Rôles des chimiokines dans le développement de la dégénérescence maculaire liée à l'âge

William Raoul^{1,2,3}, Élise Lelièvre^{1,2,3}, Constance Auvynet^{1,2,3,4}, Charles Feumi^{1,2,3}, Christophe Combadière^{4,5,6} et Florian Sennlaub^{1,2,3,7}

¹ INSERM, UMR S 872, Centre de Recherche des Cordeliers, 15 rue de l'École de Médecine, 75006 Paris, France

² UPMC Université Paris VI, UMR S 872, 15 rue de l'École de Médecine, 75006 Paris, France

³ Université Paris Descartes, UMR S 872, 15 rue de l'École de Médecine, 75006 Paris, France

⁴ INSERM U543, Laboratoire d'Immunologie Cellulaire, 83 boulevard de l'Hôpital, 75013 Paris, France

⁵ UPMC Université Paris VI, 83 boulevard de l'Hôpital, 75006 Paris, France

⁶ AP-HP, Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière, Service d'Immunologie, 83 boulevard de l'Hôpital, 75013 Paris, France

⁷ AP-HP, Hôtel Dieu, Service d'Ophthalmologie, 1 place du Parvis de Notre Dame, 75001 Paris, France

Auteur correspondant : Florian Sennlaub, florian.sennlaub@crc.jussieu.fr

Reçu le 3 septembre 2010

Résumé – La dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) est la principale cause de cécité irréversible dans les pays industrialisés. Les études récentes mettent en exergue l'importance des processus inflammatoires dans le développement de la maladie. Les cytokines chimiotactiques, dénommées chimiokines, qui apparaissent comme des médiateurs importants de l'inflammation, pourraient jouer un rôle dans le développement de la DMLA. Plus particulièrement, elles semblent indispensables dans le processus d'accumulation des microglies/macrophages dans l'espace sous-rétinien observé au cours de la DMLA. Elles pourraient par conséquent participer au développement de la dégénérescence rétinienne et de la néovascularisation choroïdienne. Dans cette revue, nous décrirons l'implication des chimiokines et de leurs récepteurs dans le développement de la DMLA.

Mots clés : Dégénérescence maculaire liée à l'âge / chimiokines / dégénérescence rétinienne / néovascularisation choroïdienne

Abstract – Role of chemokines in the development of age-related macular degeneration.

Age-related macular degeneration (AMD) is the main cause of irreversible blindness in industrialized nations. Recent research has emphasized the importance of inflammatory processes in pathogenesis of this disease. Chemotactic cytokines also named chemokines are important mediators of inflammation and might have a role in development of this disease. They appear to be crucial in the subretinal microglia / macrophage accumulation observed in AMD and may participate in the development of retinal degeneration and in choroidal neovascularization. This paper reviews the possible implication of chemokines in the development of AMD.

Key words: Age-related macular degeneration / chemokines / retinal degeneration / choroidal neovascularization

Liste des abréviations

DMLA :	Dégénérescence maculaire liée à l'âge
EPR :	Epithélium pigmentaire
MB :	Membrane de Bruch
CMH :	Complexe majeur d'histocompatibilité
CM :	Cellules microgliales
M ϕ :	Macrophage
SNC :	Système nerveux central
VEGF :	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
NVC :	NéoVascularisation choroïdienne
CfH :	Facteur H du complément
SNP :	Polymorphisme nucléotidique simple

Introduction

La dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) est la principale cause de cécité légale dans les pays industrialisés (Klein *et al.*, 2004). Cette pathologie est caractérisée par des lésions au niveau des photorécepteurs, de l'épithélium pigmentaire (EPR), de la membrane de Bruch (MB) ainsi que de la chorio-capillaire (Sarks, 1976). Au stade précoce de la DMLA, nommé maculopathie liée à l'âge (MLA), s'accumulent des dépôts lipidiques dans la MB nommés « *drusen* » de grande taille et de type diffus (« *soft drusen* »). Ce stade est également associé à des variations de pigmentation (hypo- et/ou hyper-pigmentation) de l'EPR. Le stade MLA peut régresser (20 % des patients), se stabiliser pendant plusieurs années (environ 60 % des patients) ou bien progresser vers le stade de la DMLA (pour 10 à 20 % des patients) (Klein *et al.*, 2004). Les facteurs favorisant la progression vers la DMLA sont encore inconnus. Il existe deux formes cliniques de DMLA tardives : (i) une forme à progression rapide dite « humide » ou « exsudative » caractérisée par une néovascularisation choroïdienne (NVC), responsable de la plupart des cécités légales dues à la DMLA et (ii) une forme à progression lente, dite « sèche » ou « atrophique » où se développent une atrophie de l'EPR, une dégénérescence des photorécepteurs et une involution puis une oblitération de la choroïde (Klein *et al.*, 2004).

Des études récentes suggèrent que les médiateurs de l'inflammation jouent un rôle important dans la physiopathologie de la DMLA. Il a été démontré que les dépôts de type *drusen* contiennent des molécules du système immunitaire telles que des complexes immuns, des facteurs du complément, des éléments du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) et des oligomères d'amyloïde (van der Schaft *et al.*, 1993; Mullins *et al.*, 2000; Hageman *et al.*, 2001; Johnson *et al.*, 2001; Lührl *et al.*, 2006). Par ailleurs, la DMLA est associée à un polymorphisme conduisant à une perte-de-fonction du facteur H du complément (Edwards, *et al.*, 2005; Haines, *et al.*, 2005; Klein

et al., 2005). Avec la perte de l'activité inhibitrice du facteur H, le système du complément se trouve alors suractivé au cours de la DMLA (Hakobyan, *et al.*, 2008; Ormsby, *et al.*, 2008).

