

Thèse de doctorat de l'Université Sorbonne Paris Cité

Préparée à l'Université Paris Diderot

**Ecole doctorale : Bio SPC 562**

Centre de Recherche des Cordeliers/ physiopathologie des maladies de la rétine : *de l'étude*  
des mécanismes aux avancées cliniques

# Dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) et voie du complément

Rôle de la voie alterne du complément dans la pathologie

Par Céline BORRAS

Thèse de doctorat de physiopathologie

Dirigée par le Dr. Virginie DINET

Présentée et soutenue publiquement Paris le 14 novembre 2018

Président du jury : **Pr. Voisin Pierre** : DR2, CNRS, Université de Poitiers, Poitiers

Rapporteurs : **Dr. Locker Morgane** : MCF, Université Paris Sud, Saclay

**Dr. Korobelnik Jean-François** : PU/PH, Université de Bordeaux, Bordeaux

Examineurs : **Pr. Voisin Pierre** : DR2, CNRS, Université de Poitiers, Poitiers

**Pr. Behar-Cohen Francine** : PU/PH INSERM, Centre de Recherche des Cordeliers, Paris

Directeur de thèse : **Dr Dinet Virginie** : CR2, INSERM, Centre de Recherche des Cordeliers, Paris

Membres invités : **Dr. Sylvie Jorieux** : Directeur de projet, LFB, Lille



SOMMAIRE	2
REMERCIEMENTS	8
PREAMBULE	9
ABREVIATIONS	12
INTRODUCTION	15
<b>I. <u>L'œil</u></b>	<b>15</b>
A) <u>Généralités</u>	15
B) <u>La rétine et Choroïde</u>	16
a) La choroïde	16
b) La membrane de Bruch	17
c) L'épithélium pigmentaire de la rétine : EPR	18
d) La neurorétine	20
e) Cellules gliales de la rétine : cellules gliales de Müller et cellules microgliales et astrocytes	22
C) <u>Vascularisation de la rétine</u>	24
<b>II. <u>Dégénérescence Maculaire Liée à l'Age (DMLA)</u></b>	<b>25</b>
A) <u>Généralités</u>	25
B) <u>Les drusen</u>	25
C) <u>Deux formes de la DMLA</u>	27
D) <u>Facteurs de risque</u>	29
a) Facteurs environnementaux	29
b) Facteurs génétiques	29
E) <u>Thérapies actuelles</u>	33
<b>III. <u>DMLA et processus impliqués</u></b>	<b>35</b>
A) <u>L'angiogenèse</u>	35
a) Facteurs pro-angiogéniques	36
i. <u>Le VEGFA</u>	
ii. <u>Le VEGFB</u>	
b) Facteurs anti-angiogéniques	38



i. <u>Le PEDF</u>	
ii. <u>La TSP1</u>	
B) <u>L'inflammation</u>	40
a) Recrutement des cellules microgliales et/ou macrophagiques	41
b) Molécule inflammatoire : CRP	42
C) <u>Stress oxydant</u>	43
a) Espèces réactives de l'oxygène (ERO)	43
b) Molécules antioxydantes	44
c) Stress oxydant et vieillissement	44
D) <u>Stress oxydant et DMLA</u>	47
E) <u>Mort cellulaire</u>	48
F) <u>Modèles expérimentaux</u>	51
<b>IV. <u>Le système du complément</u></b>	<b>53</b>
A) <u>Généralités</u>	53
B) <u>Voie alterne du complément</u>	56
C) <u>Régulation de la voie alterne</u>	57
a) Les inhibiteurs de la voie alterne du complément (VAC) au niveau des membranes cellulaires	<b>58</b>
i. <u>Le DAF</u>	
ii. <u>Le MCP</u>	
iii. <u>Le CR1</u>	
iv. <u>Le CR2</u>	
v. <u>Les CR3 et CR4</u>	
vi. <u>Le CD59</u>	
b) Les inhibiteurs de la VAC en phase soluble	59
i. <u>CFI</u>	
ii. <u>CFH</u>	
D) <u>Le facteur H du complément (CFH)</u>	60
a) Structure	60
b) Fonctions du CFH et des protéines associées CFHL1, CFHR1 à R5	61
i. <u>CFH like 1 : CFHL-1</u>	



ii. <u>CFH related : CFHR1 à R5</u>	
E) <u>Voie alterne du complément et DMLA</u>	63
a) Polymorphismes associés au complément et DMLA	65
b) Implication des molécules de la VAC dans les processus responsables du développement de la DMLA	66
F) <u>CFH et processus de la DMLA</u>	70
a) Polymorphisme Y402H du CFH et DMLA	70
b) CFH et inflammation	70
c) CFH et stress oxydant	72
d) CFH et angiogenèse	73
PROJET	75
RESULTATS	77
<b>Partie 1 - CFH et processus impliqués dans la DMLA</b>	<b>77</b>
<b>I. <u>Expression du CFH dans la rétine de patients atteints de la forme néovasculaire de la DMLA</u></b>	<b>77</b>
<b>II. <u>CFH et angiogenèse</u></b>	<b>78</b>
A) <u>Solution de CFH testés et préparation des animaux</u>	78
B) <u>Caractérisation des effets du CFH sur l'angiogenèse</u>	79
C) <u>L'effet anti-angiogénique du CFH n'est pas expression ou tissus dépendant</u>	82
D) <u>Caractérisation des effets du CFH sur les autres processus de la DMLA : Inflammation, voie alterne du complément et stress oxydant</u>	84
<b>III. <u>Fonctions des différents domaines du CFH dans la pathogénèse de la DMLA</u></b>	<b>86</b>
A) <u>Rôle des domaines CCP19-20 sur les différents processus impliqués dans la pathogénèse de la DMLA : angiogenèse/inflammation/stress oxydant</u>	86
B) <u>Rôle des domaines CCP6-8 et particulièrement du CCP7 sur les différents processus impliqués dans la pathogénèse de la DMLA : angiogenèse/inflammation/stress oxydant</u>	87
C) <u>Effets anti-angiogénique, anti-inflammatoire et anti-stress oxydant du CFH et</u>	



<u>activation de la voie alterne du complément : importance des domaines CCP1-4</u>	90
<b>IV. <u>Caractérisations des voies de transductions impliquées dans les effets</u></b>	
<b><u>« thérapeutiques » du CFH dans le modèle CNV</u></b>	<b>91</b>
A) <u>Profils d'expression des gènes codant pour les principales protéines impliquées dans l'angiogenèse/l'inflammation et le stress oxydant</u> Action du CFH sur le transcriptome de la rétine au cours de la CNV	92
B) <u>Effet d'un apport de CFH sur les profils d'expression des gènes codant pour les principales protéines impliquées dans l'angiogenèse/l'inflammation et le stress oxydant au cours de la CNV</u>	93
C) <u>Rôle du CCP7 et conséquence du polymorphisme Y402H</u>	95
<b>V. <u>Analyse du rôle anti-angiogénique du CFH indépendamment de son activité anti-inflammatoire</u></b>	<b>96</b>
<b>VI. <u>Schéma d'un mécanisme d'action possible de l'activité anti-angiogénique du CFH dans le modèle CNV</u></b>	<b>99</b>
<b>Partie 2 - CFH et mort cellulaire induite par un stress oxydant type 4HNE</b>	<b>101</b>
<b>I. <u>Contexte de l'étude</u></b>	<b>101</b>
A) <u>Généralités</u>	101
B) <u>Mise en œuvre de l'étude</u>	102
<b>II. <u>Identification des domaines CCP du CFH nécessaires pour protéger les cellules de l'EPR de la mort induite par un stress oxydant</u></b>	<b>103</b>
<b>III. <u>Effets du CFH sur les structures cellulaires des cellules de l'EPR</u></b>	<b>105</b>
A) <u>Jonctions serrées</u>	105
B) <u>Intégrité cellulaire</u>	107
C) <u>Analyse intracellulaire en microscopie électronique</u>	107
<b>IV. <u>Effet du CFH sur l'apoptose et la nécrose</u></b>	<b>108</b>
A) <u>CFH et apoptose</u>	108



B) <u>CFH et nécrose</u>	110
<b>V. <u>CFH, mort cellulaire et voie alterne du complément</u></b>	<b>110</b>
A) <u>Formation du MAC et stress oxydant</u>	110
B) <u>Analyse des effets du MAC sur les jonctions serrées des cellules de l'EPR</u>	111
C) <u>Analyse des effets du MAC sur la mort des cellules de l'EPR</u>	112
<b>VI. <u>Mécanisme d'action du CFH suite à l'induction d'un stress oxydant</u></b>	<b>113</b>
<b>DISCUSSION</b>	<b>114</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE</b>	<b>124</b>
<b>ANEXES</b>	<b>158</b>
Matériels et méthode des expériences de cultures cellulaire	
Liste des figures du manuscrit	
Papier publié	
Papier en soumission	



Titre : Dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) et voie du complément

Résumé : La DMLA, sous ses deux formes néovasculaire et atrophique, est la première cause de cécité dans les pays industrialisés. Seule la forme néovasculaire est traitée par des injections intravitréennes répétées d'anti-VEGFs. Les anti-VEGFs exercent un effet incomplet dans plus de 30% des cas au long cours malgré un traitement bien conduit et tous les patients ne répondent pas aux anti-VEGFs. En particulier, ceux portant le polymorphisme Y402H du facteur H (CFH) de la voie alterne du complément (VAC) seraient moins sensibles aux anti-VEGFs alors qu'ils présentent 7 fois plus de risque de développer une des deux formes de DMLA. L'objectif de ces travaux a été de caractériser les effets du CFH sur l'angiogenèse, l'inflammation, le stress oxydant et la mort cellulaire, ensemble des processus impliqués dans la pathogenèse de la DMLA. Nos résultats montrent que dans un modèle de néovaisseaux choroïdiens murins, le CFH 1- a une activité anti-angiogénique au moins aussi efficace que les anti-VEGFs non maintenue pour le polymorphisme, 2- a un effet anti-inflammatoire et anti-stress oxydant, et 3- protège de la mort les cellules de l'épithélium pigmentaire de la rétine préalablement soumises à un stress oxydant. Les domaines CCP1-4 inhibiteurs de l'activation de la VAC sont nécessaires pour son effet anti-inflammatoire mais pas pour son activité anti-angiogénique. Au contraire du domaine CCP7 qui est nécessaire pour tous les effets du CFH identifiés. Enfin, nous montrons que l'effet anti-angiogénique du CFH est dépendant de la production de thrombospondine-1. Ces résultats valident le CFH comme molécule médicament pour traiter la DMLA.

Mots clés : DMLA, CFH, VAC, Angiogenèse, inflammation, stress oxydant

Title : age-related macular degeneration (AMD) and complement pathway

Abstract : age-related macular degeneration (AMD), under its two forms atrophic and exudative, is the leading cause of blindness in the industrialized world. Actually, only the exudative form is treated by monthly intravitreal injections of anti-VEGFs. However, resistances of this treatment appear and patients with Y402H polymorphism of factor H (FH) of alternative pathway (AP) are no sensibles for anti-VEGFs while they presents 7 times more risk to develop one AMD forms. The aim of this study is to characterize the roles of FH in AMD process : neovascularization, inflammation, oxidative stress and cell death. Our results show that, FH 1- has an anti-angiogenic effect as well as anti-VEGFs, 2- has both anti-inflammatory and - stress oxydant effects and 3- protects from oxidative stress death retinal pigmentary epithelium cells. The AP-inhibitor CCP1-4 FH domains are essentials for its anti-angiogenic effect but not for its anti-inflammatory activity. Furthermore, the CCP7-FH domain is essential for reducing all DMLA process. Finally, we demonstrate that the FH anti-angiogenic activity is dependant of the thrombospondin-1 production. All together, these data validate FH as a potential AMD treatment.

Keywords : AMD, CFH, Angiogenesis, Complement pathway, Inflammation, oxidative stress



## REMERCIEMENTS

---

Je tiens, tout d'abord, à remercier ma directrice de thèse, le Dr Virginie Dinet, de m'avoir encadrée tout au long de ce travail et de m'avoir « appris » la recherche. De m'avoir communiqué son savoir et sa passion et d'avoir un optimisme à toute épreuve.

Je remercie le Pr Francine Behar-Cohen de m'avoir acceptée dans son laboratoire ainsi que d'avoir pris le temps de relire mon manuscrit.

Je remercie le Dr Morgane Locker de me faire le plaisir d'être membre de mon jury de thèse, en tant que rapporteur, après avoir déjà jugé mes deux années de Master.

Je remercie le Pr Jean François Korobelnik et le Pr Pierre Voisin de me faire l'honneur d'être membres de mon jury de thèse en tant que rapporteur et examinateur.

Je remercie le Dr Sylvie Jorieux et le Dr Abache Toufik pour leur soutien et leur participation au projet. Mais aussi pour les réunions scientifiques qui ont souvent permis de soulever des questions intéressantes.

Je remercie les membres de l'équipe 17, Mme Marie Christine Naud, Mr Laurent Jonet, Mme Emmanuelle Gélisé, Mme Julia Pardo, Mr Thierry Crevel et Mme Michelle Savoldeli pour l'aide, les conseils techniques et les moments passés ensemble. Le Dr Emilie Picard, le Dr Slavica Krantic, le Dr Yvonne de Kozak et le Dr Mohammed El Sanharawi, pour les discussions scientifiques et les autres. Tara, Quentin, et tous les étudiants passés dans le laboratoire pour les moments de joies comme de doutes.

Enfin je remercie mes parents, mes sœurs et mon homme, Lucas, de m'avoir soutenue, encouragée et supportée durant mes études et ce travail de thèse.

Je remercie également mes amis de m'avoir remonté le moral lors des périodes difficiles.



## PREAMBULE

---

Lors de mon cursus universitaire à l'université d'Orsay, j'ai réalisé différents stages encadrés par le Dr. Dinet et travaillé sur plusieurs sujets et notamment sur le rôle de l'APP/A $\beta$  et son homologue l'APLP2 dans la rétine, travail qui a débouché sur la publication d'un papier dans « *Molecular Brain* » dont je suis co-signataire. Puis, par choix j'ai bifurqué sur le sujet actuel de ma thèse qui a pour but d'identifier des cibles thérapeutiques de la DMLA et d'en comprendre leur mécanisme. Ce travail a permis de soumettre une publication dans "Nature Immunology" et fait l'objet de l'écriture d'un deuxième papier qui sera soumis dans les mois à suivre.

### **Rôle de l'APP/A $\beta$ et son homologue l'APLP2 dans la rétine**

#### *A) Contexte de l'étude*

La dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) est la première cause de perte de la vision centrale dans les pays industrialisés. Le premier facteur de risque de la DMLA est l'âge (15% de la population âgée de plus de 70 ans soit un million et demi de patients en France). Elle se présente sous deux formes, l'une atrophique ou sèche (80% des cas) et l'autre exsudative ou néovasculaire (20% des cas) (aujourd'hui on revoit ces chiffres et c'est plutôt 50/50). Aucun traitement de la forme atrophique n'existe, seuls des traitements anti-angiogéniques existent pour la forme exsudative. Les stades précoces de la DMLA sont caractérisés par des dépôts de matériels extracellulaires sous l'épithélium pigmentaire de la rétine (EPR), les drusen, qui sont un facteur de risque important de la DMLA. Les drusen entraînent un dysfonctionnement de l'EPR, qui ne joue plus alors son rôle de soutien à la rétine neurale. Ceci induit la dégénérescence des photorécepteurs, lieu du cycle visuel, d'où la perte de la vision. Une forte activation microgliale accompagne ce phénomène. Les drusen s'apparentent aux plaques séniles des patients atteints de la maladie d'Alzheimer et, comme elles, ils contiennent de l'amyloïde-Béta (A $\beta$ ). Chez ces patients, l'A $\beta$  est neurotoxique en induisant un stress oxydatif aboutissant à une perte de fonction des neurones de l'hippocampe et à leur mort. Le processus amyloïdogénique induit une forte réaction inflammatoire amplifiant la dégénérescence chez ces patients Alzheimer. De nouveaux traitements contre la maladie d'Alzheimer sont en voie de développement et ciblent spécifiquement l'A $\beta$  et son métabolisme. En revanche, les mécanismes à l'origine et impliqués dans le développement de la DMLA, ainsi que le rôle de l'A $\beta$  dans cette pathologie restent mal connus. Toutefois, il ne faut pas faire dans l'état des connaissances actuelles, un amalgame entre la maladie Alzheimer et les dégénérescences rétinienne pour lesquelles l'A $\beta$  est



retrouvé accumulé dans la rétine. Les voies pathogéniques proposées de la DMLA sont l'inflammation et le stress oxydatif. **L'identification des mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans la pathogenèse de la DMLA constitue donc un enjeu de santé publique, puisqu'elle permettrait de développer des stratégies thérapeutiques pour lutter efficacement contre cette pathologie.**

**Un des projets du Dr. Dinet à mon arrivée au laboratoire était de caractériser le ou les effet(s) de l'A $\beta$  sur les cellules rétinienne (cellules de l'EPR, photorécepteurs, cellules gliales de Müller), et 2- d'identifier les mécanismes cellulaires responsables de ces effets.** Toutefois, avant même d'analyser les effets d'un apport exogène d'A $\beta$  sur les cellules rétinienne, il fallait caractériser le rôle physiologique dans la rétine, jusqu'alors non connu, de son précurseur l'APP (précurseur de l'amyloïde bêta). Le Dr. Dinet a, donc, commencé par étudier le ou les rôle(s) de l'APP dans la rétine de souris, au cours du développement et chez l'adulte.

#### - Rôle de l'APP dans la différenciation de la rétine

Pour rappel, l'APP, qui est un récepteur transmembranaire de type I ubiquitaire, est un composant physiologique de la membrane cellulaire. L'APP est exprimé sous différentes formes : neuronale (APP-695) et non neuronale (APP-770 et -751) suite à des épissages alternatifs.

Les résultats montrent que l'APP est exprimé dans les différents types cellulaires se différenciant au cours du développement de la rétine ; et que l'inactivation du gène codant pour la protéine APP induit: 1- une désorganisation transitoire des couches synaptiques, 2- une diminution définitive de 50% du nombre de cellules amacrines de type glycinergique, 3- une augmentation transitoire de 52% du nombre de cellules horizontales, et 4- une expression anormalement prolongée de Ptf1a (Dinet et al., 2011), facteur de transcription qui est impliqué dans la détermination des rétino blastes en cellules amacrines et horizontales (Fujitani et al., 2006). A noter que l'APP ne joue aucun rôle sur l'apparition des photorécepteurs, des cellules gliales de Müller et de l'EPR. De plus ces résultats montrent une altération fonctionnelle des interneurons de la couche nucléaire interne (CNI) et notamment des cellules amacrines (onde OP3) dans la rétine de souris APP<sup>-/-</sup> (Ho et al., 2012).

#### B) rôle de l'APLP2 dans la différenciation de la rétine

Suite à ces résultats, je suis arrivée au laboratoire en stage de L2 afin d'étudier le ou les rôles d'un homologue de l'APP, l'APLP2, dans la différenciation de la rétine. Cette première approche du tissu rétinien m'a permis de mieux comprendre sa différenciation et son



fonctionnement : deux points essentiels pour mieux comprendre les dégénérescences qui lui sont associées.

Étant donné que l'APP possède un homologue, l'APLP2, dont le rôle dans la rétine saine n'était pas encore connu, des travaux similaires ont été réalisés pour déterminer si oui ou non l'APP et l'APLP2 ont des rôles redondants dans la rétine de souris normales. À l'aide de souris invalidées pour l'expression du gène codant pour l'APLP2 (APLP2<sup>-/-</sup>), nous avons entrepris des travaux pour savoir si l'APLP2 avait les mêmes effets que l'APP sur la rétine de souris. Nos résultats montrent que l'expression de l'APLP2 suit celle de l'APP dans les cellules rétinienne en cours de différenciation. En revanche, contrairement à l'APP, l'APLP2 n'a pas d'effet sur la différenciation des cellules amacrines mais sur celle des cellules bipolaires. En effet, nos travaux montrent que l'APLP2 joue un rôle dans la mise en place des jonctions synaptiques de la couche plexiforme externe établies entre les photorécepteurs et les cellules bipolaires, et 2- que l'APLP2 favorise la différenciation des cellules bipolaires de la rétine (Dinet et al., 2016). Par une analyse en RT-qPCR de l'expression de gènes impliqués dans le maintien de la structure et la fonction de la plexiforme externe, nos résultats montrent que la délétion de l'APLP2 induit un fort remodelage du transcriptome de cette synapse : avec une augmentation de l'expression des gènes codant pour des protéines « présynaptiques » (côté photorécepteurs) et au contraire une diminution de l'expression des gènes codant pour les protéines « postsynaptiques » (côté cellules bipolaires) (Dinet et al., 2016). L'ensemble de ces résultats montre un rôle différent non redondant de l'APLP2 et APP dans la différenciation de la rétine.

**Puis suite à ces résultats, j'ai décidé de suivre le Dr. Dinet dans un autre de ses projets : l'identification de cibles thérapeutiques pour traiter la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) et ce dès mon stage de master 1. Ce premier stage de L2 m'a permis néanmoins de mieux comprendre le fonctionnement de la rétine qui est un tissu complexe aussi bien dans sa différenciation que son fonctionnement.**



## ABREVIATION

---

4HNE :	4 hydroxynonenal
A2E :	Pyridinium bis-rétinoïde
ABCR :	ATP-binding cassette
ADN :	Acide désoxyribonucléique
APOE :	Apolipoprotéine E
AREDS :	Age-Related Eye Disease Study Research
ARN :	Acide ribonucléique
ARNm :	ARN messenger
ARPE19 :	Lignée cellulaire de l'épithélium pigmentée de la rétine humaine
CCG:	Couche des cellules ganglionnaires
CCL2 :	Chemokine (C-C motif) Ligand 2
CCP :	Complement control protein
CCR2 :	Chemokine (C-C motif) Receptor 2
CD39 :	MACip ou MAC inhibitory protein
CFB :	Complement facteur B
CFD :	Complement facteur D
CFH:	Complement factor H
CFHL1:	Complement factor H like 1
CFHR1 :	Complement factor H related 1
CFHR2 :	Complement factor H related 2
CFHR3 :	Complement factor H related 3
CFHR4 :	Complement factor H related 4
CFHR5 :	Complement factor H related 5
CFI :	Complement facteur I
CL- :	Clore
CL-/HCO3-/ :	Canal échangeur clore/bicarbonate
CNE:	Couche nucléaire externe
CNI:	Couche nucléaire interne
CNV :	Néovascularisation choroïdienne
CR1 :	Complement receptor 1 (CD35)



CR2 :	Complement receptor 2 (CD21)
CR3 :	Complement receptor 3 (CD11b/CD18)
CR4 :	Complement receptor 4 (CD11c/CD18)
CX3CL1 :	Fractalkine
CX3CR1 :	CX3C chemokine receptor 1
DAF:	Decay accelerator factor
DMEM:	Milieu Dulbecco modifié par Eagles
DMLA :	Dégénérescence maculaire liée à l'âge
EPR :	Epithélium pigmenté de la rétine
ERO :	Espèces réactive à l'oxygène
FBS :	Sérum veau foetal
Fas :	Récepteur de Fas L
Fas L :	Fas ligand
FGF :	Fibroblast growth factor
GABA :	Acide $\gamma$ -aminobutyrique
GNC3 :	Glomérulonéphrite chronique de type 3
GPI :	Glycosylphosphatidylinositol
GPX :	Glutathion peroxydase
GSH :	Glutathion SH
HTRA1 :	HtrA serine peptidase 1
IL1 $\beta$ :	Interleukin 1 beta
Il6 :	Interleukine 6
Il8 :	Interleukine 8
K :	Potassium
Kir :	K <sup>+</sup> inward rectifier
LDL :	Low Density Lipoprotein
LDH :	Lactate désydragenase
MCP :	Monocyte chemotactic protein
MCP :	Membrane cofactor protein
MDA :	MalonDiAldéhyde
MMPs :	Métalloprotéase matricielle
MPT :	Mitochondrial permeability transition
NADPH :	Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate
NO :	Monoxyde d'azote



ON :	Optic nerve
OPI:	Couche plexiforme interne
OPL:	Couche plexiforme externe
PAF :	Paraformaldéhyde
PBS :	Phosphate buffered saline
PEDF:	Pigment epithelium derived factor
RCA :	Regulation of complement activation
RIP :	Receptor interacting protein
SAMP :	Senescence accelerated mouse prone
SOD :	Superoxyde dismutase
tBHP :	tert-Butyl hydroperoxide
TBS :	Tris buffered saline
TSP1:	Thrombospondin 1
TSR1 :	Domaine de repetition 1
VAC :	Voie alterne du complément
VEGF:	Vascular endothelial growth factor
ZO1 :	Zonula occludens-1



# INTRODUCTION

---

## I. L'œil

### A) Généralités

L'œil est l'organe responsable de la vision et constitue le récepteur des rayons lumineux qu'il focalise afin d'en projeter une image sur la rétine. La rétine a pour rôle de transformer le message lumineux en influx nerveux qui sera alors conduit aux aires visuelles du cerveau (cortex) via les nerfs optiques. Pour cela la lumière doit traverser plusieurs structures : la cornée (barrière entre l'environnement extérieur et l'intérieur de l'œil), l'iris (orifice par lequel la lumière traverse l'œil), le cristallin (projection de l'image sur la rétine) et la neurorétine (tissus nerveux tapissant le fond de l'œil et permettant la transduction d'un message lumineux à nerveux) (Fig. 1).

- Le globe oculaire est défini comme un contenant formé de trois tuniques et d'un contenu. Ces trois tuniques sont (Fig. 1) : La tunique externe ou coque cornéosclérale. Cette tunique est constituée en arrière par un tissu fibreux de soutien nommé sclère. La sclère se prolonge vers l'avant par la cornée, tissu transparent. Sur la sclère viennent s'insérer les muscles oculomoteurs.
- La tunique intermédiaire, ou uvée, est constituée d'arrière en avant **a-** de la choroïde, qui est le tissu vasculaire responsable de la nutrition de l'épithélium pigmentaire et de la partie externe de la neurorétine, **b-** des corps secrètent l'humeur aqueuse, et **c-** de l'iris dans sa partie antérieure, circulaire perforée en son centre de la pupille.
- La tunique interne ou rétine, composée de la membrane de Bruch, de l'épithélium pigmentaire et de la neurorétine.

Le contenu est constitué de milieux transparents permettant le passage des rayons lumineux jusqu'à la rétine (Fig. 1) :

Chambre antérieure :

- L'humeur aqueuse est un liquide qui remplit l'espace entre l'iris et la partie la plus avant de la cornée. Ce liquide est secrété en permanence et contribue au maintien de la forme et de la pression intraoculaire de l'œil.



- Le cristallin, correspondant à une lentille convergente capable de se déformer via la contraction ou le relâchement des muscles ciliaires ce qui permet de concentrer les rayons lumineux. Le cristallin possède également une fonction de protection de par l'absorption d'une partie des ultra-violets (UV) et surtout de la lumière bleue reçue par l'œil.

Chambre postérieure :

- Le corps vitré correspondant à un gel aqueux transparent, il remplit les 4/5<sup>ème</sup> de la cavité oculaire et assure le tonus de l'œil et le maintien du contact entre la rétine et la choroïde.

## B) La rétine et choroïde

La rétine tapisse entièrement la face interne de la choroïde pour se terminer en avant par l'ora serrata. La membrane de Bruch sépare la choroïde de la rétine qui est constituée de l'épithélium pigmentaire de la rétine (EPR) et de la neurorétine qui est le tissu sensible aux photons. Il est à noter qu'il existe, uniquement chez les primates, une zone particulière de la rétine neurale appelée macula. La macula correspond à une petite zone (5mm) avasculaire située à deux diamètres papillaires du nerf optique et permettant la vision centrale (Fig. 1). En son centre, elle présente une petite dépression : la fovéa qui est responsable de l'acuité visuelle chez les mammifères.

### a) La choroïde

La choroïde est une des membranes nourricières de l'œil constituée d'un tissu conjonctif vasculaire lâche situé entre la rétine et la sclère. Elle constitue les 2/3 postérieurs du globe oculaire. L'épaisseur de la choroïde peut varier au cours de la vie de 10 à 30 µm. Ce système est vascularisé par l'artère ciliaire postérieure née d'une artère ophtalmique qui va alors irriguer l'iris, le corps ciliaire et la choroïde. Le débit choroïdien est le plus important de l'organisme (800ml/min). La choroïde se compose de trois niveaux distincts : la choriocapillaire, la couche de Sattler, et la couche de Haller. La choriocapillaire forme un réseau disposé en une nappe plane unique sous l'épithélium pigmentaire de la rétine auquel elle adhère par l'intermédiaire de la membrane de Bruch. Elle se compose de gros vaisseaux, comprenant artères et veines (Fig. 2). La choriocapillaire est constituée d'un réseau dense de capillaires de diamètre compris entre 40 à 60µm. L'épaisseur de cette couche est extrêmement fine puisque privée de péricytes (Société française d'ophtalmologie and Pournaras, 2008). Les cellules endothéliales la composant présentent de nombreuses fenestrations circulaires de 80nm de diamètre en regard



exclusivement de la membrane de Bruch et disposées en forme de mosaïques d'unités nommées : lobules. La principale fonction de la choriocapillaire est l'apport de nutriments et d'oxygène à la rétine externe qui est avasculaire. La choroïde, quant à elle, est approvisionnée essentiellement par les artères ciliaires postérieures et les artères ciliaires antérieures. La couche de Sattler est une couche de tissus conjonctifs très pigmentés et contenant des vaisseaux de moyen calibre. Cette couche est surmontée de la couche de Haller qui est également un tissu conjonctif pigmenté s'insérant dans la sclère. Cette couche choroïdienne contient de gros vaisseaux correspondant aux artères ciliaires postérieures. La choroïde, en plus de ces différentes couches de vaisseaux décrites ci-dessus, présente, non seulement, des fibres nerveuses, mais aussi, des cellules ganglionnaires isolées, chez les primates (Muller, 1859 ; Wang et al., 2018) réparties de façon irrégulière et absentes de la choriocapillaire. Chez l'Homme, ces cellules sont trouvées principalement au niveau de la fovéa ou elles constituent un réseau neuronal local (Société française d'ophtalmologie and Pournaras, 2008) . Ces cellules ganglionnaires pourraient être impliquées dans le contrôle du volume de la choroïde ou dans l'épaisseur de la choroïde (Société française d'ophtalmologie and Pournaras, 2008).

La choroïde est essentielle au bon fonctionnement de la rétine et est un tissu sécrétant du VEGF A. or cette molécule est fortement impliquée dans la pathogénèse de la DMLA. De plus, lors de cette pathologie il a été montré une réduction de l'épaisseur de la choroïde (Coscas et al., 2014), qui apparaît plus marquée au niveau de la fovéa (Wood et al., 2011). Cette diminution va fragiliser l'intégrité de la choroïde et peut être à l'origine d'une rupture entraînant la formation de néovaisseaux anormaux dans la région maculaire.

#### b) La membrane de Bruch

La membrane de Bruch sépare la choroïde de l'EPR et en régule l'approvisionnement en oxygène et nutriments (Fig. 2). Elle se compose de cinq couches distinctes :

- La lame basale choriocapillaire
- La couche collagénique externe
- La couche élastique
- La couche collagénique interne
- La lame basale de l'EPR



Ces couches sont principalement constituées de protéoglycanes, d'héparanes sulfates, de collagènes et de glycoprotéines. Cette composition permet à la membrane de Bruch de fixer des éléments de la circulation sanguine, comme certaines protéines de la voie du complément qui fait partie intégrante de l'immunité innée. Cette membrane forme également une barrière semi-perméable à travers laquelle une véritable régulation du passage des nutriments de la choriocapillaire aux cellules de l'EPR et aux photorécepteurs se met en place. Les déchets organiques sont éliminés par la choriocapillaire. Lors du vieillissement, la composition de la membrane de Bruch se modifie comme ce qui est observé dans les deux formes de la DMLA sèche (atrophique) et humide (néovasculaire). Au cours de l'âge, il peut aussi y avoir une accumulation de dérivés peroxydés, de phospholipides, de triglycérides, de cholestérols et d'espèces réactives à l'oxygène (ERO) dans cette membrane qui est progressivement altérée (Gardès-Albert et al., 2003). Du fait de ces caractéristiques la membrane de Bruch est une des premières cibles de la DMLA.

c) *L'épithélium pigmentaire de la rétine (EPR)*

L'EPR est constitué d'une monocouche de cellules polygonales à quatre faces appelées basale, apicale et latérales (Fig. 3). Les faces latérales sont les seules à être étroitement liées entre elles formant des jonctions serrées qui participent à la formation de la barrière hématorétinienne externe. Ces cellules sont caractérisées par une polarisation et la présence de villosités coté basal (choroïde / membrane de Bruch) et coté apical (photorécepteurs). Ces villosités correspondent à des invaginations de la membrane plasmique et permettent d'augmenter la surface d'échange entre l'EPR, les photorécepteurs et la choroïde. Du fait de leur polarisation, les cellules de l'EPR remplissent différentes fonctions et interviennent dans **a-** le transport sélectif transépithélial d'ions, d'eau et de métabolites, **b-** le métabolisme des photopigments (rhodopsine, opsines) des photorécepteurs qui sont les cellules photosensibles de la rétine, **c-** la phagocytose des segments externes des photorécepteurs et **d-** la sécrétion de facteurs de croissances tels que le VEGF ou de cytokines type interleukines IL6 et IL1 $\beta$ . Ces cellules sont pigmentées via la présence de mélanosomes. Ces derniers synthétisent de la mélanine qui a pour rôle de protéger les photorécepteurs d'un excès de lumière. Cette absorption entraîne l'oxydation de la mélanine, ce qui crée un radical stable échangeur d'électrons permettant de piéger les espèces réactives de l'oxygène (ERO) à l'origine de stress oxydant dans la rétine.



La face basale, dont les villosités font face à la membrane de Bruch et augmentent fortement les échanges avec la choriocapillaire située en dessous, a principalement un rôle dans la régulation des flux ioniques par transports actifs pour le potassium (K) et le chlore (Cl<sup>-</sup>) et par simple échangeur d'anions pour les Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> ou de cations pour le sodium. Ces villosités se trouvent diminuées avec l'âge impliquant une réduction des transports intercellulaires.

La face apicale présente des villosités se projetant sous l'espace rétinien en contact direct avec les photorécepteurs. Elle joue un rôle très important dans le renouvellement des segments externes des photorécepteurs, lieu de la phototransduction qui est le mécanisme moléculaire responsable de la transformation d'un message lumineux en influx nerveux. Ces derniers, étant fortement photo-oxydables, doivent être perpétuellement éliminés, et par conséquent, constamment renouvelés constituant la base même du cycle visuel. La survie des photorécepteurs dépend essentiellement du renouvellement de ses segments externes et ce pour maintenir un bon fonctionnement de la phototransduction donc de la vision. Outre cette fonction, les cellules de l'EPR synthétisent la matrice extracellulaire interphotorécepteurs qui est en contact direct avec les extensions des cellules gliales de Müller, véritables cellules de soutien pour la rétine. Cette zone est favorable à des échanges privilégiés entre les cellules de l'EPR et les photorécepteurs permettant la survie de ces derniers notamment via la sécrétion de facteurs neurotrophiques type VEGF ou FGF (Fibroblaste growth factor) (Strauss, 2005).

Les faces latérales forment des jonctions serrées entre elles séparant ainsi l'espace intercellulaire latéral de l'espace sous rétinien. En raison de ces jonctions, les cellules de l'EPR participent à la formation de la barrière hématorétinienne qui est responsable d'une véritable régulation sélective du passage de macromolécules entre les photorécepteurs et la choroïde. Ces jonctions serrées sont de type zonulae occludens (ZO) et se situent du côté apical (Fig. 4). Elles sont occlusives et forment une soudure membranaire assurant une imperméabilité essentielle au support morphologique de la barrière hématorétinienne, puisque sans elle, il serait impossible de maintenir les propriétés internes des cellules de l'EPR. La formation de ces jonctions repose sur la présence de deux protéines : **a-** la claudine, protéine transmembranaire avec deux boucles extracellulaires (une petite et une grande) et **b-** l'occludine, protéine transmembranaire à deux domaines extracellulaires et quatre zones transmembranaires. Ces protéines vont permettre le rapprochement des membranes plasmiques de deux cellules de l'EPR au point de créer une fusion, avec disparition des hémimembranes extra cytoplasmiques de chacune, puis une restructuration d'une nouvelle hémimembrane cytoplasmique provenant des deux cellules de l'EPR. Les complexes claudine/occludine sont connectés par les protéines



ZO1, ZO2 et ZO3, aux filaments d'actine intracellulaires qui participent à la formation de la jonction serrée (Fig. 4). Les jonctions serrées de l'EPR sont cependant des jonctions de faible résistance, atteignant environ 80 Ohm.cm alors que la résistance des épithéliums cornéens ou intestinaux est 50 à 100 fois plus élevés.

Au cours du vieillissement, des complexes d'agrégats lipidiques et protéiques, dont la lipofuscine qui est un pigment cellulaire composé de débris de molécules, vont s'accumuler entre l'EPR et les photorécepteurs (Wang et al., 2018). Ces agrégats contiennent aussi des métabolites du cycle visuel ainsi que du fluorophore N-retinyl-N-retinylidene ethanolamine ou AE2. Ce dernier peut se photo-oxyder et entraîner la libération d'ERO de type superoxyde tel que le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) source de stress oxydants. Dans la rétine, l'accumulation de lipofuscine augmente avec l'âge et provient de l'autophagie des mitochondries, du réticulum endoplasmique, des vésicules golgiennes et de la phagocytose des segments externes des photorécepteurs. La lipofuscine et l'AE2 sont associés à l'atrophie des cellules de l'EPR et à l'activation de la voie alterne du complément deux processus impliqués dans la pathogenèse de la DMLA (Sokolov et al., 2007; Sparrow et al., 2000).

#### d) La neurorétine

La neurorétine est le tissu sensoriel de la rétine et se compose de deux couches synaptiques et de trois couches neuronales constituées, elles-mêmes, de six types de neurones et interneurones et de cellules gliales (les cellules gliales de Müller, astrocytes et microglies). Chaque type cellulaire possède une place et une fonction bien spécifique dans ce tissu stratifié (Fig. 5).

Les trois couches de neurones et interneurones sont :

La couche la plus externe, ou la couche nucléaire externe (CNE), est composée exclusivement des corps cellulaires des photorécepteurs. Ceux-ci sont de deux types : **a-** les bâtonnets responsables de la vision scotopique, constituant chez l'homme les 95% de la population des photorécepteurs (92 à 100 millions) situés principalement en périphérie de la neurorétine et **b-** les cônes responsables de la vision diurne et colorimétrique correspondant à 5% des photorécepteurs et principalement concentrés dans la fovéa des primates. Il existe au moins trois types de cônes appelés vert, bleu ou rouge en fonction du photopigment qu'ils expriment appelés respectivement opsine verte, bleue et rouge. Les bâtonnets, quant à eux, expriment la rhodopsine. Les photorécepteurs se composent de segments externes



correspondants à un empilement de disques membranaires, d'un segment interne contenant notamment des mitochondries, d'un noyau et d'une terminaison synaptique (Fig. 6). Les disques membranaires des photorécepteurs, en constant renouvellement, sont le siège de la phototransduction, mécanisme responsable de la vision.

La couche nucléaire interne est composée des noyaux des cellules bipolaires et de deux types d'interneurones : les cellules horizontales et amacrines. Il existe deux types de transmission des signaux en provenance des photorécepteurs. Le premier, appelé « axe principal », met en jeu les signaux directement transmis des photorécepteurs vers les cellules bipolaires puis aux cellules ganglionnaires. Ainsi, schématiquement un axe principal (ou vertical) est constitué d'un photorécepteur relié à une cellule bipolaire elle-même en relation avec une cellule ganglionnaire. Le second axe de transmission permet, quant à lui, de relier toutes les informations issues des axes principaux entre elles et ainsi de construire une image complète, c'est l'axe horizontal. Les cellules amacrines et horizontales sont les interneurones permettant de relier les informations des axes principaux entre eux et ce avec des connexions dendritiques localisées dans les couches plexiformes. Les cellules amacrines, horizontales et bipolaires permettent ainsi de moduler et de prendre dans leur globalité les influx nerveux qui seront transmis ensuite aux cellules ganglionnaires puis aux aires visuelles du cerveau afin d'améliorer la précision de l'image.

La couche la plus interne est la couche des cellules ganglionnaires (CCG) localisée au contact de l'humeur vitré. Toutes les informations provenant des photorécepteurs, des cellules bipolaires et complétées par les cellules amacrines et horizontales convergent vers les dendrites des cellules ganglionnaires. Une fois traitées toutes ces informations vont être transmises aux aires visuelles du cerveau (Colliculus supérieur, corps grenouillé et aires visuelles du cortex) via le nerf optique qui est composé de l'ensemble des axones des cellules ganglionnaires. Cette couche contient également des astrocytes qui entourent les vaisseaux nourriciers de la rétine interne.

Il existe deux couches synaptiques, appelées couche plexiforme externe (CNE) et interne (CNI), permettant la transduction des influx nerveux des photorécepteurs aux cellules ganglionnaires via les cellules bipolaires, amacrines et horizontales.

La couche plexiforme externe est composée des terminaisons nerveuses des photorécepteurs, des cellules bipolaires et des cellules horizontales. Les neurotransmetteurs principaux sont le glutamate, neurotransmetteur activateur, l'acide gamma-amino-butérique



(GABA), acétyl choline et la dopamine, neurotransmetteurs modulateurs. Le glutamate est le principal neurotransmetteur des photorécepteurs et des cellules bipolaires permettant la transmission du signal nerveux vers la couche nucléaire interne puis vers la couche des cellules ganglionnaires. Les cellules horizontales sont, pour la plupart, des cellules gabaergiques, quant aux cellules amacrines, ce sont des cellules sécrétant plusieurs neurotransmetteurs comme la GABA mais aussi l'acétylcholine et la dopamine (Nguyen Legros 1987). Il y a deux types de synapses, la synapse superficielle et la synapse à ruban. Les synapses superficielles sont trouvées au niveau des cônes et ne font de connexions qu'avec les cellules bipolaires. La synapse à ruban est tripartite et connecte le photorécepteur à une dendrite de cellule bipolaire au centre et à deux dendrites ou axones de cellules horizontales de chaque côté (Fig. 7). Pour les cônes, ces synapses peuvent se répéter 15 à 20 fois contrairement aux bâtonnets qui n'en possèdent qu'une seule, compte tenu de l'étroitesse de leur pédicule synaptique.

La couche plexiforme interne est un enchevêtrement d'axones et de dendrites provenant des cellules ganglionnaires, des cellules bipolaires et des cellules amacrines. Dans cette zone, il y a formation synaptique entre les dendrites des cellules amacrines, ganglionnaires et les axones des neurones bipolaires. Les cellules amacrines forment un lien entre les cellules bipolaires et les cellules ganglionnaires mais aussi des synapses uniquement avec les cellules bipolaires dans le but de moduler le signal transmis permettant d'améliorer la précision de l'image reçue.

- e) Cellules gliales de la rétine : cellules gliales de Müller et cellules microgliales et les astrocytes

La rétine contient trois types de cellules gliales : les cellules gliales de Müller, qui proviennent comme les autres cellules de la rétine des rétinoblastes, les astrocytes et les cellules microgliales qui sont des cellules dérivées de l'hématopoïèse. Les cellules gliales de Müller traversent toute la rétine délimitant alors **a-** la limitante externe localisée au niveau des segments internes des photorécepteurs et **b-** la limitante interne localisée à l'interface de la rétine et du vitré (Fig. 5). Via leurs prolongements cytoplasmiques de part et d'autre de la rétine, ces cellules sont un véritable soutien structural pour le tissu et participent également à la formation de la barrière hématorétinienne avec les cellules de l'EPR. Outre ce rôle « mécanique » les cellules gliales de Müller régulent l'homéostasie rétinienne via l'expression de canaux à eau (aquaporine 1 à 4), maintiennent le pH intracellulaire, ajustent les niveaux de potassium en fonction des besoins via des canaux spécifiques (Kir4.1, Kir2.1) et participent à la détoxification



du glutamate principal neurotransmetteur de la rétine. Ces cellules jouent également un rôle important dans la régulation du stress oxydant induit par le cycle visuel en sécrétant des antioxydants dont notamment le glutathion (GSH) (Bringmann and Wiedemann, 2012).

Les astrocytes sont des cellules macrogliales de la rétine. Il s'agit de cellules stellaires à noyaux ovales. Elles sont localisées autour des vaisseaux dans la couche des fibres nerveuses contenant aussi les cellules ganglionnaires. Deux types d'astrocytes sont distingués, les astrocytes allongés, présents dans la couche des fibres nerveuses, et les astrocytes en forme d'étoile, présents dans la couche des cellules ganglionnaires (de Hoz et al., 2016). Les astrocytes, comme les cellules gliales de Muller, apportent aux neurones de la rétine un soutien physique ainsi qu'un apport en métabolites et en facteurs de croissance tel que le VEGF (de Hoz et al., 2016). Ces cellules gliales participent également a- au maintien de l'homéostasie des ions extracellulaires et des neurotransmetteurs, qui sont essentiels au traitement de l'information dans les circuits neuronaux et b- au métabolisme du glucose (de Hoz et al., 2016). Enfin, elles éliminent aussi les déchets métaboliques, régulent le flux sanguin local, qui joue un rôle fondamental dans la réponse immunitaire du microenvironnement, et protègent les neurones des dommages oxydatifs (de Hoz et al., 2016). Les astrocytes « non réactifs » sont des cellules non polarisées, alors qu'une fois activés, ils vont se polariser et présenter une asymétrie (avant/arrière) typique des cellules migratrices (Cárdenas et al., 2014; Peng and Carbonetto, 2012). Dans le but d'exercer un rôle de neuroprotection les astrocytes activés sont capables de sécréter des cytokines inflammatoires telles que l'IL-1 $\beta$ , l'IL-6 et l'IL-8, ainsi que des chimiokines, notamment la CCL2, CCL5, CCL20, CXCL10, CXCL12, CXCL1, CXCL2 et la CX3CL1 (de Hoz et al., 2016). Une astroglie réactive a été rapportée dans différentes pathologies rétinienne et notamment dans la DMLA, où un grand nombre d'astrocytes réactifs et hypertrophiques ont été trouvés (Ramírez et al., 2001). De plus, ces dernières semblent jouer un rôle non négligeable dans la phagocytose des résidus des cellules ganglionnaires mortes par nécrose ou apoptose (de Hoz et al., 2016).

Les cellules microgliales, cellules résidentes, participent, elles aussi, au maintien de l'homéostasie de la rétine. Dans un contexte physiologique normal les microglies non activées sont situées dans la partie interne de la rétine et notamment de la couche des cellules ganglionnaires à la couche plexiforme externe. Une fois activées ces cellules peuvent se rendre sur le site de lésion notamment au niveau de la couche des noyaux des photorécepteurs (CNE). La morphologie de ces cellules reflète leur activité. En effet, lorsqu'elles ont des noyaux ovoïdes et de longues et fines ramifications elles sont inactives alors que la présence de noyaux



amiboïdes et de ramifications courtes indique une activation de ces cellules. La migration des microglies activées est régulée, entre autres, par la sécrétion de la chemokine CCL2 (chemokine ligan 2) et l'expression de son récepteur CCR2 (C-C chemokine receptors type 2) (Hinojosa et al., 2011 ; Bose et al., 2016 ; Shambhunath et al., 2016). Une fois sur le site lésé, ces cellules sont capables de phagocyter les déchets métaboliques et les débris tissulaires résultants du stress subi par la rétine (Streit et al., 1988). L'axe de la chemokine CX3CL1/CX3CR1 est, quant à lui, impliqué dans la migration, l'adhésion et la survie/élimination des cellules microgliales activées (Combadière et al., 2007; Zeiss and Johnson, 2004). À la différence du CCL2, le CX3CL1 est une chemokine transmembranaire qui peut être clivée pour devenir soluble au site de lésion (Lucas et al., 2001; Schwaebler et al., 1998). Les principaux activateurs des cellules microgliales sont les cytokines pro-inflammatoires (IL6 et IL1 $\beta$ ) et les composants de la voie du complément (C3) (Gebicke-Haerter et al., 1998; Schuetz and Thanos, 2004).

### C) Vascularisation interne de la rétine

Alors que la couche nucléaire externe de la rétine n'est pas vascularisée, le seul réseau vasculaire propre au tissu est localisé dans la partie interne de la rétine et l'approvisionne en nutriments et oxygène. (Fig. 2). Ce réseau dérive de l'artère ophtalmique centrale qui se divise en deux branches supérieure et inférieure se subdivisant elle-même en deux branches nasale et temporale. Les artères et artérioles vont alors se diviser en capillaires rétiniens à jonctions serrées qui, à l'inverse de la choriocapillaire, ne sont pas fenêtrés et constituent la barrière hémato-rétinienne interne. Ce réseau rétinien se divise en trois couches, la couche superficielle à prédominance d'artérioles situées au niveau des cellules ganglionnaires, la couche intermédiaire située au niveau de la plexiforme interne et la couche profonde qui est localisée au niveau de la couche plexiforme externe. La rétine possède une forte consommation d'oxygène et représente donc le tissu le plus vascularisé de l'organisme avec un débit sanguin très élevé supérieur au débit cardiaque. Le réseau choroïdien permet lui d'apporter 85% des apports en oxygène à la rétine. Le réseau rétinien possède un débit beaucoup plus faible et autorégulé, sans intervention du système sympathique nécessitant la présence de facteurs locaux pour assurer le tonus vasculaire. La modulation du débit sanguin est alors assurée par les cellules endothéliales et les neurones rétiniens qui sécrètent du monoxyde d'azote (NO), des prostaglandines, des endothélines et des hormones comme l'angiotensine permettant une fine régulation du débit sanguin local (Furchgott and Zawadzki, 1980; Ignarro, 1990; Moncada et al., 1991). Ce système vasculaire est sous l'influence de nombreux facteurs pro- ou anti-angiogéniques tels que le VEGF, le PEDF et la TSP1 (thrombospondine 1) qui permettent de



réguler positivement ou négativement le réseau vasculaire par croissance des vaisseaux ou maintien d'un réseau préexistant sans néocroissance.

Au cours du vieillissement, le débit vasculaire et les diamètres vasculaires diminuent, contrairement aux résistances vasculaires qui augmentent (Jaeger et al., 2012). Les cellules endothéliales sont très sensibles aux stress oxydants dont l'accumulation, lors du vieillissement, entraîne un dysfonctionnement des cellules endothéliales associé à une redistribution des facteurs endothéliaux (Thorin-Trescases et al., 2010).

## **II. Dégénérescence Maculaire Liée à l'Age (DMLA)**

### **A) Généralités**

La DMLA est la première cause de cécité dans les pays industrialisés et touche 8% de la population française, soit 1,5 million de personnes sur les 8 à 10% des personnes de plus de 65 ans (Wong et al., 2014; communiqué de l'hôpital les "Quinze-Vingts", Paris 2009). Il est estimé que la prévalence doublera d'ici 2030, ce qui en fait un vrai problème de santé publique. Le principal facteur de risque est l'âge du patient avec l'apparition des symptômes vers 50 ans. En effet, sur les 8% seul 1% a entre 50 et 55 ans, 10% a entre 55 et 65 ans, 15 à 20% a entre 65 et 75 ans et 25 à 30% de la population a plus de 75 ans (communiqué de l'hôpital des « Quinze-Vingts » Paris). La DMLA est une pathologie multifactorielle résultant de la conjonction de facteurs environnementaux (cigarette, obésité et nutrition) et de facteurs génétiques (HTRA1 (serine protéase HTRA1), ABCR (ATP binding cassette), APOE (Apolipoprotéine E), CFH (Complement factor H) ...).

### **B) Les drusen**

Les drusen sont le premier signe clinique de la MLA (maculopathie liée à l'âge), forme en général non symptomatique qui précède la DMLA. Toutes les MLAs n'évoluent pas en DMLA. Les drusen, qui sont des dépôts de matériels extracellulaires localisés entre la membrane de Bruch et l'EPR, s'accumulent naturellement au cours du vieillissement (Fig. 8 et 10). Ces dépôts sont le reflet d'une accumulation de résidus et déchets protéiques provenant, entre autres, de la phagocytose par les cellules de l'EPR des segments externes photo-oxydés des photorécepteurs. Il est à noter qu'il existe un sous type de drusen, appelé « drusen bleus »,



pouvant être considérés comme un précurseur de DMLA est situé entre l'EPR et la rétine (Querques et al., 2006). En fond d'œil, les drusen s'apparentent à des petites lésions blanchâtres de formes et tailles variables. Les drusen trouvés chez les personnes saines sont en majorité observés en périphérie, de petites tailles et en faible quantité contrairement aux patients atteints de DMLA qui présentent des drusen larges et confluent au niveau de la macula.

La formation excessive de drusen pourrait avoir diverses origines : **a-** une sécrétion de matériels protéiques anormaux par l'EPR et les photorécepteurs **b-** une activité anormale des cellules de l'EPR qui vont dégénérer suite à un renouvellement excessif des segments externes des photorécepteurs **c-** ou encore un environnement inflammatoire associé à un stress oxydatif intense provenant de l'EPR et/ou de la choroïde entraînant l'accumulation excessive de protéines inflammatoires (exemple les protéines de la voie du complément), de lipides peroxydés (exemples MDA : malondialdéhyde et APOE) et d'autres résidus cellulaires.

Les drusen des personnes âgées non malades et de patients atteints de DMLA sont à 65% identiques (Crabb et al., 2002). Ils sont composés de lipides, de polysaccharides, de glycosaminoglycanes, de vitronectine, d'apolipoprotéine (APOE) ; de composants provenant des cellules de l'EPR elles-mêmes (lipofuscine, mélanine, ubiquitine et de l'abeta cristalline) et de la lame basale de l'EPR (collagène et laminine) ; et de protéines impliquées dans l'inflammation et notamment dans la voie du complément. Cependant, dans les drusen des patients atteints de DMLA, une plus grande proportion de protéines oxydées et de protéines associées à des dérivés oxydés d'acide docosahexaénoïque (DHA) est clairement observée (Crabb et al., 2002) De plus, il a été montré que les drusen contenaient la forme toxique de l'amyloïde beta chez les patients atteints de DMLA (Isas et al., 2010) sans pour autant montrer un lien direct entre DMLA et maladie d'Alzheimer.

Au cours du vieillissement, une accumulation excessive de drusen a des conséquences visuelles importantes pouvant entraîner une altération de la vision (lignes courbes ou apparition de zones floues) (Fig. 9). De plus, deux types de dépôts sont à prendre en compte, les dépôts laminaux basaux et les débris membraneux. Tous les deux apparaissent au cours du vieillissement et permettent de juger de l'avancement de la DMLA. Ces dépôts peuvent se développer autant dans la région maculaire que dans la région périphérique de la rétine (van der Schaft et al., 1993). En effet, l'accumulation de dépôts laminaux basaux tardifs est corrélée à l'apparition de dégénérescence visuelle et de l'EPR, toutefois, ce sont le nombre et les sites d'accumulation membraneux qui vont permettre de déterminer le risque de développer une DMLA forme



néovasculaire (Sarks et al., 2007). La présence de ces dépôts et drusen altère le fonctionnement des cellules de l'EPR et le cycle des photopigments des segments externes de photorécepteurs (Johnson et al., 2003). Ceux-ci sont alors retrouvés dans les corps cellulaires et les axones de ces cellules (Johnson et al., 2003). L'altération des fonctions des cellules de l'EPR peut retentir sur la phototransduction. Cette déstabilisation de la fonction des photorécepteurs pourrait être à l'origine d'une mort par apoptose de ces cellules aux abords des drusen (Dunaief et al., 2002).

### C) Deux formes de DMLA

La MLA est en général peu ou pas symptomatique et peut se stabiliser au cours de la vie du patient avec cependant une perception des lignes droites légèrement déformée et l'apparition de taches floues (Fig. 9). Néanmoins dans la moitié des cas, cette phase précoce dégénère, dans les 5 ans, en forme atrophique (ou sèche) ou néovasculaire (ou humide) de la DMLA entraînant une altération irréversible de la macula avec une perte de la vision centrale uni- ou bilatérale (Fig. 9). La forme précoce de la DMLA est caractérisée par la présence de 30% de drusen, ce taux augmente jusqu'à 50% dans la forme atrophique contrairement à la forme exsudative qui n'a qu'un taux de 20% de drusen (communiqué de l'hôpital des « Quinze-vingts » Paris, 2009). Selon le stade de développement de la DMLA les symptômes cliniques peuvent être discrets à handicapants (Age-Related Eye Disease Study Research Group, 2001). Cela se traduit par une baisse d'acuité visuelle, des difficultés à la lecture, une légère déformation de la forme des objets et par des lignes déformées (grille d'Amsler). À un stade plus avancé, des taches noires apparaissent dans le champ visuel dues à la formation d'hémorragies (scotome) et d'atrophies au niveau de la macula (Fig. 10).

La forme atrophique correspond à l'accumulation dans et autour de la macula de drusen formant de petites zones dites « atrophiques » de l'EPR associée à une mort des photorécepteurs par asphyxie (Green et Key, 2005) (Fig. 10). Cette forme de la maladie est lente et peut mettre plusieurs années à s'installer. L'atrophique touche 80 à 90% des patients atteints de DMLA, qui à terme perdent la vision centrale (de Almeida and de Souza, 2018; communiqué de l'hôpital des «Quinze-Vingts», Paris 2009 ). Cette est caractérisée par des zones hypo-autofluorescentes, par perte des cellules, bordées de zones hyper-autofluorescentes dues notamment à l'accumulation toxique de la lipofuscine (Holz et al., 2001). En effet la lipofuscine s'accumule normalement au cours de l'âge mais dans des proportions moindres (Van Bol and Rasquin, 2014). Ainsi, ces plages autofluorescentes précèdent l'atrophie de la rétine et la localisation de



celles-ci détermine la sévérité de la perte de la vision centrale en fonction de leur proximité de la macula (Holz et al., 2001). La forme atrophique est susceptible d'évoluer en forme humide et cela dans 30% des cas (Green and Key, 2005). Il n'existe pas de traitement actuellement, en dehors de supplément en vitamines et antioxydant, pour la forme atrophique de la DMLA malgré des tentatives d'essais thérapeutiques ciblant des molécules de la voie du complément (Do et al., 2014; Kaushal et al., 2009; van Lookeren Campagne et al., 2014). En revanche, de nouvelles avancées permettent aux chercheurs de tenter la mise en place d'une thérapie cellulaire selon laquelle une injection de cellules souches rétiniennes pourrait permettre de remplacer les cellules manquantes, et ainsi limiter la perte progressive des cellules responsables de la perte de vision centrale. Toutefois, la plus grande ambition des chercheurs, dans le cadre de cette forme de DMLA, réside dans la mise au point d'une rétine artificielle. En effet, ce dispositif est un implant capable de recevoir, via une caméra intégrée sur des lunettes, une image qui est alors transmise sous la forme de signaux électriques aux visuelles du cerveau. Trois dispositifs sont en cours d'évaluation, Argus II, (Second sight, Etats-Unis), Retina Implant (AG, Allemagne) et IRIS II (Pixium Vision, France). Argus II possède déjà une habilitation FDA et est commercialisé en France pour la rétinite pigmentaire (da Cruz et al., 2016; Kitiratschky et al., 2015; Stronks and Dagnelie, 2014).

La forme néovasculaire (ou humide) est caractérisée par l'apparition de néovaisseaux d'origine choroïdienne (dans la majorité des cas) sous l'épithélium pigmentaire (néovaisseaux de type 1) ou sous la rétine (néovaisseaux de type 2) Ces vaisseaux immatures exsudent entraînant un décollement séreux rétinien, un œdème rétinien et des hémorragies. Aux stades les plus avancés, une cicatrice fibreuse peut conduire à un scotome central (Fig. 11). Cette forme de la pathologie est très rapide et peut entraîner la perte de la vision centrale en quelques semaines. La forme humide est aujourd'hui traitée par des injections intravitréennes d'anti-VEGFs (ranibizumab, bevacizumab ou aflibercept) qui ont révolutionné la prise en charge de la DMLA humide permettant non seulement une stabilisation dans plus de 70% des cas à un an mais également un gain visuel dans environ 30% des cas à un an (marina study, NEJM). Néanmoins 20 à 30 % patients (porteurs du polymorphisme Y402H du facteur H de la voie alterne du complément) ne répondent pas ou peu aux traitements et 20% deviennent résistants (Brantley et al., 2007, 2009; Kloeckener-Gruissem et al., 2011; Rasmussen and Sander, 2014).



## D) Facteurs de risque

### a) Facteurs environnementaux

L'âge est le principal facteur de risque

La cigarette est un facteur environnemental non négligeable au développement de la pathologie avec un facteur d'augmentation de risque de trois à six fois (Lois et al., 2008; communiqué de l'hôpital les "Quinze-Vingts", Paris 2009 ). L'obésité est aussi un facteur aggravant augmentant de deux fois le risque de développer une DMLA, et plus particulièrement une forme atrophique de la DMLA (Natoli et al., 2018; Rowan and Taylor, 2016). Des apports en acides gras polyinsaturés (omégas 3), en antioxydants et en minéraux peuvent ralentir la pathologie (Age-Related Eye Disease Study Research Group, 2001; Couasnon et al., 2010). D'autres facteurs environnementaux existent comme une exposition prolongée à la lumière. En effet, la longueur d'onde de la lumière bleue (495nm), retrouvée actuellement dans les lumières à LED, a des risques d'être toxique pour la rétine du fait de son apport énergétique accru et susceptible, à de fortes concentrations, d'entraîner des dommages rétinien type DMLA (Behar-Cohen et al., 2011; Renard and Leid, 2016).

Ces divers facteurs environnementaux sont capables d'agir sur le développement de la pathologie. Mais ce versant de la pathologie est à la fois simple et difficile à gérer puisqu'il n'est pas à lui seul responsable de la pathologie.

### b) Facteurs génétiques

La DMLA se développe de façon privilégiée dans certaines populations d'individus souvent par hérédité. En 2013, une étude d'association de loci, menée sur 17000 patients atteints de DMLA avancée, sans distinctions de formes, et comparée à 60000 personnes saines, a permis de mettre en évidence 19 loci impliqués dans la pathogenèse de la DMLA (Fritsche et al., 2013). Ces loci impliquent des régions du génome qui ont des fonctions dans la régulation de la voie du complément, du métabolisme des lipides, du remodelage de la MEC et de l'angiogenèse (Leveziel et al., 2010). Parmi les principales régions impliquées sont distinguées les protéines APOE, ABCR, HTRA1, CX3CR1 et CFH (facteur H du complément).



L'apolipoprotéine (APOE): est une protéine retrouvée dans les drusen au cours du vieillissement (Gene ID : 348, 2018) (Klaver et al., 1998; Souied et al., 2007). Elle est impliquée dans le catabolisme des lipoprotéines riches en triglycérides. L'APOE est présente sous 3 isoformes (E2, E3 et E4) correspondant respectivement aux allèles  $\epsilon 2$ , 3 et 4. Selon l'expression de son isoforme, l'APOE est impliquée dans la pathogenèse de plusieurs pathologies de type DMLA et Alzheimer (Liu et al., 2013; Montine et al., 1997; Souied et al., 2007). Dans le cas de la forme néovasculaire de la DMLA, l'allèle  $\epsilon 4$  de l'APOE confère une protection contre le développement de la pathologie or c'est un facteur aggravant pour la maladie d'Alzheimer (van Duijn et al., 1994; Liu et al., 2013; Montine et al., 1997; Souied et al., 2007). En effet, l'expression de l'APOE ( $\epsilon 4$ ) diminue de 4 à 5 fois le risque de développer une DMLA (Klaver et al., 1998; Souied et al., 2007). De plus, il a été montré que les souris déplétées du gène ApoE- $\epsilon 4$ , et soumises à un régime enrichi en lipides, développaient des drusen, des zones atrophiques de l'EPR et une néovascularisation choroïdienne par rapport aux souris contrôles (Malek et al., 2005). Cette protection pourrait s'expliquer par l'incapacité de la molécule à dimériser les lipides, ce qui faciliterait l'élimination du cholestérol et des débris cellulaires au travers de la membrane de Bruch puisque le complexe formé est de taille plus petite (Souied et al., 2007). En revanche l'expression de l'allèle  $\epsilon 2$  de l'APOE augmente de 50% le risque de développer la forme néovasculaire de la DMLA (Baird et al., 2004; Klaver et al., 1998).

ABCR : (ATP binding transport) ce gène code pour une protéine de transport membranaire actif (Gene ID 24, 2018). Cette molécule a la particularité de n'être exprimée pratiquement que dans la rétine (Sun et al., 2000). ABCR est impliquée dans la réduction du trans-rétinal en trans-rétinol dans les segments externes des photorécepteurs lors du cycle visuel (Molday et al., 2009). Ce gène est connu pour entraîner le développement de la maladie de Stargardt lorsqu'il est muté (Kaplan et al., 1993). Cette maladie est une affection de l'œil liée à une altération progressive de la région maculaire (Allikmets et al., 1997) et présente des similitudes avec la pathogenèse de la DMLA avec une atrophie de l'EPR et des photorécepteurs observables dans les deux pathologies (Allikmets et al., 1997). Étant donné qu'une des cibles de la maladie de Stargardt est la macula, la mutation du gène ABCR a été fortement étudiée dans le contexte de la forme atrophique de la DMLA (Allikmets et al., 1997; Dryja, 1998 ; De La Paz et al., 1999). Toutefois, l'étude d'Allikmets et collaborateurs, qui avait montré un lien entre la présence du polymorphisme ABCR et le développement de la DMLA (Allikmets et al., 1997), a été très contestée du fait d'un groupe contrôle peu homogène (Dryja, 1998). Puis le



consortium de 18 équipes, qui ont participé à élucider les gènes possiblement impliqués dans la DMLA, se sont mis d'accord pour dire que deux polymorphismes du gène (G1961E and D2177N) ABCR sont associés à un risque accru de développer cette pathologie (The international ABCR screening consortium, 2000). En effet, ces polymorphismes étaient retrouvés plus fréquemment chez les patients atteints de DMLA par rapport au groupe control (The international ABCR screening consortium, 2000). De plus, dans certaines familles sont observées des petits enfants atteints de Stargardt alors que les grands parents sont atteints de DMLA (Souied et al., 1999), suggérant possiblement un lien entre ces deux pathologies. L'ensemble de ces données suggère un rôle non négligeable de la protéine lors du développement de la DMLA.

HTRA1 également nommé ARMS2. Ce gène code pour une sérine protéase qui a pour rôle de réguler la disponibilité des facteurs de croissance analogues à l'insuline (NCBI, gene ID 5654, 2018). Les mutations de ce gène sont connues pour entraîner une forme génétique de vasculopathie cérébrale (Hara et al., 2009). Toutefois, le rôle de cette protéine dans la rétine reste actuellement inconnu. Pourtant le polymorphisme (rs11200638) de ce gène a été mis en évidence comme facteur de risque de développer la DMLA (Leveziel et al., 2008). Les individus porteurs de ce polymorphisme, couplé au polymorphisme Y402H (Tyr402His) du facteur H de la voie du complément, présentent une susceptibilité de 57,6 fois de développer la DMLA (Rivera et al., 2005). L'ensemble de ces données suggère un rôle important de cette protéine dans le développement de la DMLA.

CX3CR1 (chemokine receptor) est un gène codant pour le récepteur de la chemokine CX3CL1. Ce ligand est exprimé dans de nombreux tissus mais plus fortement dans le cerveau, la rétine et le poumon et diffère des autres chemokines par le fait qu'elle puisse se retrouver sous une forme soluble ou transmembranaire (NCBI, Gene ID 6376, 2018) (Bazan et al., 1997; Pan et al., 1997). CX3CR1 est exprimé au niveau des lymphocytes (Imai et al., 1997) et des monocytes jouant ainsi un rôle dans la survie de ces dernières (Calippe et al., 2017; Landsman et al., 2009). Dans l'œil, CX3CR1 est constitutivement exprimé dans les neurones rétiniens et dans l'EPR (Silverman et al., 2003), et peut être exprimé par les cellules endothéliales vasculaires lors de lésion (Raoul et al., 2010; Silverman et al., 2003). De plus les cellules microgliales quiescentes de la rétine, expriment aussi CX3CR1 (Combadière et al., 2007; Raoul et al., 2010). Une des principales fonctions de CX3CL1/CX3CR1 est de réguler la survie/mort des cellules gliales (Tuo et al., 2004). Plusieurs polymorphismes (T / T280, T / M280) associés à CX3CR1 augmentent le risque de développer une DMLA (Tuo et al., 2004). En accord avec



cela, il a été montré une diminution de l'expression de CX3CR1 dans l'EPR et dans la rétine neurale des patients atteints de DMLA et notamment au niveau de la macula (Chan et al., 2005). Un autre argument, est l'observation d'un infiltrat microgliale/macrophagique augmenté dans la rétine de patients atteints de DMLA par rapport aux personnes contrôles du même âge qui est en faveur d'un rôle important de l'axe CX3CL1/CX3CR1 dans la pathogenèse de la DMLA puisque responsable de l'infiltration microgliales et macrophagiques (Raoul et al., 2010).

L'ensemble de ces données suggère un rôle important de l'axe CX3CL1/CX3CR1 dans le développement de la DMLA. Toutefois en 2011, une étude comparant 1093 patients atteints de la forme néovasculaire de la DMLA à 396 contrôles sains, la plus grande étude comparative à ce jour sur cette association CX3CR1/DMLA, ne retrouve pas de cause à effet pour les polymorphismes de CX3CR1 (Zerbib et al., 2011). D'autres études devront être menées pour lever le voile sur ces doutes.

**Facteur H du complément (CFH)**, ce gène code pour une glycoprotéine soluble essentiellement produite par le foie et constitutivement sécrétée dans la circulation sanguine (NCBI Gene ID 3075, 2018) (Walport, 2001). Toutefois, il existe une production locale au niveau des cellules de l'EPR de la rétine (Hageman et al., 2005a). Le CFH est un inhibiteur de l'activation de la voie alterne du complément. Les mutations de ce gène, plus d'une centaine, sont connues pour entraîner le développement de maladies rénales telles que le syndrome hémolytique et urémique atypique (aShu) et la glomérulonéphrite membranoproliférative de type 2 (GPNM 2) (Coffey et al., 2007; Loirat and Fremeaux-Bacchi, 2008; Noris et al., 2010). En effet, 30% des patients atteints de ces affections présentent une mutation du CFH. Ces mutations sont majoritairement situées sur les CCP18-19 et 20 entraînant la non reconnaissance des surfaces et la formation d'une protéine non fonctionnelle pouvant aboutir à une lyse des cellules endothéliales du rein (Loirat and Fremeaux-Bacchi, 2008). Pour le syndrome GPNM 2, plusieurs mutations du CFH peuvent entraîner une perte de capacité à inhiber l'activation de la voie alterne du complément en phase fluide entraînant un dérèglement de ce système qui va alors induire une inflammation aigue. L'un d'eux touche le CCP7 (C431S) (Servais et al., 2012). Les cellules épithéliales du rein, ou podocytes, présentant de nombreuses similitudes structurales et fonctionnelles avec les cellules de l'EPR, un rôle commun du CFH, sur la protection de ces types cellulaires de l'activation excessive de la voie alterne du complément, est fort probable mais sans être forcément identique. En effet, les patients atteints de GPNM 2 présentent assez rapidement au cours de leur pathologie des dépôts



rétiniens s'apparentant aux drusen présents dans le DMLA, mais ne développent pas forcément pour autant cette rétinopathie (Kim et al., 1992). En 2005, quatre-études, menées sur différentes cohortes de patients atteints des deux formes de la DMLA, ont montré que le polymorphisme Y402H du CFH est **LE facteur de risque le plus important** connu à ce jour pour développer cette neurodégénérescence rétinienne (Edwards et al., 2005; Hageman et al., 2005b; Haines et al., 2005; Klein et al., 2005), sans toutefois développer une maladie rénale. A l'état homozygote l'haplotype Y402H du CFH augmente de 7 fois le risque de développer la pathologie et de 2 à 3 fois pour un état hétérozygote (Schaumberg et al., 2007). Cette association Y402H-CFH et risque de développer une des deux formes de la DMLA a été confirmée en 2009 par l'étude Aliénor (Rougier MB et al., 2009). Ce polymorphisme a également été associé au risque de développer la maladie d'Alzheimer surtout lorsque l'individu possède l'allèle  $\epsilon 4$  de l'ApoE (Zetterberg et al., 2008). Toutefois, il est important de noter que les souris invalidées pour l'expression du gène codant pour la protéine CFH ne récapitulent pas l'ensemble des caractéristiques de la DMLA (Coffey et al., 2007), suggérant que ce facteur n'est pas à lui seul responsable de la pathogenèse de la DMLA. En effet, l'absence d'expression du CFH chez ces souris n'entraîne pas d'effet structural important sur la rétine jusqu'à l'âge de 3 mois, avec une vascularisation normale de la choriocapillaire, pas de diminution de l'épaisseur de la membrane de Bruch et pas de dépôts de C3 qui est le point de départ de l'activation du système du complément du (Coffey et al., 2007; Lundh von Leithner et al., 2009; Pickering et al., 2002). En revanche à l'âge de deux ans, ces souris présentent une réduction de l'acuité visuelle associée à une désorganisation des segments externes des photorécepteurs, une désorganisation des cellules de l'EPR, des dépôts sous rétiniens autofluorescents, un amincissement de la membrane de Bruch et une accumulation de C3 dans la rétine neurale et dans les vaisseaux rétiniens (Coffey et al., 2007; Lundh von Leithner et al., 2009; Pickering et al., 2002).

#### E) Thérapies actuelles

Actuellement, seule la forme néovasculaire de la DMLA est traitée, toutefois ce traitement n'est pas curatif et reste contraignant pour les patients de par sa fréquence et son coût (895 euros l'injection pour un œil). De plus, 20-30% des patients deviennent résistants à long terme (Rasmussen et Sander, 2014) alors que d'autres ne répondent pas aux anti-VEGFs (Brantley et al., 2007, 2009; Klockener-gruissem et al., 2011), d'où la nécessité de trouver d'autres approches thérapeutiques. Dans le cas de la forme sèche de la pathologie, n'ayant pas de traitement actif sur le marché les médecins conseillent à leurs patients de prendre des suppléments en vitamines et antioxydants susceptibles de ralentir la pathologie. En effet, l'étude



AREDS (Age related eye disease study) réalisée pendant 6 mois sur 3640 patients âgés de 55 à 80 ans a montré que l'apport quotidien de 500mg de vitamine C, 400UI de vitamine E, 15 mg de beta carotène et 80 mg d'oxyde de zinc permet le ralentissement de l'atrophie géographique observée sur la rétine des patients (AREDS 2013). L'ensemble de ces données montre qu'il est nécessaire et important de caractériser les mécanismes de la pathogenèse des deux formes de la DMLA et que ces recherches constituent réellement un enjeu de santé publique afin d'en identifier des cibles thérapeutiques potentielles.

Pour lutter contre la formation des néovaisseaux dans la forme néovasculaire de la DMLA, plusieurs traitements annexes des injections d'anti-VEGFs, qui est le traitement de référence, sont disponibles :

La thérapie photodynamique ou PDT basée sur l'utilisation d'un laser couplé à une injection (dans le bras) d'un produit photosensibilisant. La seule indication reste les formes polypoidales, en combinaison avec des anti-VEGFs ± corticoïdes

Les traitements aux anti-VEGFs agissent sur les phénomènes exsudatifs. (Penn et al., 2008). Le traitement consiste en des injections répétées dans le vitré de

- Lucentis (ranibizumab), a obtenu l'AMM en 2005
- Avastin (bevacizumab, GENENTECH) est utilisé hors AMM, toutefois il possède une AMM pour le cancer colorectal. Cette molécule a un poids moléculaire plus important (149kDa) que le Lucentis qui n'est qu'un fragment de l'Avastin.
- Eyléa (aflibercept) est une protéine de fusion recombinante composée des domaines extracellulaires des récepteurs au VEGF humain et d'un fragment Fc d'IgG humain. Sa structure lui permet de se lier au VEGFA, B avec une affinité supérieure à celle de leurs propres récepteurs et au PGF. La glycosylation de la molécule lui confère une demi-vie plus importante que le Lucentis (Avery et al., 2014). De plus, cette molécule en injection mensuelle pendant trois mois, puis bimensuelle, est aussi efficace qu'une injection mensuelle de Lucentis et permet de ralentir et d'améliorer la vue des patients (Heier et al., 2012; Schmidt-Erfurth et al., 2014).

Ces traitements médicamenteux, dont la molécule active est dirigée contre les effets du VEGF (A et/ou B), ont permis une avancée très importante dans le traitement de la forme néovasculaire de la DMLA, bien que cela ne cible qu'une conséquence de la pathologie sans la soigner. Cependant, il a été montré que 20 à 30% des patients ne répondent pas aux anti-VEGFs,



et notamment les patients portant le polymorphisme Y402H du CFH (Kloekener-Gruissem et al., 2011 ; Brantley et al., 2009) et que pour les patients répondeurs il peut y avoir une diminution de l'acuité visuelle sur le long terme (Rasmussen et Sander, 2014). Une étude récente a également mis en évidence que les traitements aux anti-VEGFs, bien qu'ils améliorent la vue en bloquant la progression de la néovascularisation, peuvent favoriser l'atrophie (Keir et al., 2017).

**C'est pourquoi il est important aujourd'hui de trouver une alternative aux traitements actuels.**

### III. DMLA et processus impliqués

#### A) L'angiogenèse

L'angiogenèse est un processus physiologique normal qui consiste à créer de nouveaux vaisseaux à partir d'anciens. Ce processus est impliqué dans le remodelage tissulaire, la réparation et la cicatrisation des tissus. L'angiogenèse débute à partir d'un réseau sanguin primitif composé de progéniteurs de cellules endothéliales : les angioblastes. Lors d'un manque en oxygène, des facteurs de croissance vasculaires sont sécrétés auxquels les angioblastes répondent par la déstabilisation d'un vaisseau mature en dégradant sa matrice extracellulaire (Fig. 12). La dégradation de la matrice requiert l'expression de protéinases MMPs (Métalloprotéase matricielle) (Chang et Werb, 2001). Des petits amas composés de cellules souches hématopoïétiques et d'angioblastes vont alors apparaître et former des bourgeonnements d'ilots sanguins (Fig. 12). A la formation des bourgeons s'ajoutent des processus de vasodilatation et de migration de cellules endothéliales. Les ilots vont alors fusionner pour former des tubes vasculaires du nouveau réseau (Fig. 12). Ces tubes sont entourés de cellules endothéliales différenciées et d'une matrice extracellulaire, qui sous l'influence de facteurs pro-angiogéniques, vont mûrir jusqu'à la formation de véritables canaux endothéliaux sur lesquelles se développe, à partir de bourgeonnement, le réseau lymphatique. Ce processus est régulé à l'aide d'un équilibre dynamique entre les facteurs pro- et anti-angiogéniques. Chez l'adulte, l'angiogenèse est à l'état quiescent, mais la rupture de l'équilibre de l'expression des facteurs pro- et anti-angiogéniques par un stimulus peut entraîner la formation d'une angiogenèse. La rupture de l'équilibre peut être induite par différents stimuli comme le manque d'oxygène (ischémie) et la production excessive de cytokines



inflammatoires. Si le déséquilibre perdure, un phénomène pathologique va se mettre en place, comme observé dans la forme néovasculaire de la DMLA.

L'angiogenèse est régulée par des facteurs pro- (VEGF, Angiopoïétine 1 et 2) et anti-angiogéniques (PEDF et/ou la TSP1 (thrombospondine1)). Une sécrétion accrue de VEGF est nécessaire pour initier l'angiogenèse chez l'adulte. L'angiopoïétine 1 est, quant à lui, un facteur pro-angiogénique permettant la maturation des néovaisseaux (Fagiani and Christofori, 2013), alors que la sécrétion excessive d'angiopoïétine 2 entraîne une déstabilisation des vaisseaux matures afin de permettre le bourgeonnement et la migration des cellules endothéliales (Lim et al., 2004). Au contraire, le PEDF est un facteur anti-angiogénique entrant directement en compétition pour la liaison aux récepteurs VEGFR1 et R2, avec le VEGF permettant de réguler la vascularisation rétinienne, en limitant la migration et la prolifération des cellules endothéliales (Zhang et al., 2006). La TSP1 est une protéine impliquée à la fois dans la prolifération des cellules endothéliales mais aussi dans leur mort par apoptose (Bigé et al., 2013; Mirochnik et al., 2008; Zhang et al., 2009).

#### a) Facteurs pro-angiogéniques

Les membres de la famille du VEGF, jouant un rôle déterminant dans la pathogenèse de la DMLA, seront développés dans ce chapitre de facteurs pro-angiogéniques.

Le terme VEGF représente une famille de glycoprotéines transmembranaires nommées VEGF A à VEGF D (Fig. 13). Ces molécules, issues d'un épissage alternatif, ont une composition commune caractérisée par la présence de 8 résidus cystéines et un domaine transmembranaire (Fig. 13). Les VEGFs sont nécessaires et impliqués dans les processus de néoformation de vaisseaux via : la vasculogénèse initiale, le remodelage angiogénique, le chimiotactisme, la différenciation des progéniteurs endothéliaux et la prolifération des cellules endothéliales (Adams et Alitalo, 2007). Au niveau de la rétine, le VEGFA et B est synthétisé par les cellules endothéliales des vaisseaux déjà présents, par les cellules de l'EPR, les cellules ganglionnaires mais aussi par les cellules gliales de Müller et les astrocytes (Campochiaro et al., 2013 ; Keir et al., 2017). In vitro, en co-culture avec des cellules de l'EPR, le VEGF induit la migration des cellules endothéliales (Geisen et al., 2006). Seuls les VEGFA et B seront développés dans ce chapitre, puisque ces deux derniers sont les molécules impliquées dans la pathogenèse de la DMLA.

i. Le VEGFA, est une molécule de 36 à 46 kDa, produite par les cellules endothéliales vasculaires et par les cellules de l'EPR de la rétine (Ambati et al., 2003). Outre ses effets pro-angiogéniques, le VEGFA sécrété par les cellules de l'EPR est indispensable au maintien



structurale et neurotrophique de la choriocapillaire (Ambati et al., 2003). Il est également nécessaire au développement du réseau vasculaire rétinien (Ferrara, 2001), et il a été montré, in vitro, qu'il entraîne la migration des cellules endothéliales choroïdiennes (Geisen et al., 2006). Le VEGFA, par sa liaison au récepteur VEGFR2, exprimé sur les cellules endothéliales, induit une prolifération et une augmentation de la perméabilité vasculaire de ces cellules (Campa et al., 2008; Yu et al., 2008). La double invalidation de l'expression des gènes codants pour le VEGFA et pour le récepteur VEGFR2 entraîne une diminution significative de la prolifération des néovaisseaux (Campa et al., 2008), suggérant ainsi un rôle de ces deux acteurs dans l'angiogenèse : processus impliqué dans la pathogenèse de la DMLA. Contrairement au VEGFR2, la fixation du VEGFA sur le récepteur VEGFR1 entraîne sa séquestration ce qui a pour conséquence la non stimulation de la néovascularisation (Fong et al., 1995). En effet, l'invalidation de l'expression du gène codant pour le récepteur VEGFR1 entraîne une prolifération excessive des vaisseaux sanguins (Fong et al., 1995) alors que son inactivation, par délétion d'une partie de son domaine cytoplasmique actif, n'a pas d'effet significatif sur la vascularisation (Hiratsuka et al., 1998), démontrant alors que ce récepteur exerce son effet sur la vascularisation en piégeant le VEGFA circulant.

En présence d'une hypoxie ou de réactions inflammatoires aiguës observées dans de nombreuses pathologies, les cellules de l'EPR et les macrophages vont sur-exprimer le VEGFA et entraîner une dérégulation de l'angiogenèse locale (Ramanathan et al., 2007). De même, une surexpression de VEGFA est observée dans la rétine de patients atteints de DMLA et est associée à une néovascularisation anormale avec perte de la vision (Fajnkuchen et Cohen, 2007), désignant cette molécule comme une cible thérapeutique de la DMLA.

ii. Le VEGFB, protéine de 42 ou 60 kDa (selon l'isoforme) est exprimé dans les tissus à haute activité métabolique comme le cœur, le cerveau ou l'estomac et dans les cellules endothéliales de la rétine (Bry et al., 2014). Le VEGFB se fixe uniquement sur le récepteur VEGFR1. En physiologie normale, le VEGFB n'a pas d'effet sur la néovascularisation. En effet quel que soit le tissu, le VEGFB n'a pas de rôle dans la mise en place de la vascularisation mais uniquement dans son maintien (Aase et al., 2001; Carmeliet et al., 2001; Dhondt et al., 2011; Yang et al., 2009). En revanche dans le cas d'une angiogenèse pathologique, comme dans la forme néovasculaire de la DMLA, la molécule étant surexprimée, a un possible effet de compétition de liaison avec le VEGFA pour sa liaison au VEGFR1 (Bry et al., 2014; Li et al., 2008). Cette compétition pourrait avoir comme conséquence la libération du VEGFA pour son autre récepteur VEGFR2 et donc l'augmentation de la vascularisation.



Le VEGF A et B, possède donc deux récepteurs à activité tyrosine kinase VEGFR1 et VEGFR2. Ces récepteurs sont transmembranaires (un domaine) avec une partie extracellulaire constituée de 7 domaines de type « immunoglobuline like » et un domaine cytoplasmique possédant l'activité tyrosine kinase (Fig. 14). Ces récepteurs fonctionnent par dimérisation et peuvent s'homodimériser ou s'hétérodimériser. Les récepteurs VEGF R1 et R2 sont exprimés aux surfaces des cellules endothéliales, des péricytes, des cellules inflammatoires mais aussi des cellules gliales (Müller, astrocyte) (Coscas, 2011; Gaddini et al., 2016; Michinaga, 2017; Weber et al., 2014). Comme vu précédemment, le VEGFR1 possède une forme soluble qui est responsable, lorsque le VEGFA se fixe, de la dégradation des membranes basales des cellules endothéliales (Coscas, 2011; Ferrara, 2001). Le VEGFR2, lorsque le VEGFA est fixé est responsable de la migration, la prolifération, la différenciation des bourgeonnements des cellules endothéliales (Ambati et al., 2003). Les VEGFA et B, en se fixant à leurs récepteurs situés sur les cellules endothéliales rétiniennes, les cellules de Müller et les astrocytes, sont impliqués dans l'angiogenèse via leurs effets pro-angiogénique sur les cellules endothéliales qui sont un des acteurs majeurs de la pathogenèse de la forme néovasculaire de la DMLA (Weber et al., 2013 ; Gaddini et al., 2016 ; Michinaga et al., 2017).

#### b) Facteurs anti-angiogéniques

Les principaux facteurs anti-angiogéniques impliqués dans les processus d'angiogenèse sont :

i. Le PEDF (pigment epithelium derived factor) ou Serpin F1 est une glycoprotéine de 50kDa sécrétée par les cellules de l'EPR et les cellules gliales de Müller (Eichler et al., 2004; Karakousis et al., 2001; Subramanian et al., 2010). Outre son effet neurotrophique, une des fonctions principales du PEDF est une activité anti-angiogénique qui se manifeste par l'inhibition de la migration, de la prolifération des cellules endothéliales (Dawson et al., 1999), mais aussi par l'inhibition de la vascularisation rétinienne induite par l'activation des récepteurs VEGFR1 et R2 (Cai et al., 2006; Zhang et al., 2006). En effet, le PEDF entre en compétition directe avec le VEGF pour sa liaison au récepteur VEGFR2 induisant alors, en fonction de la concentration de chacun, un processus pro- ou anti-angiogénique (Cai et al., 2006 ; Zhang et al., 2006). Ainsi, un déséquilibre en faveur d'une production excessive de VEGF et une diminution de sécrétion de PEDF va entraîner une angiogenèse importante favorisant le



développement de la pathologie, comme ce qui est observé par exemple dans la pathogenèse de la forme néovasculaire de la DMLA (Farnoodian et al., 2017). Une fois secrété en grande quantité, le PEDF peut aussi induire l'expression d'un autre facteur anti-angiogénique la TPS1. En effet, une surexpression de PEDF augmente significativement l'expression de TPS1 et diminue celle du VEGFA dans l'EPR (Farnoodian et al., 2017 ; Guan et al., 2004), suggérant un effet anti-angiogénique combiné par la diminution d'expression d'un facteur pro-angiogénique et au contraire l'augmentation de l'expression d'un facteur anti-angiogénique.

ii. La TSP1 (thrombospondine 1) est une glycoprotéine de 450 kDa qui fait partie d'une famille de cinq membres répartis en deux groupes A (forme homotrimérique) et B (forme homopentamérique). Cette protéine est exprimée par les cellules endothéliales, l'EPR, les macrophages et les monocytes (Jaffe et al., 1985; Reed et al., 1995; Zamiri et al., 2007). Chez l'adulte, son expression se limite aux tissus inflammatoires ou en cours de remodelage où elle va réguler l'activation et la prolifération des cellules endothéliales (Bigé et al., 2013). La TPS1 possède des propriétés anti-angiogéniques via non seulement un domaine procollagénique identique au domaine C du facteur von Willebrand, mais aussi, par la présence d'un domaine TSR1 (domaine de répétition 1) permettant une activité anti-angiogénique via une interaction avec le récepteur CD36 et également indispensable à l'activation du TGF beta (Fig. 15). La liaison du TPS1 au CD36, exprimé par les macrophages rétiens, favoriserait aussi la sécrétion d'IL6 (interleukine pro-inflammatoire), et inhiberait celle de l'IL10 (interleukine anti inflammatoire), lui suggérant un rôle de régulateur des réactions inflammatoires (Yamauchi et al., 2002). Outre ce site de liaison au récepteur CD36, la protéine TSP1 exerce une activité anti-angiogénique via sa liaison au récepteur CD47. En effet, la liaison de TSP1 sur ce récepteur va inhiber l'activité angiogénique du NO et inhiber l'activation de la voie de signalisation du VEGFA en phosphorylant le récepteur R2 qui devient inactif (Bijé et al., 2013). La liaison de TSP1 sur le récepteur CD47 joue également un rôle non négligeable dans survie des cellules T puisque cette liaison favorise l'entrée en apoptose de ces cellules (Bijé et al., 2013). La structure de la TPS1, comme le CFH de la voie alterne du complément, lui permet également de se lier aux glycosaminoglycanes (GAG) et donc de se lier à la membrane cellulaire, notamment des macrophages (Fig. 15). Les travaux récents de Calippe et collaborateurs ont montré que la liaison de TSP1 sur son récepteur CD47 pouvait être régulée par la liaison du CFH sur les membranes des macrophages de la rétine (Calippe et al., 2017).



