



HAL
open science

Développement d'un modèle cellulaire de la DMLA à partir de cellules de patients pour étudier la physiopathologie de la maladie

Audrey Voisin

► **To cite this version:**

Audrey Voisin. Développement d'un modèle cellulaire de la DMLA à partir de cellules de patients pour étudier la physiopathologie de la maladie. Organes des sens. Université de Poitiers, 2017. Français. NNT: . tel-02498161

HAL Id: tel-02498161

<https://univ-poitiers.hal.science/tel-02498161>

Submitted on 4 Mar 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE

Pour l'obtention du grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE POITIERS
UFR de médecine et de pharmacie
Laboratoire de neurosciences expérimentales et cliniques - LNEC (Poitiers)
(Diplôme National - Arrêté du 25 mai 2016)

École doctorale : Biologie-santé - Bio-santé (Limoges)
Secteur de recherche : Recherche clinique, innovation thérapeutique, santé publique

Présentée par :
Audrey Voisin

Développement d'un modèle cellulaire de la DMLA à partir de cellules de patients pour étudier la physiopathologie de la maladie

Directeur(s) de Thèse :
Nicolas Leveziel, Afsaneh Gaillard

Soutenue le 09 novembre 2017 devant le jury

Jury :

Président	Pierre Voisin	Directeur de recherche CNRS, STIM, Université de Poitiers
Rapporteur	Vasiliki Kalatzis	Chargée de recherche, INM, INSERM, Montpellier
Rapporteur	Marina Yefimova	Directeur de recherche, Académie des sciences de Russie
Membre	Nicolas Leveziel	Professeur et praticien hospitalier, LNEC, Université de Poitiers
Membre	Afsaneh Gaillard	Professeur, LNEC, Université de Poitiers
Membre	Xavier Nissan	Docteur, ISTEM, INSERM, Evry

Pour citer cette thèse :

Audrey Voisin. *Développement d'un modèle cellulaire de la DMLA à partir de cellules de patients pour étudier la physiopathologie de la maladie* [En ligne]. Thèse Recherche clinique, innovation thérapeutique, santé publique. Poitiers : Université de Poitiers, 2017. Disponible sur Internet <<http://theses.univ-poitiers.fr>>

THESE

Pour l'obtention du Grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE POITIERS

(Faculté Médecine et Pharmacie)

(Diplôme National - Arrêté du 25 mai 2016)

Ecole Doctorale : Biosanté, ED n°524 du PRES Limousin Poitou-Charentes

Secteur de Recherche : Recherche clinique, innovation thérapeutique, santé publique

Présentée par :

Audrey VOISIN

Développement d'un modèle cellulaire de la DMLA à partir de cellules de patients pour étudier la physiopathologie de la maladie

Directeurs de Thèse : Pr Afsaneh Gaillard & Pr Nicolas Leveziel

Soutenue le Jeudi 09 Novembre 2017
devant la Commission d'Examen

JURY

Dr Vasiliki Kalatzis
Dr Marina Yefimova
Dr Xavier Nissan
Dr Pierre Voisin
Pr Afsaneh Gaillard
Pr Nicolas Leveziel

IMN, INSERM U844, Montpellier
Académie des Sciences de Russie
ISTEM, INSERM U861, Evry
STIM, CNRS-ERL 7368, Poitiers
LNEC, INSERM U1084, Poitiers
LNEC, INSERM U1084, Poitiers

Rapporteur
Rapporteur
Membre
Membre
Membre
Membre

Remerciements

Je tiens à remercier le Professeur Marina Yefimova et le Docteur Vasiliki Kalatzis d'avoir accepté d'être les rapporteurs de mon travail de thèse. Je remercie également le Docteur Xavier Nissan et le Docteur Pierre Voisin d'avoir évalué mon travail en tant que membres du jury.

Je remercie le Professeur Marc Peschanski de m'avoir accueillie pour ma première année de thèse dans l'unité de recherche U-861 ; ainsi que le Professeur Mohamed Jaber de m'avoir permis d'intégrer l'unité U-1084 où j'ai réalisé ma deuxième et troisième année de thèse.