Les cellules microgliales (CMs), macrophages résidents du système nerveux central (SNC), sont localisées dans la rétine interne (Combadière *et al.*, 2007; Xu *et al.*, 2009) et normalement exclues de l'espace sous-rétinien situé entre l'EPR et la rétine. Dans la DMLA, les macrophages/cellules microgliales (M ϕ /CM) s'activent, s'accumulent (van der Schaft *et al.*, 1993; Penfold *et al.*, 1997) dans l'espace sous-rétinien (Gupta *et al.*, 2003; Combadière *et al.*, 2007) et sécrètent, avec l'EPR, le facteur de croissance VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*), connu pour activer l'angiogenèse (Ishibashi *et al.*, 1997; Yi *et al.*, 1997). Ainsi, dans des modèles animaux, l'inhibition de leur accumulation sous-rétinienne diminue de manière significative la néovascularisation choroïdienne (NVC) (Ambati *et al.*, 2003a; Espinosa-Heidmann *et al.*, 2003). La présence prolongée de macrophages dans l'espace sous-rétinien est également associée à une dégénérescence et une mort des photorécepteurs (Combadière *et al.*, 2007; Nakazawa *et al.*, 2007). Cependant, si l'effet délétère de l'accumulation sous-rétinienne des cellules M ϕ /CMs semble peu à peu se confirmer, les mécanismes à l'origine de cette accumulation localisée et l'implication dans le processus de dégénérescence de la rétine restent à caractériser.

Les signalisations en aval de la chimiokine CCL2 et de son récepteur CCR2 et celle de CX3CL1 *via* son récepteur CX3CR1 sont des voies clefs du recrutement des macrophages vers des lésions tissulaires (Combadière *et al.*, 2003, 2008). Dans cette revue, nous discuterons le rôle des axes CCL2/CCR2 et CX3CL1/CX3CR1 dans l'homéostasie des M ϕ /CMs, ainsi que leurs implications dans la physiologie de l'œil et la pathologie de la DMLA.

Expression des chimiokines et de leurs récepteurs dans la rétine

Dans la circulation générale, les récepteurs aux chimiokines, CCR2 and CX3CR1, permettent d'identifier deux types fonctionnels de monocytes : les monocytes « inflammatoires », qui expriment les deux récepteurs, et les monocytes « anti-inflammatoires », qui n'expriment que le récepteur CX3CR1 à leur surface (Geissmann *et al.*, 2003). Les chimiokines CCL2 et CX3CL1 sont libérées au niveau d'une lésion tissulaire et participent à la réponse inflammatoire locale notamment en recrutant les monocytes (Combadière *et al.*, 2003, 2008). CX3CL1 est une chimiokine atypique puisque, contrairement aux

autres chimiokines solubles, cette protéine est transmembranaire. Sous cette forme, sa fonction s'apparente à celle des intégrines. Elle peut néanmoins être clivée par des protéases en une forme soluble aux propriétés chimiotactiques (Ransohoff, 2009). Contrairement à d'autres chimiokines, CX3CL1 ne lie qu'un seul récepteur, le CX3CR1. Dans l'œil, elle est exprimée de manière constitutive par les neurones de la rétine et l'EPR (Silverman *et al.*, 2003). Dans la rétine, la grande majorité des CMs résidentes quiescentes expriment CX3CR1 chez les souris jeunes et adultes (Checchin *et al.*, 2006; Combadière *et al.*, 2007). De la même manière chez l'Homme, toutes les cellules microgliales CD18-positives expriment également le récepteur CX3CR1 (Combadière *et al.*, 2007). Cependant, contrairement aux résultats d'une précédente étude (Tuo *et al.*, 2004), l'expression de CX3CR1 par les cellules de l'EPR n'a pu être confirmée chez la souris *in vivo* tant en immunohistochimie qu'en analysant l'expression du gène rapporteur dans les souris récepteurs *Cx3cr1^{GFP/+}*. Les CMs semblent donc être le seul type cellulaire rétinien à exprimer le récepteur dans des conditions physiologiques normales.

La chimiokine CCL2 est très peu exprimée dans l'œil d'animaux jeunes, mais son expression s'accroît avec l'âge (Chen *et al.*, 2008) ainsi qu'après un stress oxydatif dans l'EPR (Higgins *et al.*, 2008). Des études récentes suggèrent que les M ϕ /CMs sont capables d'induire la production des chimiokines CCL2 et CCL5 par l'EPR (Ma *et al.*, 2009). CCL2 se lie principalement au récepteur CCR2 (Charo *et al.*, 1994). À ce jour, aucune preuve directe de l'expression de CCR2 dans les M ϕ /CMs de la rétine n'a été apportée. Cependant, il a été montré, en étudiant le phénotype des souris knockout, que la signalisation CCL2/CCR2 est impliquée dans le recrutement de M ϕ /CMs au niveau des lésions induites par photo-coagulation laser (Tsumumi *et al.*, 2003; Luhmann *et al.*, 2009a) et au cours du vieillissement (Luhmann *et al.*, 2009a). Ces résultats suggèrent indirectement que des cellules CCR2-positives seraient présentes dans les rétines. De la même manière, dans le cerveau, l'expression de CCR2 est très faible dans la microglie de rat sain, mais le nombre de cellules CCR2-positives augmente drastiquement lors d'une inflammation aiguë (Eltayeb *et al.*, 2007).

Ainsi, la chimiokine CX3CL1 et son récepteur CX3CR1 sont exprimés de manière constitutive dans la rétine et jouerait probablement un rôle dans l'homéostasie de la rétine saine. À l'inverse, la chimiokine CCL2 n'est exprimée qu'à de faibles niveaux chez le jeune adulte. Son induction lors de lésions ou de stress et l'augmentation naturelle de son taux d'expression avec l'âge suggèrent que cette chimiokine participerait davantage aux processus pathologiques et de

vieillessement de la rétine. Il est ainsi tentant de faire l'hypothèse d'un contrôle du recrutement des monocytes et des M ϕ /CMs dans l'espace sous-rétinien par l'axe CCL2/CCR2 lors de la DMLA.