## B) Inflammation

L'inflammation est une réaction du système immunitaire ubiquitaire et stéréotypée de l'organisme face à une agression quelconque. Il existe deux types d'immunité : innée et adaptative. La première est une réponse immédiate de l'organisme face à une infection ou à un traumatisme ponctuel, alors que la seconde confère à l'organisme une protection plus tardive mais plus durable faisant intervenir la production d'anticorps. Lors de l'inflammation trois phases sont observées :

1. Une phase dite vasculaire marquée par l'action de régulateurs modulant la prolifération, la migration et l'étanchéité des cellules endothéliales. Une des premières cellules à agir sur les vaisseaux sont les mastocytes, qui du fait de leur dégranulation rapide libèrent a- de l'histamine qui est responsable de la dilatation des vaisseaux, et b- un panel de cytokines enclenchant la réaction inflammatoire. Un des principaux activateurs des mastocytes est le produit de clivage C5a issu de l'activation de la voie alterne du complément qui fait partie intégrante de l'immunité innée (Klos et al., 2009). Ainsi, la dilatation des vaisseaux favorise l'infiltration des cellules inflammatoires (type macrophage) et des globules blancs. De même, la sécrétion de cytokines va accentuer cet appel aux macrophages afin de nettoyer la zone lésée.
2. La deuxième phase est une phase dite « cellulaire » où les macrophages nettoient la zone et permettent à l'immunité adaptative de se mettre en place.
3. La dernière phase de l'inflammation est une phase dite de « résolution ». En effet, dans le cas le plus simple, exemple d'une infection bactérienne, une fois les bactéries éliminées par les macrophages, un équilibre de la sécrétion entre les cytokines pro- et anti-inflammatoires va se mettre en place permettant alors au tissu lésé de retrouver un état physiologique normal, il n'y a pas de réaction inflammatoire aigue. Au contraire, lors de pathologies telle que la DMLA, les lésions de la rétine sont telles qu'elles entraînent une réaction inflammatoire non contrôlée néfaste à long terme pour le tissu endommagé.



#### a) Recrutements des cellules microgliales et/ou macrophagiques

Dans la rétine, afin de nettoyer la zone lésée il faut recruter des cellules dites « de ménage » : les cellules microgliales et /ou macrophagiques. Le recrutement de ces cellules est régulé notamment par l'axe chimio-attractant CCL2 (chemokine ligand 2 encore appelée MCP1 (monocyte chimioattractant protein 1) / CCR2 (C-C chemokines receptor type 2). En effet, CCL2, est une chimiokine de 13kDa, sécrétée par les cellules endothéliales et les macrophages, qui est impliquée dans le recrutement des monocytes, des polynucléaires basophiles et des lymphocytes sur le site lésé (Deshmane et al., 2009). L'ensemble de ces cellules, exprimant CCR2, migrent selon un gradient de sécrétion de la molécule CCL2, ce qui leur permet ainsi d'arriver au site où l'inflammation est apparue. Une altération de l'expression de cet axe entraîne une « non migration » des cellules inflammatoires sur le site endommagé, et par conséquent, une aggravation de la pathologie avec l'apparition d'œdèmes inflammatoires appelés également exsudats. Outre ce rôle au niveau inflammatoire, CCL2 peut réguler l'angiogenèse directement, en agissant sur les cellules endothéliales elles-mêmes, ou indirectement, via la production d'un intermédiaire. Dans le premier cas, cette chemokine favorise la migration et la prolifération des cellules endothéliales qui expriment son récepteur CCR2 (Owen and Mohamadzadeh, 2013; Salcedo et al., 2000), suggérant un rôle plutôt pro-angiogénique de CCL2. De plus, l'invalidation de l'expression du gène codant pour la chemokine CCL2 diminue la surface de néovascularisation induite par laser dans le modèle murin de néovascularisation choroïdienne (Bonyadi et al., 2017; Liu et al., 2011; Robbie et al., 2016), confirmant un rôle pro-angiogénique de CCL2. Le polymorphisme associé à CCL2 (rs4586) a été mis en évidence dans le risque de développer la DMLA, avec une augmentation du taux de CCL2 dans la rétine de patients atteints de DMLA, toutes formes confondues, comparés à des personnes du même âge mais sans problème majeur de la vision (Anand et al., 2012). L'ensemble de ces données montre qu'il peut s'avérer nécessaire de diminuer l'expression de « l'axe CCL2/CCR2 » afin de réduire, donc de mieux contrôler, l'infiltration microgliale/macrophagique qui, en excès, peut être aussi toxique pour le tissu et avoir un effet pro-angiogénique. Dans le cas d'une action indirecte, CCL2 attire des cellules exprimant des TAMs (TAM tyrosine kinase receptor) qui favorisent la sécrétion, non seulement, de molécules pro-angiogéniques tels que le VEGF, le TGF beta et/ou l'IL8, mais aussi, d'enzymes protéolytiques MMP 2 et 9 permettant la déstabilisation du réseau vasculaire préexistant (Brault and Kurt, 2005; Gu et al., 2000). Par conséquent, ceci va favoriser la prolifération et la migration



des cellules endothéliales afin de former de nouveaux vaisseaux (Mantovani and Sica, 2010; Owen and Mohamadzadeh, 2013), démontrant là aussi une activité pro-angiogénique de CCL2.

En résumé, CCL2 favorise, d'une part, l'infiltration microgliale/macrophagique, processus plutôt positif pour nettoyer la zone de lésion à condition que celle-ci soit contrôlée (Deshmane et al., 2009), et d'autre part, a une activité pro-angiogénique qui sur le long terme est néfaste pour le tissu (Low-Marchelli et al., 2013). Ces données suggèrent donc qu'un équilibre entre inflammation et angiogenèse doit être trouvé pour que le tissu continue à fonctionner correctement. Le stress oxydatif joue un rôle non négligeable dans cette régulation. La sécrétion de CCL2 par les cellules de l'EPR est en effet augmentée en présence d'ERO (Lin et al., 2013), soulignant le lien entre stress oxydant et inflammation dans la pathogenèse des deux formes de DMLA. **Ces données démontrent une implication non négligeable de l'axe CCL2/CCR2 dans la pathogenèse de la DMLA et notamment dans chacun des processus qui la compose.**

#### b) Molécule inflammatoire : CRP

La C réactive protein (CRP) est une protéine inflammatoire de 251 kDa faisant partie de la famille des pentraxines. Cette molécule est un marqueur précoce de l'inflammation. Elle est constituée de 5 sous unités dans sa forme pentamérique mais peut également être trouvée sous forme monomérique après dissociation du pentamère (Luc et al., 2006). Ces deux formes confèrent des activités opposées à cette molécule. En effet, la forme pentamérique est anti-inflammatoire contrairement à la forme monomérique qui est pro-inflammatoire (Chirco et al., 2016). La CRP fixe les polysaccharides microbiens et les membranes des cellules endommagées entraînant alors l'activation de la voie du complément afin de recruter des cellules phagocytaires (Ripoche et al., 1989 ; O'Flynn et al., 2016). La liaison de la CRP pentamérique avec le CFH favorise sa liaison sur les cellules endommagées, et réduit la formation à la membrane du pore de lyse MAC, produit final de l'activation du système du complément (Mold et al., 1999). La CRP contribue donc à l'activité inhibitrice du CFH. Ce système d'inhibition par le CFH permet, non seulement, d'empêcher la lyse de la cellule du soi endommagée mais limite aussi la réponse inflammatoire. Une forte concentration de la forme monomérique de la CRP a été observée au niveau de la choriocapillaire et la membrane de Bruch des patients atteints de DMLA porteurs du polymorphisme Y402H du CFH (Chirco et al., 2016), suggérant un lien étroit entre CRP et CFH. La CRP est également retrouvée dans les dépôts sub-EPR associés à un risque majeur de développer une DMLA et favorise la migration des cellules endothéliales



(Chew et al., 2014 ; Chirco et al., 2016). Toutes ces données sont en faveur d'un rôle important de la CRP dans la pathogenèse de la DMLA.

### C) Stress oxydants

#### a) *Espèces réactives de l'oxygène (ERO)*

Le stress oxydant résulte d'un déséquilibre entre la formation d'espèces réactives de l'oxygène et les défenses antioxydantes de l'organisme, et ce en faveur de la formation excessive des ERO. Les ERO sont des molécules hautement réactives à l'oxygène qui peuvent entraîner de nombreux dommages cellulaires. Le mode de vie (tabagisme, alcoolisme, obésité, exercice physique intense) et les mauvaises habitudes alimentaires augmentent de façon anormale la production d'ERO dans l'organisme. Au cours du vieillissement, ce déséquilibre peut entraîner l'apparition de pathologies diverses comme la DMLA (forme atrophique et néovasculaire) mais aussi des maladies cardiovasculaires et des cancers.

Dans des conditions physiologiques, la cellule produit des ERO provenant essentiellement de l'utilisation excessive de l'oxygène, susceptibles d'entraîner des effets dommageables dans l'organisme. Les ERO sont des espèces chimiques oxygénées de type radicaux libres, ions oxygénés ou produits peroxydés rendus très réactifs en présence d'électrons. Il peut s'agir de :

- L'anion superoxyde,
- De l'oxygène singulet,
- Du radical hydroxyle,
- De radicaux libres secondaires
- De peroxyde d'hydrogène

Les cellules puisent leur énergie sous forme d'ATP de la chaîne respiratoire mitochondriale qui joue un rôle essentiel en couplant l'oxydation de coenzymes transporteurs d'hydrogènes ou d'électrons avec la phosphorylation de l'ADP en ATP. Cette activité est essentielle à la vie avec un apport énergétique important pour les cellules (36 ATP par réduction de l'oxygène). Paradoxalement, l'utilisation de l'oxygène entraîne la formation d'ERO due à une petite fuite d'électrons dans la chaîne respiratoire réagissant directement avec l'oxygène. Ces ERO sont principalement produits dans les complexes 1 et 3 de la chaîne respiratoire (Fig. 16). Cependant, le complexe 1 libère les ERO uniquement dans la mitochondrie qui sont détoxifiés sur place contrairement au complexe 3 qui peut libérer les ERO hors de la mitochondrie. Le processus de respiration fait de la mitochondrie la principale source d'ERO dans l'organisme, mais leur



formation est également due au métabolisme du réticulum endoplasmique, des peroxysomes et aux oxydations cellulaires (Gardès-Albert et al., 2003). Dans des conditions physiologiques, les ERO jouent un rôle dans la régulation de l'apoptose et l'activation de facteurs de transcription (Gardès-Albert et al., 2003). En revanche, une production excessive d'ERO crée un environnement néfaste pro-inflammatoires (Gardès- Albert et al., 2003). Toutefois, l'organisme possède plusieurs moyens d'éliminer les ERO formés. Deux sources de production de molécules antioxydantes se distinguent : les sources alimentaires sous forme de fruits et légumes comme la vitamine C, E les caroténoïdes etc. ; et les sources endogènes se composant d'enzymes, comme par exemple : la superoxyde dismutase (SOD), le glutathion peroxydase (GPX), la peroxyde, catalase et les protéines de réparation des dommages nucléaires comme les endonucléases (Gardès- Albert et al., 2003).

#### b) Molécules antioxydantes

La superoxyde dismutase (SOD), est une enzyme catalysant la dismutation de l'anion superoxyde en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, alors pris en charge par les enzymes de type peroxydase. Il en existe trois formes : les formes cytosolique et/ou nucléaire (SOD1), la forme extracellulaire (SOD3) et la forme mitochondriale (SOD2) qui permet la dismutation quasi instantanée de l'anion superoxyde dans la chaîne de transport d'électrons mitochondriale.

La glutathion peroxydase (GPX) joue un rôle central dans l'élimination de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et des lipides peroxydés. Elle nécessite la présence du glutathion (GSH) comme donneur d'électrons (Flohé, 1971; Rotruck et al., 1973). Il existe plusieurs formes de GPX : GPX1 cytosolique, la GPX2 présente notamment dans le foie et le colon, la GPX3 extracellulaire présente dans le plasma et la GPX4 phospholipide hydroperoxydase cytosolique ou mitochondriale (Ursini et al., 1995).

La catalase permet la transformation de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en eau et oxygène. Elle est présente dans le peroxysome mais aussi dans le cytosol (Bienert et al., 2007). La catalase ne fonctionne qu'en cas de forte concentration d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

#### c) Stress oxydant et vieillissement

Au cours du vieillissement, la formation d'ERO augmente en échappant aux défenses antioxydantes. Les principales cibles des ERO sont les acides nucléiques, les protéines et les lipides. En ce qui concerne l'ADN, cible privilégiée des ERO, la guanine peut réagir avec un OH ce qui aura pour conséquence la liaison avec l'adénine en lieu et place de la cytosine



entraînant alors l'apparition d'une mutation pouvant être à l'origine de certains cancers (Gardès-Albert et al., 2003). Les acides aminés des protéines sont plus ou moins susceptibles de réagir avec les ERO. Les plus réactifs sont l'histidine, la proline, le tryptophane, la cystéine et la tyrosine. L'oxydation de certains résidus entraîne, entre autres, l'apparition de groupements carbonyles ou des clivages responsables de fortes modifications fonctionnelles (Gardès-Albert et al., 2003). De plus, la formation d'agrégats de protéines s'accumule dans les cellules et dans le compartiment extracellulaire (Tyedmers et al., 2010). Outre l'accumulation des ERO au cours de l'âge, un radical hydroxyle est capable d'arracher un hydrogène sur les carbones situés entre deux liaisons d'acides gras polyinsaturés. Cette première étape induit la formation de lipides peroxydés sur l'ensemble de la bicouche lipidique. Il en résulte alors une altération de la fluidité membranaire responsable de la mort cellulaire. La non régulation de cette réaction en chaîne aboutit à la formation de lipides peroxydés **de type malondialdéhyde (MDA) ou de type 4 hydroxynonéal (4HNE)**, deux molécules à fort potentiel oxydant et fortement produits dans la rétine de patients atteints de la forme atrophique de la DMLA (Bellmann and Sahel, 2008; Schutt et al., 2003). Le 4HNE est cependant le composé le plus toxique issu de peroxydation lipidique. L'attaque radicalaire des lipoprotéines circulantes aboutit à la formation de LDL qui seront alors captés par les macrophages (Hoff et al., 1989). Les LDL oxydés induisent une réaction immunogène avoisinante, une activation de la voie alterne du complément et une sécrétion de cytokines pro-inflammatoires par les macrophages (Haleng et al., 2007; Saad et al., 2006).

Lors de la réception de la lumière sur la rétine, les photorécepteurs, excités par les photons, vont entamer la phototransduction au niveau de leurs segments externes. Le récepteur du photon, le photopigment, est constitué de l'association d'une opsine et d'un chromophore nommé le 11-cis-rétinal. Chaque type de cône exprime une opsine particulière, sensible à une longueur d'onde donnée. L'opsine spécifique des bâtonnets est la rhodopsine. Lors de l'absorption d'un photon il y a isomérisation du 11-cis-rétinal en trans-rétinal, forme la plus stable de la molécule. L'opsine photo activée va, à ce stade, interagir avec la transducine (protéine G hétérotrimérique). la transducine activée chélate les sous unités inhibitrices P $\gamma$  de la phosphodiesterase permettant de libérer les sous unités catalytiques. Cette activation entraîne une chute du taux de GMPc provoquant alors la fermeture des canaux cationiques membranaires menant à une hyperpolarisation. La phototransduction à recours à de nombreuses réactions chimiques d'oxydation, entraînant la formation de dérivé oxydé et de peroxydation lipidique, faisant des photorécepteurs une cible privilégiée des réactions photo-oxydation. En



effet, les protéines et lipides endommagés s'accumulent chaque jour au sein des segments externes des photorécepteurs

Ce phénomène est basé sur la disponibilité du 11-cis-retinal d'où l'importance capitale du recyclage, par les cellules de l'EPR, des disques des photorécepteurs continuellement soumis aux dommages oxydatifs générés lors de la phototransduction (Couasnon et al., 2010). Le bon fonctionnement du cycle visuel est donc inerrant au recyclage des disques membranaires des photorécepteurs et à la détoxification du stress oxydatif perpétuellement induit par la phototransduction. Or au cours du vieillissement, ce recyclage est moins efficace ce qui pourraient expliquer, en partie, le rôle du stress oxydant dans la pathogenèse de la DMLA.

L'EPR et la membrane de Bruch sont des cibles directes des effets du vieillissement et notamment du stress oxydant. Or, une activité accrue du monoxyde d'azote (NO) augmente la formation de GMPc, véritable médiateur moléculaire activant les voies de signalisation impliquées dans l'angiogenèse. Ce processus est observé dans la pathogenèse de la forme néovasculaire de la DMLA (Koch et al., 1994 ; Haleng et al., 2007 ; Ando et al., 2002). Un des inhibiteurs de cette voie est la TSP1 qui, par sa liaison aux récepteurs CD47 présents sur les cellules endothéliales remplies de NO, inhibe la formation du GMPc, démontrant ainsi un rôle anti-angiogénique de la TSP1 (Bijé et al., 2013). Cette forte concentration de NO induit un stress associé à la formation de lipides peroxydés (MDA et 4HNE) qui peuvent être à l'origine de la formation des drusen dans la rétine des patients atteints de DMLA. Ainsi, ces dépôts peroxydés n'étant pas éliminés par les cellules vont s'accumuler et entraîner des dommages aux cellules environnantes comme ce qui est observé dans les deux formes de la DMLA. De plus, il a été montré qu'un traitement par du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ou du tert butyl hydroperoxyde (tBHP) des cellules de l'EPR humaines (ARPE19) en culture induit une mort par apoptose de ces dernières (Ballinger et al., 1999; Cai et al., 2006), suggérant un lien entre stress oxydant et mort des cellules de l'EPR.

L'accumulation de lipofuscine autour et dans la macula au cours du vieillissement peut également être une source de stress oxydants à l'origine de neurodégénérescence (Delori et al., 2001). En effet, au cours de la DMLA, cette accumulation pourrait participer au dysfonctionnement des cellules de l'EPR et ainsi entraîner la dégénérescence des photorécepteurs (Delori et al., 2001). Cette hypothèse est confortée par les travaux de Suter et collaborateurs qui montrent que l'AE2, composant de la lipofuscine, est associé à la mort par apoptose des cellules de l'EPR par la libération du cytochrome c des mitochondries (Suter et



al., 2000). De plus, il a été montré que la présence d'AE2 en grande quantité inhibe la phagocytose des segments externes des photorécepteurs par les cellules de l'EPR (Sparrow et Boulton, 2005), suggérant un lien entre AE2 et dysfonctionnement de l'EPR.

Avec le vieillissement, les cellules de l'EPR accumulent des granules complexes associant mélanine et lipofuscine : les mélanolipofuscines (Feeney-Burns et al., 1984). L'accumulation de ces granules, en plus de la lipofuscine, est associée à la DMLA (Winkler et al., 1999) et augmente fortement la photoréactivité des cellules de l'EPR et notamment en présence de lumière bleue (460nm), entraînant l'augmentation d'espèces réactives de l'oxygène (Boulton et al., 1993, 2004; Rózanowska et al., 2002). L'accumulation exacerbée de ces pigments met en place une réelle zone de stress oxydant accentuant le dysfonctionnement des cellules de l'EPR.

#### D) Stress oxydant et DMLA

L'implication du stress oxydant dans la pathogenèse de la DMLA a été démontrée à l'aide de souris invalidées pour l'expression d'enzyme antioxydante. En effet, ces travaux montrent que la non expression de SOD1 entraîne l'apparition de drusen dans la rétine et une néovascularisation choroïdienne identique à celle observée dans la DMLA (Imamura et al., 2006). De même, l'invalidation de l'expression du gène SOD2 induit une augmentation significative de la mort des cellules de l'EPR soumises au préalable à un stress oxydant (Kasahara et al., 2005). Ces résultats suggèrent un rôle important des enzymes antioxydantes, et donc un rôle délétère du stress oxydant, dans la pathogenèse de la DMLA. De plus, une étude menée sur les macaques rhésus âgés de 20 ans a mis en évidence la présence augmentée de drusen apparues spontanément corrélée à une réactivité importante à l'acide thiobarbiturique, qui est un marqueur du stress oxydant. (Olin et al., 1995). De même, une analyse protéomique, à partir de cellules de l'EPR provenant de patients atteints de DMLA, montre une augmentation significative des protéines réactives aux stress oxydants (Decanini et al., 2007), démontrant là encore un lien de cause à effets. Plus récemment, une étude menée sur des cohortes humaines associe une protection des individus soumis à des régimes anti-oxydants contre la susceptibilité de développer la DMLA (AREDS, 2001). Toutefois il est indispensable de déterminer les susceptibilités génétiques des patients avant de compléter les régimes des patients, en effet, il a été montré que selon les susceptibilités génétiques des patients il pouvait y avoir des aggravations vers une forme néovasculaire de la DMLA après prise de ces régimes (Vavvas et al., 2018).



L'ensemble de ces données appuie fortement un rôle prédominant du stress oxydant dans l'étiopathologie de la DMLA pouvant en partie expliquer l'atrophie et la dégénérescence des photorécepteurs. Toutefois, les ERO, les lipides peroxydés de type MDA et 4HNE, le NO et l'AE2 ne sont pas à eux seuls responsables de la pathogenèse de la DMLA. En effet, la présence de l'ensemble de ces molécules oxydantes est associée à une réaction inflammatoire notamment induite en partie par l'activation de la voie du complément (Sokolov et al., 2007). Pour donner suite à un stress oxydant, certaines molécules jouant un rôle important dans la régulation de la voie du complément, vont voir leur expression augmenter ou diminuer. C'est en effet le cas du facteur H du complément dont l'expression, qui était au préalable augmenté par un traitement à l'INF $\gamma$ , se retrouve fortement diminuée dans des cellules ARPE19 soumises en plus à un stress oxydant (Wu et al., 2007). Une interaction entre le CFH et le MDA a également été identifiée (Weissman et al., 2011), démontrant alors un lien direct entre un produit de lipide peroxydé et une molécule régulatrice de la voie du complément donc de l'inflammation.

#### E) Mort cellulaire

Au cours du vieillissement, bon nombre de cellules vont mourir par apoptose et/ou par nécrose. Parmi ces cellules se trouvent les cellules de l'EPR dont la mort est associée à des dysfonctionnements inflammatoires et angiogéniques : deux processus responsables de la pathogenèse de la DMLA (Dick, 2017). Une mort cellulaire programmée par apoptose a été mise en évidence dans la rétine de macaque rhésus, et ce à différents âges avec un taux augmenté aux âges les plus avancés (Lambooi et al., 2000). Ces données soulèvent le rôle de la mort cellulaire dans la DMLA.

Au cours des deux formes de la DMLA, les cellules de l'EPR et les photorécepteurs vont dégénérer dans la région périfovéaire (Curcio and Millican, 1999) atténuant ainsi la vision centrale du patient. Dans la rétine de patients atteints des deux formes de DMLA, de nombreuses études suggèrent que la mort des cellules de l'EPR serait apoptose dépendante (Curcio and Millican, 1999; Haddad et al., 2003; Lambooi et al., 2000). Un des facteurs prédictifs de la mort de ces cellules est la localisation des drusen au cours du vieillissement de la rétine. En effet, leur nombre, leur taille et leur localisation évoquent un risque accru de développer une DMLA par dégénérescence des cellules adjacentes (Burns and Feeney-Burns, 1980; Ishibashi et al., 1986). Cette mort cellulaire est due à de l'apoptose comme ce qui a



été montré dans la rétine de singe présentant de nombreux drusen (Burns and Feeney-Burns, 1980; Ishibashi et al., 1986). En effet, ces études ont montré des évaginations de petits fragments cytoplasmiques des cellules de l'EPR, ressemblant à des corps apoptotiques, et ce en contact de drusen (Burns and Feeney-Burns, 1980; Ishibashi et al., 1986). Une autre étude a montré que, dans les zones de néovascularisation, une apoptose dans le stroma des cellules de l'EPR, dans les cellules endothéliales et occasionnellement dans les macrophages était liée à l'expression de Fas et FasL : deux protéines impliquées dans l'apoptose (Hinton et al., 1998). L'entrée en apoptose des cellules de l'EPR pourrait être due à des stimuli de stress oxydants provenant des mitochondries (Delcourt et al., 1999; Susin et al., 1998; Wallace et al., 1998). Les mitochondries sont le siège du stress oxydant dans les cellules et ont un rôle dans la régulation de l'apoptose. En effet, les mitochondries peuvent relarguer dans la cellule des molécules pro-apoptotiques telles que le cytochrome C (Susin et al., 1998). Un mécanisme responsable de la libération du cytochrome C provient de l'altération de la membrane externe des mitochondries et l'ouverture de pores MPT (mitochondrial permeability transition) (Susin et al., 1999). L'ouverture de ces pores déstabilise aussi les échanges ioniques de la cellule et notamment la régulation de la concentration cytosolique du calcium, ce qui à long terme provoque l'entrée de la cellule en apoptose (Susin et al., 1999). Cette entrée en apoptose est déclenchée par la présence d'oxydants, de TNF alpha ou de toxines (Marzo et al., 1998). Les cellules de l'EPR (ARPE19) en culture sont sensibles à d'autres facteurs oxydants (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, tBHP ou photo traumatisme) pouvant induire leur mort par apoptose (Cai et al., 2006; Hafezi et al., 1997). L'ensemble de ces travaux montre une mort par apoptose des cellules de l'EPR suite à un stress oxydant exogène ou endogène par la formation de drusen.

L'apoptose peut être caspase dépendante ou indépendante. Dans le cas d'une apoptose caspase dépendante, plusieurs caspases interviennent dans la mise en place de la mort cellulaire programmée : les caspases 8, 9 et 3. Dans ce cas, la voie de signalisation Fas/FasL va entraîner le clivage de la procaspase 8 ce qui va induire le clivage de la procaspase 9 permettant alors le clivage de la procaspase 3 en caspase 3 active induisant la mort cellulaire. On peut observer ce type de mort lors de la DMLA (Cai et al., 1999 ; Hinton et al., 1998).

Toutefois, l'apoptose ne semble pas être le seul mécanisme de mort impliqué lors de pathologies neurodégénératives. La nécrose et l'apoptose sont deux processus impliqués dans la pathogenèse de la DMLA mais avec des réactions inflammatoires différentes entraînant une ou l'autre forme de la DMLA (atrophique ou néovasculaire). La nécrose est une mort non programmée et prématurée des cellules. Contrairement à l'apoptose, la nécrose va lyser la



cellule cible entraînant une réaction inflammatoire plus ou moins forte. En effet, une fois nécrosées les cellules déversent leur contenu cytoplasmique attirant les cellules inflammatoires sur le site de lésion, entraînant la formation d'une zone inflammatoire aiguë, phénomène observé dans la pathogenèse de la DMLA et appelé exsudats (Rutar et Provis, 2016). Des études *in vivo* et *in vitro* ont montré qu'au cours de la DMLA, les cellules de l'EPR soumises à un stress oxydant mourraient par nécrose (Cai et al., 2000; Sharma et al., 2008). L'activation du système du complément entraîne la formation d'un pore d'attaque membranaire ou (MAC) qui peut, à des concentrations élevées, lyser les cellules l'exprimant. Cette lyse peut correspondre à une nécrose des tissus. Les causes de la nécrose peuvent être diverses telles qu'une ischémie avec asphyxie ou une infection bactérienne avec activation du système du complément. Le facteur H de la voie alterne du complément est un facteur clé dans la régulation de la voie de mort par nécrose étant donné qu'il inhibe la formation du pore de lyse (MAC). Son importance dans la lyse cellulaire est notamment démontrée dans le syndrome hémolytique et urémique (aSHU) où sa non fixation sur les cellules endothéliales du rein entraîne leur lyse associée à une nécrose hépatique et une ischémie (Campistol et al., 2013; Laurence, 2012; Noris et al., 2010, 2012).

Outre ces deux processus de mort cellulaire, une mort par nécroptose peut être observée dans la pathogenèse de la DMLA (Pasparakis and Vandenabeele, 2015). La nécroptose est une forme de nécrose programmée et contrôlée par les kinases RIP (Receptor interacting protein) (Pasparakis et Vandenabeele, 2015). Cette mort est également observée dans d'autres pathologies de la rétine (ex. décollement de la rétine), où l'inhibition des RIP réduit considérablement la nécrose des photorécepteurs (Trichonas et al., 2010). De même il a été montré que les cellules de l'EPR, lors de la progression de la forme atrophique de la DMLA, sont fortement sensibles à la mort par nécroptose en réponse à un stress oxydant (Hanus et al., 2015, 2016).

En résumé, il apparaît que la mort des cellules de l'EPR et des photorécepteurs, à la suite d'un stress oxydant, résulterait de plusieurs processus combinés entraînant leur dégénérescence (apoptose/nécrose/nécroptose) (Kim et al., 2003), rendant alors plus difficile la compréhension des processus de mort observés dans la pathogenèse de la DMLA.

La forme atrophique de la DMLA présente des atrophies géographiques marquées par l'inflammation et la mort cellulaire de l'EPR (Wright and Ambati, 2017). Il apparaît également



que lors de la forme sèche de la DMLA, un dysfonctionnement au niveau du système de régulation post-transcriptionnelle, via la protéine Dicer, est associé à inflammation et une mort des cellules de l'EPR (Kim et al., 2014). En effet, une augmentation abondante de la caspase 8 est observée dans l'EPR maculaire des yeux humains présentant une atrophie géographique par rapport aux yeux de patients sains (Kim et al., 2014). Au contraire, chez les patients atteints d'atrophies géographiques, l'abondance de l'ARNm Dicer 1 est réduite de 65% dans l'EPR par rapport aux donneurs sains (Kaneko et al., 2011). Chez la souris, l'ablation génétique de Dicer montre une augmentation de l'activation de la caspase 8 dans l'EPR (Kim et al., 2014). De plus, les cellules de l'EPR humain cultivées avec un ajout de l'ARN alu, ARN non clivé par Dicer, entraîne l'activation de la caspase 8 (Kim et al., 2014). En revanche, le blocage de la caspase 8 permet de protéger les cellules de l'EPR de la toxicité à l'ARN alu injecté en sous-rétinienne chez la souris (Kim et al., 2014). L'ablation de l'expression de la protéine Dicer chez la souris permet également d'observer une mort uniforme des cellules de l'EPR (Kaneko et al., 2011). Cette mort est associée à une augmentation de l'ARN alu (Kaneko et al., 2011). La mort cellulaire semble jouer un rôle important dans la pathogénèse de la DMLA.

#### F) Modèles expérimentaux

A ce jour, il n'existe pas de modèle animal de la forme atrophique de la DMLA, mais qu'un modèle murin mimant les principales caractéristiques de la forme néovasculaire de la DMLA : inflammation/stress oxydant et angiogénèse. Une des principales raisons est que cette pathologie affecte la macula qui n'est présente que chez les primates, ce qui complique d'avantage d'en avoir un modèle animal. Le plus petit mammifère possédant une macula « like », car pas tout à fait identique à celle de l'Homme, est le microcèbe. Aux vues de sa fréquence de reproduction (1 à 2 petits/an) et de la composition de sa fovéa qui diffère quand même de celle de l'homme, cet animal n'est pas un cobaye idéal pour ce type de recherche de cibles thérapeutiques. La réglementation d'utilisation de singes en recherche étant très stricte rend difficile l'utilisation de cet animal en première instance. Il existe des modèles de vieillissement qui sont fortement informatifs comme le singe rhésus âgé. Ces singes présentent des drusen et des dépôts cellulaires et granulaires dans la membrane de Bruch comme ceux observés dans la rétine de patients atteints de DMLA, toutefois leurs compositions biochimiques divergentes (Ambati et al., 2003). De même, une souche de souris nommée SAMP (senescence accelerated mouse prone) a également montré un épaississement de la



membrane de Bruch associé à des dépôts, une dégénérescence des cellules de l'EPR et une néovascularisation qui sont des phénomènes observés dans la rétine de patients atteints de la DMLA (Majji et al., 2000).

En revanche afin d'étudier la DMLA, de nombreuses souches de souris génétiquement modifiées dans des gènes apparentés au développement de la pathologie permettent de comprendre certains mécanismes associés. Parmi eux, des souris invalidées pour l'expression de certaines protéines de la voie du complément dont le C3, C5 et le CFH. Pour le CFH deux types de souris génétiquement modifiées a- des souris deletées pour le CFH (CFHKO) et b- des souris deletées pour le CFH mais supplémenté en CFH humain contenant le polymorphisme CFHY402H s'exprimant sous le promoteur de l'ApoE. Les souris CFHKO présentent une perte fonctionnelle de la rétine, de nombreuses lésions autofluorescentes à la base de l'EPR et une augmentation de dépôts de C3 avec l'âge (Coffey et al., 2007 ; Williams et al., 2013). Les souris déplétées en CFH et supplémentées en CFHY402H présentent des dépôts et accumulation de lipofuscine like au niveau de la lame basale et de l'EPR ainsi qu'une accumulation de macrophage et cellules immunitaires dans l'espace subrétinal (Ufret-Vincenty et al., 2010). Ces données montrent bien que le CFH est impliqué dans la pathogenèse de la DMLA (Fletcher et al., 2014).

L'association entre le taux élevé de CCL2 dans la rétine, l'humeur aqueuse et les urines des patients atteints de DMLA (Guymer et al., 2011 ; Sennlaub et al., 2013) ainsi qu'un rôle important de CCL2 dans la migration de cellules immunitaires dans l'espace subrétinal avec l'âge (Sennlaub et al., 2013), a permis de mettre en avant un nouveau paramètre dans la DMLA. Ces souris délétées en CCL2 présentent une perte de photorécepteurs, une augmentation de l'épaisseur de la membrane de Bruch associé à un dépôt de C3 et C5 et une augmentation de drusen dans l'EPR après 9 mois (Ambati et al., 2003). Les drusen sont associés à une accumulation d'AE2 et plusieurs de souris présentent une néovascularisation après 18 mois (Fletcher et al., 2014).

L'ensemble de ces phénomènes est retrouvé dans la DMLA suggérant l'utilisation de cette souche de souris CCL2-/- afin de mieux caractériser les mécanismes moléculaires mis en jeu dans la DMLA. La cytokine CX3CL1 et son récepteur CX3CR1, impliqués dans la migration des monocytes et macrophages, ont été associés à la DMLA (Fletcher et al., 2014). En effet, l'inactivation de l'expression de CX3CR1 (CX3CR1KO) a permis d'observer un important blocage des macrophages et monocytes dans l'espace sous rétiniens comme c'est observé chez



les patients atteints de DMLA (Fletcher et al., 2014). Toutefois ces souches ne permettent pas de combiner tous les différents paramètres de la DMLA.

Face à l'absence d'un modèle inné de la DMLA, le modèle de néovascularisation choroïdienne (CNV) a été validé comme un modèle murin de cette pathologie. Dans ce modèle, la barrière hématorétinienne constituée entre autres de la membrane de Bruch, est rompue à l'aide d'un impact laser argon (Dot et al., 2009; Ryan, 1982) et laisse alors les vaisseaux choroïdiens envahir la rétine neurale, comme ce qui est observé dans la forme néovasculaire de la DMLA, créant en plus un environnement inflammatoire associé à du stress oxydant. Ce modèle a bien été caractérisé dans notre laboratoire par l'équipe du Dr. Jeanny (Dot et al., 2009). En effet, suite à l'impact laser une inflammation aigüe apparaît à 3-4 jours post-laser suivie d'un pic d'angiogenèse au 7<sup>ème</sup> jour post-Laser (Dot et al., 2009). Ainsi, Chez le singe soumis au modèle CNV, une fois l'impact réalisé, les cellules endothéliales choroïdiennes vont migrer et former des néovaisseaux sous rétinien (Dot et al., 2009). Comme mentionné précédemment, ce modèle présente également un processus inflammatoire avec un recrutement leucocytaire et microphagique favorisant la sécrétion de facteurs pro-angiogéniques et/ou de croissance : VEGF/ses récepteurs R1 et R2, FGF2 et TGF beta, facilitant ainsi la néovascularisation choroïdienne (Ambati et al., 2005). Ce modèle est actuellement le modèle de référence utilisé pour étudier le ou les effet(s) d'une molécule sur les différents processus impliqués dans la pathogenèse de la forme néovasculaire de la DMLA : angiogenèse, inflammation et stress oxydant. En effet, de nombreuses études, utilisant des souris invalidées pour l'expression de nombreux gènes codant pour des protéines du système du complément et soumises au modèle CNV, ont permis de montrer une forte implication de cette voie de l'immunité innée dans la pathogenèse de la DMLA (Bora et al., 2006, 2005; Lyzogubov et al., 2010; Rohrer et al., 2012; Yates et al., 2007).

#### **IV. Le système du complément**

##### **A) Généralités**

Le système du complément fait partie intégrante de l'immunité innée et intervient dans la défense non spécifique. Il est constitué d'un ensemble d'environ 30 à 40 protéines plasmatiques et/ou membranaires constitutivement exprimées par le foie et présentes dans le sang pouvant

<u>Voies</u>	<u>Composants</u>
Voie classique	C1, C2, C3, C4
Voie alterne	C3, CFH, CFD
Voie des lectines	MBL, MASP1, MASP2
Complexe d'attaque membranaire (MAC)	C5, C6, C7, C8, C9
Récepteurs	CR1, CR2, CR3, CR4
Protéines régulatrices	C1inh, C4bp, CFH, CFI, DAF, MCP, HRF

**Fig. 17** : les protéines du système du complément.

s'auto-activer très rapidement. Ces protéines exercent des fonctions différentes : activité enzymatique, récepteurs membranaires, molécules anaphylactiques ou encore sont des éléments régulateurs des différentes voies d'activation du système du complément.

Les conséquences de l'activation du système du complément sont les suivantes :

- **Opsonisation** des organismes étrangers (infection) ou cellules hôtes du soi favorisant ainsi leur phagocytose
- **Lyse** des micro-organismes (cas observé lors d'une infection) ou de certaines de cellules de l'organisme
- **Activation des réponses immunitaires** (inflammation ou immuno- modulation des réponses immunes spécifiques) via la liaison aux récepteurs du complément sur les cellules immunitaires de type lymphocytes T par exemple
- **Clairance des complexes immuns et des corps apoptotiques.**

Une activation non contrôlée du système du complément participe à aggraver les pathologies avec un versant inflammatoire exacerbé. L'ensemble des protéines du complément sont synthétisées majoritairement par le foie mais peuvent être aussi produites localement comme par exemple dans la rétine. Les cellules endothéliales de la choriocapillaire sont les principales cellules de l'œil qui expriment l'ensemble des protéines du complément, malgré une synthèse possible par les cellules de l'EPR et de la rétine neurale (Anderson et al., 2012). Puis, dans une moindre mesure, la synthèse de ces protéines peut également provenir, s'il le faut, des monocytes, des macrophages, des cellules épithéliales et des fibroblastes (Miloudi et al., 2016).

Le système du complément se divise en trois voies effectrices distinctes : la voie classique, la voie des lectines et la voie alterne du complément (VAC). Pour être activées, ces trois voies ont besoin d'un élément commun et central : la molécule plasmatique C3. Puis elles vont toutes aboutir à la formation d'un complexe protéique appelé « pore d'attaque membranaire » ou MAC, pouvant à haute dose entraîner la lyse de la cellule l'exprimant. En dépit d'une activation commune via la molécule C3 et d'un produit final, le MAC, chacune de ces voies possède des protéines qui lui sont propres (Fig. 17).

La voie classique est activée par les complexes antigènes-anticorps via les IgM et les IgG 1/2/3, par certains agents pathogènes, par la CRP, par l'amyloïde bêta et les corps apoptotiques (Merle et al., 2015). La fixation de deux ou plusieurs immunoglobulines d'IgG ou une molécule



d'IgM pentamérique, à la surface d'un micro-organisme, permet à leur région Fc de fixer le premier composant de la voie classique : C1 qui est un complexe composé des molécules C1q/ C1s et C1r. L'activation de cette voie commence donc par l'interaction du complexe soluble C1 avec un complexe antigénique IgM-Ag, IgG-Ag ou Anticorps dépendant. Une fois constitué, ce complexe protéique entraîne le clivage de la molécule plasmatique C4 en C4a et C4b (Fig. 18). Le C4a reste plasmatique alors que le C4b se fixe aux membranes cellulaires et recrute la molécule C2. Cette dernière va être clivée en C2a et C2b. Il en résulte alors la formation d'un complexe « C4bC2a » qui possède une activité « C3 convertase » capable de cliver les molécules C3 en C3a et C3b qui sont les deux premières molécules activatrices des réactions inflammatoires associées (Fig. 19). Un nouveau complexe va se former « C4bC2a/C3b » et possède une activité « C5 convertase » qui est à l'origine du clivage du C5 soluble : point d'initiation à la formation du MAC (Fig. 18-20). Le principal inhibiteur de cette voie, afin de protéger le soi, est l'inhibiteur de la C1 estérase (C1Inh) qui est une serpine inhibant l'activité du complexe C1/C1s/C1r (Merle et al., 2015).

La voie des lectines est activée par l'interaction d'une protéine globulaire appelée mannose binding lectin (MBL) avec les résidus mannose ou N-acétylglucosamine (GlcNac) des microorganismes. La structure du MBL est homologue au C1q de la voie classique. Une fois fixé sur les bactéries, le MBL active les sérines protéases MASP1, MASP2 ou MASP3 qui clivent et activent à leur tour les molécules C4 et C2, rejoignant ainsi la voie classique (Merle et al, 2015). La voie effectrice de l'activation de la voie des lectines, comme celle de la voie classique, est la formation du MAC qui, à de fortes concentrations, induit la lyse des cellules qui l'expriment (cellules hôtes ou bactéries).

La voie alterne, quant à elle, est activée par des éléments constitutifs : de la paroi microbienne, des endotoxines, des virus et des cellules infectées ou transformées. Sans infection, la voie alterne est constitutivement activée, mais très bien régulée, créant alors une inflammation dite à "bas bruit" et permettant une réaction spontanée et rapide en cas d'infection. Cette voie du complément est considérée comme « la défense de première garde » en cas d'infection et s'auto-active rapidement par l'hydrolyse d'une molécule C3 plasmatique. Ce complexe C3/H<sub>2</sub>O possède une activité C3 convertase dite « like » parce qu'elle est détectée uniquement en phase soluble. Ce complexe va cliver les molécules C3 solubles libérant du C3a et C3b. Le C3b va participer à la création de complexes C3 et C5 convertase, et par conséquent, pour le complexe C5 convertase entraîner la formation du MAC. Comme décrit précédemment pour les deux autres voies du système du complément, la voie alterne conduit à la formation



d'un complexe à activité C3 convertase puis à une voie effectrice commune : la formation du MAC. La voie alterne est régulée par la properdine, le facteur CD55/DAF (decay accelerating factor), CD46/MCP, le facteur i (CFI) et le facteur H (CFH) (Fig. 21).

### B) Voie alterne du complément

Comme mentionné précédemment, pour être activée la voie alterne du complément doit au préalable former un complexe C3 convertase dit « like » puisqu'il est issu de l'hydrolyse d'une molécule C3 circulante et n'est actif qu'en phase soluble et non sur les membranes. Une fois formé, ce complexe « C3 convertase like » va cliver d'autres molécules C3 plasmatiques en C3a et C3b. Ce dernier va être le point de départ pour former de véritables complexes C3 convertase actifs aussi bien en phase fluide qu'en phase membranaire. En effet, les molécules C3b ainsi formées vont se lier au facteur B (CFB) et au facteur D (CFD) de la voie du complément pour former des complexes C3 convertase (C3bBb). Le facteur D permet le clivage du facteur B en deux fragments nommés Ba et Bb, dont le dernier reste lié au C3b d'où son nom C3bBb. Le fragment Bb du CFB va donner au complexe, ainsi formé, son activité C3 convertase donc capable de cliver une molécule C3 en C3a et C3b aussi bien en phase fluide que sur les membranes cellulaires (Fig. 18). En conclusion, une fois que le système est amorcé par la présence d'un complexe C3 convertase « like », la présence de CFB/CFD et de C3b, membranaire ou circulante, cela amplifie la formation d'autres complexes C3 convertase actifs. Ces complexes vont à leur tour recliver des molécules C3 en C3a/C3b, formant rapidement une boucle d'auto-amplification capable de libérer de nombreuses molécules C3a et C3b inductrices de réactions inflammatoires diverses. En effet, le fragment de clivage C3a est une protéine très anaphylactique induisant une réaction inflammatoire aigue. Le fragment de clivage C3b est responsable de l'opsonisation des cellules via son interaction avec le récepteur C3b (CD11b) présents sur les cellules cibles. Ces cellules « marquées » au C3b vont être la cible, entre autres, des cellules dites de « ménage » : les microglies et les macrophages. L'activité convertase du complexe C3bBb est favorisée en se liant à la properdine qui le stabilise et le rend plus efficace, ce qui amplifie le clivage du C3 et par conséquent entraîne une inflammation aigue et rapide.

Une autre fonction du fragment de clivage C3b est de se fixer sur les complexes C3 convertase (C3bBb) déjà préexistants formant un autre complexe appelé C5 convertase (C3bBbC3b) (Fig. 19). Il est à noter qu'il faut plus qu'une molécule de C3b fixée sur la C3 convertase pour former un complexe C5 convertase fonctionnel. La C5 convertase va, à son



tour, cliver le C5 circulant en C5a et C5b. Ce clivage va permettre le recrutement rapide des molécules C6, C7, C8 et C9 et former le pore d'attaque membranaire MAC ou C5b9 qui s'insère dans la bicouche lipidique (Fig. 20). Les molécules C6 et C7 se lient directement au C5b et les molécules C8 vont amarrer ce complexe C5bC6C7 aux membranes des cellules cibles. Une fois sur la membrane, ce complexe C5bC6C7C8 se lie à plusieurs molécules C9 qui sont responsables de la formation d'un pore protéique : le MAC. À des concentrations suffisantes l'insertion du MAC va entraîner la lyse de la cellule, et par conséquent, une réaction inflammatoire importante avec une infiltration des cellules microgliales/macrophagiques. Toutefois, il est à noter qu'à des concentrations sublytiques le MAC exerce des fonctions physiologiques nécessaires à la cellule (ex. régulation du taux de calcium, des flux ioniques) (Bohana-Kashtan et al., 2004; Jeon et al., 2014; Tegla et al., 2011). Le C5a a, comme le C3a, une activité anaphylactique très importante notamment via la dégranulation des mastocytes (Sayah et al., 1998 ; Chou et al., 2012).

### C) Régulation de la voie alterne

À la vue de l'importance de l'activation de la voie alterne du complément dans la réponse immunitaire, il est nécessaire de la réguler afin de ne pas toucher aux cellules du soi en permanence. Un dérèglement de cette voie entraîne une inflammation et une lyse cellulaire pouvant être néfaste et fatale pour les tissus. Cette régulation s'effectue via différentes molécules circulantes ou membranaires pouvant être des activateurs ou des inhibiteurs.

**Facteurs activateurs de la VAC :** La properdine, synthétisée par les monocytes et cellules T (Franck et Sullivan, 2014), permet de stabiliser les complexes C3 et C5 convertase les rendant alors plus actifs. Outre la properdine et comme mentionné ci-dessus, les facteurs CFB et CFD sont les activateurs principaux de la voie alterne du complément puisqu'ils sont à l'origine même de la formation du complexe C3 convertase. Le CFB est constitutivement produit par le foie et est exprimé dans les cellules de l'EPR (Chou et al., 2012). Son activité est régulée par sa compétitivité avec le CFH pour sa liaison au C3b. L'expression de ce facteur est trouvée au niveau de la rétine et plus précisément au niveau des photorécepteurs (Pascual et al., 1988 ; Rohrer et al., 2007), mais sans CFD le CFB ne peut être fonctionnel. Le CFD est



maintenue à faible concentration dans la circulation sanguine (White et al., 1992) grâce à un catabolisme rapide de cette molécule par la rate.

**Facteurs inhibiteurs de la VAC :** l'activation excessive du complément peut entraîner des dommages aux cellules hôtes et surtout aux cellules du soi. C'est pourquoi la voie alterne du complément est hautement régulée via divers facteurs membranaires et solubles.

a) Les inhibiteurs de la voie alterne du complément (VAC) au niveau des membranes cellulaires

Au niveau membranaire, la régulation de l'activation de la voie alterne du complément se fait via le CD55/DAF (decay accelerating factor), le CD46/MCP (membran cofactor protein) et /ou le CD59.

i. Le DAF (ou CD55), est une « protéine anchor » de 70kDa se liant à la membrane cellulaire via son glycosylphosphatidylinositol (GPI) (Fig. 21). Dans la rétine, le DAF est présent au niveau des segments internes des photorécepteurs et des cellules ganglionnaires (Fett et al., 2012). Le DAF a pour rôle de dissocier la liaison du C3b au CFB empêchant, de ce fait, la formation du complexe C3 convertase et donc le clivage du C3 circulant. Ainsi, le DAF empêche la formation excessive de C3a, C3b et MAC, et par conséquent, limite les réactions inflammatoires associées (Lublin and Atkinson, 1989).

ii. Le MCP (ou CD46), est une protéine transmembranaire de 45 à 70 kDa synthétisée à la surface des cellules à l'exception des globules rouges. Dans la rétine, le MCP est localisé au niveau des cellules de l'EPR et de la membrane de Bruch (Fett et al., 2012). Comme le DAF, le MCP se lie au C3b, le séquestre et empêche alors la formation de la C3 convertase. Par contre, le MCP est aussi un cofacteur au CFI dont un des rôles est d'inhiber les fonctions du C3b en le rendant inactif en C3bi. Ce dernier fragment est alors incapable de se lier au CFB. Le C3bi fait également un appel aux macrophages pour nettoyer le site de lésion (Adams et Hamilton, 1984). Il peut aussi être de nouveau cliver en C3dg puis C3d.

Le C3b et ses fragments de clivage ont pour récepteurs les molécules CR1 (CD35), CR2 (CD21), CR3 (CD11b/CD18) et CR4 (CD11c/CD18). La liaison des fragments de clivage C3bi/dg/d ou du C3b lui-même sur ces récepteurs, présents à la surface des cellules immunitaires, va moduler la réaction inflammatoire sur le site de lésion (Merle et al., 2015). En effet, ces récepteurs une fois activés vont avoir des fonctions différentes :



- iii. Le CR1 ou CD35, est une glycoprotéine membranaire de 250kDa présente sur les membranes des hématies, macrophages, cellules dendritiques, monocytes et podocytes des cellules rénales (Lubbers et al., 2017). Dans la rétine, le CR1 est présent sur les faces apicales de l'EPR et dans les cellules ganglionnaires humaines (Fett et al., 2012). La liaison de C3b sur le récepteur CR1 participe à la clairance des complexes immuns opsonisés (Merle et al., 2015). De plus, ce récepteur est également un cofacteur du CFI et permet ainsi de rendre inactif le C3b en C3bi et C3dg assurant alors une phagocytose contrôlée (Merle et al., 2015 ; Rochowiak et Niemir, 2010).
- iv. Le CR2, est une protéine de 145kDa, exprimée sur la membrane des lymphocytes B choroïdiens. Ce récepteur se lie aux fragments C3bi et C3d (Frank et Aktinson, 2001). Cette fixation permet une meilleure réponse immunitaire en mûrissant et en diminuant le seuil d'activation des lymphocytes B, adaptant ainsi la réponse immunitaire à la lésion tissulaire (Matsumoto et al., 1991).
- v. Les CR3 et CR4, sont des protéines de 180 et 170 kDa, exprimées par les cellules immunitaires (monocytes, cellules dendritiques, neutrophiles, les cellules natural killer) et par les macrophages (Merle et al., 2015) qui peuvent infiltrer les différentes couches de la rétine. Ces deux récepteurs se lient au fragment de clivage C3bi et activent ainsi la phagocytose des cellules et pathogènes opsonisés par le C3bi (Lukácsi et al., 2017; Merle et al., 2015).
- vi. Le CD59 (ou MAC-IP MAC inhibitory protein), est une glycoprotéine de 20kDa présente sur les membranes des cellules sanguines, épithéliales et endothéliales de nombreux tissus dont la rétine (Merles et al., 2015). Cette protéine empêche la formation du MAC en inhibant la liaison du complexe C5bC6C7C8 avec le C9 sur les membranes cellulaires (Maio et al., 1998 ; Huang et al., 2006).

b) Les inhibiteurs de la VAC en phase soluble

Les deux inhibiteurs de la voie alterne du complément en phase soluble sont le CFI et le CFH. Ces deux molécules sont synthétisées par les cellules endothéliales et les cellules de l'EPR de la rétine (Merles et al., 2017).

- i. Le CFI est une sérine protéase sérique de 88kDa. Cette protéine est un cofacteur de nombreuses autres molécules du complément et permet ainsi de cliver le C3b en C3bi inactif,



inhibant de ce fait l'assemblage des complexes C3 et C5 convertase dont le C3b est un élément essentiel à leur formation (Vyse et al., 1994).

ii. Le CFH est une glycoprotéine sérique soluble de 155kDa, dont un des rôles est d'inhiber l'activité de la C3 convertase. En effet, le CFH agit à trois niveaux pour l'inhiber : 1- il entre en compétition de liaison avec le CFB pour la fixation du C3b ; 2- il dissocie les complexes C3 convertase déjà existants en déplaçant le fragment Bb de ce complexe et 3- il transforme, en synergie, avec le CFI le C3b en C3bi (Fig. 21).

#### D) Le facteur H du complément (CFH)

##### a) Structure

Le CFH est une glycoprotéine plasmatique dont la concentration dans le plasma humain est d'environ 500µg/ml et peut varier entre 116 et 562 µg/ml en fonction des facteurs génétiques et environnementaux (de Córdoba and de Jorge, 2008; Esparza-Gordillo et al., 2004; Saunders et al., 2006). Cette protéine est codée par un gène localisé sur le chromosome Chr1q32. Le CFH est une protéine sushi composée de 20 séquences répétitives de 60 acides aminés nommés CCP (complement control protein) lui conférant une structure tridimensionnelle fonctionnelle spécifique (Fig. 22). Le CFH est exprimé par les cellules de l'EPR et les cellules endothéliales (Clark et al., 2014; Ormsby et al., 2008) et est retrouvé au niveau de la choroïde et la membrane de Bruch (Chen et al., 2007). La molécule présente des glycosylations, localisées sur les CCP9, 12-14, 15(deux)-17 et 18, qui permettent au CFH de se lier aux glycosaminoglycanes (GAG) présents sur les membranes cellulaires (Merle et al., 2017 ; Perkins et al., 2014). Les différents CCP de la protéine lui confèrent différentes fonctions comme les deux principales régions responsables de la liaison du CFH aux héparanes sulfates des cellules qui sont les CCP6-8 et CCP19-20 (Perkins et al., 2014 ; Ferreira et al., 2010). La liaison de ces deux domaines sur les héparanes sulfates des membranes cellulaires confère au CFH une conformation tridimensionnelle spécifique lui permettant de se lier à d'autres molécules et ainsi d'avoir des fonctions particulières. Les CCP6-8 sont les premiers domaines à se lier sur les membranes puis cette liaison est stabilisée par la fixation des CCP19-20 (Perkins et al., 2012). Plusieurs mutations et polymorphismes du CFH sont associés à des pathologies hémorragiques comme notamment pour le syndrome hémolytique et urémique (aSHU) avec une mutation observée dans les domaines CCP19-20 (Manuelian et al., 2003), et pour la DMLA avec le polymorphisme Y402H localisé dans le CCP7 et qui est le facteur de risque de développer cette pathologie (Hageman et al., 2005 ; Edward et al., 2005 ; Klein et al., 2005). Les CCP1 à 4 du



CFH correspondent, quant à eux, aux domaines actifs de la molécule puisqu'ils sont responsables de l'inhibition de la C3 convertase (Perkins et al., 2012 ; Merle et al., 2017). Ces domaines possèdent également un site de fixation à la CRP et au C3b (Perkins et al., 2012), suggérant un rôle des CCP1-4 du CFH dans l'initiation des réactions inflammatoires associées au site de lésion.

#### b) Fonctions du CFH et des protéines associées CFHL1, CFHR1 à R5

Comme décrit précédemment le CFH, via ses domaines CCP1-4, va entrer en compétition de liaison pour le C3b avec le CFB, va dissocier les complexes C3 convertase préexistants puis cliver avec le CFI le C3b en C3bi le rendant inactif (Harrison and Lachmann, 1980; Pangburn et al., 1977; Weiler et al., 1976; Whaley and Ruddy, 1976). Toutes ces fonctions du CFH démontrent bien sa capacité à inhiber l'activation de la C3 convertase, et par conséquent, la formation du MAC. En inhibant le clivage du C3 en C3a le CFH va aussi réduire la réaction inflammatoire déclenchée par l'anaphylactique C3a. Le CFH interagit également avec la CRP des cellules endommagées permettant d'accélérer la réaction inflammatoire induite par cette protéine et d'empêcher l'activation excessive de la voie du complément par la CRP (Trouw et al., 2008). Plusieurs protéines associées au CFH, puisqu'elles sont issues soit d'un épissage alternatif (CFHL1) soit d'un cluster (CFHR1 à R5), présentent des fonctions similaires au facteur H.

##### i. CFH like 1 : CFHL-1

Le CFHL-1 (complément factor H like protein 1) est issu de l'épissage alternatif du transcrit du CFH. Cette protéine contient les domaines CCP1 à 7 du CFH (Zipfel et al., 1999 ; Merle et al., 2015). Cette protéine est comme le CFH synthétisée par les cellules endothéliales et les cellules de l'EPR de la rétine (Clark et al., 2014). Son poids moléculaire, de 49kDa, plus faible que celui du CFH en fait une protéine plus « soluble » et passe plus facilement les membranes cellulaires (Clark et al., 2014). En phase fluide, du fait de ses domaines CCP1-4, le CFHL-1 est, comme le CFH, un inhibiteur de l'activation de la voie du complément via son intervention sur la dissociation de la C3 convertase et de son activité de cofacteur du CFI. (Zipfel et al., 2009). De plus, l'adhésion cellulaire via les GAGs est conservée par les CCP6-7 (Clark et al., 2014; Zipfel and Skerka, 2009; Zipfel et al., 1999).

##### ii. CFH related : CFHR1 à R5



Le CFH fait partie d'un cluster RCA (Regulation of Complement Activation) dont il existe 5 protéines qui lui sont apparentées et nommées respectivement CFHR1 à R5 (complement factor H related 1 à 5) (Fig. 22 et 23). Ces protéines présentent de grandes homologies avec le CFH, et sont la conséquence de recombinaisons non homologues du gène codant pour le CFH ayant abouti à des mutations, des délétions, des duplications ou des réarrangements (Abarrategui-Garrido et al., 2009; Skerka and Zipfel, 2008). Les CFHR sont classés en deux groupes distincts, le groupe 1 comprend les « related 1, 2 et 5 » et le groupe 2 comprend les « related 3 et 4 » (Sherka et al., 2013) (Fig. 22 et 23). Ces protéines sont incapables d'inhiber l'activation de la voie du complément via une action sur la C3 convertase puisqu'aucune d'entre elle ne possède les domaines CCP1-4 nécessaires à cette fonction (Fig. 23). Cependant, toutes ces protéines possèdent les deux domaines de liaison aux GAG du CFH à savoir les CCP6-7 et CCP19-20, les rendant alors aptes à se lier sur les membranes cellulaires.

Le CFHR1 est une protéine de 37 à 43 kDa composée de 5 domaines CCP (CCP6-7 et CCP18-20) et présente une concentration plasmatique de 70 à 100µg/ml chez l'homme (Heinen et al., 2009 ; Sherka et al., 2013). L'étude de Juel ne montre pas d'expression du CFHR1 dans les cellules de l'EPR (Juel et al., 2011). Il est capable de se lier aux fragments C3b, C3d et aux GAGs mais ne possède pas d'activité cofacteur avec le CFI (Goicoechea de Jorge et al., 2013 ; Fritsche et al., 2010). In vitro, le CFHR1 est capable de se lier aux ARPE19, cellules de l'EPR humain, mais aussi sur les vaisseaux sanguins de la rétine et la membrane de Bruch (Heinen et al., 2009). Le CFHR1 entre en compétition avec le CFH pour sa liaison à la surface des membranes cellulaires mais n'empêche pas la formation excessive de MAC puisqu'il ne possède pas les domaines CCP1-4 (Sherka et al., 2013). Toutefois, cette protéine peut se lier à la C5 convertase via les sites de liaison au C3b contenus dans ses CCP6-8 et 19-20, et par conséquent limiter, quand même, la formation de MAC et ce à cause d'un complexe C5 convertase non fonctionnel (Heinen et al., 2009). Alors que la délétion du CFHR1 est un facteur aggravant pour le développement du SHUa, avec de surcroît une synthèse d'anticorps anti-CFH, elle est bénéfique, par contre, pour la DMLA (Dragon-Durey et al., 2009; Hughes et al., 2007; Kubista et al., 2011).

Le CFHR2 est composé de 4 domaines CCP homologues aux CCP6-7 et CCP19-20. Sa concentration sanguine est d'environ 50µg/ml (Sherka et al., 2013). L'expression du CFHR2 n'est pas observée dans les cellules ARPE19 (Juel et al., 2011). Tout comme le CFHR1, il est capable de se lier au C3b et aux GAGs présents sur les membranes cellulaires (Goicoechea de Jorge et al., 2013 ; Sherka et al., 2013). Cette protéine inhibe la boucle amplificatrice de la C3



convertase mais, malgré une liaison au C3b, n'entre pas en compétition avec le CFH pour cette liaison. (Goicoechea de Jorge et al., 2013 ; Sherka et al., 2013). En effet, le CFHR2 en se liant au C3b, piège la molécule et l'empêche de former de nouvelles C3 convertase inhibant l'amplification du système. Un polymorphisme du CFHR2 (rs3790414) a été associé à un risque accru de développer une DMLA (Eberhardt et al., 2013 ; Sherka et al., 2013) ce qui appuie encore le rôle du complément dans la pathogenèse de la DMLA.

Le CFHR5 est une protéine de 62kDa, composé de 9 domaines CCP correspondant aux domaines CCP6-7, 10-14 et 19-20 (Fig. 22, 23). L'équipe de Juel montre une expression in vitro du CFHR5 dans les cellules ARPE19 (Juel et al., 2011). Le CFHR5 peut se lier aux GAGs, à la CRP et au C3b, de plus il est un cofacteur du CFI (Goicoechea de Jorge et al., 2013 ; Sherka et al., 2013). Étant donné ses domaines CCP6-7 et 19-20, cette protéine peut aussi entrer en compétition avec le CFH pour sa liaison aux membranes cellulaires (Goicoechea de Jorge et al., 2013 ; Sherka et al., 2013). Cette molécule en liant beaucoup de C3b va entraîner l'inhibition de l'activation de la C5 convertase. De nombreuses mutations entraînant une protéine tronquée de CFHR5 ont été associées à une néphropathie, forme de GNC3 et une forme de glomérulonéphrite infectieuse (Gale et al., 2008 ; Vernon et al., 2012).

Les CFHR3 et 4, sont respectivement formés de 5 et 9 domaines CCP correspondant respectivement aux domaines CCP 6-8,19-20 (CFHR3) et CCP 6,8-9, 19-20, 6,8-9 et 19 (CFHR4) du CFH. In vitro, Ces protéines sont exprimées dans les cellules ARPE19 (Juel et al., 2011). Leur fonction n'est pas encore connue mais ces deux molécules se lient au C3b et C3d, ce qui pourrait leur permettre de jouer un rôle dans la régulation de la voie du complément (Hellwage et al., 1999). La co-délétion simultanée du CFHR3 et CFHR1 diminue le risque de développer la DMLA (Kubista et al., 2011), suggérant alors une compétition avec certaines fonctions du CFH : fixation aux membranes cellulaires des CFHR mais sans les protéger de l'activation de la VAC.

#### E) Voie alterne du complément et DMLA

**En absence de pathologie chez l'homme :** Bien que les protéines de la voie alterne du complément soient principalement produites par le foie, de nombreuses études montrent qu'il y a une synthèse locale de l'ensemble de ces molécules dans l'œil (Anderson et al., 2010; Chen et al., 2008; Seth et al., 2008). En effet, chez l'homme en absence de pathologie, les molécules



C3 et CFB sont principalement synthétisées par les cellules endothéliales de la choroïde mais aussi par le complexe ERP/membrane de Bruch, tout comme la formation de MAC à des concentrations sublytiques (Anderson et al., 2010 ; Chen et al., 2008 ; Seth et al., 2008). Une synthèse de C3 peut également être observée dans les vaisseaux de la rétine neurale mais à des concentrations plus faibles que celles observées dans le complexe ERP/membrane de Bruch/choroïde (Anderson et al., 2010). La molécule centrale C3, initiateur de l'activation de la VAC, représente, à elle seule, 5% de la production globale des protéines de la voie alterne du complément (Anderson et al., 2010). Afin de réguler correctement l'activation de la VAC et ainsi éviter d'amplifier la production de molécules à haut potentiel inflammatoire (C3a et C5a notamment), les régulateurs de cette voie du complément sont également produits par les cellules de la rétine humaine outre leur production principale par le foie. Ainsi, le CFH, principal inhibiteur de la VAC, est produit par les cellules endothéliales de la choroïde (Anderson et al., 2010). Son cofacteur, le CFI est synthétisé principalement par les cellules de la rétine neurale (cellules ganglionnaires et couche nucléaire interne) et, dans une moindre mesure, par les cellules endothéliales de la choroïde (Anderson et al., 2010). Toutefois, pour maintenir un « équilibre inflammatoire » à bas bruit, la rétine a besoin d'exprimer également des facteurs activateurs de la VAC, et ce aussi, afin de pouvoir répondre rapidement à un stress si cela se trouvait nécessaire et ainsi induire une réponse inflammatoire. Le principal activateur de cette voie, le CFB, est produit par les cellules endothéliales choroïdiennes humaines (Anderson et al., 2010), mais aussi, par la rétine neurale et plus abondamment par les cellules de l'EPR (Chen et al., 2008; Mandal and Ayyagari, 2006; Skeie and Mahajan, 2014). Au cours du vieillissement, cet équilibre entre l'expression des facteurs activateurs et inhibiteurs de la VAC va se rompre et entraîner, selon le cas, une réaction inflammatoire aiguë, ou au contraire, un déficit immunitaire.

Ces données suggèrent l'importance d'une régulation de l'activation de la voie alterne du complément et notamment celles de l'expression des facteurs CFH et CFB principaux acteurs régulateurs de ce processus.

**Au cours de la DMLA**, l'expression des molécules du complément change aussi bien au niveau quantité que localisation. En effet, des analyses protéomiques ont montré que l'ensemble des facteurs du complément est localisé dans et autour des drusen de patients atteints de DMLA (Crabb et al., 2002 ; Rattner et Nathans., 2006). Les molécules CFB et C3 sont également



fortement surexprimées dans les vaisseaux choroïdiens, la membrane de Bruch et les cellules de l'EPR de ces patients (Anderson et al., 2010; Mullins et al., 2001; Nozaki et al., 2006). Une augmentation de la concentration de MAC, au niveau de la membrane de Bruch et des vaisseaux choroïdiens, est également observée dans la rétine de ces patients atteints de DMLA (Mullins et al., 2014 ; Anderson et al., 2010). De même, il a été montré une augmentation de la concentration de C3, du CFD et du CFB dans le sang des patients atteints de la DMLA par rapport aux patients du même âge sans pathologie (Reynolds et al., 2009; Scholl et al., 2008; Sivaprasad and Chong, 2006; Smailhodzic et al., 2012; Stanton et al., 2011). Outre ces molécules, les concentrations plasmatiques des produits de clivage du C3 (C3a/C3b), du C5, du CFH et du CFD sont aussi augmentées chez les patients atteints de DMLA, toutes formes confondues, par rapport aux patients du même âge sans pathologie (Reynolds et al., 2009; Scholl et al., 2008; Sivaprasad and Chong, 2006; Smailhodzic et al., 2012; Stanton et al., 2011).

L'ensemble de ces données suggère une implication non négligeable de la voie alterne du complément dans la pathogenèse de la DMLA. Ainsi, les protéines C3, C5, CFB, CFD, CD59 (pour le MAC) et CFH, principaux acteurs de la VAC, ont été très étudiés pour leur implication dans les mécanismes impliqués dans le développement de la DMLA : angiogenèse/inflammation et stress oxydants.

#### a) Polymorphismes associés au complément et DMLA

Plusieurs polymorphismes, associés aux molécules de la voie alterne du complément, ont été identifiés comme des facteurs aggravants, ou au contraire, protecteurs dans le développement des deux formes de la DMLA : forme atrophique et néovasculaire. La découverte de ces polymorphismes suggère fortement un rôle de l'activation de la voie alterne du complément dans la pathogenèse des deux formes de DMLA. Les acteurs de la VAC, les plus fortement associés au développement de la DMLA, sont le C3, le CFB, le CFD et le CFH.

Le C3 a été étudié dans la DMLA après la découverte d'un polymorphisme associé à la pathologie (Yates et al., 2007). Il s'agit du polymorphisme R80G qui augmente le risque de développer la forme néovasculaire de la DMLA de 1.4 fois (Yates et al., 2007), suggérant un effet aggravant de cette molécule dans cette neurodégénérescence rétinienne.

Le CFB a également été mis en cause lorsque le polymorphisme R32Q a été associé, non pas, au développement de la pathologie mais, au contraire, comme un polymorphisme



protecteur de la DMLA néovasculaire (Hughes et al., 2011 ; Montes et al., 2009), suggérant que la perte de fonction de ce facteur est bénéfique pour ne pas développer cette forme de la DMLA.

Le CFD représente une susceptibilité génétique de développer les deux formes de la DMLA. En effet, un polymorphisme (SNP rs3826945) est associé au développement de la pathologie sous ses deux formes (Stanton et al., 2011), suggérant que le CFD est, comme le C3 et le CFB, un facteur aggravant de la DMLA.

Le CFH est le facteur du complément dont le polymorphisme Y402H représente **LE FACTEUR** de risque le plus élevé de développer une des deux formes de DMLA (Haines et al., 2005 ; Edward et al., 2005 ; Hageman et al., 2005 ; Klein et al., 2005). Plus précisément ce risque est multiplié par 7 à l'état homozygote (Haines et al., 2005 ; Edward et al., 2005 ; Hageman et al., 2005) et 4.6 à l'état hétérozygote (Klein et al., 2005).

D'autres polymorphismes associés à d'autres molécules du complément ont été mis en évidence pour leur risque de développer l'une ou l'autre forme de la DMLA, comme le C5 et le CFI (Baas et al., 2010; Bonyadi et al., 2017; Yaspan et al., 2017; Yates et al., 2007), mais les associations de cause à effet restent faibles vis-à-vis de ceux décrits ci-dessus.

b) Implication des molécules de la VAC dans les processus responsables du développement de la DMLA

L'implication des molécules de la voie alterne du complément dans le développement des processus impliqués dans la DMLA a principalement été étudié dans le modèle murin de néovascularisation choroïdienne (CNV) décrit précédemment (page 53).

Le C3 : Dans la rétine de souris, la surexpression de C3 induit non seulement une augmentation de la perméabilité vasculaire, de la prolifération et de la migration des cellules endothéliales, mais induit aussi une atrophie des cellules de l'EPR, une perte des segments externes des photorécepteurs et une gliose (Cashman et al., 2011), phénomènes observés dans la rétine de patients atteints de la forme néovasculaire de la DMLA. De plus, dans le modèle de néovascularisation choroïdienne, l'abolition de l'expression de C3 diminue à la fois la surface de néovascularisation induite par laser et l'expression du VEGF (Bora et al., 2005), démontrant un rôle pro-angiogénique du C3. De même, l'inhibition de l'expression du récepteur au C3a chez la souris soumise au CNV entraîne aussi une diminution de la surface de néovascularisation choroïdienne et de l'expression de VEGF (Nozaki et al., 2006). Des résultats identiques ont été obtenus à la suite du blocage de la molécule C3a à l'aide d'un anticorps anti-



C3a (Nozaki et al., 2006), confirmant bien l'implication du C3 et de ses fragments de clivage dans le processus d'angiogenèse. L'ensemble de ses études montre clairement un rôle pro-angiogénique du C3 et du C3a dans la pathogenèse de la forme néovasculaire de la DMLA. C'est pourquoi la molécule C3 a été choisie comme cible thérapeutique de la forme néovasculaire de la DMLA. Un anticorps anti-C3a (POT4 potentia pharmaceutical, USA) a été utilisé pour une seule et unique injection dans le vitré des patients (Kaushal et al., 2009). Malheureusement, cet essai clinique s'est arrêté en phase II, en 2010, pour des raisons non communiquées. Cependant, des essais thérapeutiques utilisant des peptides C3 sont toujours à l'essai, en phase III. La phase II s'étant achevée en août 2017 (Tableau 1), pour les deux formes de la DMLA (Mastellos et al., 2015; Qu et al., 2013).

Le CFB : L'invalidation de l'expression du gène codant pour le CFB chez la souris soumise au modèle CNV entraîne une diminution de la surface de néovascularisation choroïdienne par rapport aux souris contrôles (Schnabolk et al., 2015). De même, l'abolition de l'expression du CFB dans la rétine, via l'injection de siRNA spécifiques, induit aussi une diminution de la surface de néovascularisation, mais également une diminution de la concentration de MAC et de l'expression des transcrits codant pour les facteurs pro-angiogéniques vegf et tgf-beta2 (Bora et al., 2006). Ces données montrent que le CFB a une activité pro-angiogénique dans le modèle CNV. Afin de confirmer cet effet, Schnabolk et collaborateurs ont montré que l'injection de CFB dans la rétine de souris CFB<sup>-/-</sup> soumises au modèle CNV restaure la surface de néovascularisation choroïdienne précédemment diminuée par l'inhibition de l'expression du CFB (Schnabolk et al., 2015). L'ensemble de toutes ces données démontre, sans ambiguïté, le rôle pro-angiogénique du CFB dans le modèle CNV. Pour le moment seul l'anti-CFB TA106 de « Taligen Therapeutics » cible cette protéine et est actuellement en essai préclinique (Tableau 1).

Le CFD : Le CFD serait plutôt impliqué dans la survie des cellules rétiniennes et notamment celle des photorécepteurs. En effet, chez la souris soumise à une forte phototoxicité l'invalidation de l'expression du gène codant pour le CFD diminue significativement la mort des photorécepteurs (Rohrer et al., 2007). Alors qu'actuellement aucune donnée ne montre un effet pro-angiogénique du CFD, ce facteur serait plutôt impliqué dans la pathogenèse de la forme atrophique de la DMLA et par conséquent dans la mort cellulaire. En effet, l'étude « Mahalo » a montré qu'une injection intravitréenne mensuelle pendant 18 mois d'un anticorps anti-CFD spécifique (Lampalizumab) diminue de 20% la progression de l'atrophie géographique observée dans la rétine de patients atteints de la forme atrophique de la DMLA



par rapport à l'injection d'un placebo (Yaspan et al., 2017). Cet essai clinique en phase II, sur une cohorte de 129 patients, a suscité beaucoup d'espoirs. Toutefois, au cours de l'été 2017, les auteurs ont publié un rapport de leur étude en phase III (Spectry Study) selon lequel leur principal critère d'efficacité (diminution de la progression atrophique) n'a pas été atteint suite à l'injection intravitréenne du Lamaplizumab et ce dans une cohorte de 1800 patients de 20 pays différents (étude "Mahalo"). Les résultats de leur deuxième phase III (étude Chroma) seront rendus publics au cours de l'hiver 2019. A la suite de cette étude sur le Lampalizumab, deux autres anticorps anti-CFD ont été mis au point : FCFD4514S et TA106. Ces deux anticorps sont actuellement testés en clinique, de la même façon que pour le Lampalizumab, dans le but d'une thérapeutique contre la forme atrophique de la DMLA (Van Lookeren Campane et al., 2010 ; Do et al., 2014).

Le C5 : Dans le modèle CNV appliqué à la souris, l'invalidation de l'expression du gène codant pour la protéine circulante C5 diminue fortement la surface de néovascularisation choroïdienne et l'expression du vegf (Nozaki et al., 2006). Ces données démontrent un effet pro-angiogénique du C5. Cette molécule a également fait l'objet de nombreux essais cliniques dans le but de traiter les deux formes de la DMLA : atrophique et néovasculaire. En effet, plusieurs molécules ont été testées 1- l' LFG316 (Novartis) : un anti-C5, injecté en intravitréen dans le cadre des deux formes de la pathologie, il a été abandonné en 2015 après la phase clinique II pour des raisons non communiquées ; 2- l'Eculizumab (Soliris) : un anticorps monoclonal anti-C5 injecté en intravitréen dans le cas de la forme atrophique de la DMLA et abandonné en phase II car non efficace ; 3-l'ARC1905 (Ophthotech Corp. Princeton, NJ) : un aptamère anti-C5, utilisé en une injection intravitréenne dans le cadre des deux formes de la DMLA, mais a également été abandonné en 2013 ; et 4- Le Zimura (Ophthotech) : un aptamère anti-C5 utilisé en association avec un anti-VEGFs dans le cadre des deux formes de la DMLA , ce traitement est actuellement en cours d'évaluation en phase II (Tableau 1).

Le MAC, du fait de ses différentes fonctions, peut être un facteur aggravant de la DMLA. En effet, ce pore membranaire n'est pas impliqué que dans la lyse cellulaire, mais également, dans la régulation des flux ioniques (notamment celui du calcium), dans la sécrétion du VEGF, ou encore dans la mort cellulaire par apoptose ou l'inflammation : processus impliqués dans la DMLA (Bohana-Kashtan et al., 2004; Jeon et al., 2014; Lueck et al., 2011; Tegla et al., 2011). Toutes ces fonctions ne sont pas dramatiques lorsqu'elles sont contrôlées, c'est-à-dire à des concentrations non excessives de MAC : sublytique. La concentration de la molécule CD59, inhibiteur naturel de la formation du MAC, est diminuée chez les patients atteints de DMLA

Rétine humaine normale		Rétine humaine atteinte de DMLA	
Protéine (production locale)	Cellules/tissus	Protéine	Cellules/tissus
CFH, C3, CFB, MAC (MAC=concentration sublytique)	Cellules endothéliales EPR Choroïde	CFH, C3, CFB, MAC	Dans et autour des drusen
		Surexpression de CFB et C3	Vaisseaux choroïdiens, membrane de Bruch, EPR
		Surexpression de MAC	Vaisseaux choroïdiens, membrane de Bruch

Gènes/polymorphisme/mutation	Risque de développement de la DMLA
CFH	Augmente de 7 fois les risques
C3	Augmente de 1,4 fois les risques
CFH	Mutation protectrice contre la DMLA

Rétine de souris	Observation
Surexpression de C3	Augmentation de la perméabilité vasculaire Prolifération et migration endothéliale Atrophie de l'EPR
Surexpression du MAC	Surexpression du VEGF et de CCL2
Délétion de C3	Reduction de la CNV et de l'expression de VEGF
Délétion de C5	Reduction de la CNV et de l'expression de VEGF
Délétion de CFB	Reduction de la CNV, de l'expression de VEGF et de la production de MAC
Blocage du MAC	Reduction de la CNV et de l'expression de VEGF

**Tableau 2** : rôle du complément dans le développement de la DMLA

(Singh et al., 2012) et dans le modèle murin CNV (Bora et al., 2007), suggérant un moins bon contrôle de la formation du MAC. Quand de fortes concentrations de MAC sont observées sur les membranes cellulaires, alors se développent une réaction inflammatoire aigue et une angiogenèse non contrôlée. En effet, la formation de MAC, induit une augmentation non seulement de la sécrétion des interleukines IL6, IL8 et de l'expression de CCL2, mais aussi, des MMP-2 et 9 qui sont impliquées dans l'angiogenèse (Kunchithapautham and Rohrer, 2011; Lueck et al., 2011). Ceci suggère qu'une non régulation de la production de MAC entraîne une expression excessive de ces facteurs pro- inflammatoires et pro-angiogéniques. Une étude a montré que l'apport de CD59, par un adénovirus dans la rétine de souris soumise au modèle CNV, réduit la néovascularisation choroïdienne induite par le laser (Cashman et al., 2011), en accord avec un rôle pro-angiogénique du MAC. Dans ce même modèle CNV, l'injection dans le vitrée, d'une protéine de fusion composée du CD59 associé à un IGg, dans le but d'obtenir une molécule à pouvoir thérapeutique, réduit non seulement la surface de néovascularisation induite par laser, mais également l'expression transcriptionnelle des facteurs pro-angiogéniques (Bora et al., 2007). Le MAC a donc clairement un rôle pro-angiogénique lorsqu'il est produit en forte concentration dans l'EPR. Outre cette fonction, la réduction de la concentration de MAC, par apport de CD59 dans le vitrée de souris soumises au modèle CNV, protège les cellules de l'EPR de la lyse (Cashman et al., 2011), démontrant un rôle du MAC dans la mort cellulaire (Cashman et al., 2011).

L'ensemble de toutes ces données (Tableau 2) démontre sans ambiguïté l'implication de la voie alterne du complément dans la pathogenèse des deux formes de la DMLA, d'où les diverses tentatives d'essais thérapeutiques. Toutefois, aucun de ces essais cliniques n'est pour l'instant concluant et ce malgré cette forte implication du complément dans la DMLA. Une raison possible est que la voie alterne du complément n'est pas un élément primordial dans le déclenchement de la pathologie mais est un élément aggravant. L'autre raison serait qu'actuellement on n'ait pas encore trouvé la bonne cible thérapeutique de la voie du complément suffisante pour traiter les deux, ou au moins, une forme de la DMLA. Après les tests non concluants des facteurs activateurs de la voie du complément (CFD, C3 et C5), il paraît logique, et même nécessaire, de tester les inhibiteurs de cette voie, comme le CFH par exemple, et ce pour essayer de réguler cette voie et non pas la stopper. En effet, l'arrêt total de l'activation de la voie alterne du complément pourrait avoir des conséquences immunitaires graves pour le patient, puisque c'est cette voie qui est la première à réagir en cas d'infection.



## F) CFH et processus de la DMLA

Le polymorphisme Y402H du CFH est le facteur de risque de développer l'une ou l'autre forme de la DMLA. La concentration plasmatique du CFH est augmentée chez les patients atteints de DMLA porteur de la mutation (Hakobyan et al., 2008). Cette dernière donnée est controversée puisque l'étude de Scholl ne montre pas de différence de concentration plasmatique du CFH entre les patients atteints de la DMLA, sans distinguer les allèles Y402H, et les personnes saines, alors que l'étude de Reynolds montre une diminution de ce taux plasmatique chez les personnes atteintes de DMLA comparées aux personnes non malades (Scholl et al., 2008 ; Reynolds et al., 2009). Ces données montrent que le taux plasmatique de CFH n'est pas un bon indicateur de la DMLA. En revanche, il a clairement été montré que l'expression du CFH muté ou pas, quant à lui, diminue dans l'EPR, la membrane de Bruch et la choroïde des patients atteints de DMLA (Bhutto et al., 2011 ; Johnson et al., 2006), suggérant qu'une fois installée la DMLA réduit l'expression d'un facteur potentiellement protecteur de la survie des cellules rétinienne. Le CFH est une cible thérapeutique potentielle pour traiter les deux formes de DMLA, cependant il reste à approfondir par quels mécanismes il peut y parvenir.

### a) Polymorphisme Y402H du CFH et DMLA

Comme décrit précédemment, les diverses fonctions du CFH sont dues à ses différents domaines CCP. La susceptibilité du polymorphisme Y402H dans la DMLA pourrait être expliquée par un gain ou une perte de fonction du CFH résultant d'un changement d'acide aminé dans le CCP7, domaine contenant cette mutation. En effet, ce polymorphisme implique le remplacement d'un acide aminé aromatique non chargé par un acide aminé de charge positive, pouvant alors être responsable d'une structure tridimensionnelle modifiée voir même altérée. Ce changement, dans le domaine 7 du CFH, semblerait diminuer sa capacité à se lier sur les GAGs présents sur les membranes des cellules cibles et ainsi ne pas les protéger de la lyse cellulaire induite par une formation excessive de MAC (Blackmore et al., 1996). Cette théorie est controversée par des études montrant que ce changement d'acide aminé n'a pas d'impact direct sur la liaison du CFH aux cellules de l'EPR (Clark et al., 2010 ; Ormsby et al., 2008). À ce jour, aucun mécanisme précis du CFH Y402H n'a vraiment été mis en évidence expliquant son implication dans la pathogenèse de la DMLA.

### b) CFH et inflammation



Étant donné sa fonction d'inhibiteur de l'activation de la voie alterne du complément, le CFH réduit la production des molécules anaphylactiques C3a et C5a, réduisant considérablement l'inflammation pouvant en découler. En revanche, certaines cytokines peuvent, à leur tour, réguler l'expression du CFH entraînant alors une sorte d'auto-régulation des réactions inflammatoires. En effet, il a été montré, *in vitro*, que le traitement des cellules de l'EPR, par l'interleukine Il-8 ou par le TNF $\alpha$ , induit une augmentation de l'expression du CFH (Lau et al., 2011 ; Weissman et al., 2011), suggérant une recherche d'équilibre entre l'expression des cytokines et du CFH. Il existe également une interaction entre les domaines CCP6-8 du CFH et la protéine CRP qui va aussi forcément moduler les réactions inflammatoires. Cette liaison va augmenter l'affinité du C3b pour le CFH augmentant ainsi l'inhibition de l'activation de la VAC et donc la production des molécules inflammatoires en découlant (Mold et al., 1984, 1999). Le polymorphisme Y402H du CFH va perdre cette capacité à se lier à la CRP (Blackmore et al., 1996 ; Ormsby et al., 2008), suggérant un moindre contrôle de la réaction inflammatoire environnante. Ces données sont confortées par une étude montrant que l'augmentation des taux sériques de CRP chez les patients portant le polymorphisme Y402H du CFH, augmente les risques de développer la pathologie par rapport au groupe ayant un taux de CRP normal (Despriet et al., 2006). En revanche, il a été montré que les cellules de l'EPR, la membrane de Bruch et la choroïde des patients atteints de DMLA, porteurs ou pas du polymorphisme Y402H, présentent de plus fortes concentrations de CRP par rapport aux personnes du même âge sans pathologie (Bhutto et al., 2011 ; Johnson et al., 2006). Ces dernières données suggèrent que le taux de CRP augmente chez les patients atteints de DMLA accentuant ainsi le risque de développer cette pathologie.

De plus, ce taux élevé de CRP dans les tissus rétiniens n'est pas dépendant de la forme du CFH exprimée (Y402H ou pas). Le CFH peut également se fixer sur certaines cellules inflammatoires et ainsi en moduler leurs fonctions. En effet, il a été montré récemment que le CFH est capable de se lier sur le récepteur CD11b des macrophages les protégeant ainsi de la mort induite par la TSP1 via son récepteur CD47 (Calippe et al., 2017) maintenant la présence sur le site de lésion de macrophages nécessaires au nettoyage de la zone lésée. Cependant, cette fonction du CFH est perdue en présence du polymorphisme Y402H induisant alors une mort excessive des macrophages par la fixation du TSP1 sur son récepteur CD47 (Calippe et al., 2017). Le CFH ne va pas uniquement intervenir dans la survie des cellules macrophagiques mais aussi dans la régulation de leur migration sur le site de lésion. En effet, l'utilisation d'une souris chimérique, exprimant les domaines CCP1-4 et CCP9-20 du CFH de souris mais les



domaines CCP6-8 du CFH humain et comportant la mutation Y402H sur le CCP7, montre une infiltration microgliale/macrophagique plus importante dans la rétine par rapport aux souris normales (Aredo et al., 2015), démontrant bien un effet du CFH sur ce processus inflammatoire. De plus, ces résultats démontrent un effet du polymorphisme Y402H du CFH qui pourrait être un précoce dans la compréhension du mécanisme d'action du CFH dans la pathogenèse de la DMLA.

