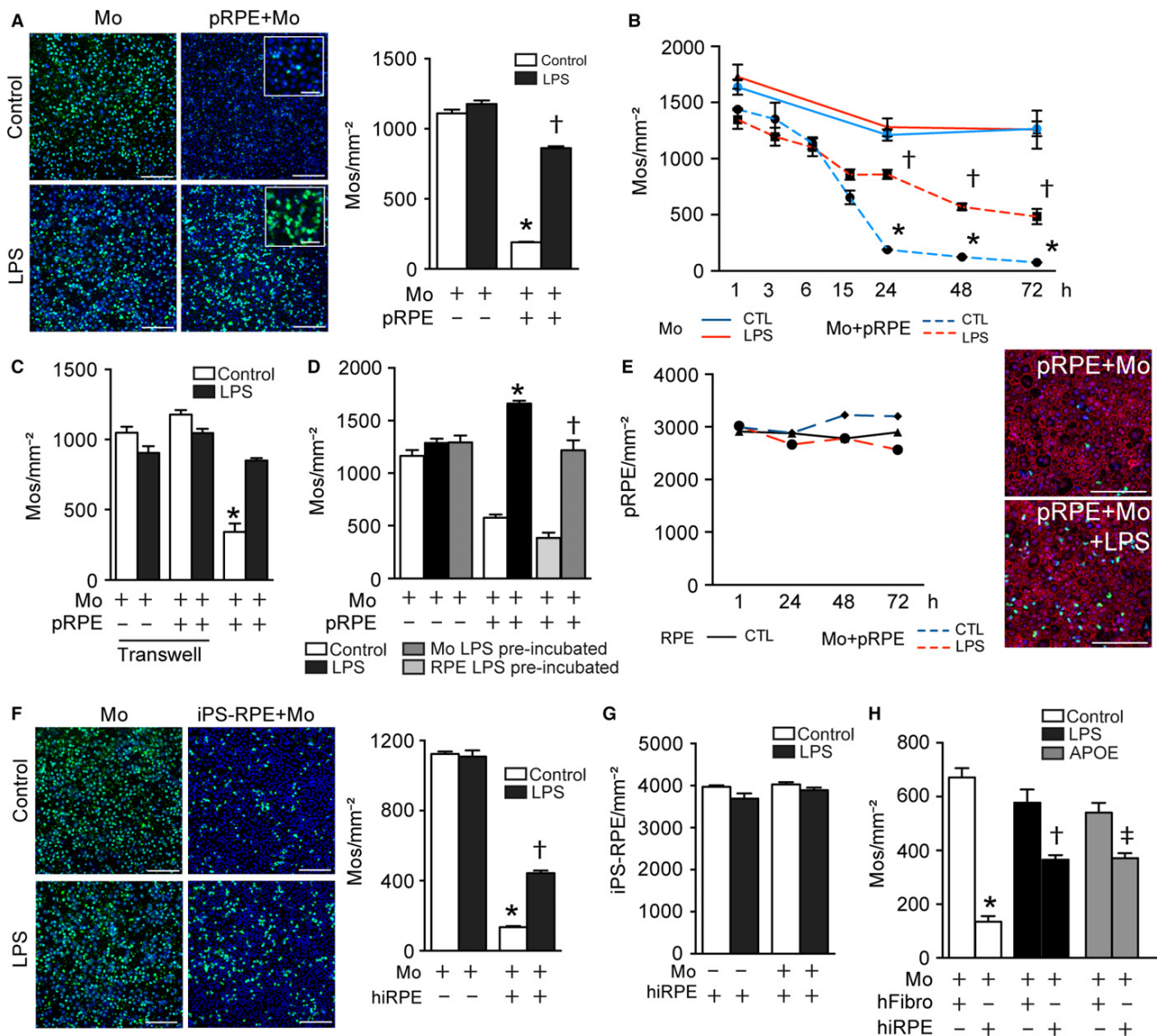


Fig. 1 The RPE efficiently eliminates naïve- but not activated monocytes *in vitro*. (A) Representative pictures and quantification of CFSE labeled Mos at 24 h in monoculture (left panels) and pRPE/Mo coculture (right panels), incubated without (upper panels) or with LPS (lower panels). Blue fluorescence: DAPI; green fluorescence: CFSE (inset, close-up view). Corresponding Arrayscan quantification of CFSE⁺DAPI⁺Mos ($n = 6$ /group; one-way ANOVA/Bonferroni test: pRPE+Mos versus Mos $*P < 0.0001$; pRPE+Mos+LPS versus pRPE+Mos $\dagger P < 0.0001$). (B) Quantification of the density of CFSE⁺DAPI⁺Mos in monoculture (uninterrupted lines) or pRPE/Mo coculture (dotted lines) at indicated times with (red lines) or without (blue lines) LPS ($n = 3$ /group; one-way ANOVA/Bonferroni test: pRPE+Mos versus Mos $*P < 0.0001$ for each time point; pRPE+Mos+LPS versus pRPE+Mos at 24 h $\dagger P < 0.0001$, at 48 h $\dagger P < 0.0001$, at 72 h $\dagger P = 0.0064$). (C) Quantification at 24 h of the density of CFSE⁺DAPI⁺Mos in monoculture, and transwell or contact coculture with pRPE with and without LPS ($n = 4$ /group; one-way ANOVA/Bonferroni test: pRPE+Mos versus any other group $*P < 0.0001$). (D) Quantification of the density of CFSE⁺DAPI⁺Mos in monoculture or coculture after LPS-pre-activation of Mos or pre-activation of the pRPE cells and 24 h culture in LPS-free DMEM compared with LPS-activated coculture ($n = 3$ –4/group; one-way ANOVA/Bonferroni test: pRPE+Mos+LPS versus pRPE+Mos $*P < 0.0001$; pRPE+Mos/LPS-PA versus pRPE+Mos $\dagger P = 0.0003$). (E) Quantification of the density of OTX2⁺DAPI⁺pRPE