Polymorphismes nucléotidiques simples (SNPs) associés à la DMLA

La DMLA est fortement associée à un polymorphisme du facteur H du complément (CfH) (Edwards *et al.*, 2005; Haines *et al.*, 2005; Klein *et al.*, 2005), qui mène à une sur-activation du système du complément (Hakobyan *et al.*, 2008; Ormsby *et al.*, 2008). Ces données cliniques mettent en exergue le rôle des médiateurs de l'inflammation dans la DMLA. D'autres SNPs des gènes du système du complément, qui pourraient mener à une hyper-activation, ont été identifiés comme des gènes de susceptibilité favorisant l'apparition de la DMLA (Gold *et al.*, 2006; Yates *et al.*, 2007). Cependant, il reste à savoir comment une telle sur-activation du système du complément pourrait prédisposer à la DMLA. Les protéines activées du complément, C3a et C5a, participent au recrutement des neutrophiles et des macrophages dans l'espace sous-rétinien dans un modèle de NVC (Nozaki *et al.*, 2006) et il est possible qu'un mécanisme semblable mène à une inflammation à l'interface rétine/choroïde dans la DMLA.

Plusieurs études ont examiné les SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) du système des chimiokines et leur éventuelle association avec une susceptibilité accrue à la DMLA. Dans une cohorte de patients américains, il a été montré que l'allèle T280M du gène du *CX3CR1* est associé à la DMLA (Tuo *et al.*, 2004). Nous avons retrouvé cette association dans un groupe de patients français (Combadière *et al.*, 2007) et une association similaire vient d'être décrite dans une cohorte de patients chinois (Yang *et al.*, 2010). Fonctionnellement, le polymorphisme M280 accroît l'adhésion de CX3CR1 à son ligand CX3CL1 (Daoudi *et al.*, 2004). Ainsi, en présence de son ligand sous forme transmembranaire, présent abondamment dans l'EPR (Silverman *et al.*, 2003), la mobilité des monocytes exprimant le variant M280 de *CX3CR1* est diminuée. Un défaut de migration des M ϕ /CMs dû à l'altération de la voie de signalisation CX3CL1/CX3CR1 pourrait par conséquent contribuer à l'accumulation sous-rétinienne de ces cellules observée dans la DMLA.

Le modèle *Cx3cr1*^{-/-}

Etant donné que l'allèle T280M du gène *CX3CR1* menant à un dysfonctionnement dans la migration des monocytes (Combadière *et al.*, 2007) est associé

à la DMLA (Tuo *et al.*, 2004; Combadière *et al.*, 2007; Yang *et al.* 2010), plusieurs équipes ont étudié le phénotype des souris déficientes *Cx3cr1*^{-/-} afin d'élucider les effets du dysfonctionnement de CX3CR1 dans l'homéostasie oculaire. De la même manière que les monocytes portant l'allèle T280M, les CMs de souris *Cx3cr1*^{-/-} présentent un défaut de migration (Liang *et al.*, 2009). Nous avons également montré que chez les souris *Cx3cr1*^{-/-} les Mφ/CMs s'accumulent spontanément dans l'espace sous-rétinien en l'absence de dégénérescence initiale des photorécepteurs (Combadière *et al.*, 2007). De plus, cette accumulation est exacerbée à la suite d'une exposition à de fortes intensités lumineuses, connue pour induire des dégénérescences rétinienne chez les souris albinos (Raoul *et al.*, 2008a). Ces résultats contrastent fortement avec le comportement des Mφs dans le tissu périphérique inflammatoire où est observé un déficit d'accumulation/recrutement dans les zones de lésion à la suite de l'invalidation de *Cx3cr1* (Combadière *et al.*, 2003).

Chez les souris de type sauvage, il a été montré depuis que les Mφ/CMs s'accumulent également dans l'espace sous-rétinien à un âge plus avancé (Xu *et al.*, 2008). Ainsi le dysfonctionnement de CX3CR1 accélérerait un processus physiologique. En accord avec cette hypothèse, Ng *et al.* (2001) ont observé que la lumière ambiante suffit à entraîner une accumulation de Mφ/MCs chez des souris albinos sans dégénérescence rétinienne. Par ailleurs, les Mφ/CMs disparaissent de l'espace sous-rétinien quand la stimulation lumineuse est interrompue (Ng *et al.*, 2001). Les Mφ/CMs seraient donc capables naturellement d'entrer et d'être évacués de l'espace sous-rétinien en l'absence de lésions pathologiques des photorécepteurs ou de l'EPR. Cette étude n'explique cependant pas les mécanismes de la clairance, à savoir si elle se produit à la suite de l'apoptose des Mφ/CMs ou bien par suite d'une migration hors de l'espace sous-rétinien (phénomène nommé « egress »). Dans un modèle de dégénérescence rétinienne, nous avons détecté des Mφ/CMs contenant de la rhodopsine en dehors de l'espace sous-rétinien (Raoul *et al.*, 2008a), ce qui suggère que le phénomène d'« egress » serait bien actif dans la clairance de l'espace sous-rétinien. Les défauts de migration microgliale chez les souris *Cx3cr1*^{-/-} (Liang *et al.*, 2009) pourraient alors contribuer à une réduction de la clairance de l'espace sous-rétinien et par conséquent provoquer l'accumulation microgliale observée chez les souris *Cx3cr1*^{-/-} âgées. Cette hypothèse n'exclut pas qu'une résistance à l'apoptose des Mφ/CMs puisse contribuer en parallèle à cette accumulation.