Comme dans de nombreuses pathologies les réactions inflammatoires sont associées à du stress oxydant, comme c'est le cas pour la DMLA. En fait, au cours du vieillissement l'accumulation de lipides peroxydés sur les membranes des cellules de l'EPR sont souvent à l'origine de réactions inflammatoires avec une infiltration microgliale/macrophagique pouvant être accompagnée d'une angiogenèse (Shaw et al., 2012). Or, il a été montré que le CFH lie ces lipides peroxydés avec une forte affinité et, de ce fait, diminue la réaction inflammatoire associée (Shaw et al., 2012). En présence du polymorphisme Y402H, la réaction inflammatoire n'est pas diminuée, et il est observé à la place une lyse cellulaire (Shaw et al., 2012), certainement par une non liaison du CFH Y402H sur ces membranes.

### c) CFH et stress oxydant

Le MDA, comme le 4HNE, est un produit de peroxydation des lipides dû à la présence de stress oxydants et s'accumule au cours du vieillissement. L'ensemble de ces lipides peroxydés sont présents dans les drusen, l'EPR et la membrane de Bruch des patients atteints de DMLA (Ethen et al., 2007; Schutt et al., 2003). En revanche, ils ne présentent pas la même affinité de liaison avec le CFH. En effet, alors que le MDA est capable de se lier spécifiquement au CFH, le 4HNE, ou ses adduits, n'ont aucune affinité de liaison avec ce facteur (Weissman et al., 2011), démontrant une certaine spécificité de liaison du CFH avec certains lipides peroxydés. De façon intéressante, le polymorphisme Y402H du CFH perd cette capacité de liaison au MDA (Weissman et al., 2011), suggérant là aussi un possible mécanisme d'action du CFH sur les conséquences d'un stress oxydant. Une fois lié au MDA, le CFH, en présence de CFI, clive le C3b en C3bi inactif (Weisman et al., 2011), suggérant un lien direct entre le CFH, le stress oxydant et l'inflammation. Lien renforcé par des travaux montrant que, suite à un traitement au H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, les cellules ARPE19 sécrètent plus de C3a (Zhang et al., 2015), suggérant que le stress oxydant appliqué aux cellules diminue l'expression du CFH puisque le C3 est clivé en C3a qui est pro-inflammatoire. La diminution de l'expression du CFH suite un stress oxydant a été



réellement démontrée dans la rétine. En effet, la culture de cellules de l'EPR de souris, supplémentée en segments externes de photorécepteurs oxydés, entraîne une diminution significative de l'expression de CFH (Chen et al., 2007). Une autre étude sur des cellules ARPE-19 sénescents, après induction d'un stress oxydant au H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, montre une diminution de l'expression du CFH associé à une augmentation de l'expression du VEGF (Marazita et al., 2016 ; Zhang et al., 2015). De plus, comme mentionné précédemment l'ajout d'un stress oxydant sur des cellules APRE19 préalablement traitées avec de l'Il-8 abolit l'augmentation de l'expression du CFH induite par cet interleukine (Lau et al., 2011). Toujours in vitro, cette étude montre aussi que l'ajout d'interféron gamma sur les cellules ARPE-19 en culture induit une surexpression du CFH qui est inhibée (ARNm et protéine) par ajout d'un stress oxydant (Lau et al., 2011). Confortant l'idée que la présence de stress oxydant diminue l'expression du CFH, une étude menée sur les cellules ARPE19 montre que l'induction d'un stress oxydant suivie de l'ajout d'une molécule chélatrice de ce dernier, de type vitamine C ou tempol, inhibe la diminution d'expression du CFH (ARNm et protéine) (Lau et al., 2011). L'ensemble de toutes ces études démontre clairement un lien étroit entre le CFH, les cellules de l'EPR, le stress oxydant et l'inflammation.

#### d) CFH et angiogenèse

L'angiogenèse et l'inflammation sont des processus liés du fait que lors d'une inflammation le recrutement de macrophages et de microglies induit une hypoxie aboutissant à la production de VEGF molécule pro-angiogénique (Pang et al., 2008 ; Knowles et al., 2004). De plus, la sécrétion de VEGF est augmentée par la formation du MAC produit final de la voie du complément (Liu et al., 2011), ce qui montre bien un lien étroit entre les deux mécanismes.

Dans le modèle CNV induit par laser appliqué à des souris, il a été montré que l'utilisation de siRNA permettant l'inhibition de l'expression du CFH localement dans la rétine, entraînait la formation d'une néovascularisation plus étendue aux jours 3, 5 et 7 post-laser (Lyzogubov et al., 2010). A l'inverse, dans un modèle CNV appliqué au rats, l'injection intravitréenne de CFH permet de réduire de façon significative la formation de MAC mais aussi de réduire la surface de néovascularisation choroïdienne (Kim et al., 2012). En accord avec ces données, il a été montré, chez des souris soumises au modèle CNV, que l'injection d'une protéine chimère (TT30), composée du récepteur CR2 (domaine de liaison aux produits de clivage du C3) associé aux domaines CCP1-4 du CFH régulateurs de l'activation de la VAC, entraîne une réduction significative de la surface de néovascularisation et de l'expression du VEGF (Rorher et al.,



2009). L'ensemble de ces résultats montre que le CFH présent dans le complexe EPR/choroïde est impliqué dans la régulation de la néovascularisation, possiblement par l'intermédiaire du taux de MAC formé puisqu'il facilite la sécrétion du VEGF. Toutefois, l'invalidation de l'expression du CFH chez la souris ne récapitule pas à elle seule l'ensemble des caractéristiques de la DMLA, montrant que ce facteur n'est pas seul responsable de la pathologie. En effet, une étude menée chez ces souris montre que jusqu'à trois mois ces dernières présentent un lit vasculaire choroïdien identique à celles des souris normales, une structure de la rétine non altérée et pas de dépôts majeurs de C3 (Coffey et al., 2007 ; Pickering et al., 2002). Cependant, en vieillissant ces souris présentent à l'âge de 2 ans, un lit vasculaire altéré, une membrane de Bruch moins épaisse, des dépôts importants de C3 et des désorganisations au niveau des photorécepteurs (batônnets) (Coffey et al., 2007). De même, un déficit structural et dynamique des vaisseaux sanguins dans la rétine de ces souris sont observés à l'âge de 2 ans (Lundh von Leithner et al., 2009). Toutes ces études montrent clairement, un rôle de l'activation de la VAC dans l'angiogenèse et un rôle du CFH dans la régulation de cette angiogenèse choroïdienne.

**En conclusion, toutes ces données sur la nécessité de contrôler l'activation de la voie alterne du complément afin de limiter les réactions inflammatoires, le stress oxydants et l'angiogenèse, montrent bien l'implication de la VAC dans la pathogenèse de la DMLA. De ce fait, et du fait que le polymorphisme Y402H du CFH est le facteur de risque de développer une DMLA, le CFH est une cible thérapeutique intéressante pour traiter les deux formes de la DMLA.**

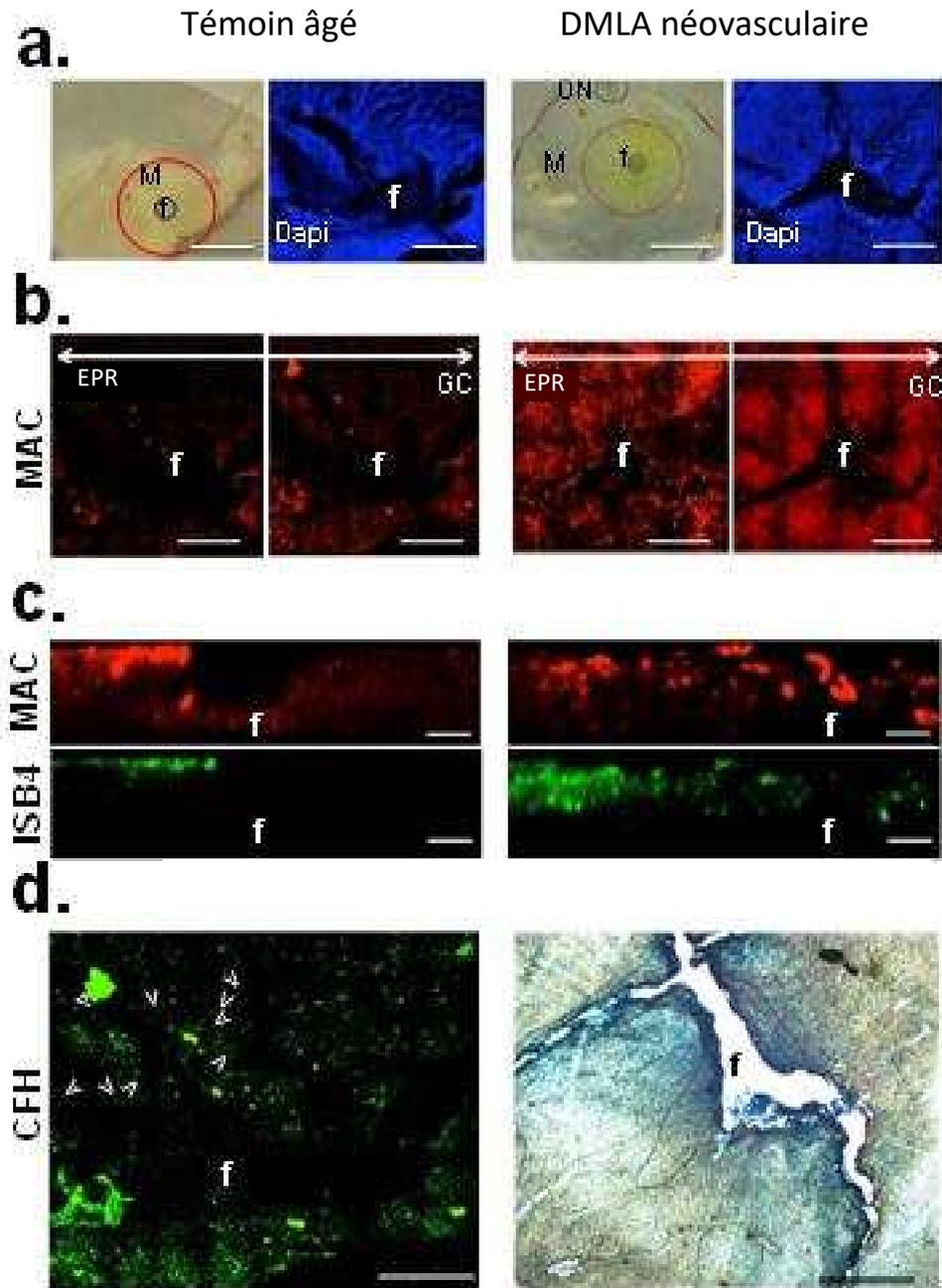


## **PROJET :**

Comme mentionné précédemment, la DMLA, sous ses deux formes (atrophique et néovasculaire), constitue un enjeu de santé publique puisque cette pathologie multifactorielle va toucher plus de 2,250 millions de personnes d'ici 2030 et ce rien qu'en France. Actuellement, seule la forme néovasculaire est traitée par des injections mensuelles d'anti-VEGFs ce qui représente environ 20% des patients, la forme atrophique de la maladie étant plus présente. De plus, ce traitement non curatif a des limites, non seulement, à long terme chez les patients qui développent une résistance à ce traitement, mais aussi, vis-à-vis d'un groupe non négligeable de patients (20 à 30%) qui eux ne répondent pas du tout aux injections intravitréennes d'anti-VEGFs dès le début du traitement. Ces données sont la preuve même qu'il faut absolument trouver d'autres cibles thérapeutiques pouvant traiter les deux formes de DMLA et ce à long terme. Parmi les candidats les plus prometteurs se trouve le facteur H (CFH) de la voie alterne du complément puisque le polymorphisme Y402H du CFH est le facteur de risque, le plus élevé à ce jour, pour développer une DMLA (augmenté de 6 à 7 fois). Le CFH est un inhibiteur de l'activation de la voie alterne du complément et va donc intervenir sur la régulation des réactions inflammatoires qui y sont associées. De plus, le CFH peut également interagir avec les lipides peroxydés qui sont eux connus pour jouer un rôle majoritaire dans la pathogenèse de la DMLA. Malgré ces données, le ou les mécanisme(s) d'action du CFH sur ces deux processus, responsables du développement des deux formes de la DMLA, reste(nt) malheureusement méconnus. Un des objectifs de mon projet de thèse a donc été 1- de caractériser le ou les effet(s) du CFH sur tous les principaux processus impliqués dans la pathogenèse de la DMLA : inflammation, stress oxydant et angiogenèse ; 2- d'identifier le ou les domaines du CFH spécifique(s) à la régulation de ces processus ; 3- de mettre en évidence le ou les voies de transduction impliquées dans les effets du CFH sur l'angiogenèse, le stress oxydant et l'inflammation ; et 4- de définir les différentes interactions possibles entre le CFH, l'inflammation et l'angiogenèse, et ce afin d'identifier d'autres cibles thérapeutiques potentielles pour traiter la DMLA. Le deuxième objectif de ce travail de thèse a été de caractériser le ou les rôles du CFH sur une des cibles principales de la DMLA : les cellules de l'épithélium pigmentaire de la rétine (EPR). En effet, ces cellules sont les premières cibles de l'accumulation de molécules oxydées, qui sur le long terme, aboutit à la rupture de la barrière hémato-rétinienne : passant alors de la forme atrophique à la forme néovasculaire de la DMLA. Pour ce volet de ma thèse, nous avons identifié le ou les domaine(s) du CFH capable(s) de protéger les cellules de l'EPR de la mort induite, in vitro, par un stress oxydant de type 4HNE.



**L'ensemble de ce projet de thèse devrait nous permettre de valider le CFH comme une molécule médicament aussi bien pour traiter la forme atrophique que néovasculaire de la DMLA.**



Borras et al, en cours de publication

**Fig. 24** : Activation de la voie alterne du complément dans la DMLA néovasculaire

**a**-Localisation de la région fovéale et maculaire de la rétine à plat de deux donneurs : l'un atteint de la DMLA néovasculaire (86 ans) et l'autre sain (83 ans). **b, c**- immunomarquage du MAC (C5b9, rouge) et des vaisseaux (ISB4, vert) sur les montages à plat de rétines des donneurs (DMLA gauche) et sain (droite). **d**- immunomarquage du CFH sur les rétines à plat des deux mêmes donneurs. ON (optic nerve= nerf optique), EPR (épithélium pigmentaire de la rétine), GC (cellules ganglionnaires), F (fovéa) et M (Macula). Echelle 10 $\mu$ m.

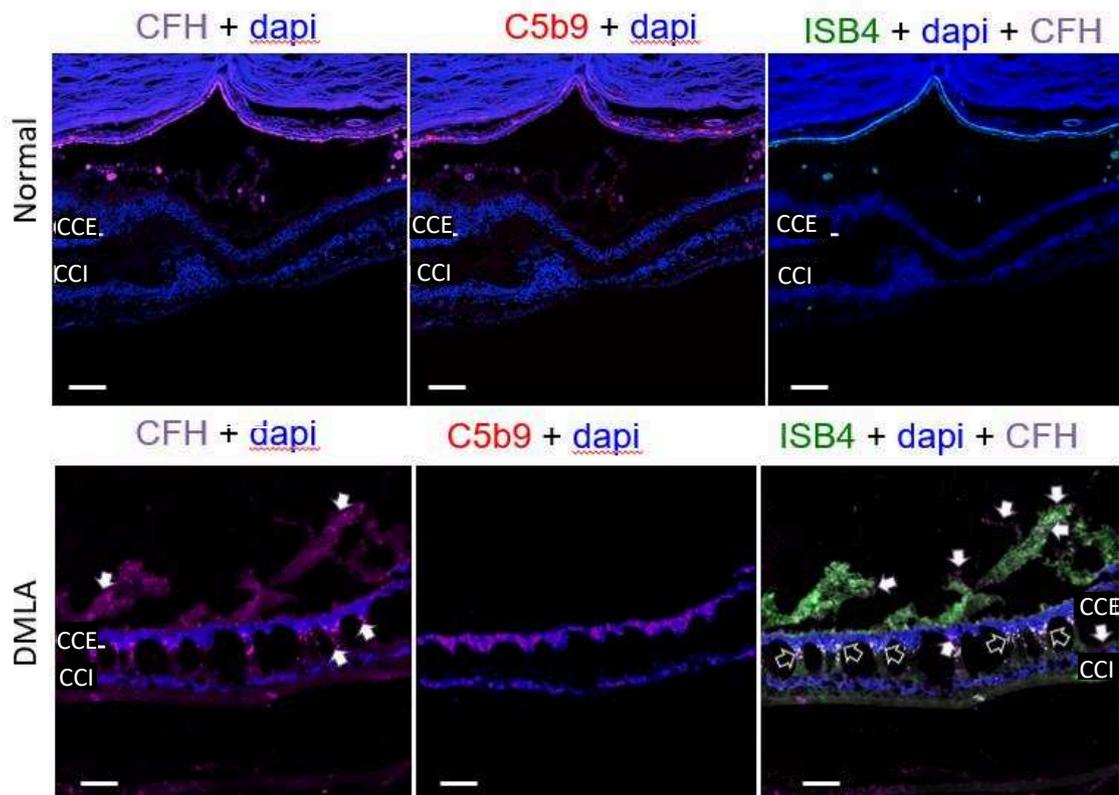
## RESULTATS

---

### Partie 1 - CFH et processus impliqués dans la DMLA

#### **I. Expression du CFH dans la rétine de patients atteints de la forme néovasculaire de la DMLA**

Dans un premier temps, afin de donner une certaine réalité du CFH en tant que cible thérapeutique pour la DMLA, nous avons comparé l'expression de ce facteur dans la région maculaire d'un patient atteint de la forme néovasculaire de la DMLA à celle d'une personne du même âge mais ne présentant pas de pathologie particulière. Nous avons obtenu des yeux de deux patients âgés de 86 ans et 83 ans et de deux personnes saines à peu près du même âge. Comme ces échantillons sont rares et précieux, nous avons réalisé pour le premier un montage à plat (MP) de la rétine neurale contenant la région maculaire, puis pour le deuxième, nous avons fait des coupes en cryotomie (OCT) nous permettant d'observer des immunomarquages spécifiques dans le complexe EPR/choroïde/rétine neurale et non plus uniquement dans la rétine neurale. Avec ces deux techniques, nous avons pu ainsi caractériser l'expression du CFH et du MAC (C5b9) par immunofluorescence avec des marqueurs spécifiques de ces deux facteurs et ce dans toute la macula et sa région (en transversale (MP) et longitudinal (OCT)). Les résultats de MP obtenus montrent une surexpression du MAC dans la région maculaire du patient atteint de la forme néovasculaire de la DMLA (Fig. 24 a, b), suggérant un non contrôle de l'activation de la voie alterne du complément. De façon intéressante, nous montrons que cette expression coïncide avec la présence de néovaisseaux dans la macula immunomarqués à l'ISB4 (un marqueur de vaisseaux) (Fig. 24c). En accord avec ces résultats, nous montrons un immunomarquage au CFH concentré que dans la macula et plus précisément autour de la région fovéaire du patient atteint de la forme néovasculaire de la DMLA (Fig. 24d). Au contraire, l'expression du CFH est localisé de façon homogène dans toute la macula de la personne non malade (Fig. 24d). La surexpression du MAC dans toute la macula et la concentration de CFH autour de la fovéa du patient atteint de la forme néovasculaire de la DMLA sont en accord avec une suractivation de la voie alterne du complément dans des zones néovasculaires (Fig. 24c, d). **Ces premiers résultats nous ont permis de montrer clairement que dans la rétine des patients atteints de la forme néovasculaire de la DMLA, en comparaison avec les personnes du même âge non malade, la voie alterne du complément est suractivée dans**



Dinet V.

**Fig. 25 :** Activation de la voie alterne du complément au niveau de la rétine DMLA

Immunohistochimie de coupes OCT de rétines humaines de donneurs, l'un atteint de la forme néovasculaire de la DMLA (86 ans) et l'autre non malade (83 ans), immunomarquées pour les vaisseaux (ISB4, vert), le CFH (violet) et le MAC (C5b9, rouge) et noyaux (dapi, bleu). ON (optic nerve= nerf optique), EPR (épithélium pigmentaire de la rétine), CCG (couche des cellules ganglionnaires), CNE (couche nucléaire externe), CNI (couche nucléaire interne), F (fovéa) et M (Macula). Les flèches montrent la présence de CFH seul ou colocalisé avec l'ISB4. Echelle 10 $\mu$ m

**des zones maculaires où l'expression du CFH est réduite, au contraire, de la néovascularisation qui est excessive.**

Après avoir montré l'expression du CFH et du MAC dans la rétine neurale, nous avons étudié l'expression de ces deux facteurs dans le complexe RPE/membrane de Bruch/choroïde/rétine neurale sur des coupes de cryotomie. Dans la région maculaire du patient atteint de la forme néovasculaire de la DMLA, nos résultats montrent une forte expression de MAC au niveau du complexe ERP/membrane de Bruch/choroïde associée, au contraire, à une faible expression de CFH (Fig. 25), suggérant là aussi une activation de la voie alterne du complément au niveau du complexe ERP/membrane de Bruch/choroïde comme pour la rétine neurale. Ces expressions sont associées à des zones néovasculaires intenses marquées à l'isolectine B4 (Fig. 25). Il est important de noter que dans la rétine de personne non atteinte, une expression homogène et relativement intense de CFH est observée au niveau du complexe EPR/membrane de Bruch/choroïde sur toute la zone maculaire, alors qu'il n'y a presque pas d'immunomarquage du MAC et de l'ISB4 (Fig. 25). Ces derniers résultats semblent suggérer que dans la région maculaire d'une personne âgée, l'accumulation de l'expression de CFH au niveau du complexe ERP/membrane de Bruch/choroïde, dont la structure est essentielle au maintien de la barrière hémato-rétinienne, protégerait cette dernière d'une surproduction de MAC et de la lyse des cellules de l'EPR. La rupture de cette barrière est préalable à l'invasion des néovaisseaux choroïdiens pour développer la forme néovasculaire de la DMLA.

**L'ensemble de ces données montre que lors d'une forme néovasculaire de la DMLA, une sous expression de CFH, associée à une surexpression de MAC et à une néovascularisation intense, apparait aussi bien dans le complexe ERP/membrane de Bruch/choroïde que dans la rétine neurale de la zone maculaire, ces processus pourraient être un bon point de départ pour mieux caractériser la pathogenèse de la DMLA.**

## **II. CFH et angiogenèse**

### **A) Solution de CFH testés et préparation des animaux**

Pour toutes nos expériences, nous avons utilisé du CFH humain plasmatique, du CFH humain recombinant ou des fragments de CFH humain recombinant. Tous les fragments de CFH humain testés dans cette étude proviennent du laboratoire français du fractionnement et des biotechnologies (LFB) et ont été obtenus à partir de cultures de cellules rétiennes PERC6 (dérivées de cellules rétiennes humaines). Il est à noter que les glycosylations localisées entre

Peptides	Anti-C3 convertase EC <sub>50</sub> ng/ml	Protection Erythrocyte Lysis (%)
pICFH	0.12	100
recCFH Y402	0.12	100
recCFH H402	0.09	100
recCFH 1-18	0.16	0
recCFH 1-7	0.06	17
recCFH 1-7 H402	0.08	7
recCFH 7-20	9.80	0
recCFH 8-20	8.80	0

Borras et al, en cours de publication

**Fig. 26** : Activité anti C3 convertase des fragments du CFH

Analyse de l'activité anti C3 convertase in vitro et analyse de la protection de la lyse sur érythrocyte de mouton coté sur plaque. L'activité C3 convertase a été analysée sur différents fragments du CFH rec.

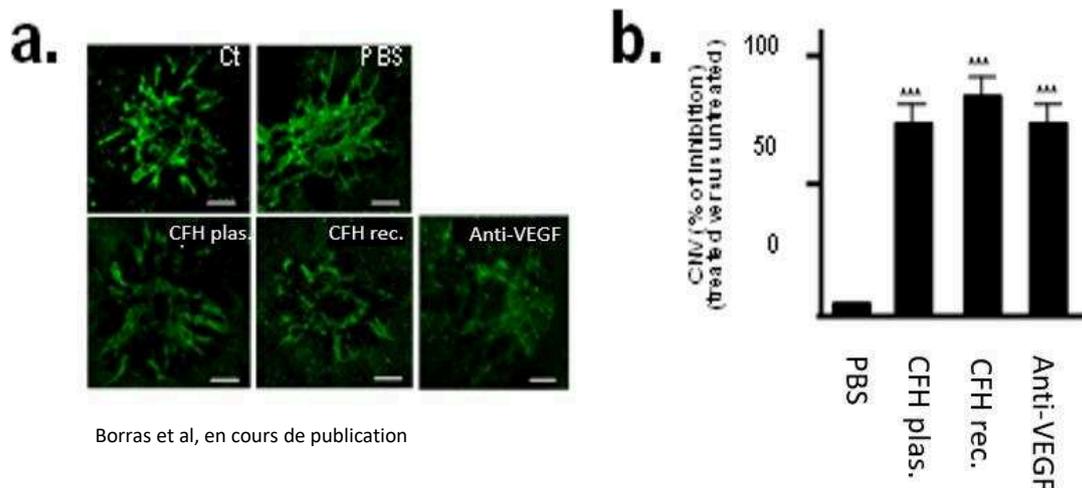
les 8 et 20<sup>èmes</sup> domaines du CFH entier ou de ses fragments synthétisés ont été conservées. Leurs activités anti-C3 convertase ont été testées in vitro, puis leurs capacités de liaison aux membranes ont été testées in vivo à l'aide d'érythrocytes de mouton. In vitro, l'activité anti convertase du CFH est calculée par dosage des produits de clivage du C3 résultant de l'inhibition de la formation de la C3 convertase. L'effet anti-hémolytique du CFH est étudié sur les érythrocytes de mouton cultivés en présence des protéines activées du complément capables alors de former de nombreux pores de lyse « MAC ». Ainsi les différentes fonctions du CFH rec. et de ses fragments sont testés par ajout dans le milieu de culture. Pour être protégés de la lyse, les érythrocytes doivent fixer les domaines CCP19-20 du CFH, seuls capables de lier les GAGs de ce type cellulaire. Ainsi, nous avons vérifié que le CFH recombinant (ou ses fragments) était capable de se lier après synthèse. L'ensemble de ces tests a été réalisé par le LFB (Dr. Toufik Abache, Sylvie Jorieux ; Laboratoire Français du Fractionnement (LFB) Lille, France).

Tous les animaux (rats ou souris) soumis au modèle CNV ont subi 5 impacts laser avec un indice de brûlure de 0,3 (rats : 50 µm spot size, 0.1 ms duration and 175 mW power/ souris : 50 µm spot size, 0.05 ms duration and 250mW power) : deux superposés au pôle supérieur afin d'orienter l'œil en fin d'expérience et les trois autres dans respectivement le cadran nasal, temporal et inférieur du globe oculaire. Tous les impacts ont été fait à une distance de deux papilles du nerf optique et éloignés des gros vaisseaux afin d'éviter la formation d'hémorragies rétinienne.

Afin de démontrer le ou les effets thérapeutiques du CFH dans la forme néovasculaire de la DMLA, nous avons testé deux solutions de CFH humain (plasmatique : CFH plas. et recombinant : CFH rec.) dans le modèle de néovascularisation choroïdienne appliqué à des mâles rats long Evans âgés de 3 mois et des souris de fond génique C57Bl âgées de 3 mois également. Toutes les solutions de CFH ou de PBS ont été injectées dans le pôle inférieur du vitrée de chaque œil de chaque animal. Au moins quatre animaux ont été utilisés par groupe expérimental représentant alors environ 40 impacts à quantifier.

#### B) Caractérisation des effets du CFH sur l'angiogenèse

Le CFH plas. et le CFH rec. présentent in vitro une activité anti-C3 convertase, reflétant une activité conservée des domaines CCP1-4 nécessaires pour inactiver le complexe C3 convertase. Ces deux molécules possèdent une activité d'inhibition similaire du domaine CCP1-4 avec une concentration efficace médiane de  $EC_{50} = 0,12 \mu\text{g/ml}$  (Fig. 26). De même, les deux



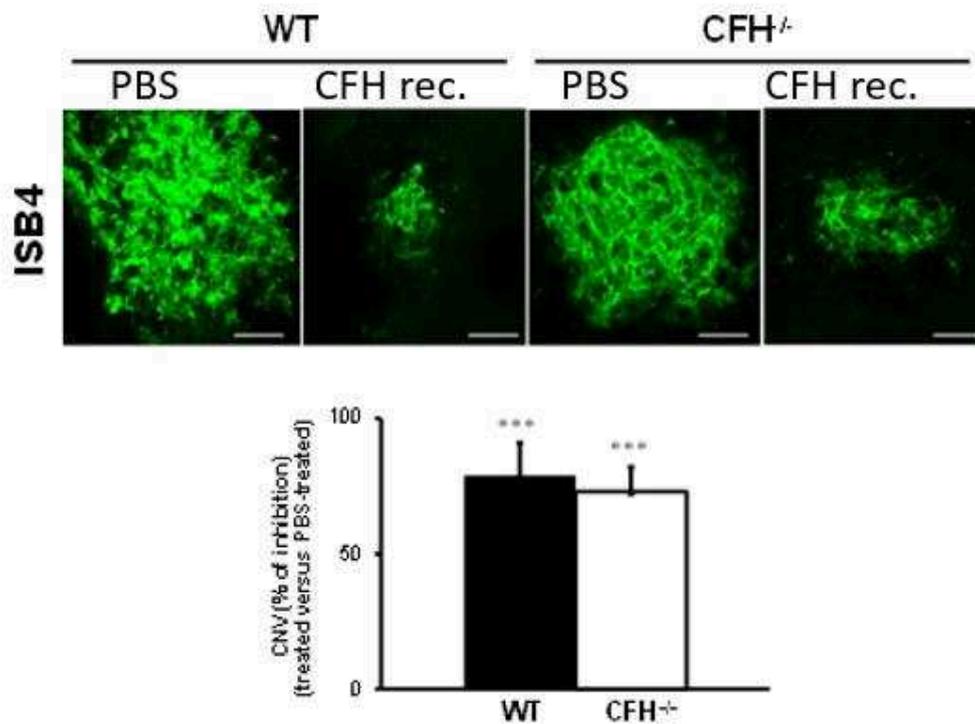
**Fig. 27 :** Effet anti-angiogénique du CFH dans un modèle murin de néovascularisation choroïdienne (CNV)

**a-** Immunohistochimie de la néovascularisation induite par impact laser dans le modèle de CNV rat par marquage à l'ISB4 (marquage des vaisseaux). Le marquage correspond à la formation de néovaisseaux au niveau des impacts laser. Ce phénomène correspond à celui observé chez l'homme lors d'une DMLA néovasculaire. **b-** analyse semi-quantitative de l'inhibition de la néovascularisation induite par laser dans le cas d'une injection de 3µl de CFH plas., de CFH rec. ou d'anti VEGF (traitement actuel chez l'homme) par rapport au contrôle (normal et injecté PBS). Cette analyse se base sur la quantification de la surface intégrée de la néovascularisation (ISB4, vert). N=20 impacts laser sur 3 animaux, évaluation statistique Mann Withney considérée significative si  $p < 0,05$ . \*\*\* :  $p < 0,001$  ; \*\* :  $p < 0,01$  ; \* :  $p < 0,1$ . Echelle 10µm

facteurs CFH plas. et CFH rec. sont capables de protéger les érythrocytes de la lyse cellulaire (Fig. 26), démontrant une région CCP19-20 active capable de se lier sur les membranes de ces cellules. Grâce à ces deux tests, nous montrons que les domaines CCP1-4 et CCP19-20 du CFH plasmatique et recombinant sont aussi actifs l'un que l'autre.

Après avoir montré que les deux solutions de CFH plas. et rec. avaient gardé leur activité anti-C3 convertase et de liaison aux membranes cellulaires, nous avons testé leurs effets sur l'angiogenèse dans le modèle CNV, appliqué aux rats, par une injection intravitréenne de chacun de ces produits aussitôt le laser réalisé, que nous appellerons ici « conditions préventives ». Nos résultats montrent clairement que l'ajout de CFH exogène au moment même de l'impact laser diminue considérablement la surface de néovascularisation induite par laser et ce de 69% pour le CFH plas. et de 76% pour le CFH rec. par rapport à une injection de PBS (Fig. 27a, b). Cet effet anti-angiogénique du CFH plas. ou rec. est aussi efficace que l'injection à la même dose d'anti-VEGFs (Fig. 27a, b), qui est actuellement le traitement de référence utilisé chez l'homme pour stopper la néovascularisation de la DMLA. La quantité de CFH plas. ou rec. ou d'anti-VEGFs rat injectée dans le vitrée des rats soumis au modèle CNV est de 4,5µg dans chaque œil, soit une concentration de 6µM/œil. Cette dose est la dose d'anti-VEGFs injectée chaque mois dans le vitrée des patients atteints de la forme néovasculaire de la DMLA mais ramenée au volume de l'œil de rat soit de 50µL.

Afin de vérifier que cet effet anti-angiogénique du CFH est bien dû à l'injection du CFH plas. ou rec., et non au CFH endogène, nous avons injecté dans le vitrée de souris invalidées pour l'expression du CFH (CFH<sup>-/-</sup>) séparément chacune de ces deux molécules suite à l'impact laser. L'ajout de CFH exogène plas. ou rec. diminue la surface de néovascularisation chez les souris CFH<sup>-/-</sup>/CNV par rapport aux souris CFH<sup>-/-</sup> injectées avec du PBS (Fig. 28), démontrant sans contexte que c'est bien l'ajout de CFH exogène qui est responsable de cet effet anti-angiogénique. De plus, nous avons montré que le CFH plas. ou rec. injecté dans le vitré des yeux de rats contrôles arrive dans le complexe choroïde/RPE/rétine neurale et ce dès 1h post-injection et reste décelable jusqu'à 72h (Fig. 29a), démontrant que le CFH humain injecté arrive très rapidement aux structures du fond de l'œil et n'est pas instantanément dégradé. Enfin, en collaboration avec le LFB, nous montrons que l'injection de CFH humain chez le rat n'entraîne pas de surproduction d'anticorps anti-CFH humain, donc aucune réaction immune pouvant altérer les résultats (data not shown). De même, nous montrons que des injections



Borras et al, en cours de publication

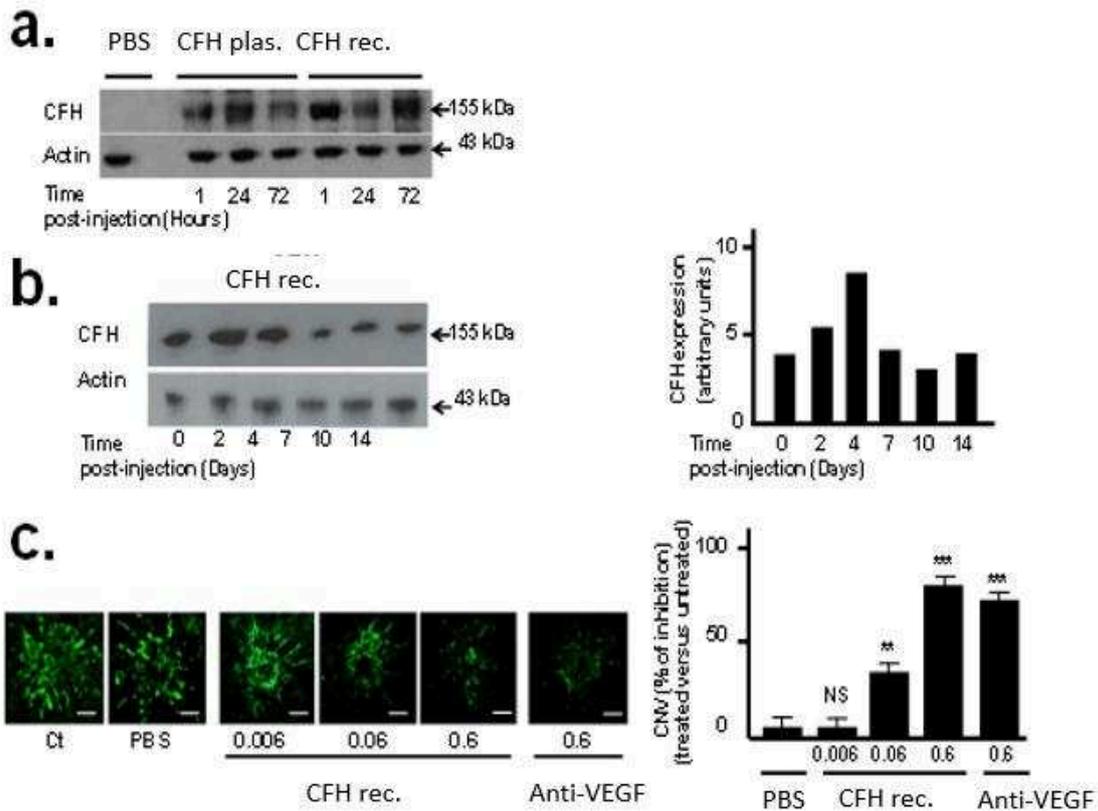
**Fig. 28 :** Diminution de l'angiogenèse par injection de CFH dans un modèle CNV chez des souris CFHKO induites.

Montage à plat du complexe EPR/choroïde/sclère 14 jours post injection intravitréenne. Immunomarquage des néovaisseaux à l'ISB4 (vert). La formation des néovaisseaux est observée après injection de PBS ou de 3µl de CFH rec. humain post impact laser. Le modèle CNV est appliqué à des souris C5BL/J (WT) vs des souris génétiquement modifiées n'exprimant pas le CFH (CFH<sup>-/-</sup>). L'analyse de l'inhibition de la néovascularisation due à l'injection du CFH est quantifiée par la surface intégrée de néovaisseaux. N=20 impacts laser sur 3 animaux, évaluation statistique Mann Withney considérée significative si p<0,05. \*\*\* : p<0,001 ; \*\* : p<0,01 ; \* : p<0,1. Echelle 10µm

répétées de CFH dans le vitré des rats sans laser, tous les 15 jours pendant 6 mois, n'entraînent pas une baisse de la fonction visuelle de ces rats (Fig. 30).

**L'ensemble de ces premiers résultats nous a permis de valider le CFH comme une potentielle molécule médicament étant donné que l'injection de ce dernier diminue, avec la même efficacité, la surface de néovascularisation induite par impact laser que l'injection d'anti-VEGFs, et que l'injection de CFH n'est pas toxique pour la structure et la fonction du tissu rétinien.**

Comme nous nous plaçons dans une optique d'une thérapeutique humaine avec traitement de symptômes déjà existants, nous avons identifié une fenêtre optimale d'injection et ce en analysant, par western blot, la cinétique de production de CFH endogène dans le complexe choroïde/RPE/rétine neurale des yeux de rats soumis au modèle CNV. En effet, nos résultats montrent que la production de CFH augmente de J0 à J4 post-laser, puis diminue pour revenir à un niveau de base entre J4 et J14 (Fig. 29b), montrant un pic d'expression à J4. De façon intéressante, il a été montré au laboratoire par le Dr. Jeanny que la surface de néovascularisation dans le modèle CNV est à son maximum à J7 post-laser (Dot et al., 2009). Ainsi, nous avons émis l'hypothèse que cette baisse de production endogène de CFH, dont nous avons précédemment montré un effet anti-angiogénique, pouvait jouer un rôle non négligeable dans le processus de néovascularisation observé dans le modèle CNV qui est optimal à J7 post laser. Pour valider cette hypothèse, nous avons injecté du CFH rec. humain dans le vitré de rats soumis au modèle CNV et ce précisément à J4 post-laser qui est le moment même où la production endogène de ce facteur diminue significativement. Nous avons choisi d'injecter que du CFH rec. et non plasmatisé puisque ces deux facteurs présentent la même efficacité pour leur action anti-angiogénique et parce que dans une optique de thérapie chez l'homme c'est bien entendu du recombinant qui sera utilisé. À la suite de l'injection de CFH rec. (6 $\mu$ M) à J4 post-laser la surface de néovascularisation est significativement diminuée de 76% par rapport à une injection de PBS au même temps (Fig. 29c). Comme précédemment, l'injection à J4 post-laser de CFH rec. est aussi efficace pour diminuer la surface de néovascularisation qu'une injection d'anti-VEGFs aux mêmes doses (Fig. 29c), démontrant qu'une injection en prévention comme en « curatif » (à J4 post-laser) de CFH réduit la progression des vaisseaux. L'effet anti-angiogénique du CFH rec. est dose dépendante avec une diminution de 76% et de 35% pour une dose respective de CFH rec. de 6 $\mu$ M et 0,6  $\mu$ M. Cependant, à une dose de 0,06 $\mu$ M l'injection de CFH rec. n'a plus d'effet sur la surface de néovascularisation. L'ensemble de ces



Borras et al, en cours de publication

**Fig. 29 :** Présence et activité anti-angiogénique dose dépendante du CFH injecté dans le complexe EPR/choroïde/sclère

**a-** Analyse par western blot (30ng /dépôt) de la présence de CFH recombinant post injecté à 1h, 24h et 72h dans le complexe EPR/choroïde/sclère de rats (injection intravitreuse). **b-** Analyse par western blot de la cinétique de la production de CFH endogène de rats soumis au modèle CNV, suivie d'une analyse semi-quantitative des résultats obtenus. **c-** Analyse de la dose réponse de l'activité anti-angiogénique du CFH dans le modèle CNV à l'aide de trois concentrations différentes, 0.006, 0.06 et 0.6, injectées 4 jours post laser en intravitréen. L'analyse se fait 14 jours post injection. Le complexe EPR/choroïde/sclère est immunomarcqué avec de l'ISB4 en vert pour quantifier la surface intégrée de la néovascularisation formée post laser. N=20 impacts laser sur 3 animaux, évaluation statistique Mann Withney considérée significative si  $p < 0,05$ . \*\*\* :  $p < 0,001$  ; \*\* :  $p < 0,01$  ; \* :  $p < 0,1$ . Echelle 10 $\mu$ m

dernières données, nous a permis de calculer, avec une courbe effet/dose, un EC50 du CFH à 0,34  $\mu$ M.

**Nous montrons un effet anti-angiogénique du CFH rec. aussi bien dans des conditions de « prévention », c'est-à-dire avec une injection concomitante aux impacts laser, que dans des conditions dites « curatives » puisque l'injection intravitréenne a eu lieu 4 jours après l'impact laser. Cet effet est aussi efficace qu'une injection d'anti-VEGFs à la même dose voir même pour une dose 10 fois moins concentrée, démontrant alors un potentiel thérapeutique du CFH au moins aussi efficace qu'un traitement d'anti-VEGFs comme c'est actuellement le cas.**

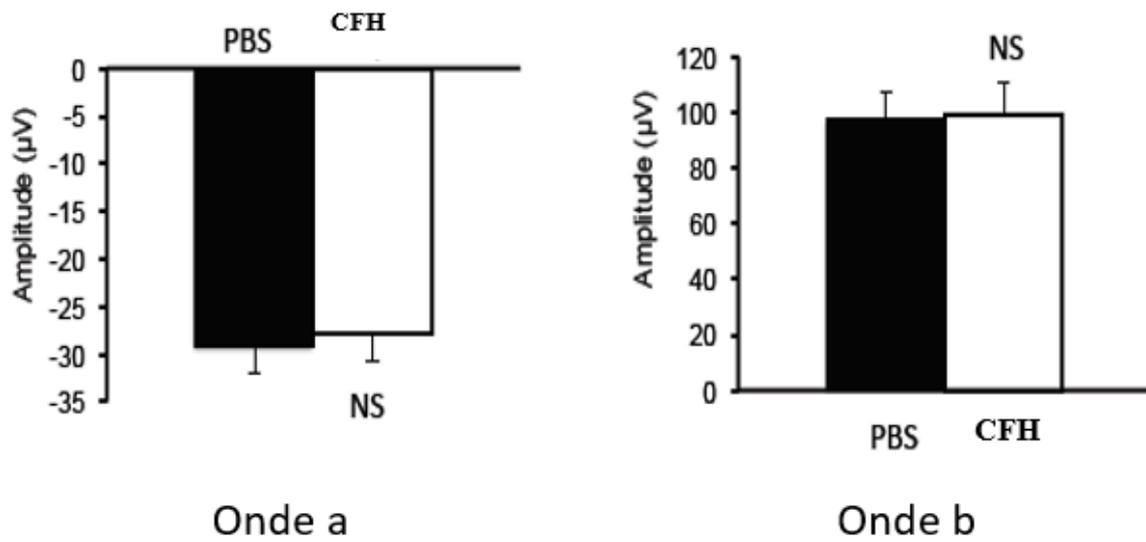
Suite à ces premiers résultats, l'ensemble des expériences suivantes seront donc réalisées avec du CFH rec. humain injecté dans le vitré des yeux de rats soumis au modèle CNV à J4 post-laser et à une dose de 6  $\mu$ M (dose fréquemment injectée chez les patients atteints de la forme néovasculaire de la DMLA mais ramenée au volume de l'œil de rat).

*C) L'effet anti-angiogénique du CFH n'est pas expression ou tissus dépendant*

Non -expression dépendante : modèle de la néovascularisation cornéenne

Après avoir démontré un effet anti-angiogénique du CFH dans la rétine, nous avons voulu savoir si cette activité était dépendante d'une expression endogène de CFH. Ainsi, nous avons testé le pouvoir anti-angiogénique du CFH dans un modèle de néovascularisation cornéenne puisque ce tissu de l'œil n'exprime pas naturellement ce facteur (Mandal et al., 2006). Ce modèle, appliqué à des rats albinos, est très informatif pour tester l'activité anti-angiogénique de certaines protéines, parce qu'il est facile d'accès pour l'apport de molécules tests et puisque la non présence de pigmentation va nous permettre de visualiser spontanément l'invasion des néovaisseaux. Une néovascularisation de la cornée est obtenue par dés-épithélisation de la cornée suivie par une dissection du tissu conjonctif avoisinant (Amano et al., 1998). Dès le 2<sup>ème</sup> jour post-traumatique les néovaisseaux envahissent la cornée jusqu'à présent avasculaire.

Afin d'étudier un rôle anti-angiogénique du CFH dans des conditions « curatives », comme étudiées précédemment dans le modèle CNV, nous avons injecté 6 $\mu$ M de ce facteur sous la conjonctive de l'œil et ce à J4 post-stress traumatique. À J12 post-stress traumatique, l'injection de PBS, montre une forte surface de néovascularisation de la cornée, visible à l'œil nu ou en immunomarquage avec l'isolectine B4, avec l'apparition de gros vaisseaux,



Dinet V.

**Fig. 30 :** Absence d'altération de la vision du au CFH injecté

Analyse de la fonction visuelle par électrorétinogramme après des injections intravitréennes de 3μl de CFH tous les 15 jours durant 6 mois chez le rat. L'analyse est réalisée en scotopique et photopique à 8cd/m<sup>2</sup> d'intensité, par adaptation des rats de 24 h préalable au noir, puis 10min à la lumière. L'onde a permet d'observer la fonctionnalité des photorécepteurs et l'onde b d'observer la fonctionnalité de la rétine neurale.

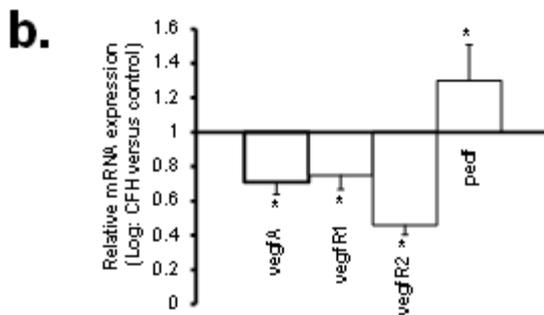
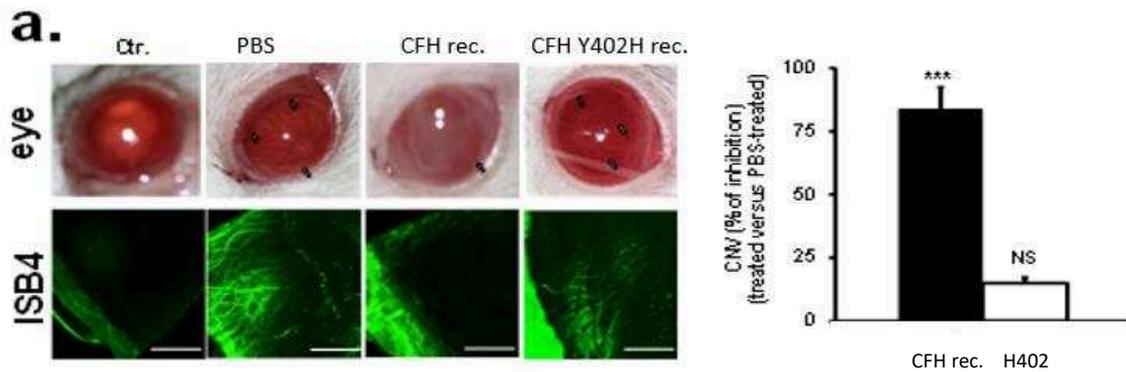
envahissant le tissu (Fig. 31a). Cependant, en présence de CFH, nos résultats montrent clairement, comme pour le modèle CNV, une réduction significative de 84% de la surface de néovascularisation immunomarquée à l'ISB4 par rapport à une injection de PBS (Fig. 31a), validant que l'effet anti-angiogénique du CFH n'est pas dépendant de l'expression de ce dernier dans le tissu lésé. Ces données confirment et valident nos précédents résultats démontrant que le CFH possède une activité anti-angiogénique. En revanche l'injection sous conjonctivale de CFHY402H à J4 ne permet pas de résorber la néovascularisation cornéenne induite par la chirurgie à J0 (Fig. 31a). En effet, la surface de néovascularisation en présence de CFHY402H est quasiment identique à celle observée après l'injection de PBS (Fig. 31a) démontrant que le domaine CCP7 du CFH est indispensable à l'activité anti-angiogénique du CFH. La mutation de ce domaine abolit purement et simplement l'effet du CFH indispensable à l'activité anti-angiogénique du CFH dans la cornée.

**Ces résultats démontrent clairement que l'effet anti-angiogénique du CFH n'est pas dépendant de son expression endogène dans le tissu lésé, mais que, cependant, la présence d'un domaine CCP7 non muté est primordiale.**

L'analyse par PCR quantitative de l'expression des facteurs régulant l'angiogenèse, montre que, par rapport aux rats traités avec du PBS, l'injection de CFH rec. dans le modèle de néovascularisation cornéenne diminue l'expression des gènes codant pour le VEGFA ou pour ses récepteurs R1 et R2 de respectivement de 29%, 25% et 54% (Fig. 31b). En revanche, l'apport de CFH rec. dans ce même modèle augmente de 30% l'expression du gène codant pour le PEDF par rapport aux rats traités avec du PBS (Fig. 31b). **Ces données montrent que l'une des voies d'action possible du CFH sur l'angiogenèse est la régulation de l'expression des facteurs pro- et anti-angiogéniques dont l'équilibre détermine un effet physiologique ou hémorragique.**

Non –tissus dépendante : vascularisation de la membrane chorio-allantoïde de poulet (CAM)

Afin de montrer que le CFH n'a pas un effet anti-angiogénique que dans la rétine et que dans un modèle murin, nous avons testé son action dans un modèle de néovascularisation chez le poulet : modèle CAM. Dans ce modèle, au cours de l'embryogenèse une néovascularisation de la membrane allantoïde apparaît dès le stade embryonnaire E8 avec la mise en place des



Borras et al, en cours de publication

**Fig. 31** : Effet anti-angiogénique du CFH sur la cornée

**a**-Analyse par immunomarquage ISB4 (vert), de la néovascularisation induite par désépithélisation par application d'éthanol et petite chirurgie de la conjonctive avant injection de 3µl de CFH ou d'anti-VEGF chez le rat (3 individus par groupe). L'analyse est réalisée par quantification de la surface intégrée des néovaisseaux formés. Echelle 10µm. **b**- Analyse par qPCR (50ng d'ARN) de la régulation des profils d'expression de gènes codants pour les facteurs pro (VEGF, VEGFR1, R2) et anti-angiogénique (PEDF). N=6 par groupe, évaluation statistique Mann Withney considérée significative si  $p < 0,05$ . \*\*\* :  $p < 0,001$  ; \*\* :  $p < 0,01$  ; \* :  $p < 0,1$ . Echelle 10µm

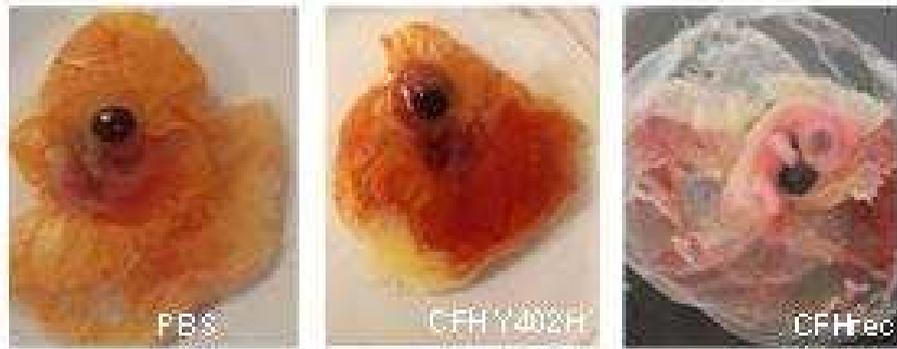
veines et artères de la membrane et ce jusqu'au stade E18 (Ausprunk et al., 1974 ; Ribatti et al., 2001). Au stade E10, la vascularisation de la membrane allantoïde présente des ramifications importantes avec la présence de gros vaisseaux en direction de l'embryon qui se développe grâce à ça. À ce même stade du développement apparaisse de nombreuses ramifications vasculaires, c'est pourquoi nous avons choisi de déposer à E10 des pastilles d'agar contenant du PBS ou 3nM de CFH ou de CFH Y402H sur la membrane allantoïde. L'utilisation d'une pastille d'agar, va permettre la diffusion progressive de CFH sur la membrane allantoïde durant le développement des embryons, qui sont replacés en couveuse pendant 48 heures. Après 48h (soit au stade E12), l'observation de la vascularisation de la membrane allantoïde est identique entre les embryons traités avec du PBS et les embryons non traités (Fig. 32). Cependant, l'apport de CFH rec. entraîne une régression de la vascularisation de la membrane allantoïde par rapport aux embryons non traités ou traités avec du PBS (Fig. 32). En effet, nous observons une membrane allantoïde très blanche avec une absence de vaisseaux autour de la pastille de CFH rec. (Fig. 32). Le CFH rec. a également une action plus large puisque toute la membrane est quasi avasculaire et l'embryon présente un fort retard de développement avec une taille bien inférieure à celle du témoin et du PBS (Fig. 32). Dans le cas de l'apport de CFH Y402H, aucune différence significative n'est observée par rapport au traitement PBS (Fig. 32).

**L'ensemble de ces résultats montre que le CFH possède une activité anti-angiogénique indépendamment de la rétine et dans une autre espèce que les rongeurs. De plus, ces résultats confirment l'importance capitale du domaine CCP7 du CFH dans la régulation de l'angiogenèse.**

#### D) Caractérisation des effets du CFH sur les autres processus de la DMLA : Inflammation, voie alterne du complément et stress oxydant

Comme l'angiogenèse n'est pas le seul processus impliqué dans la pathogenèse de la DMLA, nous avons recherché à caractériser les effets du CFH sur les autres mécanismes responsables du déclenchement de cette pathologie et notamment sur l'inflammation, l'activation de la voie alterne du complément et sur le stress oxydant. Cette étape de notre étude sera réalisée à l'aide d'expériences d'immunofluorescence sur montage à plat du fond d'œil contenant la choroïde, la membrane de Bruch et les cellules de l'EPR. Pour l'inflammation, nous avons étudié l'infiltration microgliale/macrophagique à l'aide d'un marqueur spécifique chez le rat : le CD68. Pour la voie alterne du complément, nous avons choisi comme

CAM



Borras et al, en cours de publication

**Fig. 32 :** Effet anti angiogénique du CFH sur le modèle CAM

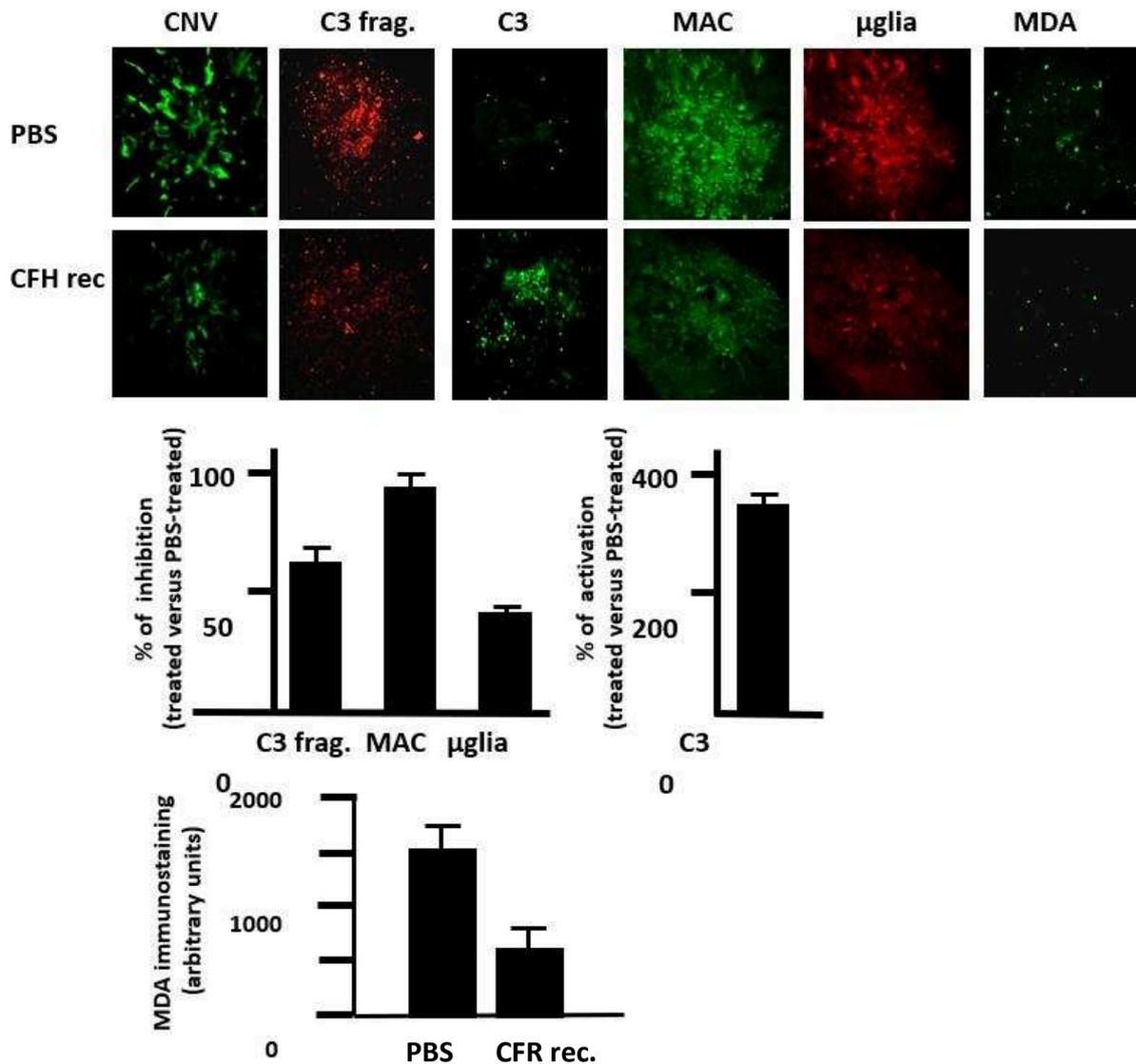
Analyse de la vascularisation de la membrane chorioallantoïde du poulet au cours du développement après diffusion de CFH ou du polymorphisme (300nM) à l'aide d'une pastille d'agar. Les embryons reçoivent la pastille à J4 et sont observés à J12. Ils sont maintenus en incubateur à 37°C. N=10

marqueurs : a- le C3, qui est le point de départ de la VAC nous permettant ainsi de mettre en évidence la capacité du CFH à inhiber l'activité C3 convertase et donc le clivage du C3, et b- le MAC (marqueur C5b9) produit final de la VAC. Pour le stress oxydant, une molécule a été étudié à l'aide anticorps spécifiques : le MDA, lipide peroxydé connu pour son rôle dans la pathogenèse de la DMLA. Toutes les observations au microscope confocal ont été réalisées à 14 jours post-laser.

D'un point de vue général, la rupture de la barrière hématorétinienne par impact laser, suivie d'une injection de PBS à J4 post-laser, montre une large surface de néovascularisation associée à une faible accumulation de C3 mais à une forte formation de MAC, confirmant une activation de la voie alterne du complément (Fig. 33). De plus, nous observons une infiltration microgliale/macrophagique excessive et de forts dépôts de lipides peroxydés type MDA au niveau de l'impact laser (Fig. 33).

Au cours de la CNV, l'inflammation va augmenter jusqu'à un pic inflammatoire observé entre J3 et J5 post-laser (Dot et al., 2007). Nos résultats montrent que l'injection à J4 post-laser de CFH diminue significativement de 37% l'infiltration microgliale/macrophagique par rapport aux rats injectés avec du PBS (Fig. 33). Pour la VAC, nous montrons une accumulation de C3 de 340% sur les montages à plat issus des rats injectés avec du CFH en comparaison avec l'injection de PBS (Fig. 33). Cependant, une diminution de la formation de MAC de 85% est nettement observée chez les rats injectés avec du CFH contrairement aux rats injectés avec du PBS qui montrent un dépôt intense de C5b9 (Fig. 33). Ces résultats sont cohérents entre eux puisque le CFH, de par son activité anti-C3 convertase démontrée in vitro (Fig. 26), va inhiber le clivage du C3 circulant qui va alors s'accumuler. De même, l'inhibition du clivage du C3 empêche, de ce fait, la formation de MAC au niveau des membranes. Au niveau du stress oxydant, les dépôts de MDA sont aussi diminués de 67% en présence d'un excès de CFH exogène (Fig. 33), ce qui semble cohérent avec la capacité du CFH à se lier à des lipides peroxydés (Weissman et al., 2010).

**L'ensemble de ces résultats nous montre que le CFH injecté est actif en exerçant au moins son rôle anti-C3 convertase, ce qui entraîne des dépôts de C3 et une diminution considérable de la formation du MAC. Mis à part cet effet, l'injection de CFH dans le modèle CNV diminue l'infiltration microgliale/macrophagique et le stress oxydant, suggérant alors une implication du CFH dans la régulation de ces deux processus qui sont à la base même du développement des deux formes de la DMLA.**



Borras et al, en cours de publication

**Fig. 33 :** Effet du CFH rec. sur les différents paramètres de la DMLA

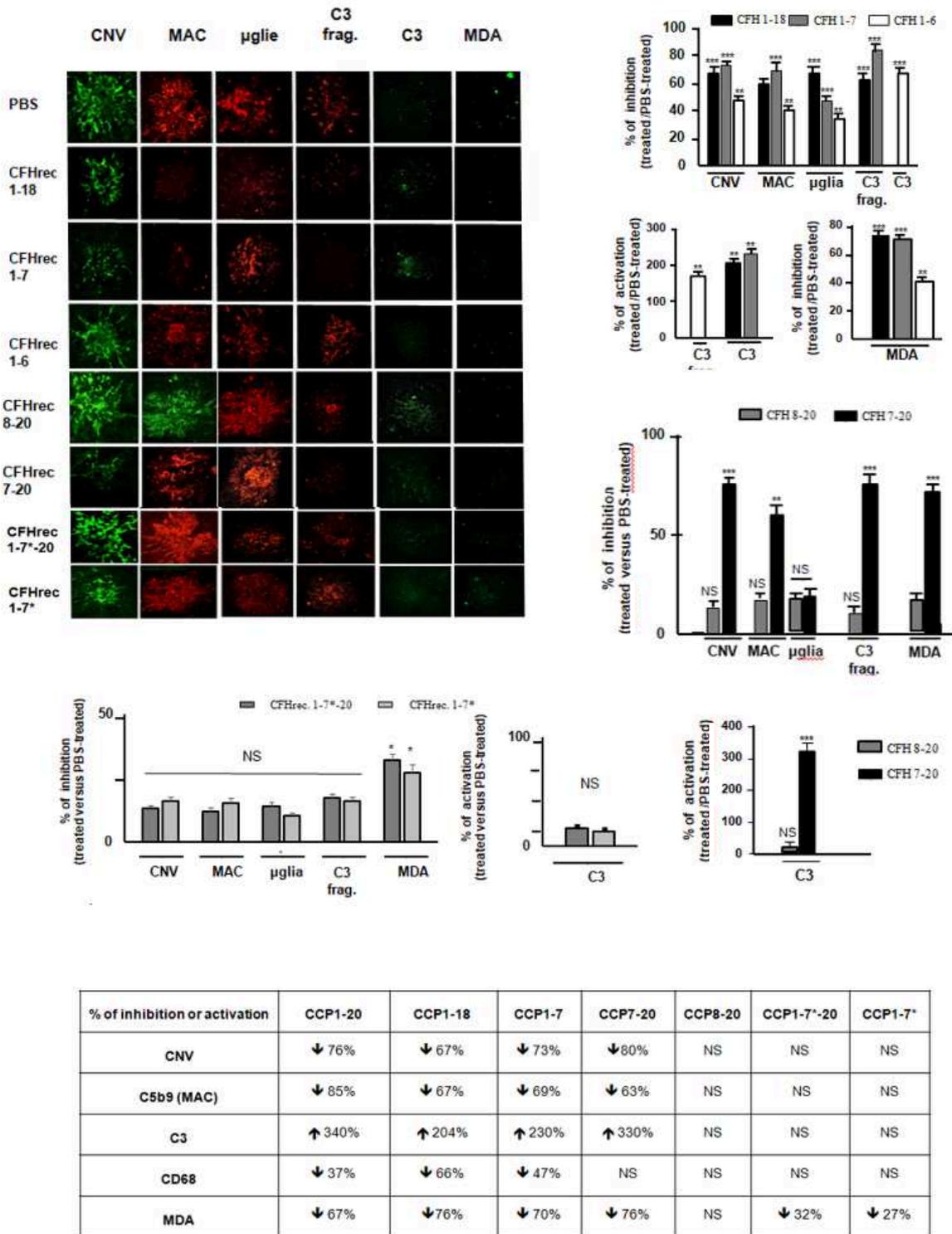
Analyse semi-quantitative par immunohistochimie sur montage à plat du complexe EPR/choroïde/sclère de la surface de néovascularisation induite par laser (ISB4), production de MAC (MAC), activation de la VAC (C3, C3 fragment), inflammation par infiltration des cellules microgliales (microglie) et du stress oxydant (MDA) par dépôt de produit de peroxydation lipidique 14 jours post injection intravitréenne de PBS ou de 3µl de CFH rec. L'analyse est quantifiée par le taux d'inhibition des molécules ou de la surface d'intégration de la néovascularisation par rapport au taux du PBS. N=20 impacts laser sur 3 animaux, évaluation statistique Mann Withney considérée significative si  $p < 0,05$ . \*\*\* :  $p < 0,001$  ; \*\* :  $p < 0,01$  ; \* :  $p < 0,1$ . Echelle 10µm

### III. Fonctions des différents domaines du CFH dans la pathogenèse de la DMLA

Après avoir validé le CFH comme une bonne cible thérapeutique pour la DMLA, puisqu'il est capable de réduire tous les processus impliqués dans la pathogenèse de cette maladie, nous avons voulu identifier le ou les différent(s) rôle(s) des différents domaines du CFH dans ses actions anti-angiogénique, anti-inflammatoire et anti-stress oxydant. Trois domaines ont particulièrement retenu notre attention : les domaines CCP1-4, responsables de l'activité anti-C3 convertase du CFH et les domaines CCP6-8 et CCP 19-20 responsables de la fixation du CFH sur les glycosaminoglycanes des membranes cellulaires. Aussi, afin de savoir quelles régions sont nécessaires et/ou suffisantes pour induire les différentes fonctions anti-angiogénique, anti-inflammatoire et anti-stress oxydant observées précédemment dans le modèle CNV appliqué aux rats, nous avons testés différents fragments de CFH : CFH 1-18, CFH1-7, CFH7-20 et CFH8-20. L'ensemble de ces fragments, synthétisés par le LFB, possède toutes les glycosylations du CFH endogène retrouvées sur les domaines 9,12-14, 15(deux fois),17 et 18 (data fournis par Dr. Toufik Abache, LFB). Ces fragments ont été injectés dans le vitré des rats soumis au modèle CNV à J4 post-laser et les différents processus angiogénèse (ISB4) infiltration microgliale/macrophagique (CD68), VAC (C3 et MAC) et stress oxydant (MDA) ont été étudiés au 14<sup>ème</sup> jours post-laser par des expériences d'immunofluorescence sur montage à plat de la choroïde, membrane de Bruch et cellules de l'EPR. Les surfaces d'immunomarquage ont été quantifiées à l'aide du logiciel image J et comparées à celles obtenues avec une injection de PBS qui nous sert de contrôle.

#### A) Rôle des domaines CCP19-20 sur les différents processus impliqués dans la pathogenèse de la DMLA : angiogénèse/inflammation/stress oxydant

Afin de caractériser le ou les rôle(s) joué(s) par les domaines CCP19-20 du CFH sur l'angiogénèse, l'infiltration microgliale/macrophagique, l'accumulation de C3 ou de MAC et sur le stress oxydant, nous avons injecté à J4 post-laser le fragment CFH1-18 ne contenant pas ces deux domaines dans le vitré des rats soumis au modèle CNV, puis nous en avons analysé les effets à J14 post-laser. Au préalable, nous avons montré in vitro que ce fragment conserve son activité anti-C3 convertase, due à la présence des domaines CCP1-4, mais ne protège plus les érythrocytes de la lyse cellulaire (Fig. 26). En effet, il est important d'avoir en mémoire que les sites CCP19-20 sont indispensables pour la fixation du CFH sur les membranes cellulaires des érythrocytes de mouton, contrairement à d'autre tissus où les domaines CCP6-8 jouent un rôle beaucoup plus important. Après injection du fragment CFH1-18, les résultats montrent une



Borras et al, en cours de publication

**Fig. 34 :** Effets du CFH sur les différents paramètres de la DMLA dans le modèle CNV

Analyse semi-quantitative par immunohistochimie sur montages à plats du complexe EPR/choroïde/sclère de la surface de néovascularisation induite par laser (ISB4), production de MAC (MAC), activation de la VAC (C3, C3 fragment), inflammation par infiltration des cellules microgliales (microglie) et du stress oxydant (MDA) par dépôt de produit de peroxydation lipidique, 14 jours post injection intravitréenne de PBS, ou de 3µl de CFH rec. ou fragment de CFH (CCP1-18, CCP 1-7, CCP 7-20, CCP 8-20, CCP 1-7\*620 et CCP 1-7\*). L'analyse est quantifiée par le taux d'inhibition des molécules ou de la surface d'intégration de la néovascularisation par rapport au taux du PBS. N=20 impacts laser sur 3 animaux, évaluation statistique Mann Withney considérée significative si  $p < 0,05$ . \*\*\* :  $p < 0,001$  ; \*\* :  $p < 0,01$  ; \* :  $p < 0,1$ . Echelle 10µm

réduction significative de la surface de néovascularisation de 67% (ISB4), de l'infiltration microgliale/macrophagique de 66% (CD68) et de la formation du MAC de 67% (C5b9) (Fig. 34). De même, les dépôts de MDA sont également diminués de 76% par rapport aux injections de PBS (Fig. 34). Seule une accumulation de 204% de C3 est observée par rapport aux rats/CNV-PBS (Fig. 34). Ces résultats montrent clairement que, même sans ces domaines CCP19-20, le CFH maintient ses activités anti-angiogénique, anti-inflammatoire, anti-VAC et anti-stress oxydant (Fig. 34).

**Les domaines CCP19-20, et par conséquent la fixation du CFH sur les membranes cellulaires par cette région, ne sont donc pas nécessaires pour que le CFH exerce ces différentes activités dans le modèle CNV.**

B) Rôle des domaines CCP6-8 et particulièrement du CCP7 sur les différents processus impliqués dans la pathogenèse de la DMLA : angiogenèse/inflammation/stress oxydant

Le CFH peut se lier aux membranes cellulaires via également ses domaines CCP6-8 contenant le domaine CCP7, site de la mutation Y402H qui est le facteur de risque de développer une DMLA (Haines et al., 2005 ; Edward et al., 2005 ; Hageman et al., 2005 ; Klein et al., 2005). Aux vues de ce risque, il est fort probable que le domaine CCP7 joue un rôle primordial dans les différents processus impliqués dans le développement de la DMLA. Aussi, afin de caractériser le ou les effet(s) des domaines CCP6-8 et plus précisément le rôle du domaine CCP7, nous avons injecté à J4 post-laser dans le vitré des rats soumis au modèle CNV les fragments suivants : le CFH8-20 ne contenant pas le site CCP7 mais les CCP19-20, le CFH7-20 contenant le domaine 7 couplé aux domaines CCP19-20, et les deux fragments CFH1-7\*-20 et CFH1-7\* contenant le domaine CCP7 mais sous sa forme mutée Y402H (\*) (Fig. 34). Ces deux derniers fragments testés vont nous permettre de caractériser le ou les rôles du domaine CCP7 uniquement car les deux autres régions fonctionnelles du CFH sont, elles, présentes et intactes (CCP1-4 : activité anti-C3 convertase et CCP19-20 : liaison aux membranes cellulaires).

Malgré la présence des domaines CCP19-20, aucune activité anti-C3 convertase et une non protection de la lyse des érythrocytes de mouton est observée in vitro pour les fragments CFH8-20 et 7-20 (Fig. 26). Ces résultats ne sont pas surprenants car même si ces fragments se lient sur les érythrocytes de mouton via les domaines CCP19-20, ils n'ont pas les domaines CCP1-



4 indispensables à l'activité anti-C3 convertase donc à l'inhibition de l'activation de la voie alterne du complément conduisant à la lyse cellulaire. Pour les deux fragments contenant la mutation Y402H, nous observons une activité anti-C3 convertase, due à la présence des domaines CCP1-4 (Fig. 26). Cependant seul le fragment CFH1-7\*-20, contrairement au fragment CFH1-7\*, protège les érythrocytes de mouton de la lyse cellulaire et ceci grâce à la présence des régions CCP19-20, domaines indispensables pour protéger de la lyse ces cellules dans ce système (Fig. 26).

Résultats fragments CFH8-20 et CFH7-20 : Après 14 jours post-laser, nous avons observé les effets de l'injection de chacun de ces fragments sur les différents processus responsables de la pathogenèse de la DMLA. Les résultats ne montrent aucun effet du fragment CFH8-20 sur la surface de néovascularisation (ISB4), sur l'infiltration microgliale/macrophagique (CD68), sur le dépôt de C3 ou de MAC (C5b9) ou sur la production des lipides peroxydés MDA par rapport aux injections de PBS (Fig. 34). Ce manque d'effet du CFH8-20 sur ces différents processus n'est pas dû à une non présence de ce dernier dans le complexe choroïde/membrane de Bruch/EPR/rétine neurale puisque nous montrons, par western blot, la présence de ce fragment dans ce complexe et ce dès une heure et jusqu'à 72H post-injection (Fig. 29).

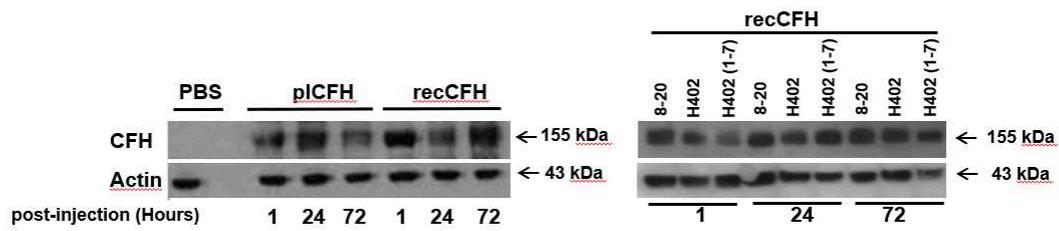
En revanche, l'injection du fragment CFH7-20, quant à lui, diminue significativement la surface de néovascularisation de 80% et la formation de MAC de 63%, mais augmente considérablement les dépôts de C3 de 330% (Fig. 34). L'augmentation des dépôts de C3 dans le complexe choroïde/membrane de Bruch/EPR s'explique, d'une part, par l'impact laser lui-même qui augmente la production de C3, et d'autre part, par « chelation » du C3 par le CFH7-20 via les domaines de liaisons CCP7 et CCP19-20 empêchant alors le clivage de la molécule. Aussi, le C3 va pouvoir s'accumuler aussi bien en phase fluide que sur les membranes cellulaires. En revanche, le CFH, grâce à ses deux régions CCP6-8 et CCP19-20, se lie de façon plus stable aux membranes cellulaires et peut être ainsi plus actif (Perkins et al., 2012), ce qui lui permet alors de piéger le C3b nécessaire à la formation du complexe C5 convertase indispensable à la formation du MAC. La non formation du complexe enzymatique C5 convertase va entraîner la diminution de la formation du MAC observée dans le complexe choroïde/membrane de Bruch/EPR des rats soumis aux CNV et injecté avec du CFH7-20. Contrairement à son activité anti-angiogénique ou « anti-MAC », le CFH7-20 n'a pas d'effet sur l'infiltration microgliale/macrophagique par rapport aux rats injectés avec du PBS et soumis au modèle CNV (Fig. 34).



**Pris dans leur ensemble, ces résultats montrent, sans ambiguïté, que la présence du domaine CCP7 couplé aux domaines CCP19-20 est nécessaire pour l'activité anti-angiogénique du CFH mais pas pour son activité anti-infiltration microgliale/macrophagique, suggérant que le CFH, pour son activité anti-inflammatoire, nécessite au moins la présence de la région anti-C3 convertase (CCP1-4) couplée au domaine CCP7 de liaison aux membranes cellulaires.**

De façon très intéressante, l'injection du fragment CFH7-20 diminue considérablement les dépôts de MDA de 76% par rapport aux rats/CNV injectées avec du PBS ou du CFH8-20 (Fig. 34), démontrant clairement que la présence du domaine CCP7 est indispensable pour réduire la formation de lipides peroxydés dans la rétine. Ces derniers résultats sont en accord avec les travaux de l'équipe de Weissman qui montrent que le domaine CCP7 est indispensable pour se lier au MDA (Weissman et al., 2011).

Résultats fragments CFH1-7\*-20 et CFH1-7\* : Afin de mieux comprendre le rôle du domaine CCP7, seul, dans l'angiogenèse, l'inflammation et le stress oxydant, nous avons injecté à J4 post-laser du CFH1-7\*-20 et CFH1-7\* (\*=mutation Y402H) dans le vitré de rats soumis au modèle CNV. Nous avons inclus le fragment CFH1-7\* puisque nous avons montré précédemment que les domaines CCP19-20 ne sont pas indispensables aux effets du CFH sur les processus étudiés dans le modèle CNV. Ainsi, en comparant les effets de ces deux fragments « mutés » à ceux observés avec l'injection de CFH rec., nous allons caractériser le rôle du domaine CCP7 dans l'angiogenèse, l'inflammation, le stress oxydant et la régulation de la VAC dans le modèle CNV. Quatorze jours après l'impact laser, la surface de néovascularisation, de l'infiltration microgliale/macrophagique et l'accumulation de C3 ou de MAC restent identiques à celles des rats-PBS/CNV aussi bien pour l'injection du fragment muté long ou court (Fig. 34). Ces résultats ne sont pas dus à un problème de biodisponibilité de ces fragments au site de lésion, puisque nous montrons, par western blot, une présence de CFH1-7\*-20 et CFH1-7\* dans le complexe choroïde/membrane de Bruch/EPR/rétine neurale dès 1h post injection et ce jusqu'à 72H post injection. Nous montrons ici que la mutation du seul domaine CCP7, couplé ou pas aux domaines CCP19-20 et CCP1-4, réduit voir même abolit, les différents effets du CFH sur tous les processus impliqués dans la DMLA, ce qui pourrait alors expliquer pourquoi le polymorphisme Y402H du CFH est bel et bien LE facteur de risque de développer cette pathologie. **Le domaine CCP7 est un élément primordial pour les activités du CFH sur l'angiogenèse, l'inflammation et la régulation de la voie alterne du complément dans le modèle CNV.**



Borras et al, en cours de publication

**Fig. 35 :** Présence de CFH ou de fragment de CFH dans le complexe EPR/choroïde/sclère

Analyse par western blot (30ng) de la présence de CFH ou fragment de CFH dans le complexe EPR/choroïde/sclère post injection intravitréenne de 3 $\mu$ l de CFH plas., rec. ou des fragments de CFH rec. chez le rat à 1H, 24H et 72H. 30ng de protéine sont déposés par conditions. L'analyse semi-quantificative est réalisée par rapport au gène de ménage actine. N=20 impacts laser sur 3 animaux.

Pour le stress oxydant nous montrons que la mutation du domaine CCP7 réduit d'environ 30% les dépôts de MDA par rapport à l'injection de PBS contrairement au CFH rec. qui, lui, les réduit de 70% (Fig. 34, 35), démontrant tout de même une implication de ce domaine dans la régulation du stress oxydant. Cet effet est indépendant de la présence des domaines CCP19-20 puisque les deux fragments CFH1-7\*-20 et CFH1-7\* réduisent le stress oxydant dans les mêmes proportions.

**L'ensemble de tous ces résultats montre clairement que le domaine CCP7 du CFH est indispensable pour ses activités anti-angiogénique et anti-inflammatoire et moins pour son activité anti-stress oxydant.**

C) Effets anti-angiogénique, anti-inflammatoire et anti-stress oxydant du CFH et activation de la voie alterne du complément : importance des domaines CCP1-4

Après avoir démontré l'importance « thérapeutique » du CCP7 du CFH dans le modèle CNV, nous avons voulu savoir si ces effets du CFH passaient nécessairement par l'inactivation de la voie alterne du complément. Pour cela, nous avons étudié les effets d'une injection intravitréenne de deux fragments CFH1-7 et CFH1-4. L'utilisation du fragment CFH1-7 est justifié puisqu'il contient à la fois les domaines CCP1-4, indispensables pour inhiber l'activité du complexe C3 convertase point de départ de l'activation de la voie alterne du complément, couplés au domaine CCP7 dont nous venons de montrer l'importance dans la régulation de l'angiogenèse/l'inflammation/VAC. Nous montrons que les fragments CFH1-7 et CFH1-4 ont in vitro une activité anti-C3 convertase, via les domaines CCP1-4, mais ne protègent pas de la lyse cellulaire les érythrocytes de mouton puisqu'ils ne possèdent pas les domaines CCP19-20.

Résultats fragment CFH1-4 : nous montrons que ce fragment n'a aucun effet sur l'angiogenèse, l'infiltration microgliale/macrophagique et le stress oxydant dans le modèle CNV (data not show).

Résultats fragment CFH1-7 : Après 14 jours post-laser, nos résultats montrent que, par rapport aux rats/CNV injectés avec du PBS, ce fragment diminue de 73% la surface de néovascularisation immunomarquée à l'ISB4, de 47% l'infiltration microgliale/macrophagique immunomarquée par le CD68, de 69% la formation du MAC immunomarquée par du C5b9, et de 70% les dépôts de MDA (Fig. 34). De même que pour le CFH rec., une accumulation de 230% C3 est observée dans le complexe choroïde/membrane de Bruch/EPR (Fig. 34). **Ces résultats montrent que le fragment de CFH le plus petit, mais aussi efficace que le CFH rec. entier, est le fragment CFH1-7.**



Comme nos résultats précédents montrent que la mutation du domaine CCP7 (test du CFH1-7\*) abolit les effets anti-angiogénique et anti-infiltration microgliale/macrophagique du CFH (Fig. 34) et que le CFH1-4 n'a pas d'effet, nous démontrons ici que la seule inactivation de la voie alterne du complément, via les domaines CCP1-4, n'est pas suffisante pour obtenir ces deux activités du CFH dans le modèle CNV, il faut absolument que les domaines CCP1-4 soient liés au CCP7 non muté. Par contre, nos résultats montrent que le fragment CFH7-20 possède une activité anti-angiogénique mais pas anti-infiltration microgliale/macrophagique contrairement aux fragments CFH rec. et CFH1-7 (Fig. 34, 35), démontrant alors que l'inactivation de la voie du complément n'est pas nécessaire pour réduire la vascularisation induite par laser mais l'est pour réduire l'infiltration microgliale/macrophagique.

**L'ensemble de ces données montre que de l'inactivation de la voie du complément, contrairement à l'infiltration microgliale/macrophagique n'est pas indispensable pour inhiber l'angiogénèse impliquant que le CFH inhibe l'angiogénèse via un autre mécanisme.**

**En résumé, toutes nos expériences menées avec les différents fragments de CFH dans le modèle CNV montrent 1- que les domaines CCP19-20 du CFH ne sont pas nécessaires pour l'ensemble de ses activités, 2- que, au contraire, le domaine CCP7 est primordial pour obtenir des effets optimums du CFH (anti-angiogénique/infiltration microgliale//macrophagique/ anti-stress oxydant), et 3- que l'inactivation de la voie alterne du complément est nécessaire pour l'activité anti-infiltration microgliale/macrophagique du CFH mais pas pour ses activités anti-angiogénique et anti-stress oxydant.**

#### **IV. Voies de transductions impliquées dans les effets « thérapeutiques » du CFH dans le modèle CNV**

Afin d'identifier les mécanismes par lesquels le CFH exerce ses activités anti-angiogénique, anti-inflammatoire et anti-stress oxydant, nous avons réalisé des expériences de qPCR sur les complexes choroïde/membrane de Bruch/EPR/rétine neurale de rats soumis au modèle CNV injectés à J4 post-laser avec du CFH, ou du PBS. Puis, les échantillons ont été prélevés puis analysés à J7 post-laser. Nous avons choisi ce temps de la CNV pour analyser les expressions des transcrits puisque c'est à ce stade que l'angiogénèse est optimale (Dot et al., 2009).

<b>a.</b>		<b>b.</b>				
		recCFH:	Y402	CCP1-7	CCP7-20	H402
<b>Angiogenesis</b>		<b>Angiogenesis</b>				
<i>vegfa</i>	↑ 15.7 ±	<i>vegfa</i>	↓ 2.5 ±	↓ 3.4 ±	↓ 3.6 ±	↓ 9.6 ±
<i>vegfr1</i>	↑ 31.1 ±	<i>vegfr1</i>	↓ 4.5 ±	↓ 35.9 ±	↓ 5 ±	↓ 10.6 ±
<i>vegfr2</i>	= 1.02 ±	<i>vegfr2</i>	↓ 10.2 ±	↓ 7 ±	↓ 5 ±	↓ 10 ±
<i>ang1</i>	↑ 22.6 ±	<i>pedf</i>	↑ 5.4 ±	↑ 1.8 ±	↑ 3.1 ±	= 0.78 ±
<i>pedf</i>	= 1.05 ±	<b>Complement</b>				
<b>Complement</b>		<i>c3</i>	↓ 7.7 ±	↓ 2.2 ±	↓ 2.5 ±	= 1.2 ±
<i>c3</i>	↑ 161.6 ±	<i>c5aR</i>	↓ 10 ±	↓ 4.8 ±	= 1.1 ±	= 1.1 ±
<i>c5aR</i>	↑ 75.9 ±	<i>c3aR</i>	↑ 5.5 ±	↑ 51 ±	↑ 15.8 ±	↑ 4 ±
<i>cfb</i>	↑ 14.3 ±	<i>cfb</i>	↑ 10.7 ±	↑ 4.6 ±	= 1.3 ±	↑ 75 ±
<i>cfh</i>	= 1.1 ±	<i>cfh</i>	↓ 2.3 ±	↓ 14.2 ±	↓ 3.8 ±	↑ 44.8 ±
<i>cfhl1</i>	↑ 8.2 ±	<i>cfhl1</i>	↓ 5.5 ±	↓ 5.3 ±	↓ 2.4 ±	= 0.8 ±
<i>cd55</i>	↑ 3.6 ±	<i>cfi</i>	↓ 12.5 ±	↓ 10 ±	↓ 2.3 ±	= 1.3 ±
<i>cd46</i>	↑ 246.4 ±	<b>Inflammation</b>				
<i>cd59</i>	↑ 485 ±	<i>cc12</i>	= 0.84 ±	= 0.72 ±	↑ 681.8 ±	↑ 484 ±
<i>cfi</i>	↑ 18 ±	<i>ccr2</i>	= 1.36 ±	= 1.4 ±	↑ 134.2 ±	↑ 103.4 ±
<b>Inflammation</b>		<i>il1β</i>	↓ 10.7 ±	↓ 7 ±	↓ 3.1 ±	↓ 7.7 ±
<i>ccl2</i>	↑ 6.3 ±	<i>il6</i>	= 1.4 ±	= 1.3 ±	↑ 152 ±	↑ 4.8 ±
<i>ccr2</i>	↑ 141.4 ±	<i>il18</i>	↓ 10.1 ±	↓ 10 ±	↓ 10 ±	↓ 50 ±
<i>il1β</i>	↑ 8.6 ±	<b>stress Ox.</b>				
<i>il6</i>	↑ 97.2 ±	<i>pon1</i>	= 0.68 ±	↑ 3.5 ±	= 0.73 ±	↑ 2.8 ±
<i>il18</i>	↑ 13.9 ±	<i>gpx1</i>	= 0.69 ±	= 0.71 ±	↑ 27.5 ±	↑ 96.8 ±
<i>cox2</i>	↑ 39.9 ±	<i>inos</i>	= 0.68 ±	= 1.5 ±	↑ 42.2 ±	↑ 32.63 ±
<b>stress Ox.</b>		<i>sod2</i>	= 0.62 ±	↓ 3 ±	↑ 20.1 ±	↑ 174.8 ±
<i>pon1</i>	↑ 10.8 ±					
<i>gpx1</i>	↑ 4.15 ±					
<i>inos</i>	↑ 8.4 ±					
<i>sod2</i>	= 1.1 ±					

Borras et al, en cours de publication

**Tableau 3 :** Régulation de l'expression des gènes d'angiogenèse, inflammation, voie du complément et stress oxydant par le CFH dans le modèle CNV

**a**-qPCR réalisées sur 50ng d'ADNc par échantillons après extraction au trisol. Analyse de la régulation des gènes d'angiogenèses, inflammation, stress oxydant et VAC, impliqués dans la DMLA, après injection intravitréenne de PBS. **b**-analyse de la régulation par le CFH rec., le polymorphisme, ou les fragments CFH1-7 et 7-20 sur les mêmes gènes impliqués dans la DMLA après injection intravitréenne de 3µl et comparée au PBS. N=20 impacts laser sur 3 animaux, évaluation statistique Mann Withney considérée significative si p<0,05. \*\*\* : p<0,001 ; \*\* : p<0,01 ; \* : p<0,1.