in monoculture (black uninterrupted line) or coculture (dotted lines) at 1 h, 24 h, 48 h, and 72 h with (red line) or without (blue line) 1 ng mL⁻¹ of LPS ($n = 4$ /group). Representative images of ZO-1 (red), CFSE (green), DAPI (blue) staining of 24 h pRPE/Mo cocultures without (upper panel) and with LPS (lower panel). (F) Representative pictures and quantification of the density of CFSE⁺DAPI⁺Mos at 24 h in monoculture (left panels) and hiRPE/Mo coculture (right panels), incubated without (upper panels) or with (lower panels) LPS. Blue fluorescence: DAPI; green fluorescence: CFSE ($n = 6$ /per group; one-way ANOVA/Bonferroni test: hiRPE+Mos versus Mos $*P < 0.0001$; hiRPE+Mos+LPS versus hiRPE+Mos $\dagger P < 0.0001$). (G) Quantification of the density of OTX2⁺DAPI⁺hiRPE at 24 h in monoculture or coculture with or without LPS ($n = 6$ /group one-way ANOVA/Bonferroni test: no significant). (H) Quantification of the density of CFSE⁺DAPI⁺Mos after 24 h of coculture of Mo with either human foreskin fibroblasts, or hiRPE derived from these fibroblasts activated with LPS or APOE ($n = 5$ /group; one-way ANOVA/Bonferroni test: hiRPE+Mos versus hFibro+Mos $*P < 0.0001$; hiRPE+Mos versus hiRPE+Mos+LPS; $\dagger P < 0.0001$; hiRPE+Mos versus hiRPE+Mos+APOE $\ddagger P < 0.0001$). Data information: All experiments were repeated three times with similar results. Mos: monocytes; pRPE: porcine primary retinal pigment epithelial cells; hiRPE: human-induced pluripotent stem cell-derived RPE cells; hFibro: human foreskin fibroblasts; CTL: control; LPS: lipopolysaccharide; APOE: apolipoprotein E isoform 3. Scale bar A, E and F: 100 μ m, insets 20 μ m.