Chez les souris *Cx3cr1*^{-/-}, la présence prolongée des Mφ/CMs dans l'espace sous-rétinien est associée à une phagocytose excessive des segments externes

des photorécepteurs par les Mφ/CMs, ce qui entraîne l'accumulation de lipides intracellulaires (Combadière *et al.*, 2007; Raoul *et al.*, 2008b). Ces Mφ/MCs « spumeux » sont à l'origine des dépôts semblables à des *drusen*, observés dans les fonds d'œil des souris *Cx3cr1*^{-/-} (Combadière *et al.*, 2007), ainsi que des souris *Ccl2*^{-/-} (Luhmann *et al.*, 2009a) (voir ci-dessous). De façon semblable, des cellules microgliales exprimant le récepteur CX3CR1 et gonflées de lipides intracellulaires sont retrouvées dans l'espace sous-rétinien chez des patients atteints de DMLA (Gupta *et al.*, 2003; Combadière *et al.*, 2007). Des rapports récents suggèrent que les lésions de type « *drusen* » observées chez les patients DMLA seraient non seulement formées par des dépôts dans la MB du côté basal de l'EPR, qui sont couramment admis comme étant à l'origine des *drusen* chez l'Homme, mais aussi par des dépôts dans l'espace sous-rétinien du côté apical de l'EPR, donc à l'instar des lésions observées chez les souris *Cx3cr1*^{-/-} et *Ccl2*^{-/-} (Cohen *et al.*, 2007; Rudolf *et al.*, 2008; Zweifel *et al.*, 2010). Il est donc tentant de spéculer que ces dépôts sous-rétiens correspondraient à une accumulation des débris provenant de l'apoptose des Mφ/CMs « spumeux ». Quant aux dépôts de la MB, ils pourraient dériver de ces débris recouverts dans un deuxième temps par des cellules de l'EPR. Plusieurs arguments viennent étayer cette hypothèse. Tout d'abord, les *drusen* contiennent beaucoup d'organites dégénérés qui pourraient provenir de Mφ/CMs sous-rétiens (Farkas *et al.*, 1971). De plus, les *drusen* contiennent des protéines inflammatoires comme le récepteur CX3CR1, l'apolipoprotéine E, les facteurs du complément et des protéines du CMH (van der Schaft *et al.*, 1993; Mullins *et al.*, 2000; Hageman *et al.*, 2001; Johnson *et al.*, 2001; Luibl *et al.*, 2006; Combadière *et al.*, 2007) qui peuvent tous être exprimés par les Mφ/CMs (Matsubara *et al.*, 1999; Bellander *et al.*, 2004; Xu *et al.*, 2006; Combadière *et al.*, 2007).

D'autres conséquences à plus long terme de la présence prolongée des CMs chez les souris *Cx3cr1*^{-/-} dans l'espace sous-rétinien sont la mort des cellules photoréceptrices (Combadière *et al.*, 2007; Raoul *et al.*, 2008a) ainsi que des changements de structure et de distribution de l'EPR (Ma *et al.*, 2009). Chez ces souris, une dégénérescence rétinienne est en effet observée chez les souris sénescences ou à la suite d'une exposition de longue durée à une intensité lumineuse moyenne. Ce protocole d'illumination n'induit pas de dégénérescence chez les souris sauvages (Combadière *et al.*, 2007; Raoul *et al.*, 2008a). Cependant, dans un autre modèle d'illumination à plus haute intensité, qui provoque la quasi-complète dégénérescence chez des animaux de type sauvage, cette différence de réponse entre les souris sauvages et déficientes

en *Cx3cr1* n'est plus observée (Joly *et al.*, 2009), ce qui suggère qu'un niveau maximum de toxicité des Mφ/CMs peut être atteint chez des animaux de type sauvage par ce protocole. La toxicité des Mφ/CMs activés sur les photorécepteurs a été démontrée à la fois *in vitro* (Roque *et al.* 1999) et *in vivo* (Nakazawa *et al.*, 2007). Par ailleurs, dans le cerveau de souris déficientes en *Cx3cr1*, la toxicité neuronale induite par la présence des Mφ/CMs est considérée comme un mécanisme majeur dans le développement des maladies neurodégénératives. Ainsi, des mécanismes similaires pourraient causer la dégénérescence de photorécepteurs chez les souris *Cx3cr1*^{-/-}.

Enfin, les souris *Cx3cr1*^{-/-} développent une néovascularisation choroïdienne (NVC) exacerbée dans le modèle de NVC induite par laser. La présence des Mφ/CMs sous-rétiens constituerait donc un environnement pro-angiogénique (Combadière *et al.*, 2007). Les Mφ/CMs pourraient produire eux-mêmes des facteurs pro-angiogéniques de type VEGF, mais plus important encore, ils pourraient induire l'expression de la métallo-protéase matricielle 9 (MMP9), également pro-angiogénique, et du VEGF dans l'EPR (Ma *et al.*, 2009), ce qui pourrait expliquer l'hyper-néovascularisation choroïdienne observée chez les souris *Cx3cr1*^{-/-}.

En résumé, les souris *Cx3cr1*^{-/-} développent une accumulation primaire de Mφ/CMs sous la rétine, résultant probablement d'un défaut de migration associé à un dysfonctionnement de CX3CR1. La présence prolongée des Mφ/CMs sous-rétiens mène à la formation de dépôts « drusénoïdes » dans l'espace sous-rétinien, à une dégénérescence rétinienne et à l'induction de la NVC. Ces résultats révolutionnent quelque peu la vision selon laquelle l'accumulation de Mφ/CMs dans l'espace sous-rétinien est une simple réponse et conséquence des maladies affectant soit l'EPR soit les photorécepteurs et la place davantage comme un élément causal et moteur de la pathogenèse de la DMLA.