Merci à Novartis, à la région Poitou-Charentes et au CHU de Poitiers pour leur soutien. Un remerciement particulier au CHU de Poitiers qui me permet aujourd'hui de poursuivre mes recherches même après la thèse. Merci aussi à tous les patients qui ont participé à ce projet.

Je tiens à remercier chaleureusement mes deux directeurs de thèse, le Professeur Afsaneh Gaillard et le Professeur Nicolas Leveziel. Je vous remercie du fond du cœur pour la confiance que vous m'avez accordé, votre présence ces 3 dernières années ainsi que votre patience. Tout au long de mon doctorat, je me suis sentie soutenue et écoutée ce qui m'a permis de m'épanouir totalement scientifiquement. J'ai pu réaliser cette thèse dans des conditions idéales et j'ai énormément appris à vos côtés. J'ai été très honorée de pouvoir travailler avec vous. Encore merci.

Je souhaite aussi remercier de tout cœur le Professeur Christelle Monville de m'avoir accueillie et encadrée pendant ma première année de thèse.

*C'est à tes côtés que j'ai commencé ce travail et je ne peux que te remercier pour tout ce que tu m'as apporté scientifiquement, ainsi que pour ton soutien et ta présence dans ce projet même après mon départ du laboratoire. Je remercie également ma technicienne préférée, ma chère **Alexandra**. Avant de te rencontrer, je ne connaissais rien aux cellules souches ou à la reprogrammation cellulaire ! Tout ce que je peux savoir à ces sujets aujourd'hui c'est toi qui me l'a appris alors merci pour tout, pour avoir partagé tes connaissances, pour ta gentillesse et ta patience, merci pour ton amitié...*

*Je souhaite remercier **Florian**, **Walter** et **Karim** de m'avoir accepté dans leur équipe et pour leur sympathie durant ma première année de thèse à Evry ; ainsi que tout le laboratoire **I-STEM** pour leur accueil, leur gentillesse et leur aide. Je pense particulièrement à **Michel**, toi que j'ai harcelé de questions diverses et variées, ainsi qu'à **Sophie** et **Yolande** pour avoir partagé mes déjeuners. Un grand merci aussi à **Déborah** et **Anaïs**. Les filles, je vous kiffe ! Vous avez été mes rayons de soleil durant cette année parisienne, toujours présente scientifiquement... mais surtout pour rigoler !*

*Un grand merci à mon équipe au sein du **LNEC** ! Dès mon arrivée, je me suis sentie à l'aise à vos côtés. Merci à tous pour votre soutien, votre aide et votre bonne humeur ! Merci à **Tristan**, je n'ai pas pu travailler longtemps avec toi mais ce fût un réel plaisir, à **Sébastien** le spécialiste du microscope, à **Marie-Laure** sans qui personne ne ferait rien, à **Maureen** pour sa gaieté sans faille et à **Anaïs** ma partenaire (Oui oui ! On est une équipe à nous deux !). Merci également à **Hammam**, **Sarah** et **Nissnine** pour votre gentillesse à mon égard.*

*Je remercie bien sûr chaque personne du laboratoire **LNEC** pour son aide et sa bonne humeur ces deux dernières années. Vous avez tous d'une façon ou d'un autre participé à ce travail de thèse alors merci **Emilie**, **Mejda**, **Marianne**, **Laetitia**, **Josette**, **Virginie**, **Marcello**, **Nathalie**, **Konstantin**, **Pierre-Olivier** (**Guichet** et **Fernagut**), **Christos**, **Pauline**, **Taneq**, **Emile** et **Emmanuel**. Un merci*

ma Fanny chérie et Thomas. Merci ma pucette pour ton amitié, ta présence et ton soutien, ta gentillesse et ta bonne humeur.

Merci à ma belle-famille, merci pour tous ces moments partagés ainsi que pour votre intérêt pour mon travail. Merci à mes beaux-parents Corinne & Jean-Marie, et à mes belles-sœurs et beaux-frères Michael & Emilie, Séverine & David, Céline & Sébastien, Emmanuelle alias Manou & Michelle ainsi que Carole-Anne et Julien. Merci aussi à mes neveux et nièces Jason, Kimberley, Clément, Sarah, Dorian, Manon et Noé.