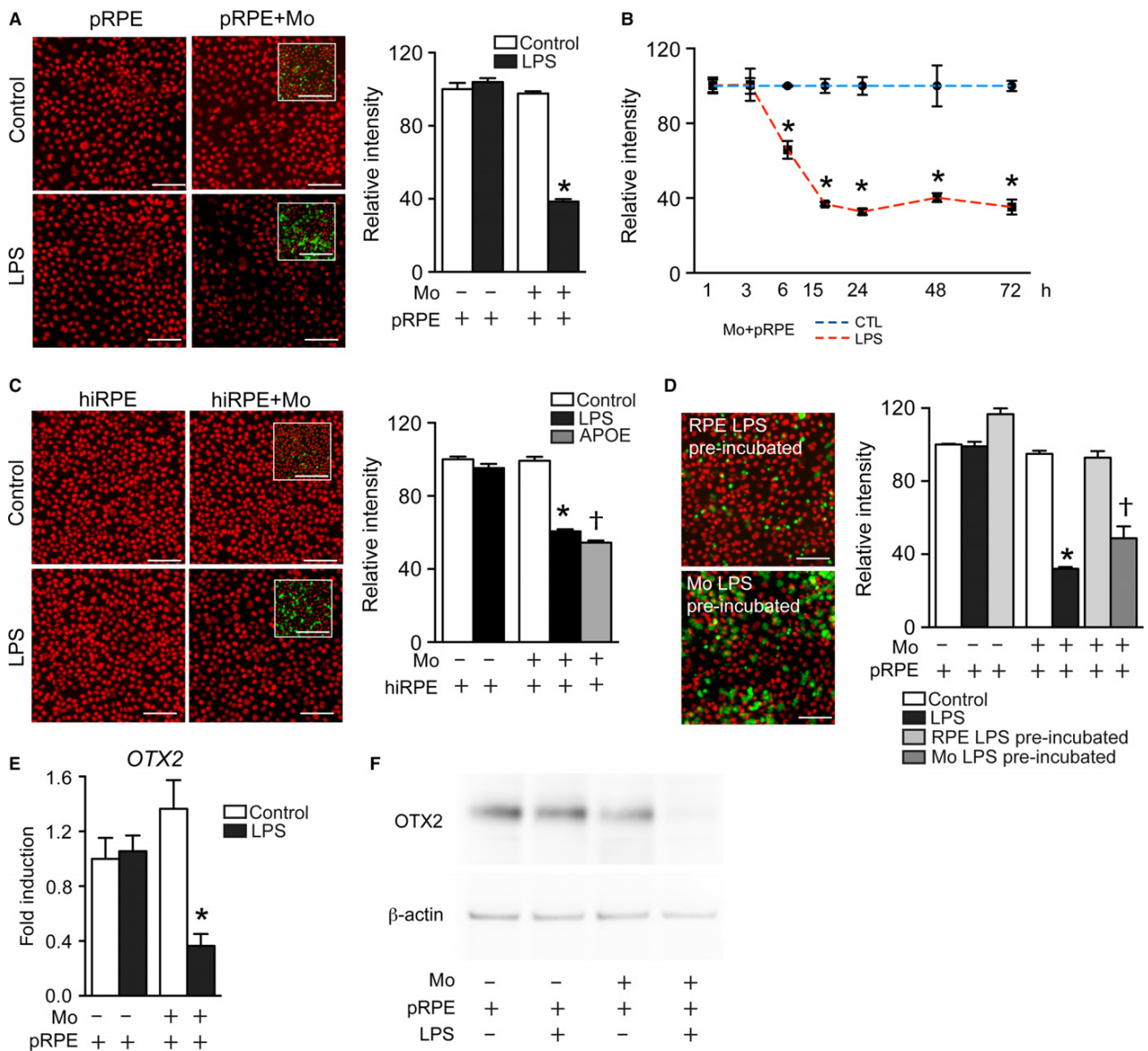


Fig. 2 Activated Monocytes downregulate RPE OTX2 expression. (A) Representative pictures of OTX2 immunohistochemistry of pRPE at 24 h in pRPE cultures (left panels) and pRPE/Mo cocultures (right panels), incubated without (upper panels) or with (lower panels) LPS. Red fluorescence: OTX2; green fluorescence: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