Les modèles *Ccl2*^{-/-} et *Ccr2*^{-/-}

Plusieurs études ont utilisé comme modèles les souris *Ccl2*^{-/-} ou *Ccr2*^{-/-} dans l'espoir de décrypter les mécanismes inflammatoires de la DMLA. En 2003, Tsutsumi *et al.* ont montré que, à la suite d'une NVC induite par un impact laser, les macrophages situés dans l'œil adoptent un phénotype pro-angiogénique. Leur recrutement au site de photocoagulation et la néovascularisation qui s'ensuit sont fortement inhibés chez les souris *Ccr2*^{-/-} et *Ccl2*^{-/-} (Tsutsumi *et al.*, 2003; Luhmann *et al.*, 2009b). Par ailleurs, la déplétion en macrophages inhibe la NVC induite par laser (Espinosa-Heidmann *et al.*, 2003; Sakurai *et al.*,

2006). L'apparition de NVC spontanée a également été observée dans 25 % des souris déficientes en *Ccl2* ou *Ccr2* âgées de plus 18 mois par l'équipe d'Ambati *et al.* (2003a); Luhmann *et al.* (2009a) ont été cependant incapables de reproduire ces résultats. Il est donc difficile à l'heure actuelle d'affirmer que la seule déficience en *Ccl2* est suffisante pour induire une néovascularisation spontanée. Les souris *Ccl2*^{-/-} et *Ccr2*^{-/-} âgées forment également spontanément des lésions comparables à des *drusen*. Les auteurs ont donc émis comme hypothèse que le défaut de recrutement des macrophages provenant de la circulation choroïdienne à la suite de l'inactivation de la voie de signalisation CCL2/CCR2 pourrait entraîner un état hypo-inflammatoire et un ralentissement de la clairance des débris accumulés au niveau de la membrane de Bruch (Ambati *et al.*, 2003a). Cependant, bien que les lésions observées lors d'examen du fond d'œil s'apparentent à des *drusen*, il est maintenant admis que ces lésions ne sont pas formées de dépôts extracellulaires sous l'EPR dans la membrane de Bruch. Les dépôts observés chez ces souris *Ccl2*^{-/-} et *Ccr2*^{-/-} sont en réalité constitués de cellules microgliales sous-rétiennes gonflées de lipides (Luhmann *et al.*, 2009a), semblables à celles décrites chez les souris *Cx3cr1*^{-/-} (Combadière *et al.*, 2007; Raoul *et al.*, 2008b). Cette accumulation importante de Mφ/CMs dans l'espace sous-rétinien étant également une caractéristique des yeux de patients atteints de DMLA (van der Schaft *et al.*, 1993; Penfold *et al.*, 1997; Gupta *et al.*, 2003; Combadière *et al.*, 2007), ces observations remettent ainsi en cause l'hypothèse d'un développement de la DMLA induit par un déficit de recrutement en Mφ/CMs et un état hypo-inflammatoire (Ambati *et al.*, 2003b). D'autres études sont nécessaires afin de synthétiser les observations contradictoires obtenues sur ces souris modèles par les équipes de Luhmann et d'Ambati.

Le modèle *Ccl2*^{-/-} *Cx3cr1*^{-/-}

Tuo *et al.* (2004) ont été les premiers à décrire une association entre l'allèle T280M du *CX3CR1* et la DMLA. Ambati *et al.* (2003a) ont aussi montré que des souris *Ccl2*^{-/-} et *Ccr2*^{-/-} développent les caractéristiques majeures de la DMLA. Chez ces modèles murins, cependant, le développement des caractéristiques de la DMLA ne se produit que tardivement, chez les souris âgées, ralentissant ainsi les efforts de recherche. Pour pallier cet inconvénient, Tuo *et al.* (2007) ont généré des souris double knock-out *Ccl2*^{-/-}/*Cx3cr1*^{-/-} qui développent des lésions de type *drusen*, des altérations pigmentaires et une dégénérescence rétinienne dès l'âge de 6 semaines chez 100 % des souris. Cependant, des

souris *Ccl2*^{-/-} *Cx3cr1*^{-/-} produites indépendamment dans notre laboratoire n'ont présenté aucune caractéristique de la DMLA à cet âge. Tuo *et al.* ont également précisé que les accouplements conduisaient à une distribution non-mendélienne des génotypes des souris. Les souris *Ccl2*^{-/-} *Cx3cr1*^{-/-} obtenues par ce groupe présentent également une faible fécondité et une dépigmentation progressive de la peau, caractéristiques que nous n'avons pas observées dans notre propre souche (Combadière *et al.*, 2008). Tuo *et al.* ont, en réalité, introduit un biais dans l'étude de leur souche *Ccl2*^{-/-} *Cx3cr1*^{-/-}, en sélectionnant initialement un couple reproducteur formé de souris « contenant le plus de lésions oculaires de type drusénoïde » (Chan *et al.*, 2009). En choisissant leurs géniteurs initiaux de la sorte, il est possible que les auteurs aient sélectionné des animaux génétiquement prédisposés à développer des lésions et ce, indépendamment de leur invalidation pour *Ccl2* ou *Cx3cr1*. Ceci expliquerait ainsi la non-reproductibilité des caractéristiques oculaires et systémiques entre leur souche de souris *Ccl2*^{-/-} *Cx3cr1*^{-/-} et celle que nous avons générée. Les conclusions concernant l'implication de CCL2 et CX3CR1 dans le phénotype de ce modèle se doivent par conséquent d'être très prudentes.