Merci à toute ma famille, mes oncles et tantes, mes cousins et cousines... Vous êtes bien trop nombreux pour tous vous citer mais merci. Je souhaite remercier tout particulièrement mes grands-parents, Mamie & Pitou et Mamie Solange de m'avoir toujours soutenu.

Merci à mon papa Robert et à ma maman Isabelle sans qui je ne serais pas qui je suis maintenant. Merci pour votre amour. Depuis mon enfance, vous m'avez poussé à me dépasser, à viser toujours plus haut et j'espère que vous êtes fiers de moi aujourd'hui. Merci aussi à mon beau-papa Bruno, toujours aux petits soins ; et merci à ma sœur d'amour, Doriane, mon « bloc » indispensable à mon bonheur.

Merci à ma chienne Surra d'avoir été près de moi tous les jours et encore pour de nombreuses années je l'espère. Tu ne parles pas notre langage mais notre amour n'a pas besoin de mots.

Je ne peux clôturer ces remerciements sans penser à l'amour de ma vie, mon mari Vivien. Merci mon Loulou de me faire rire jour après jour, et d'être aussi présent pour essuyer mes larmes. Merci pour ton soutien, pour toutes ces fois où tu m'as écouté parler de mon projet sans forcément toujours tout comprendre. La thèse

n'a pas été de tout repos pour toi non plus mais tu as été près de moi chaque seconde ces 3 dernières années et, si j'en suis là aujourd'hui, c'est aussi grâce à toi. Merci de faire de moi la femme la plus heureuse au monde. Je t'aime.

J'espère n'avoir oublié personne.

Je dédie cette thèse à mon grand-père.

Papi,

Tu es parti il y a quelques mois maintenant...

Sache que tu resteras toujours près de moi, dans mon cœur et mon esprit.

J'ai de la chance d'avoir eu un grand-père tel que toi.

J'espère que là où tu es, tu es fier de moi aujourd'hui.

Ta petite fille qui t'aime et qui ne t'oubliera jamais.

« Le chercheur doit être libre de tenter des expériences audacieuses, de soutenir des théories révolutionnaires, voire paradoxales. Il doit disposer du droit à l'erreur »

Pierre Joliot Curie

Ce travail a fait l'objet de :

Articles en cours de publication

Audrey Voisin, Christelle Monville, Alexandra Plancheron, Anaïs Balbous, Afsaneh Gaillard, Nicolas Leveziel. hRPE cells derived from induced pluripotent stem cells better recapitulate oxidative stress responses than ARPE-19 cells. *Aging & Disease*, in submission (2017).

Audrey Voisin, Christelle Monville, Alexandra Plancheron, Anaïs Balbous, Afsaneh Gaillard, Nicolas Leveziel. Typical disease-phenotype of hiPSC-RPE derived from dry AMD patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, en attente.

Congrès

23 Juin 2017 : Poster intitulé « ARPE-19 : the best cell to model retinal disease *in vitro* ? » à la « Journée Scientifique » organisée par la Société Fédérative de la Recherche FED 4246 Neuroimagerie Fonctionnelle, Poitiers.

Prix du meilleur poster obtenu dans l'axe « Physiopathologie du développement et du vieillissement ».

17 au 19 Mai 2017 : Poster intitulé « ARPE-19 : the best cell to model retinal disease *in vitro* ? » au congrès international NeuroFrance 2017, Bordeaux.

06 au 11 Mai 2017 : Poster intitulé « ARPE-19 : the best cell to model retinal disease *in vitro* ? » au congrès international ARVO, Baltimore (USA).

Communication orale (Interview) au près de Macular News, service presse de la fondation américaine « Macular degeneration ».

25 et 26 Mai 2016 : Poster intitulé « Development of a cellular model of dry AMD » à la 2^{ème} Journées Thématiques organisée par la Société des Neurosciences et la Société Fédérative de la Recherche FED 4246 Neuroimagerie Fonctionnelle, Tours.

Vulgarisation scientifique

21 Mai 2016 et 24 Juin 2017 : Exposé grand public intitulé « Thérapie cellulaire : quelles maladies et à quelle échéance ? » par l'intermédiaire de l'association Retina France, Poitiers.

Mars 2015 : Exposé grand public par l'intermédiaire de la « Semaine du Cerveau » au Palais de la Découverte, Paris.