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

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

TNF- α mediates activated Mo-induced RPE OTX2 downregulation

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

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

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

Activated Mos lead to OTX2-dependent RPE gene downregulation

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

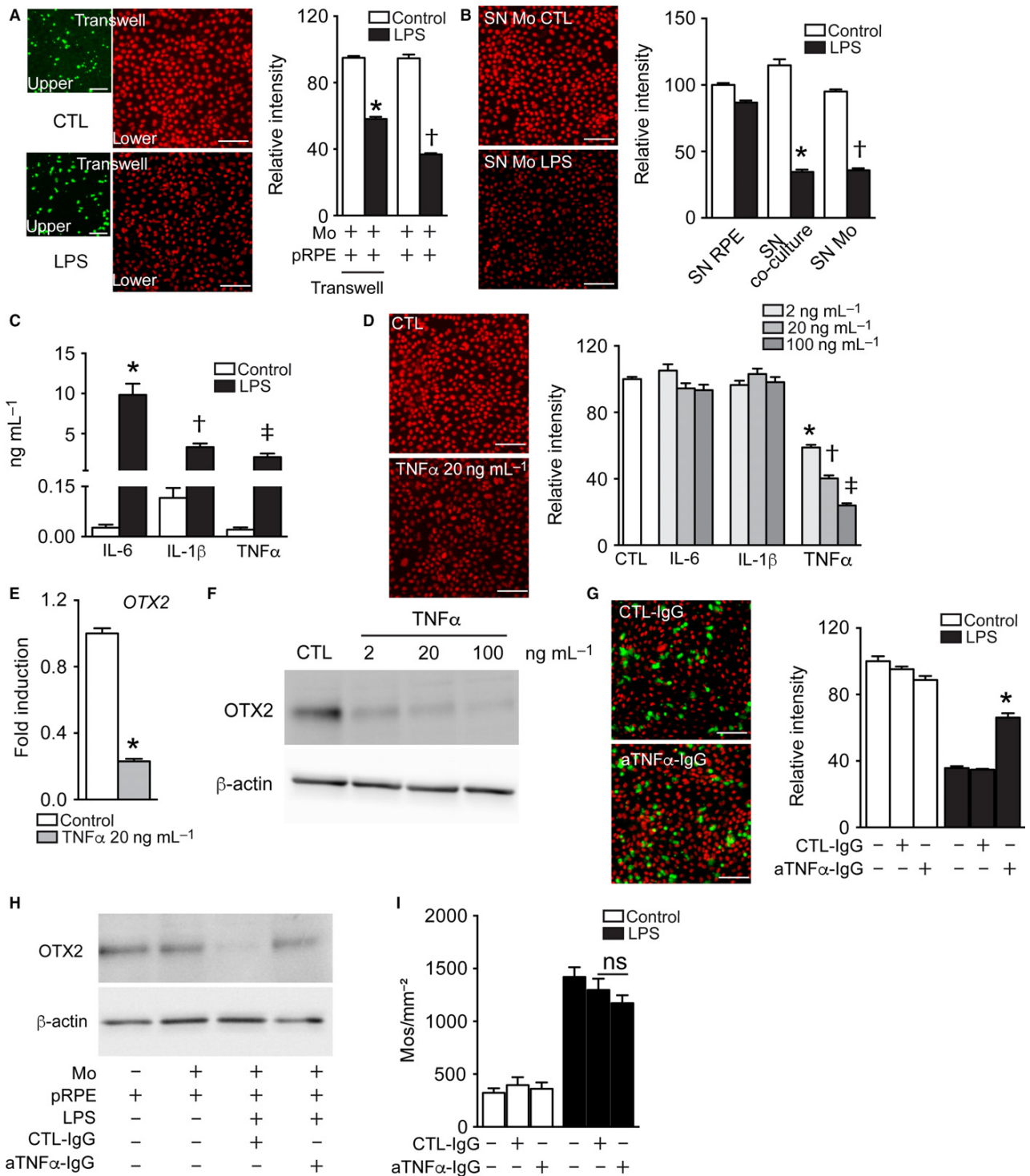
In summary, these results show that the reduced OTX2 expression induced by activated Mos or recombinant TNF- α is associated with a grave downregulation of the essential RPE genes it regulates (Fig. 4G).