Conclusions et perspectives

CX3CL1 et CX3CR1 sont exprimées de manière constitutive dans l'oeil. Chez la souris, le dysfonctionnement de leur signalisation entraîne une accumulation sous-rétinienne de Mφ/CMs avec des effets délétères sur l'EPR et les photorécepteurs. L'association d'un polymorphisme du gène *CX3CR1* à la DMLA chez l'Homme, menant à une protéine CX3CR1 non-fonctionnelle, et l'observation d'une accumulation des Mφ/CMs dans l'espace sous-rétinien au cours de la DMLA suggèrent qu'un dysfonctionnement de la voie CX3CL1/CX3CR1 pourrait effectivement jouer un rôle majeur dans la pathogenèse de la DMLA chez l'humain. Cependant, les mécanismes qui mènent à l'accumulation des Mφ/CMs restent à élucider et de plus amples recherches seront nécessaires afin d'identifier tous les acteurs de ce processus.

La chimiokine CCL2, quant à elle, est peu exprimée dans la rétine saine. Cependant, les modèles de blessures, comme les impacts laser, induisent un recrutement des Mφ/CMs qui dépend de la voie CCL2/CCR2. Cette accumulation conduit à la mort des photorécepteurs et favorise la progression de la NVC (Tsutsumi *et al.*, 2003; Nakazawa *et al.*, 2007). L'expression de CCR2 dans la rétine saine n'est pas bien identifiée et son augmentation avec l'âge reste

à préciser. Cependant le fait que les souris *Ccl2*^{-/-} développent aussi une accumulation sous-rétinienne des Mφ/CMs à un stade plus avancé pourrait indiquer qu'un changement de sous-population de Mφ/CMs se produit avec l'âge, passant ainsi d'une population de microglies CX3CR1⁺/CCR2⁻ à une population CX3CR1⁺/CCR2⁺. La voie de signalisation CCL2/CCR2 serait alors effectivement impliquée dans la clairance des Mφ/CMs sous-rétiniens lors du vieillissement de la rétine, de façon semblable au phénomène observé chez les souris *Cx3cr1*^{-/-}. Inhiber la voie CCL2/CCR2 pourrait ainsi protéger de l'accumulation des Mφ/CMs aux stades précoces de la DMLA. Cependant, des études sont encore nécessaires afin de déterminer si l'inhibition de la voie CCL2/CCR2 serait bénéfique à un stade plus avancé pour bloquer la dégénérescence des photorécepteurs et de la NVC induite par cette accumulation.

Remerciements. Ce travail a été réalisé grâce aux financements de l'INSERM ANR « blanc » (AO5120DD), European Grant « Innochem » (LSHB-CT-2005-518167), ANR maladies neurologiques et psychiatriques (R08098DS) et ERC starting Grant (ERC-2007 St.G. 210345). F.S. est rcipiendaire d'un contrat « Interface » de l'Assistance Publique-Hpitaux de Paris.

Rfrences

- Ambati J., Ambati B.K., Yoo S.H., Ianchulev S., Adamis A.P., Age-related macular degeneration: etiology, pathogenesis, and therapeutic strategies. *Surv Ophthalmol*, 2003a, 48, 257–293.
- Ambati J., Anand A., Fernandez S., Sakurai E., Lynn B.C., Kuziel W.A., Rollins B.J., Ambati B.K., An animal model of age-related macular degeneration in senescent *Ccl2*- or *Ccr2*-deficient mice. *Nat Med*, 2003b, 9, 1390–1397.
- Bellander B.M., Bendel O., Von Euler G., Ohlsson M., Svensson M., Activation of microglial cells and complement following traumatic injury in rat entorhinal-hippocampal slice cultures. *J Neurotrauma*, 2004, 21, 605–615.
- Chan C.C., Ross R.J., Shen D., Ding X., Majumdar Z., Bojanowski C.M., Zhou M., Salem N., Jr., Bonner R., Tuo J., *Ccl2/Cx3cr1*-deficient mice: an animal model for age-related macular degeneration. *Ophthalmic Res*, 2008, 40, 124–128.
- Charo I.F., Myers S.J., Herman A., Franci C., Connolly A.J., Coughlin S.R., Molecular cloning and functional expression of two monocyte chemoattractant protein 1 receptors reveals alternative splicing of the carboxyl-terminal tails. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91, 2752–2756.