Table des Matières

<i>ABREVIATIONS</i>	21
<i>TABLE DES ILLUSTRATIONS</i>	24
<i>AVANT-PROPOS</i>	27
INTRODUCTION	31
CHAPITRE I – L’ŒIL : L’ORGANE DE LA VISION	31
I. ANATOMIE DE L’ŒIL	33
II.1 – LA TUNIQUE EXTERNE : UNE TUNIQUE CONJONCTIVE ET RESISTANTE	33
A. <i>La sclérotique ou sclère</i>	33
B. <i>La conjonctive</i>	34
C. <i>La cornée</i>	34
II.2 – LA TUNIQUE MOYENNE : UN TISSU PIGMENTE ET TRES VASCULARISE	35
A. <i>L’uvée</i>	35
B. <i>Le cristallin</i>	36
II.3 – LA TUNIQUE INTERNE, MEMBRANE NERVEUSE DU GLOBE OCULAIRE	36
A. <i>Organisation de la rétine</i>	36
B. <i>Les cellules de l’épithélium pigmentaire de la rétine, cellules centrales dans l’homéostasie de la rétine</i>	40
B.1 – Définition	40
B.2 – Rôles biologiques des cellules de l’EPR	41
C. <i>Le nerf optique</i>	45
II.4 – LES RESEAUX VASCULAIRES	46
A. <i>Vascularisation artérielle</i>	46
B. <i>Vascularisation veineuse</i>	48
II. EMBRYOLOGIE DE L’ŒIL	48
III.1 – MISE EN PLACE MORPHOLOGIQUE DE L’ŒIL	48
A. <i>Formation de l’œil</i>	49
B. <i>Formation des autres constituants oculaires</i>	51
C. <i>Formation des paupières et des glandes lacrymales</i>	52
III.2 – IMPLICATION GENETIQUE DANS L’EMBRYOGENESE OCULAIRE	52
III. PHOTOTRANSDUCTION DU SIGNAL VISUEL	55

CHAPITRE II- DU VIEILLISSEMENT PHYSIOLOGIQUE A LA MACULOPATHIE LIEE A L'AGE.....	57
I. LE VIEILLISSEMENT	59
I.1 – LE STRESS OXYDATIF	59
A. <i>Généralités.....</i>	59
B. <i>Implication du fer dans le stress oxydatif.....</i>	62
B.1 – Rôle physiologique	62
B.2 – Rôle dans le vieillissement et le développement pathologique	63
I.2 - LA GLYCATION DES PROTEINES.....	64
II. VIEILLISSEMENT DE LA RETINE.....	65
II.1 – VIEILLISSEMENT DE LA RETINE NEURALE.....	66
II.2 – VIEILLISSEMENT DES CELLULES DE L'EPITHELIUM PIGMENTAIRE RETINIEN	66
II.3 – VIEILLISSEMENT DE LA MEMBRANE DE BRUCH	68
III. MACULOPATHIE LIEE A L'AGE	71
III.1 – DEFINITION	71
III.2 – ASPECT CLINIQUE.....	71
III. 3 – EPIDEMIOLOGIE DE LA MLA	74
III.4 – EVOLUTION DE LA MALADIE.....	74
CHAPITRE III – LA DEGENERESCENCE MACULAIRE LIEE A L'AGE	77
I. DEFINITION.....	79
II. ASPECT CLINIQUE DE LA DMLA ATROPHIQUE	80
II.1 – PRESENTATION CLINIQUE	80
A. <i>Symptômes fonctionnels.....</i>	80
B. <i>Symptômes anatomiques.....</i>	83
II.2 – EPIDEMIOLOGIE	84
II.3 – FACTEURS DE RISQUE INDIVIDUELS, SYSTEMIQUES ET ENVIRONNEMENTAUX.....	85
A. <i>Facteurs de risque individuels</i>	85
A.1. L'âge.....	85
A.2. Le sexe	86
A.3. L'origine ethnique	87
B. <i>Facteurs de risque génétiques</i>	89
B.1. CFH, facteur de risque principal de la DMLA.....	89
B.2. Autres facteurs de risque génétiques.....	91
C. <i>Facteurs de risque environnementaux.....</i>	92
C.1. Le tabac.....	92
C.2. Régime alimentaire	93
C.3. Autres facteurs de risque environnementaux.....	94