Discussion

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

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

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

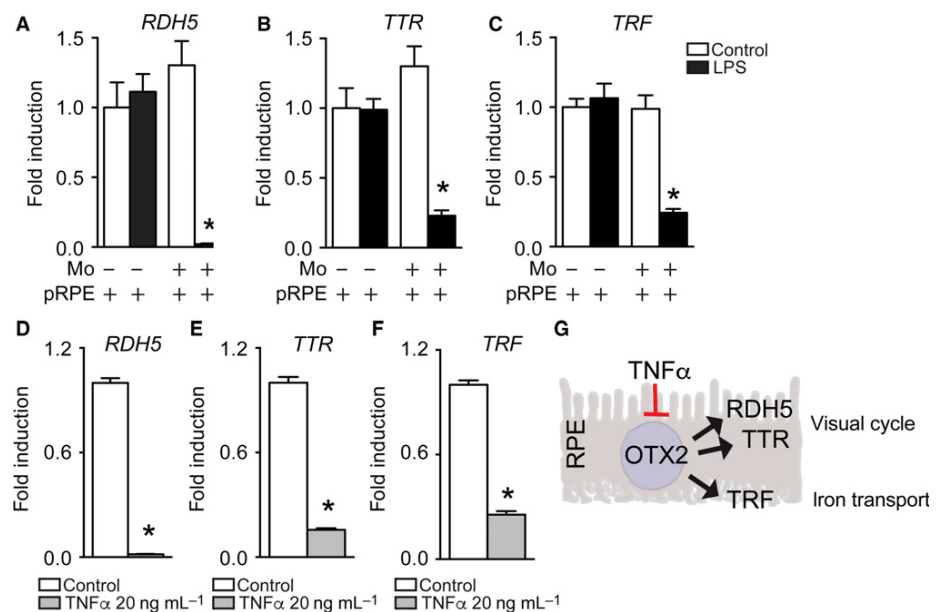


activated Mos, is sufficient to downregulate OTX2 in the RPE and that an anti-TNF- α -blocking antibody partially restores its expression in the activated Mo/RPE coculture. OTX2 expression is regulated by β -catenin during development (Westenskow *et al.*, 2009). TNF- α has