A) Profils d'expression des gènes codant pour les principales protéines impliquées dans l'angiogenèse/l'inflammation et le stress oxydant-Action du CFH sur le transcriptome de la rétine au cours de la CNV

Nous avons commencé par analyser, au cours du modèle CNV, le profil d'expression de l'ensemble des gènes codant pour les différentes protéines impliquées dans l'angiogenèse/l'inflammation/la VAC/ le stress oxydant sans injection de CFH (injecté PBS). Nos résultats montrent une augmentation significative des expressions des gènes codant pour les facteurs pro-angiogéniques : vegfa (15,7 fois) et ses récepteurs vegfR1/R2 (31,1 et 1,02 fois) et de l'angiotensine1 (ang1 : 22,6 fois) (Tableau 3). En revanche, l'expression du gène codant pour la protéine anti-angiogénique pedf diminue de 1,05 fois (Tableau 3). **Ces résultats sont cohérents avec une néovascularisation optimale dans le modèle CNV à J7 post-laser avec un déséquilibre entre l'expression des gènes codant pour les facteurs pro- et anti-angiogéniques et ce en faveur des facteurs pro-angiogéniques.** Il est à noter que les expressions les plus augmentées dans ce système sont celles du vegf, de son récepteur vegfR1 et de l'angiotensine suggérant que la néovascularisation se met en place dans le modèle CNV au moins en partie à cause de l'expression de ces facteurs stimulant l'angiogenèse.

Pour la voie alterne du complément, nous montrons une très forte augmentation de l'expression des gènes codant pour la molécule centrale de cette voie le C3 (161,6 fois) et des récepteurs anaphylactiques C3aR (161,6 fois) et C5aR (75 fois) (Tableau 3), suggérant un processus inflammatoire qui se met en place. Toutefois, une régulation de la VAC existe puisque nous montrons également une augmentation de certains gènes codant pour les facteurs inhibiteurs de l'activation de la VAC, c'est le cas des gènes cfhl1, cd55, cd46, cd59 et cfi (Tableau 3). Les facteurs les plus exprimés sont le cd46 (246 fois) et le cd59 (485 fois) suggérant une résistance du tissu à former du MAC afin de limiter la lyse cellulaire. De façon intéressante, les expressions des gènes codants pour les deux principaux régulateurs de la VAC sont, quant à elles, diminuées faiblement pour l'inhibiteur cfh (1,7 fois) et fortement pour l'activateur cfb (14,3 fois) (Tableau 3). **L'ensemble de ces résultats montre une activation, sans contexte, de la voie alterne du complément mais aussi une régulation de celle-ci vraisemblablement pour ne pas créer une inflammation aigue toxique pour le tissu et une lyse cellulaire non contrôlée pour ce stade de la CNV.** En accord avec une activation de la VAC et par conséquent de l'inflammation, une forte augmentation des gènes codant pour les facteurs pro-inflammatoires il6 (97,2 fois), il1 $\beta$  (8,6 fois), il18 (13,9 fois) et cox2 (39,9 fois)



est observée (Tableau 3). De même, nous montrons qu'au cours de la CNV, il y a une augmentation des expressions des gènes codant pour les protéines CCL2 (6,3fois) et CCR2 (141,4 fois), qui sont fortement impliquées dans la migration des cellules microgliales dans la rétine (Tableau 3). **Pris dans leur ensemble, ces données démontrent que, dans le modèle CNV, se met en place une inflammation aigue associée à une migration des cellules microgliales de la rétine, comme ce qui est observée dans la pathogenèse de la DMLA.** Au niveau du stress oxydant, les expressions des gènes codant pour les facteurs anti-oxydants gpx1 et inos sont augmentés respectivement de 4,15 fois et 8,4 fois (Tableau 3).

**En résumé, nos résultats montrent que, dans le modèle rat/CNV sans injection dans le vitré, l'ensemble des gènes codant pour les principaux facteurs responsables de la mise en place de l'angiogenèse/l'inflammation/la VAC et le stress oxydant sont augmentés, avec toutefois, une augmentation, aussi, de l'expression des gènes codant pour les facteurs inhibiteurs de chacun de ces processus, certainement pour que le système ne s'emballe trop au point d'être « mortel » pour la rétine.**

*B) Effet d'un apport de CFH sur les profils d'expression des gènes codant pour les principales protéines impliquées dans l'angiogenèse/l'inflammation et le stress oxydant au cours de la CNV*

Nous avons étudié par qPCR à J7 post-laser le profil d'expression de chacun des gènes cités ci-dessus dans le complexe choroïde/membrane de Bruch/EPR/rétine neurale des rats soumis au modèle CNV et injectés dans le vitré à J4 post-laser avec du CFH ou un de ses fragments (CFH1-7 et CFH7-20) ou avec du PBS. Nous avons testé ces trois solutions de CFH (rec., 1-7 et 7-20) puisque ce sont ces derniers qui présentent au moins une activité anti-angiogénique dans le modèle CNV. Les résultats ont été rapportés par rapport à l'injection du PBS.

*Pour l'angiogenèse*, nos résultats montrent que la présence exogène de CFH rec., de CFH1-7 ou de CFH7-20 diminue l'expression de l'ensemble des gènes codant pour les facteurs pro-angiogéniques vegf, vegfR1/R2 et ang1, et au contraire, augmente celle du gène codant pour le facteur anti-angiogénique pedf (Tableau 3), **confirmant clairement un rôle du CFH sur l'équilibre des expressions des gènes pro- et anti-angiogéniques orientant ici le processus vers une inhibition de la néovascularisation.**



Pour la voie alterne du complément, l'expression du gène codant pour le C3 est diminuée avec l'apport exogène de ces trois solutions de CFH (Tableau 3). L'expression du gène codant pour le récepteur C5aR est aussi diminuée alors que celle du C3aR est augmentée (Tableau 3), suggérant une régulation spécifique des voies afférentes de l'activation de la voie alterne du complément par le CFH. L'ensemble de l'expression des facteurs (cfh, cfh11 et cfi) codant pour les principaux inhibiteurs de la VAC est diminué (Tableau 3), montrant qu'un apport exogène de CFH (rec., 1-7 ou 7-20) régule négativement sa propre expression endogène. L'expression du gène codant pour le principal facteur activateur cfb de la VAC est, quant à elle, augmentée avec une injection de CFH rec. ou de CFH1-7 mais pas pour l'injection du CFH7-20 (Tableau 3). **Ces données suggèrent qu'un blocage total de la VAC n'est pas souhaitable mais qu'il faut trouver un équilibre entre activation et inhibition de la voie alterne du complément.**

Pour l'inflammation, seules les expressions des gènes codant pour les facteurs pro-inflammatoires il18 et il1 $\beta$  sont diminuées significativement en présence de CFH rec., CFH1-7 ou CFH7-20 (Tableau 3). Cependant, l'expression du gène codant pour l'interleukine il6 est augmentée pour l'injection de CFH7-20 alors que pour l'injection des deux autres solutions de CFH cette expression est stable (Tableau 3), suggérant peut-être un lien entre une non activité du CFH7-20 sur l'infiltration microgliale/macrophagique et l'augmentation de ce facteur pro-inflammatoire. De même, seule l'injection de CFH7-20 augmente l'expression des deux gènes codant pour les protéines CCL2 et CCR2 responsables de la migration microgliale/macrophagique (Tableau 3), confirmant la perte de fonction du CFH7-20 au niveau de l'infiltration de ces cellules au site de lésion par rapport aux deux autres solutions de CFH : CFH rec. et CFH1-7 (Fig. 36). **L'ensemble de ces résultats montre que, dans le modèle CNV, la perte des domaines CCP1-4, responsables de l'inhibition de l'activation de la VAC et absents dans le fragment CFH7-20, est rédhibitoire pour inhiber l'infiltration microgliale/macrophagique qui se trouve associée à une surexpression d'il6, de CCL2 et CCR2.**

Pour le stress oxydant, l'injection des différentes solutions de CFH modifie différemment l'expression des gènes codant pour les facteurs anti-stress oxydant gpx1, inos et sod2 (Tableau 3). En effet, l'injection du CFH1-7 ou du CFH7-20 augmente l'expression du gène inos, alors que l'injection du CFH rec. la diminue (Tableau 3). Seule l'injection de CFH7-20 augmente l'expression du gpx1 les autres n'ayant pas d'effet (Tableau 3). L'injection du CFH rec. n'a pas d'effet sur l'expression de sod2, au contraire, du CFH1-7 et du CFH7-20 qui respectivement la

diminue et l'augmente (Tableau 3). **L'ensemble de ces données montre différentes actions du CFH en fonction des domaines qui le composent, mais que pour augmenter fortement l'ensemble des défenses antioxydantes, le CFH doit perdre sa capacité à inhiber l'activation de la VAC donc les domaines CCP1-4.**

**En résumé,** nous montrons que l'apport de CFH réduit l'expression des gènes codant pour les facteurs pro-angiogénique (vegf, vegfR1/R2, ang1) alors qu'il augmente celle du facteur anti-angiogénique (pedf), confirmant nos résultats d'immunofluorescence montrant une activité anti-angiogénique du CFH. **De plus, il apparaît clairement que la présence des domaines CCP1-4 du CFH, pour cet effet, n'est pas nécessaire, démontrant que l'activité anti-angiogénique du CFH est indépendante de la régulation de la voie alterne du complément. Au contraire, nous montrons que la régulation de l'infiltration microgliale/macrophagique sur le site de lésion est dépendante de l'inhibition de l'activation de la voie alterne du complément.** En présence d'un apport exogène de CFH, l'expression de la majorité des acteurs de la voie alterne du complément est régulée de la même façon, aussi bien en absence des domaines CCP1-4 inhibiteurs de l'activation de la VAC, qu'en l'absence des domaines CCP19-20 de liaison aux membranes cellulaires. **Enfin, nous montrons que l'activité anti-stress oxydant du CFH est dépendante de la régulation de la VAC,** avec une augmentation des défenses antioxydantes lorsque celle-ci n'est plus inhibée par le CFH (fragment CFH7-20).

**En conclusion, nous montrons que l'activité anti-angiogénique du CFH est indépendante de l'activation de la voie alterne du complément au contraire de son activité anti-infiltration microgliale/macrophagique.**

### C) Rôle du CCP7 et conséquence du polymorphisme Y402H

Après avoir caractérisé le rôle de l'activation de la voie alterne du complément dans les activités anti-angiogénique, anti-inflammatoire et anti-stress oxydant du CFH, nous avons voulu identifier l'impact du domaine CCP7, porteur de la mutation Y402H, sur ces effets. Pour cela, nous avons étudié, par qPCR, l'expression des gènes cités ci-dessus suite à l'injection de CFH1-7\*-20 (CFH muté) dans le vitré des rats/CNV à J4 post laser. Nous avons fait les analyses à J7 post-laser par rapport à une injection de PBS.

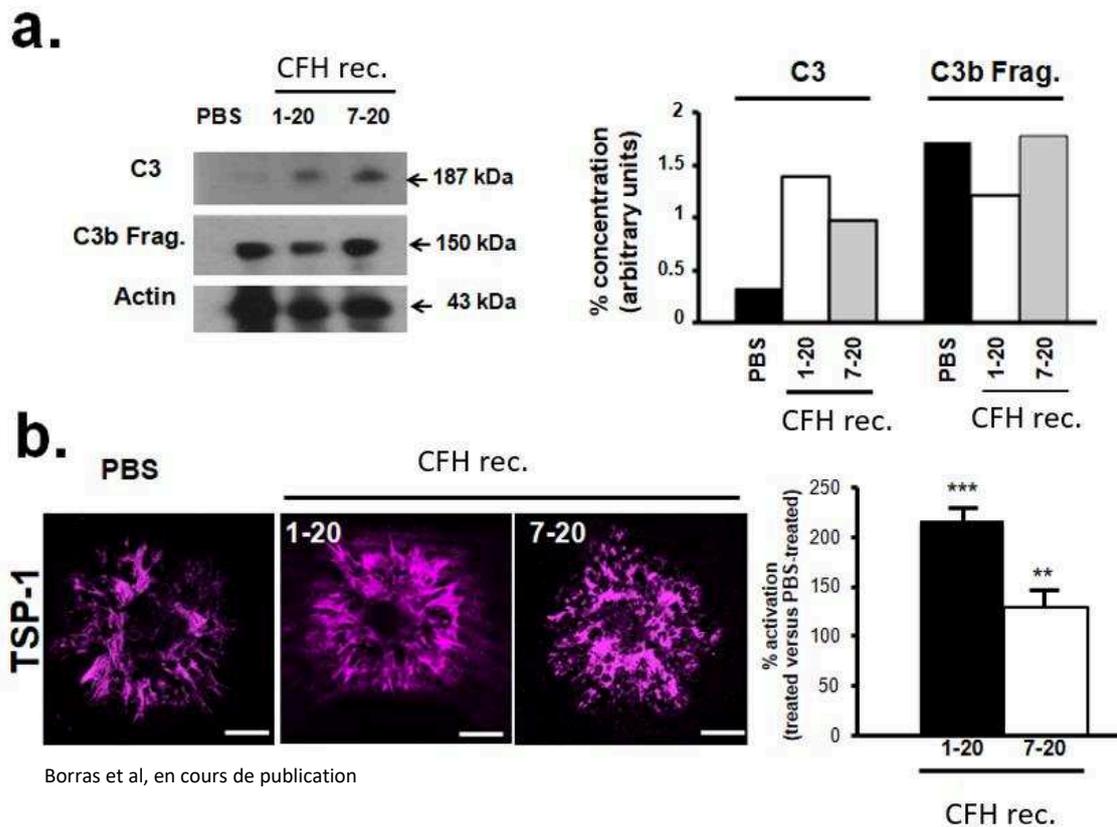


Nos résultats montrent que la présence d'un excès de CFH muté diminue l'ensemble des expressions des gènes codant pour les facteurs pro-angiogéniques (vegf, vegfR1/2) mais n'a pas d'effet sur l'expression du gène codant pour le facteur anti-angiogénique pedf qui reste identique à une injection de PBS (Tableau 3). L'expression du transcrit CFH est augmenté de 44,8 fois par rapport à une injection de PBS démontrant que la présence exogène de CFH muté, possiblement inactif, semble être compensée par un apport de CFH endogène dans le modèle CNV. Comme pour le fragment CFH7-20, qui n'a pas d'effet sur l'infiltration microgliale/macrophagique, l'apport de CFH muté augmente l'expression de l'il6 et des protéines de régulation de la migration ccl2 et ccr2 (Tableau 3). De façon très intéressante, la présence de CFH muté augmente aussi considérablement l'expression des gènes anti-stress oxydants (gpx1, inos et sod2) (Tableau 3).

**L'ensemble de tous ces résultats nous permet d'entrevoir un possible mécanisme d'action de la mutation du CFH dans le risque de développer une DMLA. En effet, nous démontrons que cette mutation 1- abolit l'activité anti-angiogénique du CFH via uniquement un non effet sur l'expression de gènes codant pour des facteurs anti-angiogéniques tel que le PEDF ; 2- n'empêche pas l'augmentation de l'expression des protéines régulatrices de la migration microgliale/macrophagique CCL2/CCR2, entraînant une infiltration de ces cellules inflammatoires ; mais cependant 3- augmente considérablement les défenses antioxydantes.**

## **V. Analyse du rôle anti-angiogénique du CFH indépendamment de son activité anti-inflammatoire**

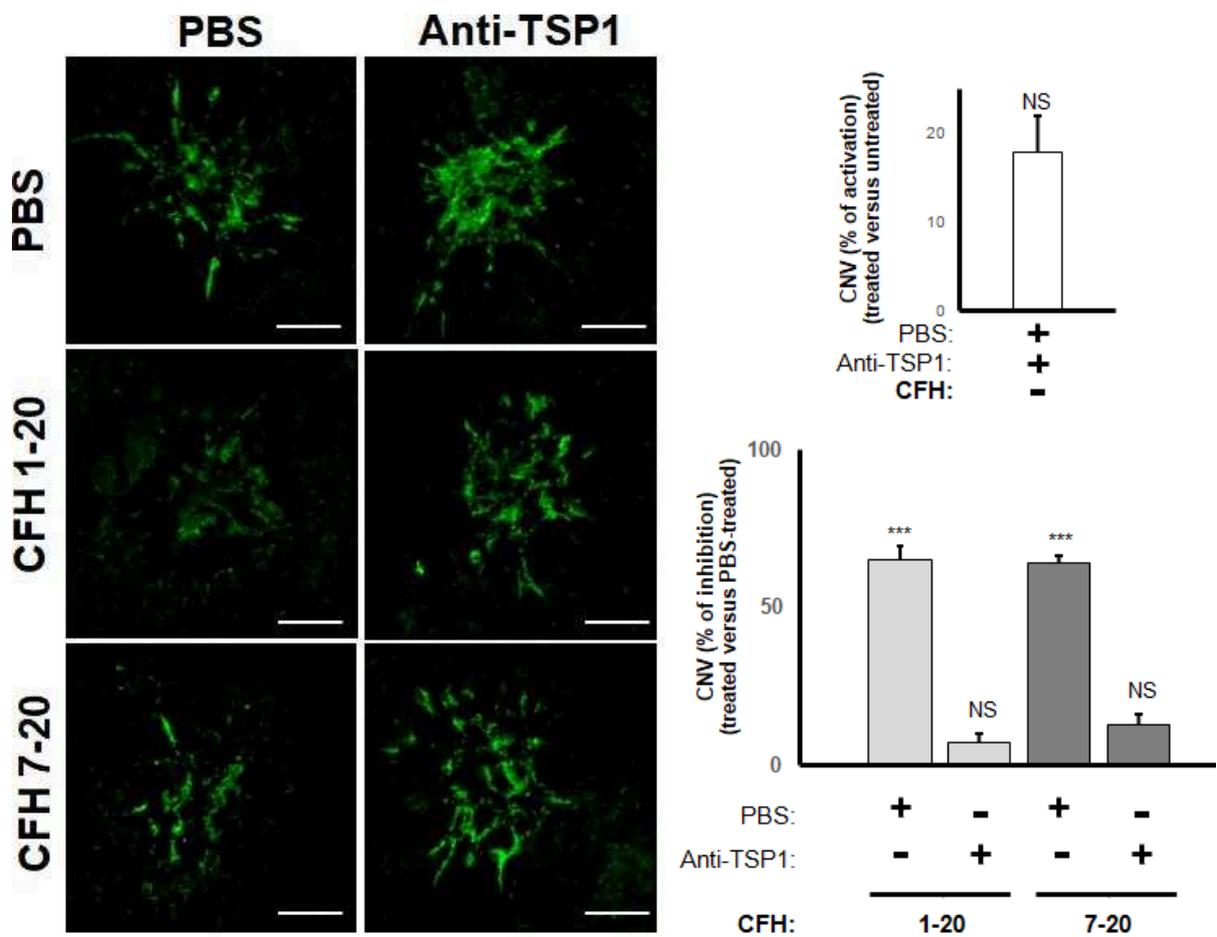
Nos résultats précédents posent la question des relations entre angiogenèse et inflammation : deux processus normalement étroitement liés dans de nombreuses pathologies neurodégénératives associées à une vasculopathie, comme la DMLA. En effet, l'injection de CFH rec. possède à la fois une activité anti-angiogénique et anti-infiltration microgliale/macrophagique contrairement à l'injection du fragment CFH7-20 qui n'a que la première. La question se pose alors comment le CFH peut réduire la néovascularisation sans avoir d'effet sur l'infiltration microgliale/macrophagique ? et par quels mécanismes ? quelles sont les cibles du CFH injecté ? Pour répondre à toutes ces questions, nous avons, dans un premier temps, estimé par western blot les concentrations de C3 et de ses produits de clivage



**Fig. 36 :** Différence d'action entre le CFH rec. et le CFH 7-20

**a-** analyse par western blot (30ng) de l'accumulation de C3 et de C3 fragments dans le modèle CNV chez le rat 10 jours post injection intravitréenne de 3µl de CFH rec. ou de 3µl CFH 7-20 et 14 jours post laser. L'analyse semi-quantificative est réalisée par rapport au PBS **b-** analyse semi-quantitative par immunohistochimie de la TPS1 sur montage à plat du complexe EPR/choroïde/sclère dans le modèle CNV 10 jours post injection intravitréenne et 14 jours post laser. L'analyse est réalisée par rapport au PBS. Echelle 10µm. N=20 impacts laser pour 3 rats, évaluation statistique Mann Withney considérée significative si  $p < 0,05$ . \*\*\* :  $p < 0,001$ ; \*\* :  $p < 0,01$  ; \* :  $p < 0,1$ . Echelle 10µm

C3b/bi/c/d au 14<sup>ème</sup> jours post-laser dans le complexe choroïde/membrane de Bruch/EPR/rétine neurale des rats soumis au modèle CNV et injectés, dans le vitré à J4 post-laser, avec soit du CFH rec. ou du CFH7-20 ou avec du PBS qui nous servira de contrôle. Les résultats montrent qu'en présence d'un apport exogène de CFH rec. ou CFH7-20 une accumulation de C3 apparaît dans le complexe choroïde/membrane de Bruch/ERP/rétine neurale respectivement de 340% et de 330% par rapport à une injection de PBS (Fig. 36). Pour estimer l'activation de la voie alterne du complément, via le clivage de la molécule C3, nous avons semi-quantifié, par western blot, la production des fragments de clivage du C3 appelés ici C3b fragments. Nous observons une nette diminution du taux de production de C3b fragments en présence de CFH rec. par rapport aux injections de CFH7-20 ou PBS qui sont pratiquement identiques (Fig. 36). Ces derniers résultats sont cohérents puisque le fragment CFH rec., contenant les domaines CCP1-4, inhibe le clivage du C3, qui s'accumule davantage que pour une injection de CFH7-20 (Fig. 36a), produisant alors moins de C3b fragments que ce dernier. Le clivage de la molécule C3 va produire également du C3a qui est une molécule anaphylactique pouvant attirer les microglies/macrophages sur le site de lésion. Ainsi, nous avons émis l'hypothèse que le fragment CFH rec. en inhibant la production de C3b fragments, et par la même occasion du C3a, réduit l'infiltration microgliale/macrophagique sur le site de l'impact contrairement au fragment CFH7-20. Cette hypothèse peut expliquer la non réduction de l'infiltration microgliale/macrophagique observée à la suite d'une injection de CFH7-20 mais ne peut en aucun cas expliquer comment ce fragment de CFH possède une activité anti-angiogénique aussi efficace que celle du CFH rec. Nous avons alors émis l'hypothèse que cette fonction du CFH était indépendante de l'infiltration des cellules microgliales/macrophagiques sur le site de lésion et que cet effet passait par la modulation de l'expression d'un facteur à haut pouvoir anti-angiogénique comme par exemple la thrombospondine 1 (TSP1). Nous avons choisi la TSP1 puisque nous avons précédemment montré que l'injection de CFH rec., comme de CFH7-20, augmente significativement l'expression du gène codant pour le PEDF qui régule lui-même la production de TSP1 (Farnoodian et al., 2015). De plus, les travaux de Callipe et collaborateurs ont récemment montré que, dans le modèle CNV, le CFH est capable, en se liant sur les membranes des macrophages, de protéger de la mort ces cellules (Callipe et al., 2017). Cette liaison du CFH sur les membranes des macrophages va empêcher la TSP1 de se lier sur son récepteur CD47 qui n'induit alors pas l'apoptose de ces cellules (Callipe et al., 2017). Ces dernières données suggèrent un rôle de TSP1 dans les différents processus impliqués dans le modèle CNV, ce qui nous conforte dans notre hypothèse d'une action de cette molécule dans la néovascularisation induite par laser. Pour valider cette hypothèse, nous avons injecté à J4



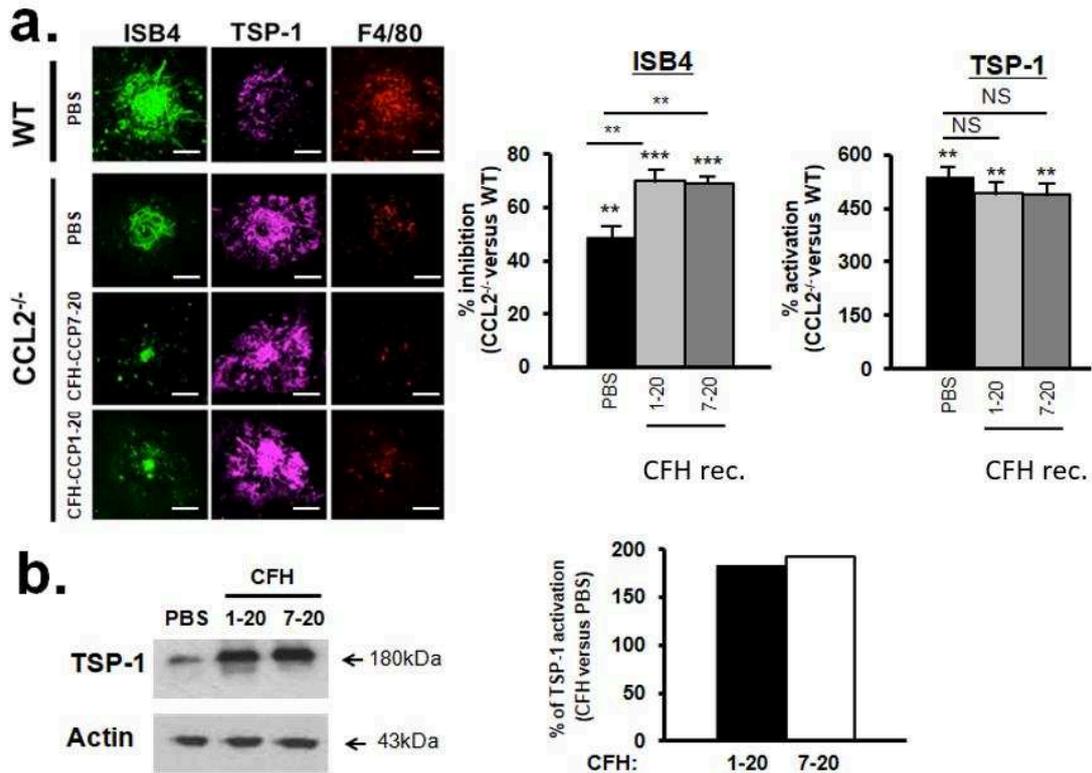
Borras et al, en cours de publication

**Fig. 37** : Effet anti angiogénique du CFH dû au TPS1

Analyse semi-quantitative par immunohistochimie de la surface de néovascularisation sur montage à plat du complexe EPR/choroïde/sclère 10 jours post injection intravitréenne de 3µl de CFH rec. ou CFH7-20 et d'anti TSP1 et 14 jours post impact laser. L'analyse est réalisée sur la surface d'intégration des néovaisseaux par rapport au PBS. Echelle 10µm. N=20 impacts laser réalisés sur 3 rats, évaluation statistique Mann Withney considérée significative  $p < 0,05$ . \*\*\* :  $p < 0,001$ ; \*\* :  $p < 0,01$  ; \* :  $p < 0,1$ . Echelle 10µm

post-laser dans le vitré des rats soumis au modèle CNV du CFH rec. ou du CFH7-20 ou du PBS et nous avons, par des expériences d'immunofluorescence sur montage à plat du complexe choroïde/membrane de Bruch/EPR, quantifié la surface d'immunomarquage de la TSP1 avec un anticorps spécifique. Les résultats obtenus à J14 post-laser montrent que l'apport de CFH rec. ou de CFH7-20 augmente significativement la surface immunomarkuée par la TSP1 par rapport à une injection de PBS de respectivement 220% et 130% (Fig. 36b). Pour confirmer l'implication de TSP1 dans l'activité anti-angiogénique du CFH rec. ou CFH7-20, nous avons injecté à J4 post-laser, et 20min après l'injection de CFH, dans le vitré des rats soumis au modèle CNV un anticorps anti-TSP1. À J14 post-laser, les résultats montrent que la co-injection de CFH rec. ou CFH7-20 avec l'anti-TSP1 ne réduit plus la surface de néovascularisation par rapport à une injection de PBS, contrairement à une simple injection de CFH rec. ou de CFH7-20 (Fig. 37), **démontrant clairement que l'activité anti-angiogénique du CFH passe par une régulation du taux de TSP1 présent sur le site de lésion.**

Afin de voir s'il y avait un lien entre l'infiltration microgliale/macrophagique, l'angiogenèse et la production de TSP1, nous avons injecté dans le vitré de souris invalidées pour l'expression de CCL2 (CCL2<sup>-/-</sup>) du CFH rec. ou du CFH7-20 ou du PBS (contrôle) au moment même de l'impact. Puis nous avons quantifié, par des expériences d'immunofluorescence sur montage à plat du complexe choroïde/membrane de Bruch/EPR à J14 post-laser, la surface de néovascularisation à l'aide du marqueur ISB4, la surface d'immunomarquage de la TSP1 avec un anti-TSP1 spécifique et la présence de microglies/macrophages à l'aide du marqueur F4/80. Nos résultats obtenus avec le F4/80 valident bien la suppression de l'expression de CCL2 chez les souris CCL2<sup>-/-</sup> puisqu'il n'y a pas ou peu d'infiltration microgliale/macrophagique immunomarkuée dans le complexe choroïde/membrane de Bruch/EPR par rapport aux souris contrôles soumis au modèle CNV (Fig. 38). Nous montrons que la surface de néovascularisation est significativement diminuée de 49% dans le complexe choroïde/membrane de Bruch/EPR des souris CCL2<sup>-/-</sup>/CNV injectées avec du PBS par rapport aux souris CNV/contrôles injectées avec du PBS (Fig. 38a), confirmant l'activité anti-angiogénique de CCL2 précédemment démontrée par les travaux de Liu et collaborateurs (Liu et al., 2011). L'injection de CFH rec. ou de CFH7-20 diminue, quant à elle, la surface de néovascularisation d'environ 70% chez les souris CNV/CCL2<sup>-/-</sup> par rapport aux souris CNV/contrôles, soit de 20% en plus que l'injection de PBS chez les souris CNV/CCL2<sup>-/-</sup> (Fig. 38a), **montrant un effet additif entre l'apport exogène de CFH et la réduction de l'infiltration microgliale/macrophagique sur l'angiogenèse.**



Borras et al, en cours de publication

**Fig. 38** : Augmentation par injection de CFH, du relargage de TPS1, préalablement inhibée par les cellules microgliales

**a-** analyse semi-quantitative par immunohistochimie sur montage à plat du complexe EPR/choroïde/sclère 10 jours post injection intravitréenne de 3µl de CFH rec. ou CFH 7-20 dans le modèle CNV WT ou CCL2<sup>-/-</sup> et 14 jours post laser. **b-** analyse semi-quantitative par western blot (30ng) du niveau d'expression de TPS1 induit par l'injection intravitréenne de 3µl de CFH rec. ou CFH7-20 10 jours post injection et 14 jours post laser. Les analyses sont réalisées par rapport au PBS. Echelle 10µm. N=20 impacts laser réalisés sur 3 rats, évaluation statistique Mann Withney considérée significative à p<0,05. \*\*\* : p <0,001; \*\* : p<0,01 ; \* : p<0,1. Echelle 10µm

Pour la TSP1, nous montrons une surface d'immunomarquage nettement augmentée de 540% chez les souris CNV/CCL2<sup>-/-</sup> par rapport aux souris CNV/contrôle, **suggérant une inhibition de production de TSP1 par la présence des cellules**

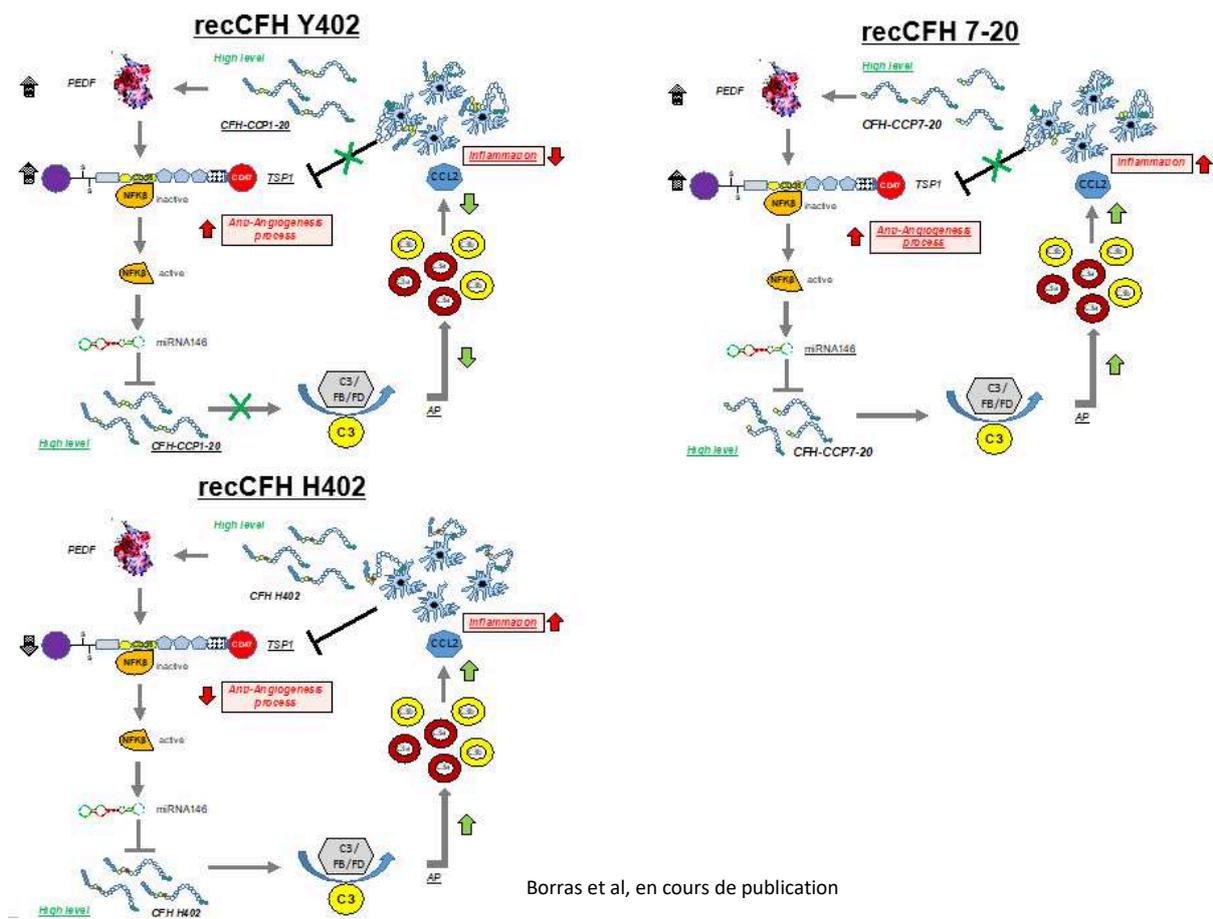
**microgliales/macrophagiques.** L'injection de CFH rec. ou de CFH7-20 n'augmente pas la surface d'immunomarquage au TSP1 par rapport à une injection de PBS chez les souris CNV/CCL2<sup>-/-</sup> mais reste plus importante par rapport aux souris contrôles/CNV (Fig. 38a). Cependant, nous montrons, par western blot, que la quantité de TSP1 est augmentée chez les souris CNV/CCL2<sup>-/-</sup> injectées avec du CFH rec. ou du CFH7-20 par rapport à une injection de PBS respectivement de 220% et de 130% (Fig. 38b). **L'ensemble de ces résultats montre 1- que l'apport de CFH rec. ou de CFH7-20 et la suppression de l'infiltration microgliale/macrophagique ont un effet additif sur la diminution de l'angiogenèse ; 2- que la présence sur le site de lésion des cellules microgliales/macrophagiques réduit considérablement la production de TSP1 ; et 3- que l'ajout de CFH (rec. ou 7-20) augmente la concentration de TSP1 mais pas la surface d'action de cette protéine.**

En résumé, l'ensemble de tous nos résultats montre que **l'infiltration des cellules microgliales/macrophagiques est dépendante de l'activation de la voie alterne du complément. De plus, nous montrons que l'infiltration de ces cellules sur le site de lésion inhibe la production de TSP1 et que cette dernière est responsable de l'activité anti-angiogénique du CFH.**

#### **VI. Schéma d'un mécanisme d'action possible de l'activité anti-angiogénique du CFH dans le modèle CNV**

**Sans injection de CFH :** l'impact laser va induire une diminution de l'expression du gène codant pour le facteur anti-angiogénique PEDF qui ne va alors pas induire l'expression du facteur anti-angiogénique TSP1 (Farnoodian et al., 2015). Le manque de production de TSP1 associée à une surexpression de VEGF, VEGFR1/R2 et d'angiotensine1 va favoriser la néovascularisation. De plus, l'infiltration microgliale/macrophagique, favorisée par la non régulation de la voie alterne du complément due à une baisse de production de CFH endogène, va encore plus inhiber la production de TSP1, ayant alors un effet additif avec les facteurs pro-angiogéniques sur l'augmentation de l'angiogenèse (Fig. 39).

**Injection de CFH rec. :** L'apport exogène de CFH à J4 post-laser va en quelque sorte combler la diminution de production de CFH endogène et entraîner une augmentation de l'expression



**Fig. 39 :** Schéma du mécanisme d'action du CFH, du CFH 7-20 et du polymorphisme du CFH sur les différents paramètres impliqués dans la DMLA.

du gène codant pour le PEDF qui va induire l'expression de TSP1 (Farnoodian et al., 2015). Cette augmentation couplée à une diminution de l'expression des gènes codant pour des facteurs pro-angiogéniques favorise une diminution de la surface de néovascularisation. De plus, de par son activité anti-C3 convertase, le CFH rec. va réduire la production des produits de clivage du C3 (dont le C3a et C3b) qui interviendraient dans le recrutement des cellules microgliales/macrophagiques en le réduisant. Ces dernières n'étant plus sur place vont alors favoriser la production de TSP1 qui peut jouer d'autant plus son rôle de facteur anti-angiogénique. En retour, et pour ne pas avoir un excès de CFH sur le site lésé, la TSP1 peut entraîner une augmentation de synthèse siRNA146 pouvant être responsable de l'inhibition de l'expression de cfh endogène observé en qPCR. Nos résultats montrent que l'activité anti-angiogénique du CFH est dose dépendante. En effet, l'apport de différentes concentrations de CFH exogène devrait moduler différemment l'expression du PEDF et l'inactivation de la VAC, et par conséquent, de la concentration de TSP1, entraînant alors un effet réducteur différent de la néovascularisation (Fig. 39).

**Injection de CFH7-20 :** L'apport de CFH7-20 va augmenter l'expression du facteur anti-angiogénique PEDF qui à son tour va augmenter l'expression de la TSP1. Au contraire du CFH rec., le CFH7-20 ne va pas inhiber le clivage du C3 produisant alors du C3a et C3b impliqués, pour au moins une partie, dans l'infiltration microgliale/macrophagique. Le recrutement de ces cellules sur le site de lésion devrait inhiber pour une bonne partie la synthèse de TSP1. Or, nos résultats montrent que la concentration de TSP1 reste la même suite à l'injection de CFH rec. ou de CFH7-20 ce qui suggère que malgré la présence des cellules microgliales/macrophagiques le CFH7-20 arrive tout de même à lever l'inhibition de production de TSP1 induite par ces cellules inflammatoires. Une des possibilités serait que le CFH7-20 en se liant sur les microglies/macrophages libère du TSP1 ou réduit l'expression d'un facteur inhibiteur dans la synthèse de TSP1. Des expériences en collaboration avec le LFB sont en cours de réalisation afin de montrer cela. De même que pour l'injection de CFH rec., la présence d'un excès de CFH7-20 exogène va induire une diminution de l'expression du CFH endogène et ce probablement via une synthèse de siRNA146 induite par la production de TSP1 (Pogue et al., 2009), ce qui permettrait de réguler la voie alterne du complément pour ne pas l'inhiber totalement (Fig. 39).

**Injection de CFH H402 :** L'injection de ce fragment de CFH n'entraîne pas d'augmentation de l'expression de PEDF et donc de TSP1. De plus, l'infiltration microgliale/macrophagique n'est aucunement réduite, induisant certainement une inhibition de la production de TSP1. Cette



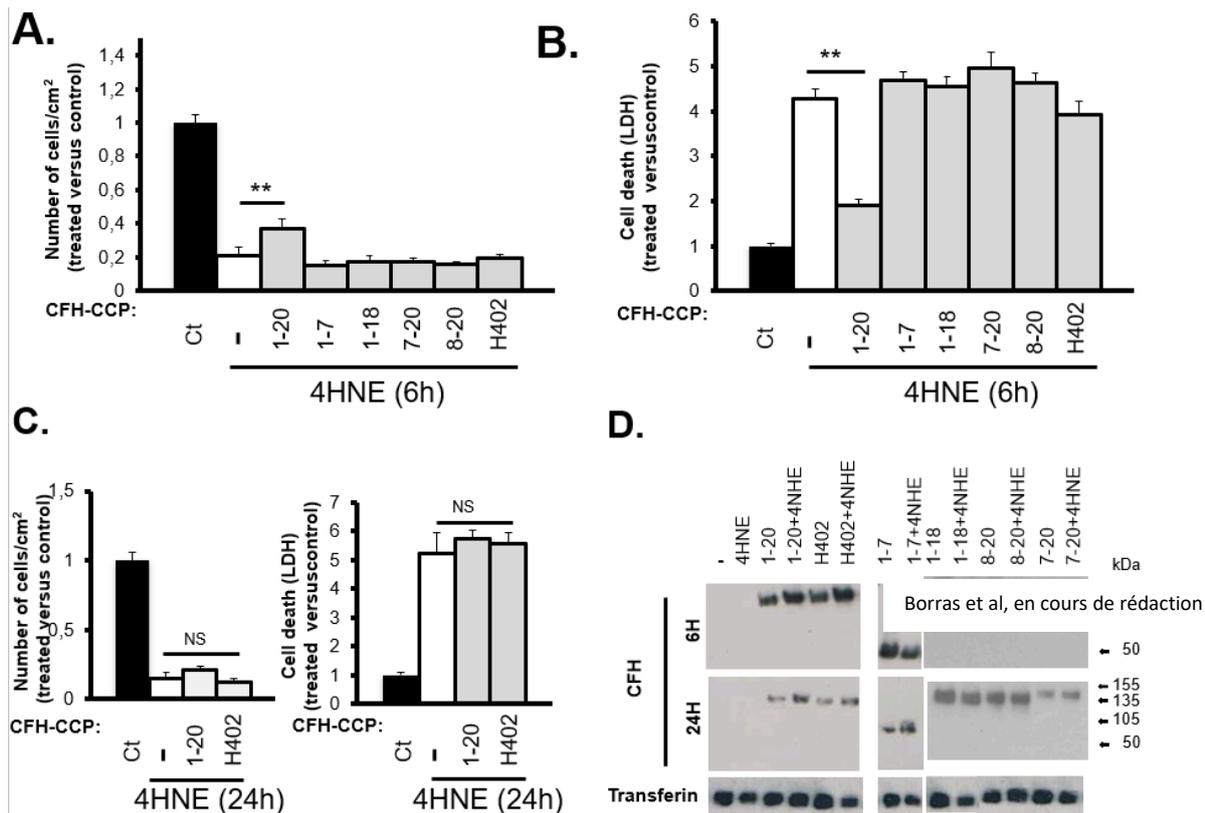
inhibition ne semble pas pouvoir être levée puisque le domaine CCP7 du CFH étant muté se trouve certainement incapable de se fixer sur les membranes des microglies et macrophages ne pouvant pas alors favoriser la production de TSP1. Ces deux phénomènes -pas de production de PEDF et infiltration microgliale/macrophagique suivie d'une inhibition de production de TSP1- semble être responsable, dans ce cas de figure, d'une néovascularisation non régulée. (Fig. 27, 39)

## PARTIE 2 - CFH et mort cellulaire induite par un stress oxydant type 4HNE

### I- Contexte de l'étude

#### A) Généralités

Nos résultats ont montré une action du CFH particulièrement bénéfique pour la thérapeutique de la forme néovasculaire de la DMLA. Toutefois, aucun de nos précédents résultats ne présage des effets thérapeutiques du CFH sur la forme atrophique de la DMLA qui présente une accumulation de lipides peroxydés responsables de la formation de stress oxydants dans le microenvironnement. Seule une réduction de l'accumulation de MDA a été observée, mais ne montre en aucun cas que la baisse de ces taux de stress oxydants est suffisante pour être bénéfique pour la forme atrophique de la DMLA. Une des premières cibles de cette forme de DMLA est les cellules de l'EPR. En effet, de nombreux lipides peroxydés vont s'accumuler sur ces cellules créant des zones atrophiques pouvant induire une rupture de la barrière hémato-rétinienne par la mort des cellules de l'EPR. Une fois rompue, cette barrière laisse place à une invasion des cellules endothéliales de la choriocapillaire vers la couche des photorécepteurs et entraîne la pathologie vers sa forme néovasculaire. Les mécanismes moléculaires impliqués dans la rupture de la barrière hématorétinienne restent encore inconnus à ce jour, malgré des pistes prometteuses et notamment celle d'une réduction de la formation des lipides peroxydés pouvant s'accumuler au cours de l'âge et être à l'origine même du déclenchement de la pathogenèse de la DMLA. **Le CFH étant capable de se lier sur les GAGs des membranes cellulaires de l'EPR et, comme le montrent nos précédents résultats, de réduire l'accumulation des lipides peroxydés de type MDA, nous avons émis l'hypothèse que le CFH pourrait jouer un rôle de protection de la mort des cellules de l'EPR soumises à un stress oxydant.**



**Fig. 40 :** Protection de la mort cellulaire des cellules de l'EPR par le CFH

**a-** analyse de la survie cellulaire par comptage, sur cellule de Malassez, en réponse à un stress oxydant fort (30 $\mu$ M 4HNE) durant 6h en présence de CFH (300nM) ou de fragments de CFH (300nM). **b-** analyse de la mort cellulaire par LDH à 6H en réponse au 4HNE en présence de CFH ou de fragment de CFH. **c-** analyse de la survie cellulaire par comptage, sur cellule de Mallasez, et de la mort cellulaire par LDH en réponse au 4HNE (30 $\mu$ M) à 24H en présence de CFH (300nM) ou du polymorphisme du CFH (300nM). **d-** analyse par western blot de la présence de CFH ou fragment dans les milieux des cellules co-cultivées avec du CFH ou du polymorphisme (300nM) et/ou 4HNE (30 $\mu$ M) à 6h et 24H. Analyse statistique réalisée par application du test de Student considérée comme significative si  $p < 0,05$ . \*\*\* :  $p < 0,001$ ; \*\* :  $p < 0,01$  ; \* :  $p < 0,1$ .

Pour valider notre hypothèse, nous avons 1- caractérisé les effets du CFH sur le maintien des jonctions serrées des cellules de l'EPR qui sont altérées en présence d'un stress oxydant, et 2- identifié le ou les action(s) du CFH sur les voies de transduction induisant la mort cellulaire : la nécrose et l'apoptose caspases dépendantes. Nous alors avons choisi de soumettre à un stress oxydant deux types cellulaires : 1- des cellules ARPE19 qui sont issues d'une lignée de cellules de l'EPR humain, et des cellules pluripotentes induites (iRPE) qui sont des fibroblastes différenciés en cellules de l'EPR. Dans les deux cas, nous avons maintenu en culture ces deux types cellulaires le temps nécessaire pour qu'elles acquièrent les caractéristiques des cellules de l'EPR in vivo : forme, pigmentation, jonctions serrées. La résistance transépithéliale « TER » des iRPE étant plus proche de celle des cellules de l'EPR in vivo que celle des ARPE19 rend ces cellules intéressantes pour en étudier les « fonctions membranaires ». Nous avons soumis les cellules ARPE19 et iRPE, en présence ou pas de CFH rec., à du 4HNE, qui est un oxydant naturel connu pour être impliqué dans la pathogenèse de la DMLA (Bellmann et Sahel, 2006 ; Schutt et al., 2003 ; Ethen et al., 2007).

#### B) Mise en œuvre de l'étude

Pendant 4 semaines les cellules ARPE19 ont été cultivées avec du milieu DMEM/F12 complémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (FBS), puis avec du sérum à 1% durant les deux dernières semaines de culture avant traitement. Dès 4 semaines de culture, les ARPE19 présentent les caractéristiques des cellules humaines et sont différenciées. En effet, les cellules ARPE19 présentent des jonctions serrées et une pigmentation identique à celles observées in vivo au niveau de l'EPR humain. Les iRPE, cellules humaines dédifférenciées puis redifférenciées en cellules de l'EPR au bout de 42 jours, sont cultivées à 5% de CO<sub>2</sub> et à 37°C. Afin de limiter leur croissance pendant l'expérimentation, ce qui pourrait altérer leurs propriétés, ces deux lots de cellules sont cultivés deux semaines dans 1% de sérum FBS. Puis, après 6 semaines de culture, les cellules (ARPE19 et iRPE) ont été co-traitées avec soit du 4HNE-PBS ou du 4HNE-CFH rec. pendant 1 heure, 6 heures ou 24 heures. Une pré-étude, réalisée à lors de mon arrivée, dans le laboratoire dans le but de définir les doses optimales de 4HNE et de CFH. (Fig. 40). De la sorte nous avons alors utilisé une dose de 30µM de 4HNE pour induire une mort cellulaire de des ARPE19 de 50 à 65% après 6h de culture (Fig. 40) ; et une dose de CFH rec., identifiée comme la plus efficace pour protéger de la mort les cellules ARPE1 soumises à 30µM de 4HNE, de 300nM (Fig. 40). Ces deux doses (4HNE et CFH rec.) ont été alors utilisées dans toutes les expériences qui vont être décrites dans les paragraphes suivants. Les cultures et traitement des cellules iRPE ont été réalisées par le DR. Canonica



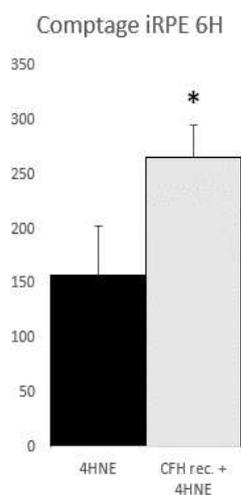
Jérémie, chercheur en stage postdoctoral à Lausanne en Suisse avec le PR. Behar-Cohen Francine. Ces premières données ont permis de montrer que le CFH est capable de protéger les cellules de l'EPR d'un stress oxydant. Toutefois, il reste à savoir comment le CFH peut agir sur ces cellules : est-ce par pure protection des membranes cellulaires ? ou par régulation des voies de mort induites par le 4HNE (apoptose et nécrose) ? et quels sont les domaines du CFH mis en jeu dans cette protection face à un stress oxydant ?

## **II. Identification des domaines CCP du CFH nécessaires pour protéger les cellules de l'EPR de la mort induite par un stress oxydant.**

Après avoir montré un effet protecteur du CFH rec. sur les cellules ARPE19 soumises à un stress oxydant type 4HNE, nous avons voulu savoir quels étaient les domaines CCP du CFH mis en jeu. Pour cela, nous avons co-traité pendant 6h ou 24h les cellules ARPE19 avec du 4HNE à une concentration de 30 $\mu$ M et différents fragments de CFH rec. à une dose 300nM ou du PBS, puis nous avons réalisé un comptage cellulaire. Les différents fragments testés sont : - le **CFH rec.** contenant les deux régions de fixation aux membranes cellulaires CCP6-8 et CCP19-20 et les domaines CCP1-4 de régulation de l'activation de la VAC; - le **CFH1-18** sans les domaines de fixation CCP19-20; - le **CFH1-7** contenant seulement les domaines régulateurs de l'activation de la VAC (CCP1-4) et les domaines de fixation CCP6-7; - le **CFH7-20** contenant le CCP7 site de la mutation Y402H et les domaines de fixation aux membranes CCP19-20; et - le **CFH8-20** ne contenant que le site de fixation CCP19-20. Préalablement la toxicité éventuelle des fragments a été testée à 6h et 24h post-traitement.

Nos résultats montrent, que la présence des différents fragments de CFH, dans le milieu de culture des cellules ARPE19, n'entraîne pas la mort et ne présente donc aucune toxicité pour les cellules en culture à ces deux temps post-traitement. En effet, un test de comptage cellulaire par cellule de Malassez, permet de montrer, qu'il n'y a pas de déficit numérique de cellules à 6h et 24h post traitement et cela avec les différents fragments. De plus, le test de mort cellulaire, LDH, ne montre pas de mort ni à 6h ni à 24h après l'ajout seulement des fragments dans les milieux (Fig. 40).

En revanche, lorsque les cellules ARPE19 sont incubées avec du 4HNE à 6h ou 24h, on observe, par rapport aux cellules non traitées, un important déficit numérique de cellules avec présence de nombreux débris cellulaires et un taux de LDH important (Fig. 40a, b). Ces résultats, permettent de montrer un taux de mort de 60% à 6h et de 99% à 24h (Fig. 40c).



Borras et al, en cours de rédaction

**Fig. 41** : Le CFH protège de la mort induite par stress oxydant

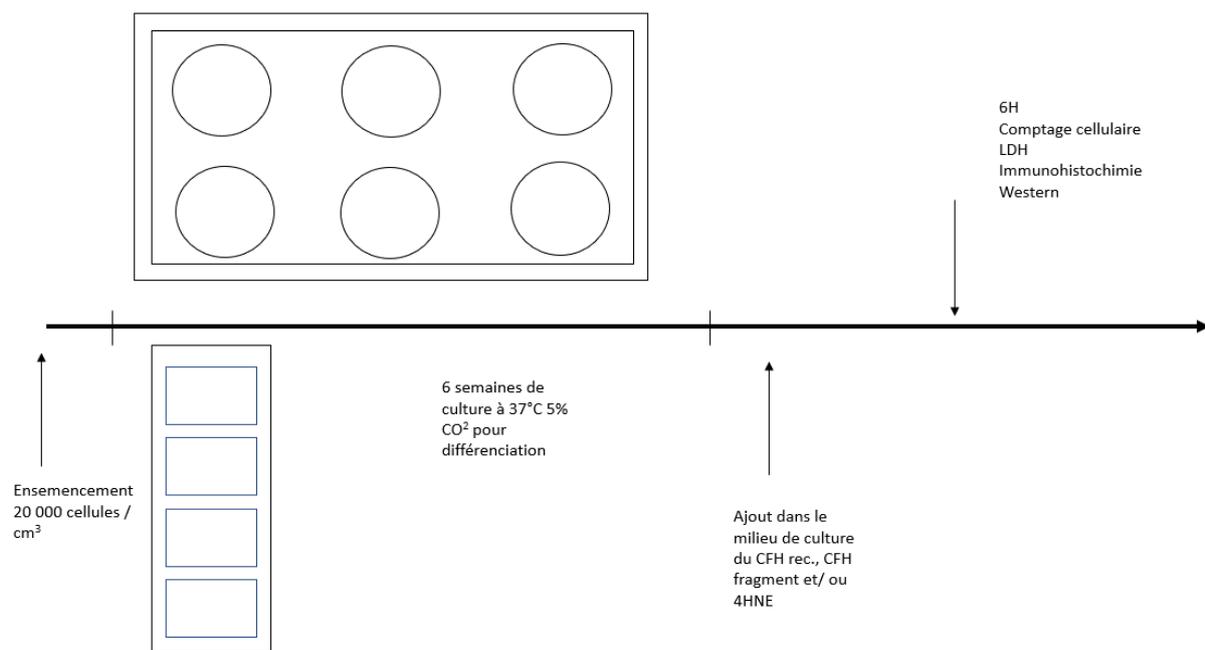
Comptage cellulaire, sur cellule de Malassez, des iRPE après co-culture avec du CFH (300nM) et/ou du 4HNE (30 $\mu$ M) durant 6 heures. Les cellules sont décollées à la trypsine avant d'être comptées. N=3 Analyse statistique réalisée par application du test de Student considérée comme significative si  $p < 0,05$ . \*\*\* :  $p < 0,001$ ; \*\* :  $p < 0,01$  ; \* :  $p < 0,1$ .

Lorsque les cellules sont co-traitées avec du 4HNE et les différents fragments de CFH à 6h, les résultats de comptage sur cellule de Malassez montrent que seul le CFH rec. protège de 40% les cellules ARPE19 de la mort induite par le 4HNE (Fig. 40c). Ces données ont été confirmées par nos expériences de mesure de LDH qui montrent également une protection de la mort des cellules ARPE19 soumises à du 4HNE uniquement en présence de CFH rec. forme entière (Fig. 40b,c). L'inaction des autres fragments de CFH n'est pas due à une dégradation rapide de ces différents fragments puisqu'ils sont toujours détectables dans le milieu de culture (Fig. 40d). En revanche, cet effet protecteur du CFH rec. forme entière n'est plus observé après 24H de culture et ce malgré la présence de CFH dans le milieu de culture (Fig. 40d). De même, nos expériences de stress oxydant sur les cellules iRPE montrent un effet protecteur du CFH rec. de 28% de la mort de ces cellules induite par le 4HNE après 6h de culture (Fig. 41). Ce taux de protection, supérieur par rapport aux cellules ARPE19, s'explique par le fait que les iRPE ont une résistance transépithéliale ou « TER » élevée.

**En résumé : Nous montrons que l'effet protecteur du CFH pour la survie des cellules de l'EPR n'est présent qu'à un stade précoce à la suite d'un stress oxydant à 6h et plus à 24h. Le fait que la forme CFH1-7 ne permette pas la protection des cellules de la mort, suggère que le domaine de fixation CCP19-20 est nécessaire à l'activité protectrice de ces cellules dans ces conditions. De même l'inactivité des fragments CFH7-20 et CFH8-20 sur la protection de la mort des cellules de l'EPR montre que pour être actif le CFH doit pouvoir réguler l'activation de la voie alterne du complément.**

Afin de caractériser le rôle du CCP7, site du polymorphisme Y402H du CFH, nous avons co-traité les cellules de l'ARPE19 avec du 4HNE et soit du CFH1-7 Y402H ou du CFH Y402H aux mêmes doses décrites au-dessus. Les résultats montrent clairement que la mutation Y402H du CFH suffit à elle-seule pour abolir les effets protecteurs du CFH sur la mort des cellules ARPE19 (Fig. 40). Le fait que les fragments CFH Y402H et CFH1-7 Y402H ne protègent plus les cellules de l'EPR de la mort induite par un stress oxydant, montre l'importance du CCP7, et probablement dû à sa capacité de liaison aux membranes cellulaires dans ce processus de protection de la mort.

**Ces résultats démontrent, pour la première fois, que pour être protecteur de la mort cellulaire le CFH doit, non seulement, posséder ses deux régions de fixation aux membranes des cellules ARPE19 les domaines : CCP6-8 et CCP19-20, mais aussi, ses domaines CCP1-4 indispensables à l'inhibition de l'activation de la VAC. Ainsi, deux**



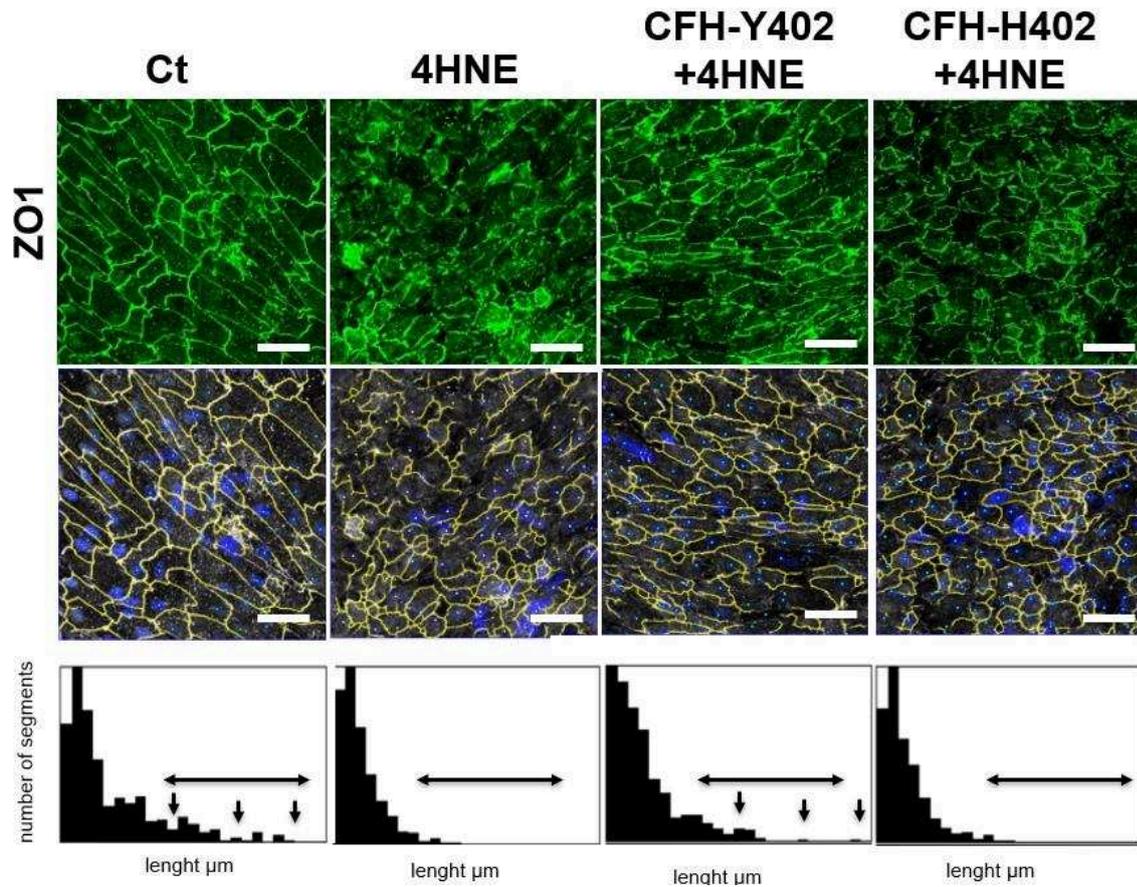
**Fig. 42** : Schéma du protocole utilisé sur les cellules ARPE19 et iRPE

processus peuvent être impliqués dans la protection du CFH vis-à-vis de la survie des cellules de l'EPR : par fixation sur les GAGs des membranes cellulaires et par régulation de l'activation de la voie du complément, ces deux mécanismes n'étant pas exclusifs.

### **III. Effets du CFH sur les structures cellulaires des cellules de l'EPR**

#### **A) Jonctions serrées**

Etant donné que les sites de fixation aux membranes cellulaires du CFH sont requis pour la survie des cellules de l'EPR, cela nous a laissé penser que le CFH pourrait agir sur le maintien de la structure des jonctions serrées de ces cellules qui sont les gardiennes de l'intégrité cellulaire. C'est pourquoi, nous avons étudié par des expériences d'immunofluorescence, à l'aide du marqueur ZO1, les jonctions serrées des cellules ARPE19 co-traitées avec du 4HNE (30 $\mu$ M) et du CFH rec. (300nM) pendant 6h (Fig. 42). Nous avons étudié que les effets du CFH rec. forme entière car les autres fragments ne protègent pas de la mort. Le marquage ZO-1 observé sur les cellules non traitées ou traitées avec du CFH rec. sans présence de 4HNE, présente un maillage alvéolé net et bien organisé, permettant l'observation de la structure cellulaire (Fig. 43). Les cellules ARPE19 immunomarquées au ZO1 ont une forme d'alvéole allongée avec la présence de longs fragments (Fig. 43). En revanche, lorsque les cellules sont incubées avec du 4HNE, le maillage est complètement désorganisé avec rupture des segments membranaires alvéolés et destruction de l'intégrité cellulaire (Fig. 43). La présence de 4HNE dans le milieu de culture entraîne la formation de petits fragments issus de la rupture des grands fragments alvéolaires (Fig. 43). Le co-traitement du 4HNE avec du CFH rec. montre des cellules ARPE19 plus rondes qu'alvéolaires et un mix de segments membranaires plus ou moins longs (Fig. 43). Nous avons, à l'aide d'une macro réalisée par l'ingénieur d'étude du Centre de Recherche des Cordeliers Mr. Klein, quantifié la longueur de chaque fragment membranaire des cellules ARPE19 traitées ou pas avec du 4HNE et/ou du CFH. Cette macro, appliquée aux stacks des images d'expériences d'immunofluorescence réalisées à l'aide du marqueur ZO1 et prises au microscope confocal, mesure la taille des différents fragments cellulaires immunomarqués présents dans les puits de culture des cellules ARPE19. Elle permet ainsi d'obtenir, pour un groupe de traitement donné, un histogramme représentatif des jonctions cellulaires en fonction de leur longueur en  $\mu$ m et de leur nombre (Fig. 43). Ces histogrammes permettent de quantifier la présence de jonctions serrées en « bonne santé » présentant un grand nombre de grands fragments cellulaires impliquant des cellules étendues et jointives. Au



Borras et al, en cours de rédaction

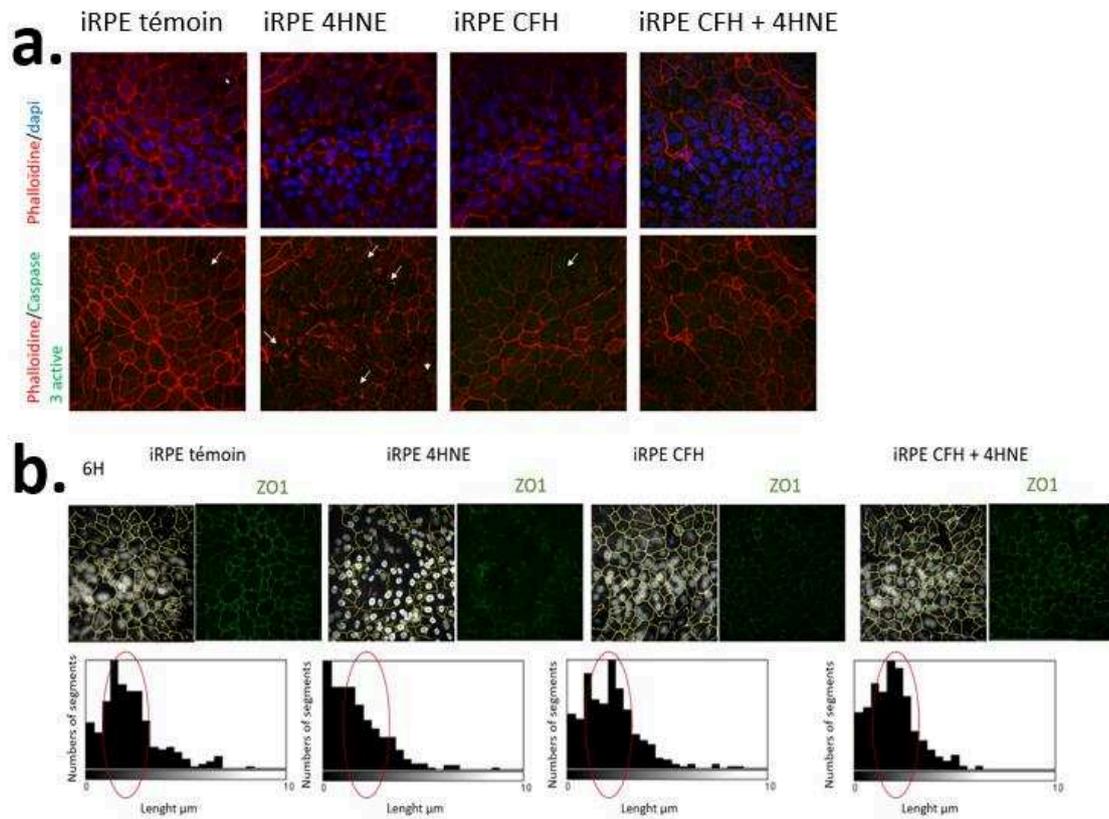
**Fig. 43** : Protection des jonctions serrées de l'EPR par le CFH lors d'un stress oxydant

Analyse par macro des longueurs de fragments membranaires des cellules de l'EPR en fonction de leur nombre sur image prise au microscope confocal LMS 700 Zeis (superposition de Z stack) d'immunohistochimie des jonction serrées de cellules de l'EPR marquées en vert (ZO1), cultivées en présence de CFH rec. (300nM) et/ou de 4HNE (30μM) à 6h. N=6

contraire, la présence de 4HNE dans le milieu de culture présente essentiellement que des petits fragments cellulaires impliquant des cellules rondes détachées et dont les membranes cellulaires ne sont plus jointives (Fig. 43). Les résultats montrent que les cellules ARPE19 non traitées présentent plus de longs fragments membranaires que de courts ou d'intermédiaires (Fig. 43). Le traitement avec du CFH rec. seul présente un profil similaire aux cellules non traitées (Fig. 43). Cependant, le traitement avec du 4HNE seul entraîne la formation d'un grand nombre de petits fragments membranaires par rapport aux grands fragments pratiquement inexistantes (Fig. 43). Le co-traitement de 4HNE et de CFH rec. présente un mix de petits/intermédiaires et grands fragments membranaires (Fig. 43), suggérant une action du CFH sur le maintien des structures des membranes cellulaires. En revanche, le co-traitement de 4HNE et de CFH Y402H ne permet pas de conserver de façon significative de longs fragments cellulaires (Fig. 43). En effet, nous obtenons un profil d'histogramme très proche de celui obtenu avec le traitement 4HNE, avec de très nombreux et exclusifs petits fragments provenant de la perte des jonctions serrées des cellules ARPE19 qui ne sont plus jointives (Fig. 43), **démontrant que la mutation Y402H du CFH entraîne une protection moindre des jonctions serrées des cellules ARPE19**. Nos résultats d'immunomarquage ZO1 sur les cellules iRPE montrent également que le CFH rec. protège la structure des jonctions serrées des cellules iRPE traitées au 4HNE (Fig. 44b). En effet, plus de petits fragments sont dénombrés pour le traitement 4HNE seul que pour un co-traitement CFH/4HNE où un mix de petits et moyens fragments sont observés (Fig. 44b), suggérant une fixation du CFH induisant la protection de ces jonctions.

À l'aide d'un double immunomarquage ZO-1 et CFH, nous montrons que le CFH ajouté dans le milieu de culture se fixe sur les membranes des cellules ARPE19 (Fig. 45). De plus, à l'endroit où le CFH est colocalisé avec les jonctions serrées immunomarquée au ZO1, les structures cellulaires semblent plus conservées qu'avec un traitement au 4HNE seul (Fig. 45). Ces résultats suggèrent bien que le CFH se fixe sur les jonctions serrées afin de protéger les cellules de l'EPR de la mort induite par un stress oxydant. En revanche, le polymorphisme Y402H du CFH semble se fixer moins sur les membranes cellulaires immunomarquées au ZO1 (Fig. 45), ce qui pourrait expliquer l'absence de protection de la mort des cellules ARPE19 qui ont du mal à fixer du CFH puisqu'il est muté sur le domaine de liaison CCP7.

**L'ensemble de ces résultats montre que le CFH conserve, dans une moindre mesure, la structure des jonctions serrées des cellules de l'EPR lorsqu'elles sont soumises à un stress oxydant. Nous démontrons également que pour cet effet le CCP7 a un rôle primordial dans la fixation du CFH sur les membranes des cellules de l'EPR.**



Borras et al, en cours de rédaction

**Fig. 44** : Protection de l'intégrité cellulaire et cytoplasmique des irPE dans des conditions de stress oxydant

**a-** Immunomarquage des irPE dans des conditions d'incubation avec du CFH (300nM) et/ou du 4HNE (30µM) à 6 heures avec la phalloïdine (rouge) marquant le réseau d'actine et la caspase 3 (vert), marquant la forme active de la caspase 3. Les images sont obtenues à l'aide d'un microscope confocal LMS 700 Zeis par superposition de Z stack. **b-** immunomarquage des jonction serrées (ZO1, vert) et analyse par macro des fragments membranaires des irPE en co-culture avec du CFH (300nM) et/ou du 4HNE (30µM) durant 6 h. N= 3

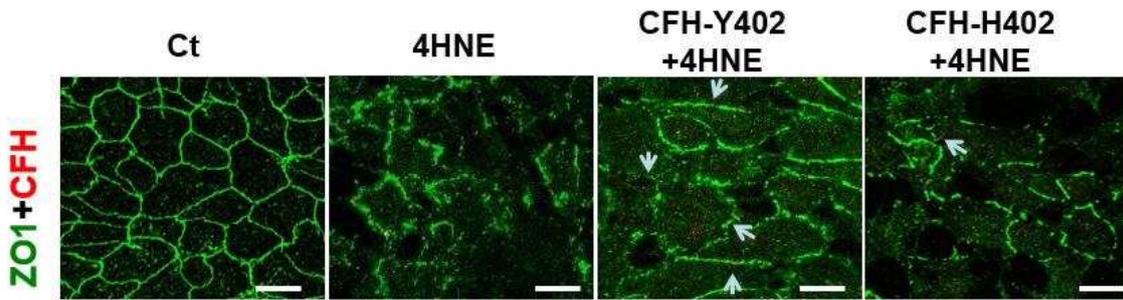
## B) Intégrité cellulaire

Nous avons étudié, à l'aide d'expériences d'immunofluorescence, le maintien de la structure cytoplasmique des cellules ARPE19 et iRPE soumises à un stress oxydant de type 4HNE. Pour cela, nous avons utilisé la phalloïdine comme marqueur des filaments d'actine qui sont eux-mêmes étroitement liés aux jonctions serrées de type ZO1. Nous nous sommes placés dans des conditions de culture ARPE19 ou iRPE co-traitées avec du 4HNE (30 $\mu$ M) et/ou du CFH (300nM) pendant un laps de temps de 6h. Nos résultats montrent un immunomarquage à la phalloïdine très dense et structuré pour les cellules non traitées mais très désorganisé et en amas pour celles traitées avec du 4HNE (Fig. 44a, 46). En revanche, la présence de CFH rec., en plus du 4HNE dans le milieu de culture, atténue la déstructuration du réseau des filaments d'actine intracellulaires induite par le stress oxydant aussi bien pour les cellules ARPE19 et iRPE (Fig. 44a, 46). Cette protection est anéantie lorsque le CFH porte le polymorphisme Y402H du CFH (Fig. 44a, 46). **Ces résultats montrent que lors d'un stress oxydant 1- le CFH protège la structure du réseau d'actine intracellulaire et par conséquent l'intégrité des cellules de l'EPR ; et 2- que le domaine CCP7 du CFH est indispensable à cet effet.**

## C) Analyse intracellulaire en microscopie électronique

Précédemment, nous avons montré que l'effet protecteur de la mort du CFH vis-à-vis des cellules de l'EPR passe par le maintien des jonctions serrées et de l'intégrité cellulaire. Afin de mieux comprendre comment le CFH protège ces cellules de la mort, nous avons réalisé une analyse en microscopie électronique des structures organiques des cellules ARPE19 soumises à un stress oxydant de type 4HNE. Nous avons basé nos observations sur l'aspect des membranes, des mitochondries et des noyaux des cellules ARPE19 à 6h post-traitement au 4HNE (30 $\mu$ M) +/- du CFH (300nM).

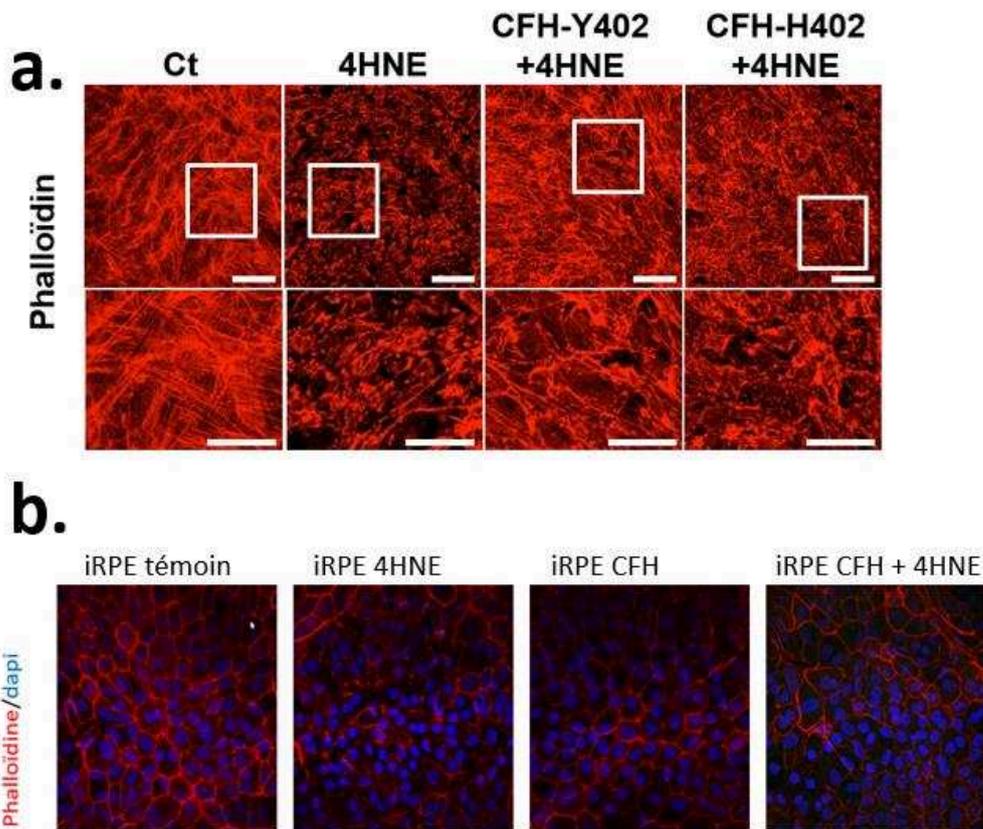
Sans traitement, les cellules ARPE19 ont une forme allongée avec une bicouche lipidique bien délimitée et nette (Fig. 47). Le noyau de ces cellules est bien visible de taille importante présentant une chromatine majoritairement décondensée (Fig. 47). Ce dernier est entouré d'une enveloppe nucléaire délimitée, nette et non désorganisée (Fig. 47). Les mitochondries présentent, quant à elles, une forme allongée avec de très nombreuses crêtes mitochondriales bien nettes, le tout contenu dans une double membrane lipidique (Fig. 47). Après 6 semaines de culture et 6 heures de traitement au 4HNE, les cellules ARPE19 sont de



Borras et al, en cours de rédaction

**Fig. 45 :** Protection des jonctions serrées par fixation du CFH

Immunohistochimie des jonctions serrées (ZO1 vert) des cellules de l'EPR après 6h de culture en présence de CFH (300nM) et / ou 4HNE (30µM). Le CFH fixé est marqué en rouge. Les images sont obtenues à l'aide d'un microscope confocal par superposition de Z stack. N=9



Borras et al, en cours de rédaction

**Fig. 46 :** Protection du cytosquelette des cellules de l'EPR par le CFH en condition de stress oxydant

**a-** Immunohistochimie du réseau d'actine (phalloïdine, rouge) des cellules de l'EPR incubées avec du CFH (300nM) et/ou du 4HNE (30µM) durant 6 heures. **b-** Immunohistochimie du réseau d'actine (phalloïdine, rouge) des cellules iRPE incubé avec du CFH (300nM) et/ou du 4HNE (30µM) durant 6 heures. Les images sont obtenues à l'aide d'un microscope confocale par superposition de Z stack. N=3

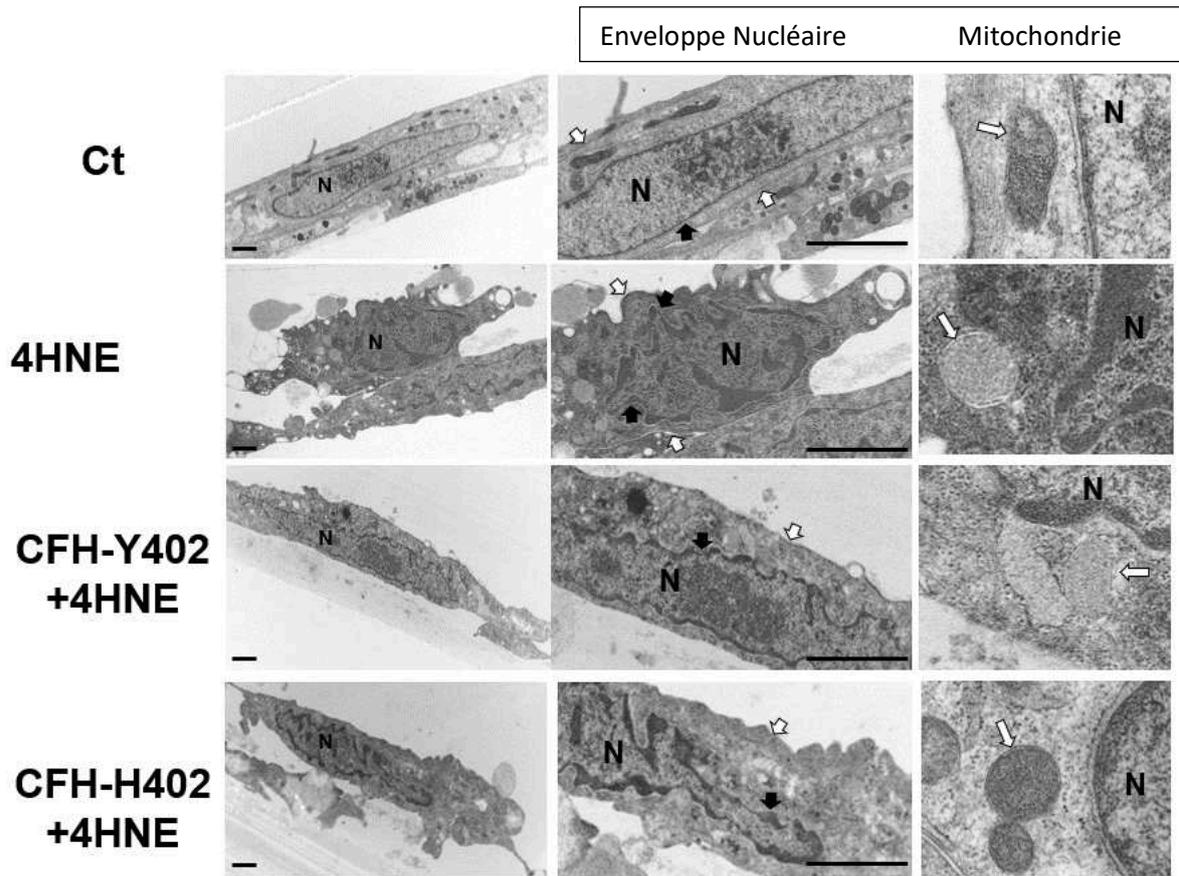
taille réduite recroquevillées sur elles-mêmes (Fig. 47). Les contours cellulaires sont toujours bien visibles mais forment des irrégularités sur toute leur longueur (Fig. 47). Les mitochondries présentent une forme arrondie avec une absence de crêtes mitochondriales, suggérant une chaîne respiratoire altérée (Fig. 47). De plus, leur noyau est moins volumineux par rapport aux cellules non traitées et présente de nombreuses évaginations ressemblant à des corps apoptotiques (Fig. 47). Dans le cas d'un co-traitement 4HNE et CFH rec., les cellules possèdent une forme ovoïde intermédiaire entre la forme allongée des cellules non traitées et celle plus arrondie des cellules traitées au 4HNE (Fig. 47). La membrane de ces cellules est encore bien définie, plus ou moins régulière, en tout cas plus que celle observée avec le traitement au 4HNE seul (Fig. 47). Le noyau reste avec une forme allongée moins qu'avec le témoin mais plus que pour les cellules traitées au 4HNE seul (Fig. 47). Les mitochondries ne sont pas aussi allongées que pour les cellules non traitées mais plus que pour les cellules traitées avec du 4HNE seul (Fig. 47). Elles présentent des crêtes moins visibles par rapport aux cellules non traitées mais existantes (Fig. 47), suggérant un maintien de l'activité de la chaîne respiratoire. Cependant, pour le co-traitement avec du 4HNE et du CFH Y402H, nous observons un profil quasi identique au traitement 4HNE avec un noyau présentant de nombreuses évaginations, une forme cellulaire déstructurée et des mitochondries rondes sans crêtes apparentes (Fig. 47).

**L'ensemble de ces données montre que, à la suite d'un stress oxydant induit, le CFH arrive à préserver, dans une moindre mesure, les structures membranaires, la structure nucléaire et l'activité mitochondriale des cellules de l'EPR. Cet effet est dépendant d'un domaine CCP7 intact.**

#### **IV. Effet du CFH sur l'apoptose et la nécrose**

##### **A) CFH et apoptose**

La réduction de formation de corps apoptotiques et le maintien des crêtes mitochondriales en présence de CFH semble suggérer une action de ce facteur dans l'apoptose. Afin de savoir si le CFH peut réguler l'apoptose, nous avons choisi d'étudier l'expression des facteurs nécessaires à l'activation de cette voie de mort : la pro-caspase3, la caspase 3 activée



Borras et al, en cours de rédaction

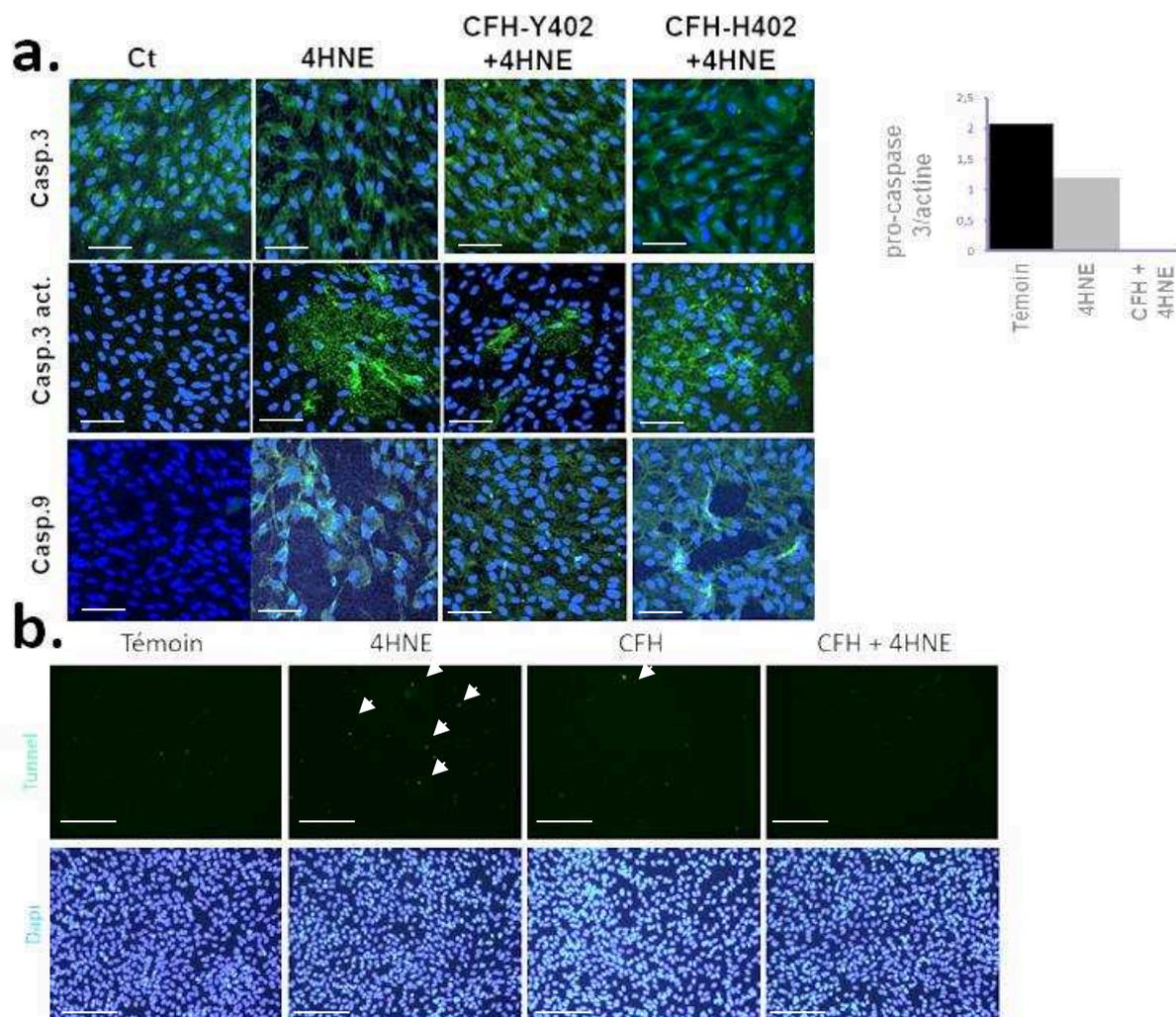
**Fig. 47** : Morphologie des cellules de l'EPR en microscopie électronique

Analyse morphologique de coupe transversale de cellule en microscopie électronique après incubation durant 6H avec du CFH (300nM) et/ou du 4HNE (30µM).

et la caspase 9. En effet, seul le clivage de la procaspase 3 va permettre à cette caspase d'être active, et ce clivage est possible grâce à la caspase 9.