- Checchin D., Sennlaub F., Levavasseur E., Leduc M., Chemtob S., Potential role of microglia in retinal blood vessel formation. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2006, 47, 3595–3602.
- Chen H., Liu B., Lukas T.J., Neufeld A.H., The aged retinal pigment epithelium/choroid: a potential substratum for the pathogenesis of age-related macular degeneration. *PLoS One*, 2008, 3, e2339.
- Cohen S.Y., Dubois L., Tadayoni R., Delahaye-Mazza C., Debibie C., Quentel G., Prevalence of reticular pseudodrusen in age-related macular degeneration with newly diagnosed choroidal neovascularisation. *Br J Ophthalmol*, 2007, 91, 354–359.
- Combadière C., Feumi C., Raoul W., Keller N., Rodero M., Pezard A., Lavalette S., Houssier M., Jonet L., Picard E., CX3CR1-dependent subretinal microglia cell accumulation is associated with cardinal features of age-related macular degeneration. *J Clin Invest*, 2007, 117, 2920–2928.
- Combadière C., Potteaux S., Gao J.L., Esposito B., Casanova S., Lee E.J., Debré P., Tedgui A., Murphy P.M., Mallat Z., Decreased atherosclerotic lesion formation in CX3CR1/apolipoprotein E double knockout mice. *Circulation*, 2003, 107, 1009–1016.
- Combadière C., Potteaux S., Rodero M., Simon T., Pezard A., Esposito B., Merval R., Proudfoot A., Tedgui A., Mallat Z., Combined inhibition of CCL2, CX3CR1, and CCR5 abrogates Ly6C(hi) and Ly6C(lo) monocytes and almost abolishes atherosclerosis in hypercholesterolemic mice. *Circulation*, 2008, 117, 1649–1657.
- Daoudi M., Lavergne E., Garin A., Tarantino N., Debré P., Pincet F., Combadière C., Deterre P., Enhanced adhesive capacities of the naturally occurring Ile249-Met280 variant of the chemokine receptor CX3CR1. *J Biol Chem*, 2004, 279, 19649–19657.
- Edwards A.O., Ritter R., 3rd, Abel K.J., Manning A., Panhuysen C., Farrer, L.A., Complement factor H polymorphism and age-related macular degeneration. *Science*, 2005, 308, 421–424.
- Eltayeb S., Berg A.L., Lassmann H., Wallstrom E., Nilsson M., Olsson T., Ericsson-Dahlstrand A., Sunnemark D., Temporal expression and cellular origin of CC chemokine receptors CCR1, CCR2 and CCR5 in the central nervous system: insight into mechanisms of MOG-induced EAE. *J Neuroinflammation*, 2007, 4, 14.
- Espinosa-Heidmann, D.G., Suner I.J., Hernandez E.P., Monroy D., Csaky K.G., Cousins S.W., Macrophage depletion diminishes lesion size and severity in experimental choroidal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2003, 44, 3586–3592.
- Farkas T.G., Sylvester V., Archer D., The ultrastructure of drusen. *Am J Ophthalmol*, 1971, 71, 1196–1205.
- Geissmann F., Jung, S., Littman D.R., Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity*, 2003, 19, 71–82.
- Gold B., Merriam J.E., Zernant J., Hancox L.S., Taiber A.J., Gehrs K., Cramer K., Neel J., Bergeron J., Barile G.R., Variation in factor B (BF) and complement component 2 (C2) genes is associated with age-related macular degeneration. *Nat Genet*, 2006, 38, 458–462.
- Gupta N., Brown K.E., Milam A.H., Activated microglia in human retinitis pigmentosa, late-onset retinal degeneration, and age-related macular degeneration. *Exp Eye Res*, 2003, 76, 463–471.
- Hageman G.S., Luthert P.J., Victor Chong N.H., Johnson L.V., Anderson D.H., Mullins R.F., 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*, 2001, 20, 705–732.
- Haines J.L., Hauser M.A., Schmidt S., Scott W.K., Olson L.M., Gallins P., Spencer K.L., Kwan S.Y., Nouredine M., Gilbert J.R., Complement factor H variant increases the risk of age-related macular degeneration. *Science*, 2005, 308, 419–421.
- Hakobyan S., Harris C.L., van den Berg C.W., Fernandez-Alonso M.C., de Jorge E.G., de Cordoba S.R., Rivas G., Mangione P., Pepys M.B., Morgan B.P., Complement factor H binds to denatured rather than to native pentameric C-reactive protein. *J Biol Chem*, 2008, 283, 30451–30460.
- Higgins G.T., Wang J.H., Dockery P., Cleary P.E., Redmond H.P., Induction of angiogenic cytokine expression in cultured RPE by ingestion of oxidized photoreceptor outer segments. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2003, 44, 1775–1782.
- Ishibashi T., Hata Y., Yoshikawa H., Nakagawa K., Sueishi K., Inomata H., Expression of vascular endothelial growth factor in experimental choroidal neovascularization. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 1997, 235, 159–167.
- Johnson L.V., Leitner W.P., Staples M.K., Anderson D.H., Complement activation and inflammatory processes in Drusen formation and age related macular degeneration. *Exp Eye Res*, 2001, 73, 887–896.
- Joly S., Francke M., Ulbricht E., Beck S., Seeliger M., Hirrlinger P., Hirrlinger J., Lang K.S., Zinkernagel M., Odermatt B., Cooperative phagocytes: resident microglia and bone marrow immigrants remove dead photoreceptors in retinal lesions. *Am J Pathol*, 2009, 174, 2310–2323.
- Klein R., Peto T., Bird A., Vannewkirk M.R., The epidemiology of age-related macular degeneration. *Am J Ophthalmol*, 2004, 137, 486–495.
- 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., Complement factor H polymorphism in age-related macular degeneration. *Science*, 2005, 308, 385–389.