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

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

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



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

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

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

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

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

Experimental procedures

Porcine RPE cell culture

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

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

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

Human blood monocyte isolation

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

Coculture and treatments

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

Immunofluorescence microscopy

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

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

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

RT-PCR

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

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

Western blotting

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

Statistical analysis

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

Acknowledgments

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

Funding

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

Conflict of interest

None declared

References

- Acampora D, Mazan S, Lallemand Y, Avantaggiato V, Maury M, Simeone A, Brûlet P (1995) Forebrain and midbrain regions are deleted in *Otx2*^{-/-} mutants due to a defective anterior neuroectoderm specification during gastrulation. *Dev. Camb. Engl.* **121**, 3279–3290.
- Arnault E, Barrau C, Nanteau C, Gondouin P, Bigot K, Viénot F, Gutman E, Fontaine V, Villette T, Cohen-Tannoudji D, Sahel J-A, Picaud S (2013) Phototoxic action spectrum on a retinal pigment epithelium model of age-related macular degeneration exposed to sunlight normalized conditions. *PLoS ONE* **8**, e71398.
- Béby F, Housset M, Fossat N, Le Greneur C, Flamant F, Godement P, Lamonerie T (2010) *Otx2* gene deletion in adult mouse retina induces rapid RPE dystrophy and slow photoreceptor degeneration. *PLoS ONE* **5**, e11673.
- Becroft DM (1981) Prenatal cytomegalovirus infection: epidemiology, pathology and pathogenesis. *Perspect. Pediatr. Pathol.* **6**, 203–241.
- Cantos R, Cole LK, Acampora D, Simeone A, Wu DK (2000) Patterning of the mammalian cochlea. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 11707–11713.
- Cao S, Ko A, Partanen M, Pakzad-Vaezi K, Merkur AB, Albiani DA, Kirker AW, Wang A, Cui JZ, Forooghian F, Matsubara JA (2013) Relationship between systemic cytokines and complement factor H Y402H polymorphism in patients with dry age-related macular degeneration. *Am. J. Ophthalmol.* **156**, 1176–1183.
- Cavallaro T, Martone RL, Dwork AJ, Schon EA, Herbert J (1990) The retinal pigment epithelium is the unique site of transthyretin synthesis in the rat eye. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **31**, 497–501.
- Cideciyan AV, Haeseleer F, Fariss RN, Aleman TS, Jang GF, Verlinde CL, Marmor MF, Jacobson SG, Palczewski K (2000) Rod and cone visual cycle consequences of a null mutation in the 11-cis-retinol dehydrogenase gene in man. *Vis. Neurosci.* **17**, 667–678.
- Combadière C, Feumi C, Raoul W, Keller N, Rodéro M, Pézard A, Lavalette S, Houssier M, Jonet L, Picard E, Debré P, Sirinyan M, Deterre P, Ferroukhi T, Cohen S-Y, Chauvaud D, Jeanny J-C, Chemtob S, Behar-Cohen F, Sennlaub F (2007) CX3CR1-dependent subretinal microglia cell accumulation is associated with cardinal features of age-related macular degeneration. *J. Clin. Invest.* **117**, 2920–2928.
- Cousin SW, Espinosa-Heidmann DG, Csaky KG (2004) Espinosa-Heidmann DG & Csaky KG (2004) Monocyte activation in patients with age-related macular degeneration: a biomarker of risk for choroidal neovascularization? *Arch. Ophthalmol. Chic. Ill* **122**, 1013–1018.
- Diarra D, Stolina M, Polzer K, Zwerina J, Ominsky MS, Dwyer D, Korb A, Smolen J, Hoffmann M, Scheinecker C, van der Heide D, Landewe R, Lacey D, Richards WG, Schett G (2007) Dickkopf-1 is a master regulator of joint remodeling. *Nat. Med.* **13**, 156–163.
- Elnér SG, Yoshida A, Bian Z-M, Kindezelkii AL, Petty HR, Elnér VM (2003) Human RPE cell apoptosis induced by activated monocytes is mediated by caspase-3 activation. *Trans. Am. Ophthalmol. Soc.* **101**, 77–89. discussion 89–91.
- Flamendorf J, Agrón E, Wong WT, Thompson D, Wiley HE, Doss EL, Al-Holou S, Ferris FL, Chew EY, Cukras C (2015) Impairments in Dark Adaptation Are Associated with Age-Related Macular Degeneration Severity and Reticular Pseudodrusen. *Ophthalmology* **122**, 2053–2062.
- Fossat N, Chatelain G, Brun G, Lamonerie T (2006) Temporal and spatial delineation of mouse *Otx2* functions by conditional self-knockout. *EMBO Rep.* **7**, 824–830.
- Horbenko Del Blanco D, Romero CJ, Diaczok D, de Graaff LCG, Radovick S, Hokken-Koelega ACS (2012) A novel OTX2 mutation in a patient with combined pituitary hormone deficiency, pituitary malformation, and an underdeveloped left optic nerve. *Eur. J. Endocrinol. Eur. Fed. Endocr. Soc.* **167**, 441–452.
- Griffith TS, Brunner T, Fletcher SM, Green DR, Ferguson TA (1995) Fas ligand-induced apoptosis as a mechanism of immune privilege. *Science* **270**, 1189–1192.
- Gupta N, Brown KE, Milam AH (2003) Activated microglia in human retinitis pigmentosa, late-onset retinal degeneration, and age-related macular degeneration. *Exp. Eye Res.* **76**, 463–471.
- Hanisch U-K (2002) Microglia as a source and target of cytokines. *Glia* **40**, 140–155.