III. SYNTHÈSE DES MÉCANISMES PATHOGENIQUES DE LA DMLA	94
IV. LES DIFFÉRENTES HYPOTHÈSES PHYSIOPATHOLOGIQUES DE LA DMLA	96
IV.1 – L’HYPOTHÈSE INFLAMMATOIRE	97
IV.2 – L’HYPOTHÈSE OXYDATIVE	98
IV.3 – L’HYPOTHÈSE DU REMODELAGE MATRICIEL	100
V. PRÉVENTION & TRAITEMENT DE LA DMLA	101
V.1 – LES COMPLÉMENTS ALIMENTAIRES	102
V.2 – RÉHABILITATION DE LA BASSE VISION	104
V.3 – TRAITEMENTS CHIRURGICAUX	105
V.4 – TRANSPLANTATION ET MÉDECINE RÉGÉNÉRATIVE	106
CHAPITRE IV – MODELISATION DE LA DMLA	109
I. LES MODÈLES ANIMAUX	111
II. LES MODÈLES CELLULAIRES	112
II.1 - LES CELLULES DE L’EPR	112
A. <i>Implication des cellules de l’EPR dans la DMLA</i>	112
B. <i>Obtention des cellules de l’EPR</i>	114
B.1 - Cellules de l’EPR d’origine native	114
B.2 - Cellules de l’EPR obtenues à partir de cellules souches	115
II.3 – LES CELLULES ARPE-19	117
III. LES CELLULES SOUCHES PLURIPOTENTES INDUITES	119
I.1 – DÉFINITIONS	119
I.2 – HISTORIQUE	120
I.3 – STRATÉGIES DE REPROGRAMMATION CELLULAIRE	121
A. <i>Le transfert cellulaire de cellule somatique ou SNCT</i>	121
B. <i>La fusion cellulaire</i>	122
C. <i>Génération de CSPi</i>	122
I.4 – CELLULES SOUCHES EMBRYONNAIRES <i>VERSUS</i> CELLULES SOUCHES PLURIPOTENTES INDUITES	123
I.5 – UTILISATION DES CELLULES SOUCHES PLURIPOTENTES INDUITES	126
A. <i>La modélisation et le criblage pharmaceutique</i>	126
B. <i>La médecine régénérative</i>	127
OBJECTIFS DE LA THÈSE	129
RESULTATS	135
ARTICLE I « HRPE CELLS DERIVED FROM INDUCED PLURIPOTENT STEM CELLS BETTER RECAPITULATE OXIDATIVE STRESS RESPONSES THAN ARPE-19 CELLS »	135

ARTICLE II. « TYPICAL DISEASE-PHENOTYPE OF HIPSC-RPE DERIVED FROM DRY AMD PATIENTS »	167
TRAVAUX EN COURS	203
I. ANALYSE DU METABOLISME MITOCHONDRIAL	205
I.1 – MATERIELS & METHODES	206
I.2 – RESULTATS & PERSPECTIVES	210
II. ETUDE DE LA PHYSIOLOGIE DES CELLULES ARPE-19 DANS DIFFERENTES CONDITIONS DE CULTURE EN MILIEU PRO-OXYDANT	217
II.1 – MATERIELS & METHODES	217
II.2 – RESULTATS & PERSPECTIVES	218
A. <i>Effet d'un stress oxydatif succinct et chronique sur la phagocytose des cellules ARPE-19</i>	218
B. <i>Impact de la culture prolongée sur la réponse au stress oxydatif</i>	221
DISCUSSION & PERSPECTIVES	227
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	241