Les cellules ARPE19 utilisées dans cette expérimentation, ont été cultivées durant 6 semaines comme précédemment puis traitées au 4HNE (30 $\mu$ M) et CFH rec. (300nM) pendant 1 heure. Comme le montrent nos résultats d'immunofluorescence sur les cellules ARPE19 non traitées, il y a une grande quantité de procaspase 3, donc non active, contrairement au taux de caspase 3 active qui est faible (Fig. 48a). En accord avec ces résultats, nous observons très peu de caspase 9 (Fig. 48a). Cependant, en présence de 4HNE l'accumulation de caspase 3 active est augmentée contrairement à celle de procaspase 3 qui est naturellement diminuée (Fig. 48a), démontrant que, à la suite d'un stress oxydant, les cellules de l'EPR entrent en apoptose via l'activation de la caspase 3. En accord avec ces données, une augmentation du taux de caspase 9 est observée par rapport aux cellules non traitées (Fig. 48a). La situation s'inverse en présence de CFH et de 4HNE. En effet, par rapport aux cellules traitées uniquement avec du 4HNE, nous observons une réduction significative du taux de caspase 3 active et de caspase 9 associée à un fort taux de procaspase 3 (Fig. 48a). **La présence de CFH atténue les effets pro-apoptotiques du 4HNE sur les cellules ARPE19.** Il est à noter que le CFH Y402H ne possède pas cette capacité à réguler le taux de caspase 3 active. En effet, le co-traitement de 4HNE et de CFH Y402H entraîne une augmentation des taux de caspase 3 active et de caspase 9 au contraire de la concentration de procaspase 3 qui diminue (Fig. 48a), démontrant un processus apoptotique. De même, suite à un traitement avec du 4HNE, les cellules iRPE expriment davantage de caspase 3 active par rapport aux cellules non traitées (Fig. 44a). Au contraire, comme pour les cellules ARPE19, le co-traitement 4HNE/CFH rec. diminue le taux de caspase 3 active par rapport aux cellules témoins (Fig.44a), démontrant là encore, clairement, une action du CFH sur l'activation de la caspase 3 responsable d'une entrée en apoptose.

Nous avons confirmé cette mort par apoptose par des expériences de « Tunnel » réalisées sur des cultures de cellules ARPE19 co-traitées avec du 4HNE et/ou du CFH pendant 1H. Nous avons choisi d'observer ce marquage à 1H, compte tenu du haut pourcentage de mort observé à 6H. Un faible marquage est observé pour les cultures non traitées ou traitées seulement avec du CFH rec. (Fig. 48b), signe d'une non toxicité du CFH sur ces cellules. En revanche, un traitement avec du 4HNE entraîne une mort par apoptose intense (Fig. 48b), confirmant que suite à un stress oxydant la voie apoptotique est activée dans les cellules de l'EPR. En accord avec nos précédents résultats, un co-traitement 4HNE et CFH rec. diminue la mort par apoptose dans les cultures de cellules ARPE19 (Fig. 48b). **Ces données montrent**



Borras et al, en cours de rédaction

**Fig. 48 :** Mort cellulaire par apoptose lors d'un stress oxydant

**a-** Immunohistochimie des cellules de l'EPR marqué en vert pour la caspase 3, la caspase 3 active ou la caspase 9, 6 heures après incubation avec du CFH (300nM) et/ou du 4HNE (30µM) et analyse semi-quantitative par western blot (30ng) de la quantité de procaspase 3 des cellules de l'EPR incubé avec du CFH (300nM) et/ou du 4HNE (30µM). **b-** immunohistochimie Tunnell, des cellules après incubation durant 1 heure avec du CFH (300nM) et/ou du 4HNE (30µM). Les images sont obtenues à l'aide d'un microscope confocal LSM 700 Zeiss par superposition de Z stack. N=3 Analyse statistique réalisée par application du test de Student considérée comme significative si  $p < 0,05$ . \*\*\* :  $p < 0,001$ ; \*\* :  $p < 0,01$  ; \* :  $p < 0,1$ . Echelle 10µm

**sans équivoque, que le CFH est capable de réduire le processus de mort activée par apoptose.**

**En conclusion, ces données prises dans leur ensemble montrent clairement un effet anti-apoptotique du CFH sur les cellules de l'EPR soumises à un stress oxydant. Cet effet n'est possible qu'à condition que le domaine CCP7 du CFH soit intact et passe par la régulation de l'activation de la voie des caspases.**

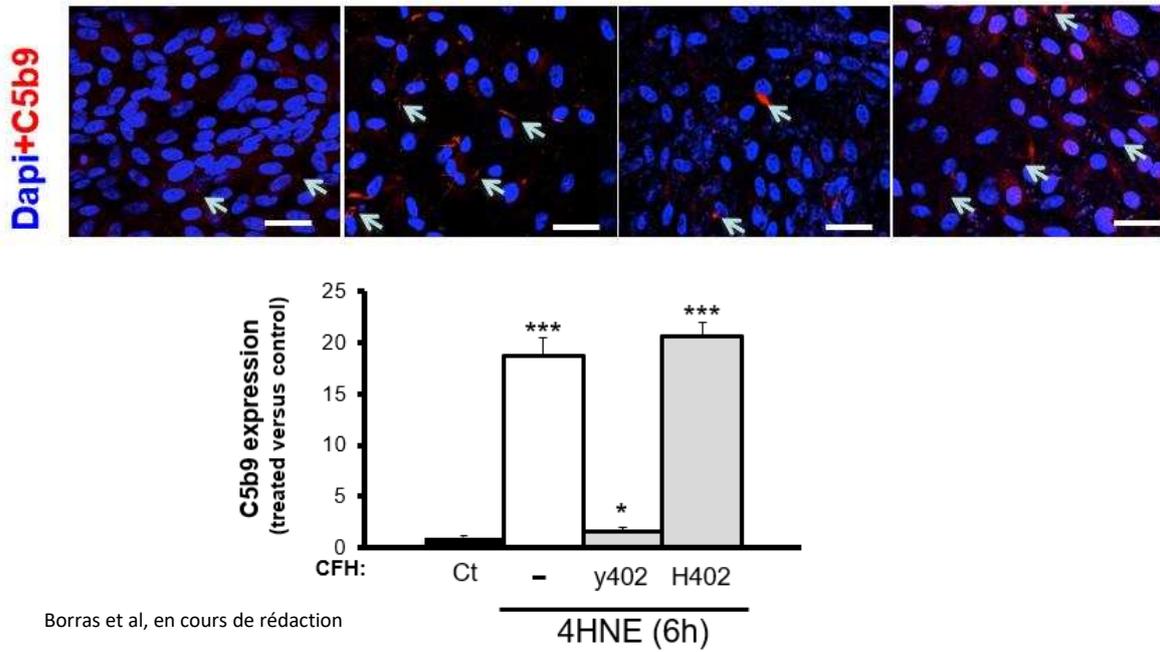
#### B) CFH et nécrose

Nos résultats montrent que le 4HNE induit un processus apoptotique des cellules de l'EPR, toutefois, rien ne montre qu'à cet effet ne s'ajoute une nécrose : ces deux processus apoptose et nécrose n'étant pas exclusifs. Les expériences sur l'étude de la nécrose dans ces conditions sont en cours et les résultats en attentes.

### V. **CFH, mort cellulaire et voie alterne du complément**

#### A) Formation du MAC et stress oxydant

Les fonctions du CFH ne se limitent pas à sa capacité de se fixer sur les membranes cellulaires. Ce facteur est aussi le principal inhibiteur de l'activation de la voie alterne du complément, et par conséquent, un régulateur de l'inflammation : processus étroitement lié au stress oxydant. Un des meilleurs moyens pour juger de l'activité inhibitrice du CFH sur l'activation de la VAC est de mesurer les taux de MAC s'accumulant suite à l'induction de stress oxydants. Nous avons alors, par des expériences d'immunofluorescence, localisé l'expression de MAC dans les différents groupes de culture : ARPE19 non traitées, traitées avec du 4HNE seul, co-traitées avec du 4HNE et du CFH rec. ou co-traitées avec du 4HNE et du CFH Y402H. Les doses de traitement de 4HNE et/ou de CFH et le temps de traitement sont respectivement de 30 $\mu$ M, 300nM et 6h.



**Fig. 49** : Mort cellulaire par activation de la voie du complément

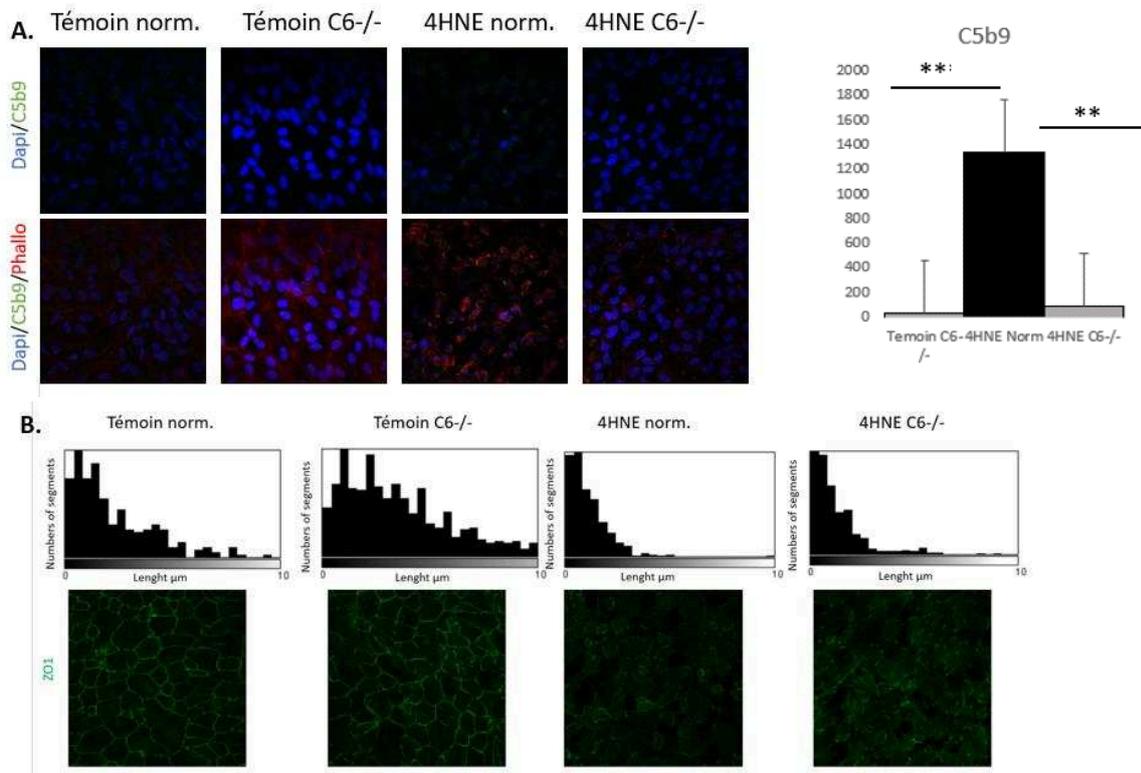
Analyse semi-quantitative de la production de MAC (rouge) à la suite de l'incubation des cellules de l'EPR durant 6 heures avec du CFH (300nM) et/ou du 4HNE (30μM). N=6, Analyse statistique réalisée par application du test de Student, considérée comme significative si  $p < 0,05$ . \*\*\* :  $p < 0,001$ ; \*\* :  $p < 0,01$  ; \* :  $p < 0,1$ . Echelle 10μm

Les cellules ARPE19 non traitées présentent un faible immunomarquage au C5b9 (MAC) contrairement aux cellules traitées au 4HNE seul qui présentent un marquage C5b9 très important autour des noyaux cellulaires (Fig. 49), suggérant que les cellules sont lysées. En revanche, le co-traitement 4HNE et CFH rec., montre un immunomarquage du C5b9 fortement réduit par rapport aux cellules traitées avec du 4HNE seul (Fig. 49). L'accumulation du C5b9 pour ce co-traitement est sensiblement identique à celui des cellules non traitées, avec la présence d'un faible immunomarquage localisé autour des noyaux cellulaires (Fig. 49). Pour ce qui est du co-traitement 4HNE et CFH Y402H, nous observons un fort immunomarquage de C5b9 localisée autour des noyaux cellulaires comme pour les cellules traitées avec du 4HNE seul (Fig. 49), montrant une inefficacité de cette forme de CFH.

**Ces résultats montrent que le traitement au 4HNE induit une forte expression de MAC dans les cellules de l'EPR suggérant une lyse cellulaire. Cependant, la présence de CFH limite cette lyse cellulaire en réduisant la concentration du MAC à des taux sub-lytiques. Là encore, le domaine CCP7 du CFH joue un rôle primordial dans cet effet, suggérant que cette activité du CFH passe par sa capacité à inhiber l'activation de la VAC au niveau des membranes et non pas en phase fluide.**

#### *B) Analyse des effets du MAC sur les jonctions serrées des cellules de l'EPR*

Précédemment, nous avons montré que le CFH était capable de maintenir, dans une certaine mesure, l'intégrité des jonctions serrées (ZO1) et du réseau des filaments d'actine (phalloïdine) des cellules de l'EPR soumises à un stress oxydant. Afin de déterminer si ces effets du CFH passent ou pas par l'inhibition de la formation du MAC, nous avons cultivé les cellules ARPE19 avec du sérum normal ou déplété en C6. Nos résultats montrent qu'en l'absence de C6 les cellules non traitées au 4HNE présentent un immunomarquage ZO1 et de la phalloïdine identique aux cellules cultivées avec du sérum complet (Fig. 50), démontrant que l'absence de ce facteur du complément n'altère pas la croissance des cellules. Cependant la combinaison, culture sans C6 et traitement au 4HNE, entraîne une désorganisation significative de ces deux immunomarquages ZO1 et phalloïdine identique à celle observée avec le traitement au 4HNE en présence de sérum complet (Fig. 50). La déplétion du facteur C6 ne protège pas la déstructuration des jonctions serrées induite par le 4HNE, démontrant alors que l'inhibition de la formation du MAC ne joue aucun rôle dans la protection dans ces structures cellulaires. **Le CFH protège donc les jonctions serrées des cellules de l'EPR soumises à un stress oxydant**



Borras et al, en cours de rédaction

**Fig. 50 :** Implication de la VAC dans la perte d'intégrité cellulaire lors d'un stress oxydant

**a-** Immunomarquage des ARPE19, après co-culture avec du CFH (300nM) et/ou 4HNE (30 $\mu\text{M}$ ) durant 6h et dans du milieu normal (DMEM/F12 sérum 5%) vs déplété en C6 (Sérum 5%) et analyse semi-quantitative du taux de dépôt de MAC dans ces conditions. **b-** analyse par macro de l'immunomarquage ZO1 des cellules dans les mêmes conditions. Les images sont obtenues à l'aide d'un microscope confocal par superposition de z stack. N=6. Analyse statistique réalisée par application du test de student considérée comme significative si  $p < 0,05$ . \*\*\* :  $p < 0,001$ ; \*\* :  $p < 0,01$  ; \* :  $p < 0,1$ . Echelle 10 $\mu\text{m}$

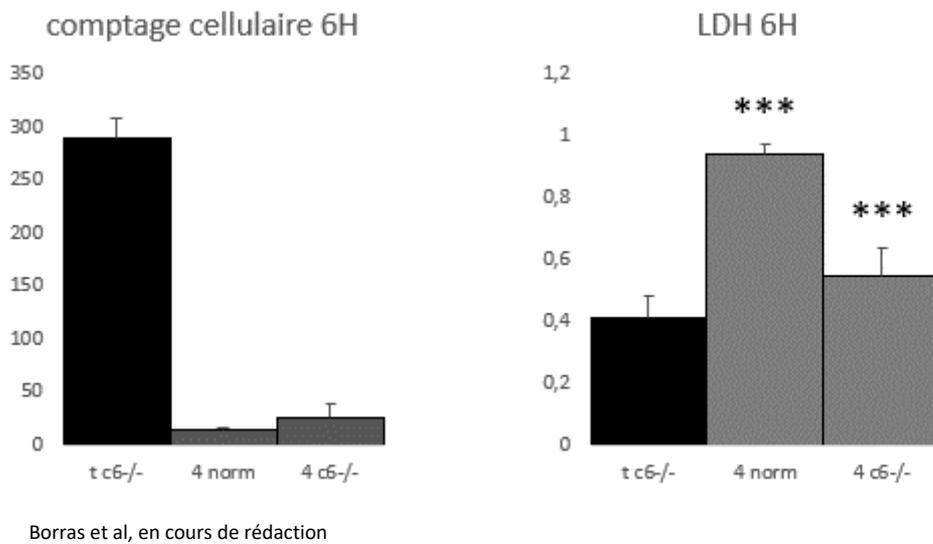
**certainement par liaison sur ces dernières et indépendamment de l'inhibition de la formation du MAC.**

En conclusion, le CFH préserve les jonctions serrées indépendamment de son activité d'inhibition de la formation du MAC, néanmoins qu'en est-il pour sa fonction sur la protection de la mort des cellules de l'EPR suite à un stress oxydant ?

C) *Analyse des effets du MAC sur la mort des cellules de l'EPR*

Nos précédents résultats montrent une mort des cellules de l'EPR provenant soit d'une entrée en apoptose ou soit d'une formation trop forte de MAC entraînant leur lyse. Une autre fonction du MAC, à des concentrations sublytiques, est de réguler l'activation de l'apoptose (Dejean et al., 2006; Peixoto et al., 2009). Aussi, afin de savoir si l'action protecteur du CFH sur l'apoptose passe ou pas par la formation du MAC, nous avons cultivé les cellules ARPE19 dans un milieu de culture déplété en C6 rendant alors impossible la formation du MAC. En effet, sans C6 les cellules ne peuvent pas mourir par lyse à cause du MAC mais le peuvent toujours par apoptose si ce processus n'est pas MAC dépendant. Par comptage cellulaire sur cellule de Malassez, nous montrons que l'absence de C6 réduit que de 28% la mort des cellules de l'EPR induite par le 4HNE (Fig. 51), démontrant que la formation excessive de MAC est en partie responsable, à elle seule, de la mort des cellules de l'EPR induite par le 4HNE. Toutefois, l'effet protecteur du CFH face à ce processus de mort n'est pas entièrement dépendant de l'inhibition de l'activation de la voie alterne du complément puisque seule une partie de la mort est abolie.

Nos résultats de LDH, preuve d'une mort par nécrose (lyse cellulaire), montrent que le 4HNE entraîne une augmentation très importante du taux de LDH par rapport aux cellules non traitées et cela en présence de sérum normal (Fig. 51). En revanche, l'utilisation du sérum déplété en C6 en plus du 4HNE réduit de façon significative le taux de LDH par rapport au taux observés de LDH du 4HNE en présence de sérum normal (Fig. 51). Ces données confirment une mort par lyse des cellules de l'EPR mais pas que par ce processus puisque toutes les cellules ne sont pas protégées. **En conclusion, nous montrons que l'effet protecteur du CFH vis-à-vis de la mort des cellules de l'EPR induite par un stress oxydant passe, non seulement, par sa capacité à inhiber la formation du MAC, mais également, par un autre processus indépendant de la régulation de la voie alterne du complément.**



**Fig. 51** : Implication de la VAC dans la mort cellulaire lors d'un stress oxydant

Comptage cellulaire et test de LDH réalisés sur des ARPE19 après co-culture durant 6 heures avec du CFH (300nM) et/ou du 4HNE (30 $\mu$ M). Une partie des cellules sont cultivées dans du sérum normal, l'autre, dans du sérum déplété en C6, molécule indispensable à la formation du MAC. Le comptage est réalisé après trypsination des cellules, sur lame de Malassez. N=9. Analyse statistique réalisée par application du test de student, considéré comme significative si  $p < 0,05$ . \*\*\* :  $p < 0,001$ ; \*\* :  $p < 0,01$  ; \* :  $p < 0,1$ . Echelle 10 $\mu$ m

## **VI. Mécanisme d'action du CFH suite à l'induction d'un stress oxydant**

Lors d'un stress oxydatif fort, les cellules de l'EPR sont fortement éprouvées. Lorsque le stress est trop intense, les cellules incapables d'y faire face vont mourir. Dans ces conditions, une activation de la VAC est mise en place et les cellules subissent une désorganisation des jonctions cellulaires associée à une désorganisation du réseau d'actine. Ce phénomène va entraîner une perte d'intégrité membranaire puis un arrêt des mitochondries conséquence du déclenchement de la mort cellulaire. Plusieurs morts sont observées, une mort due à la lyse par le MAC de la VAC. En effet celle-ci est activée et va permettre la formation du pont de lyse sur ces cellules. Une deuxième mort est observée par apoptose, ou la cascade moléculaire impliquant la caspase 3 et 9 va se mettre en place aboutissant à la mort des cellules de l'EPR. Dans ces conditions de stress, un ajout de CFH est capable de protéger les cellules de l'EPR de la mort. Le CFH, par liaison membranaire, va réguler l'activité de la VAC et protéger les jonctions serrées et le réseau d'actine de ces cellules. De ce fait l'intégrité du noyau est préservée et l'activité des mitochondries est conservée. De ce fait le CFH va freiner la mise en place de la mort par lyse, puisque le MAC n'est plus ou peu formé, et par apoptose.

La VAC est là encore un paramètre essentiel au maintien de l'intégrité des cellules de l'EPR, première cible de la DMLA. Etant donné que la régulation de celle-ci est moins bonne au cours de l'âge, ce déséquilibre pourrait expliquer la mise en place de la mort de l'EPR puis celle des photorécepteurs en réponses. Ces résultats accentuent le fait que le CFH, est une cible thérapeutique dans cette pathologie.



## DISCUSSION

---

La DMLA est une maladie multifactorielle devenue un réel enjeu de santé publique. En effet, cette pathologie qui présente deux formes, n'est traitée que pour sa forme minoritaire (néovasculaire) et de façon non curative. De plus, il existe de nombreuses limites au traitement actuellement en place (anti-VEGFs), comme des résistances sur le long terme avec la formation de régions atrophiques, mais aussi des résistances innées chez certains patients notamment ceux portant le polymorphisme Y402H du facteur H de la voie alterne du complément (Rasmussen et Sander, 2014 ; Kloeckener-gruissem et al., 2011 ; Brantley et al., 2007,2009). La DMLA est une pathologie encore mal connue dans sa mise en place et son développement, or les populations industrialisées font face à de plus en plus de personnes atteintes, c'est pourquoi il est indispensable, non seulement de trouver de nouvelles cibles thérapeutiques plus efficaces, mais également d'approfondir nos connaissances dans le développement de la pathogenèse. Le CFH, du fait de son lien génétique important avec le développement de la pathologie et son rôle dans l'inflammation, processus important impliqué dans la pathologie, est une cible thérapeutique potentielle de choix. C'est pourquoi, nous avons choisi de tester les effets d'une injection intravitréenne de CFH dans un modèle de néovascularisation choroïdienne mimant les principales caractéristiques de la forme néovasculaire de la DMLA : inflammation/angiogenèse/stress oxydants et mort cellulaire. Nous avons testé les effets du CFH recombinant humain et de ses fragments fournis par les docteurs Jorieux et Toufik du LFB de Lille. Nos résultats montrent clairement que le CFH réduit l'ensemble de ces différents processus à l'origine même du développement d'une DMLA, suggérant que le CFH peut être un traitement possible pour cette pathologie. Ces effets du CFH sont domaines dépendants. En effet, nous montrons que pour exercer son activité anti-angiogénique le CFH doit posséder dans tous les cas un domaine CCP7, porteur du polymorphisme Y402H, intact sans mutation. Ces données montrent l'importance de ce domaine, mais aussi, sont les prémices d'une explication du / des mécanisme(s) d'action du CFH dans la pathogenèse de la DMLA. En effet, pour être actif, le domaine CCP7 du CFH doit être couplé soit aux domaines CCP1-4, inhibiteur de l'activation de la VAC, soit aux domaines CCP19-20, sites renforçant avec les CCP6-8 la liaison du CFH sur les membranes cellulaires. Ces effets anti-angiogéniques du CFH sont, dans les deux cas, au moins aussi efficaces que ceux des anti-VEGFs actuellement donnés aux patients.



Concernant, les effets anti-inflammatoires du CFH dans le modèle CNV, ce facteur réduit à la fois la production de molécules anaphylactiques (C3a et C5a) très pro-inflammatoires mais aussi l'infiltration microgliale/macrophagique. Toutefois, pour exercer cette activité le CFH doit posséder absolument les domaines CCP1-4 couplés aux domaines de liaison CCP6-8 incluant le CCP7. Sans les domaines CCP1-4 et CCP7, le CFH n'exerce pas d'effet sur l'infiltration microgliale/macrophagique. **Ces données montrent clairement un effet de la régulation de la VAC sur le développement inflammatoire impliqué dans la pathogenèse de la DMLA.** De plus, sans le domaine CCP7 le CFH ne peut plus réduire l'infiltration microgliale/macrophagique démontrant l'importance de la liaison du CFH sur les membranes cellulaires pour réduire l'inflammation. L'inhibition de l'activation de la VAC semble donc passer par une action du CFH, au moins en partie, sur les membranes cellulaires et donc pas uniquement en phase fluide (plasmatique) comme cela peut être le cas pour réduire la production des C3a/C5a par clivage. En général, les processus angiogénique et inflammatoire sont liés dans le développement de la pathologie. Or, nous montrons ici, avec nos résultats, qu'il est possible de réduire l'angiogenèse, sans pour autant, réduire les phénomènes inflammatoires liés. Un des mécanismes d'action du CFH, pour son activité anti-angiogénique seule, passe par la régulation du taux de TSP1 présent sur le site de lésion. De plus, nous montrons, pour la première fois, que la concentration de TSP1 présent sur site est dépendant de l'infiltration microgliale/macrophagique qui inhibe sa production. En effet, la simple présence de cellules inflammatoires sur le site de lésion entraîne une diminution importante de TSP1, favorisant ainsi l'angiogenèse puisque ce facteur est un anti-angiogénique. Cependant, cette inhibition de TSP1 par les cellules microgliales/macrophagiques est levée en présence de CFH à condition que celui possède ses deux régions CCP6-8 et CCP19-20 de fixation aux GAGs des membranes cellulaires. Ces données suggèrent une liaison obligatoire du CFH sur les membranes de ces cellules inflammatoires. Deux hypothèses peuvent être alors émises : a- la première est que suite à la fixation du CFH sur les membranes, les cellules microgliales/macrophagiques vont se mettre à synthétiser elles-mêmes de la TSP1 qui, sans ce signal membranaire, n'était pas synthétisée ; et b- la deuxième hypothèse est que cette néosynthèse de TSP1 pourrait provenir des cellules de l'EPR qui la synthétise. Pour cette dernière hypothèse, l'infiltration microgliale/macrophagique sur le site de lésion serait à l'origine d'une sécrétion d'un facteur qui, lui, irait inhiber la synthèse de TSP1 par les cellules de l'EPR. Ces deux hypothèses ne sont pas exclusives l'une de l'autre. Afin, de valider ces hypothèses des expériences de binding sont actuellement mises en œuvre par le LFB. En effet, des macrophages sont mis en culture en présence ou pas de CFH rec. ou de CFH7-20 ou de CFHY402H afin de regarder si l'apport de



ces fragments modifie la sécrétion des macrophages préalablement activés, et si oui quelles sont ces modifications. Ces dernières peuvent concerner une molécule capable d'aller modifier l'activité de synthèse des cellules de l'EPR ou bien simplement, une fois activées, et uniquement en fixant du CFH les macrophages peuvent se mettre elles-mêmes à sécréter de la TSP1. Ces expériences sont en cours de réalisation par le LFB. Ces résultats sont très importants afin de cibler la source de synthèse de TSP1 qui est la voie par laquelle le CFH exerce son activité anti-angiogénique dans le modèle CNV.

Le CFH permet également de réduire le stress oxydant dans le modèle CNV mais peut aussi protéger les cellules ARPE19 de la mort induite par ces derniers. Ces cellules sont une des premières cibles de la DMLA et notamment des stress oxydants s'accumulant au cours du vieillissement. La production grandissante de stress oxydants dans la rétine au niveau de l'interface choroïde-membrane de Bruch-cellules de l'EPR va altérer, dégrader la barrière hémato-rétinienne garant de l'intégrité de la rétine. Nous montrons que l'apport de CFH diminue l'accumulation de stress oxydant de type MDA, suggérant une protection de la barrière hémato-rétinienne de part une réduction de stress. Toutefois, il faudrait compléter nos résultats par un dosage du MDA par un test Elisa, et tester (tests Elisa et expériences d'immunofluorescence) d'autres stress oxydants induits dans la pathogenèse de la DMLA comme par exemple le 4HNE ou l'acroléine. Les expériences d'immunofluorescence, concernant le 4HNE et l'acroléine après injection de CFH rec. dans le vitré des rats/CNV, sont en cours au laboratoire et montrent d'ores et déjà une diminution de la surface immunomarquée pour le 4HNE et l'acroléine suite à une injection de CFH rec. Les autres fragments de CFH n'ayant pas encore été tous testés. Nous montrons, dans cette étude, que cette action anti-stress oxydant du CFH protège, non seulement, les jonctions serrées établies entre les cellules de l'EPR elles-mêmes, mais également, protège de la mort les cellules de l'EPR soumises à un stress oxydant de type 4HNE. Ainsi, par ces deux actions, le CFH permet de préserver comme il le peut l'intégrité de la barrière hémato-rétinienne dont les cellules de l'EPR font partie.

Le polymorphisme Y402H du CFH est LE facteur de risque de développer une des deux formes de la DMLA. Cet effet résulte du changement d'un acide aminé (chargé positivement contre un neutre) contenu dans le domaine CCP7 intervenant dans la capacité du CFH à se lier aux GAGs et à la CRP. Ainsi, cet échange peut limiter, voir supprimer, la fixation du CFH sur les GAGs et entraîner alors un changement du micro-environnement membranaire, avec par exemple une composition protéique de la membrane cellulaire différente avec plus de formation de MAC entraînant un risque plus élevé de lyse cellulaire. Par une fixation non efficace ou



absente, le CFH ne peut plus jouer son rôle de régulateur de la formation de MAC, mais aussi, un rôle d'activateur ou d'inhibiteur de certaines voies de transduction indépendantes de la VAC, comme nous l'avons montré pour la mort cellulaire (caspases dépendantes) ou l'angiogenèse (sécrétion de TSP1). Au niveau inflammatoire, une mauvaise fixation du CFH peut également altérer son interaction avec la CRP et ainsi moduler différemment les réactions inflammatoires en découlant donc un microenvironnement différent. Dans la même optique, une conformation altérée du CFH, via cette mutation, peut rendre ce facteur moins actif au niveau de son activité anti-C3 convertase et ainsi laisser une fuite de production plus élevée des molécules très inflammatoires C3a et C5a. Comme dans toutes maladies, la modification du micro-environnement, telle qu'elle soit, peut être néfaste et faire basculer le « tissu » dans un processus pathologique. Une preuve d'un environnement inflammatoire modifié, chez les patients atteints de DMLA, est l'observation de l'accumulation des protéines du complément dans les drusen (Baudouin et al., 1992; Hageman et al., 2001). La modification de ce micro-environnement cellulaire et plasmatique, résultant du polymorphisme Y402H du CFH, peut avoir des conséquences graves. En effet, un dysfonctionnement de la voie du complément peut aboutir à la formation du MAC ce qui, à de fortes quantités, peut lyser les cellules l'exprimant, mais aussi, induire sécrétion plus élevée de VEGF, telle est le cas des cellules endothéliales. De part tous ces effets mentionnés ci-dessus, le polymorphisme Y402 du CFH semble être un facteur aggravant dans la DMLA par la mise en place d'un micro-environnement inflammatoire/angiogénique/stress oxydants/mort cellulaire élevé et favorable au développement de cette pathologie. Toutefois, toutes ces hypothèses du mécanisme d'action du CFH Y402H doivent être vérifiées pour être validées. Cependant, l'accumulation, au niveau de la membrane de Bruch de patients atteints de DMLA de lipides, de protéines inflammatoires et l'infiltration excessive de macrophages et microglies sont en faveur de ces hypothèses. Les mécanismes d'action du CFHY402H peuvent être diverses mais pas exclusifs, et font alors de cette mutation le facteur de risque de développer une des deux formes de la DMLA puisqu'il intervient dans chacun des processus impliqués dans le développement de cette pathologie.

En résumé nos résultats nous permettent d'établir un possible mécanisme d'action du CFH dans la pathogenèse de la forme néovasculaire de la DMLA. En effet, chez les personnes non atteintes le CFH est exprimé à des concentrations constantes et normales permettant de réguler l'activation de la VAC. Lorsque la pathologie apparaît, on observe une baisse de production de CFH endogène (Fig. 29) qui entraîne une diminution d'expression du facteur anti-angiogénique PEDF (Fig. 35-37, Tableau 3). Cette baisse de PEDF entrainerait une



diminution de synthèse du facteur anti-angiogénique TSP1 (Farnoodian et al., 2015 ; Guan et al., 2004), favorisant alors un processus pro-angiogénique. De même, lorsque la DMLA se met en place, une forte infiltration microgliale/macrophagique apparaît inhibant alors la production de TSP1 (Fig. 38), cet effet est additif à celle observée par la baisse de production du CFH endogène (Fig. 38). Ces deux processus favoriseraient une angiogenèse alors non contrôlée d'où un versant pathologique.

L'apport de CFH exogène (CFH rec. ou CFH7-20), au moment même où la concentration de CFH endogène diminue, va, quant à lui, augmenter la production de PEDF (Tableau 3, Fig. 39), qui va lui-même pouvoir augmenter celle de la TPS1 (Farnoodian et al., 2015 ; Guan et al., 2004), entraînant un effet anti-angiogénique. Parallèlement, le CFH va lever l'inhibition de production de la TPS1 par les macrophages/microglies (Fig. 37) soit en se liant sur les membranes de ces cellules (CFH rec. ou CFH7-20), soit en inhibant leur infiltration via l'inactivation de la VAC associée à l'inhibition de l'expression des protéines CCL2/CCR2 responsables de l'arrivée des cellules inflammatoires sur site (CFH rec. uniquement). Ces deux effets additifs, et induits par le CFH exogène, vont entraîner une augmentation de la concentration endogène de TSP1 réduisant alors l'angiogenèse. De façon intéressante, nous montrons, par nos expériences de qPCR, une diminution de l'expression du transcrit *cfh* endogène suite à l'apport exogène de ce facteur (Tableau 3), suggérant la nécessité de réguler l'expression du CFH endogène afin de ne pas bloquer la VAC à long terme. Cette diminution du transcrit *cfh* peut s'expliquer par un fort taux de TSP1 qui peut induire l'expression du miRNA146 démontré comme un inhibiteur de l'expression du transcrit *cfh* (Pogue et al., 2009 ; Fig. 39).

Lorsque le CFH possède le polymorphisme Y402H, il n'est plus en mesure d'induire la production de PEDF (Tableau 3, Fig. 39), ni même de lever l'inhibition de la TPS1 par les macrophages/microglies (Tableau 3, Fig. 39). De ce fait, il n'y a pas de réduction des mécanismes d'angiogenèse. De plus, le CFHY402H ne régule plus la VAC, qui continue fortement à produire du C3b/C3a, C5a et du CCL2 permettant à un micro-environnement inflammatoire de s'installer.

**Nos travaux nous ont donc permis de confirmer que le CFH est une bonne cible thérapeutique, non seulement parce qu'il possède un rôle bénéfique en réduisant tous les processus impliqués dans la DMLA, mais aussi, parce qu'il s'agit d'ajouter dans**



**l'organisme, une protéine naturellement exprimée et non pas de retirer un élément de la voie du complément qui est nécessaire au fonctionnement du système immunitaire.**

### **Vers une nouvelle thérapie ?**

La thérapeutique actuelle est basée sur la suppression par « piégeage » du VEGF, molécule neurotrophique et angiogénique naturellement exprimée dans l'œil. Pourtant la fonction de la rétine est dépendante d'une vascularisation spécifique maintenue au cours de la vie par le VEGF (Strauss et al., 2005 ; Keir et al., 2017). De plus, ce facteur joue un rôle neurotrophique non négligeable pour les photorécepteurs (Strauss et al., 2005). L'injection intravitréenne d'anti-VEGFs, le traitement gold standard de la DMLA, entraîne une diminution de l'expression de CFH (Keir et al., 2017), suggérant alors une activation de la voie alterne du complément non contrôlée ce qui a été montré comme un facteur aggravant de la DMLA (Crabb et al., 2002 ; Mullins et al., 2014 ; Anderson et al., 2010). Ces données prises dans leur ensemble pourraient expliquer pourquoi l'injection répétée d'anti-VEGFs entraîne une résistance à ce traitement et des atrophies, certainement dues à des fonctions salutaires et nécessaires du VEGF mais inhibées par le traitement sur le long terme. Notre étude montre, sans ambiguïté, que le CFH est un facteur capable de réduire l'ensemble des processus impliqués dans la DMLA, sans pour autant nuire à la survie du tissu rétinien. Toutefois, une interrogation est le devenir de l'accumulation du C3 due à l'apport d'une quantité excessive de CFH. En effet, le CFH va naturellement inhiber le clivage du C3 circulant qui va alors s'accumuler sur les membranes cellulaires (cellules de l'EPR), comme le montrent nos résultats. Le problème de cette accumulation est une possible toxicité, voire même un dépôt de C3 capable de s'activer à la moindre diminution de production de CFH ce qui entrainerait des réactions inflammatoires aiguës et ne pouvant plus être contrôlées. Afin d'identifier les effets d'une accumulation de C3, suite à un apport excessif de CFH, nous allons injecter dans le vitré de rats soumis au modèle CNV du CFH puis en observer les effets plusieurs mois après. Ainsi, après des délais allant de 1 mois à 6 mois, nous pourrions voir 1- s'il y a toujours un dépôt de C3 après 1 à 6 mois post-injection, ou cette concentration est-elle régulée par le tissu lui-même, et 2- au cas où ce dépôt persisterait quels en seraient les effets sur le long terme sur l'inflammation ou sur la mort pour les cellules les présentant (cellules de l'EPR essentiellement).

De même, il va être important de voir quels seraient les effets d'un apport exogène de CFH sur les patients portant le polymorphisme Y402H. Effectivement l'expression endogène



de ce facteur muté pourrait interférer avec les taux exogènes de CFH et entrer en compétition par exemple de liaison sur les GAGs par les domaines CCP19-20 et dans une moindre mesure par les domaines CCP6-8 : ces apports devront-ils être identiques pour tous les patients ? mêmes ceux portant ce polymorphisme ? Il serait alors intéressant de comparer les effets sur l'inflammation/l'angiogenèse/le stress oxydant et la mort cellulaire d'un apport de CFH dans le vitré de souris exprimant de façon endogène le CFHY402H et soumises au modèle CNV. Ainsi, plusieurs concentrations pourraient être testées et voir s'il y a des interférences de fonction, par compétition, entre l'apport exogène d'un CFH normal et actif avec l'expression endogène d'un CFH Y402H. Ces souris peuvent être obtenus par la technique CRISPR-CAS9 dans un délai raisonnable de 3 mois (le Dr. Dinet est d'ores et déjà en contact avec les plateformes animalerie possédant cette technologie). L'utilisation d'un nouveau traitement pour les patients porteurs du polymorphisme Y402H est absolument nécessaire premièrement parce que le traitement actuel est inefficaces pour eux, et deuxièmes parce que l'utilisation d'anti-VEGFs chez ces personnes entraîne l'activation des cellules endothéliales (Keir et al., 2017), donc dans un micro-environnement où la néovascularisation est déjà pathologique. Un traitement par des anti-VEGFs n'est alors pas du tout envisageable pour eux une autre piste doit être exploré.

A ce problème conséquent pour cette catégorie de patients, s'ajoute des risques d'hématomes maculaires survenant à la suite d'injection répétées d'anti-VEGFs dans le cadre d'un traitement de la DMLA. Or, une étude rétrospective a montré que l'apparition d'hématomes maculaires pouvait favoriser les déchirures de l'EPR et provoquer des larges décollements rétinien (Baeteman et al., 2009). L'injection d'anti-VEGFs serait alors directement responsable d'une rétraction de la plaque vasculaire entraînant des dysfonctionnements physiologiques (Baeteman et al., 2009).

À la vue du rôle de la VAC dans la pathogenèse de la DMLA, plusieurs essais cliniques basés sur la suppression ou le blocage d'un composant de cette voie immunitaire ont été menés mais malheureusement ont abouti à des échecs thérapeutiques (étude « Mahalo », Tableau 1). Les molécules testées comme médicament étaient exclusivement soit des activateurs de la VAC (CFD) ou soit des molécules circulantes nécessaires à son activation (C3 et C5). L'inhibition des fonctions de ces molécules peut être trop drastique et conduire à une interruption totale de la VAC et donc exposer les patients à un déficit immunitaire. Cela pourrait expliquer pourquoi les essais thérapeutiques ont échoué. Ce qui fait la force d'une thérapeutique basée sur l'ajout d'un inhibiteur de la VAC comme le CFH, dont la production semble diminuée dans la DMLA,



est justement de ne pas bloquer drastiquement l'activation de la VAC par inhibition fonctionnelle de molécules activatrices, mais essayer de retrouver un équilibre inflammatoire sans la supprimer totalement. Un co-traitement CFH et anti-VEGFs pourrait être envisagé. En effet, l'injection d'anti-VEGFs supplémenter au CFH, permettrait de jouer sur les différents fronts de la DMLA et peut être d'obtenir plus rapidement une régression de la pathologie, peut-être à définir en fonction du patient : porteur ou pas du polymorphisme Y402H du CFH.

Le traitement actuel pâti également du fait que son administration soit très contraignante, puisqu'il s'agit d'une injection mensuelle dans l'œil. Pour améliorer la prise en charge et alléger la contrainte de ce traitement, tout en l'améliorant, une alternative serait une production de CFH continue sur une durée d'environ 4 à 5 mois à l'aide d'une technique innovante : l'électrotransfert du muscle ciliaire. Cette voie de délivrance thérapeutique est à l'étude par le Pr. Francine Behar-Cohen qui en détient le brevet d'exploitation. Le muscle ciliaire étant facile d'accès, l'introduction d'un ADN plasmidique non viral contenant le gène codant pour la molécule médicament à tester est facilitée. Ce système consiste à créer un champ électrique pour que le plasmide passe dans le tissu. Cette technique permet alors la diffusion d'une protéine jusqu'à 5 mois après un électrotransfert du muscle ciliaire (Touchard et al., 2012). L'électrotransfert peut parfaitement être mis en place, dans le cadre du CFH ou un de ses fragments, ce qui permettrait de produire in vivo la protéine par un tissu rétinien et donc se rapprocher de sa synthèse endogène avec les mêmes modifications post-traductionnelles. Par contre, resterait à définir quelle forme de CFH utiliser. En effet, d'après nos résultats la forme entière du CFH est nécessaire pour protéger les cellules de l'EPR des effets délétères des stress oxydants, ce fragment de CFH serait alors idéal pour traiter la forme atrophique de la DMLA. En revanche, pour la forme néovasculaire le fragment CFH1-7 serait plus indiqué étant donné qu'il possède les mêmes effets thérapeutiques que la forme entière. De plus, étant donné sa taille plus petite, il diffuserait plus facilement, mais en revanche, il devrait certainement avoir une demi-vie plus courte que le fragment de CFH entier.

#### IIII- Voie du complément et autres pathologies

Notre étude, permet également, de mettre en relief un mécanisme d'action du CFH, nous éclairant davantage sur les mécanismes des maladies dans lesquelles la VAC peut être impliquée, comme notamment les maladies rénales ou la maladie d'Alzheimer.



## A-Syndrome urémique atypique / glomérulopathie proliférative

En effet, le CFH est fortement lié, lorsqu'il est muté, à de graves maladies rénales comme la glomérulopathie ou le syndrome urémique atypique (SHUa). Dans ces deux pathologies, des associations symptômes/polymorphismes, ont montré l'implication du CFH. Dans le cas de la SHUa, la suractivation de la VAC est responsable de la lyse des cellules endothéliales (Malina et al., 2012). Ces dernières ne sont plus protégées par le CFH qui est inactif. En effet, à cette pathologie est associée une mutation du CFH dans ses domaines CCP19-20 l'empêchant alors de se lier sur les cellules endothéliales et ainsi ne les protège plus de la formation excessive du MAC et donc de la lyse. En revanche, le polymorphisme Y402H du CFH n'a pas d'incidence et n'empêche pas la protection des cellules endothéliales. Ces données montrent bien une fonction des domaines du CFH tissu dépendant.

Dans le cas des glomérulopathies prolifératives, la VAC est suractivée en phase fluide entraînant alors de nombreuses molécules C3a et C5a et, par conséquent, une inflammation aiguë (Malina et al., 2012 ;Józsi et al., 2014). De plus, de nombreux dépôts de C3 sont observés sur les podocytes du rein qui sont, en quelque sorte, les homologues des cellules de l'EPR de la rétine. Dans ces pathologies on retrouve souvent une mutation du CFH dans ses domaines CCP1-4 responsables de la régulation de l'activation de la VAC d'où sa suractivation. Par contre, aucune corrélation entre mutation du CFH/glomérulopathie/DMLA n'a été observée

## B- Maladie d'Alzheimer :

Nos travaux, nous ont permis de mettre en évidence, l'importance travail du CFH dans la pathogenèse de la DMLA et de son pouvoir thérapeutique dans cette même maladie. Or, La maladie d'Alzheimer (MA) et la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) sont toutes les deux des dégénérescences inflammatoires complexes et progressives du néocortex humain et de la rétine. Comme pour la DMLA, il existe plusieurs polymorphismes du CFH associés à la maladie d'Alzheimer. En effet, une étude a montré que les polymorphismes rs1061170 et rs800292 du CFH sont fortement associés au développement de la MA (Zhang et al., 2016). À cela s'ajoute le fait que le polymorphisme Y402H du CFH entraîne la mise en place d'un micro-environnement pro inflammatoire dans a DMLA. De plus, la présence de molécules du complément a été observé dans les plaques amyloïdes, en plus de l'amyloïde bêta (A $\beta$ ) (Aiyaz et al., 2012), suggérant une activation de la VAC. De plus, dans la MA comme la DMLA, le



taux endogène du CFH est diminué (Lukiw et al., 2012), suggérant là aussi une activation de la VAC participant alors à la formation d'un micro-environnement inflammatoire responsable de ces pathologies. L'A $\beta$  est une des principales molécules responsables de la dégénérescence des neurones dans la maladie d'Alzheimer. Or, il a été montré que l'A $\beta$  est capable de se lier au CFI entrant donc directement en compétition avec le CFH (Liu et al., 2013b; Matsubara et al., 2009). Pris dans leur ensemble, ces données suggèrent un lien étroit entre A $\beta$  / CFH et micro-environnement inflammatoire. Les avancées sur la compréhension des mécanismes d'action du CFH dans les neurodégénérescences inflammatoires, type MA et DMLA, pourraient permettre de caractériser les interactions entre les molécules impliquées dans la pathogenèse de ces maladies et ainsi d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques pour les traiter.



## BIBLIOGRAPHIE

---

Aase, K., von Euler, G., Li, X., Pontén, A., Thorén, P., Cao, R., Cao, Y., Olofsson, B., Gebre-Medhin, S., Pekny, M., et al. (2001). Vascular endothelial growth factor-B-deficient mice display an atrial conduction defect. *Circulation* 104, 358–364.

Abarrategui-Garrido, C., Martínez-Barricarte, R., López-Trascasa, M., de Córdoba, S.R., and Sánchez-Corral, P. (2009). Characterization of complement factor H-related (CFHR) proteins in plasma reveals novel genetic variations of CFHR1 associated with atypical hemolytic uremic syndrome. *Blood* 114, 4261–4271.

Adams, R.H., and Alitalo, K. (2007). Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 464–478.

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. *Arch. Ophthalmol.* 119, 1417–1436.

Aiyaz, M., Lupton, M.K., Proitsi, P., Powell, J.F., and Lovestone, S. (2012). Complement activation as a biomarker for Alzheimer's disease. *Immunobiology* 217, 204–215.

Allikmets, R. (2000). Further evidence for an association of ABCR alleles with age-related macular degeneration. The International ABCR Screening Consortium. *Am. J. Hum. Genet.* 67, 487–491.

Allikmets, R., Shroyer, N.F., Singh, N., Seddon, J.M., Lewis, R.A., Bernstein, P.S., Peiffer, A., Zabriskie, N.A., Li, Y., Hutchinson, A., et al. (1997). Mutation of the Stargardt disease gene (ABCR) in age-related macular degeneration. *Science* 277, 1805–1807.

de Almeida, N.A., and de Souza, O.F. (2018). Early changes in macular optical coherence tomography parameters after Ranibizumab intravitreal injection in patients with exsudative age-related macular degeneration. *Int J Retina Vitreous* 4, 5.

Amano, S., Rohan, R., Kuroki, M., Tolentino, M., and Adamis, A.P. (1998). Requirement for vascular endothelial growth factor in wound- and inflammation-related corneal neovascularization. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 39, 18–22.



Ambati, J., Anand, A., Fernandez, S., Sakurai, E., Lynn, B.C., Kuziel, W.A., Rollins, B.J., and Ambati, B.K. (2003). An animal model of age-related macular degeneration in senescent Ccl-2- or Ccr-2-deficient mice. *Nat. Med.* 9, 1390–1397.

Anand, A., Sharma, N.K., Gupta, A., Prabhakar, S., Sharma, S.K., Singh, R., and Gupta, P.K. (2012). Single nucleotide polymorphisms in MCP-1 and its receptor are associated with the risk of age related macular degeneration. *PLoS ONE* 7, e49905.

Anderson, D.H., Radeke, M.J., Gallo, N.B., Chapin, E.A., Johnson, P.T., Curletti, C.R., Hancox, L.S., Hu, J., Ebright, J.N., Malek, G., et al. (2010). The pivotal role of the complement system in aging and age-related macular degeneration: hypothesis re-visited. *Prog Retin Eye Res* 29, 95–112.

Ando, A., Yang, A., Nambu, H., and Campochiaro, P.A. (2002). Blockade of nitric-oxide synthase reduces choroidal neovascularization. *Mol. Pharmacol.* 62, 539–544.

Aredo, B., Li, T., Chen, X., Zhang, K., Wang, C.X.-Z., Gou, D., Zhao, B., He, Y., and Ufret-Vincenty, R.L. (2015). A chimeric Cfh transgene leads to increased retinal oxidative stress, inflammation, and accumulation of activated subretinal microglia in mice. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 56, 3427–3440.

Ausprunk, D.H., Knighton, D.R., and Folkman, J. (1974). Differentiation of vascular endothelium in the chick chorioallantois: a structural and autoradiographic study. *Dev. Biol.* 38, 237–248.

Avery, R.L., Castellarin, A.A., Steinle, N.C., Dhoot, D.S., Pieramici, D.J., See, R., Couvillion, S., Nasir, M.A., Rabena, M.D., Le, K., et al. (2014). Systemic pharmacokinetics following intravitreal injections of ranibizumab, bevacizumab or aflibercept in patients with neovascular AMD. *Br J Ophthalmol* 98, 1636–1641.

Baas, D.C., Ho, L., Ennis, S., Merriam, J.E., Tanck, M.W.T., Uitterlinden, A.G., de Jong, P.T.V.M., Cree, A.J., Griffiths, H.L., Rivadeneira, F., et al. (2010). The complement component 5 gene and age-related macular degeneration. *Ophthalmology* 117, 500–511.

Baeteman, C., Hoffart, L., Galland, F., Ridings, B., and Conrath, J. (2009). [Subretinal hemorrhage after intravitreal injection of anti-VEGF for age-related macular degeneration: a retrospective study]. *J Fr Ophtalmol* 32, 309–313.



- Baird, P.N., Guida, E., Chu, D.T., Vu, H.T.V., and Guymer, R.H. (2004). The epsilon2 and epsilon4 alleles of the apolipoprotein gene are associated with age-related macular degeneration. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 45, 1311–1315.
- Ballinger, S.W., Van Houten, B., Jin, G.F., Conklin, C.A., and Godley, B.F. (1999). Hydrogen peroxide causes significant mitochondrial DNA damage in human RPE cells. *Exp. Eye Res.* 68, 765–772.
- Baudouin, C., Peyman, G.A., Fredj-Reygrobellet, D., Gordon, W.C., Lapalus, P., Gastaud, P., and Bazan, N.G. (1992). Immunohistological study of subretinal membranes in age-related macular degeneration. *Jpn J Ophthalmol* 36, 443–451.
- Bazan, J.F., Bacon, K.B., Hardiman, G., Wang, W., Soo, K., Rossi, D., Greaves, D.R., Zlotnik, A., and Schall, T.J. (1997). A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif. *Nature* 385, 640–644.
- Behar-Cohen, F., Martinsons, C., Viénot, F., Zissis, G., Barlier-Salsi, A., Cesarini, J.P., Enouf, O., Garcia, M., Picaud, S., and Attia, D. (2011). Light-emitting diodes (LED) for domestic lighting: any risks for the eye? *Prog Retin Eye Res* 30, 239–257.
- Bellmann, C., and Sahel, J.-A. (2008). Aspects pathogéniques de la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA). </data/revues/01815512/00300HS1/11/>.
- Bhutto, I.A., Baba, T., Merges, C., Juriasinghani, V., McLeod, D.S., and Luty, G.A. (2011). C-reactive protein and complement factor H in aged human eyes and eyes with age-related macular degeneration. *Br J Ophthalmol* 95, 1323–1330.
- Bienert, G.P., Møller, A.L.B., Kristiansen, K.A., Schulz, A., Møller, I.M., Schjoerring, J.K., and Jahn, T.P. (2007). Specific aquaporins facilitate the diffusion of hydrogen peroxide across membranes. *J. Biol. Chem.* 282, 1183–1192.
- Bigé, N., Boffa, J.-J., Lepeyre, F., and Shweke, N. (2013). [Role of thrombospondin-1 in the development of kidney diseases]. *Med Sci (Paris)* 29, 1131–1137.
- Blackmore, T.K., Sadlon, T.A., Ward, H.M., Lublin, D.M., and Gordon, D.L. (1996). Identification of a heparin binding domain in the seventh short consensus repeat of complement factor H. *J. Immunol.* 157, 5422–5427.



Bohana-Kashtan, O., Ziporen, L., Donin, N., Kraus, S., and Fishelson, Z. (2004). Cell signals transduced by complement. *Mol. Immunol.* 41, 583–597.

Bonyadi, M., Jabbarpoor Bonyadi, M.H., Yaseri, M., Mohammadian, T., Fotouhi, N., Javadzadeh, A., and Soheilian, M. (2017). Joint association of complement component 3 and CC-cytokine ligand2 (CCL2) or complement component 3 and CFH polymorphisms in age-related macular degeneration. *Ophthalmic Genet.* 38, 365–370.

Bora, N.S., Kaliappan, S., Jha, P., Xu, Q., Sohn, J.-H., Dhaulakhandi, D.B., Kaplan, H.J., and Bora, P.S. (2006). Complement activation via alternative pathway is critical in the development of laser-induced choroidal neovascularization: role of factor B and factor H. *J. Immunol.* 177, 1872–1878.

Bora, P.S., Sohn, J.-H., Cruz, J.M.C., Jha, P., Nishihori, H., Wang, Y., Kaliappan, S., Kaplan, H.J., and Bora, N.S. (2005). Role of complement and complement membrane attack complex in laser-induced choroidal neovascularization. *J. Immunol.* 174, 491–497.

Bose, S., Kim, S., Oh, Y., Moniruzzaman, M., Lee, G., and Cho, J. (2016). Effect of CCL2 on BV2 microglial cell migration: Involvement of probable signaling pathways. *Cytokine* 81, 39–49.

Brantley, M.A., Edelstein, S.L., King, J.M., Apte, R.S., Kymes, S.M., and Shiels, A. (2007). Clinical phenotypes associated with the complement factor H Y402H variant in age-related macular degeneration. *Am. J. Ophthalmol.* 144, 404–408.

Brantley, M.A., Edelstein, S.L., King, J.M., Plotzke, M.R., Apte, R.S., Kymes, S.M., and Shiels, A. (2009). Association of complement factor H and LOC387715 genotypes with response of exudative age-related macular degeneration to photodynamic therapy. *Eye (Lond)* 23, 626–631.

Brault, M.S., and Kurt, R.A. (2005). Impact of Tumor-Derived CCL2 on Macrophage Effector Function. *J. Biomed. Biotechnol.* 2005, 37–43.

Bringmann, A., and Wiedemann, P. (2012). Müller glial cells in retinal disease. *Ophthalmologica* 227, 1–19.

Bry, M., Kivelä, R., Leppänen, V.-M., and Alitalo, K. (2014). Vascular endothelial growth factor-B in physiology and disease. *Physiol. Rev.* 94, 779–794.



Burns, R.P., and Feeney-Burns, L. (1980). Clinico-morphologic correlations of drusen of Bruch's membrane. *Trans Am Ophthalmol Soc* 78, 206–225.

Cai, J., Nelson, K.C., Wu, M., Sternberg, P., and Jones, D.P. (2000). Oxidative damage and protection of the RPE. *Progress in Retinal and Eye Research* 19, 205–221.

Cai, J., Jiang, W.G., Grant, M.B., and Boulton, M. (2006). Pigment epithelium-derived factor inhibits angiogenesis via regulated intracellular proteolysis of vascular endothelial growth factor receptor 1. *J. Biol. Chem.* 281, 3604–3613.

Calippe, B., Augustin, S., Beguier, F., Charles-Messance, H., Poupel, L., Conart, J.-B., Hu, S.J., Lavalette, S., Fauvet, A., Rayes, J., et al. (2017). Complement Factor H Inhibits CD47-Mediated Resolution of Inflammation. *Immunity* 46, 261–272.

Campa, C., Kasman, I., Ye, W., Lee, W.P., Fuh, G., and Ferrara, N. (2008). Effects of an anti-VEGF-A monoclonal antibody on laser-induced choroidal neovascularization in mice: optimizing methods to quantify vascular changes. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 49, 1178–1183.

Campistol, J.M., Arias, M., Ariceta, G., Blasco, M., Espinosa, M., Grinyó, J.M., Praga, M., Torra, R., Vilalta, R., and Rodríguez de Córdoba, S. (2013). An update for atypical haemolytic uraemic syndrome: diagnosis and treatment. A consensus document. *Nefrologia* 33, 27–45.

Campochiaro, P.A. (2013). Ocular neovascularization. *J. Mol. Med.* 91, 311–321.

Carmeliet, P., Moons, L., Luttun, A., Vincenti, V., Compernelle, V., De Mol, M., Wu, Y., Bono, F., Devy, L., Beck, H., et al. (2001). Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions. *Nat. Med.* 7, 575–583.

Carolina, N. Dolph 0. Adams and Thomas A. Hamilton. 38.

Cashman, S.M., Desai, A., Ramo, K., and Kumar-Singh, R. (2011). Expression of complement component 3 (C3) from an adenovirus leads to pathology in the murine retina. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 52, 3436–3445.

Chan, C.-C., Tuo, J., Bojanowski, C.M., Csaky, K.G., and Green, W.R. (2005). Detection of CX3CR1 single nucleotide polymorphism and expression on archived eyes with age-related macular degeneration. *Histol. Histopathol.* 20, 857–863.



Chang, C., and Werb, Z. (2001). The many faces of metalloproteases: cell growth, invasion, angiogenesis and metastasis. *Trends Cell Biol.* 11, S37-43.

Chen, M., Forrester, J.V., and Xu, H. (2007). Synthesis of complement factor H by retinal pigment epithelial cells is down-regulated by oxidized photoreceptor outer segments. *Exp. Eye Res.* 84, 635–645.

Chen, M., Muckersie, E., Robertson, M., Forrester, J.V., and Xu, H. (2008). Up-regulation of complement factor B in retinal pigment epithelial cells is accompanied by complement activation in the aged retina. *Exp. Eye Res.* 87, 543–550.

Chew, E.Y., Clemons, T.E., Agrón, E., Sperduto, R.D., Sangiovanni, J.P., Davis, M.D., Ferris, F.L., and Age-Related Eye Disease Study Research Group (2014). Ten-year follow-up of age-related macular degeneration in the age-related eye disease study: AREDS report no. 36. *JAMA Ophthalmol* 132, 272–277.

Chirco, K.R., Whitmore, S.S., Wang, K., Potempa, L.A., Halder, J.A., Stone, E.M., Tucker, B.A., and Mullins, R.F. (2016). Monomeric C-reactive protein and inflammation in age-related macular degeneration. *J. Pathol.* 240, 173–183.

Chou, W.-W., Wang, Y.-S., Chen, K.-C., Wu, J.-M., Liang, C.-L., and Juo, S.-H.H. (2012). Tannic acid suppresses ultraviolet B-induced inflammatory signaling and complement factor B on human retinal pigment epithelial cells. *Cell. Immunol.* 273, 79–84.

Clark, S.J., Bishop, P.N., and Day, A.J. (2010). Complement factor H and age-related macular degeneration: the role of glycosaminoglycan recognition in disease pathology. *Biochem. Soc. Trans.* 38, 1342–1348.

Clark, S.J., Schmidt, C.Q., White, A.M., Hakobyan, S., Morgan, B.P., and Bishop, P.N. (2014). Identification of factor H-like protein 1 as the predominant complement regulator in Bruch's membrane: implications for age-related macular degeneration. *J. Immunol.* 193, 4962–4970.

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. U.S.A.* 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.

de Córdoba, S.R., and de Jorge, E.G. (2008). Translational mini-review series on complement factor H: genetics and disease associations of human complement factor H. *Clin. Exp. Immunol.* 151, 1–13.

Coscas, G. (2011). *Œdèmes maculaires* (Paris: Springer Paris).

COUASNON, D., COBAST, E., HERVE, A., HAZIF, E.L., and LEGRAND, A.B. (2010). Prévention de la dégénérescence maculaire liée à l'âge. *e a* 29, 27.

Crabb, J.W., Miyagi, M., Gu, X., Shadrach, K., West, K.A., Sakaguchi, H., Kamei, M., Hasan, A., Yan, L., Rayborn, M.E., et al. (2002). Drusen proteome analysis: an approach to the etiology of age-related macular degeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 14682–14687.

da Cruz, L., Dorn, J.D., Humayun, M.S., Dagnelie, G., Handa, J., Barale, P.-O., Sahel, J.-A., Stanga, P.E., Hafezi, F., Safran, A.B., et al. (2016). Five-Year Safety and Performance Results from the Argus II Retinal Prosthesis System Clinical Trial. *Ophthalmology* 123, 2248–2254.

Curcio, C.A., and Millican, C.L. (1999). Basal linear deposit and large drusen are specific for early age-related maculopathy. *Arch. Ophthalmol.* 117, 329–339.

Dawson, D.W., Volpert, O.V., Gillis, P., Crawford, S.E., Xu, H., Benedict, W., and Bouck, N.P. (1999). Pigment epithelium-derived factor: a potent inhibitor of angiogenesis. *Science* 285, 245–248.

De La Paz, M.A., Guy, V.K., Abou-Donia, S., Heinis, R., Bracken, B., Vance, J.M., Gilbert, J.R., Gass, J.D., Haines, J.L., and Pericak-Vance, M.A. (1999). Analysis of the Stargardt disease gene (ABCR) in age-related macular degeneration. *Ophthalmology* 106, 1531–1536.

Decanini, A., Nordgaard, C.L., Feng, X., Ferrington, D.A., and Olsen, T.W. (2007). Changes in select redox proteins of the retinal pigment epithelium in age-related macular degeneration. *Am. J. Ophthalmol.* 143, 607–615.

Dejean, L.M., Martinez-Caballero, S., Manon, S., and Kinnally, K.W. (2006). Regulation of the mitochondrial apoptosis-induced channel, MAC, by BCL-2 family proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1762, 191–201.



- Delcourt, C., Cristol, J.P., Tessier, F., Léger, C.L., Descomps, B., and Papoz, L. (1999). Age-related macular degeneration and antioxidant status in the POLA study. POLA Study Group. *Pathologies Oculaires Liées à l'Age. Arch. Ophthalmol.* 117, 1384–1390.
- Delori, F.C., Goger, D.G., and Dorey, C.K. (2001). Age-related accumulation and spatial distribution of lipofuscin in RPE of normal subjects. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 42, 1855–1866.
- Deshmane, S.L., Kremlev, S., Amini, S., and Sawaya, B.E. (2009). Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. *J. Interferon Cytokine Res.* 29, 313–326.
- Despriet, D.D.G., Klaver, C.C.W., Witteman, J.C.M., Bergen, A.A.B., Kardys, I., de Maat, M.P.M., Boekhoorn, S.S., Vingerling, J.R., Hofman, A., Oostra, B.A., et al. (2006). Complement factor H polymorphism, complement activators, and risk of age-related macular degeneration. *JAMA* 296, 301–309.
- Dhondt, J., Peeraer, E., Verheyen, A., Nuydens, R., Buyschaert, I., Poesen, K., Van Geyte, K., Beerens, M., Shibuya, M., Haigh, J.J., et al. (2011). Neuronal FLT1 receptor and its selective ligand VEGF-B protect against retrograde degeneration of sensory neurons. *FASEB J.* 25, 1461–1473.
- Dick, A.D. (2017). Doyné lecture 2016: intraocular health and the many faces of inflammation. *Eye (Lond)* 31, 87–96.
- Dinet, V., An, N., Ciccotosto, G.D., Bruban, J., Maoui, A., Bellingham, S.A., Hill, A.F., Andersen, O.M., Nykjaer, A., Jonet, L., et al. (2011). APP involvement in retinogenesis of mice. *Acta Neuropathol.* 121, 351–363.
- Dinet, V., Ciccotosto, G.D., Delaunay, K., Borrás, C., Ranchon-Cole, I., Kostic, C., Savoldelli, M., El Sanharawi, M., Jonet, L., Pirou, C., et al. (2016). Amyloid Precursor-Like Protein 2 deletion-induced retinal synaptopathy related to congenital stationary night blindness: structural, functional and molecular characteristics. *Mol Brain* 9, 64.
- Do, D.V., Bressler, S.B., Cassard, S.D., Gower, E.W., Tabandeh, H., Jefferys, J.L., and Bressler, N.M. (2014). Ranibizumab for macular telangiectasia type 2 in the absence of subretinal neovascularization. *Retina (Philadelphia, Pa.)* 34, 2063–2071.



Dot, C., Behar-Cohen, F., BenEzra, D., Doat, M., Jonet, L., May, F., and Jeanny, J.C. (2007). Influence of triamcinolone intravitreal injection on retinochoroidal healing processes. *Exp. Eye Res.* 84, 1081–1089.

Dot, C., Parier, V., Behar-Cohen, F., Benezra, D., Jonet, L., Goldenberg, B., Picard, E., Camelo, S., de Kozak, Y., May, F., et al. (2009). Influence of age on retinochoroidal healing processes after argon photocoagulation in C57bl/6j mice. *Mol. Vis.* 15, 670–684.

Dragon-Durey, M.-A., Blanc, C., Marliot, F., Loirat, C., Blouin, J., Sautes-Fridman, C., Fridman, W.H., and Frémeaux-Bacchi, V. (2009). The high frequency of complement factor H related CFHR1 gene deletion is restricted to specific subgroups of patients with atypical haemolytic uraemic syndrome. *J. Med. Genet.* 46, 447–450.

Dryja, T.P. (1998). ABCR Gene and Age-Related Macular Degeneration. *Science* 279, 1107a – 1107.

van Duijn, C.M., de Knijff, P., Cruts, M., Wehnert, A., Havekes, L.M., Hofman, A., and Van Broeckhoven, C. (1994). Apolipoprotein E4 allele in a population-based study of early-onset Alzheimer's disease. *Nat. Genet.* 7, 74–78.

Dunaief, J.L., Dentchev, T., Ying, G.-S., and Milam, A.H. (2002). The role of apoptosis in age-related macular degeneration. *Arch. Ophthalmol.* 120, 1435–1442.

Eberhardt, H.U., Buhlmann, D., Hortschansky, P., Chen, Q., Böhm, S., Kemper, M.J., Wallich, R., Hartmann, A., Hallström, T., Zipfel, P.F., et al. (2013). Human factor H-related protein 2 (CFHR2) regulates complement activation. *PLoS ONE* 8, e78617.

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

Eichler, W., Yafai, Y., Keller, T., Wiedemann, P., and Reichenbach, A. (2004). PEDF derived from glial Müller cells: a possible regulator of retinal angiogenesis. *Exp. Cell Res.* 299, 68–78.

Elman, M.J., Fine, S.L., Murphy, R.P., Patz, A., and Auer, C. (1986). The natural history of serous retinal pigment epithelium detachment in patients with age-related macular degeneration. *Ophthalmology* 93, 224–230.



Esparza-Gordillo, J., Soria, J.M., Buil, A., Almasy, L., Blangero, J., Fontcuberta, J., and Rodríguez de Córdoba, S. (2004). Genetic and environmental factors influencing the human factor H plasma levels. *Immunogenetics* 56, 77–82.

Ethen, C.M., Reilly, C., Feng, X., Olsen, T.W., and Ferrington, D.A. (2007). Age-related macular degeneration and retinal protein modification by 4-hydroxy-2-nonenal. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 48, 3469–3479.

Farnoodian, M., Kinter, J.B., Yadranji Aghdam, S., Zaitoun, I., Sorenson, C.M., and Sheibani, N. (2015). Expression of pigment epithelium-derived factor and thrombospondin-1 regulate proliferation and migration of retinal pigment epithelial cells. *Physiol Rep* 3.

Farnoodian, M., Wang, S., Dietz, J., Nickells, R.W., Sorenson, C.M., and Sheibani, N. (2017). Negative regulators of angiogenesis: important targets for treatment of exudative AMD. *Clin. Sci.* 131, 1763–1780.

Ferrara, N. (2001). Role of vascular endothelial growth factor in regulation of physiological angiogenesis. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* 280, C1358-1366.

Ferreira, V.P., Pangburn, M.K., and Cortés, C. (2010). Complement control protein factor H: the good, the bad, and the inadequate. *Mol. Immunol.* 47, 2187–2197.

Fett, A.L., Hermann, M.M., Muether, P.S., Kirchhof, B., and Fauser, S. (2012). Immunohistochemical localization of complement regulatory proteins in the human retina. *Histol. Histopathol.* 27, 357–364.

Fletcher, E.L., Chung, S.T.L., Downie, L.E., Guymer, R.H., and Vingrys, A.J. (2014). Age-related macular degeneration: what's new and on the horizon. *Optom Vis Sci* 91, 816–818.

Flohé, L. (1971). [Glutathione peroxidase: enzymology and biological aspects]. *Klin. Wochenschr.* 49, 669–683.

Fong, G.H., Rossant, J., Gertsenstein, M., and Breitman, M.L. (1995). Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature* 376, 66–70.

Fritsche, L.G., Lauer, N., Hartmann, A., Stippa, S., Keilhauer, C.N., Oppermann, M., Pandey, M.K., Köhl, J., Zipfel, P.F., Weber, B.H.F., et al. (2010). An imbalance of human complement regulatory proteins CFHR1, CFHR3 and factor H influences risk for age-related macular degeneration (AMD). *Hum. Mol. Genet.* 19, 4694–4704.



Fritsche, L.G., Chen, W., Schu, M., Yaspan, B.L., Yu, Y., Thorleifsson, G., Zack, D.J., Arakawa, S., Cipriani, V., Ripke, S., et al. (2013). Seven new loci associated with age-related macular degeneration. *Nat. Genet.* 45, 433–439, 439e1-2.

Fujitani, Y., Fujitani, S., Luo, H., Qiu, F., Burlison, J., Long, Q., Kawaguchi, Y., Edlund, H., MacDonald, R.J., Furukawa, T., et al. (2006). *Ptf1a* determines horizontal and amacrine cell fates during mouse retinal development. *Development* 133, 4439–4450.

Furchgott, R.F., and Zawadzki, J.V. (1980). The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288, 373–376.

Gaddini, L., Varano, M., Matteucci, A., Mallozzi, C., Villa, M., Pricci, F., and Malchiodi-Albedi, F. (2016). Müller glia activation by VEGF-antagonizing drugs: An in vitro study on rat primary retinal cultures. *Exp. Eye Res.* 145, 158–163.

Gale, D.P., de Jorge, E.G., Cook, H.T., Martinez-Barricarte, R., Hadjisavvas, A., McLean, A.G., Pusey, C.D., Pierides, A., Kyriacou, K., Athanasiou, Y., et al. (2010). Identification of a mutation in complement factor H-related protein 5 in patients of Cypriot origin with glomerulonephritis. *The Lancet* 376, 794–801.

Gardès-Albert, M., Bonnefont-Rousselot, D., and Abedinzadeh, Z. *Espèces réactives de l'oxygène*. 6.

Gebicke-Haerter, P.J., Lieb, K., Illes, P., and Berger, M. (1998). [Microglia: mechanisms of activation and significance in pathogenesis of neuropsychiatric illnesses]. *Nervenarzt* 69, 752–762.

Geisen, P., McColm, J.R., King, B.M., and Hartnett, M.E. (2006). Characterization of barrier properties and inducible VEGF expression of several types of retinal pigment epithelium in medium-term culture. *Curr. Eye Res.* 31, 739–748.

Goicoechea de Jorge, E., Caesar, J.J.E., Malik, T.H., Patel, M., Colledge, M., Johnson, S., Hakobyan, S., Morgan, B.P., Harris, C.L., Pickering, M.C., et al. (2013). Dimerization of complement factor H-related proteins modulates complement activation in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110, 4685–4690.



Gragoudas, E.S., Adamis, A.P., Cunningham, E.T., Feinsod, M., Guyer, D.R., and VEGF Inhibition Study in Ocular Neovascularization Clinical Trial Group (2004). Pegaptanib for neovascular age-related macular degeneration. *N. Engl. J. Med.* 351, 2805–2816.

Green, W.R., and Key, S.N. (2005). Senile macular degeneration: a histopathologic study. 1977. *Retina (Philadelphia, Pa.)* 25, 180–250; discussion 250-254.

Gu, L., Tseng, S., Horner, R.M., Tam, C., Loda, M., and Rollins, B.J. (2000). Control of TH2 polarization by the chemokine monocyte chemoattractant protein-1. *Nature* 404, 407–411.

Guan, M., Pang, C.-P., Yam, H.-F., Cheung, K.-F., Liu, W.-W., and Lu, Y. (2004). Inhibition of glioma invasion by overexpression of pigment epithelium-derived factor. *Cancer Gene Ther.* 11, 325–332.

Guymer, R.H., Tao, L.W., Goh, J.K., Liew, D., Ischenko, O., Robman, L.D., Aung, K., Cipriani, T., Cain, M., Richardson, A.J., et al. (2011). Identification of urinary biomarkers for age-related macular degeneration. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 52, 4639–4644.

Haddad, W.-M., Coscas, G., and Soubrane, G. (2003). [Age-related macular degeneration and apoptosis]. *J Fr Ophtalmol* 26, 307–311.

Hafezi, F., Marti, A., Munz, K., and Remé, C.E. (1997). Light-induced apoptosis: differential timing in the retina and pigment epithelium. *Exp. Eye Res.* 64, 963–970.

Hageman, G.S., Luthert, P.J., Victor Chong, N.H., Johnson, L.V., Anderson, D.H., and Mullins, R.F. (2001). An integrated hypothesis that considers drusen as biomarkers of immune-mediated processes at the RPE-Bruch's membrane interface in aging and age-related macular degeneration. *Prog Retin Eye Res* 20, 705–732.

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. (2005a). A common haplotype in the complement regulatory gene factor H (HF1/CFH) predisposes individuals to age-related macular degeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 7227–7232.

Hageman, G.S., 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. (2005b). A common haplotype in the complement regulatory gene factor H (HF1/CFH) predisposes individuals to age-related macular degeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 7227–7232.



Haines, J.L., Hauser, M.A., Schmidt, S., Scott, W.K., Olson, L.M., Gallins, P., Spencer, K.L., Kwan, S.Y., Noureddine, M., Gilbert, J.R., et al. (2005). Complement factor H variant increases the risk of age-related macular degeneration. *Science* 308, 419–421.

Hakobyan, S., Harris, C.L., Tortajada, A., Goicochea de Jorge, E., García-Layana, A., Fernández-Robredo, P., Rodríguez de Córdoba, S., and Morgan, B.P. (2008). Measurement of factor H variants in plasma using variant-specific monoclonal antibodies: application to assessing risk of age-related macular degeneration. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 49, 1983–1990.

Haleng, J., Pincemail, J., Defraigne, J.O., Charlier, C., and Chapelle, J.P. (2007). [Oxidative stress]. *Rev Med Liege* 62, 628–638.

Hanus, J., Anderson, C., and Wang, S. (2015). RPE necroptosis in response to oxidative stress and in AMD. *Ageing Res. Rev.* 24, 286–298.

Hanus, J., Anderson, C., Sarraf, D., Ma, J., and Wang, S. (2016). Retinal pigment epithelial cell necroptosis in response to sodium iodate. *Cell Death Discov* 2, 16054.

Hara, K., Shiga, A., Fukutake, T., Nozaki, H., Miyashita, A., Yokoseki, A., Kawata, H., Koyama, A., Arima, K., Takahashi, T., et al. (2009). Association of HTRA1 mutations and familial ischemic cerebral small-vessel disease. *N. Engl. J. Med.* 360, 1729–1739.

Harrison, R.A., and Lachmann, P.J. (1980). The physiological breakdown of the third component of human complement. *Mol. Immunol.* 17, 9–20.

Heier, J.S., Brown, D.M., Chong, V., Korobelnik, J.-F., Kaiser, P.K., Nguyen, Q.D., Kirchhof, B., Ho, A., Ogura, Y., Yancopoulos, G.D., et al. (2012). Intravitreal aflibercept (VEGF trap-eye) in wet age-related macular degeneration. *Ophthalmology* 119, 2537–2548.

Heinen, S., Hartmann, A., Lauer, N., Wiehl, U., Dahse, H.-M., Schirmer, S., Gropp, K., Enghardt, T., Wallich, R., Hälbich, S., et al. (2009). Factor H-related protein 1 (CFHR-1) inhibits complement C5 convertase activity and terminal complex formation. *Blood* 114, 2439–2447.

Hellwege, J., Jokiranta, T.S., Koistinen, V., Vaarala, O., Meri, S., and Zipfel, P.F. (1999). Functional properties of complement factor H-related proteins FHR-3 and FHR-4: binding to the C3d region of C3b and differential regulation by heparin. *FEBS Lett.* 462, 345–352.



- Hinton, D.R., He, S., and Lopez, P.F. (1998). Apoptosis in surgically excised choroidal neovascular membranes in age-related macular degeneration. *Arch. Ophthalmol.* 116, 203–209.
- Hiratsuka, S., Minowa, O., Kuno, J., Noda, T., and Shibuya, M. (1998). Flt-1 lacking the tyrosine kinase domain is sufficient for normal development and angiogenesis in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 9349–9354.
- Ho, T., Vessey, K.A., Cappai, R., Dinet, V., Mascarelli, F., Ciccotosto, G.D., and Fletcher, E.L. (2012). Amyloid precursor protein is required for normal function of the rod and cone pathways in the mouse retina. *PLoS ONE* 7, e29892.
- Hoff, H.F., O’Neil, J., Chisolm, G.M., Cole, T.B., Quehenberger, O., Esterbauer, H., and Jürgens, G. (1989). Modification of low density lipoprotein with 4-hydroxynonenal induces uptake by macrophages. *Arteriosclerosis* 9, 538–549.
- Holz, F.G., Bellman, C., Staudt, S., Schütt, F., and Völcker, H.E. (2001). Fundus autofluorescence and development of geographic atrophy in age-related macular degeneration. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 42, 1051–1056.
- de Hoz, R., Rojas, B., Ramírez, A.I., Salazar, J.J., Gallego, B.I., Triviño, A., and Ramírez, J.M. (2016). Retinal Macroglial Responses in Health and Disease. *Biomed Res Int* 2016.
- Huang, Y., Qiao, F., Abagyan, R., Hazard, S., and Tomlinson, S. (2006). Defining the CD59-C9 binding interaction. *J. Biol. Chem.* 281, 27398–27404.
- Hughes, A.E., Orr, N., Patterson, C., Esfandiary, H., Hogg, R., McConnell, V., Silvestri, G., and Chakravarthy, U. (2007). Neovascular Age-Related Macular Degeneration Risk Based on CFH, LOC387715/HTRA1, and Smoking. *PLoS Medicine* 4, e355.
- Hughes, A.E., Mullan, G.M., and Bradley, D.T. (2011). Complement factor B polymorphism 32W protects against age-related macular degeneration. *Mol. Vis.* 17, 983–988.
- Ignarro, L.J. (1990). Biosynthesis and metabolism of endothelium-derived nitric oxide. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 30, 535–560.
- Imamura, Y., Noda, S., Hashizume, K., Shinoda, K., Yamaguchi, M., Uchiyama, S., Shimizu, T., Mizushima, Y., Shirasawa, T., and Tsubota, K. (2006). Drusen, choroidal neovascularization, and retinal pigment epithelium dysfunction in SOD1-deficient mice: a model of age-related macular degeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 11282–11287.



- Isas, J.M., Luibl, V., Johnson, L.V., Kaye, R., Wetzel, R., Glabe, C.G., Langen, R., and Chen, J. (2010). Soluble and mature amyloid fibrils in drusen deposits. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 51, 1304–1310.
- Ishibashi, T., Patterson, R., Ohnishi, Y., Inomata, H., and Ryan, S.J. (1986). Formation of drusen in the human eye. *Am. J. Ophthalmol.* 101, 342–353.
- Jaffe, E.A., Ruggiero, J.T., and Falcone, D.J. (1985). Monocytes and macrophages synthesize and secrete thrombospondin. *Blood* 65, 79–84.
- Jeon, H., Lee, J.-S., Yoo, S., and Lee, M.-S. (2014). Quantification of complement system activation by measuring C5b-9 cell surface deposition using a cell-ELISA technique. *J. Immunol. Methods* 415, 57–62.
- Johnson, P.T., Lewis, G.P., Talaga, K.C., Brown, M.N., Kappel, P.J., Fisher, S.K., Anderson, D.H., and Johnson, L.V. (2003). Drusen-associated degeneration in the retina. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 44, 4481–4488.
- 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 U S A* 103, 17456–17461.
- Józsi, M., Reuter, S., Nozal, P., López-Trascasa, M., Sánchez-Corral, P., Prohászka, Z., and Uzonyi, B. (2014). Autoantibodies to complement components in C3 glomerulopathy and atypical hemolytic uremic syndrome. *Immunol. Lett.* 160, 163–171.
- Juel, H.B., Kaestel, C., Folkersen, L., Faber, C., Heegaard, N.H.H., Borup, R., and Nissen, M.H. (2011). Retinal pigment epithelial cells upregulate expression of complement factors after co-culture with activated T cells. *Exp. Eye Res.* 92, 180–188.
- Kaneko, H., Dridi, S., Tarallo, V., Gelfand, B.D., Fowler, B.J., Cho, W.G., Kleinman, M.E., Ponicsan, S.L., Hauswirth, W.W., Chiodo, V.A., et al. (2011). DICER1 deficit induces Alu RNA toxicity in age-related macular degeneration. *Nature* 471, 325–330.
- Kaplan, J., Gerber, S., Larget-Piet, D., Rozet, J.-M., Dollfus, H., Dufier, J.-L., Odent, S., Postel-Vinay, A., Janin, N., Briard, M.-L., et al. (1993). A gene for Stargardt's disease (fundus flavimaculatus) maps to the short arm of chromosome 1. *Nature Genetics* 5, 308–311.



Karakousis, P.C., John, S.K., Behling, K.C., Surace, E.M., Smith, J.E., Hendrickson, A., Tang, W.X., Bennett, J., and Milam, A.H. (2001). Localization of pigment epithelium derived factor (PEDF) in developing and adult human ocular tissues. *Mol. Vis.* 7, 154–163.

Kasahara, E., Lin, L.-R., Ho, Y.-S., and Reddy, V.N. (2005). SOD2 protects against oxidation-induced apoptosis in mouse retinal pigment epithelium: implications for age-related macular degeneration. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 46, 3426–3434.

Kaushal, S., Grossi, F., Francois, C., Slakter, J., and Group, As.S. (2009). Complement C3 inhibitor POT-4: Clinical Safety of Intravitreal Administration. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 50, 5010–5010.

Keir, L.S., Firth, R., Aponik, L., Feitelberg, D., Sakimoto, S., Aguilar, E., Welsh, G.I., Richards, A., Usui, Y., Satchell, S.C., et al. (2017). VEGF regulates local inhibitory complement proteins in the eye and kidney. *J. Clin. Invest.* 127, 199–214.

Kim, C.H., Wu, W., Wysoczynski, M., Abdel-Latif, A., Sunkara, M., Morris, A., Kucia, M., Ratajczak, J., and Ratajczak, M.Z. (2012). Conditioning for hematopoietic transplantation activates the complement cascade and induces a proteolytic environment in bone marrow: a novel role for bioactive lipids and soluble C5b-C9 as homing factors. *Leukemia* 26, 106–116.

Kim, D.D., Mieler, W.F., and Wolf, M.D. (1992). Posterior segment changes in membranoproliferative glomerulonephritis. *Am. J. Ophthalmol.* 114, 593–599.

Kim, M.-H., Chung, J., Yang, J., Chung, S.-M., Kwag, N.-H., and Yoo, J.-S. (2003). Hydrogen peroxide-induced cell death in a human retinal pigment epithelial cell line, ARPE-19. *Korean J Ophthalmol* 17, 19–28.

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

Kitiratschky, V.B.D., Stingl, K., Wilhelm, B., Peters, T., Besch, D., Sachs, H., Gekeler, F., Bartz-Schmidt, K.U., and Zrenner, E. (2015). Safety evaluation of “retina implant alpha IMS”-a prospective clinical trial. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 253, 381–387.



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

Klein, R.J., Zeiss, C., Chew, E.Y., Tsai, J.-Y., Sackler, R.S., Haynes, C., Henning, A.K., SanGiovanni, J.P., Mane, S.M., Mayne, S.T., et al. (2005). Complement factor H polymorphism in age-related macular degeneration. *Science* 308, 385–389.

Kloekener-Gruissem, B., Barthelmes, D., Labs, S., Schindler, C., Kurz-Levin, M., Michels, S., Fleischhauer, J., Berger, W., Sutter, F., and Menghini, M. (2011). Genetic association with response to intravitreal ranibizumab in patients with neovascular AMD. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 52, 4694–4702.

Klos, A., Tenner, A.J., Johswich, K.-O., Ager, R.R., Reis, E.S., and Köhl, J. (2009). The role of the anaphylatoxins in health and disease. *Mol. Immunol.* 46, 2753–2766.

Knowles, H.J., Tian, Y.-M., Mole, D.R., and Harris, A.L. (2004). Novel mechanism of action for hydralazine: induction of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ , vascular endothelial growth factor, and angiogenesis by inhibition of prolyl hydroxylases. *Circ. Res.* 95, 162–169.

Koch, K.W., Lambrecht, H.G., Haberecht, M., Redburn, D., and Schmidt, H.H. (1994). Functional coupling of a Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent nitric oxide synthase and a soluble guanylyl cyclase in vertebrate photoreceptor cells. *EMBO J.* 13, 3312–3320.

Kubista, K.E., Tosakulwong, N., Wu, Y., Ryu, E., Roeder, J.L., Hecker, L.A., Baratz, K.H., Brown, W.L., and Edwards, A.O. (2011). Copy number variation in the complement factor H-related genes and age-related macular degeneration. *Mol. Vis.* 17, 2080–2092.

Kunchithapautham, K., and Rohrer, B. (2011). Sublytic membrane-attack-complex (MAC) activation alters regulated rather than constitutive vascular endothelial growth factor (VEGF) secretion in retinal pigment epithelium monolayers. *J. Biol. Chem.* 286, 23717–23724.

Lambooj, A.C., Kliffen, M., Kuijpers, R.W., Houtsmuller, A.B., Broerse, J.J., and Mooy, C.M. (2000). Apoptosis is present in the primate macula at all ages. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 238, 508–514.



Landsman, L., Bar-On, L., Zernecke, A., Kim, K.-W., Krauthgamer, R., Shagdarsuren, E., Lira, S.A., Weissman, I.L., Weber, C., and Jung, S. (2009). CX3CR1 is required for monocyte homeostasis and atherogenesis by promoting cell survival. *Blood* 113, 963–972.

Lau, L.-I., Chiou, S.-H., Liu, C.J.-L., Yen, M.-Y., and Wei, Y.-H. (2011). The effect of photo-oxidative stress and inflammatory cytokine on complement factor H expression in retinal pigment epithelial cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 52, 6832–6841.

Laurence, J. (2012). Diagnosis of atypical hemolytic uremic syndrome: a review of case studies. *Clin Adv Hematol Oncol* 10, 9–11.