- He X, Hahn P, Iacovelli J, Wong R, King C, Bhisitkul R, Massaro-Giordano M, Dunaief JL (2007) Iron homeostasis and toxicity in retinal degeneration. *Prog. Retin. Eye Res.* **26**, 649–673.
- Housset M, Samuel A, Ettaiche M, Bemelmans A, Béby F, Billon N, Lamonerie T (2013) Loss of Otx2 in the adult retina disrupts retinal pigment epithelium function, causing photoreceptor degeneration. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **33**, 9890–9904.
- Lad EM, Cousins SW, Van Arnem JS, Proia AD (2015) Abundance of infiltrating CD163 + cells in the retina of postmortem eyes with dry and neovascular age-related macular degeneration. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* **253**, 1941–1945.
- Levy O, Lavalette S, Hu SJ, Housset M, Raoul W, Eandi C, Sahel J-A, Sullivan PM, Guillonneau X, Sennlaub F (2015a) APOE Isoforms Control Pathogenic Subretinal Inflammation in Age-Related Macular Degeneration. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **35**, 13568–13576.
- Levy O, Calippe B, Lavalette S, Hu SJ, Raoul W, Dominguez E, Housset M, Paques M, Sahel J-A, Bemelmans A-P, Combadiere C, Guillonneau X, Sennlaub F (2015b) Apolipoprotein E promotes subretinal mononuclear phagocyte survival and chronic inflammation in age-related macular degeneration. *EMBO Mol. Med.* **7**, 211–226.
- Martínez-Morales JR, Dolez V, Rodrigo I, Zaccarini R, Leconte L, Bovolenta P, Saule S (2003) OTX2 activates the molecular network underlying retina pigment epithelium differentiation. *J. Biol. Chem.* **278**, 21721–21731.
- Masuda T, Wahlin K, Wan J, Hu J, Maruotti J, Yang X, Iacovelli J, Wolkow N, Kist R, Dunaief JL, Qian J, Zack DJ, Esumi N (2014) Transcription factor SOX9 plays a key role in the regulation of visual cycle gene expression in the retinal pigment epithelium. *J. Biol. Chem.* **289**, 12908–12921.
- Nava P, Koch S, Laukoetter MG, Lee WY, Kolegraff K, Capaldo CT, Beeman N, Addis C, Gerner-Smidt K, Neumaier I, Skerra A, Li L, Parkos CA, Nusrat A (2010) Interferon- γ Regulates Intestinal Epithelial Homeostasis through Converging β -Catenin Signaling Pathways. *Immunity* **32**, 392–402.
- Owsley C, Jackson GR, White M, Feist R, Edwards D (2001) Delays in rod-mediated dark adaptation in early age-related maculopathy. *Ophthalmology* **108**, 1196–1202.
- Picard E, Le Rouzic Q, Oudar A, Berdugo M, El Sanharawi M, Andrieu-Soler C, Naud M-C, Jonet L, Latour C, Klein C, Galiacy S, Malecaze F, Coppin H, Roth M-P, Jeanny J-C, Courtois Y, Behar-Cohen F (2015) Targeting iron-mediated retinal degeneration by local delivery of transferrin. *Free Radic. Biol. Med.* **89**, 1105–1121.
- Reichman S, Terray A, Slembrouck A, Nanteau C, Orieux G, Habeler W, Nandrot EF, Sahel J-A, Monville C, Goureau O (2014) From confluent human iPS cells to self-forming neural retina and retinal pigmented epithelium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 8518–8523.
- Sennlaub F, Auvynet C, Calippe B, Lavalette S, Poupel L, Hu SJ, Dominguez E, Camelo S, Levy O, Guyon E, Saederup N, Charo IF, Rooijen NV, Nandrot E, Bourges J-L, Behar-Cohen F, Sahel J-A, Guillonneau X, Raoul W, Combadiere C (2013) CCR2(+) monocytes infiltrate atrophic lesions in age-related macular disease and mediate photoreceptor degeneration in experimental subretinal inflammation in Cx3cr1 deficient mice. *EMBO Mol. Med.* **5**, 1775–1793.
- Smith PD, Saini SS, Raffeld M, Manischewitz JF, Wahl SM (1992) Cytomegalovirus induction of tumor necrosis factor- α by human monocytes and mucosal macrophages. *J. Clin. Invest.* **90**, 1642–1648.
- Wenkel H, Streilein JW (2000) Evidence that retinal pigment epithelium functions as an immune-privileged tissue. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **41**, 3467–3473.
- Westenskow P, Piccolo S, Fuhrmann S (2009) Beta-catenin controls differentiation of the retinal pigment epithelium in the mouse optic cup by regulating Mitf and Otx2 expression. *Dev. Camb. Engl.* **136**, 2505–2510.
- Yamamoto H, Simon A, Eriksson U, Harris E, Berson EL, Dryja TP (1999) Mutations in the gene encoding 11-cis retinol dehydrogenase cause delayed dark adaptation and fundus albipunctatus. *Nat. Genet.* **22**, 188–191.
- Yang D, Elnér SG, Lin L-R, Reddy VN, Petty HR, Elnér VM (2009) Association of superoxide anions with retinal pigment epithelial cell apoptosis induced by mononuclear phagocytes. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **50**, 4998–5005.
- Yang D, Elnér SG, Chen X, Field MG, Petty HR, Elnér VM (2011) MCP-1-activated monocytes induce apoptosis in human retinal pigment epithelium. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **52**, 6026–6034.