- Liang K.J., Lee J.E., Wang Y.D., Ma W., Fontainhas A.M., Fariss R.N., Wong W.T., Regulation of dynamic behavior of retinal microglia by CX3CR1 signaling. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2009, 50, 4444–4451.
- Luhmann U.F., Robbie S., Munro P.M., Barker S.E., Duran Y., Luong V., Fitzke F.W., Bainbridge J., Ali R.R., MacLaren R., The drusen-like phenotype in aging Ccl2 knockout mice is caused by an accelerated accumulation of swollen autofluorescent subretinal macrophages. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2009a,
- Luhmann U.F., Robbie S., Munro P.M., Barker S.E., Duran Y., Luong V., Fitzke F.W., Bainbridge J.W., Ali R.R., MacLaren R.E., The drusenlike phenotype in aging Ccl2-knockout mice is caused by an accelerated accumulation of swollen autofluorescent subretinal macrophages. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2009b, 50, 5934–5943.
- Luibl V., Isas J.M., Kaye R., Glabe C.G., Langen R., Chen J., Drusen deposits associated with aging and age-related macular degeneration contain nonfibrillar amyloid oligomers. *J Clin Invest*, 2006, 116, 378–385.
- Ma, W., Zhao, L., Fontainhas, A.M., Fariss, R.N., Wong, W.T., Microglia in the mouse retina alter the structure and function of retinal pigmented epithelial cells: a potential cellular interaction relevant to AMD. *PLoS One*, 2009, 4, e7945.
- Matsubara T., Pararajasegaram G., Wu G.S., Rao N.A., Retinal microglia differentially express phenotypic markers of antigen-presenting cells in vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1999, 40, 3186–3193.
- Mullins R.F., Russell S.R., Anderson D.H., Hageman G.S., Drusen associated with aging and age-related macular degeneration contain proteins common to extracellular deposits associated with atherosclerosis, elastosis, amyloidosis, and dense deposit disease. *FASEB J*, 2000, 14, 835–846.
- Nakazawa T., Hisatomi T., Nakazawa C., Noda K., Maruyama K., She H., Matsubara A., Miyahara S., Nakao S., Yin Y., Monocyte chemoattractant protein 1 mediates retinal detachment-induced photoreceptor apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104, 2425–2430.
- Ng T.F., Streilein J.W., Light-induced migration of retinal microglia into the subretinal space. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2001, 42, 3301–3310.
- 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., Drusen complement components C3a and C5a promote choroidal neovascularization. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103, 2328–2333.
- 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., Gordon D.L., Functional and structural implications of the complement factor H Y402H polymorphism associated with age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2008, 49, 1763–1770.
- Penfold P.L., Liew S.C., Madigan M.C., Provis J.M., Modulation of major histocompatibility complex class II expression in retinas with age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1997, 38, 2125–2133.
- Ransohoff R.M., Chemokines and chemokine receptors: standing at the crossroads of immunobiology and neurobiology. *Immunity*, 2009, 31, 711–721.
- Raoul W., Feumi C., Keller N., Lavalette S., Houssier M., Behar-Cohen F., Combadière C., Sennlaub F., Lipid-bloated subretinal microglial cells are at the origin of drusen appearance in CX3CR1-deficient mice. *Ophthalmic Res*, 2008a, 40, 115–119.
- Raoul W., Keller N., Rodero M., Behar-Cohen F., Sennlaub F., Combadière C., Role of the chemokine receptor CX3CR1 in the mobilization of phagocytic retinal microglial cells. *J Neuroimmunol*, 2008b, 198, 56–61.
- Roque R.S., Rosales A.A., Jingjing L., Agarwal N., Al-Ubaidi M.R., Retina-derived microglial cells induce photoreceptor cell death in vitro. *Brain Res*, 1999, 836, 110–119.
- Rudolf M., Malek G., Messinger J.D., Clark M.E., Wang L., Curcio C.A., Sub-retinal drusenoid deposits in human retina: organization and composition. *Exp Eye Res*, 2008, 87, 402–408.
- Sakurai E., Anand A., Ambati B.K., van Rooijen N., Ambati J., Macrophage depletion inhibits experimental choroidal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2003, 44, 3578–3585.
- Sarks S.H., Ageing and degeneration in the macular region: a clinico-pathological study. *Br J Ophthalmol*, 1976, 60, 324–341.
- Silverman M.D., Zamora D.O., Pan Y., Texeira P.V., Baek S.H., Planck S.R., Rosenbaum J.T., Constitutive and inflammatory mediator-regulated fractalkine expression in human ocular tissues and cultured cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2003, 44, 1608–1615.
- Tsutsumi C., Sonoda K.H., Egashira K., Qiao H., Hisatomi T., Nakao S., Ishibashi M., Charo I.F., Sakamoto T., Murata T., The critical role of ocular-infiltrating macrophages in the development of choroidal neovascularization. *J Leukoc Biol*, 2003, 74, 25–32.
- Tuo J., Bojanowski C.M., Zhou M., Shen D., Ross R.J., Rosenberg K.I., Cameron D.J., Yin C., Kowalak J.A., Zhuang Z., Murine ccl2/cx3cr1 deficiency results in retinal lesions mimicking human age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2007, 48, 3827–3836.
- Tuo J., Smith B.C., Bojanowski C.M., Meleth A.D., Gery I., Csaky K.G., Chew E.Y., Chan C.C., The involvement of sequence variation and expression of CX3CR1

- in the pathogenesis of age-related macular degeneration. *FASEB J*, 2004, 18, 1297–1299.
- van der Schaft T.L., Mooy C.M., de Bruijn W.C., de Jong P.T., Early stages of age-related macular degeneration: an immunofluorescence and electron microscopy study. *Br J Ophthalmol*, 1993, 77, 657–661.
- Xu H., Chen M., Forrester J.V., Para-inflammation in the aging retina. *Prog Retin Eye Res*, 2009, 28, 348–368.
- Xu H., Chen M., Manivannan A., Lois N., Forrester J.V., Age-dependent accumulation of lipofuscin in perivascular and subretinal microglia in experimental mice. *Aging Cell*, 2008, 7, 58–68.
- Xu Q., Bernardo A., Walker D., Kanegawa T., Mahley R.W., Huang Y., Profile and regulation of apolipoprotein E (ApoE) expression in the CNS in mice with targeting of green fluorescent protein gene to the ApoE locus. *J Neurosci*, 2006, 26, 4985–4994.
- Yang X., Hu J., Zhang J., Guan H., Polymorphisms in CFH, HTRA1 and CX3CR1 confer risk to exudative age-related macular degeneration in Han Chinese. *Br J Ophthalmol*, 2010, 94, 1211–1214.
- Yates J.R., Sepp T., Matharu B.K., Khan J.C., Thurlby D.A., Shahid H., Clayton D.G., Hayward C., Morgan J., Wright A.F., Complement C3 variant and the risk of age-related macular degeneration. *N Engl J Med*, 2007, 357, 553–561.
- Yi X., Ogata N., Komada M., Yamamoto C., Takahashi K., Omori K., Uyama M., Vascular endothelial growth factor expression in choroidal neovascularization in rats. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 1997, 235, 313–319.
- Zweifel S.A., Imamura, Y., Spaide T.C., Fujiwara T., Spaide R.F., Prevalence and Significance of Subretinal Drusenoid Deposits (Reticular Pseudodrusen) in Age-Related Macular Degeneration. *Ophthalmology*, 2010, 117, 1775–1781.