Leveziel, N., Zerbib, J., Richard, F., Querques, G., Morineau, G., Fremeaux-Bacchi, V., Coscas, G., Soubrane, G., Benlian, P., and Souied, E.H. (2008). Genotype-phenotype correlations for exudative age-related macular degeneration associated with homozygous HTRA1 and CFH genotypes. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 49, 3090–3094.

Leveziel, N., Puche, N., Zerbib, J., Benlian, P., Coscas, G., Soubrane, G., and Souied, E. (2010). [Genetic factors associated with age-related macular degeneration]. *Med Sci (Paris)* 26, 509–515.

Li, Y., Zhang, F., Nagai, N., Tang, Z., Zhang, S., Scotney, P., Lennartsson, J., Zhu, C., Qu, Y., Fang, C., et al. (2008). VEGF-B inhibits apoptosis via VEGFR-1-mediated suppression of the expression of BH3-only protein genes in mice and rats. *J. Clin. Invest.* 118, 913–923.

Lin, T., Walker, G.B., Kurji, K., Fang, E., Law, G., Prasad, S.S., Kojic, L., Cao, S., White, V., Cui, J.Z., et al. (2013). Parainflammation associated with advanced glycation endproduct stimulation of RPE in vitro: implications for age-related degenerative diseases of the eye. *Cytokine* 62, 369–381.

Liu, J., Jha, P., Lyzogubov, V.V., Tytarenko, R.G., Bora, N.S., and Bora, P.S. (2011). Relationship between complement membrane attack complex, chemokine (C-C motif) ligand 2 (CCL2) and vascular endothelial growth factor in mouse model of laser-induced choroidal neovascularization. *J. Biol. Chem.* 286, 20991–21001.

Liu, R.T., Gao, J., Cao, S., Sandhu, N., Cui, J.Z., Chou, C.L., Fang, E., and Matsubara, J.A. (2013). Inflammatory mediators induced by amyloid-beta in the retina and RPE in vivo: implications for inflammasome activation in age-related macular degeneration. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 54, 2225–2237.



Loirat, C., and Fremeaux-Bacchi, V. (2008). Hemolytic uremic syndrome recurrence after renal transplantation. *Pediatr Transplant* 12, 619–629.

Lois, N., Abdelkader, E., Reglitz, K., Garden, C., and Ayres, J.G. (2008). Environmental tobacco smoke exposure and eye disease. *Br J Ophthalmol* 92, 1304–1310.

van Lookeren Campagne, M., LeCouter, J., Yaspan, B.L., and Ye, W. (2014). Mechanisms of age-related macular degeneration and therapeutic opportunities. *J. Pathol.* 232, 151–164.

Low-Marchelli, J.M., Ardi, V.C., Vizcarra, E.A., van Rooijen, N., Quigley, J.P., and Yang, J. (2013). Twist1 induces CCL2 and recruits macrophages to promote angiogenesis. *Cancer Res.* 73, 662–671.

Lubbers, R., van Essen, M.F., van Kooten, C., and Trouw, L.A. (2017). Production of complement components by cells of the immune system. *Clin. Exp. Immunol.* 188, 183–194.

Lublin, D.M., and Atkinson, J.P. (1989). Decay-accelerating factor: biochemistry, molecular biology, and function. *Annu. Rev. Immunol.* 7, 35–58.

Luc, G., Bard, J.-M., Lesueur, C., Arveiler, D., Evans, A., Amouyel, P., Ferrieres, J., Juhan-Vague, I., Fruchart, J.-C., Ducimetiere, P., et al. (2006). Plasma cystatin-C and development of coronary heart disease: The PRIME Study. *Atherosclerosis* 185, 375–380.

Lucas, A.D., Chadwick, N., Warren, B.F., Jewell, D.P., Gordon, S., Powrie, F., and Greaves, D.R. (2001). The Transmembrane Form of the CX3CL1 Chemokine Fractalkine Is Expressed Predominantly by Epithelial Cells in Vivo. *Am J Pathol* 158, 855–866.

Lueck, K., Wasmuth, S., Williams, J., Hughes, T.R., Morgan, B.P., Lommatzsch, A., Greenwood, J., Moss, S.E., and Pauleikhoff, D. (2011). Sub-lytic C5b-9 induces functional changes in retinal pigment epithelial cells consistent with age-related macular degeneration. *Eye (Lond)* 25, 1074–1082.

Lukácsi, S., Nagy-Baló, Z., Erdei, A., Sándor, N., and Bajtay, Z. (2017). The role of CR3 (CD11b/CD18) and CR4 (CD11c/CD18) in complement-mediated phagocytosis and podosome formation by human phagocytes. *Immunol. Lett.* 189, 64–72.

Lukiw, W.J., Surjyadipta, B., Dua, P., and Alexandrov, P.N. (2012). Common micro RNAs (miRNAs) target complement factor H (CFH) regulation in Alzheimer's disease (AD) and in age-related macular degeneration (AMD). *Int J Biochem Mol Biol* 3, 105–116.



Lundh von Leithner, P., Kam, J.H., Bainbridge, J., Catchpole, I., Gough, G., Coffey, P., and Jeffery, G. (2009). Complement factor h is critical in the maintenance of retinal perfusion. *Am. J. Pathol.* 175, 412–421.

Lyzogubov, V.V., Tytarenko, R.G., Jha, P., Liu, J., Bora, N.S., and Bora, P.S. (2010). Role of ocular complement factor H in a murine model of choroidal neovascularization. *Am. J. Pathol.* 177, 1870–1880.

Maiorano, M., Brasoveanu, L.I., Coral, S., Sigalotti, L., Lamaj, E., Gasparollo, A., Visintin, A., Altomonte, M., and Fonsatti, E. (1998). Structure, distribution, and functional role of protectin (CD59) in complement-susceptibility and in immunotherapy of human malignancies (Review). *Int. J. Oncol.* 13, 305–318.

Majji, A.B., Cao, J., Chang, K.Y., Hayashi, A., Aggarwal, S., Grebe, R.R., and De Juan, E. (2000). Age-related retinal pigment epithelium and Bruch's membrane degeneration in senescence-accelerated mouse. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 41, 3936–3942.

Malek, G., Johnson, L.V., Mace, B.E., Saloupis, P., Schmechel, D.E., Rickman, D.W., Toth, C.A., Sullivan, P.M., and Bowes Rickman, C. (2005). Apolipoprotein E allele-dependent pathogenesis: a model for age-related retinal degeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 11900–11905.

Malina, M., Roumenina, L.T., Seeman, T., Quintrec, M.L., Dragon-Durey, M.-A., Schaefer, F., and Fremeaux-Bacchi, V. (2012). Genetics of hemolytic uremic syndromes. [/Data/Revues/07554982/V41i3sP2/S0755498211006385/](#).

Mandal, M.N.A., and Ayyagari, R. (2006). Complement factor H: spatial and temporal expression and localization in the eye. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 47, 4091–4097.

Mantovani, A., and Sica, A. (2010). Macrophages, innate immunity and cancer: balance, tolerance, and diversity. *Curr. Opin. Immunol.* 22, 231–237.

Manuelian, T., Hellwege, J., Meri, S., Caprioli, J., Noris, M., Heinen, S., Jozsi, M., Neumann, H.P.H., Remuzzi, G., and Zipfel, P.F. (2003). Mutations in factor H reduce binding affinity to C3b and heparin and surface attachment to endothelial cells in hemolytic uremic syndrome. *J. Clin. Invest.* 111, 1181–1190.



Marazita, M.C., Dugour, A., Marquioni-Ramella, M.D., Figueroa, J.M., and Suburo, A.M. (2016). Oxidative stress-induced premature senescence dysregulates VEGF and CFH expression in retinal pigment epithelial cells: Implications for Age-related Macular Degeneration. *Redox Biol* 7, 78–87.

Marzo, I., Brenner, C., Zamzami, N., Susin, S.A., Beutner, G., Brdiczka, D., Rémy, R., Xie, Z.H., Reed, J.C., and Kroemer, G. (1998). The permeability transition pore complex: a target for apoptosis regulation by caspases and bcl-2-related proteins. *J. Exp. Med.* 187, 1261–1271.

Mastellos, D.C., Yancopoulou, D., Kokkinos, P., Huber-Lang, M., Hajishengallis, G., Biglarnia, A.R., Lupu, F., Nilsson, B., Risitano, A.M., Ricklin, D., et al. (2015). Compstatin: a C3-targeted complement inhibitor reaching its prime for bedside intervention. *Eur. J. Clin. Invest.* 45, 423–440.

Matsubara, J.A., Kurji, K., Cui, J., Lin, T.K., Walker, G., and Prasad, S. (2009). Amyloid Beta (A $\beta$ ) Stimulation Alters Inflammatory Gene Expression in Cultured Human Retinal Pigment Epithelial Cells (RPE). *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 50, 710–710.

Matsumoto, A.K., Kopicky-Burd, J., Carter, R.H., Tuveson, D.A., Tedder, T.F., and Fearon, D.T. (1991). Intersection of the complement and immune systems: a signal transduction complex of the B lymphocyte-containing complement receptor type 2 and CD19. *J. Exp. Med.* 173, 55–64.

Merle, N.S., Church, S.E., Fremeaux-Bacchi, V., and Roumenina, L.T. (2015). Complement System Part I - Molecular Mechanisms of Activation and Regulation. *Front Immunol* 6, 262.

Michinaga, S. (2017). The Endothelin ETB Receptor Antagonist BQ788 Protects against Brain Edema after Fluid Percussion Injury by Decreasing Vascular Endothelial Growth Factor-A Expression in Mice. *Yakugaku Zasshi* 137, 1241–1246.

Miloudi, K., Binet, F., Wilson, A., Cerani, A., Oubaha, M., Menard, C., Henriques, S., Mawambo, G., Dejda, A., Nguyen, P.T., et al. (2016). Truncated netrin-1 contributes to pathological vascular permeability in diabetic retinopathy. *J. Clin. Invest.* 126, 3006–3022.

Mirochnik, Y., Kwiatek, A., and Volpert, O.V. (2008). Thrombospondin and apoptosis: molecular mechanisms and use for design of complementation treatments. *Curr Drug Targets* 9, 851–862.



- Mold, C., Kingzette, M., and Gewurz, H. (1984). C-reactive protein inhibits pneumococcal activation of the alternative pathway by increasing the interaction between factor H and C3b. *J. Immunol.* 133, 882–885.
- Mold, C., Gewurz, H., and Du Clos, T.W. (1999). Regulation of complement activation by C-reactive protein. *Immunopharmacology* 42, 23–30.
- Molday, R.S., Zhong, M., and Quazi, F. (2009). The role of the photoreceptor ABC transporter ABCA4 in lipid transport and Stargardt macular degeneration. *Biochim. Biophys. Acta* 1791, 573–583.
- Moncada, S., Palmer, R.M., and Higgs, E.A. (1991). Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* 43, 109–142.
- Montes, T., Tortajada, A., Morgan, B.P., Rodríguez de Córdoba, S., and Harris, C.L. (2009). Functional basis of protection against age-related macular degeneration conferred by a common polymorphism in complement factor B. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 4366–4371.
- Montine, T.J., Montine, K.S., and Swift, L.L. (1997). Central nervous system lipoproteins in Alzheimer's disease. *Am. J. Pathol.* 151, 1571–1575.
- Mullins, R.F., Aptsiauri, N., and Hageman, G.S. (2001). Structure and composition of drusen associated with glomerulonephritis: implications for the role of complement activation in drusen biogenesis. *Eye (Lond)* 15, 390–395.
- Natoli, R., Fernando, N., Dahlenburg, T., Jiao, H., Aggio-Bruce, R., Barnett, N.L., Chao de la Barca, J.M., Tcherkez, G., Reynier, P., Fang, J., et al. (2018). Obesity-induced metabolic disturbance drives oxidative stress and complement activation in the retinal environment. *Mol. Vis.* 24, 201–217.
- Nguyen-Legros, J. (1987). Les neurotransmetteurs de la rétine. *médecine/sciences* 3, 198.
- Noris, M., Caprioli, J., Bresin, E., Mossali, C., Pianetti, G., Gamba, S., Daina, E., Fenili, C., Castelletti, F., Sorosina, A., et al. (2010). Relative role of genetic complement abnormalities in sporadic and familial aHUS and their impact on clinical phenotype. *Clin J Am Soc Nephrol* 5, 1844–1859.
- Noris, M., Mescia, F., and Remuzzi, G. (2012). STEC-HUS, atypical HUS and TTP are all diseases of complement activation. *Nat Rev Nephrol* 8, 622–633.



- Nozaki, M., Raisler, B.J., Sakurai, E., Sarma, J.V., Barnum, S.R., Lambris, J.D., Chen, Y., Zhang, K., Ambati, B.K., Baffi, J.Z., et al. (2006). Drusen complement components C3a and C5a promote choroidal neovascularization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 2328–2333.
- O’Flynn, J., van der Pol, P., Dixon, K.O., Prohászka, Z., Daha, M.R., and van Kooten, C. (2016). Monomeric C-reactive protein inhibits renal cell-directed complement activation mediated by properdin. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 310, F1308-1316.
- Olin, K.L., Morse, L.S., Murphy, C., Paul-Murphy, J., Line, S., Bellhorn, R.W., Hjelmeland, L.M., and Keen, C.L. (1995). Trace element status and free radical defense in elderly rhesus macaques (*Macaca mulatta*) with macular drusen. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 208, 370–377.
- Ormsby, R.J., Ranganathan, S., Tong, J.C., Griggs, K.M., Dimasi, D.P., Hewitt, A.W., Burdon, K.P., Craig, J.E., Hoh, J., and Gordon, D.L. (2008). Functional and structural implications of the complement factor H Y402H polymorphism associated with age-related macular degeneration. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 49, 1763–1770.
- Owen, J.L., and Mohamadzadeh, M. (2013). Macrophages and chemokines as mediators of angiogenesis. *Front Physiol* 4, 159.
- Pan, Y., Lloyd, C., Zhou, H., Dolich, S., Deeds, J., Gonzalo, J.A., Vath, J., Gosselin, M., Ma, J., Dussault, B., et al. (1997). Neurotactin, a membrane-anchored chemokine upregulated in brain inflammation. *Nature* 387, 611–617.
- Pang, C., Gao, Z., Yin, J., Zhang, J., Jia, W., and Ye, J. (2008). Macrophage infiltration into adipose tissue may promote angiogenesis for adipose tissue remodeling in obesity. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 295, E313-322.
- Pangburn, M.K., Schreiber, R.D., and Müller-Eberhard, H.J. (1977). Human complement C3b inactivator: isolation, characterization, and demonstration of an absolute requirement for the serum protein beta1H for cleavage of C3b and C4b in solution. *J. Exp. Med.* 146, 257–270.
- Pascual, M., Steiger, G., Estreicher, J., Macon, K., Volanakis, J.E., and Schifferli, J.A. (1988). Metabolism of complement factor D in renal failure. *Kidney Int.* 34, 529–536.
- Pasparakis, M., and Vandenabeele, P. (2015). Necroptosis and its role in inflammation. *Nature* 517, 311–320.



- Peixoto, P.M., Ryu, S.-Y., Bombrun, A., Antonsson, B., and Kinnally, K.W. (2009). MAC inhibitors suppress mitochondrial apoptosis. *Biochem. J.* 423, 381–387.
- Penn, J.S., Madan, A., Caldwell, R.B., Bartoli, M., Caldwell, R.W., and Hartnett, M.E. (2008). Vascular endothelial growth factor in eye disease. *Prog Retin Eye Res* 27, 331–371.
- Perkins, S.J., Nan, R., Li, K., Khan, S., and Miller, A. (2012). Complement factor H-ligand interactions: self-association, multivalency and dissociation constants. *Immunobiology* 217, 281–297.
- Perkins, S.J., Fung, K.W., and Khan, S. (2014). Molecular Interactions between Complement Factor H and Its Heparin and Heparan Sulfate Ligands. *Front Immunol* 5, 126.
- 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.
- Pogue, A.I., Li, Y.Y., Cui, J.-G., Zhao, Y., Kruck, T.P.A., Percy, M.E., Tarr, M.A., and Lukiw, W.J. (2009). Characterization of an NF-kappaB-regulated, miRNA-146a-mediated down-regulation of complement factor H (CFH) in metal-sulfate-stressed human brain cells. *J. Inorg. Biochem.* 103, 1591–1595.
- Qu, H., Ricklin, D., Bai, H., Chen, H., Reis, E.S., Maciejewski, M., Tzekou, A., DeAngelis, R.A., Resuello, R.R.G., Lupu, F., et al. (2013). New analogs of the clinical complement inhibitor compstatin with subnanomolar affinity and enhanced pharmacokinetic properties. *Immunobiology* 218, 496–505.
- Ramanathan, M., Pinhal-Enfield, G., Hao, I., and Leibovich, S.J. (2007). Synergistic up-regulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in macrophages by adenosine A2A receptor agonists and endotoxin involves transcriptional regulation via the hypoxia response element in the VEGF promoter. *Mol. Biol. Cell* 18, 14–23.
- Ramírez, J.M., Ramírez, A.I., Salazar, J.J., de Hoz, R., and Triviño, A. (2001). Changes of Astrocytes in Retinal Ageing and Age-related Macular Degeneration. *Experimental Eye Research* 73, 601–615.



- Raoul, W., Auvynet, C., Camelo, S., Guillonnet, X., Feumi, C., Combadière, C., and Sennlaub, F. (2010). CCL2/CCR2 and CX3CL1/CX3CR1 chemokine axes and their possible involvement in age-related macular degeneration. *J Neuroinflammation* 7, 87.
- Rasmussen, A., and Sander, B. (2014). Long-term longitudinal study of patients treated with ranibizumab for neovascular age-related macular degeneration. *Curr Opin Ophthalmol* 25, 158–163.
- Rattner, A., and Nathans, J. (2006). Macular degeneration: recent advances and therapeutic opportunities. *Nat. Rev. Neurosci.* 7, 860–872.
- Reed, M.J., Iruela-Arispe, L., O'Brien, E.R., Truong, T., LaBell, T., Bornstein, P., and Sage, E.H. (1995). Expression of thrombospondins by endothelial cells. Injury is correlated with TSP-1. *Am. J. Pathol.* 147, 1068–1080.
- Renard, G., and Leid, J. (2016). [The dangers of blue light: True story!]. *J Fr Ophtalmol* 39, 483–488.
- Reynolds, R., Hartnett, M.E., Atkinson, J.P., Giclas, P.C., Rosner, B., and Seddon, J.M. (2009). Plasma complement components and activation fragments: associations with age-related macular degeneration genotypes and phenotypes. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 50, 5818–5827.
- Ribatti, D., Nico, B., Belloni, A.S., Vacca, A., Roncali, L., and Nussdorfer, G.G. (2001). Angiogenic activity of leptin in the chick embryo chorioallantoic membrane is in part mediated by endogenous fibroblast growth factor-2. *Int. J. Mol. Med.* 8, 265–268.
- Ripoche, J., Mitchell, J.A., Erdei, A., Madin, C., Moffatt, B., Mokoena, T., Gordon, S., and Sim, R.B. (1988). Interferon gamma induces synthesis of complement alternative pathway proteins by human endothelial cells in culture. *J. Exp. Med.* 168, 1917–1922.
- Rivera, A., Fisher, S.A., Fritsche, L.G., Keilhauer, C.N., Lichtner, P., Meitinger, T., and Weber, B.H.F. (2005). Hypothetical LOC387715 is a second major susceptibility gene for age-related macular degeneration, contributing independently of complement factor H to disease risk. *Hum. Mol. Genet.* 14, 3227–3236.
- Robbie, S.J., Georgiadis, A., Barker, S.E., Duran, Y., Smith, A.J., Ali, R.R., Luhmann, U.F.O., and Bainbridge, J.W. (2016). Enhanced Ccl2-Ccr2 signaling drives more severe choroidal neovascularization with aging. *Neurobiol. Aging* 40, 110–119.



- Rochowiak, A., and Niemi, Z.I. (2010). [The role of CR1 complement receptor in pathology]. *Pol. Merkur. Lekarski* 28, 84–88.
- Rohrer, B., Guo, Y., Kunchithapautham, K., and Gilkeson, G.S. (2007). Eliminating complement factor D reduces photoreceptor susceptibility to light-induced damage. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 48, 5282–5289.
- Rohrer, B., Long, Q., Coughlin, B., Wilson, R.B., Huang, Y., Qiao, F., Tang, P.H., Kunchithapautham, K., Gilkeson, G.S., and Tomlinson, S. (2009). A targeted inhibitor of the alternative complement pathway reduces angiogenesis in a mouse model of age-related macular degeneration. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 50, 3056–3064.
- Rohrer, B., Coughlin, B., Bandyopadhyay, M., and Holers, V.M. (2012). Systemic human CR2-targeted complement alternative pathway inhibitor ameliorates mouse laser-induced choroidal neovascularization. *J Ocul Pharmacol Ther* 28, 402–409.
- Rosenfeld, P.J., Rich, R.M., and Lalwani, G.A. (2006). Ranibizumab: Phase III clinical trial results. *Ophthalmol Clin North Am* 19, 361–372.
- Rotruck, J.T., Pope, A.L., Ganther, H.E., Swanson, A.B., Hafeman, D.G., and Hoekstra, W.G. (1973). Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science* 179, 588–590.
- Rougier, M.B.R., Barberger-Gateau, P., Delyfer, M.N., Colin, J., Malet, F., Goff, M.L., Dartigues, J.F., Korobelnik, J.F., and Delcourt, C. (2009). 114 Facteur H du complément, tabac et risque de développer une dégénérescence maculaire liée à l'âge: Étude Alienor. </data/revues/01815512/v32sS1/S0181551209732425/>.
- Rowan, S., and Taylor, A. (2016). Gene-Diet Interactions in Age-Related Macular Degeneration. *Adv. Exp. Med. Biol.* 854, 95–101.
- Rutar, M., and Provis, J.M. (2016). Role of Chemokines in Shaping Macrophage Activity in AMD. *Adv. Exp. Med. Biol.* 854, 11–16.
- Ryan, S.J. (1982). Subretinal neovascularization. Natural history of an experimental model. *Arch. Ophthalmol.* 100, 1804–1809.



Saad, A.F., Virella, G., Chassereau, C., Boackle, R.J., and Lopes-Virella, M.F. (2006). OxLDL immune complexes activate complement and induce cytokine production by MonoMac 6 cells and human macrophages. *J. Lipid Res.* 47, 1975–1983.

Salcedo, R., Ponce, M.L., Young, H.A., Wasserman, K., Ward, J.M., Kleinman, H.K., Oppenheim, J.J., and Murphy, W.J. (2000). Human endothelial cells express CCR2 and respond to MCP-1: direct role of MCP-1 in angiogenesis and tumor progression. *Blood* 96, 34–40.

Saunders, R.E., Goodship, T.H.J., Zipfel, P.F., and Perkins, S.J. (2006). An interactive web database of factor H-associated hemolytic uremic syndrome mutations: insights into the structural consequences of disease-associated mutations. *Hum. Mutat.* 27, 21–30.

Sayah, S., Leon, P., Chan, P., and Fontaine, M. (1998). Les récepteurs des anaphylatoxines C3a (C3aR) et C5a (C5aR). *médecine/sciences* 14, 291.

Schaumberg, D.A., Hankinson, S.E., Guo, Q., Rimm, E., and Hunter, D.J. (2007). A prospective study of 2 major age-related macular degeneration susceptibility alleles and interactions with modifiable risk factors. *Arch. Ophthalmol.* 125, 55–62.

Schmidt-Erfurth, U., Kaiser, P.K., Korobelnik, J.-F., Brown, D.M., Chong, V., Nguyen, Q.D., Ho, A.C., Ogura, Y., Simader, C., Jaffe, G.J., et al. (2014). Intravitreal aflibercept injection for neovascular age-related macular degeneration: ninety-six-week results of the VIEW studies. *Ophthalmology* 121, 193–201.

Schnabolk, G., Coughlin, B., Joseph, K., Kunchithapautham, K., Bandyopadhyay, M., O'Quinn, E.C., Nowling, T., and Rohrer, B. (2015). Local production of the alternative pathway component factor B is sufficient to promote laser-induced choroidal neovascularization. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 56, 1850–1863.

Scholl, H.P.N., Charbel Issa, P., Walier, M., Janzer, S., Pollok-Kopp, B., Börncke, F., Fritsche, L.G., Chong, N.V., Fimmers, R., Wienker, T., et al. (2008). Systemic complement activation in age-related macular degeneration. *PLoS ONE* 3, e2593.

Schuetz, E., and Thanos, S. (2004). Microglia-targeted pharmacotherapy in retinal neurodegenerative diseases. *Curr Drug Targets* 5, 619–627.



Schutt, F., Bergmann, M., Holz, F.G., and Kopitz, J. (2003). Proteins modified by malondialdehyde, 4-hydroxynonenal, or advanced glycation end products in lipofuscin of human retinal pigment epithelium. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 44, 3663–3668.

Schwaeble, W.J., Stover, C.M., Schall, T.J., Dairaghi, D.J., Trinder, P.K., Linington, C., Iglesias, A., Schubart, A., Lynch, N.J., Weihe, E., et al. (1998). Neuronal expression of fractalkine in the presence and absence of inflammation. *FEBS Lett.* 439, 203–207.

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.

Servais, A., Noël, L.-H., Roumenina, L.T., Le Quintrec, M., Ngo, S., Dragon-Durey, M.-A., Macher, M.-A., Zuber, J., Karras, A., Provot, F., et al. (2012). Acquired and genetic complement abnormalities play a critical role in dense deposit disease and other C3 glomerulopathies. *Kidney International* 82, 454–464.

Seth, A., Cui, J., To, E., Kwee, M., and Matsubara, J. (2008). Complement-associated deposits in the human retina. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 49, 743–750.

Sharma, A., Sharma, R., Chaudhary, P., Vatsyayan, R., Pearce, V., Jeyabal, P.V.S., Zimniak, P., Awasthi, S., and Awasthi, Y.C. (2008). 4-Hydroxynonenal induces p53-mediated apoptosis in retinal pigment epithelial cells. *Arch. Biochem. Biophys.* 480, 85–94.

Shaw, P.X., Zhang, L., Zhang, M., Du, H., Zhao, L., Lee, C., Grob, S., Lim, S.L., Hughes, G., Lee, J., et al. (2012). Complement factor H genotypes impact risk of age-related macular degeneration by interaction with oxidized phospholipids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, 13757–13762.

Silverman, M.D., Zamora, D.O., Pan, Y., Texeira, P.V., Baek, S.-H., Planck, S.R., and Rosenbaum, J.T. (2003). Constitutive and inflammatory mediator-regulated fractalkine expression in human ocular tissues and cultured cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 44, 1608–1615.

Singh, A., Faber, C., Falk, M., Nissen, M.H., Hviid, T.V.F., and Sørensen, T.L. (2012). Altered expression of CD46 and CD59 on leukocytes in neovascular age-related macular degeneration. *Am. J. Ophthalmol.* 154, 193-199.e2.



Sivaprasad, S., and Chong, N.V. (2006). The complement system and age-related macular degeneration. *Eye (Lond)* 20, 867–872.

Skeie, J.M., and Mahajan, V.B. (2014). Proteomic landscape of the human choroid-retinal pigment epithelial complex. *JAMA Ophthalmol* 132, 1271–1281.

Skerka, C., and Zipfel, P.F. (2008). Complement factor H related proteins in immune diseases. *Vaccine* 26 Suppl 8, I9-14.

Skerka, C., Chen, Q., Fremeaux-Bacchi, V., and Roumenina, L.T. (2013). Complement factor H related proteins (CFHRs). *Mol. Immunol.* 56, 170–180.

Smailhodzic, D., Klaver, C.C.W., Klevering, B.J., Boon, C.J.F., Groenewoud, J.M.M., Kirchhof, B., Daha, M.R., den Hollander, A.I., and Hoyng, C.B. (2012). Risk alleles in CFH and ARMS2 are independently associated with systemic complement activation in age-related macular degeneration. *Ophthalmology* 119, 339–346.

Société française d'ophtalmologie, and Pournaras, C.J. (2008). Pathologies vasculaires oculaires: [rapport présenté à la] Société française d'ophtalmologie (Issy-les-Moulineaux: Elsevier-Masson).

Sokolov, V.S., Sokolenko, E.A., Sokolov, A.V., Dontsov, A.E., Chizmadzhev, Y.A., and Ostrovsky, M.A. (2007). Interaction of pyridinium bis-retinoid (A2E) with bilayer lipid membranes. *J. Photochem. Photobiol. B, Biol.* 86, 177–185.

Souied, E., Le Tien, V., Coscas, G., and Soubrane, G. (2007). [Toward prevention of age-related macular degeneration]. *J Fr Ophtalmol* 30, 449–455.

Sparrow, J.R., and Boulton, M. (2005). RPE lipofuscin and its role in retinal pathobiology. *Exp. Eye Res.* 80, 595–606.

Sparrow, J.R., Nakanishi, K., and Parish, C.A. (2000). The lipofuscin fluorophore A2E mediates blue light-induced damage to retinal pigmented epithelial cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 41, 1981–1989.

Stanton, C.M., Yates, J.R.W., den Hollander, A.I., Seddon, J.M., Swaroop, A., Stambolian, D., Fauser, S., Hoyng, C., Yu, Y., Atsuhiko, K., et al. (2011). Complement factor D in age-related macular degeneration. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 52, 8828–8834.



Strauss, O. (2005). The retinal pigment epithelium in visual function. *Physiol. Rev.* 85, 845–881.

Streit, W.J., Graeber, M.B., and Kreutzberg, G.W. (1988). Functional plasticity of microglia: a review. *Glia* 1, 301–307.

Stronks, H.C., and Dagnelie, G. (2014). The functional performance of the Argus II retinal prosthesis. *Expert Rev Med Devices* 11, 23–30.

Subramanian, P., Notario, P.M., and Becerra, S.P. (2010). Pigment epithelium-derived factor receptor (PEDF-R): a plasma membrane-linked phospholipase with PEDF binding affinity. *Adv. Exp. Med. Biol.* 664, 29–37.

Sun, H., Smallwood, P.M., and Nathans, J. (2000). Biochemical defects in ABCR protein variants associated with human retinopathies. *Nat. Genet.* 26, 242–246.

Susin, S.A., Zamzami, N., and Kroemer, G. (1998). Mitochondria as regulators of apoptosis: doubt no more. *Biochim. Biophys. Acta* 1366, 151–165.

Suter, M., Remé, C., Grimm, C., Wenzel, A., Jäättela, M., Esser, P., Kociok, N., Leist, M., and Richter, C. (2000). Age-related macular degeneration. The lipofusion component N-retinyl-N-retinylidene ethanolamine detaches proapoptotic proteins from mitochondria and induces apoptosis in mammalian retinal pigment epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 275, 39625–39630.

Tegla, C.A., Cudrici, C., Patel, S., Trippe, R., Rus, V., Niculescu, F., and Rus, H. (2011). Membrane attack by complement: the assembly and biology of terminal complement complexes. *Immunol. Res.* 51, 45–60.

Thorin-Trescases, N., Voghel, G., Farhat, N., Drouin, A., Gendron, M.-È., and Thorin, É. (2010). Âge et stress oxydant: Vers un déséquilibre irréversible de l'homéostasie endothéliale. *Med Sci (Paris)* 26, 875–880.

Touchard, E., Berdugo, M., Bigey, P., El Sanharawi, M., Savoldelli, M., Naud, M.-C., Jeanny, J.-C., and Behar-Cohen, F. (2012). Suprachoroidal electrotransfer: a nonviral gene delivery method to transfect the choroid and the retina without detaching the retina. *Mol. Ther.* 20, 1559–1570.

Trichonas, G., Murakami, Y., Thanos, A., Morizane, Y., Kayama, M., Debouck, C.M., Hisatomi, T., Miller, J.W., and Vavvas, D.G. (2010). Receptor interacting protein kinases



mediate retinal detachment-induced photoreceptor necrosis and compensate for inhibition of apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 21695–21700.

Trouw, L.A., Okroj, M., Kupreishvili, K., Landberg, G., Johansson, B., Niessen, H.W.M., and Blom, A.M. (2008). C4b-binding protein is present in affected areas of myocardial infarction during the acute inflammatory phase and covers a larger area than C3. *PLoS ONE* 3, e2886.

Tuo, J., Smith, B.C., Bojanowski, C.M., Meleth, A.D., Gery, I., Csaky, K.G., Chew, E.Y., and Chan, C.-C. (2004). The involvement of sequence variation and expression of CX3CR1 in the pathogenesis of age-related macular degeneration. *FASEB J.* 18, 1297–1299.

Tyedmers, J., Mogk, A., and Bukau, B. (2010). Cellular strategies for controlling protein aggregation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11, 777–788.

Ufret-Vincenty, R.L., Aredo, B., Liu, X., McMahon, A., Chen, P.W., Sun, H., Niederkorn, J.Y., and Kedzierski, W. (2010). Transgenic Mice Expressing Variants of Complement Factor H Develop AMD-like Retinal Findings. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 51, 5878–5887.

Ursini, F., Maiorino, M., Brigelius-Flohé, R., Aumann, K.D., Roveri, A., Schomburg, D., and Flohé, L. (1995). Diversity of glutathione peroxidases. *Meth. Enzymol.* 252, 38–53.

Vavvas, D.G., Small, K.W., Awh, C.C., Zanke, B.W., Tibshirani, R.J., and Kustra, R. (2018). CFH and ARMS2 genetic risk determines progression to neovascular age-related macular degeneration after antioxidant and zinc supplementation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 115, E696–E704.

Van Bol, L., and Rasquin, F. (2014). [Age-related macular degeneration]. *Rev Med Brux* 35, 265–270.

Vernon, K.A., Goicoechea de Jorge, E., Hall, A.E., Fremeaux-Bacchi, V., Aitman, T.J., Cook, H.T., Hangartner, R., Koziell, A., and Pickering, M.C. (2012). Acute presentation and persistent glomerulonephritis following streptococcal infection in a patient with heterozygous complement factor H-related protein 5 deficiency. *Am. J. Kidney Dis.* 60, 121–125.

Vyse, T.J., Späth, P.J., Davies, K.A., Morley, B.J., Philippe, P., Athanassiou, P., Giles, C.M., and Walport, M.J. (1994). Hereditary complement factor I deficiency. *QJM* 87, 385–401.

Wallace, D.C., Brown, M.D., Melov, S., Graham, B., and Lott, M. (1998). Mitochondrial biology, degenerative diseases and aging. *Biofactors* 7, 187–190.



- Walport, M.J. (2001). Complement. First of two parts. *N. Engl. J. Med.* 344, 1058–1066.
- Wang, J., Feng, Y., Han, P., Wang, F., Luo, X., Liang, J., Sun, X., Ye, J., Lu, Y., and Sun, X. (2018). Photosensitization of A2E triggers telomere dysfunction and accelerates retinal pigment epithelium senescence. *Cell Death Dis* 9, 178.
- Weber, M., Sennlaub, F., Souied, E., Cohen, S.-Y., Béhar-Cohen, F., Milano, G., and Tadayoni, R. (2014). Expertises croisées dans la dégénérescence maculaire liée à l'âge. Focus sur la physiopathologie, l'angiogenèse, les données pharmacologiques et cliniques. *Journal Français d'Ophtalmologie* 37, 566–579.
- Weiler, J.M., Daha, M.R., Austen, K.F., and Fearon, D.T. (1976). Control of the amplification convertase of complement by the plasma protein beta1H. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 73, 3268–3272.
- Weismann, D., Hartvigsen, K., Lauer, N., Bennett, K.L., Scholl, H.P.N., 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.
- Whaley, K., and Ruddy, S. (1976). Modulation of the alternative complement pathways by beta 1 H globulin. *J. Exp. Med.* 144, 1147–1163.
- White, D.J., Oglesby, T., Liszewski, M.K., Tedja, I., Hourcade, D., Wang, M.W., Wright, L., Wallwork, J., and Atkinson, J.P. (1992). Expression of human decay accelerating factor or membrane cofactor protein genes on mouse cells inhibits lysis by human complement. *Transplant. Proc.* 24, 474–476.
- Wong, W.L., Su, X., Li, X., Cheung, C.M.G., Klein, R., Cheng, C.-Y., and Wong, T.Y. (2014). Global prevalence of age-related macular degeneration and disease burden projection for 2020 and 2040: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Glob Health* 2, e106-116.
- Wright, C.B., and Ambati, J. (2017). Dry Age-Related Macular Degeneration Pharmacology. *Handb Exp Pharmacol* 242, 321–336.
- Wu, Z., Lauer, T.W., Sick, A., Hackett, S.F., and Campochiaro, P.A. (2007). Oxidative stress modulates complement factor H expression in retinal pigmented epithelial cells by acetylation of FOXO3. *J. Biol. Chem.* 282, 22414–22425.



- Yamauchi, Y., Kuroki, M., Imakiire, T., Abe, H., Uchida, H., Beppu, R., Yamashita, Y., Kuroki, M., and Shirakusa, T. (2002). Thrombospondin-1 differentially regulates release of IL-6 and IL-10 by human monocytic cell line U937. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 290, 1551–1557.
- Yang, X.-M., Wang, Y.-S., Zhang, J., Li, Y., Xu, J.-F., Zhu, J., Zhao, W., Chu, D.-K., and Wiedemann, P. (2009). Role of PI3K/Akt and MEK/ERK in mediating hypoxia-induced expression of HIF-1alpha and VEGF in laser-induced rat choroidal neovascularization. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 50, 1873–1879.
- Yaspan, B.L., Williams, D.F., Holz, F.G., Regillo, C.D., Li, Z., Dressen, A., van Lookeren Campagne, M., Le, K.N., Graham, R.R., Beres, T., et al. (2017). Targeting factor D of the alternative complement pathway reduces geographic atrophy progression secondary to age-related macular degeneration. *Sci Transl Med* 9.
- Yates, J.R.W., Sepp, T., Matharu, B.K., Khan, J.C., Thurlby, D.A., Shahid, H., Clayton, D.G., Hayward, C., Morgan, J., Wright, A.F., et al. (2007). Complement C3 variant and the risk of age-related macular degeneration. *N. Engl. J. Med.* 357, 553–561.
- Yu, L., Wu, X., Cheng, Z., Lee, C.V., LeCouter, J., Campa, C., Fuh, G., Lowman, H., and Ferrara, N. (2008). Interaction between bevacizumab and murine VEGF-A: a reassessment. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 49, 522–527.
- Zamiri, P., Sugita, S., and Streilein, J.W. (2007). Immunosuppressive properties of the pigmented epithelial cells and the subretinal space. *Chem Immunol Allergy* 92, 86–93.
- Zeiss, C.J., and Johnson, E.A. (2004). Proliferation of microglia, but not photoreceptors, in the outer nuclear layer of the rd-1 mouse. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 45, 971–976.
- Zerbib, J., Puche, N., Richard, F., Leveziel, N., Cohen, S.Y., Korobelnik, J.-F., Sahel, J., Munnich, A., Kaplan, J., Rozet, J.-M., et al. (2011). No association between the T280M polymorphism of the CX3CR1 gene and exudative AMD. *Exp. Eye Res.* 93, 382–386.
- Zetterberg, M., Landgren, S., Andersson, M.E., Palmér, M.S., Gustafson, D.R., Skoog, I., Minthon, L., Thelle, D.S., Wallin, A., Bogdanovic, N., et al. (2008). Association of complement factor H Y402H gene polymorphism with Alzheimer's disease. *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.* 147B, 720–726.



Zhang, S.X., Wang, J.J., Gao, G., Shao, C., Mott, R., and Ma, J. (2006). Pigment epithelium-derived factor (PEDF) is an endogenous antiinflammatory factor. *FASEB J.* 20, 323–325.

Zhang, X., Kazerounian, S., Duquette, M., Perruzzi, C., Nagy, J.A., Dvorak, H.F., Parangi, S., and Lawler, J. (2009). Thrombospondin-1 modulates vascular endothelial growth factor activity at the receptor level. *FASEB J.* 23, 3368–3376.

Zhang, Y., Huang, Q., Tang, M., Zhang, J., and Fan, W. (2015). Complement Factor H Expressed by Retinal Pigment Epithelium Cells Can Suppress Neovascularization of Human Umbilical Vein Endothelial Cells: An in vitro Study. *PLoS ONE* 10, e0129945.

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

Zipfel, P.F., Jokiranta, T.S., Hellwage, J., Koistinen, V., and Meri, S. (1999). The factor H protein family. *Immunopharmacology* 42, 53–60.

Fréquence / DMLA / Maladies de l'oeil / Accueil - Les Quinze-Vingts - Centre Hospitalier National d'Ophtalmologie.

Lexique : Qu'est-ce-qu'un drusen bleu ?



# ANNEXES



## ANNEXE 1

---

### Travaux CFH et CNV :

Le matériel et méthode présentant la réalisation des travaux portant sur le CFH et la CNV sont consignés page 21, matériel et méthode du papier « **CFH-CCP domains are involved in TSP1 release : targets for wet Age-related Macular Degeneration ?** » actuellement soumis.

### Travaux de culture cellulaire :

#### A) Culture cellulaire :

##### ○ ARPE19

Des cellules de l'EPR humain, lignée ARPE 19 de passage 22 à 45, ont été cultivées à 20 000 cellules par cm<sup>3</sup> durant 5 à 6 semaines dans une étuve réglée à 5 % de CO<sub>2</sub> et à 37°C. Les cellules sont amenées à maturité durant 4 semaines dans des flasques 75, plaque 6 ou 48 puits ou labtecks 4 puits (Falcon) dans un milieu DMEM/F12 supplémenté à 10% de sérum bovin et 0.1% d'antifongique. Après ces 4 semaines, les cellules différenciées présentent des jonctions serrées et une pigmentation observée chez les cellules de l'EPR humain et sont alors maintenues dans un milieu DMEM/F12 supplémenté à 1% de sérum bovin et 0.1% d'antifongique durant 2 semaines avant d'être manipulées. L'induction du stress oxydant est réalisée par l'ajout dans le milieu 1% du 4 hydroxynonanal (4HNE) à 10nM. Cette dose de 4HNE entraîne 60% de mort cellulaire à 6H. Les cellules sont incubées 1H, 6H ou 24H et maintenues à 37°C et 5% de CO<sub>2</sub>. Pour tester la protection cellulaire, les cellules stressées au 4HNE sont supplémentées en CFH rec. ou par différents fragments et avec ou sans le polymorphisme (CFH Y402H, CFH1-7, CFH1-7\*, CFH8-20, CFH1-18, CFH7-20) à 300nM. Ceux-ci sont incubés en même temps que le 4HNE durant 1H, 6H ou 24H et maintenues à 37°C et 5% de CO<sub>2</sub>. Tous les fragments de CFH ont été synthétisés par le laboratoire Français du Fractionnement (LFB) dont la production est protégée par un brevet. Leurs activités anti VAC par liaison aux membranes, ont été également testées par le LFB.

##### ○ iRPE



La lignée cellulaire iPS derived RPE, iRPE a été cultivée au passage P3 durant 42 jours permettant l'obtention de cellules mature expérimentalement avec du milieu RDMw/oA iRPE cell culture medium avant d'être traitées durant 6H avec du 4HNE 20 $\mu$ M et du CFH 30nM. A l'issue des 6H une partie des cellules sont rincées brièvement au PBS puis fixée au PAF4% 10 min à RT avant d'être soumises à une immunohistochimie comme pour les ARPE19. L'autre partie des cellules vont être récupérer à l'aide de la trypsine, après avoir conservée les milieux, afin d'obtenir des culots qui seront utilisé pour l'extraction de protéine de la même manière que pour les ARPE19.

#### B) Comptage cellulaire

Le comptage cellulaire est réalisé sur lame Malassez, après détachement des cellules à l'aide de trypsine 10 min à 37°C. La trypsine est neutralisée par ajout de milieu DMEMF/12 10% sérum, puis les cellules sont placées à la centrifugeuse durant 5 min à 1500 tours/min. Le culot est repris dans 1ml de milieu DMEMF/12 10% sérum dont 20  $\mu$ l sont utilisés pour le comptage.

#### C) Test de mort cellulaire : LDH

Le test de lactate déshydrogénase (LDH), est réalisé à l'aide du kit Roche (LDH cytotoxic/SIGMA ALDRICH, France) en triplicata dont 100 $\mu$ l sont ajouté au 100 $\mu$ l des milieux de culture et placés à l'obscurité pendant 30 min. La DO est lue à l'aide d'un spectrographe réglé sur les longueurs d'onde 600 nM et 490 nM.

#### D) Immunofluorescence

Les expériences d'immunochimie sur les ARPE 19 et iRPE sont réalisées directement sur les labetks ou sur les lamelles de verres placés au fond des plaques 24 puits, après rinçage au PBS1% puis une fixation des cellules 10 min au PAF4% à température ambiante. Post fixation les cellules sont rincées trois fois 10 min avec du PBST avant d'être incubées dans du NGS10% dans le but de saturé les sites non spécifiques durant 20 min. les anticorps primaires (1/500 Zo1 ou 1/700 Phalloïdine, CFH, Caspases 3active ou non active et 9, C5b9 et RIP 3) sont incubé sur labteck ou lamelle à 4°C toute la nuit. Les cellules sont ensuite rincées à l'aide de trois bains de PBST 0,1% (INVITROGENE, France) avant d'être incubé dans les anticorps secondaire (dilué au 1/200 dans une solution de PBST 0,1%) choisit en fonction de l'anticorps primaire et couplé à un fluorochrome défini 1 H à température ambiante. Les noyaux sont marqués à l'aide d'une solution de dapi (SIGMA ALDRICH, France) est incubé 10 min seulement. Les lames et



lamelles sont montées à l'aide de Dako (DAKO, France), puis observées au Confocal Zeiss LSM 170 (ZEISS, France).

#### E) Western blot

Les expériences de western blot sont réalisées à l'aide des solutions d'extraction des protéines issues soit des milieux de cultures prélevées lors des traitements ou soit des culots cellulaires. Les extractions des protéines au niveau des culots cellulaires ont été réalisées à l'aide d'un potter dans une solution contenant un cocktail d'inhibiteurs de protéase (ROCHE, France) et d'inhibiteur de phosphatase (VECTOR, France), du deoxycholate 10% (SIGMA ALDRICH, France), du NP40 10% (THERMOFISHER, France), du SDS 10% (THERMOFISHER, France) et du triton 0,3% (SIGMA ALDRICH, France). Les solutions, avant d'être déposées sur gel d'acrylamides, ont été soumises à un sonotrode stérile, afin d'éliminer les fragments nucléiques pouvant être restés dans la solution, et ont été chauffées à 95°C pendant 5 min au bain marie. Après avoir rajouté le tampon de charge (THERMO SCIENTIFIQUE, France), chaque échantillon a alors été déposé à raison de 30 µg dans des puits d'un gel bis-acrylamide 4-12% (INVITROGENE, France). La migration est réalisée à 100 V dans une solution OPS (INVITROGENE, France) pendant environ 2H. Puis le transfert des protéines sur une membrane de nitrocellulose 0,2 (BIO-RAD, France) est réalisé à 30 ou 100 V durant 1 heure dans une solution de transfert (INVITROGENE, France). La membrane est ensuite incubée dans une solution de saturation TBS/Lait5% pendant 1H à température ambiante sur agitateur avant d'être incubée dans les anticorps primaires (Tableau 3) à 1/500 à 4°C sur agitateur toute la nuit. Puis la membrane est rincée 3 fois 10 min au TBS/lait1%/tween20% (SIGMA ALDRICH, France) avant d'être incubée dans les anticorps secondaires (Anti Mouse HRT et Anti Rabbit HRT, ABCCLONAL, France) à 1/2000 1h à RT. Avant la révélation les membranes sont à nouveau rincées 3 fois 10 min dans une solution de TBS/lait1%/tween20% puis 10 min dans du TBS/Tween20% puis dans une solution d'ECL (THERMOFISHER, France) contenant le substrat de la peroxydase pendant 5 min. Les membranes sont alors exposées sur film de développement (GE HEALTHCARE) 30 secondes, 1, 5, 10 ou 15 min environs.



ZO-1	Invitrogen	1/700 ou 1/500
Phalloïdine	Invitrogen	1/700 1/500
C5b9	Abcam	1/700 1/500
C3	Abcam	1/700 1/500
C5	Abcam	1/700 1/500
CHF 509G	AbDSerotec	1/700 1/500
CFH goat	Calbiochem	1/700 1/500
Caspase 9	Cell signaling	1/700 1/500
Caspase3 active	BD biosciences	1/700 1/500
Caspase3	Santa Cruz	1/700 1/500

**Tableau 3** : Tableau récapitulatif des anticorps utilisés au cours des manipulations



## ANNEXE 2

---

### LISTE DES FIGURES DU MANUSCRIT

**Fig. 1 :** organisation du globe oculaire et de la rétine

**Fig. 2 :** Vascularisation de la rétine

**Fig. 3 :** Schéma des cellules de l'EPR

**Fig. 4 :** Jonction serrée

**Fig. 5 :** Rétine neurale

**Fig. 6 :** Photorécepteurs de la rétine

**Fig. 7 :** Synapses superficielles et à ruban de la rétine

**Fig. 8 :** Fond d'œil humain sain et lors d'une atteinte DMLA atrophique

**Fig. 9 :** Schématisation de la vision d'un patient atteint de DMLA

**Fig. 10 :** Schématisation du processus de DMLA

**Fig. 11 :** Fond d'œil humain sain et lors d'une atteinte DMLA néovasculaire

**Fig. 12 :** Schéma d'angiogenèse à partir d'un réseau sanguin primitif

**Fig. 13 :** Structure des gènes de la famille du VEGFA

**Fig. 14 :** Schéma des récepteurs au VEGF

**Fig. 15 :** Structure de la thrombospondine 1 et des fonctions des différents domaines la composant.

**Fig. 16 :** Schéma simplifié de la chaîne respiratoire et des mécanismes de synthèse d'ATP par phosphorylation oxydative

**Fig. 17 :** Les protéines du système du complément

**Fig. 18 :** Cascade d'activation du système du complément

**Fig. 19 :** Schéma de l'activation et la formation des convertases des voies classique et alterne du complément

**Fig. 20 :** Formation du port d'attaque membranaire (MAC)

**Fig. 21 :** Activation du système du complément et schématisation d'une boucle d'amplification de la formation de C3 convertase en présence des facteurs activateur CFB (Factor B) et CFD (Factor D)

**Fig. 22 :** Cluster du CFH et de ses protéines associés



**Fig. 23 :** Schéma de la composition des CFH related apparenté au CFH

**Tableau 1 :** Récapitulatif des essais cliniques en cours ou abandonnés ciblant les acteurs de la voie du complément

**Tableau 2 :** Complément et développement de la DMLA

**Fig. 24 :** Activation de la voie alterne du complément dans la DMLA néovasculaire

**Fig. 25 :** Activation de la voie alterne du complément au niveau de la rétine DMLA

**Fig. 26 :** Activité anti C3 convertase des fragments du CFH

**Fig. 27 :** Effet anti-angiogénique du CFH dans un modèle murin de néovascularisation choroïdienne (CNV)

**Fig. 28 :** Diminution de l'angiogénèse par injection de CFH dans un modèle CNV chez des souris CFHKO induites

**Fig. 29 :** Présence et activité anti angiogénique dose dépendante du CFH injecté dans le complexe EPR/choroïde/sclère

**Fig. 30 :** Absence d'altération de la vision du au CFH injecté

**Fig. 31 :** Effet anti angiogénique du CFH sur la cornée

**Fig. 32 :** Effet anti angiogénique du CFH sur le modèle CAM

**Fig. 33 :** Effet du CFH rec. sur les différents paramètres de la DMLA

**Fig. 34 :** Effets du CFH sur les différents paramètres de la DMLA dans le modèle CNV

**Fig. 35 :** Présence de CFH ou de fragment de CFH dans le complexe EPR/choroïde/sclère

**Tableau 3 :** Régulation de l'expression des gènes d'angiogénèse, inflammation, voie du complément et stress oxydant par le CFH dans le modèle CNV

**Fig. 36 :** Différence d'action entre le CFH rec. et le CFH 7-20

**Fig. 37 :** L'effet anti angiogénique du cfh est dû au TPS1

**Fig. 38 :** Augmentation du relargage de TPS1, préalablement inhiber par les cellules microgliales, par le CFH

**Fig. 39 :** Schéma du mécanisme d'action du CFH, du CFH 7-20 et du polymorphisme du CFH sur les différents paramètres impliqués dans la DMLA

**Fig. 40 :** Protection de la mort cellulaire des cellules de l'EPR par le CFH

**Fig. 41 :** Le CFH protège de la mort induite par stress oxydant

**Fig. 42 :** Schéma du protocole utilisé sur les cellules ARPE19 et iRPE



**Fig. 43 :** Le CFH protège les jonctions serrées de l'EPR d'un stress oxydant

**Fig. 44 :** Protection des jonctions serrées par fixation du CFH

**Fig. 45 :** Protection de l'intégrité cellulaire et cytoplasmique des iRPE dans des conditions de stress oxydant

**Fig. 46 :** Protection du cytosquelette des cellules de l'EPR par le CFH en condition de stress oxydant

**Fig. 47 :** Morphologie des cellules de l'EPR en microscopie électronique

**Fig. 48 :** Mort cellulaire par apoptose lors d'un stress oxydant

**Fig. 49 :** Mort cellulaire par activation de la voie du complément

**Fig. 50 :** Implication de la VAC dans la perte d'intégrité cellulaire lors d'un stress oxydant

**Fig. 51 :** Implication de la VAC dans la mort cellulaire lors d'un stress oxydant

RESEARCH

Open Access



# Amyloid Precursor-Like Protein 2 deletion-induced retinal synaptopathy related to congenital stationary night blindness: structural, functional and molecular characteristics

Virginie Dinet<sup>1†</sup>, Giuseppe D. Ciccotosto<sup>2†</sup>, Kimberley Delaunay<sup>1</sup>, Céline Borrás<sup>1</sup>, Isabelle Ranchon-Cole<sup>3</sup>, Corinne Kostic<sup>4</sup>, Michèle Savoldelli<sup>1</sup>, Mohamed El Sanharawi<sup>1</sup>, Laurent Jonet<sup>1</sup>, Caroline Pirou<sup>1</sup>, Na An<sup>1</sup>, Marc Abitbol<sup>1</sup>, Yvan Arsenijevic<sup>4</sup>, Francine Behar-Cohen<sup>1</sup>, Roberto Cappai<sup>2</sup> and Frédéric Mascarelli<sup>1\*</sup>

## Abstract

**Background:** Amyloid precursor protein knockout mice (APP-KO) have impaired differentiation of amacrine and horizontal cells. APP is part of a gene family and its paralogue amyloid precursor-like protein 2 (APLP2) has both shared as well as distinct expression patterns to APP, including in the retina. Given the impact of APP in the retina we investigated how APLP2 expression affected the retina using APLP2 knockout mice (APLP2-KO).

**Results:** Using histology, morphometric analysis with noninvasive imaging technique and electron microscopy, we showed that APLP2-KO retina displayed abnormal formation of the outer synaptic layer, accompanied with greatly impaired photoreceptor ribbon synapses in adults. Moreover, APLP2-KO displayed a significant decrease in ON-bipolar, rod bipolar and type 2 OFF-cone bipolar cells (36, 21 and 63 %, respectively). Reduction of the number of bipolar cells was accompanied with disrupted dendrites, reduced expression of metabotropic glutamate receptor 6 at the dendritic tips and alteration of axon terminals in the OFF laminae of the inner plexiform layer. In contrast, the APP-KO photoreceptor ribbon synapses and bipolar cells were intact. The APLP2-KO retina displayed numerous phenotypic similarities with the congenital stationary night blindness, a non-progressive retinal degeneration disease characterized by the loss of night vision. The pathological phenotypes in the APLP2-KO mouse correlated to altered transcription of genes involved in pre- and postsynaptic structure/function, including CACNA1F, GRM6, TRMP1 and Gα0, and a normal scotopic a-wave electroretinogram amplitude, markedly reduced scotopic electroretinogram b-wave and modestly reduced photopic cone response. This confirmed the impaired function of the photoreceptor ribbon synapses and retinal bipolar cells, as is also observed in congenital stationary night blindness. Since congenital stationary night blindness present at birth, we extended our analysis to retinal differentiation and showed impaired differentiation of different bipolar cell subtypes and an altered temporal sequence of development from OFF to ON laminae in the inner plexiform layer. This was associated with the altered expression patterns of bipolar cell generation and differentiation factors, including MATH3, CHX10, VSX1 and OTX2.

(Continued on next page)

\* Correspondence: frederic.mascarelli@inserm.fr

Virginie Dinet and Giuseppe D. Ciccotosto are co-first authors.

Roberto Cappai and Frédéric Mascarelli are co-senior authors.

<sup>†</sup>Equal contributors

<sup>1</sup>Centre de Recherche des Cordeliers, Université Paris Descartes, Université Pierre et Marie Curie, Paris, France

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



(Continued from previous page)

**Conclusions:** These findings demonstrate that APLP2 couples retina development and synaptic genes and present the first evidence that APLP2 expression may be linked to synaptic disease.

**Keywords:** Amyloid precursor protein, Amyloid precursor-like protein 2, Synapses, Synaptopathy, Differentiation, Congenital stationary night blindness, Transcription

## Background

The amyloid precursor protein (APP) is known to play, together with its proteolytic fragments, numerous and varied roles in cell physiology and pathology, including in Alzheimer disease [1–4]. The amyloid precursor-like protein 2 (APLP2) belongs to the APP gene family. Phylogenetic analysis suggests the functions of APP, APLP1 and APLP2 have diverged after duplication to mediate distinct neuronal actions [5]. Our knowledge of the physiological and pathophysiological functions of APLP2 remains poor relative to APP functions, and no neuronal pathology has been definitively associated with APLP2. In contrast, APLP2 has recently been identified as one of the myopia genes and APLP2-KO mice develop high degrees of hyperopia [6]. APLP2 expression patterns during brain development suggest an important role in maturation of specific neuronal subtypes in the central nervous system (CNS) [7–9]. However, the expression or role of APLP2 in the developing and adult retina, and whether there is functional redundancy between APLP2 and APP in the retina, is not known.

As part of the CNS, the neural retina is arranged in well-defined laminar structures. Photoreceptors (rods and cones) transmit visual information to ganglion cells via bipolar cells. In the “classical” rod pathway, rods feed into rod bipolar cells that provide input to both the ON and OFF pathway via AII/glycinergic amacrine cells. The rod bipolar cell light-evoked response is initiated by a decrease in glutamate occupancy of mGluR6, which decreases its G-protein activity culminating in the opening of the TRPM1 channel [10–12]. The mGluR6-mediated modulation of TRPM1 also is known to require several other proteins including  $G\alpha_o$  and GRP179 [12–16] and other known components with unresolved function including Nyctalopin and LRIT3 [17]. Most of these proteins are localized at the dendritic tips of ON-bipolar cells. In adult mice, APP is expressed in horizontal, bipolar, amacrine and ganglion cells and on the two retinal synaptic layers: inner plexiform layer (IPL) and outer plexiform layer (OPL) [18, 19]. The IPL contains bipolar-ganglion cell connections and modulatory amacrine conventional synapses. We showed that APP is necessary for the differentiation of AII amacrine cells [18]. The OPL contains the ribbon synapses between photoreceptor cells and the bipolar and horizontal interneurons. Defects at these synapses led to congenital stationary night blindness (CSNB).

CSNB encompasses a group of genetically and clinically heterogeneous retinal disorders that primarily affect night vision. The non-progressive night vision loss is present at birth and there is no cure for CSNB. The prevalence of CSNB is approximately 1 in 10,000 [20]. CSNB is caused by mutations in seventeen identified genes with an unknown number yet to be identified and inherited in an autosomal dominant, autosomal recessive or X-linked recessive manner [21–23]. Clinically, CSNB is classified as the Riggs type and the Schubert-Bornschein type based on specific waveforms on the electroretinogram (ERG). The rare Riggs type is characterized by decreased scotopic a-wave amplitude in keeping with rod photoreceptor dysfunction and by normal cone system [24]. This should be distinguished from the Schubert-Bornschein type of ERG abnormalities in which scotopic a-wave amplitude is normal [25]. The Schubert-Bornschein type is divided into two sub-types, complete CSNB (cCSNB or CSNB1), associated with a drastically reduced or completely abolished scotopic b-wave response, because of a failure to transmit the photoreceptor signal through the ON bipolar cells, and incomplete CSNB (iCSNB or CSNB2), which is associated with a reduced scotopic b-wave and reduced photopic cone responses indicating ON- and OFF-bipolar cell dysfunction [26]. cCSNB has been associated with mutations in genes that encode postsynaptic proteins which are required for the signal transduction cascade responsible for bipolar cell depolarization, including *GRM6*, *TRPM1*, *GRP179*, *NYX* and *LRIT3* [27–33]. Mutations in *CACNA1F* were identified in patients with iCSNB [34, 35]. *CACNA1F* encodes the  $\alpha 1F$  subunit of the L-type voltage-gated  $Ca^{2+}$  channel,  $Ca_v1.4$ , and is located at the photoreceptor ribbon synapse. Abnormal synapses in the outer nuclear layer (ONL) detected by a noninvasive imaging technique using optical coherence tomography (OCT) have been observed in some cases of iCSNB [36], while thinning of the ganglion cell layer (GCL), IPL and inner nuclear layer (INL) in other iCSNB cases [37]. Mutations in *CABP4*, encoding a  $Ca^{2+}$ -binding protein located in photoreceptor synaptic terminals and associated with  $Ca_v1.4$ , lead to autosomal recessive iCSNB [38]. Most of the cases associated with *CABP4* mutations have recently been shown to display high hyperopia [39, 40]. A minority of iCSNB patients have impaired night vision compared to cCSNB [41] and they have less severely

impaired night vision and have a more variable phenotype with respect to the visual acuity, refractive error (myopia/hyperopia) and the b/a wave amplitude ratios of the scotopic ERG than those with cCSNB [41]. In mouse models of iCSNB, both hypo- and hyperactivated channels accomplished respectively by deletion of *CABP4* and the *Cacna1f* I745T mutation lead to similar ERG alterations, visual impairments and an improper maturation of the synapse architecture [42, 43], indicating that impaired retinal synaptogenesis may contribute to vision impairment in iCSNB.

Although different genes responsible for the pathogenic mechanisms of CSNB have been identified, further studies are needed to clarify the molecular mechanisms of the disease. For CSNB patients in whom the genetic causes are still to be discovered, mutations are likely to be found in genes that function in photoreceptor pre- and postsynaptic processes that affect retinal transmission. It was suggested that *BHLHB4*, *MATH5*, or *PRDM8*, which encode three transcription factors required for either maturation of rod bipolar cells or differentiation of several bipolar cell subtypes, may be candidate genes for CSNB [44, 45]. Recently, the differentiation factor of rod bipolar cells, *PRDM8*, was presented as a candidate gene for CSNB [46], reinforcing the importance to study the mechanisms of bipolar cell differentiation for elucidating the pathological events involved in CSNB. A canine pedigree of cCSNB where the ON-bipolar cell function is compromised has been recently characterized [47]. In this study all known CSNB genes have been excluded, suggesting the existence of still to be identified genes involved in the disease process.

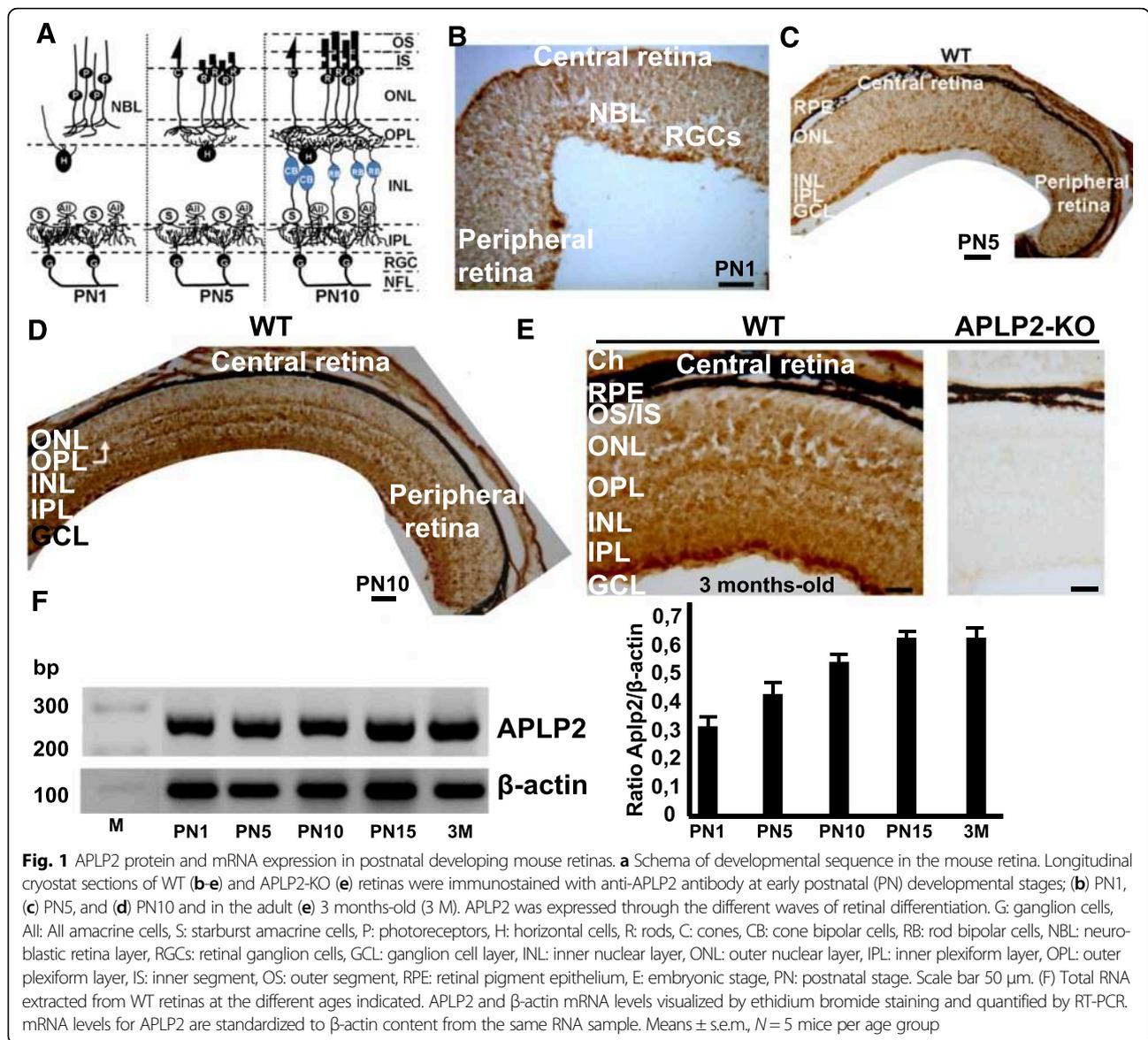
Given the role of APLP2 in synapse function in adult brain and peripheral nervous system (PNS) [3, 48], and the effect of APP on the differentiation of AII amacrine cells [18], we investigated the role of APLP2 in synaptic lamination in the adult retina using APLP2-KO mice. APLP2-KO mice display no signs of retinal degeneration in young and adult. In this study, the lack of APLP2 expression resulted in numerous phenotypic similarities to CSNB. APLP2-KO retina had a nonprogressive reduction of the scotopic ERG b-wave and the photopic cone responses. This was associated with an affected OPL structure comprising impaired presynaptic photoreceptor ribbon complex and a postsynaptic element of ON and OFF-bipolar cells resembling iCSNB. We describe for the first time the role of APLP2 in neuronal differentiation which involves regulating the temporal expression of a combination of intrinsic factors implicated in the control of bipolar cell generation (early postnatal) and differentiation (late postnatal) during development, and in pre and postsynaptic structure/function in adults. APLP2 may be a link between retina development and synaptic genes involved in the pathogenic events in CSNB.

## Results

### Laminar expression of APLP2 in postnatal developing and adult retinas

Developmental expression of APLP2 was examined by immunohistochemistry on WT neural retinas. During postnatal development, retinal ganglion cells (RGCs) and amacrine cells are the first cells to differentiate and form the IPL (Fig. 1a). Then, horizontal cells and photoreceptors differentiate and contact each other in the outer retina, forming the OPL. Later, the vertical networks are interconnected when bipolar cells are generated and connections with ganglion cells are established. At postnatal day (PN) 1, strong APLP2 immunostaining was detected in the ganglion cell layer (GCL), which harbours RGCs, whereas weaker but uniform APLP2 immunostaining was observed in the neuroblastic layer (NBL) (Fig. 1b). At PN5, the APLP2 immunostaining remained strong in the GCL and INL, where differentiating amacrine and bipolar cells are located (Fig. 1c). At PN10, the GCL, INL and OPL, which contains the presynaptic ribbon complex of the photoreceptors and the postsynaptic plexus of the bipolar cells, were all intensely stained (Fig. 1d). However, in the IPL, which is composed of conventional synapses between RGCs and amacrine and bipolar cells, APLP2 immunostaining was heterogeneous. In adult retina, the GCL, IPL, INL and OPL immunostaining for APLP2 remained strong, whereas APLP2 immunostaining was weak in the photoreceptor layer (Fig. 1e, left panel). Control experiments with the anri-APLP2 antibody on retinal sections of APLP2-KO showed no APLP2 immunostaining (Fig. 1e, right panel). RT-PCR analysis showed that APLP2 mRNA levels from whole retina increased during the retinal differentiation period from PN1 to PN15, then plateauing at adult age (Fig. 1f).

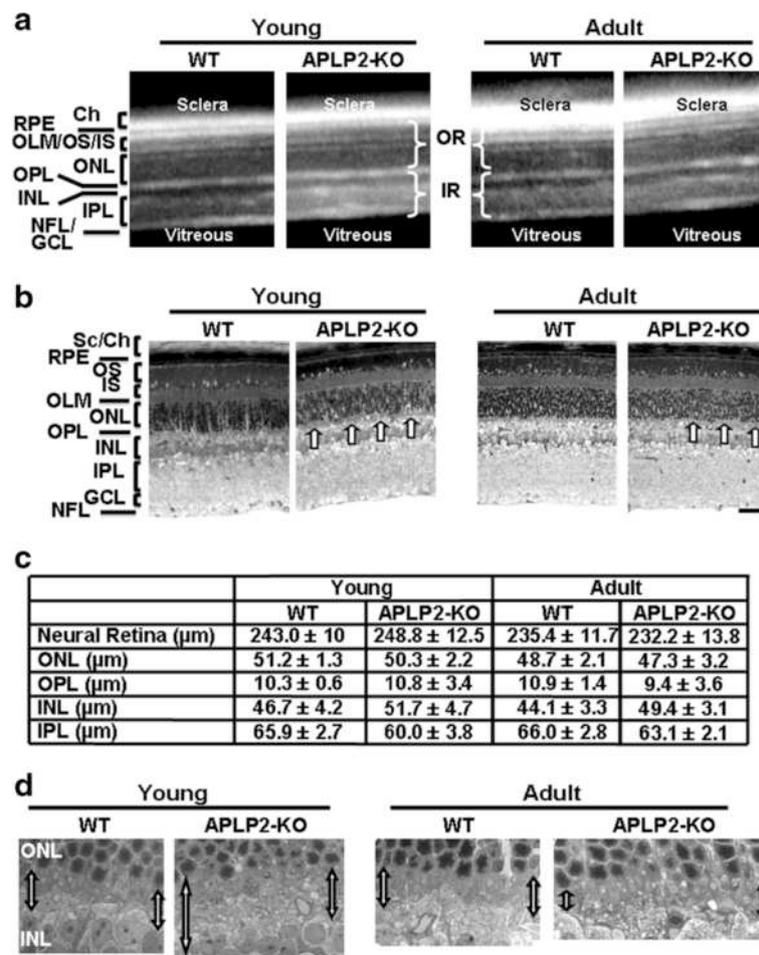
Using a panel of antibodies against specific markers of retinal cell subtypes, we showed that APLP2 colocalized with RGCs, amacrine (starburst and AII), rod bipolar and horizontal cells in adult retina (Additional file 1: Figure S1A-F). In the IPL, APLP2 colocalized with the three calretinin-labeled laminae including the upper and lower laminae which correspond to the OFF and ON starburst cell plexuses respectively (Additional file 1: Figure S1C) and with the two strata S2 and S4 bands of the cholinergic synapses (Additional file 1: Figure S1D). In the OPL, APLP2 colocalized with VGLUT1, the only vesicular glutamate transporter located in the ribbon synapses of photoreceptors (Additional file 1: Figure S1F) and with PSD95, located presynaptically at photoreceptor synapses (cone pedicles and rod spherules) (Additional file 1: Figure S1G). Moreover, co-immunostaining with anti-APLP2 and anti-APP antibodies showed that APLP2 colocalized with APP in all synaptic and nuclear layers of neural retina (Additional file 1: Figure S1I-M).



### Deletion of APLP2 alters the structure of the OPL

We investigated retinal structure in APLP2-KO by spectral domain optical coherence tomography (SD-OCT), histology and transmission electron microscopy (TEM) in young and adult mice. The SD-OCT images showed an identical laminar organization in the inner and outer retina in young APLP2-KO and WT (Fig. 2a) mice since the thicknesses of the total neural retina, inner retina (inclusive of GCL, IPL and INL) and outer retina (inclusive of OPL, ONL, OLM/IS/OS) were not significantly different (Additional file 1: Table S2). Semithin histological sections confirmed that the gross laminar structure of the retina was similar between the two genotypes (Fig. 2b). In contrast, the profile of the OPL was irregular in APLP2-KO as compared to its uniform thickness in WT (Fig. 2b, arrows). CNSB and X-linked

retinoschisis (XRLS) are two main retinal disorders specifically affecting the OPL. Both disorders show altered ERG b-wave, but XLRs is progressive [49–51], while CSNB is stationary. Moreover, XLRs is characterized by a cystic degeneration of the retina, leading to a split of retinal layers and frequently accompanied with retinal pigment epithelium (RPE) atrophy and retinal detachment during adulthood. SD-OCT images (Fig. 2a) showed that overall, retinal morphology did not change over time. No focal lesions from the retinal pigment epithelium (RPE)/Bruch's membrane complex to the GCL/NFL were observed in adult mice. No retinal detachments were observed (Fig. 2b). At high magnification (6200-8700x magnification), TEM of the RPE, in association with the photoreceptor outer segments, showed normally developed RPE with elongated apical processes into the

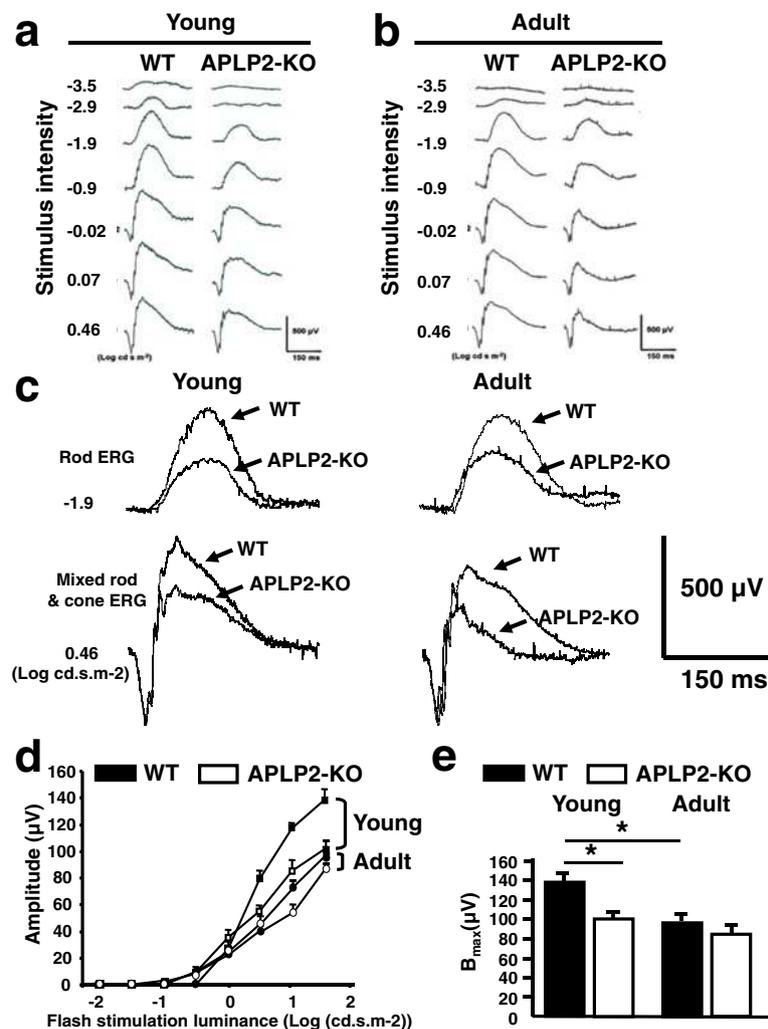


**Fig. 2** The laminar structure of the retina was similar between WT and APLP2-KO except for the OPL. **a** SD-OCT sections revealed no gross alteration of the young and adult retinas. **b** Ex vivo histology of 80 nm-thick resin retina sections showed an irregular OPL (arrows) in the young and adult APLP2-KO. **c** Thicknesses of major retinal layers in WT and APLP2-KO young and adult retinas determined using Visilog 6.4 version software (Noesis). Mean  $\pm$  s.e.m.,  $N = 4$  mice per genotype. **d** Electron micrographs showed an irregular thickness and pathological aspect of the OPL in young and adult APLP2-KO

interphotoreceptor space for WT and APLP2-KO (Additional file 1: Figure S2 A-D). The presence of phagosomes, newly engulfed by the RPE, is predicted to be the product of functional light-induced phagocytosis of the distal tip of the photoreceptor outer segment by the RPE cells. The TEM micrographs of longitudinal sections confirmed the absence of RPE atrophy and retinal detachment in adult APLP2-KO. RPE flatmounts visualized by phalloidin staining showed a uniform hexagonal array of the F-actin cytoskeletal network in WT and APLP2-KO (Additional file 1: Figure S2 E and F). Taken together, these data show a well-structured RPE/choroid complex in APLP2-KO mice.

The thicknesses of the total neural retina, inner retina and outer retina were not significantly different between young and adult APLP2-KO (Additional file 1: Table S2). The gross laminar structure of the retina was similar between the two genotypes at all ages examined (Fig. 2b).

Morphometric analysis of semithin histological sections showed a comparable thickness of the neural retina in both groups of age of APLP2-KO (Fig. 2c) confirming SD-OCT data, while the photoreceptor cell nuclei number was similar between the two genotypes in both groups of age (Additional file 1: Table S2). We saw no differences between WT and APLP2-KO retinas when comparing the number of cones stained for cone arrestin (Additional file 1: Table S2). The average OPL thicknesses were not different between WT and APLP2-KO, although width of OPL was irregular in APLP2-KO (Fig. 2b arrows and c). High-magnification (1650 x magnification) TEM micrographs of longitudinal sections confirmed the irregular width in the OPL of the APLP2-KO compared to WT for both groups of age (Fig. 2d). Taken together, these data indicate that loss of APLP2 leads to a discrete stationary structural alteration of the OPL thickness.



**Fig. 3** APLP2-KO mice have a nonprogressive defect in retinal responses postsynaptic to rod photoreceptors and cone circuitry function. Representative voltage traces from flash ERG recording in young (**a**) and adult (**b**) dark-adapted WT (left column) and APLP2-KO (right column) mice. Numbers on left of the traces correspond to the luminances ( $\log \text{cd.s.m}^{-2}$ ) of the flashes that elicit these responses. The scale indicates 150 ms and 500  $\mu\text{V}$ . **c** Examples of comparisons of responses obtained from WT and APLP2-KO mice are illustrated by superimposing the respective traces obtained from these two mouse genotypes. Responses to low-intensity stimuli ( $-1.9 \log \text{cd.s.m}^{-2}$  under dark adaptation) and responses to high-stimuli ( $0.46 \log \text{cd.s.m}^{-2}$  under dark adaptation). **d** Amplitude of the cone ERG b-wave in young (square symbol) and adult (round symbol) APLP2-KO (white symbols) and WT (black symbols). **e** Maximal b-wave amplitude ( $B_{\max}$ ) in young and adult APLP2-KO (white bars) and WT (black bars). Means  $\pm$  s.e.m.,  $N = 6$  mice per age group. \*,  $p < 0.05$ . (*t*-test)

### Impaired photoreceptor-bipolar cell synaptic transmission in APLP2-KO

Due to the similarities between APLP2-KO mice and CSNB in the phenotypic features of the OPL, we hypothesized APLP2-KO mice have dysfunction in the transmission pathway from photoreceptors to bipolar cells. Therefore, we tested our hypothesis by assessing retinal function under scotopic conditions, using ERG in APLP2-KO. Figure 3a shows a series of representative ERGs of young WT and APLP2-KO mice recorded under dark-adapted conditions to flash stimuli that cover a 4-log-unit range of intensity. The scotopic ERG of WT mice shows a typical a- and b-wave pattern. At all intensities, the ERG

included a positive-polarity b-wave, which represent the summed activity of rod bipolar cells, while at the higher intensities, the ERG also included a negative a-wave that is generated by the light-induced closure of cGMP-gated ion channels along the rod photoreceptor outer segments. Under a dim light (low flash intensity:  $-3.5 \log \text{cd.s.m}^{-2}$ ), a b-wave with a subnormal amplitude was observed in young APLP2-KO (Fig. 3a and Additional file 1: Figure S3A). Under intermediate and bright flash intensities, the b-wave was markedly reduced in amplitude in APLP2-KO compared to WT. At the higher intensities, the a-wave of young APLP2-KO appeared normal. Superimposing the ERGs recorded at a flash intensity of  $-1.9 \log \text{cd.s.m}^{-2}$  and

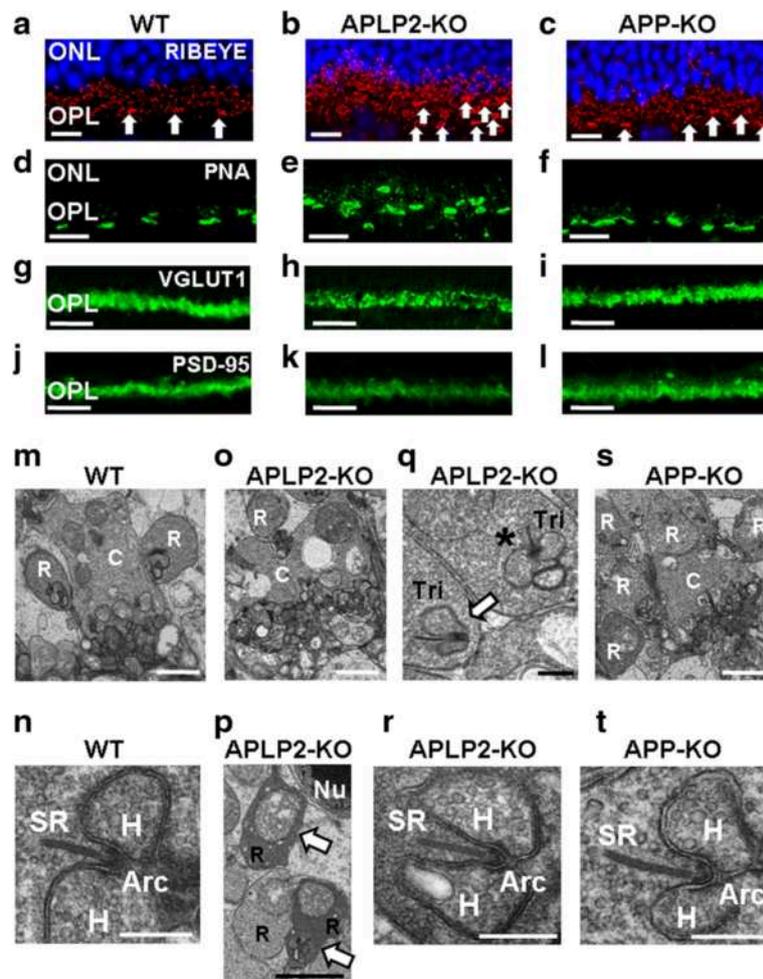
0.46 log cdsm<sup>-2</sup> evoking a rod response and a combined rod-cone response, respectively, highlighted the difference in b-wave amplitude in young APLP2-KO and WT (Fig. 3c). The average data at all flash intensities show that the ERG a-wave was similar in young APLP2-KO and WT in amplitude (Additional file 1: Figure S3A) and implicit time (Additional file 1: Figure S3C). In contrast, the ERG b-wave amplitude was reduced in young APLP2-KO (Additional file 1: Figure S3A). However, the b-wave implicit time was not altered in APLP2-KO compared to WT (Additional file 1: Figure S3C). The maximal b-wave amplitude was significantly ( $p < 0.05$ ) reduced in APLP2-KO (866 ± 191 μV) compared to WT (1218 ± 115 μV) with no alteration in half saturation luminance ( $K$ ) or the slope of the b-wave sensitivity curve ( $n$ ) (Additional file 1: Figure S3E). When b-wave amplitudes were normalized by calculating the b/a-wave ratio, we observed that values from young APLP2-KO were significantly lower at the brightest flash intensity (b/a: 2.9 vs. 1.9 in WT vs. APLP2-KO, respectively). These data indicate the lack of APLP2 affects the amplification gain of synaptic transmission from the photoreceptors to the bipolar cells, whereas the photo-transduction in rod photoreceptors is not affected. To establish whether ERG deficits of APLP2-KO were stationary or progressive, we repeated the scotopic ERGs in adults. Figure 3b shows a series of representative ERGs of adult WT and APLP2-KO mice. Superimposing the ERGs recorded at a flash intensity of -1.9 log cdsm<sup>-2</sup> and 0.46 log cdsm<sup>-2</sup> highlighted the difference in b-wave amplitude in adult APLP2-KO and WT (Fig. 3c). The average data show that the ERG-a wave of adult APLP2-KO was comparable with WT (Additional file 1: Figure S3B and D), indicating that photoreceptor functions remained normal in APLP2-KO overtime. Therefore, we excluded APLP2-KO as a model of the Riggs type. ERG b-wave responses of APLP2-KO declined in amplitude at the same rate in adult and young compared to WT of the same age (compare Additional file 1: Figure S3A with Additional file 1: Figure S3B), with no alteration in the  $K$  and  $n$  parameters (Fig. 3e). In adults, the maximal b-wave amplitude was significantly ( $p < 0.05$ ) reduced in APLP2-KO (772 ± 155 μV) compared to WT (1135 ± 211 μV) (Additional file 1: Figure S3E). At the brightest flash intensity, the b/a-wave ratio was significantly reduced in adult APLP2-KO compared to adult WT (b/a: 2.5 vs. 1.9 in WT vs. APLP2-KO, respectively), while similar in young and adult APLP2-KO. Therefore, we hypothesized that APLP2-KO resemble the incomplete form of the Schubert-Bornschein type of CSNB.

The cone photopic ERG is moderately altered in iCSNB patients, while markedly reduced in cCSNB [52, 53]. Therefore, we investigated the cone circuitry function under photopic (light adapted) conditions to confirm APLP2-KO as a model of iCSNB. Because photopic a-waves are negligible in mice [54], the amplitude and implicit time of the

photopic b-waves were measured. The cone-mediated responses were recorded at a range of light intensities (-1.5 log to 1.5 log cds/m<sup>-2</sup>). With increasing flash intensities, the b-wave amplitude increased incrementally in both age groups but the maximal cone b-wave amplitude was significantly ( $p < 0.05$ ) reduced in adult (97.1 ± 8.9 μV) compared to young WT (138.5 ± 8.5 μV) (Fig. 3d), consistent with age-related declines in cone function in C57BL/6 mice [55, 56]. In young, the maximal b-wave amplitude was significantly reduced ( $p < 0.05$ ) in APLP2-KO (100.3 ± 7.8 μV) compared to WT (138.5 ± 8.5 μV) (Fig. 3d), indicating cone-mediated pathway dysfunction in young APLP2-KO. However, the b-wave implicit time was not altered in APLP2-KO compared to WT (data not shown). Moreover, the maximal amplitude of the cone ERG b-wave were comparable in both age groups for APLP2-KO mice (103 ± 7.8 μV vs. 87.7 ± 11.4 μV in young vs. adult, respectively) (Fig. 3e), indicating a non-progressive phenotype of APLP2-KO for cone dysfunction. Altogether these data indicate that loss of APLP2 in young and adult mice leads to an electrophysiological defect in retinal circuitry from the photoreceptors (rods and cones) to the bipolar cells resembling the iCSNB.