Résumé :

Localisé entre l'Épithélium Pigmentaire Rétinien (EPR) et les segments externes des photorécepteurs, l'espace sous-rétinien est une zone immunosuppressive ; régulée par des signaux comme la thrombospondine-1 (TSP-1) ou Fas Ligand (FasL), qui empêchent l'accumulation des phagocytes mononucléés (PMs), en particulier des monocytes inflammatoires. La Dégénérescence Maculaire Liée à l'Age (DMLA) est associée à une rupture de l'immunosuppression de cet espace, et s'accompagne d'une accumulation de PMs ; causant la mort des photorécepteurs, la dédifférenciation de l'EPR et une néovascularisation pathologique. Des études d'associations génétiques ont établi un lien entre la DMLA et un haplotype qui affecte le locus 10q26, qui contient trois gènes : *PLEKHA1*, *ARMS2* et *HTRA1*. L'haplotype est associé à une augmentation de la transcription de *HTRA1* dans les lymphocytes ou les cellules de l'EPR. *HTRA1* code pour une sérine protéase qui a une multitude de substrats ; mais le mécanisme par lequel elle pourrait être impliquée dans la pathogenèse de la DMLA reste inconnu. TSP-1 est une glycoprotéine exprimée par l'EPR, les macrophages résidents et inflammatoires. Le domaine C-terminal de TSP-1 contient deux séquences VVM qui peuvent chacune interagir avec un récepteur CD47. Dans cette étude, nous montrons que HTRA1 clive TSP-1 et inhibe l'élimination des PMs régulée par l'interaction entre TSP-1 et CD47 à l'état physiologique, *in vitro* et *in vivo*. L'activation pharmacologique de CD47 nous a permis d'annuler les effets pro-inflammatoires de HTRA1 et pourrait représenter un espoir thérapeutique pour le contrôle de la progression de la DMLA chez les patients porteurs de l'haplotype à risque.

Mots-clés : HTRA1, TSP-1, CD47, Phagocytes Mononucléés, Immunosuppression, Dégénérescence Maculaire Liée à l'Age

The serine protease HTRA1 and subretinal inflammation in the context of Age-related Macular Degeneration

Abstract :

Localized between the Retinal Pigment Epithelium (RPE) and the photoreceptors outer segments, the subretinal space is an immunosuppressive zone, mediated by signals such as Thrombospondin-1 (TSP-1), Fas Ligand (FasL) that prevent the accumulation of Mononuclear Phagocytes (MPs) and in particular pathogenic inflammatory monocytes. Age related Macular Degeneration (AMD) is associated with a breakdown of this immunosuppressivity and an accumulation of MPs, which causes photoreceptor degeneration, RPE dedifferentiation and pathological neovascularization. Genome association studies showed a strong link between AMD and a relatively common haplotype of 10q26 locus that contains the *PLEKHA1*, *ARMS2* and *HTRA1* genes. The disease haplotype is associated with increased HTRA1 transcription in cell types such as lymphocytes and RPE cells. HTRA1 is a serine protease with a number of substrates, but the mechanism by which it might be involved in AMD pathogenesis is unknown. TSP-1 is a glycoprotein expressed by RPE, resident macrophages and inflammatory macrophages. The C-terminal domain of TSP-1 contains two VVM sequences that can each interact with a CD47 receptor. We show that HTRA1 induced subretinal MP accumulation is dependent on TSP-1 deactivation in an RPE/Mo co-culture model and in a laser induced inflammation model *in vivo*. This pathogenic effect of HTRA1 was reversible by synthetic CD47 agonists. Our study reveals a comprehensive mechanism how the risk-allele 10q26 participates in the pathogenesis of AMD and opens new therapeutic avenues to restore subretinal immunosuppressivity and inhibit the inflammation-dependent neurodegeneration.

Key words : HTRA1, TSP-1, CD47, Mononuclear Phagocytes, Immunosuppression, Age related Macular Degeneration