#### **APLP2 is necessary for proper presynaptic ribbon and postsynaptic triad morphology of adult OPL**

Ca<sub>v</sub>1.4-KO mice show altered localization in the OPL of presynaptic proteins, including RIBEYE and PSD95, and impaired distribution of PNA-labeled cone pedicles [57]. Further characterization of the OPL alteration in adult APLP2-KO mice was initially achieved using confocal microscopy and presynaptic marker antibodies to identify the photoreceptors. Four to six rows of RIBEYE-labeled rod ribbon and one row of clustering of RIBEYE at cone synaptic terminals (pedicles) were present in WT (Fig. 4a). In contrast, up to ten misaligned rows of disorganized rod ribbon synapses were detected in APLP2-KO OPL, suggesting the laminar restriction of rod presynaptic terminals (spherules) was compromised (Fig. 4b). The majority of RIBEYE-labeled ribbons showed non-accurate and punctuate-shaped structures, indicating signs of collapse of photoreceptor ribbons. Moreover, ectopic localization of RIBEYE-labeled structures was readily detected in large and numerous foci in the ONL (Fig. 4b). The laminar organization of the pedicles was also altered in APLP2-KO (Fig. 4b, arrows). While the RIBEYE staining in the APP-KO OPL was similar to WT, faint loci of RIBEYE-stained photoreceptor ribbon were observed deep within the ONL in APP-KO (Fig. 4c). In WT retina, one row of faint, aligned and regularly spaced horizontal (fluorescent-conjugated peanut agglutinin) PNA-stained cone pedicles was detected in the OPL (Fig. 4d). In contrast, PNA staining in APLP2-KO retina revealed the laminar restriction of



**Fig. 4** Morphology, location and ultrastructure of the ribbon photoreceptor presynaptic terminals in the adult retina differed dramatically between WT, APLP2-KO and APP-KO. **a-l** Longitudinal cryostat sections of retinas immunostained for **(a-c)** RIBEYE, **(d-f)** PNA, **(g-i)** VGLUT1 and **(j-l)** PSD-95 from **(a, d, g and j)** WT, **(b, e, h and k)** APLP2-KO and **(c, f, i and l)** APP-KO mice. **a-c** Arrows indicate cone pedicles. **m-t** Electron micrographs of longitudinal sections of **(m and n)** WT, **(o-r)** APLP2-KO and **(s and t)** APP-KO. Arrows indicate rod spherules which displayed a densely stained retracting morphology **(p)** and triads laterally oriented **(q)**, instead of facing the OPL (asterisk). Cone terminal (C), rod terminal (R), synaptic ribbon (SR), Tri (triad), Arciform density (Arc). Scale bars: 15  $\mu$ m **(a-c)**; 20  $\mu$ m **(d-l)**; 2  $\mu$ m **(m,o,p,s)**; 0.5  $\mu$ m **(n,q,r,t)**

cone pedicles was compromised (Fig. 4e). The PNA staining in APP-KO was similar to WT (Fig. 4f). We also monitored the expression of VGLUT1. VGLUT1 immunostaining was regular and dense in the OPL of WT and APP-KO (Fig. 4g and i). In contrast, APLP2-KO OPL had irregular VGLUT1 immunostaining (Fig. 4h). PSD-95 is used as a common marker for the photoreceptor presynaptic terminals [58] and has an atypical distribution in ribbon synapses. We observed a regular immunostaining pattern for PSD-95 in the OPL of WT and APP-KO (Fig. 4j and l). However, PSD-95 immunostaining was diffuse in the APLP2-KO OPL (Fig. 4k).

We next used TEM (16 K - 41 K x magnification) to monitor the photoreceptor terminals at the ultrastructure level. In the WT OPL region, the cone pedicles contained multiple triads composed of two lateral horizontal processes

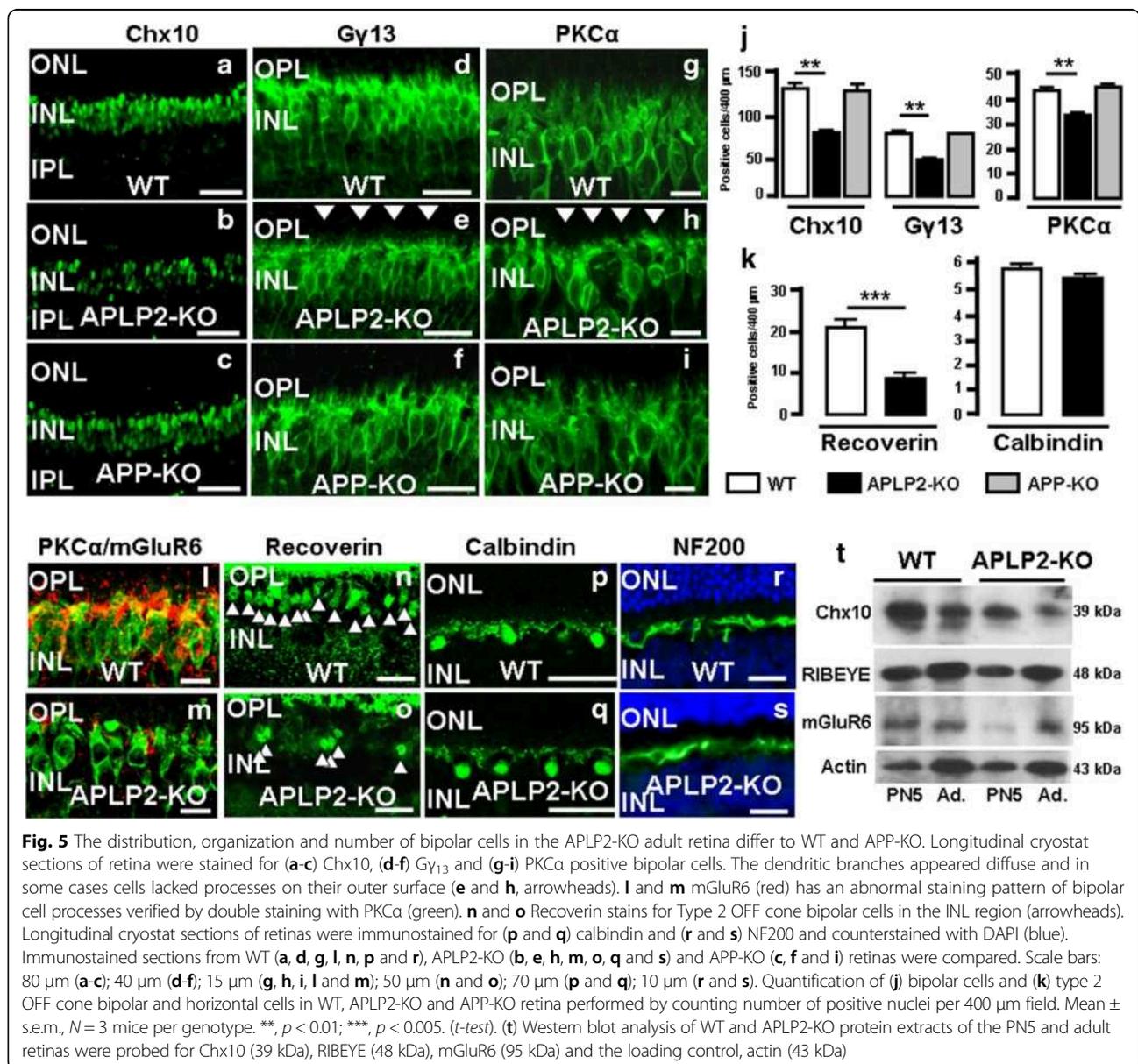
flanking a central bipolar cell dendrite (Fig. 4m). The majority of the rod spherules contained a unique long presynaptic ribbon and a visible arciform density at its base (Fig. 4n). In APLP2-KO, cone pedicles were irregular in shape and completely disorganized (Fig. 4o). Many rod spherules also displayed a densely stained retracting morphology (Fig. 4p, arrows). Moreover, many triads were misaligned and turned such that the presynaptic ribbon and the two lateral horizontal cells were laterally oriented (Fig. 4q, arrow), instead of facing the OPL (Fig. 4q, asterisk). At higher magnification (64 K x magnification), TEM of the few well-organized APLP2-KO synapses showed a unique long ribbon and a visible arciform density at its base (Fig. 4r), akin to WT synapses (Fig. 4n). In APP-KO, although the cones pedicles were not as well organized as in WT, they contained multiple well-developed triads (Fig. 4s). Higher magnification

showed that the rod spherules still had a normal overall photoreceptor terminal architecture (Fig. 4t). Similar alterations of the presynaptic ribbon synapse and postsynaptic triad morphology, including disorganized rod spherules with misoriented synaptic ribbons (Additional file 1: Figure S4C and E, arrows), and irregular cone pedicles (Additional file 1: Figure S4D), were observed in young APLP2-KO.

**APLP2 is necessary for the proper generation of bipolar cells and their dendritic branching and not horizontal cells**

Next, we investigated alterations of the postsynaptic bipolar and horizontal cells in adult retinas by immunohistochemistry. Anti-Chx10 antibody, which specifically labels all the bipolar cells in adult retina, revealed large

stained Chx10 nuclei of bipolar cells in the INL of all genotypes (Fig. 5a-c). Quantifying the number Chx10-positive cells identified a significant decrease (41.6 %) in APLP2-KO compared to WT, with no change in APP-KO (Fig. 5j).  $G\gamma_{13}$ , a specific marker for ON bipolar cells (rod bipolar and cone bipolar cells (types 5a and 5b and types 6–9)) stained three rows of ON bipolar cell somas in the WT INL (Fig. 5d). In comparison, APLP2-KO had only one or two rows of ON bipolar cell somas (Fig. 5e) and the number of  $G\gamma_{13}$ -positive ON bipolar cells was significantly reduced (36.4 %) in the INL (Fig. 5j). In addition, the APLP2-KO  $G\gamma_{13}$  labeled dendritic branches appeared diffuse and in some cases the cells appeared without processes on their outer surface (Fig. 5e,

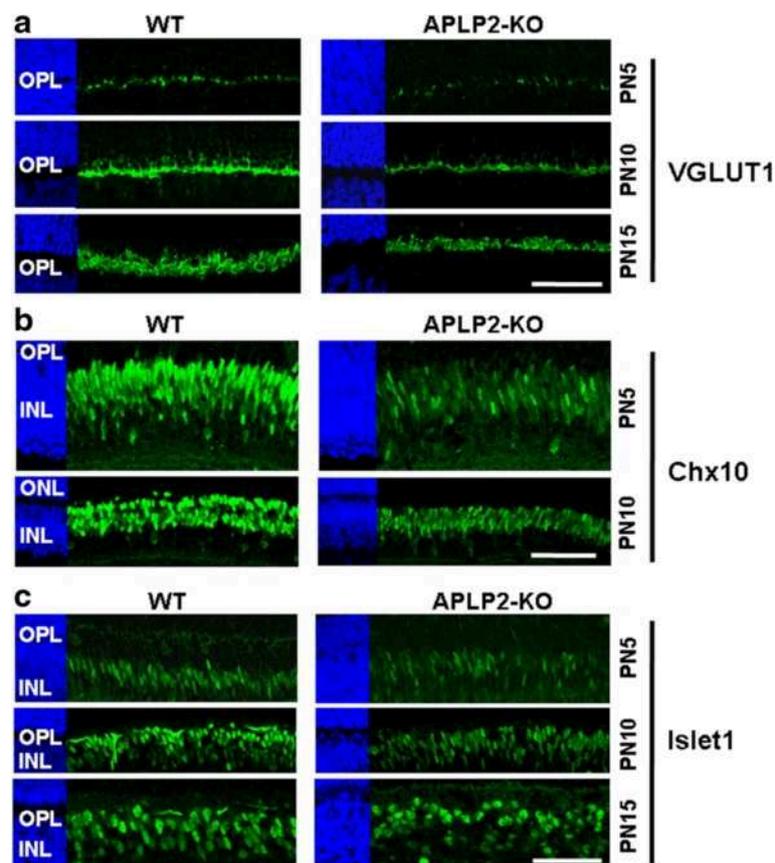


arrowheads). In contrast, the ON bipolar cell soma row structure, cell number and profuse dendritic branching was similar between APP-KO and WT retina (Fig. 5d, f and j). Rod bipolar cells, which were identified by PKC $\alpha$  staining, displayed a regular laminar structure in WT retina (Fig. 5g), while APLP2-KO rod bipolar cell somas were less structured and had a disorderly arrangement (Fig. 5h). There was a significant reduction (21.4 %) in the number of PKC $\alpha$ -positive rod bipolar cells in APLP2-KO compared to WT (Fig. 5j) and the dendritic branches were also less profuse (Fig. 5h, arrowheads). Unlike APLP2-KO, the rod bipolar cell soma structure, content and dendritic arborization was similar between APP-KO and WT (Fig. 5g, i and j). Since the rod bipolar cells utilize a metabotropic pathway to sense light-induced variations in photoreceptor glutamate release, we double immunostained for the metabotropic glutamate receptor mGluR6 and PKC $\alpha$  in the retina. The mGluR6 co-localized to the dendritic tips of rod bipolar cells in WT retina, but in the APLP2-KO retina, the mGluR6 staining was substantially diminished (Fig. 5l and m respectively). We also found differences in the distribution and number of recoverin-positive type 2 OFF-cone bipolar cell somas between WT INL, which appeared in a regular manner, while in the APLP2-KO INL, they were significantly fewer positively stained cells (63.4 % reduction; Fig. 5n and o, arrowheads, k). In contrast to bipolar cells, we saw no differences between WT and APLP2-KO retinas when comparing the number and morphology of horizontal cell somas stained for calbindin (Fig. 5k, p and q respectively) or in the morphology of the horizontal cell axons in the OPL region when staining with anti-neurofilament 200 (Fig. 5r and s). APLP2-KO retinas showed altered synapses with either mislocation (e.g. RIBEYE) or reduced expression (e.g. mGluR6) of synaptic components associated with reduced number of Chx10-positive bipolar cells. Therefore, we performed Western blotting that compares the levels of Chx10 and the two synaptic markers RIBEYE and mGluR6 in WT and APLP2 KO differentiated retinas (Fig. 5t). Western blot analysis showed reduced levels of Chx10 in protein extracts of PN5 and adult APLP2-KO mice compared with WT mice and thus confirms the microscopy and cell counting data showing reduced numbers of bipolar cells in APLP2 compared with WT mice (Fig. 5t and Additional file 1: Table S2). We observed reduced levels of mGluR6 and increased levels of RIBEYE in adult APLP2-KO compared with WT and thus confirm the microscopy observations. Moreover, we observed reduced levels of mGluR6 and increased levels of RIBEYE levels in PN5 APLP2-KO compared with WT (Fig. 5t and Additional file 1: Table S2), suggesting synaptic alteration during postnatal development in APLP2-KO retinas.

#### **APLP2 is required for the differentiation of bipolar cells during post-natal development through the correct combination of differentiation transcription factors**

CSNB is present at birth. It was recently suggested that impaired development of photoreceptor synapses associated with defect in synaptic transmission contributes to vision impairment in two mouse models of iCSNB [42]. Therefore, we hypothesized APLP2-KO have defects in the development of the OPL. First, we examined APLP2-KO retinas during development. Histological examination of APLP2-KO retinas from E14 to PN1 showed a normal structural organization of the retinas (Additional file 1: Figure S5 A-C). In WT PN5, the photoreceptors initiate ribbon synapse formation [59] and the OPL begins to form (Additional file 1: Figure S5D), however in APLP2-KO the OPL remained undefined (Additional file 1: Figure S5E).

Then, we investigated whether the observed delay in the development of the APLP2-KO OPL may be secondary to abnormal cell differentiation using markers for postnatal retina differentiation. We initially looked at VGLUT1 expression because it provides a distinct temporal sequence ordering between cones and rods in developing mouse OPL [59]. In WT retina at PN5, VGLUT1 was first expressed with the onset of synaptogenesis in cone pedicles, when they invaded the OPL, yet fewer VGLUT1-positive cone terminals were observed in APLP2-KO (Fig. 6a, upper panel). At PN10, intense VGLUT1 immunostaining was observed in WT retina when the rod spherules invaded the OPL, whereas VGLUT1 immunostaining was weak and thin in APLP2-KO (Fig. 6a, middle panel). By PN15, the mouse retina is fully differentiated into its three nuclear layers and two plexiform layers. The OPL in PN15 WT retina showed a bright and intense band of VGLUT1-positive cone and rod terminals, whereas VGLUT1 immunostaining was weak and diffuse in APLP2-KO (Fig. 6a, lower panel). The observed delay in postnatal development of photoreceptor presynaptic terminals in the APLP2-KO retina was confirmed by the significant decrease in the brightness intensity level quantitated for VGLUT1 immunostaining at each PN5, PN10 and PN15 age group examined (Additional file 1: Table S3). Moreover, we investigated defects in the differentiation of bipolar cells during retinal development. Chx10 is the earliest known pan-bipolar cell marker and its levels peak during bipolar differentiation and persist through adulthood [60, 61]. At PN5 and PN10, Chx10 immunostaining levels in APLP2-KO were weaker in the INL (Fig. 6b), and the number of Chx10-positive nuclei of bipolar cells was significantly decreased by 55.1 and 33.4 % at PN5 and PN10 respectively as compared to WT (Additional file 1: Table S3). This was consistent with findings in the Western blot analysis (Fig. 5t). Islet1 expression was also

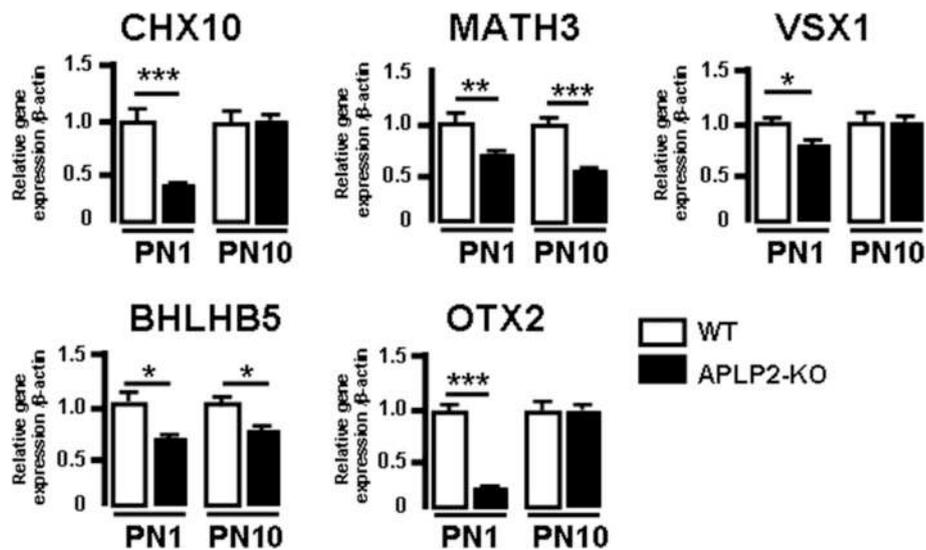


**Fig. 6** Bipolar and amacrine cell defects in APLP2-KO retina during postnatal development. Longitudinal cryostat sections of retinas from indicated times (PN5, PN10 or PN15) immunostained for (a) VGLUT1, (b) Chx10, (c) Islet1, Scale bars: 50 μm (a-c)

examined since it is important for differentiation of bipolar cells [62]. At PN5, PN10 and PN15, the number of Islet1-positive bipolar cells in the middle portion of the APLP2-KO INL was significantly reduced by 59.7, 36.0 and 29.7 %, respectively when compared to WT (Fig. 6c and Additional file 1: Table S3). This supports the model that APLP2 participates in bipolar cell differentiation. Then, we investigated the expression of photoreceptor cell and bipolar cell markers during postnatal development by Western blotting. (Additional file 1: Figure S5F). WT and APLP2-KO protein extracts of the PN5 retinas were probed for VGLUT1 and Islet1. We observed a reduction in the levels of VGLUT1 and Islet1 in the APLP2-KO retinas as compared with WT retinas. Quantification of the amounts of each protein from the Western blot confirmed the overall reduction of the bipolar cell and photoreceptor terminal markers in PN5 APLP2-KO retinas (Additional file 1: Table S3), which was consistent with findings in the immunohistochemistry assay.

To elucidate the molecular mechanisms underlying bipolar cell defects in APLP2-KO retinal development we

analyzed at PN1 and PN10 the mRNA levels of the major basic helix-loop-helix (bHLH) (MATH3 and BHLHB5) and homeodomain (HD) (CHX10, VSX1 and OTX2) factors involved in the generation or differentiation of bipolar cells [63–67]. Using qRT-PCR we found that at PN1 CHX10 and MATH3, the two main factors that promote bipolar cell generation, were significantly downregulated in APLP2-KO compared with WT (Fig. 7). The three major transcription factors involved in the differentiation of bipolar cell subtypes, VSX1 (OFF cone bipolar cells) and BHLHB5 (type 2 OFF cone bipolar cells) and OTX2 (rod bipolar cells), were also significantly downregulated (Fig. 7). Interestingly at PN10 the HD factors CHX10, VSX1 and OTX2 were unchanged, while in contrast the bHLH factors MATH3 and BHLHB5 remained significantly downregulated in APLP2-KO (Fig. 7). Taken together, these data demonstrate that deletion of APLP2 induced impaired regulation of the temporal expression of a combination of intrinsic factors involved in the control of bipolar cell generation (early postnatal) and differentiation (late postnatal) during development.



**Fig. 7** APLP2 is required for correct combination of differentiation transcription factors of bipolar cells. Quantification of differentially expressed retinal genes coding for transcription factors involved in the generation and differentiation of bipolar cells at developmental stages PN1 and PN10 for WT and APLP2-KO by qRT-PCR. Mean  $\pm$  s.e.m of 3 mice per age group for each genotype showing the gene expression level relative to  $\beta$ -actin. \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.005$ . (*t*-test)

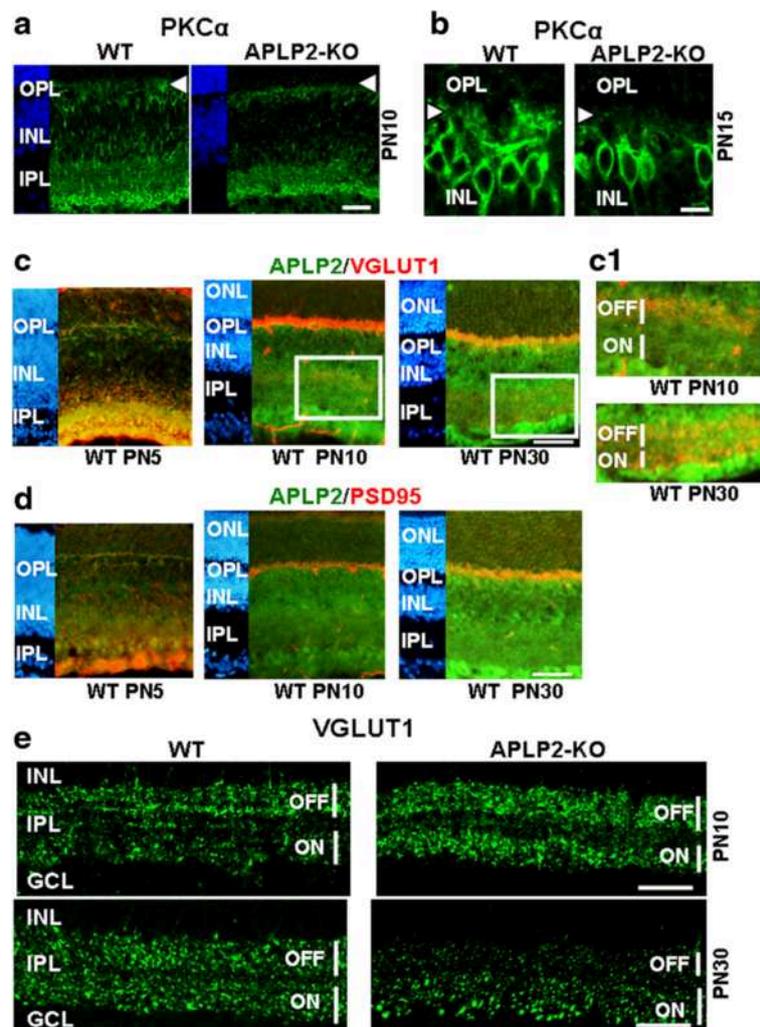
#### APLP2 is necessary for the development of bipolar cell dendritic tips and the generation of the ON and OFF pathways through the proper development of bipolar cell terminals

Since rod bipolar cell dendrites contact photoreceptor terminals in the OPL by PN10, we investigated PKC $\alpha$  immunostaining of bipolar cell dendrites at this developmental stage. In WT, PKC $\alpha$ -labeled rod bipolar cells displayed their typical elongated cell somas in the INL and developed dendrites (Fig. 8a, arrowhead). In contrast, APLP2-KO had fewer rod bipolar cell somas were observed and the dendritic branches were non-existent (Fig. 8a, arrowhead). At PN15, the APLP2-KO dendritic branches were diffuse and in some cases cells lacked processes on their outer surface as compared to WT (Fig. 8b, arrowhead). Altogether, these data reveal a role for APLP2 in the differentiation of bipolar cells and development of their dendritic tips during postnatal development.

Expression of VGLUT1 in bipolar cell terminals presents a temporal sequence of expression from OFF to ON laminae during the differentiation of the IPL, in addition to be expressed in the ribbon synapses of photoreceptors in the OPL [60]. Therefore, we investigated APLP2 and VGLUT1 colocalization during postnatal development and in differentiated WT retinas (Fig. 8c and C1). At PN5, VGLUT1 and APLP2 staining mainly colocalized in the IPL, indicating that APLP2 labels rod bipolar cell terminals and ON cone bipolar cell terminals (Fig. 8c). APLP2 weakly stained the OPL and no colocalization of APLP2 and VGLUT1 was observed because

VGLUT1 is not expressed in the OPL at this developmental stage (Fig. 8c). At PN10, VGLUT1 and APLP2 staining colocalized in the OPL of WT mice (Fig. 8c). Moreover, staining for VGLUT1 was preferentially located in the OFF sublamina where it colocalized with APLP2 staining (Fig. 8c and C1, magnified region from PN10 IPL). This data confirms localization of APLP2 in bipolar cell terminals during postnatal development. In differentiated retinas (PN30), VGLUT1 and APLP2 still colocalized presynaptically in the OPL (Fig. 8c). VGLUT1 showed equal staining intensity in the bipolar cell terminals of the OFF and ON sublamina, and APLP2 and VGLUT1 colocalized in the two sublaminae (Fig. 8c and C1, magnified region from PN30 IPL). At PN5, PSD95 was mainly observed in the IPL (Fig. 8d). APLP2 and PSD95 colocalized at bipolar cell ribbon synapses (Fig. 8d), consistent with the postsynaptic localization of PSD95 in the IPL. At this stage, a weak PSD95 and APLP2 co-staining was observed in the OPL. Immunofluorescence double staining of APLP2 and PSD95 confirms localization of APLP2 in ribbon synapses of photoreceptor cells from PN10 to adult WT OPL (Fig. 8d).

APLP2 is strongly expressed in the two retinal synaptic layers, IPL and OPL, during postnatal development, and we observed a delay in the development of the APLP2-KO OPL. Therefore, we investigated VGLUT1 expression in the IPL to study the differentiation of the bipolar cell synapse, during postnatal development in APLP2-KO. In WT, discrete VGLUT1 immunostaining was first detected in the inner retina at PN5, whereas no VGLUT1 immunostaining was observed in APLP2-



**Fig. 8** APLP2 is required for the differentiation of bipolar cells and synaptogenesis of cone and rod terminals during postnatal development. Longitudinal cryostat sections of retinas from the indicated stages of postnatal development were immunostained for (a and b) PKC $\alpha$ , (c, C1 and e) VGLUT1 and (d) PSD95. C1 shows magnified IPL from PN10 and PN30 retinas. Retina sections were double immunostained for APLP2 (green) and VGLUT1 (red) (c and C1), and for APLP2 (green) and PSD95 (red) (d). Expression of VGLUT1 was analyzed to investigate temporal ordering in development of rod versus cone terminals in the OPL. 50  $\mu$ m (a, c and e) and 20  $\mu$ m (b)

KO (data not shown). At PN10, WT staining for VGLUT1 was preferentially located in the OFF sublamina where the bipolar cell terminals were located (Fig. 8e). In PN10 APLP2-KO there was more intense VGLUT1 immunostaining and an abnormal stratification pattern with two strong VGLUT1-stained sublaminae separated from each other by a large and weakly stained VGLUT1 band (Fig. 8e). Quantitative analysis of the confocal images in the OFF and ON sublaminae showed a significant increase of VGLUT1 immunostaining in APLP2-KO compared to WT (Additional file 1: Table S4). At PN30, VGLUT1 showed equal staining intensity in the bipolar cell terminals of the OFF and ON sublamina in WT (Fig. 8e and Additional file 1: Table S4). In contrast, VGLUT1 staining was less

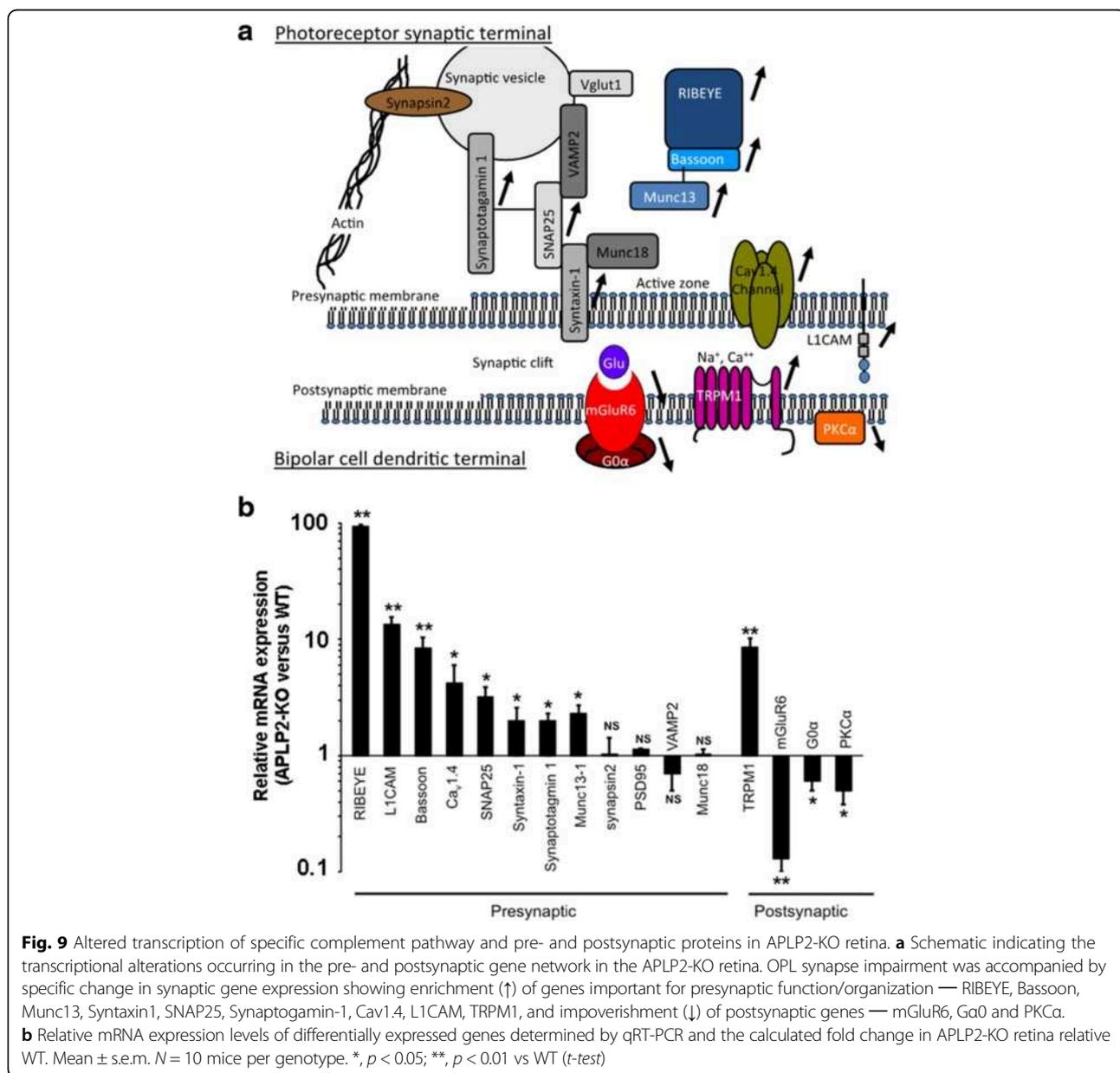
prominent in the OFF sublamina than in the ON lamina of APLP2-KO (Fig. 8e and Additional file 1: Table S4), consistent with poor cone OFF differentiation showed above. Overall, these data showed that deletion of APLP2 was associated with altered development of bipolar cell terminals in the IPL suggesting APLP2 expression is necessary for the correct generation of the ON and OFF pathways.

Activation of microglial cells occurs during postnatal development to phagocytose inappropriate synapses to form a regular array in the two retinal plexiform layers [68]. Given the altered OPL and IPL in APLP2-KO, we hypothesized a change in microglial activation in these mice. WT retinas displayed no F4/80 immunostaining within the ONL, and rare immunostaining in the inner

retinal layers. In contrast, processes of activated microglial cells were observed in the two plexiform layers and rarely in the INL of APLP2-KO (Additional file 1: Figure S6A). Classical complement cascade proteins have emerged as critical mediators of synaptic refinement. C1q refines the developing visual system through C3-dependent microglial phagocytosis of synapses [69]. We hypothesized alteration of the expression levels of the complement cascade in APLP2-KO. qRT-PCR data analysis showed C1qa, C1qb and C3 were significantly up-regulated (by 45.3, 33.0 and 177.5 fold respectively) in the retina of APLP2-KO compared with WT, indicating overactivation of the complement cascade in adult APLP2-KO (Additional file 1: Figure S6B).

**Altered transcription of specific pre- and postsynaptic proteins in APLP2-KO**

Although CSNB is a synapse pathology, the transcriptional consequences on genes encoding pre- and postsynaptic proteins of gene mutations responsible of CSNB remain unknown. Therefore, we hypothesized that deleting APLP2 may affect a transcriptional network essential for retinal synapse structure/function. To gain insights into the molecular mechanisms underlying synaptic defects in APLP2-KO, we analyzed mRNA expression of 12 proteins specifically involved in synaptic organization and function (Fig. 9a). In adult APLP2-KO retinas, 8 of the 12 genes coding for presynaptic proteins were significantly upregulated (Fig. 9b): RIBEYE (93-fold, major



component of the photoreceptor ribbon synapses); L1CAM (13-fold, necessary to establish precise synaptic contacts; bassoon (10-fold, main scaffold protein of the active zone that regulates stability of Munc13-1 and SNAP25); active zone-associated calcium channel  $Ca_v1.4$  (4-fold, necessary for maintaining bassoon in the ribbon synapse). Two main components of the soluble NSF attachment protein receptors, SNAP25 and syntaxin-1, were also upregulated. As were genes coding for two principal calcium sensors on synaptic vesicles, synaptotagmin 1 and Munc13-1 (2- to 3-fold). Genes coding for the presynaptic proteins: synapsin 2, PSD-95, synaptobrevin 2/VAMP2 and Munc18 had similar expression levels between WT and APLP2-KO.

In ON-bipolar cells, transmission of the light signal is mediated by  $G_{O\alpha}$ . In the dark, mGluR6 is constantly stimulated by glutamate and activates  $G_{O\alpha}$  which closes the TRPM1 channel, and PKC $\alpha$  accelerates and terminates glutamate-driven signal transduction. With the exception of TRPM1, which was significantly upregulated (9-fold), the other components of the ON bipolar cell signalling including mGluR6,  $G_{O\alpha}$  and PKC $\alpha$  were all significantly down regulated in APLP2-KO (Fig. 9b).

## Discussion

### Non-redundant roles for APLP2 and APP in the retina

The changes seen in synapse structure in the APLP2-KO retina are novel and are in contrast to the absence of synapse alterations in the APLP2-KO parasympathetic submandibular ganglion in the salivary duct [70], and the APLP2-KO neuromuscular junction in the diaphragm and sternomastoid muscles [71]. Sequence and phylogenetic analysis suggests there is functional conservation between APP and APLP1, but APLP2 having significantly diverged from both APP and APLP1 [5, 72]. Unlike other studies demonstrating that loss of APLP2 results in no gross abnormalities in the brain or PNS, we provide the first clear demonstration that APLP2 induces a profound phenotypic difference from APP. Our data have clearly identified non-redundant functions between APLP2 and APP in the adult retina and would indicate a specific role for APLP2 in retinal synaptogenesis and synaptopathy. Our data are consistent with recent data showing distinct and essential role of APLP2 at neuromuscular junction synapses that cannot be compensated by APP [73].

The exact molecular mechanism by which APLP2 is essential for synapse formation and function in the CNS remains to be determined. One could formulate several hypotheses regarding how APLP2 affects retinal synaptogenesis and the transmission of the light signal from the photoreceptors to the bipolar cells. APP/APLP has been identified as a novel class of synaptic adhesion molecules with shared properties as SynCAMs and neuroligins/neurexins [3]. Roles of adhesion in the development

and function of photoreceptor synapses remain incompletely understood. Unlike neuroligins [74, 75] or other immunoglobulin-family proteins, such as DSCAMs [76], that contribute to the development and function of the IPL, SynCAM 1 in the retina appears predominantly to provide for the structural and functional integrity of photoreceptor synapses in the OPL. SynCAM 1 is expressed on mouse rod photoreceptors and their terminals in the OPL in a developmentally regulated manner [77]. In adult, SynCAM 1 is expressed in OPL, where it encircles VGLUT1-positive photoreceptor terminals. Interestingly, the structural integrity of synapses in the OPL is impaired in SynCAM 1-KO mice [77]. Moreover, the number of ribbon-containing rod terminals was significantly lower and ribbons were shorter terminals with triads in SynCAM 1-KO mice, resembling retinal phenotype of APLP2-KO mice. Moreover, visual signal transmission in the scotopic (rod) pathway is impaired in SynCAM 1-KO mice. Consequently, APLP2 might play a SynCAM1-like synaptic adhesion function for OPL synaptogenesis and function. Besides a direct role in retinal synaptic adhesion, APP/APLP has been shown to interact with contactin 4 in the retina to promote NgCAM-dependent axon growth of ganglion cells in the chick [78]. Moreover, a subset of direction-selective ganglion cells fail to target the nucleus of the optic tract in APP-KO or contactin 4-KO mice [79]. Although these studies were limited to eye-to-brain connections, interactions of APLP2 with synaptic/cell adhesion molecules, including contactins, might be a mechanism by which APLP2 participates in OPL synaptogenesis, consistent with the identification of contactin 4 as a genetic marker of murine bipolar cells [80]. The third hypothesis is that APLP2 might directly or indirectly affect expression of other proteins. Unfortunately, no transcriptome profiling of retina in knockout mice lacking APP family members is available. However, the comparative transcriptome profiling of APP family members in adult cortex revealed that of 1061 genes that are altered after deletion of APLP2, only 17 % are also changed in APP-KO [81]. Moreover, brain interactomes for APLP2 and APP are different [82]. These studies suggest there are distinct pathways regulated by either APP or APLP2, consistent with the different APP and APLP2 retinal phenotypes. Among the nine APLP2-specific interactors identified in the brain [82], four are of potential interest because of their involvement in retinal development or retinal disorder: Retinitis Pigmentosa 2 homolog (RP2h), Ras-related C3 botulinum substrate 1 (RAC1), Protein phosphatase 2A (PP2A) and Rho family GTPase (RhoA). Mutation in the human RP2 gene cause X-linked retinitis pigmentosa [83, 84]. The Rp2h-KO mice showed significant reductions of the a-wave and b-wave amplitudes at

1 month of age and continued to decline over the next 6 months and exhibited a slowly progressing rod-cone dystrophy by 8 months [85]. In *Rac1*-KO mice, the numbers of cells in the ganglion cell layer and the INL are reduced to 50 % of the WT level, but the ONL is largely unaffected [86], implying a central role for *Rac1* in inner retinal development. PP2A dephosphorylates CaBP4 in the mouse retina [87]. Mutations in *CABP4* lead to iCSNB and mice lacking either *Cabp4* display a iCSNB-like phenotype [38]. CaBP4 directly associates with the Cav1.4 $\alpha$  channel. Increased CaBP4 phosphorylation potentiates the modulatory effect of CaBP4 on Cav1.3 Ca(2+) channels. RhoA signaling maintains apico-basal polarity in retinal progenitor cells, which is essential for subsequent cellular differentiation [88]. No retinal pathology has been described with RhoA dysfunction, so far.

#### **Molecular mechanisms underlying synaptic defects in APLP2-KO and animal models of CSNB**

Although for different genes the pathogenic mechanisms of CSNB has been identified, for others further studies are needed to clarify the molecular mechanisms of CSNB. Loss-of-function mutations in some synaptic genes are responsible for alteration of the neurotransmission from photoreceptors to bipolar cells in iCSNB [35]. APLP2 localizes at both the dendrites of the bipolar cells and the presynaptic terminals of the photoreceptors. Moreover, histology, immunohistochemistry and TEM of APLP2-KO retinas showed alterations on both the presynaptic terminals of rods and cones, and the dendritic tips of the bipolar cells, making APLP2-KO a pathology of both the pre- and postsynaptic part of the OPL.

Analysis of the expression of pre- and postsynaptic genes in CSNB and animal models of CSNB has been rarely performed to identify the molecular mechanism involved or associated with the pathogenic events in CSNB. The transcriptome analysis of the genes coding pre- and postsynaptic proteins in APLP2-KO retinas, indicates enrichment of genes important for presynaptic function/organization — RIBEYE, Bassoon, Munc13, Syntaxin1, SNAP25, Synaptogamin-1, Cav1.4, L1CAM, TRPM1, and impoverishment of postsynaptic genes — mGluR6, G $\alpha$ 0 and PKC $\alpha$  (summarized in the schema, Fig. 9a). Deletion of APLP2 also results in a severe reduction of mGluR6 at the dendritic tips of rod bipolar cells. Therefore, our study showed a reduction in the expression of major components of the mGluR6 signaling cascade in APLP2-KO. Interestingly, GRM6- and NYX- and LRIT3 deficient mouse, three models for cCSNB, showed a nearly absent mGluR6 at the dendritic tips of cone ON-bipolar cells [71, 89–91], indicating a reduction in ON-bipolar cells of major components of the mGluR6 signaling cascade in mouse models of cCSNB. By RT-qPCR, we demonstrated that APLP2 deletion

alters the expression of *TRPM1*, *GRM6* and *CACNA1F*, three major genes involved in CSNB. This suggests that even in the absence of any mutation, APLP2 may be involved in the phenotype of CSNB by its regulation function of expression of genes directly involved in this pathology. Recently, a new naturally occurring animal model of cCSNB has been characterized in beagle dog [47]. All known CSNB genes have been excluded in this model. However, a reduction in the expression of the photoreceptor postsynaptic gene *PKCA* and an increased expression of the photoreceptor postsynaptic gene *TRPM1* were observed in this model, as we observed in APLP2-KO mice. It remains to investigate the expression of APLP2 in this model.

#### **New roles for retinal differentiation genes in CSNB?**

APLP2 deletion alters the expression of bHLH and HD transcription factors that are involved in the generation and differentiation of bipolar cells at early and late postnatal stages of development. Since CSNB is present at birth and ERG b-wave is reduced in mice either lacking *Bhlhb4* or *Math5*, two transcription factors required for maturation/differentiation of bipolar cells, it was suggested that altered differentiation of bipolar cells may be involved in the phenotype of CSNB [44, 45]. Recently, the differentiation factor, PRDM8, was presented as a candidate gene for CSNB [46], reinforcing the importance to study the mechanisms of bipolar cell differentiation for elucidating the pathological events involved in CSNB. ON-bipolar (G $\alpha$ 0-positive cells), rod bipolar (PKC-positive cells) and type 2 (recoverin-positive cells) cone bipolar cells were markedly reduced in PRDM8-KO mice [46]. Reduced VGLUT1 staining was also observed in the IPL of PRDM8-KO mice. Moreover, a reduced scotopic b-wave amplitude with a normal a-wave amplitude was observed in PRDM8-KO mice [46]. The ERG deficits of PRDM8-KO mice were stationary between 3 and 6 months of age. The stationary ERG phenotype of APLP2-KO mice was observed between 2–4 months and 6–13 months of age. An additional role of APLP2 in the retina is the control of bipolar cell (ON-bipolar, rod bipolar and type 2 cone bipolar cells) differentiation, development of bipolar cell dendrites, temporal sequence of VGLUT1 expression from OFF to ON laminae during the differentiation of the IPL and the formation of cone and rod ribbon synapses during postnatal development. Therefore, we cannot rule out that APLP2 may also be involved in CSNB phenotype by its function of differentiation factor. This is in accordance with the recently suggested role of LRIT3 in cone synapse formation [89], confirming the importance of photoreceptor synaptogenesis in CSNB. However, alteration of ribbon synapse formation or bipolar dendrite invagination has been described in GRM6 mutants and G $\beta$ 5-KO mice, two

models of cCSNB [92–95]. Moreover, Ca<sub>v</sub>1.4 and CaBP4-KO mice exhibit altered photoreceptor synaptogenesis [42], confirming that impaired retinal differentiation contributes to vision impairment in CSNB. It remains to be determined if APLP2 expression is altered in the bipolar cells and photoreceptor ribbon synapses of GRM6-, TRPM1-, NYX-, GRP179-, Ca<sub>v</sub>1.4-, CaBP4- or LRIT3-KO mice during development and in adults.

## Methods

### Animals

The homozygous APP and APLP2 knockout and wild-type (C57/Bl6) mice have been described [96–98]. Eye balls were harvested from mice at different ages ranging from embryonic day (E) 14 and E18, and postnatal day (PN) 1, 5, 10, and 15, and from young (2–4 months) and adult (6–13 months). All Procedures were approved by the Animal Ethics Committee at the Pierre et Marie University and Paris-Descartes University of Paris and were carried out in accordance with French laws and the European Union Directive 2010/63/EU.

### SD-OCT

In vivo assessment of mice retinal thickness was performed on anesthetized animals using spectral domain optical coherence tomography (SD-OCT) (Spectralis, Heidelberg Engineering) adapted for small animal eyes. Temporal, nasal, and superior quadrants of the retina were analyzed, using the optic nerve head and the retina vessels as landmarks. Each 2-dimensional B-scan recorded at 30° field of view consisted of 1536 A-scans with an optical resolution reaching 3.5 μm. Thickness of full retina, inner retina, and ONL were quantified using software provided by Heidelberg Engineering (Heidelberg Eye Explorer Version 1.6.2.0).

### Measurement of retinal thickness

Retina cross-sections were mounted and stained with toluidine blue. Images of whole retina cross-sections were obtained using Leica leitz Aristoplan microscope equipped with DFC 480 camera (Leica) and LAS 3.7 version software. Thickness of the different nuclear and synaptic layers were determined using Visilog 6.4 version software (Noesis).

### Immunohistochemistry

Retinal expression of APLP2 during embryonic and postnatal development was investigated by immunohistochemistry as previously described [18]. Serial eye sections were stained with primary rabbit anti-APLP2 antibody and detected with a secondary antibody, a goat polyclonal biotin-conjugated anti-rabbit IgG (1/1000, Vector Laboratories) and visualized using streptavidin and biotinylated horseradish peroxidase complex (sABC) and diaminobenzidine

tetrahydrochloride (DAB). The peroxidase-stained sections were viewed with an Aristoplan-microscope (Zeiss) connected to a digital camera.

### Immunocytochemistry

Identification and visualization of specific cells and cellular structures in the retina was performed by immunofluorescence microscopy as previously described [18]. Primary antibodies are shown in Additional file 1: Table S1. Control experiments to check specificity of the primary antibodies: APLP2 antibody was omitted and secondary antibody was tested. Retinas of at least three animals were used at each stage. Nuclei were counterstained with DAPI (1:4000, Sigma-Aldrich). Sections were mounted with Dako (Cytomation). Slides were observed with a Zeiss confocal Imaging system (LSM710, Zeiss). All immunostaining was repeated at least three times. To quantify the number of different cell-type markers on retinal sections, three or more age-matched retinas were analyzed for each cell type. At least five non-overlapping fields of 400 μm of linear retinal length were photographed and printed at 40X magnification. They were counted from each retina section (4 or more sections per animal) and averaged per group.

### Transmission electron microscopy

After dissection, retinas were fixed in 2.5 % glutaraldehyde cacodylate buffer (0.1 M, pH 7.4) and then fixed in 1 % osmium tetroxide in cacodylate buffer (0.2 M, pH 7.4) and progressively dehydrated in graduated ethanol solution, then in propylene oxide. Semi-thin sections (1 μm) were cut with an ultra microtome (Reichert OmU2) and stained with toluidine blue. Ultra-thin sections (80 nm) were contrasted by uranyl acetate, and analyzed with a transmission electron microscope (Philips CM10).

### Western blot analysis

Retinas were lysed in ice-cold lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 100 mM NaCl, 0.1 % NP-40, 1 % deoxycholate, 50 mM β-glycerophosphate, 0.2 mM sodium orthovanadate, 50 mM sodium fluoride, 1 μg/mL leupeptin, 5 μM pepstatin, 20 kIU/mL aprotinin, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride), and centrifuged for 10 min at 10,000 g at 4 °C. Protein concentrations were determined using a Bio-Rad kit. Retina lysates were mixed with 3× Laemmli buffer and heated for 5 min at 95 °C. They were then resolved by SDS-PAGE (10 % or 15 % polyacrylamide gels), electroblotted onto polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (Immobilon; Millipore), and probed with antibodies directed against Chx10, Islet1, VGLUT1, RIBEYE mGluR6 and actin (Additional file 1: Table S1). Primary antibodies were tagged with specific secondary horseradish peroxidase-conjugated

antibodies. Antibody complexes were detected by enhanced chemiluminescence (ECL; Amersham), and the membrane was placed against Kodak film (BioMax Light-1; Eastman Kodak). Quantification was carried out using a Kodak image station (2000 MM) and Kodak software (1D3.6).

#### Quantitative real-time PCR

Mouse retina tissue was exposed to TRIZOL reagent (Invitrogen, France) according to the manufacturer's instructions, and SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen) was used to reverse transcribe 1  $\mu$ g of mRNA. Amplification reaction assays contained 1 $\times$  SYBR Green PCR Mastermix (Applied Biosystems). All real-time PCR oligonucleotide primers had previously been validated experimentally by qPCR, agarose gel analysis, sequencing, and blast. The PCR primer sequences are available on request. A hot start at 95 °C for 5 min followed by 40 cycles at 95 °C for 15 s and 60 °C for 1 min with the 7300 SDS thermal cycler (Applied Biosystems). Controls with no reverse transcriptase were run for each assay to confirm the absence of genomic DNA contamination. Control qRT-PCRs were performed without cDNA templates. The standard curve method (Prism 7700 Sequence Detection System, Applied Biosystems, ABI User Bulletin number 2) was used for relative quantification of gene expression. For each experiment, each individual sample was run in triplicate and the  $C_t$  value for each sample recorded at the end of the reaction. The average and standard deviation of the three  $C_t$  values were calculated. Gene expression levels were normalized to  $\beta$ -actin for each retinal tissue sample and calculated relative to WT retinal tissue with the following equation: relative expression =  $2^{-(\text{APLP2 sample } \Delta C_t - \text{WT sample } \Delta C_t)}$  where  $\Delta C_t$  = mean  $C_t$ (target) – mean  $C_t$ ( $\beta$ -actin).

#### Electroretinography

Animals were dark adapted overnight. Under dim-red-light, they were anesthetized with a mixture of ketamine/xylazine and their pupils dilated with 1 drop of atropine. A photostimulator (Type PS 33) was used to generate ERG. The highest flash stimulation was 11.8 cds.m<sup>2</sup> and neutral density filter were used to attenuate luminance. Flash stimuli were given through an integrative sphere in order to uniformly illuminate all retina. A single ERG was recorded for seventeen increasing luminance (10  $\mu$ s duration, 30s apart) via Ag/AgCl electrodes. The signal was amplified (gain 1000, pass band 0.1-10,000 Hz; A-M systems, Inc; Model 3000. AC/DC Differential Amplifier) then processed and stored in a computer. For each ERG, a- and b-wave amplitude and latency were calculated. The mean values are plotted against the flash stimulation luminance. The software program (Microsoft Origin 6.0; Microcal Software) was used to fit the b-wave sensitivity

curves to calculate the saturated b-wave amplitude ( $B_{\text{max}}$ ), the half-saturation luminance ( $K$ ); and the slope of the curve in its linear part ( $n$ ). For photopic conditions, mice were light-adapted 10 min at 30 cd/s m<sup>2</sup> and then the retinal activity recorded in response to single flashes ranging from 10<sup>-2</sup> to 30 cds/m<sup>2</sup>, in the same illumination conditions. For each stimulus intensity, 10 to 15 traces were averaged. Amplitude of the a-wave was defined as the difference between the baseline level at the time of stimulation and the peak of the a-wave. Amplitude of the b-wave was defined as the difference between the peak of the b-wave and the peak of the a-wave (or the baseline level when the a-wave was not detectable). Amplitudes are expressed in  $\mu$ V.

#### Statistical analysis

All data are presented as mean  $\pm$  s.e.m. Statistical significance in pairwise comparisons was assessed using two-tailed t-tests with unequal variance.

#### Conclusions

In conclusion, our findings demonstrated the important and specific role of APLP2 in the retina. Our results demonstrate the non-redundant actions of APLP2 and APP in the central nervous system that are mediated through different effects on specific neurons and on ribbon synaptic networks during late embryonic and early postnatal development. Most importantly and of clinical relevance, there are striking similarities to be found between the phenotypic features of bipolar cell dendrites and photoreceptor ribbon synapses, and vision alteration in APLP2-KO mice and congenital stationary night blindness. APLP2 may be a bridge between retina development and synaptic genes involved in the pathogenic events in CSNB. Our studies have identified APLP2 as a new molecule that warrants investigation for its involvement in a range of eye pathologies.

#### Additional file

**Additional file 1: Figure S1.** APLP2 expression was localized in the two synaptic layers and overlapped extensively with APP in specific neuronal populations of the adult retina. Figure S2. The ultrastructure of the RPE in the adult retina did not differ between WT and APLP2-KO. Figure S3. Impaired retinal function at the level of the post-rod response in APLP2-KO. Figure S4. The ultrastructure of the ribbon photoreceptor presynaptic terminals differed dramatically between young WT and APLP2-KO. Figure S5. Deletion of APLP2 delays the development of the OPL. Figure S6. Perturbed retinal microglia cell activation and altered transcription of specific complement pathway in APLP2-KO. Table S1. Antibodies used for colabeling immunofluorescence experiments. Table S2. Loss of APLP2 does not alter gross lamination of young and adult retina. Table S3. APLP2 is required for the differentiation of bipolar and synaptogenesis of cone and rod terminals during postnatal development. Table S4. APLP2 is necessary for the generation of the ON and OFF pathways through the proper development of bipolar cell terminals during postnatal development. (DOC 4053 kb)

### Abbreviations

APLP2, amyloid precursor-like protein 2; APP, amyloid precursor protein; BHLH, basic helix-loop-helix; BHLHB4, basic helix-loop-helix domain containing, class B 4; C1q, complement 1 q; CABP4, calcium binding protein 4; CACNA1F/Ca<sub>v</sub>1.4, calcium channel, voltage-dependent, L type, alpha 1 F subunit; cGMP, cyclic guanosine monophosphate; Chx10, Ceh-10 homeodomain-containing homolog; CNS, central nervous system; CSNB, congenital stationary night blindness; DSCAM, down syndrome cell adhesion molecule; ERG, electroretinogram; GCL, ganglion cell layer; Gy13, G protein gamma 13 subunit; HD, homeodomain; INL, inner nuclear layer; IPL, inner plexiform layer; IS, inner segment; Islet1, insulin related protein 1; L1CAM, L1 cell adhesion molecule; LRIT3, Leucine-rich repeat, immunoglobulin-like and transmembrane domains 3; MATH5/ATOH7, atonal BHLH transcription factor 7; mGluR6, metabotropic glutamate receptor 6; mRNA, messenger ribonucleic acid; NBL, neuroblastic layer; NFL, nerve fiber layer; NYX, nyctalopin; OCT, optical coherence tomography; OLM, outer limiting membrane; ONL, outer nuclear layer; OPL, outer plexiform layer; OS, outer segment; OTX2, orthodenticle homeobox 2; PKCa, protein kinase C alpha; PN, postnatal day; PNA, peanut agglutinin; PNS, peripheral nervous system; PP2A, Protein phosphatase 2A; PRDM8, RIZ homology domain containing 8; PSD95, postsynaptic density protein 95; RAC1, Ras-related C3 botulinum substrate 1; RGC, retinal ganglion cells; RhoA, Rho family GTPase; RP2h, Retinitis Pigmentosa 2 homolog; RPE, retinal pigment epithelium; RT-PCR, reverse transcription polymerase chain reaction; SD-OCT, spectral domain optical coherence tomography; SNAP25, synaptosomal-associated protein 25; SynCAM, synaptic cell adhesion molecule; TEM, transmission electron microscopy; TRPM1, transient receptor potential cation channel subfamily M member 1; VGLUT1, vesicular glutamate transporter 1; VSX1, visual system homeobox 1; WT, wild-type; XRLS, X-linked Retinoschisis

### Acknowledgements

This work was supported by the National Health and Medical Research Council (NHMRC) to RC. Mohamed El Sanharawi is an employee of EyeVensys. We thank Prof. Hui Zheng (Baylor College of Medicine, Houston, TX, USA) for the APP knockout mice. We thank Prof. Sangram Sisodia (Department Of Neurobiology, The University of Chicago, IL, USA) for the APLP2 knockout mice. The authors would like to acknowledge Drs. Isabelle Audo and Christina Zeitz for the very stimulating discussion on the role of synaptic and development genes in CSNB.

### Availability of data and materials

Not applicable.

### Authors' contributions

VD performed samples harvesting, morphological analysis, cell counting, immunochemistry, fluorescence microscopy, quantitative real-time PCR, statistical analysis, the data analysis as well as reviewed the data. VD also participated in the study design. GDC participated actively in the samples harvesting, reviewing the data and helped to draft and revise the manuscript. KD participated in tissue preparation, immunochemistry and electroretinogram. CB participated to tissue preparation and performed immunochemistry. IR-C performed electroretinogram, helped to draft the manuscript and participated in the revising the manuscript. CK oversaw some of the electroretinogram, participated in the data analysis and helped to draft the manuscript and participated in the revising the manuscript. MS participated in tissue preparation, performed transmission electron microscopy and helped to draft the manuscript. MES performed spectral domain optical coherence tomography, participated in morphological and some of the statistical analyzes and helped to draft the manuscript. LJ participated in tissue harvesting, also performed some of the immunochemistry and helped to transmission electron microscopy. CP and NA performed some of the immunochemistry. MA revised the manuscript. YA and FBC helped to the coordination and revised the manuscript. RC participated actively in the samples harvesting, reviewing the data and helped to draft and revise the manuscript. FM conceived of the study, and participated in its design, and coordination. FM helped to morphological analysis and cell counting, and drafted the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

### Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

### Consent for publication

Not applicable.

### Ethics approval and consent to participate

All procedures involving mice conformed to the resolution on the use of animals in research of the Association for Research in Vision and Ophthalmology and to the guidelines of the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale Committee on Animal Research.

### Author details

<sup>1</sup>Centre de Recherche des Cordeliers, Université Paris Descartes, Université Pierre et Marie Curie, Paris, France. <sup>2</sup>Department of Pathology and Bio21 Molecular Science and Biotechnology Institute, The University of Melbourne, Melbourne, Australia. <sup>3</sup>Laboratoire de Biophysique Sensorielle, Université Clermont 1, Clermont-Ferrand, France. <sup>4</sup>Unit of Gene Therapy & Stem Cell Biology, University of Lausanne, Jules-Gonin Eye Hospital, Lausanne, Switzerland.

Received: 28 January 2016 Accepted: 30 May 2016

Published online: 08 June 2016

### References

- Cappai R, Barnham KJ. Delineating the mechanism of Alzheimer's disease A beta peptide neurotoxicity. *Neurochem Res.* 2008;33(3):526–32.
- De Strooper B, Iwatsubo T, Wolfe MS. Presenilins and  $\gamma$ -secretase: structure, function, and role in Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2012;2(1):a006304.
- Müller UC, Zheng H. Physiological functions of APP family proteins. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2012;2:a006288.
- Yankner BA, Dawes LR, Fisher S, Villa-Komaroff L, Oster-Granite ML, Neve RL. Neurotoxicity of a fragment of the amyloid precursor associated with Alzheimer's disease. *Science.* 1989;245(4916):417–20.
- Shariati SA, De Strooper B. Redundancy and divergence in the amyloid precursor protein family. *FEBS Lett.* 2013;587:2036–45.
- Tkatchenko AV, Tkatchenko TV, Guggenheim JA, Verhoeven VJ, Hysi PG, Wojciechowski R, et al. APLP2 regulates refractive error and myopia development in mice and humans. *PLoS Genet.* 2015;11(8):e1005432.
- Ohta M, Kitamoto T, Iwaki T, Ohgami T, Fukui M, Tateishi J. Immunohistochemical distribution of amyloid precursor protein during normal rat development. *Brain Res Dev Brain Res.* 1993;75:151–61.
- Salbaum JM, Ruddle FH. Embryonic expression pattern of amyloid protein precursor suggests a role in differentiation of specific subsets of neurons. *J Exp Zool.* 1994;269:116–27.
- Shariati SA, Lau P, Hassan BA, Müller U, Dotti CG, De Strooper B, et al. APLP2 regulates neuronal stem cell differentiation during cortical development. *J Cell Sci.* 2013;126:1268–77.
- Morgans CW, Zhang J, Jeffrey BG, Nelson SM, Burke NS, Duvoisin RM, et al. TRPM1 is required for the depolarizing light response in retinal ON-bipolar cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(45):19174–8.
- Shen Y, Heimel JA, Kamermans M, Peachey NS, Gregg RG, Nawy S. A transient receptor potential-like channel mediates synaptic transmission in rod bipolar cells. *J Neurosci.* 2009;29(19):6088–93.
- Koike C, Obara T, Uriu Y, Numata T, Sanuki R, Miyata K, et al. TRPM1 is a component of the retinal ON bipolar cell transduction channel in the mGluR6 cascade. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(1):332–7.
- Dhingra A, Lyubarsky A, Jiang M, Pugh Jr EN, Birnbaumer L, Sterling P, et al. The light response of ON bipolar neurons requires G $\alpha$ q. *J Neurosci.* 2000;20(24):9053–8.
- Dhingra A, Jiang M, Wang TL, Lyubarsky A, Savchenko A, Bar-Yehuda T, et al. Light response of retinal ON bipolar cells requires a specific splice variant of G $\alpha$ q. *J Neurosci.* 2002;22(12):4878–84.
- Dhingra A, Vardi N. mGlu receptors in the retina-WIREs membrane transport and signaling. *Wiley Interdiscip Rev Membr Transp Signal.* 2012;1(5):641–53.
- Ray TA, Heath KM, Hasan N, Noel JM, Samuels IS, Martemyanov KA, et al. GRP179 is required for high sensitivity of the mGluR6 signaling cascade in the depolarizing bipolar cells. *J Neurosci.* 2014;34(18):6334–43.
- Neuillé M, El Shamieh S, Orhan E, Michiels C, Antonio A, Lancelot ME, et al. Lrit3 deficient mouse (nob6): a novel model of complete congenital stationary night blindness (cCSNB). *PLoS ONE.* 2014;9(3):e90342.
- Dinet V, An N, Ciccotosto GD, Bruban J, Maoui A, Bellingham SA, et al. APP involvement in retinogenesis of mice. *Acta Neuropathol.* 2011;121:351–63.

19. Ho T, Vessey KA, Cappai R, Dinet V, Mascarelli F, Ciccosto GD, et al. Amyloid precursor protein is required for normal function of the rod and cone pathways in the mouse retina. *PLoS ONE*. 2012;7:e29892.
20. Rosner M, Hefetz L, Abraham FA. The prevalence of retinitis pigmentosa and congenital stationary night blindness in Israel. *Am J Ophthalmol*. 1993; 116:373–4.
21. Dryja TP. Molecular genetics of oguchi disease, fundus albipunctatus, and other forms of stationary night blindness :LVII Edward Jackson Memorial lecture. *Am J Ophthalmol*. 2000;30(5):547–63.
22. Zeitz C, Forster U, Neidhardt J, Feil S, Kälin S, Leifert D, et al. Night blindness-associated mutations in the ligand-binding, cysteine-rich, and intracellular domains of the metabotropic glutamate receptor 6 abolish protein trafficking. *Hum Mutat*. 2007;28(8):771–80.
23. Zeitz C, Robson AG, Audo I. Congenital stationary night blindness: an analysis and update of genotype-phenotype correlations and pathogenic mechanisms. *Prog Retin Eye Res*. 2015;45:58–110.
24. Riggs LA. Electretinography. *Vision Res*. 1983;26(9):1443–59.
25. Schubert G, Bornschein H. Analysis of the human electroretinogram. *Ophthalmologica*. 1952;123:396–413.
26. Miyake Y, Yagasaki K, Horiguchi M, Kawase Y, Kanda T. Congenital stationary night blindness with negative electroretinogram. A new classification. *Arch Ophthalmol*. 1986;104:1013–20.
27. Bech-Hansen NT, Naylor MJ, Maybaum TA, Sparkes RL, Koop B, Birch DG, et al. Mutations in NYX, encoding the leucine-rich proteoglycan nyctalopin, cause X-linked complete congenital stationary night blindness. *Nat Genet*. 2000;26:319–23.
28. Pusch CM, Zeitz C, Brandau O, Pesch K, Achatz H, Feil S, et al. The complete form of X-linked congenital stationary night blindness is caused by mutations in a gene encoding a leucine-rich repeat protein. *Nat Genet*. 2000;26(3):324–7.
29. Dryja TP, McGee TL, Berson EL, Fishman GA, Sandberg MA, Alexander KR, et al. Night blindness and abnormal cone electroretinogram ON responses in patients with mutations in the GRM6 gene encoding mGluR6. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102:4884–9.
30. Zeitz C, Minotti R, Feil S, Matyas G, Cremers FP, Hoyng CB, et al. Novel mutations in CACNA1F and NYX in Dutch families with X-linked congenital stationary night blindness. *Mol Vis*. 2005;11:179–83.
31. Audo I, Kohl S, Leroy BP, Munier FL, Guillonneau X, Mohand-Saïd S, et al. TRPM1 is mutated in patients with autosomal-recessive complete congenital stationary night blindness. *Am J Hum Genet*. 2009;85(5):720–9.
32. Li Z, Sergouniotis PI, Michaelides M, Mackay DS, Wright GA, Devery S, et al. Recessive mutations of the gene TRPM1 abrogate ON bipolar cell function and cause complete congenital stationary night blindness in humans. *Am J Hum Genet*. 2009;85:711–9.
33. Zeitz C, Jacobson SG, Hamel CP, Bujakowska K, Neuillé M, Orhan E, et al. Whole-exome sequencing identifies LRRIT3 mutations as a cause of autosomal-recessive complete congenital stationary night blindness. *Am J Hum Genet*. 2013;92(1):67–75.
34. Strom NT, Nyakatura G, Apfelstedt-Sylla E, Hellebrand H, Lorenz B, Weber BH, et al. An L-type calcium-channel gene mutated in incomplete X-linked congenital stationary night blindness. *Nat Genet*. 1998;19:260–3.
35. Bech-Hansen NT, Naylor MJ, Maybaum TA, Pearce WG, Koop B, Fishman GA, et al. Loss-of-function mutations in a calcium-channel alpha1-subunit gene in Xp11.23 cause incomplete X-linked congenital stationary night blindness. *Nat Genet*. 1998;19:264–7.
36. Vincent A, Héon E. Outer retinal structural anomaly due to frameshift mutation in CACNA1F gene. *Eye (Lond)*. 2012;26(9):1278–80.
37. Chen RW, Greenberg JP, Lazow MA, Ramachandran R, Lima LH, Hwang JC, et al. Autofluorescence imaging and spectral-domain optical coherence tomography in incomplete congenital stationary night blindness and comparison with retinitis pigmentosa. *Am J Ophthalmol*. 2012;153(1):143–54.
38. Zeitz C, Kloetkener-Gruissem B, Forster U, Kohl S, Magyar I, Wissinger B, et al. Mutations in CABP4, the gene encoding the Ca<sup>2+</sup> + -binding protein 4, cause autosomal recessive night blindness. *Am J Hum Genet*. 2006;79(4): 657–67.
39. Bijveld MM, Florijn RJ, Bergen AA, van den Born LJ, Kamermans M, Prick L, et al. Genotype and phenotype of 101 dutch patients with congenital stationary night blindness. *Ophthalmology*. 2013;120(10):2072–81.
40. Khan AO, Alrashed M, Alkuraya FS. Clinical characterisation of the CABP4-related retinal phenotype. *Br J Ophthalmol*. 2013;97(3):262–5.
41. Lodha N, Loucks CM, Beaulieu C, Parboosingh JS, Bech-Hansen NT. Congenital stationary night blindness: mutation update and clinical variability. *Adv Exp Med Biol*. 2012;723:371–9.
42. Liu X, Kerov V, Haeseleer F, Majumder A, Artemyev N, Baker SA, et al. Dysregulation of Ca(v)1.4 channels disrupts the maturation of photoreceptor synaptic ribbons in congenital stationary night blindness type 2. *Channels (Austin)*. 2013;7(6):514–23.
43. Knoflach D, Kerov V, Sartori SB, Obermair GJ, Schmuckermaier C, Liu X, et al. Cav1.4 IT mouse as model for vision impairment in human congenital stationary night blindness type 2. *Channels (Austin)*. 2013;7(6):503–13.
44. Bramblett DE, Pennesi ME, Wu SM, Tsai MJ. The transcription factor Bhlhb4 is required for rod bipolar cell maturation. *Neuron*. 2004;43(6):779–93.
45. Brzezinski 4th JA, Brown NL, Tanikawa A, Bush RA, Sieving PA, Vitaterna MH, et al. Loss of circadian photoentrainment and abnormal retinal electrophysiology in Math5 mutant mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2005; 46(7):2540–51.
46. Jung CC, Atan D, Ng D, Ploder L, Ross SE, Klein M, et al. Transcription factor PRDM8 is required for rod bipolar and type 2 OFF-cone bipolar cell survival and amacrine subtype identity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112(23): E3010–9.
47. Kondo M, Das G, Imai R, Santana E, Nakashita T, Imawaka M, et al. A Naturally Occurring Canine Model of Autosomal Recessive Congenital Stationary Night Blindness. *PLoS ONE*. 2015;10(9):e0137072.
48. Aydin D, Weyer SW, Müller UC. Functions of the APP gene family in the nervous system: insights from mouse models. *Exp Brain Res*. 2012;217: 423–34.
49. Deutman AF, Pinckers AJ, Aan de Kerk AL. Dominantly inherited cystoid macular edema. *Am J Ophthalmol*. 1976;82:540–8.
50. George ND, Yates JR, Moore AT. Clinical features in affected males with X-linked retinoschisis. *Arch Ophthalmol*. 1996;114:274–80.
51. Tantri A, Vrabec TR, Cu-Unjieng A, Frost A, Annesley Jr WH, Donoso LA. X-linked retinoschisis: a clinical and molecular genetic review. *Surv Ophthalmol*. 2004;49(2):214–30.
52. Miyake Y, Horiguchi M, Ota I, Shiroyama N. Characteristic ERG-flicker anomaly in incomplete congenital stationary night blindness. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1987;28(11):1816–23.
53. Quigley M, Roy MS, Barsoum-Homsy M, Chevrette L, Jacob JL, Milot J. On- and off-responses in the photopic electroretinogram in complete-type congenital stationary night blindness. *Doc Ophthalmol*. 1996;92(3):159–65.
54. Peachey NS, Goto Y, al-Ubaidi MR, Naash MI. Properties of the mouse cone-mediated electroretinogram during light adaptation. *Neurosci Lett*. 1993; 162(1–2):9–11.
55. Gresh J, Goletz PW, Crouch RK, Rohrer B. Structure-function analysis of rods and cones in juvenile, adult, and aged C57bl/6 and Balb/c mice. *Vis Neurosci*. 2003;20(2):211–20.
56. Williams GA, Jacobs GH. Cone-based vision in the aging mouse. *Vision Res*. 2007;47(15):2037–46.
57. Zabouri N, Haverkamp S. Calcium channel-dependent molecular maturation of photoreceptor synapses. *PLoS ONE*. 2013;8(5):e63853.
58. Koulen P, Fletcher EL, Craven SE, Bredt DS, Wässle H. Immunocytochemical localization of the postsynaptic density protein PSD-95 in the mammalian retina. *J Neurosci*. 1998;18:10136–49.
59. Sherry DM, Wang MM, Bates J, Frishman LJ. Expression of vesicular glutamate transporter 1 in the mouse retina reveals temporal ordering in development of rod vs. cone and ON vs. OFF circuits. *J Comp Neurol*. 2003; 465:480–98.
60. Burmeister M, Novak J, Liang MY, Basu S, Ploder L, Hawes NL, et al. Ocular retardation mouse cause by CHX10 homeobox null allele: impaired retinal progenitor proliferation and bipolar cell differentiation. *Nat Genet*. 1996;12: 376–84.
61. Liu IS, Chen JD, Ploder L, Vidgen D, van der Kooy D, Kalnins VI, et al. Developmental expression of a novel murine homeobox gene (Chx10): evidence for roles in determination of the neuroretina and inner nuclear layer. *Neuron*. 1994;13:377–93.
62. Elshatory Y, Everhart D, Deng M, Xie X, Barlow RB, Gan L. Islet-1 controls the differentiation of retinal bipolar and cholinergic amacrine cells. *J Neurosci*. 2007;27:12707–20.
63. Tomita K, Nakanishi S, Guillemot F, Kageyama R. Mash1 promotes neuronal differentiation in the retina. *Genes Cells*. 1996;1:765–74.

64. Chow RL, Snow B, Novak J, Looser J, Freund C, Vidgen D, et al. Vsx1, a rapidly evolving paired-like homeobox gene expressed in cone bipolar cells. *Mech Dev.* 2001;109:315–22.
65. Hatakeyama J, Tomita K, Inoue T, Kageyama R. Roles of homeobox and bHLH genes in specification of a retinal cell type. *Development.* 2001;128:1313–22.
66. Feng L, Xie X, Joshi PS, Yang Z, Shibasaki K, Chow RL, et al. Requirement for Bhlhb5 in the specification of amacrine and cone bipolar subtypes in mouse retina. *Development.* 2006;133:4815–25.
67. Huang L, Hu F, Feng L, Luo XJ, Liang G, Zeng XY, et al. Bhlhb5 is required for the subtype development of retinal amacrine and bipolar cells in mice. *Dev Dyn.* 2014;243:279–89.
68. Hume DA, Perry VH, Gordon S. Immunohistochemical localization of a macrophage-specific antigen in developing mouse retina: phagocytosis of dying neurons and differentiation of microglial cells to form a regular array in the plexiform layers. *J Cell Biol.* 1983;97:253–7.
69. Stevens B, Allen NJ, Vazquez LE, Howell GR, Christopherson KS, Nouri N, et al. The classical complement cascade mediates CNS synapse elimination. *Cell.* 2007;131:1164–78.
70. Yang G, Gong YD, Gong K, Jiang WL, Kwon E, Wang P, et al. Reduced synaptic vesicle density and active zone size in mice lacking amyloid precursor protein (APP) and APP-like protein 2. *Neurosci Lett.* 2005;384:66–71.
71. Wang P, Yang G, Mosier DR, Chang P, Zaidi T, Gong YD, et al. Defective neuromuscular synapses in mice lacking amyloid precursor protein (APP) and APP-Like protein 2. *J Neurosci.* 2005;25:1219–25.
72. Gu X, Zou Y, Su Z, Huang W, Zhou Z, Arendsee Z, et al. An Update of Diverge Software for Functional Divergence Analysis of Protein Family. *Mol Biol Evol.* 2013;30:1713–9.
73. Klevanski M, Saar M, Baumkötter F, Weyer SW, Kins S, Müller UC. Differential role of APP and APLPs for neuromuscular synaptic morphology and function. *Mol Cell Neurosci.* 2014;61:201–10.
74. Hoon M, Bauer G, Fritschy JM, Moser T, Falkenburger BH, Varoqueaux F. Neuroligin 2 controls the maturation of GABAergic synapses and information processing in the retina. *J Neurosci.* 2009;29(25):8039–50.
75. Hoon M, Soykan T, Falkenburger B, Hammer M, Patrizi A, Schmidt KF, et al. Neuroligin-4 is localized to glycinergic postsynapses and regulates inhibition in the retina. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(7):3053–8.
76. Fuerst PG, Bruce F, Tian M, Wei W, Elstrott J, Feller MB, et al. DSCAM and DSCAML1 function in self-avoidance in multiple cell types in the developing mouse retina. *Neuron.* 2009;64(4):484–97.
77. Ribic A, Liu X, Crair MC, Biederer T. Organization and function of mouse photoreceptor ribbon synapses involve the immunoglobulin protein synaptic cell adhesion molecule 1. *J Comp Neurol.* 2014;522(4):900–20.
78. Osterfield M, Egelund R, Young LM, Flanagan JG. Interaction of amyloid precursor protein with contactins and NgCAM in the retinotectal system. *Development.* 2008;135(6):1189–99.
79. Osterhout JA, Stafford BK, Nguyen PL, Yoshihara Y, Huberman AD. Contactin-4 mediates axon-target specificity and functional development of the accessory optic system. *Neuron.* 2015;86(4):985–99.
80. Kim DS, Ross SE, Trimarchi JM, Aach J, Greenberg ME, Cepko CL. Identification of molecular markers of bipolar cells in the murine retina. *J Comp Neurol.* 2008;507(5):1795–810.
81. Aydin D, Filippov MA, Tschäpe JA, Gretz N, Prinz M, Eils R, et al. Comparative transcriptome profiling of amyloid precursor protein family members in the adult cortex. *BMC Genomics.* 2011;12:160.
82. Bai Y, Markham K, Chen F, Weerasekera R, Watts J, Horne P, et al. The in vivo brain interactome of the amyloid precursor protein. *Mol Cell Proteomics.* 2008;7(1):15–34.
83. Bhattacharya SS, Wright AF, Clayton JF, Price WH, Phillips CI, McKeown CM, et al. Close genetic linkage between X-linked retinitis pigmentosa and a restriction fragment length polymorphism identified by recombinant DNA probe L1.28. *Nature.* 1984;309(5965):253–5.
84. Wright AF, Bhattacharya SS, Aldred MA, Jay M, Carothers AD, Thomas NS, et al. Genetic localisation of the RP2 type of X linked retinitis pigmentosa in a large kindred. *J Med Genet.* 1991;28(7):453–7.
85. Zhang H, Hanke-Gogokhia C, Jiang L, Li X, Wang P, Gerstner CD, et al. Mis trafficking of prenylated proteins causes retinitis pigmentosa 2. *FASEB J.* 2015;29(3):932–42.
86. Hua ZL, Emiliani FE, Nathans J. Rac1 plays an essential role in axon growth and guidance and in neuronal survival in the central and peripheral nervous systems. *Neural Dev.* 2015;10(1):21.
87. Haeseleer F, Sokal I, Gregory FD, Lee A. Protein phosphatase 2A dephosphorylates CaBP4 and regulates CaBP4 function. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2013;54(2):1214–26.
88. Loosli F. ArhGEF18 regulated Rho signaling in vertebrate retina development. *Small GTPases.* 2013;4(4):242–6.
89. Neullé M, Morgans CW, Cao Y, Orhan E, Michiels C, Sahel JA, et al. LRIT3 is essential to localize TRPM1 to the dendritic tips of depolarizing bipolar cells and may play a role in cone synapse formation. *Eur J Neurosci.* 2015;42(3):1966–75.
90. Pardue MT, McCall MA, LaVail MM, Gregg RG, Peachey NS. A naturally occurring mouse model of X-linked congenital stationary night blindness. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1998;39(12):2443–9.
91. Pearing JN, Bojang Jr P, Shen Y, Koike C, Furukawa T, Nawy S, et al. A role for nyctalopin, a small leucine-rich repeat protein, in localizing the TRP melastatin 1 channel to retinal depolarizing bipolar cell dendrites. *J Neurosci.* 2011;31(27):10060–6.
92. Rao A, Dallman R, Henderson S, Chen CK. Gbeta5 is required for normal light responses and morphology of retinal ON-bipolar cells. *J Neurosci.* 2007;27(51):14199–204.
93. Cao Y, Masuho I, Okawa H, Xie K, Asami J, Kammermeier PJ, et al. Retina-specific GTPase accelerator RGS11/G beta 5/R9AP is a constitutive heterotrimer selectively targeted to mGluR6 in ON-bipolar neurons. *J Neurosci.* 2009;29(29):9301–13.
94. Ishii M, Morigiwa K, Takao M, Nakanishi S, Fukuda Y, Mimura O, et al. Ectopic synaptic ribbons in dendrites of mouse retinal ON- and OFF-bipolar cells. *Cell Tissue Res.* 2009;338(3):355–75.
95. Tsukamoto Y, Omi N. Effects of mGluR6-deficiency on photoreceptor ribbon synapse formation: comparison of electron microscopic analysis of serial sections with random sections. *Vis Neurosci.* 2014;31(1):39–46.
96. Zheng H, Jiang M, Trumbauer ME, Sirinathsingji DJ, Hopkins R, Smith DW, et al. beta-Amyloid precursor protein-deficient mice show reactive gliosis and decreased locomotor activity. *Cell.* 1995;81:525–31.
97. von Koch CS, Zheng H, Chen H, Trumbauer M, Thinakaran G, van der Ploeg LH, et al. Generation of APLP2 KO mice and early postnatal lethality in APLP2/APP double KO mice. *Neurobiol. Aging.* 1997;18:661–9.
98. Needham BE, Wlodek ME, Ciccosto GD, Fam BC, Masters CL, Proietto J, et al. Identification of the Alzheimer's disease amyloid precursor protein (APP) and its homologue APLP2 as essential modulators of glucose and insulin homeostasis and growth. *J. Pathol.* 2008;215:155–63.

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

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

Submit your manuscript at  
[www.biomedcentral.com/submit](http://www.biomedcentral.com/submit)



## **Dissecting of CFH effects in a wet AMD model**

**Céline Borrás<sup>1,4</sup>, Kimberley Delaunay<sup>1,2,3</sup>, Toufik Abache<sup>5</sup>, Sylvie Jorieux<sup>5</sup>, Marie-Christine Naud<sup>1,2,3</sup>, Mohamed El Sanharawi<sup>1,2,3</sup>, Emmanuelle Gélisé<sup>1,2,3</sup>, Patricia Lassiaz<sup>1,2,3</sup>, NA An<sup>1,2,3</sup>, Laura Kowalczyk<sup>1,2,3</sup>, Matthew Pickering<sup>6</sup>, Cédric Ayassami<sup>1,2</sup>, Alexandre Moulin, Francine Behar-Cohen<sup>1,2,3,(+)</sup>, Frédéric Mascarelli<sup>1,2,3</sup> and Virginie Dinet<sup>1,2,3(\*)</sup>.**

(1) Centre de Recherche des Cordeliers, Université Paris Descartes, UMRS1138, Paris, F-75006 France ; (2) INSERM, U1138, Paris, F-75006 France; (3) Université Pierre et Marie Curie - Paris6, UMRS 872, Paris, F-75006 France; (4) Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, F-75006 Paris, France; (5) Laboratoire Français du Fractionnement (LFB) Lille, France. (6) Department of Medecine, imperial College London, London UK

**Short title: anti-complement activation therapy for wet AMD**

**Grant support: the Agence Nationale de la Recherche (\*).**

**Word count:**

**(+) Corresponding author: Centre de Recherche des Cordeliers, UMRS872, 15 rue de l'Ecole de Médecine, 75006, Paris, France**

**E-mail: [francine.behar@gmail.com](mailto:francine.behar@gmail.com)**

**Author contributions:**

V.D., C.B., K.D., M.C.N., M.E.S., N.A. and E.G. performed the experiments; C.A. participated to in vivo experiments; M.P. generously provided Cfh knockout (Cfh<sup>-/-</sup>) mice; A.M. and F.B.C. contributed to obtain human tissues; T.A. and S.J. synthesized all forms of CFH and CFH fragments; S.J., V.D., F.B.C., T.A. and C.B. conceptualized experiments; V.D., F.B.C., C.B., T.A., F.M., S.J. and, P.L. interpreted data; V.D. S.J and F.B.C. and F.M. wrote the manuscript; V.D. was responsible for research supervision; F.B.C. was RPIB coordinator for this project funding.

**Competing interests**

The authors declare no competing financial interests

**ABSTRACT (205 mots au max 250)**

A common allele (H402) of the complement factor H (CFH) gene is a major risk factor for age-related macular degeneration (AMD), the leading cause of blindness in the elderly population. The loss of central vision results from atrophy and/or from abnormal neovascularization arising from the choroid. The functional link between CFH and CNV in AMD remains unclear. In a murine model of CNV used as a model for neo-vascular AMD (nAMD), intraocular human recombinant CFH (recCFH) reduced CNV as efficiently as currently used anti-VEGF antibody, decreasing deposition of activated C3 cleavage fragments, membrane attack complex and microglia/macrophages infiltration markers in the CNV lesion site. In sharp contrast, recCFH carrying the H402 risk variant had no effect on CNV indicating a causal link to disease etiology. Only the recCFH NT<sup>al</sup> region (recCFH1-7), containing the CCP1-4 C3-convertase inhibition domains coupled with CCP7 binding domain, exerted all differential biological effects. The CT<sup>al</sup> region (recCFH7-20) containing the CCP7-8 and CCP19-20 binding sites was anti-angiogenic but did not reduce the microglia/macrophages infiltration. The anti-angiogenic effect of both recCFH and recCFHCCP7-20 resulted from thrombospondin-1 (TSP-1) up-regulation independently of the activated C3 cleavage fragments. This study provides insight on the mechanistic role of CFH in nAMD and invites reconsider its therapeutic potential.

## **INTRODUCTION (528 mots comptés il en faut 500)**

Age Related Macular Degeneration (AMD) is the leading cause of vision loss over the age of 55, affecting 30-50 million individuals worldwide. A common allele (H402) of the complement factor H (CFH) gene is a major risk factor for both the atrophic and the neovascular (nAMD, also referred as wet or exudative) form of the disease<sup>1-4</sup>. Choroidal neovascularization (CNV) causes photoreceptors death<sup>5</sup>. The current treatment of nAMD relies on Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) neutralization using repeated intravitreal injections of anti-VEGF agents<sup>6</sup>. But approximately 20-30% of AMD patients respond poorly to anti-VEGFs<sup>7</sup>, and long-term VEGF neutralization may favor macular atrophy<sup>8</sup> as VEGF is trophic for the retina<sup>9,10</sup> and for the choroid<sup>11</sup>.

CFH, a regulator of the complement alternative pathway (AP), is composed of 20 complement control protein (CCP) domains. The CCP1-4 has decay acceleration activity allowing for dissociation of C3/C5 convertase<sup>12</sup>. CCP6-8 and CCP18-20 carry two binding sites to heparin/glycosaminoglycans (GAGs) on host cells, protecting them against complement activation<sup>13</sup>. Produced mainly by the liver, CFH is also produced locally in the eye<sup>14</sup> and particularly in the retinal pigment epithelium (RPE) and choroid<sup>15</sup>. Synthesis of CFH by RPE cells is down-regulated by oxidized photoreceptor outer segments<sup>14</sup>, suggesting that with aging, cumulative oxidative products may activate the alternative complement pathway and generate a local pro-inflammatory that favors neovascularization. Specific genetic CFH variants have been associated with increased risks of atypical hemolytic uremic syndrome (aHUS), membrano-proliferative glomerulonephritis type II (MPGN2) and of AMD. Complement-containing debris accumulate in the kidney in MPGN2 and in AMD eyes and *cfh* knock-out mice develops MPGN2<sup>16</sup> as well as some features of AMD<sup>17</sup>. A 1277 T>C transition in *cfh* sequence, resulting in replacement of tyrosine with histidine at position 402 (Y402H) in CCP7, increases the risk of AMD 5-7% in homozygotes<sup>1-4</sup>. Indeed, Y402H is

associated with a 48% risk for AMD by 95 years of age for homozygotes compared with a 22% risk for non-carriers<sup>18</sup>. How CFHH402 polymorphism influences AMD, including CNV development and which part of CFH protects against CNV remain undetermined. The protecting effect of CFHH402 variant against membrane attack complex (MAC/C5b9) deposition at the RPE/choroid complex is suspected to be reduced<sup>19</sup>, but its impact on CFH binding to the Bruch's membrane and RPE cells is controversial<sup>20-21</sup>. While deficiency in complement AP negative regulators favors the development of experimental CNV in mice<sup>22-24</sup>, the local or systemic inhibition of AP has controversial effects on CNV<sup>25-27</sup>. At a time when strategies aiming at limiting the AP activation failed to demonstrate any preventive effects in the atrophic form of AMD<sup>28-30</sup>, whether recombinant CFH may be an alternative therapy for CNV remains a subject of debate.

After having demonstrated the anti-angiogenic potential of recombinant human CFH (recCFH) in a murine CNV model, reliable for nAMD therapy screening<sup>23, 25-27</sup>, we have performed a molecular dissection of CFH domains to elucidate the cellular and molecular mechanisms responsible for the anti-angiogenic effects. We showed that the anti-angiogenic effect of CFH was not dependent on the C3/C5 convertase activity but was mediated by up-regulation of the concentration of thrombospondin 1 (TSP1). Moreover, recombinant CFH carrying the H402 risk variant has no protecting effect against CNV, indicating a causal link to wet AMD.

## **RESULTS (2015 mots)**

### **The overactivation of AP is correlated with an offshoring of CFH in wet AMD retina**

The formation of MAC is essential for the development of laser-induced CNV<sup>31</sup>, demonstrating that complement activation could play a direct role in the pathogenesis of nAMD. On human donor eyes, abundant anti-MAC (C5b9) immunostaining was observed in the macula from wet AMD as compared to healthy subject (Figs. 1b and c). In the healthy donor retina, anti-CFH staining was homogenously distributed all over the macula (Fig. 1d). In contrast, faint anti-CFH was localized with the neo-vascularized perifoveal region (avascular in healthy conditions) and associated with intense anti-MAC staining close to the photoreceptor layer in the wet AMD donor neuroretina (Fig. 1c and d).

### **RecCFH is as potent as anti-VEGF on a murine model of wet AMD**

Human CFHs, purified from plasma (plCFH) or recombinant CFHY402 (recCFH), were assessed on complement activation in vitro. The efficacy of the decay accelerating of AP C3-convertase, mediated by the CCP1-4 domain of CFH, was similar for plCFH and recCFH ( $IC_{50} \approx 0.12 \mu\text{g/ml}$ ) (Supplementary data 1). The regulator activity of CFH on cell surfaces was tested in an FH-dependant hemolytic assay with sheep erythrocytes; plCFH and recCFH presented a decrease in erythrocytes lysis indicating the CCP19-20 domains capacity to bind to cell membranes .

Before efficacy evaluation, the fate of exogenous human CFH was evaluated after intravitreal injection (IVT) in the rat. One hour after a single IVT of plCFH or recCFH, CFH reached the RPE/choroid complex where it stayed for at least 3 days (Supplementary data 2a). The IVT of plCFH or recCFH, concomitant to laser, reduced CNV by 69% and 76%, respectively (vs PBS,  $p < 0.001$ ), with an efficacy comparable to a similar molar concentration of rat blocking anti-VEGF antibody (70% vs PBS,  $p < 0.001$ ) (Figs. 2a and b). The anti-angiogenic effect of recCFH was similar in CFH knockout (*cfh*<sup>-/-</sup>) mice (73% vs PBS,  $p <$

0.001), excluding that local production of CFH could result in the observed effect (Supplementary data 3). Since patients are treated after CNV has developed, we tested the curative effect of recCFH injected at day 4 after laser induction to compensate for the decrease in endogenous CFH at this time (Supplementary data 2b). RecCFH reduced CNV by 76% and 35% (vs PBS,  $p < 0.001$  for both) to 0.6 and 0.06  $\mu\text{M}$ , respectively (Supplementary data 2c) to calculate of an apparent  $\text{IC}_{50}$  value of 0.34  $\mu\text{M}$ . Note that the high curative dose of recCFH was as efficient as curative anti-VEGF (68% vs PBS,  $p < 0.001$ ) (Supplementary data 2c). To remain closer to human therapeutic conditions, in all further experiments, a single IVT injection of recCFH or recCFH fragments was administered on day 4 after laser induction.

### **Intraocular recCFH protects from local AP-activation and reduces microglia/macrophages infiltration**

Accumulation of C3 was shown in the retina/choroid complex of *cfh*<sup>-/-</sup> mice<sup>17</sup> and ocular knock-down of CFH increased the deposition of MAC in the RPE/choroid/sclera, together with earlier and exacerbated angiogenic response to laser induction<sup>23</sup>, suggesting a link between AP activation and CNV. In control PBS-injected rats, intense MAC and low C3 deposition in CNV lesion confirmed the local activation of AP (Figs. 2c and d). Together with the inhibition of CNV, curative recCFH increased C3 staining by 340% (vs PBS,  $p < 0.001$ ), reduced MAC staining by 85% (vs PBS,  $p < 0.001$ ) and reduced infiltration of microglia/macrophages (anti-CD68 positive cells) (by 37% vs PBS,  $p < 0.01$ ) at the sites of laser injury (Figs. 2c and d). Altogether, these data demonstrated that recCFH not only prevented local AP-activation but also decreased microglia/macrophages infiltration in the CNV rat model.

### **recCFH1-7 carries all the effects of recCFH**

To determine which functional domains of CFH carry the anti-angiogenic activity, we tested different recCFH fragments on rat CNV (Fig. 3a). Three CCPs are required for the CFH functions: CCP6-8 and CCP19-20 that contain / a GAGs and C3b/GAGs binding sites, respectively, and CCP1-4 responsible for the dissociation of C3/C5 convertase. To investigate the impact of the CCP19-20 domains, we assessed recCFH1-18 or recCFH1-7 that contained one GAGs binding site (CCP6-7) and one C3b binding site associated to the anti-C3 convertase region (CCP1-4). Both of them maintained in vitro an anti-C3 convertase activity (IC<sub>50</sub>: 0.16 µg/ml and 0.06 µg/ml, respectively) but did not protect erythrocytes of sheep from hemolysis, due to the deprivation of the CCP19-20 domains (Supplementary data 1). RecCFH1-18 and recCFH1-7 prevented CNV formation respectively by 67% and 73% (vs PBS, p< 0.001), increased levels of C3 deposits by 204% and 230% (vs PBS, p< 0.001) and reduced MAC formation by 67% and 69% (vs PBS, p< 0.001) (Fig. 3b). These data demonstrate that the CCP8-20 and CCP19-20 domains are not essential for the anti-angiogenic and AP-inhibition in CNV model. Furthermore, both recCFH1-7 and recCFH1-18 reduced microglia/macrophages infiltration at the CNV lesion by respectively 47% and 66% (vs PBS, p<0.001) (Fig. 3b). RecCFH1-4 showed no effect on CNV area, infiltration of microglia/macrophages and activation of complement pathway (data not shown). Overall, these data indicated that to be functional on CNV lesion, recCFH must have at least the CCP1-4 and CCP6-7 domains.

### **recCFH7-20 exerts anti-angiogenic effects but has no effect on microglia/macrophages infiltration in CNV model**

As expected, recCFH8-20 showed no effect on CNV, microglia/macrophages infiltration, complement activation and MDA staining (Fig. 3b). We then tested the C-terminal fragment of CFH encompassing the CCP7, without CCP1-4 domains responsible for the anti-C3 convertase activity. We found no significant in vitro anti-C3 convertase activity (> 100% less potent than recCFH or recCFH1-7) and consequently, no protective activity from erythrocytes hemolysis (Supplementary data 1). Unexpectedly, recCFH7-20 reduced CNV development and MAC formation by 80% and 63%, respectively (vs PBS,  $P < 0.001$ ), increased C3 deposits by 330% (vs PBS,  $p < 0.001$ ), but without effect on microglia/macrophages infiltration (Fig. 3b). These data suggest that to reduce MAC formation, the CCP7 and CCP19-20 domains are required, probably for host cell surface binding and to reduce the formation of C3/C5 convertase complexes by competition for C3b binding. The absence of anti-angiogenic activity of recCFH8-20 compared to recCFH7-20 did not result from a different bioavailability within the retina, since recCFH8-20 rapidly reached and remained in the RPE/choroid complex after IVT (Supplementary data 2a). These data indicate that CCP7 is mandatory for the anti-angiogenic activity of CFH. Moreover, we demonstrated that without the domain of inhibition of C3-convertase activity, recCFH was unable to reduce microglia/macrophages infiltration.

### **The regulation of inflammation genes expressions, in contrast to angiogenic genes expressions, is dependent of the anti-C3 convertase activity of CFH in CNV model**

CNV is associated with transcriptomic changes in genes involved in inflammation and angiogenesis in the RPE/choroid (Table 2a). At day 7 post-laser, both AP-activation (complement protein C3, the receptors of the anaphylatoxin C3a or C5a (C3aR/C5aR)) and -

inhibition gene expressions (Cd46, Cd55/DAF and Cd59, Cfi and Cfh11) were up-regulated (Table 2a). Only expression of Cfh, the key inhibitor of AP complement activation, and Cfb, the limiting factor of AP-activation, were down-regulated (Table 2a), suggesting a specific regulation of the AP-activation in CNV model. Both genes involved in microglia/macrophages infiltration Mcp-1/Ccl2 and its receptor Ccr2 and genes coding for the pro-inflammatory cytokines, *Il1 $\beta$* , *Il6* and *Il18* were up-regulated. We found an imbalance in gene expression for pro- and anti-angiogenic factors with an up-regulation for the first one Vegfa and its receptors R1/R2 but a down-regulation for the second group, Pedf (Table 2a) in favor of angiogenic process.

We compared the transcriptomic signatures of recCFH, recCFH1-7 and recCFH7-20. All recCFH fragments down-regulated the expression of C3 and endogenous AP-inhibitors Cfh, Cfh11 and Cfi (Table 2b) but up-regulated C3aR (Table 2b), suggesting a negative feedback of AP-inhibitor genes expression in presence of high level of CFH. In contrast, only recCFH and recCFH1-7 upregulated Cfb expression and down-regulated C5aR expression (Table 2b), in agreement with reduced infiltration of microglia/macrophages (Fig. 3b). All recCFH fragments reduced inflammatory signal by down-regulated the expression of *Il1 $\beta$*  and *Il18* (Table 2b). Interestingly, only recCFH7-20 strongly up-regulated the expression of *Il6* and *Ccl2/Ccr2* gene (Table 2b) consistent with an increase in microglia/macrophages infiltration at the level of CNV injury (Fig. 3b). While recCFH fragments generally reduced the expression of pro-angiogenic genes, the Pedf mRNA expression was upregulated (Table 2b) according to the anti-angiogenic activity of CFH.

All of these data confirmed that the anti-angiogenic activity of CFH was, in part, outside the anti-C3-convertase activity, in contrast to its microglia/macrophage infiltration effect.

### **Thrombospondin-1 (TSP-1) mediates CFH anti-angiogenic effect**

Both recCFH and recCFH7-20 treatments promoted C3 deposition, but characterized for recCFH by a higher level of C3 (>21% P<0.01 vs recCFH7-20, Fig. 4a) and a reduction in C3b fragment deposition (Fig. 4a). This result could be explained by the capacity of recCFH, to inhibit the C3-convertase activity by its CCP1-4 domains.

We further investigated how recCFH7-20 exerted its anti-angiogenic effect on CNV without reducing inflammatory cells infiltration. As described in a recent study, the binding of CFH to complement receptor 3 (CR3; CD11b/CD18) obstructs the homeostatic elimination of mononuclear phagocyte cells from the subretinal space mediated by the anti-angiogenic TSP-1 binding to the CD47 receptor<sup>32</sup>. Furthermore, as PEDF, which gene expression was upregulated by recCFH fragments (Table 2b), increases TSP-1 concentration<sup>33</sup>, we thus investigated the effects of either recCFH or recCFH7-20 on TSP-1 expression during CNV. Injection of recCFH or recCFH7-20 increased TSP-1 area immunostaining at the CNV lesion by 220% and 130%, respectively (vs PBS, p<0.001) until 14 days post-laser (Fig. 4b). Furthermore, co-injection of a blocking anti-TSP-1 antibody and recCFH (either recCFH or recCFH7-20) abolished the anti-angiogenic activity of both recCFH (Fig. 5), providing evidence of the role of TSP-1 in the anti-angiogenic activity of each recCFH forms, independently from the regulation of C3/C5 convertases activity.

### **CFH anti-angiogenic effect is not restricted to inhibition of monocytes infiltration**

To evaluate whether the anti-angiogenic activity of CFH was restricted to its effect on monocytes, we used CCL2-knockout (CCL2<sup>-/-</sup>) mice that have reduced microglia/macrophage infiltration at the site of laser-induced CNV. As expected, CNV area was reduced by 49% in CCL2<sup>-/-</sup> mice compared to WT mice (Fig. 6a), consistent with the pro-angiogenic effect of CCL2<sup>31</sup>. However, the injection of recCFH or recCFH7-20 induced a further CNV

decrease of approximately 70% (vs WT,  $P < 0.01$ ) in  $CCL2^{-/-}$  mice (Fig. 6a). TSP-1 immunostaining at the CNV site was increased by 540% in  $CCL2^{-/-}$  mice compared to WT mice (Fig. 6a). TSP-1 concentration was further enhanced by recCFH or recCFH7-20 (Fig. 6b). We thus hypothesized that CFH could act synergistically with CCL2 mis-expression, at least in part, through TSP-1 expression.

### **CFH Y402H polymorphism significantly reduced the anti-angiogenic effect of CFH**

The effect of  $CFH_{Y402H}$  polymorphism on CFH binding to GAGs, Bruch's membrane and RPE cells is controversial<sup>20-21</sup>. RecCFH<sub>H402</sub> retains its in vitro anti-C3 convertase activity and its anti-hemolytic activity on sheep erythrocytes (Supplementary data1b). RecCFH<sub>402H</sub> treatment was not associated with C3 deposits and reduction of MAC, demonstrating that domain CCP7 is necessary for its effect on local AP activation in CNV model (Fig. 3b). RecCFH<sub>402H</sub> did not reduce CNV, microglia/macrophages infiltration (Fig. 3b) at the CNV lesion (Fig. 3b). The bioavailability of recCFH<sub>402H</sub> was similar to that of recCFH after IVT, remaining in the RPE/choroid complex for at least 3 days (Supplementary data 2a). Similar results were obtained with a preventive treatment using the recCFH<sub>402H</sub> (data not shown). Unlike to recCFH1-7, recCFH1-7<sub>402H</sub> fragment did not exert any anti-angiogenic activity (Fig. 3b), confirming that CCP 7 is determinant for angiogenic activity. These data provided a link between the Y402H CFH polymorphism and wet AMD. The role of CCP7 was confirmed in a corneal angiogenesis model in which recCFH reduced angiogenesis by 84% (vs PBS,  $p < 0.001$ ) while recCFH<sub>402H</sub> had no effect (Supplementary data 4a).

In CNV model, recCFH<sub>402H</sub> had no effect on *cfi* or *cfhl1* gene expression, but strongly up-regulated *cfh*, *cfb* and *c3* gene expressions (Table 2b), suggesting a different regulation of AP-inhibitors gene expression compared to recCFH. Note that recCFH<sub>402H</sub> up-regulated the expression of *Il6*, *ccl2* and *ccr2* (Table 2b) consistent with a microglia/macrophages

infiltration (Fig.3b). Like recCFH, recCFH<sub>402H</sub> down-regulated the vegfA/R1/R2 gene expressions, but in contrast to recCFH it had no effect on pedf expression (Table 2b).

## **DISCUSSION (1336 mots comptés / 3000\_4000 mots avec results et introduction)**

Genetic associations of complement AP in AMD patients have raised the hypothesis that chronic over activation of AP in retina/ choroid plays a key role in AMD pathogenesis. In the present study, recCFH had a strong curative and preventive anti-angiogenic effects on CNV when injected locally in the eye of Long Evans rats, confirming that CFH plays a key role in a murine CNV model, a clinically relevant therapeutic model for nAMD. The anti-angiogenic activity of recCFH was associated with of local reduction of complement activation and a reduced infiltration of microglia/macrophages at the sites of the CNV combined with an up-regulation of TSP-1. This is in accordance with the role of inflammatory cells in experimental CNV<sup>34</sup> and in exudative AMD<sup>35</sup>. AP-dependent inflammation<sup>22-25</sup> and MAC deposition play important role in angiogenesis by stimulating VEGF expression in laser-induced CNV model, and VEGF inhibition decreases local CFH and other complement regulators in the eye<sup>40</sup>, suggesting that the currently anti-VEGF treatments may favor the local AP activation. Treatment with recCFH induced the upregulation of the anti-angiogenic factors PEDF and TSP1, favoring the switch from a pro-angiogenic to an anti-angiogenic environment.

Our data show that full-length recCFH and recCFH fragments containing CCP1-4 decreased CNV injury in correlation with the reduction of MAC deposit and CD68 cells recruitment. Unexpectedly, the recCHF7-20 fragment had the same potency in reducing CNV area and MAC deposition and differed only in its inability to reduce the recruitment of microglia/macrophages to the CNV injury site. Thus, the CCP1-4 domain, which is

responsible of the accelerating decay of C3/C5 convertase complexes and and inactivation of C3b (iC3b), has been shown here to be mandatory to regulate the microglial/macrophage infiltration.

Cell-based inflammatory responses within the RPE/choroid complex are a core feature of exudative AMD<sup>41</sup>. Moreover, microglia/macrophage cells play a key role in local regulation of complement in the retina<sup>42</sup>, produce VEGF<sup>43</sup> and enhanced laser-induced CNV<sup>35</sup> which is in accordance with our data showing a strong secretion of the anti-angiogenic protein TSP-1 in CCL2<sup>-/-</sup> mice. In a CCL2<sup>-/-</sup> mice CNV model, the low CNV level is associated with high TSP-1 amount to the CNV injury site that is even increased in the mice treated with recCFH and recCFH7-20 fragment. As the recruitment of microglia/macrophages is extremely low in CCL2<sup>-/-</sup> mice, TSP-1 is likely secreted by RPE cells (Bhutto et al., 2008; Olfert, 2016) suggesting that recCFH but also recCFH7-20 could have a protective effect on RPE cells. Furthermore, these data suggest that CCL2 inhibits TSP1 release and then promotes neovascularization development (Fig. 7). Recently, a synergistic risk for AMD was found between genotype of CCL2 (CCL2—2518) and C3<sup>44</sup>, suggesting a real link between recruitment of microglia/macrophage cells and complement pathway activation. We found that both recCFH and recCFH7-20 have an anti-angiogenic role despite an opposite effect on cell infiltration associated with the presence or not of CCP1-4 domain. Our hypothesis is that recCFH7-20 through its CCP7-8 domains could bind on the microglia/macrophage and/or RPE cells membrane and then increases the level of TSP-1 leading to its anti-angiogenic activity (Fig. 7). This hypothesis is in agreement with a recent study showing that CFH through CD47/TSP-1 pathway inhibits resolution of inflammation<sup>32</sup>. The combined effect of CFH treatment and CCL2 knock-out expression is more efficient on angiogenesis process suggesting another pathway by which CFH could reduce CNV, perhaps by increasing production of TPS-1.

Whilst, previous study had already shown that the local inhibition of CFH using subretinal injection of siRNA against CFH increased MAC deposit on RPE cells and enhanced experimental CNV<sup>23</sup>, injection of high concentrations of plCFH in the vitreous (50µg/2µl) only moderately decreased laser-induced CNV in Brown Norway rats<sup>27</sup>. This can be explained by the fact that Brown Norway rats have increased immune response, hypoxia-induced, VEGF<sup>36</sup> and a progressive photoreceptor dystrophy associated with vascular abnormalities caused by mutation in the *Crb1* gene<sup>37</sup>. The systemic administration of a recombinant fusion protein containing the N-terminal of human CFH (CCP1-5) linked to the human complement receptor 2 (CR2) fragment (CCP1-4)<sup>38</sup> blocks in vitro C3 fragment accumulation on activated surfaces, MAC formation and hemolysis of erythrocytes<sup>39</sup>. Whilst one single systemic preventive injection of this compound did not prevent CNV, 50% inhibition was achieved by repeated administrations suggesting that the systemic route might not be optimal to interfere with intraocular AP activation<sup>26</sup>.

The CFH- GAGs interaction forms the basis for the protection of the native GAGs-coated host cell and membrane surfaces against MAC. Structural and binding studies suggested the need for a co-operative bivalent binding of CFH at the cell/membrane surface, involving the two GAG binding sites of the CCP6-8 and CCP19-20 domains<sup>45</sup>. However, the molecular mechanisms by which CFH<sub>402H</sub> participates to AMD progress are still not clear. Indeed, NMR-monitored titrations using His402 and Tyr402 versions of the CCP6-8 domain indicates that the structure of both CCP6-8 Y402 and CCP6-8 H402 adopts an identical extended conformation<sup>46</sup>. Moreover, the structures of CCP7 Y402 and CCP7 H402 are nearly identical<sup>47</sup>. The role of the CFH Y402H polymorphism for CFH binding to GAGs is controversial. Several in vitro studies, using chromatography affinity experiments, showed

that CFH<sub>402H</sub> and CCP7<sub>402H</sub> have less affinity for heparin than their native counterparts<sup>20,47</sup>, whereas other found no significant difference in their interactions with heparin<sup>20</sup>. The impact of CFH<sub>402H</sub> polymorphism on the binding of CFH to the Bruch's membrane is also controversial<sup>20</sup>. Moreover, mixed data have been observed regarding the altered affinity of the CFH<sub>402H</sub> variant on RPE cells<sup>20-21</sup>. It remains undetermined whether the Y402H CFH polymorphism directly affects choriocapillaris and how it participates to pathogenesis of AMD, including CNV. The effects of the CFH<sub>402H</sub> variant were never investigated in vivo. Therefore a major aim of this study was to test the hypothesis of the in vivo role of CFH<sub>402H</sub> polymorphism in exudative AMD, by investigating the efficacy of recCFH<sub>402H</sub> in the experimental model of CNV. We demonstrated for the first time the pivotal role of the CFH<sub>402H</sub> polymorphism by showing that recCFH<sub>402H</sub> did not protect against laser-induced CNV, in either curative or preventive treatment compared with the native CFH, although it possesses in fluid phase a full anti-C3 convertase activity when compared with recCFH demonstrated by in vitro experiments. On membrane cell, we provide evidence that AP activation was not inhibited in the RPE/choroid complex in these conditions, because recCFH<sub>402H</sub>, opposite to recCFH<sub>402Y</sub>, was unable to reduce MAC deposition on the sites of the CNV lesions, despite identical in vitro anti-C3 convertase activities and protection of sheep erythrocytes from hemolysis. In accordance with the bivalence and co-operativity mechanistic model of CFH and because both recCFH<sub>402H</sub> and recCFH<sub>402H</sub> (1-7) lack anti-complement activation, anti-inflammation and anti-CNV activities in the CNV model, we may speculate that CFH<sub>402H</sub> polymorphism alters , its capacity to bind to GAGs sites of the host cell and membranes. All together these data demonstrate the importance of CCP7 domain in CNV process by its inability to bind to membrane cells. Indeed, the no fixation of recCFH<sub>402H</sub> on microglia/macrophage cells would be not regulate the inhibition of TSP1 release by microglia/macrophage cells and then would promote the angiogenesis process (Fig. 7). On

other hand, our results show that the no inhibition of AP by recCFH<sub>402H</sub> leads to an overproduction of MAC, C3a/C3b products associated to an increase of microglia/macrophage cells infiltration on the CNV lesion inducing angiogenesis process by glia cells-inhibition of TSP1 release (Fig. 7). In this study, we also demonstrate that recCFH<sub>402H</sub> is unable to up-regulate PEDF expression, an activator of TSP1 expression, which would be another pathway to explain the no activity of recCFH<sub>402H</sub> on anti-angiogenesis process (Fig.7). In contrast to the hemolytic uremic syndrome (aSHU), we can exclude a deleterious role of CFH<sub>402H</sub> on the binding sites to GAGs at CCP18-20 for the anti-CNV activity of CFH because recCFH, recCFH1-18 and recCFH1-7 show similar anti-complement activation, anti-inflammation and anti-CNV activities.

In conclusion, our data demonstrate a CFH anti-angiogenic activity independently of the regulation of AP. Furthermore, this study contributes to establish a mechanistic link between CFH<sub>402H</sub> and nAMD and demonstrates the potential of local recCFH as a therapeutic option.

## MATERIALS AND METHODS

### Animals

Two month-old male Long Evans rats (Janvier), Lewis rats (Janvier), three month-old male C57Bl/6J (Janvier), male CFH<sup>-/-</sup> (kindly provided by Dr. M. Pickering MC, Centre for Complement and Inflammation Research, London) and CCL2<sup>-/-</sup> mice (kindly provided by EDTA Center, Orléans) were used in this study. All procedures conformed to the resolution on the use of animals in research of the Association for Research in Vision and Ophthalmology and to the guidelines of the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale Committee on Animal Research. For the study, several groups of 4 animals per experiment were used: one control group without intra-vitreous injection as an internal control, one group with PBS injection as a control and one group with recCFH or its fragments injection. Two time of intravitreal injection were used: at the time of Laser photocoagulation (preventive time) or four days after Laser photocoagulation (curative time). RecCFH or its fragments were injected at different concentrations (0.6 $\mu$ M, 0.06 $\mu$ M and 0.006 $\mu$ M) in the vitreous of CNV- Long Evans rats. For neutralization studies anti-TSP-1 antibody (0.6 $\mu$ M, Merck, France) was injected in the vitreous of CNV- Long Evans rats 10 min after injection of recCFH or recCFH7-20. The experiment was repeated at least three times. Before treatment of the two eye, mice or rats were anesthetized by intraperitoneal injection of a mixed of ketamine (20%)/xylaxine (40%) /NaCl (40%) 40 mg/kg. Their pupils were dilated with 2mg/0.4 ml 1% Tetracaine. At day 7 (molecular study, qPCR) or day14 (flat mounting or immunofluorescence experiments) post-Laser photocoagulation, euthanasia was performed by placing rats in a CO<sub>2</sub> chamber for 60 s, followed by cervical dislocation. The globes of the rats were collected. Mice were euthanized at the same time of the day (11:00 hours).

## **Production, purification and characterization of human plasmatic CFH, human recombinant CFH (recCFH) and its fragments**

Recombinant human CFH and CFH fragments were provided by LFB. Recombinant CFH (Y402) and CFH H402 variant were purified from supernatant of CFH transfected PerC.6 cells.

## **Laser photocoagulation**

CNV was induced by an Argon laser photocoagulator with the krypton red laser. For the study, five separate photocoagulation lesions (rats: 50  $\mu\text{m}$  spot size, 0.1 ms duration and 175 mW power and for mice: 50  $\mu\text{m}$  spot size, 0.05 ms duration and 250mW power) around and close to the optic nerve (1 to 2 disc diameters away from the papillae) were created in both eyes of all experimental animals. In all treated eyes included in the study, a reactive bubble at the retinal surface was observed after laser delivery. This was considered evidence for appropriate focusing and as an indication of the rupture of Bruch's membrane.

In the molecular study (qPCR), eight separate laser spots were uniformly realized on the total surface of the retina.

## **Flat mount preparation and measurement of CNV lesions**

Flat mounts of the RPE-choroid-Sclera complex of Long Evans rats were prepared. The enucleated eyes were incised at the limbus and immediately fixed at 4°C for 30 min with paraformaldehyde (PAF) 4% solution in PBS. These were washed three times with PBS1X, and the anterior segments were dissected out. The neuroretina was removed from the RPE-choroid-sclera complex. Five radial cuts were made from the edge of the eyecup to the equator and the sclera-choroid-retinal-RPE complex was flat-mounted, with the sclera facing down. Post-fixation with PAF4% for 15 min at 4°C was performed, and RPE-choroid-sclera complex further processed as follows: wash three time with PBS plus 1% Triton X-100, incubation overnight with normal goat serum 10% diluted in PBS/Triton X-100 1% to block

nonspecific sites and incubation two days at 4°C in FITC-conjugated fluorescent lectin (Isolectin B4, Vector Laboratories) diluted 1:200 in PBS-Triton1%. After this incubation, the samples were washed thoroughly with PBS-Triton1% and flat mounted between a slide and a coverslip using Dako gel mounting (Dako, France). Flat mounts were observed under a Zeiss confocal Imaging system (LSM710, Zeiss) and Z- stack images (1µm thickness of each optical section, seven optical sections in one Z-stack) of laser-injured area were captured. Area of green fluorescence (CNV size) was measured using ImageJ program (National Institute of Health, Bethesda, MD). The green color in the laser spot represents CNV complex. If the CNV was <3% of the total laser spot area, it was graded as negative while CNV >3% was considered positive.

### **Corneal Neovascularization**

Only the right eye of each Lewis rat was used, the left served as control. Neovascularization was induced by mechanical resection of the corneal epithelium and limbal debridement. The corneal epithelium was mechanically removed with a surgical micro sponge imbibed with 70% alcohol. In addition, a 1.5-mm wide strip of conjunctiva was excised around the limbus with microscissors. At the end of surgery, a suture tarsorrhaphy (5-0 silk) maintained the eyelids closed until day 4. On the same day the injection of subconjunctival treatment of CFH (0.6µM) was made. For quantification of corneal neovessels on day 4, the animals were killed. The eyes were then enucleated and fixed in 4% paraformaldehyde for 3 hours at 4°C and rinsed in one time in PBS1X. The corneas including 1 mm of sclera were dissected, flat mounted in a solution of PBS, blocked with normal goat serum solution (NGS 10%) for 2 hours and then immunocytochemistry was performed over night at 4°C with ISB4 (1:200 in PBS/Triton 0,1%). Then the cornea was examined under confocal fluorescence microscope (LSM 510; Carl Zeiss Meditec, Oberkochen, Germany, 488-nm argon laser), and photographed. The corneal areas of neovascularization stained by ISB4 were quantified with

NIH Image software. Four individual rats were used for each treatment (recCFH (0.6 $\mu$ M), recCFH<sub>402H</sub> (0.6 $\mu$ M) and PBS). The area of neovascularization was expressed as a percentage of total corneal area.

### **Immunohistochemistry**

For immunohistochemical studies, all samples were processed in the same manner. The RPE-choroid-sclera flat mounts were incubated in PBS1X/BSA 0.1%, permeabilized in 0.1% Triton X-100 for 15 min, saturated with normal goat serum (Cliniscience, France) 10%/PBS1X one night at 4°C and then stained two days at 4°C in selective primary antibodies diluted in 0.2% Triton X-100 in PBS: ISB4-FITC (1:200, Vector, France), C3 (1:400, rabbit Abcam, France), C5b9/MAC (1:500, rabbit Abcam, France), TSP-1 (1:200, mouse Merck, France) and CD68 (1:300, rat Invitrogen, France). After three washing in PBS/triton 0.1%, flat mounting preparations were incubated in a solution of 1:200 of secondary antibody conjugated to Alexa (red 594nm or green 488nm; Molecular Probes, Interchim, France) and corresponding to the primary antibody for 60 min at room temperature. The slides were then washed 3 times in PBS/Triton0,1% (10min/RT), stained for 5-10 min with DAPI, and washed 3 times in PBS1X. The flat mounts or sections were then mounted with Dako solution (Dako, France) and then examined with a Zeiss confocal Imaging system (LSM710, Zeiss) and Z- stack images (1 $\mu$ m thickness of each optical section, seven optical sections in one Z-stack) of laser-injured area were captured. As a control, the primary antibody was omitted: no staining was observed in any control. Identical exposure parameters were used to compare the fluorescence intensity of staining in control laser-group (PBS) with that in CFH laser-groups. Mean intensity (mean gray value, within range from 0 to 255) of green or red fluorescence in area of laser injury was measured using ImageJ program (National Institute of Health, Bethesda, MD). If the CNV was <3% of the total laser spot area, it was graded as negative while CNV >3% was considered positive. Experiment

was repeated three times with similar results.

### **Western Blot Analysis**

Total protein was extracted from retinal tissue (RPE-choroid-sclera and neural retina). The tissue was homogenized and solubilized in ice-cold PBS containing protease inhibitors as previously described (Bruban et al., 2009). For western blot analysis, we used 30µg of extracted proteins for each point. Briefly, electrophoresis was performed by SDS-PAGE 4-12% Tris-gel and the separated proteins were transferred to nitrocellulose membrane (Immobilon; Millipore). The blots were blocked with 5% no fat dry milk. Mouse monoclonal anti-human CFH (1:3000, AbDSerotec), goat polyclonal anti-CFH (1/2000, Calbiochem), mouse monoclonal anti-C3b fragments (1:2000, Hycult, France), mouse monoclonal anti-C3 (1:3000, rabbit Abcam France), rabbit polyclonal anti-βactin (1:3000, Abcam France) or anti-TSP-1 (1:500, mouse Merck, France) were used as the primary antibodies overnight at 4°C, and then the blots were washed with TBS1X/milk 1% and incubated separately with the corresponding secondary antibody coupled to horseradish peroxidase (1:3000, Abcam, France). Blots were developed using the enhanced chemiluminescence Western blotting detection system “ECL-Plus” (Amersham Pharmacia Biotech, Arlington Heights, IL) according to manufacturer’s recommendations. Quantification of CFH, C3, C3b fragments, TSP-1 and β-actin were accomplished by analyzing the intensity of the bands using ImageJ program (National Institute of Health, Bethesda, MD).

### **Quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR)**

Retinal samples from at least three animals were pooled for each condition. Total RNA from RPE-choroid-sclera and neural retina was isolated with TRIZOL reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions, and Superscript II Reverse Transcriptase (Invitrogen) was used to reverse transcribe 1 µg of mRNA. Amplification reaction assays contained 1× SYBR Green PCR Mastermix (Applied Biosystems) were

realized followed the company instructions. All real-time PCR oligonucleotide primers were previously experimentally validated by QPCR, agarose gel analysis, sequencing and BLAST, and all validation data can be freely accessed from the PrimerBank web site: <http://pga.mgh.harvard.edu/primerbank>. Primers were designed such that amplicon sizes ranged from 50 to 250 bps (Table1). A hot start at 95 °C for 5 min was followed by 40 cycles at 95 °C for 15 s and 60 °C for 1 min with the 7300 SDS thermal cycler (Applied Biosystems). Controls with no reverse transcriptase were run for each assay to confirm the lack of genomic DNA contamination. Control qRT-PCR reactions were performed without cDNA templates. Actin was used as a suitable reference gene. The standard curve method (Prism 7700 Sequence Detection System; ABI User Bulletin number 2) was used for relative quantification of gene expression. At least two experiments were conducted for each gene and sample. At each experiment, each individual sample was run in triplicate wells and the Ct of each well was recorded at the end of the reaction. The average and standard deviation of the three Cts was calculated. Gene expression levels were normalized to actin for each retinal tissue sample and calculated relative to PBS injected tissue (control) with the following equation: relative expression =  $2^{-(\text{sample}\Delta\text{Ct} - \text{control}\Delta\text{Ct})}$  where  $\Delta\text{Ct} = \text{mean Ct}(\text{target}) - \text{mean Ct}(\text{actin})$ .

### **Statistical Analyses**

Statistical analyses were performed by computer (GraphPAD Software Inc). Data are expressed as means  $\pm$  SD and were analyzed and compared using Student's t-test, Mann Whitney test, or analysis of variance (Newman Keuls) and differences were considered statistically significant with  $P < 0.05$ . Data are represented as mean  $\pm$  SE.

## Figure legends

**Figure 1. Activation of alternative pathway in wet-AMD macular region.** (a) Localization of the foveal (f) region within the macula (M) on the neural retina flat mounting in both healthy donors and wet-AMD aged 83 and 86, respectively. (b, c) Immunostaining of MAC (C5b9, red) and vessels (ISB4, green) in neural retina flat mounting of wet-AMD (right) and healthy (left) donors. Pictures were obtained from transversal (b) or longitudinal sections (c) in the macula region. (d) CFH immunostaining in neural retina flat mounting of wet-AMD (right) and healthy donor (left). ON : optic nerve, RPE : retinal pigment epithelium, GC : ganglion cells. Scale Bar: 10 $\mu$ m.

**Figure 2. CFH exhibits the same anti-angiogenic activity as anti-VEGF in a CNV murine model.** (a) Analysis at day 14 post-laser of vessel-immunostaining (ISB4) in the RPE/choroid flat mountings of the CNV rat model intravitreally injected at day 4 post-laser with PBS, plasma CFH (pICFH, 6 $\mu$ M), recombinant CFH (recCFH, 6 $\mu$ M) or anti-VEGF (6 $\mu$ M). (b) Semi-quantification of ISB4 immunostaining area in RPE/choroid flat mounting of CNV rats. Results were represented as percent of CNV area decrease compared to the control (Ct) CNV-rats without intravitreal injection. (c) To identify the CFH effects on CNV process, RPE/choroid flat mounting rats were immunostained with specific markers of alternative complement pathway (C3 and MAC) or microglia/macrophage infiltration (CD68). (d) Semi-quantification of area immunostaining on RPE/choroid flat mounting of CNV process for C3, MAC and CD68. Results were represented by percent of decrease or increase in CNV area stained compared to the PBS treated-rats. For quantification, each data point represented at least 40 laser spots of 4-6 individual rats. Data were expressed as means  $\pm$  SD and were analyzed and compared using Mann Whitney test and differences were considered statistically significant with  $P < 0.05$ . Scale Bar : 10 $\mu$ m.

**Figure 3. The CFH anti-angiogenic activity is not dependent on its N-terminal domains (CCP1-4) but on its CCP7 domain.** (a) Representation of the CFH domains and their functions. All recCFH fragments used for intravitreal injection are listed. (b). For each recCFH fragment semi-quantification of area immunostaining for CNV (ISB4), activation of alternative complement pathway (C3/MAC) or microglial/macrophage infiltration (CD68) were listed. Results were summarized by percent of decrease or increase in CNV area in the table. NS: No Significant, variation of level < 15%. comprised between 4-15%.

**Figure 4. Both recCFH and recCFH7-20 increase the TSP-1 area immunostaining in CNV rats model.** (a) Western blot analysis of C3 and C3b fragments (C3b and C3b Frag. : C3bi, C3d...) accumulation in CNV lesion at day 14 post-laser after intravitreal injection of recCFH or recCFH7-20 at day 4 post-laser. Semi-quantification of C3 and C3b Frag. accumulation compared to actin. Each data point represented at least 20 laser spots of 3 individual rats. (b) TSP-1 immunostaining on CNV-lesion observed in RPE/choroid flat mounting at day 14 post laser after intravitreal injection of recCFH or recCFH7-20 at day 4 post-laser. Semi-quantification of TPS-1 stained area on CNV-lesion. Results were represented by percent of increase CNV area compared to the PBS treated-rats. For quantification, each data point represented at least 40 laser spots of 4-6 individual rats. Data were expressed as means  $\pm$  SD and were analyzed and compared using Mann Whitney test and differences were considered statistically significant with  $P < 0.05$ . Scale Bar : 10 $\mu$ m.

**Figure 5. CFH anti-angiogenic activity depends on TPS-1 function.** (a) Choroidal neovascularization was immunostained with ISB4 marker on the CNV-lesion in RPE/choroid flat mounting at day 14 post-laser after intravitreal injection of PBS, recCFH or recCFH7-20

at day 4 post-laser combined or not with an intravitreal injection of anti-TSP-1 10min after. Semi-quantification of ISB4 stained area on CNV-lesion was realized. Results were represented by percent of decrease or increase CNV area compared to the PBS treated-rats. For quantification, each data point represented at least 40 laser spots of 4-6 individual rats. Data were expressed as means  $\pm$  SD and were analyzed and compared using Mann Whitney test and differences were considered statistically significant with  $P < 0.05$ . Scale Bar: 10 $\mu$ m.

**Figure 6. CFH increases TSP-1 concentration previously inhibited by microglia/macrophage cells infiltration.** (a) Immunostaining of choroidal neovascularization (ISB4), TSP-1 area and microglial/macrophage infiltration (F4/80) on CNV lesion in RPE/choroid flat mounting after intravitreal injection of PBS, recCFH or recCFH7-20 at day 4 post-laser in WT or CCL2<sup>-/-</sup> CNV mice. The data were analyzed at day 14 post-laser. Results were represented by percent of decrease or increase CNV area in CCL2<sup>-/-</sup> CNV-mice compared to WT CNV-mice. For quantification, each data point represented at least 25 laser spots of 4 individual mice. Data were expressed as means  $\pm$  SD and were analyzed and compared using Mann Whitney test and differences were considered statistically significant with  $P < 0.05$ . Scale Bar : 10 $\mu$ m. (b) Western blot analysis at day 14 post-laser of TSP-1 level induced by intravitreal injection at day 4 post-laser of recCFH or recCFH7-20 in CCL2<sup>-/-</sup> CNV-mice . Semi-quantifications were done with actin as an intern reference. Results represented increase of TSP-1 concentration in CCL2<sup>-/-</sup> CNV-mice injected with recCFH or recCFH7-20 compared to CCL2<sup>-/-</sup> CNV-mice injected with PBS. Each data point represented at least 20 laser spots of 3 individual mice. Data were expressed as means  $\pm$  SD and were analyzed and compared using Mann Whitney test and differences were considered statistically significant with  $P < 0.05$

**Figure 7. Schematic representation of a mechanism by which CFH could act on AMD process.**

**Supplementary data 1. Analysis of recCFH fragments anti-C3 convertase activity in vitro and in sheep erythrocyte lysis system**

**Supplementary data 2. recCFH anti-angiogenic activity is dose dependent.** (a) Analysis by western blotting of pICFH, recCFH or recCFH fragments level in the RPE/choroid complex of native rats after 1, 24 and 72 hours post-intravitreal injection. A specific anti-human CFH antibody which did not cross with endogenous rat CFH was used. (b) Kinetic analysis of endogenous CFH production during the CNV process in the rat model. For each time point, proteins were extracted from at least 3 individual retina rats and were used for western blotting experiments. Quantification of CFH /actin levels was done for each time point. Data were analyzed and compared using Mann Whitney test and differences are considered statistically significant with  $P < 0.05$ . (c) Determination of the recCFH-IC<sub>50</sub> for its anti-angiogenic activity in CNV-rat model. Three concentrations of recCFH are used (0.6, 0.06, and 0.006 $\mu$ M) for intravitreal injection at day 4 post laser. RPE/choroid flat mountings were immunostained with the vessel marker ISB4. Semi-quantification of ISB4 stained area was realized in the CNV lesion. Results are represented by percent of inhibition compared to the untreated CNV-rats. Each data point represents at least 20 laser spots of 3 individual rats. Data were expressed as means  $\pm$  SD and were analyzed and compared using Mann Whitney test and differences were considered statistically significant with  $P < 0.05$ . Scale Bar: 10 $\mu$ m.

**Supplementary data 3. Anti-angiogenic activity of recCFH is not dependent on endogenous CFH expression in CNV model.** RecCFH intravitreal injection was performed

just after the laser treatment. At day 14 post-laser, flat mounting of RPE/choroid complex was done for at least 4 individual CFH<sup>-/-</sup> CNV-mice represented approximately 20 laser spots. The ISB4 immunostained area was quantified and analyzed. Results were represented by percent of decrease CNV area compared to PBS-treated CFH<sup>-/-</sup> CNV-mice. Data were expressed as means ± SD and were analyzed and compared using Mann Whitney test and differences are considered statistically significant with P < 0.05. Scale Bar : 10µm.

**Supplementary data 4. CFH exerts an anti-angiogenic effect in a corneal angiogenesis model.** (a) To compare the effects of recCFH vs recCFH<sub>402H</sub> or PBS in neovascularization corneal model, one single local subconjunctival injection of each of them (0.6µM) was done. Neovascularization was analyzed with ISB4 marker and quantification of angiogenesis area was performed. Results were represented by percent of decrease CNV area compared to PBS treatment. 3 individual animals were used. Data were expressed as means ± SD and were analyzed and compared using Mann Whitney test and differences are considered statistically significant with P < 0.05. Scale Bar: 10µm.

**Table 1. List of primers forward and reverse used for qPCR experiments**

**Table 2. Analysis of recCFH or its fragments effects on regulation of angiogenesis, complement pathway and inflammation gene expressions in CNV-rat model.** Results were represented by decrease or increase gene expression after IVT-CFH in CNV rats model compared to (a) native CNV rats or (b) PBS treatment CNV-rats. mRNAs were extracted from at least 4 individual retina rats (containing 10 laser spots) and were used for qPCR experiments. Data were analyzed and compared using Mann Whitney test and differences are considered statistically significant with P < 0.05.

## REFERENCES

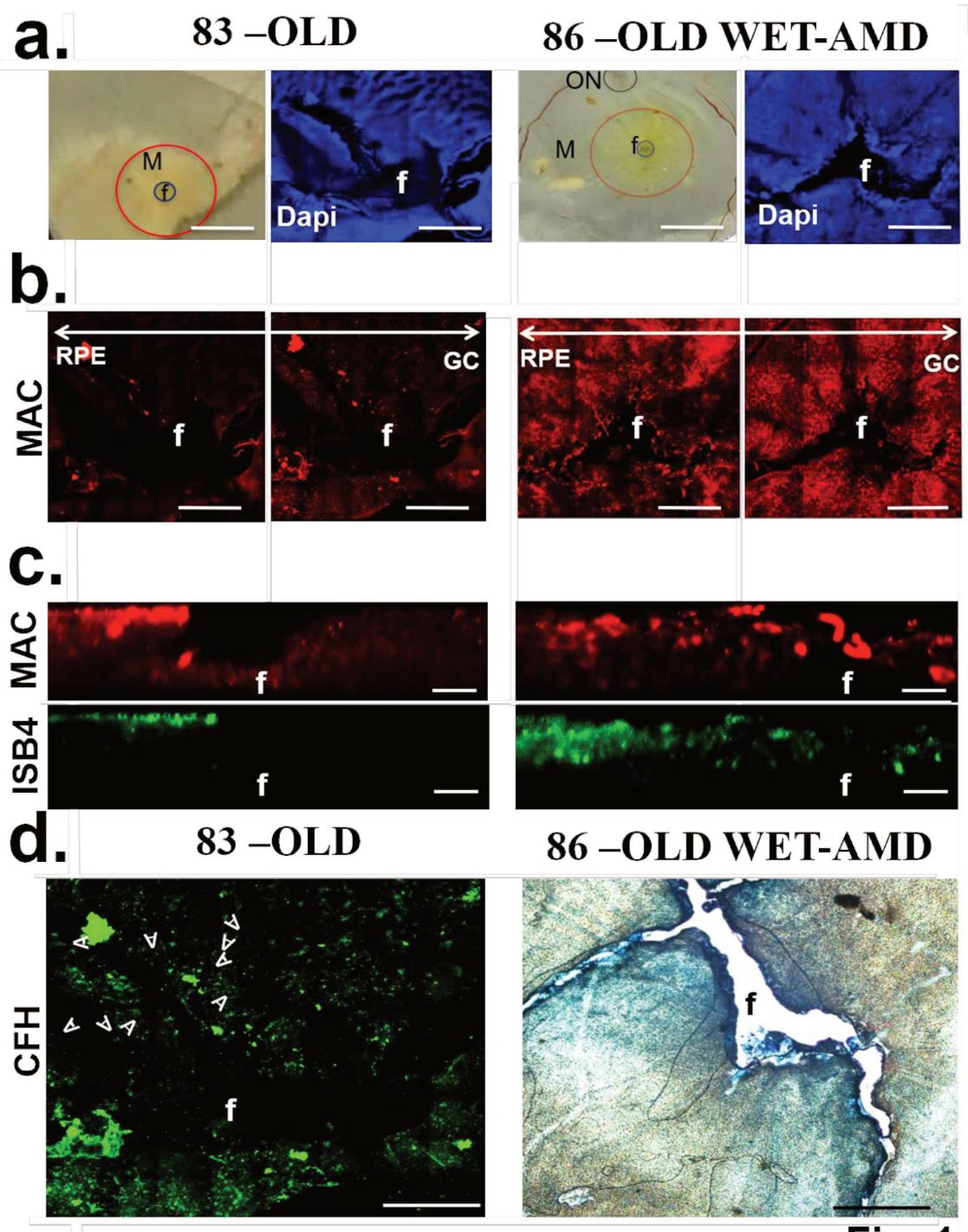
1. Edwards, A. O . et al. Complement factor H polymorphism and age-related macular degeneration. *Science* **308**, 421–424 (2005).
2. Hageman, G. S. et al. A common haplotype in the complement regulatory gene factor H (HF1/CFH) predisposes individuals to age-related macular degeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 7227–7232 (2005).
3. Klein, R. J. et al. Complement factor H polymorphism in age-related macular degeneration. *Science* **308**, 385–389 (2005).
4. Haines, J.L. et al. Complement factor H variant increases the risk of age-related macular degeneration. *Science* **308**, 419–421 (2005).
5. Hageman, G. S. et al. An integrated hypothesis that considers drusen as biomarkers of immune-mediated processes at the RPE-Bruch's membrane interface in aging and age-related macular degeneration. *Prog. Retin. Eye Res.* **20**, 705–732 (2001).
6. van Wijngaarden, P. & Qureshi, S. H. Inhibitors of vascular endothelial growth factor (VEGF) in the management of neovascular age-related macular degeneration: a review of current practice. *Clin. Exp. Optom.* **91**, 427–437 (2008).
7. Rasmussen, A. & Sander, B. Long-term longitudinal study of patients treated with ranibizumab for neovascular age-related macular degeneration. *Curr. Opin. Ophthalmol.* **25**, 158–163 (2014).
8. Grunwald, J. E. et al. Risk of geographic atrophy in the comparison of age-related macular degeneration treatments trials. *Ophthalmology* **121**, 150–161 (2014).
9. Byeon, S. H. et al. Vascular endothelial growth factor as an autocrine survival factor for retinal pigment epithelial cells under oxidative stress via the VEGF-R2/PI3K/Akt. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **51**, 1190–1197 (2010).
10. Saint-Geniez, M. et al. Endogenous VEGF is required for visual function: evidence for a survival role on müller cells and photoreceptors. *PLoS One* **3**, e3554 (2008).
11. Saint-Geniez, M., Kurihara, T., Sekiyama, E., Maldonado, A. E. & D'Amore, P. A. An essential role for RPE-derived soluble VEGF in the maintenance of the choriocapillaris. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 18751–18756 (2009).
12. Gordon, D. L., Kaufman, R. M., Blackmore, T. K., Kwong, J. & Lublin, D. M. Identification of complement regulatory domains in human factor H. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **155**, 348–356 (1995).
13. Pangburn, M. K. Cutting edge: localization of the host recognition functions of complement factor H at the carboxyl-terminal: implications for hemolytic uremic syndrome. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **169**, 4702–4706 (2002).
14. Chen, M., Forrester, J.V. & Xu, H. Synthesis of complement factor H by retinal pigment epithelial cells is down-regulated by oxidized photoreceptor outer. *Exp. Eye Res.* **84**, 635–645 (2007).
15. Anderson, Don. H. et al. The pivotal role of the complement system in aging and age-related macular degeneration: hypothesis re-visited. *Prog. Retin. Eye Res.* **29**, 95–112 (2010).
16. Pickering, M. C. et al. Uncontrolled C3 activation causes membranoproliferative glomerulonephritis in mice deficient in complement factor H. *Nat. Genet.* **31**, 424–428 (2002).
17. Coffey, P. J. et al. Complement factor H deficiency in aged mice causes retinal abnormalities and visual dysfunction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 16651–16656 (2007).
18. Despret, D. D. G. et al. Complement factor H polymorphism, complement activators, and risk of age-related macular degeneration. *JAMA* **296**, 301–309 (2006).
19. Mullins, R. F., Johnson, M. N., Faidley, E. A., Skeie, J. M. & Huang, J.

- Choriocapillaris vascular dropout related to density of drusen in human eyes with early age-related macular degeneration. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **52**, 1606–1612 (2011).
20. Clark, S. J., Bishop, P. N. & Day, A. J. Complement factor H and age-related macular degeneration: the role of glycosaminoglycan recognition in disease pathology. *Biochem. Soc. Trans.* **38**, 1342–1348 (2010).
  21. Ormsby, R. J. et al. Functional and structural implications of the complement factor H Y402H polymorphism associated with age-related macular degeneration. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **49**, 1763–1770 (2008).
  22. Bora, N. S. et al. CD59, a complement regulatory protein, controls choroidal neovascularization in a mouse model of wet-type age-related macular degeneration. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **178**, 1783–1790 (2007).
  23. Lyzogubov, V. V. et al. Role of ocular complement factor H in a murine model of choroidal neovascularization. *Am. J. Pathol.* **177**, 1870–1880 (2010).
  24. Lyzogubov, V. et al. Complement regulatory protein CD46 protects against choroidal neovascularization in mice. *Am. J. Pathol.* **184**, 2537–2548 (2014).
  25. Bora, N. S. et al. Recombinant membrane-targeted form of CD59 inhibits the growth of choroidal neovascular complex in mice. *J. Biol. Chem.* **285**, 33826–33833 (2010).
  26. Rohrer, B., Coughlin, B., Bandyopadhyay, M. & Holers, V. M. Systemic human CR2-targeted complement alternative pathway inhibitor ameliorates mouse laser-induced choroidal neovascularization. *J. Ocul. Pharmacol. Ther. Off. J. Assoc. Ocul. Pharmacol. Ther.* **28**, 402–409 (2012).
  27. Kim, S. J. et al. Intravitreal human complement factor H in a rat model of laser-induced choroidal neovascularisation. *Br. J. Ophthalmol.* **97**, 367–370 (2013).
  28. Boyer, D. S., Schmidt-Erfurth, U., van Lookeren Campagne, M., Henry, E. C. & Brittain, C. The pathophysiology of geographic atrophy secondary to age-related macular degeneration and the complement pathway as a therapeutic target. *Retina Phila. Pa* **37**, 819–835 (2017).
  29. Yaspan, B.L. et al. Targeting factor D of the alternative complement pathway reduces geographic atrophy progression secondary to age-related macular degeneration. *Sci. Transl. Med.* **9**, 395-443 (2017).
  30. Bantseev, V. et al. Nonclinical safety assessment of anti-factorD: key strategies and challenges for the nonclinical development of intravitreal biologics. *J. Ocul. Pharmacol. Ther.* **34**, 204-213 (2017).
  31. Bora, P. S. et al. Role of complement and complement membrane attack complex in laser-induced choroidal neovascularization. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **174**, 491–497 (2005).
  32. Calippe, B. et al. Complement Factor H Inhibits CD47-Mediated Resolution of Inflammation. *Immunity* **46**, 261–272 (2017).
  33. Farnoodian, M. et al. Expression of pigment epithelium-derived factor and thrombospondin-1 regulate proliferation and migration of retinal pigment epithelial cells. *Physiol. Rep.* **3**, (2015).
  34. Liu, J. et al. relationship between complement membrane attack complex chemokine (C-C motif) ligand 2 (CCL2) and vascular endothelial growth factor in mouse model of laser-induced choroidal neovascularization. *J Biol Chem.* **286**, 20991-21001 (2011).
  35. Skeie, J. M. & Mullins, R. F. Macrophages in neovascular age-related macular degeneration: friends or foes? *Eye Lond. Engl.* **23**, 747–755 (2009).
  36. Gao, G. et al. Difference in ischemic regulation of vascular endothelial growth factor and pigment epithelium--derived factor in brown norway and sprague dawley rats contributing to different susceptibilities to retinal neovascularization. *Diabetes* **51**, 1218–1225 (2002).

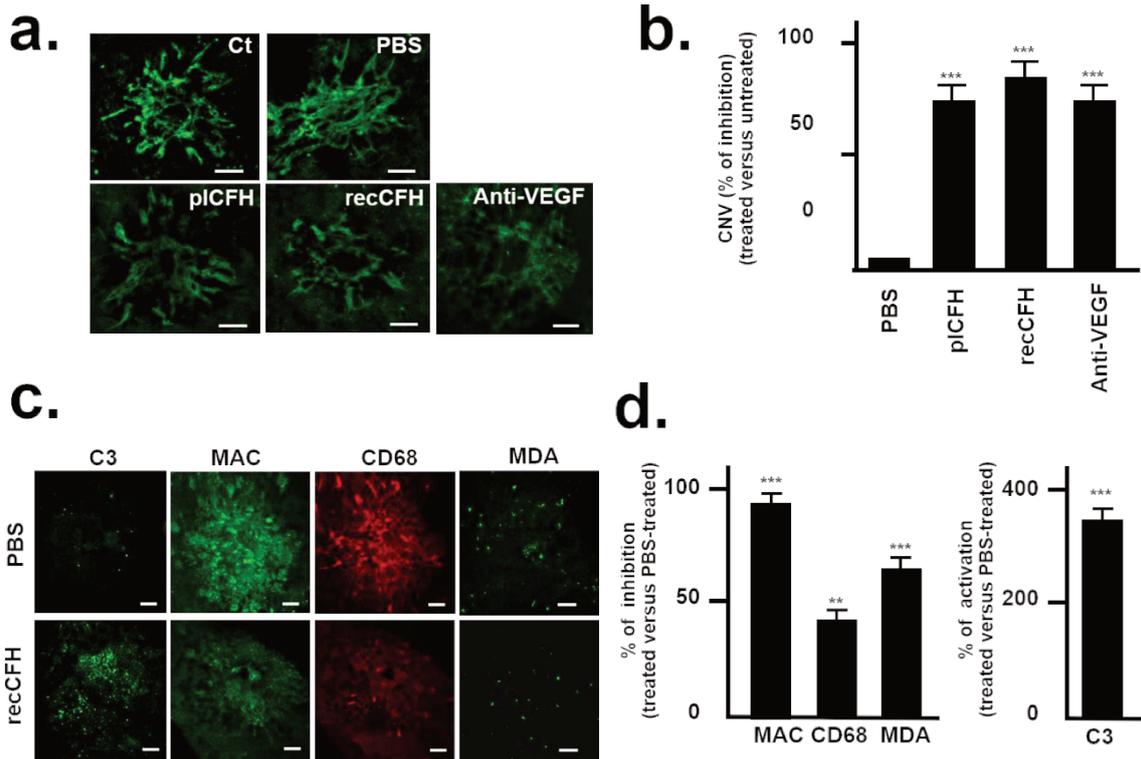
37. Zhao, M. et al. A new CRB1 rat mutation links Müller glial cells to retinal telangiectasia. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **35**, 6093–6106 (2015).
38. Fridkis-Hareli, M. et al. Design and development of TT30, a novel C3d-targeted C3/C5 convertase inhibitor for treatment of human complement alternative pathway-mediated diseases. *Blood* **118**, 4705–4713 (2011).
39. Huang, Y., Qiao, F., Atkinson, C., Holers, V. M. & Tomlinson, S. A novel targeted inhibitor of the alternative pathway of complement and its therapeutic application in ischemia/reperfusion injury. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **181**, 8068–8076 (2008).
40. Keir, L. S. et al. VEGF regulates local inhibitory complement proteins in the eye and kidney. *J. Clin. Invest.* **127**, 199–214 (2017).
41. Newman, A. M. et al. Systems-level analysis of age-related macular degeneration reveals global biomarkers and phenotype-specific functional networks. *Genome Med.* **4**, 16 (2012).
42. Karlstetter, M. et al. Retinal microglia: just bystander or target for therapy? *Prog. Retin. Eye Res.* **45**, 30–57 (2015).
43. Ishibashi, T. et al. Expression of vascular endothelial growth factor in experimental choroidal neovascularization. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol. Albrecht Von Graefes Arch. Klin. Exp. Ophthalmol.* **235**, 159–167 (1997).
44. Bonyadi, M. et al. Joint association of complement component 3 and CC-cytokine ligand2 (CCL2) or complement component 3 and CFH polymorphisms in age-related macular degeneration. *Ophthalmic Genet.* **38**, 365–370 (2017).
45. Perkins, S. J., Fung, K. W. & Khan, S. Molecular Interactions between Complement Factor H and Its Heparin and Heparan Sulfate Ligands. *Front. Immunol.* **5**, 126 (2014).
46. Prosser, B. E. et al. Expression, purification, cocrystallization and preliminary crystallographic analysis of sucrose octasulfate/human complement regulator factor H SCRs 6-8. *Acta Crystallograph. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* **63**, 480–483 (2007).
47. Herbert, A. P. et al. Structure shows that a glycosaminoglycan and protein recognition site in factor H is perturbed by age-related macular degeneration-linked single nucleotide polymorphism. *J. Biol. Chem.* **282**, 18960–18968 (2007).

Olfert IM. Physiological capillary regression is not dependent on reducing VEGF expression. *Microcirculation* 23(2), 146-56 (2016)

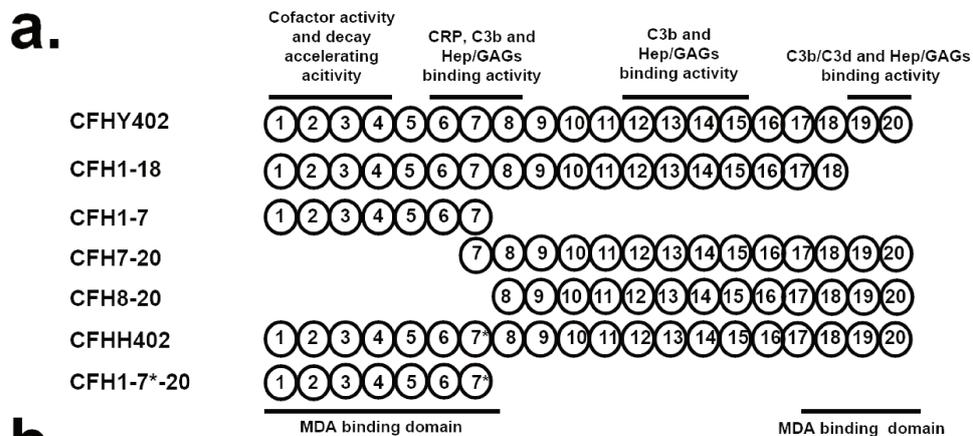
Bhutto IA, Uno K, Merges C, Zhang L, McLeod DS, Lutty GA. Reduction of endogenous angiogenesis inhibitors in Bruch's membrane of the submacular region in eyes with age-related macular degeneration. *Arch Ophthalmol.*126(5):670-8 (2008)



**Fig. 1**



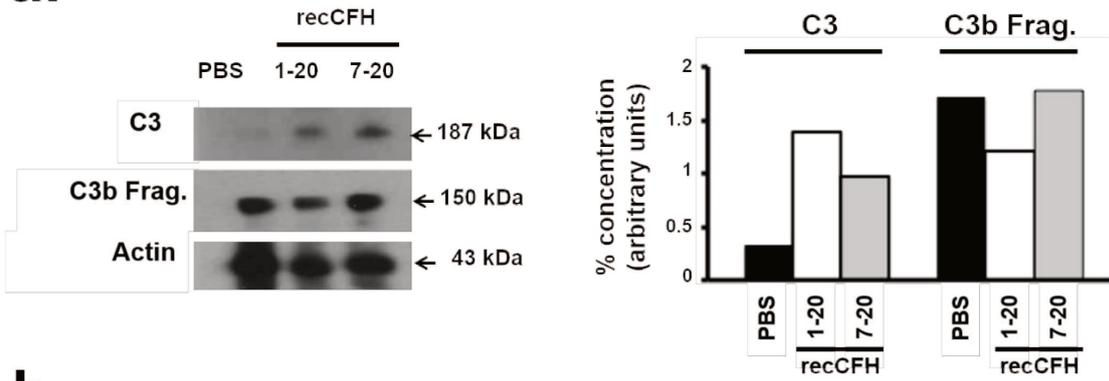
**Fig. 2**



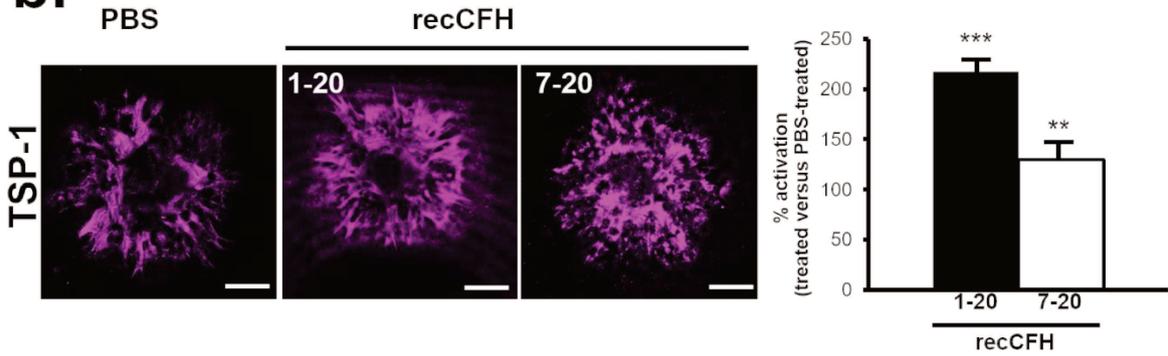
% of inhibition or activation	CCP1-20	CCP1-18	CCP1-7	CCP7-20	CCP8-20	CCP1-7*-20	CCP1-7*
CNV	↓ 76%	↓ 67%	↓ 73%	↓ 80%	NS	NS	NS
C5b9 (MAC)	↓ 85%	↓ 67%	↓ 69%	↓ 63%	NS	NS	NS
C3	↑ 340%	↑ 204%	↑ 230%	↑ 330%	NS	NS	NS
CD68	↓ 37%	↓ 66%	↓ 47%	NS	NS	NS	NS
MDA	↓ 67%	↓ 76%	↓ 70%	↓ 76%	NS	↓ 32%	↓ 27%

**Fig.3**

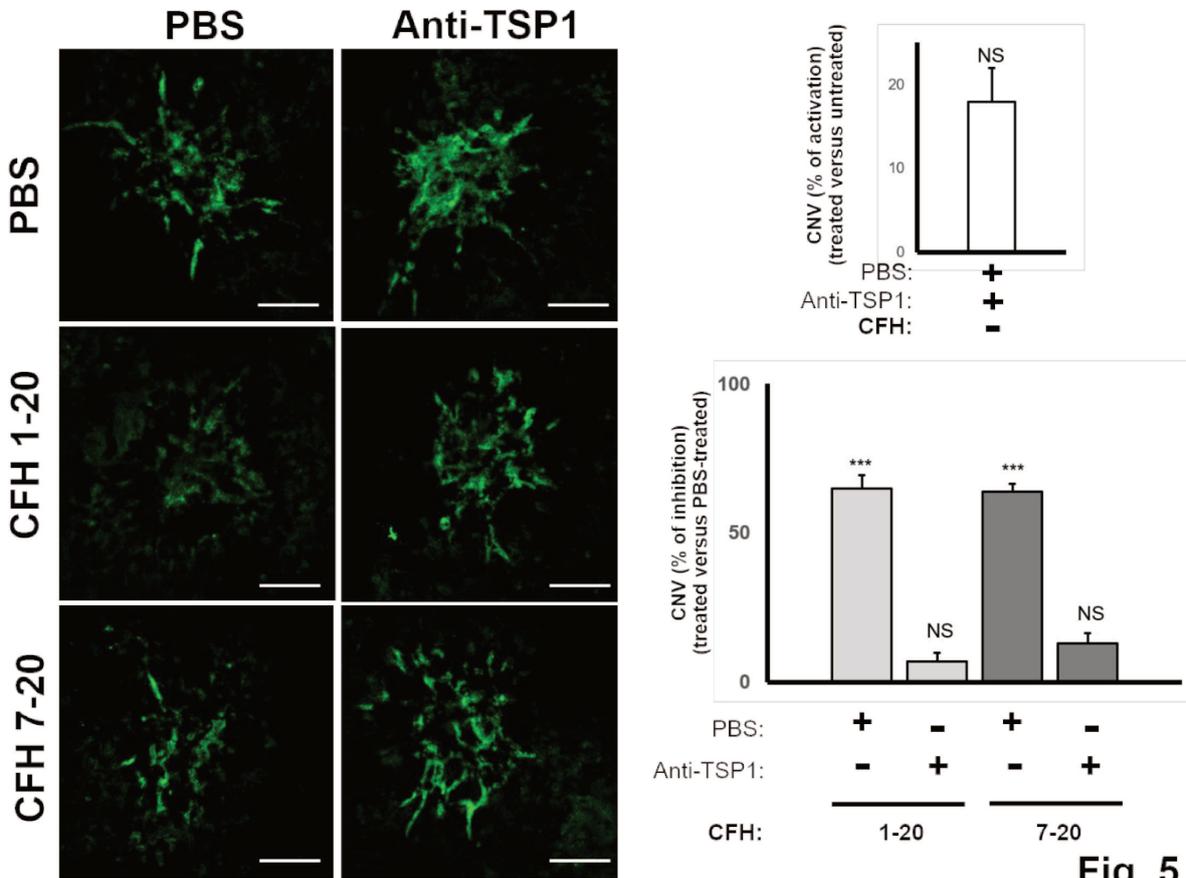
**a.**



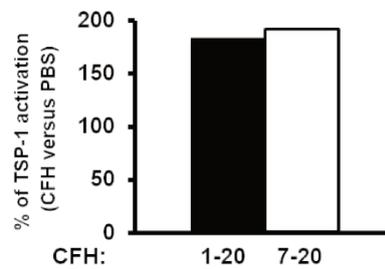
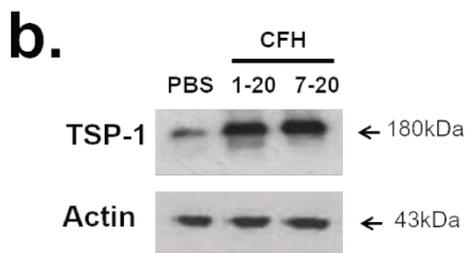
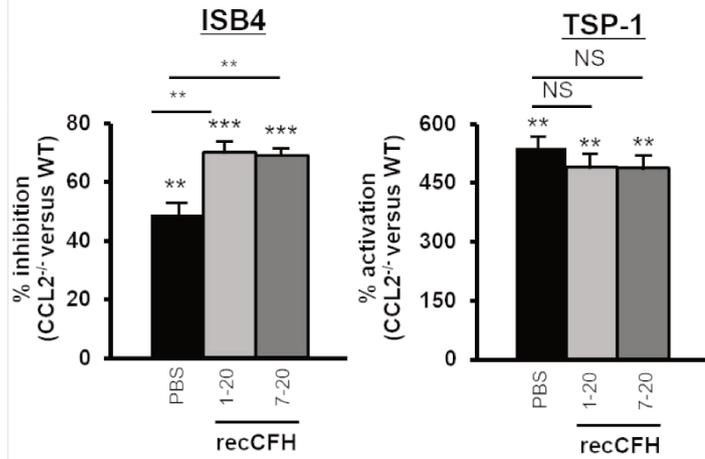
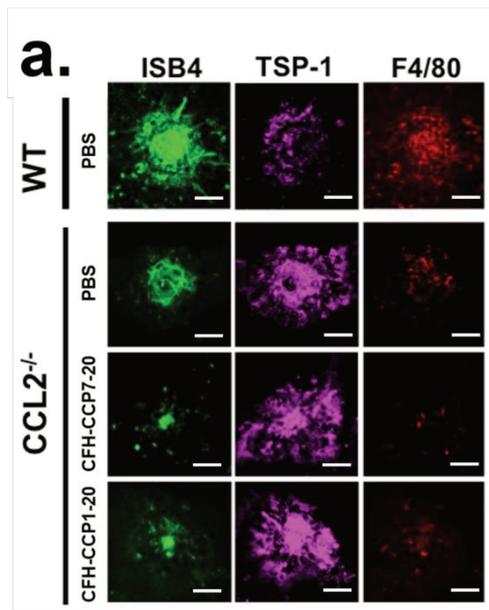
**b.**



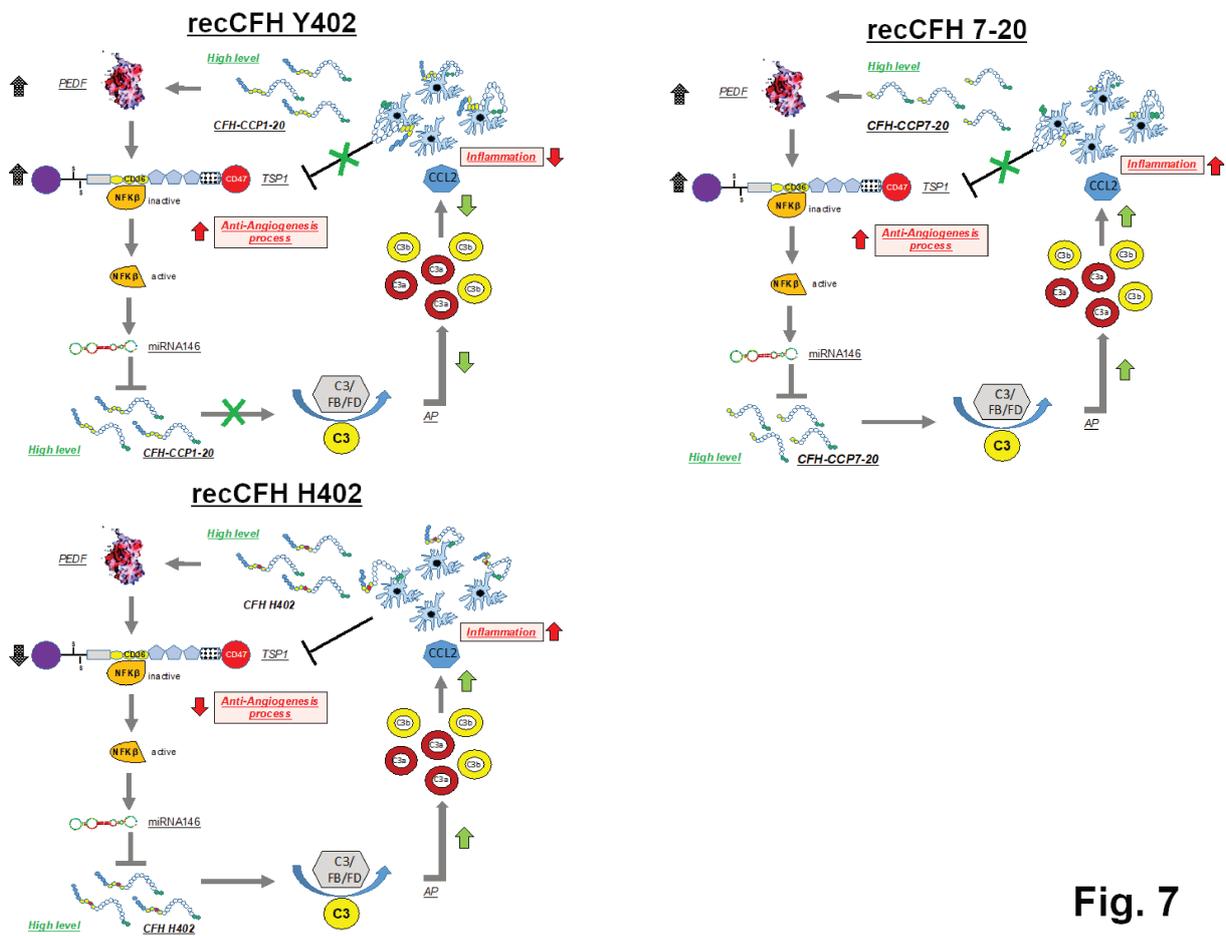
**Fig. 4**



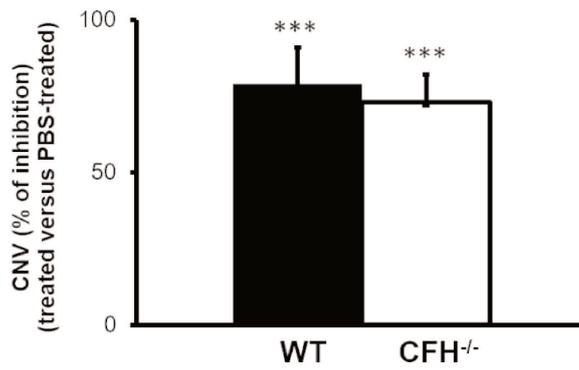
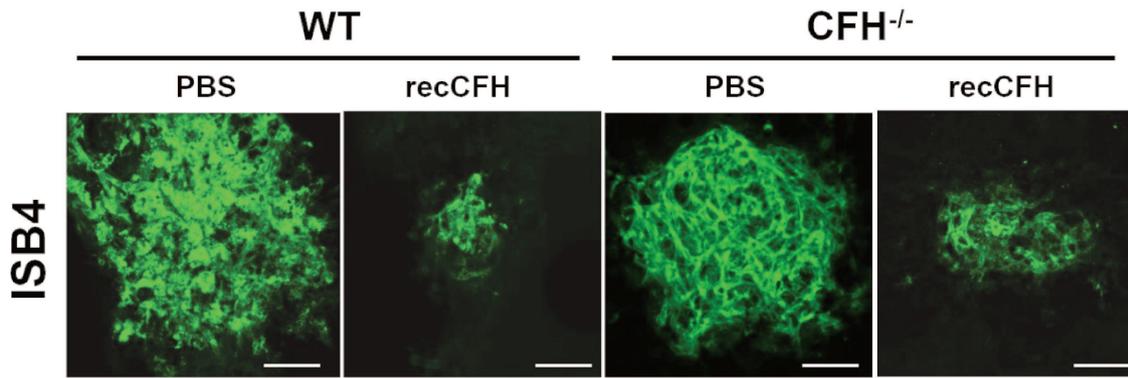
**Fig. 5**



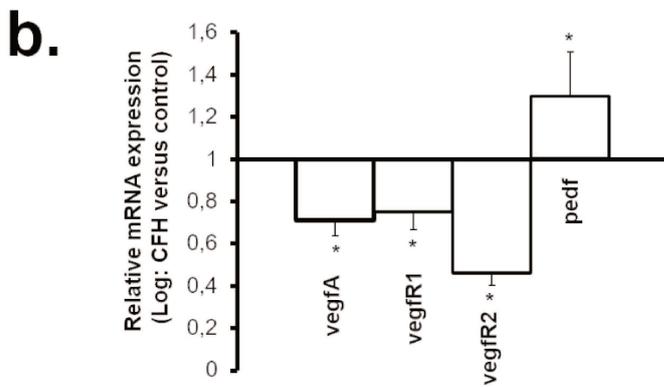
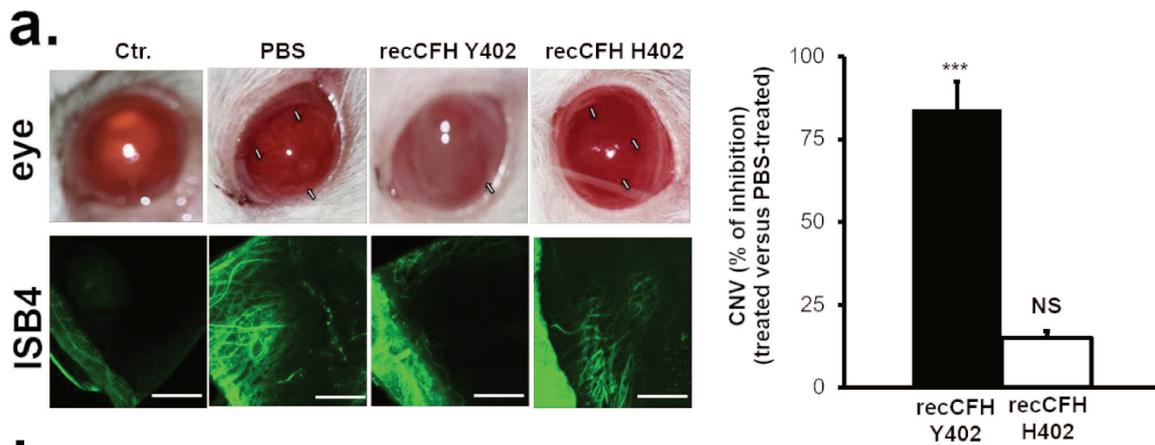
**Fig. 6**



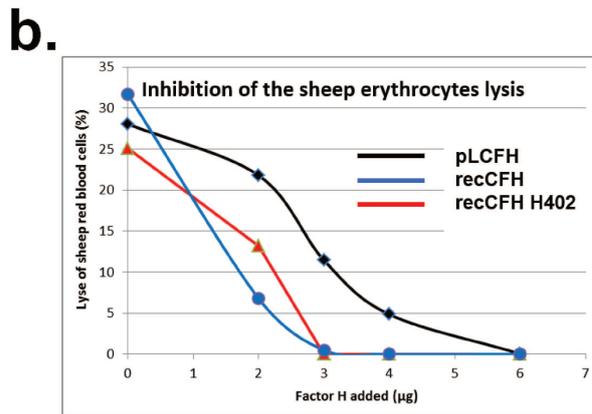
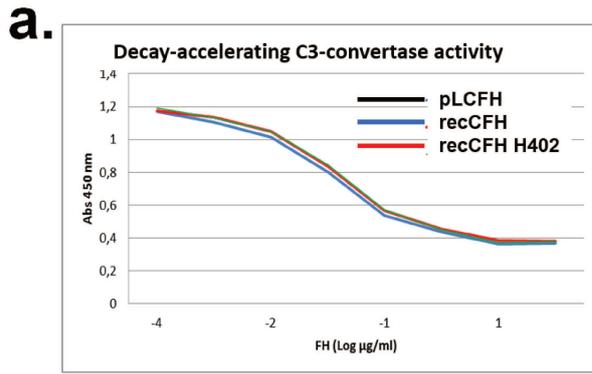
**Fig. 7**



Supplemental data 3



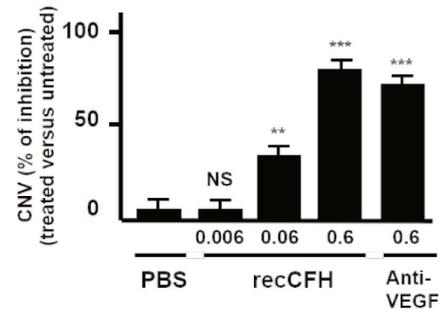
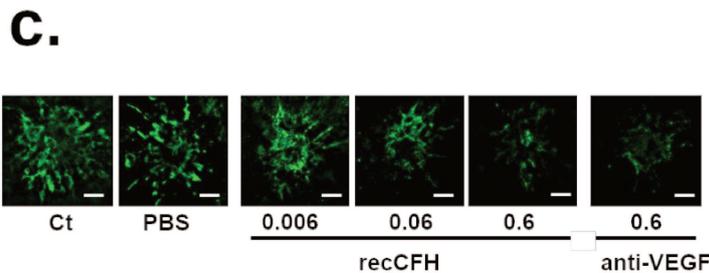
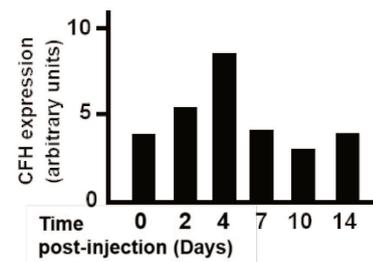
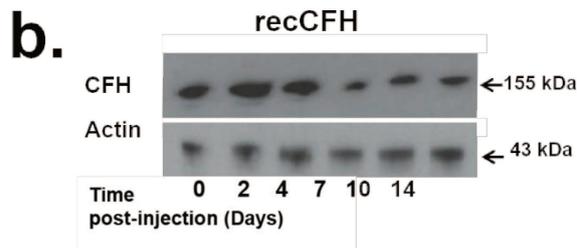
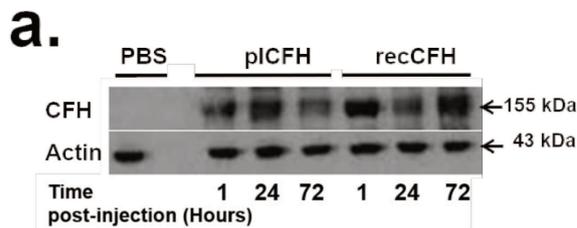
Supplemental data 4



**c.**

Peptides	Anti-C3 convertase EC <sub>50</sub> ng/ml	Protection Erythrocyte Lysis (%)
pICFH	0.12	100
recCFH Y402	0.12	100
recCFH H402	0.09	100
recCFH 1-18	0.16	0
recCFH 1-7	0.06	17
recCFH 1-7 H402	0.08	7
recCFH 7-20	9.80	0
recCFH 8-20	8.80	0

Supplemental data 1



Supplemental data 2

	Foward-primer	Reverse-primer
<b>Angiogenesis</b>		
VEGFA	ACGAAAGCGCAAGAAATCCC	TTAACTCAAGCTGCCTCGCC
VEGFR1	CGACACTCTTTTGGCTCCTTCTAAC	TGACAGGTAGTCCGTCTTTACTTCG
VEGFR2	TCTCGTACGGACCGTTAAGC	CTCATCCAAGGGCAGTTCAT
PEDF	AGTTACGAAGGCGAAGTCACCAAGTC	GCCCCGGTGTCCACCTGAGTC
Angiotensin1	CATTCTTCGCTGCCATTCTG	GCACATTGCCCATGTTGAATC
<b>Complement</b>		
C3	TCACAGTGATGCAGGACT TC	GGATTTGATGGTCTGGT AG
C3aR	GACCTACACTCAGGGC	ATGACGGACGGGATAAG
C5aR	TATAGTCCTGCCCTCGCT CAT	TCACCACTTTGAGCGTCT TGG
CD46	ATTCTTCACGGGGACTA GG	CTCTTGGGAGCCCTCTAT CC
CD55 (/DAF)	N°30001 PPR46714B (Qiagen)	N°30001 PPR46714B (Qiagen)
CFH	N°330001 PPR54700A (Qiagen)	N°330001 PPR54700A (Qiagen)
CFHL-1	N°330001PPR49233A (Qiagen)	N°330001PPR49233A (Qiagen)
CFI	N°330001PPR43849A (Qiagen)	N°330001PPR43849A (Qiagen)
CFB	N°330001 PPR56798A (Qiagen)	N°330001 PPR56798A (Qiagen)
<b>Inflammation</b>		
IL1 $\beta$	CACCTCTCAAGCAGAGCACAG	GGGTTCCATGGTGAAGTCAAC
IL18	GCC TGA TAT CGA CCG AAC A	CCT TCC ATC CTT CAC AGA TAG G
IL6	TTCCAATGCTCTCCTAATGGA	GGTTTGCCGAGTAGACCTCA
COX2	GGCCATGGAGTGGACTTAAA	CTCTCCACCGATGACCTGAT
CCL2	GCAAGATGATCCCAATGAGT	GTCAGCACAGATCTCTCTCT
CCR2	GACCGAGTGAGCTCAACATTT	AACCCAACTGAGACTTCTTGC
<b>Ox. stress</b>		
GPX1	GCTTCCCGTGCAACCAGTTT	CTTGAGGGAATTCAGAATCTCT
SOD2	GAGGAGAAGTACCAGGAG	GGGCTGAAGAGCTATCTGGG
Inos	CTCACTGTGGCTGTGGTCACCTA	GGGTCTTCGGGCTTCAGGTTA
PON1	TGGGCCTGTCATGGTCCAATGTTG	TTATCCACAAGGGTGTCAAAGCTGAG
<b>Actin</b>	TCCTCCCTGGAGAAGAGCTA	TCCTGCTTGCTGATCCACAT

**Table 1**

**a.**

Angiogenesis	
<i>vegfa</i>	↑ 15.7 ±
<i>vegfr1</i>	↑ 31.1 ±
<i>vegfr2</i>	= 1.02 ±
<i>ang1</i>	↑ 22.6 ±
<i>pedf</i>	= 1.05 ±
Complement	
<i>c3</i>	↑ 161.6 ±
<i>c5aR</i>	↑ 75.9 ±
<i>cfb</i>	↑ 14.3 ±
<i>cfh</i>	= 1.1 ±
<i>cfhl1</i>	↑ 8.2 ±
<i>cd55</i>	↑ 3.6 ±
<i>cd46</i>	↑ 246.4 ±
<i>cd59</i>	↑ 485 ±
<i>cfi</i>	↑ 18 ±
inflammation	
<i>cc12</i>	↑ 6.3 ±
<i>ccr2</i>	↑ 141.4 ±
<i>il1β</i>	↑ 8.6 ±
<i>il6</i>	↑ 97.2 ±
<i>il18</i>	↑ 13.9 ±
<i>cox2</i>	↑ 39.9 ±
stress Ox.	
<i>pon1</i>	↑ 10.8 ±
<i>gpx1</i>	↑ 4.15 ±
<i>inos</i>	↑ 8.4 ±
<i>sod2</i>	= 1.1 ±

**b.**

recCFH:	Y402	CCP1-7	CCP7-20	H402
Angiogenesis				
<i>vegfa</i>	↓ 2.5 ±	↓ 3.4 ±	↓ 3.6 ±	↓ 9.6 ±
<i>vegfr1</i>	↓ 4.5 ±	↓ 35.9 ±	↓ 5 ±	↓ 10.6 ±
<i>vegfr2</i>	↓ 10.2 ±	↓ 7 ±	↓ 5 ±	↓ 10 ±
<i>pedf</i>	↑ 5.4 ±	↑ 1.8 ±	↑ 3.1 ±	= 0.78 ±
Complement				
<i>c3</i>	↓ 7.7 ±	↓ 2.2 ±	↓ 2.5 ±	= 1.2 ±
<i>c5aR</i>	↓ 10 ±	↓ 4.8 ±	= 1.1 ±	= 1.1 ±
<i>c3aR</i>	↑ 5.5 ±	↑ 51 ±	↑ 15.8 ±	↑ 4 ±
<i>cfb</i>	↑ 10.7 ±	↑ 4.6 ±	= 1.3 ±	↑ 75 ±
<i>cfh</i>	↓ 2.3 ±	↓ 14.2 ±	↓ 3.8 ±	↑ 44.8 ±
<i>cfhl1</i>	↓ 5.5 ±	↓ 5.3 ±	↓ 2.4 ±	= 0.8 ±
<i>cfi</i>	↓ 12.5 ±	↓ 10 ±	↓ 2.3 ±	= 1.3 ±
inflammation				
<i>cc12</i>	= 0.84 ±	= 0.72 ±	↑ 681.8 ±	↑ 484 ±
<i>ccr2</i>	= 1.36 ±	= 1.4 ±	↑ 134.2 ±	↑ 103.4 ±
<i>il1β</i>	↓ 10.7 ±	↓ 7 ±	↓ 3.1 ±	↓ 7.7 ±
<i>il6</i>	= 1.4 ±	= 1.3 ±	↑ 152 ±	↑ 4.8 ±
<i>il18</i>	↓ 10.1 ±	↓ 10 ±	↓ 10 ±	↓ 50 ±
stress Ox.				
<i>pon1</i>	= 0.68 ±	↑ 3.5 ±	= 0.73 ±	↑ 2.8 ±
<i>gpx1</i>	= 0.69 ±	= 0.71 ±	↑ 27.5 ±	↑ 96.8 ±
<i>inos</i>	= 0.68 ±	= 1.5 ±	↑ 42.2 ±	↑ 32.63 ±
<i>sod2</i>	= 0.62 ±	↓ 3 ±	↑ 20.1 ±	↑ 174.8 ±

**Table 2**