Abréviations

A2E : N-retinylidene-N-retinylethanolamine	CSPi : cellule souche pluripotente induite
ABCA4 : ATP binding cassette subfamily A member 4	CoQ : coenzyme Q
ADN : acide déxosiribonucléique	DAPI : 4',6-diamidino-2-phénylindole
ADNmt : acide déxosiribonucléique mitochondrial	DAG : diacylglycérol
ADNg : acide déxosiribonucléique génomique	DCFH-DA : dichloro-dihydro-fluorescein diacetate
AMPc : adénosine monophosphate cyclique	DiOC ₂ (3) (3,3'-diethyloxacarbo-cyanine iodide
ApoE : apolipoprotéine E	Dkk1 : dickkopf-related protein 1
ARMS2 : age-related maculopathy susceptibility 2	DMEM : Dulbecco's Modified Eagle's medium
AREDS : age-related eye disease study	DMLA : dégénérescence maculaire lié à l'âge
ARN : acide ribonucléique	DO : densité optique
ARNm : acide ribonucléique messenger	EC : embryonal carcinoma cells
ATP : adénosine triphosphate	ECATs : ES cell-associated transcripts
BMP : bone morphogenetic protein	EFEMP1 : EGF containing fibulin like extracellular matrix protein 1
CCl2 : chemokine ligand 2	ELOVL4 : elongation of very long chain fatty acids protein 4
CCP : complement control protein	EPR : épithélium pigmenté rétinien
CCCP : carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone	EUREYE : european eye study
CFB : facteur B du complément	ERO : espèces réactives de l'oxygène
CFH : facteur H du complément	FADH : flavine adénine dinucléotide
CRALBP : cellular retinaldehyde-binding protein	FAK : kinase d'adhésion focale
CRP : protéine C réactive	Fe-NTA : FeCl ₃ -sodium nitrilotriacetate
CS-EPR : progéniteur des cellules de l'épithélium pigmentaire de la rétine neurale et adipo-mésenchymales	FGF1 : fibroblast growth factor 1
CSE : cellule souche embryonnaire	FGF2 : fibroblast growth factor 2
	FGF5 : fibroblast growth factor 5
	Gas 6 : growth arrest specific protein 6
	GDP : guanosine diphosphate

GMPc : guanosyle monophosphate cyclique
 GTP : guanosine triphosphate
 H : heavy
 H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène
 HLA : human leukocyte antigen
 HTRA1 : high-temperature requirement A serine peptidase 1
 IGF1 : insulin-like growth factor-1
 IL-1 : interleukine 1
 IL-6 : interleukine 6
 IL-8 : interleukine 8
 IMC : indice de masse corporelle
 InsP3 : inositol 1,4,5-triphosphate
 L : light
 LC3 : microtubule associated protein 1A/1B-light chain 3
 LX-PCR : long extension – polymerase chain reaction
 Kb : kilobases
 KeV : kiloelectron-volt
 Klf4 : kruppel-like factor 4
 MII : métharhodopsine II
 MAC : complexe d'attaque membranaire
 MESA : mutli-ethnic study of atherosclerosis
 MERTK : myeloid-epithelial-reproductive tyrosine kinase
 MITF : microphtalmia-asociated transcription factor
 MLA : maculopathie liée à l'âge
 MMPS : métalloprotéinases de la matrice
 MTT : sel de tétrazolium
 NADH : nicotinamide adénine dinucléotide
 NCBI : national center for biological information
 NO : monoxyde d'azote
 Nrf2 : nuclear factor erythroid 2-related factor
 O^{2•-} : anion superoxyde
 OCT : tomographie par cohérence optique
 Oct3/4 : octamer-binding transcription factor 4
 OMS : organisation mondiale de la santé
 ONOO⁻ : peroxydinitrite
 OH⁻ : radical hydroxyle
 OTX2 : orthodenticle homeobox 2
 PBMC : cellule mononuclée su sang périphérique
 PBS : tampon phosphate salin
 PEDF : pigment epthelium derived Factor
 PFA : paraformaldéhyde
 PKC : protéine kinase C
 PLC : phospholipase C
 PINL1 : PTEN-induced putative kinase 1
 PIP2 : phosphatidylinositol-4,5-biphosphate
 PTG : produits terminaux de la glycation
 RCS : royal college of surgeron
 RPE65 : retinal pigment epithelium-specific 65 kDa protein
 RT-qPCR : reverse transcription – réaction en chaine par polymérase quantitative
 SCARB1 : scavenger receptor class B member 1

SC-EPR : cellules souches de l'épithélium pigmenté de la rétine
SEP : segment externe des photorécepteurs
Shh : sonichedgehog
SNCT : somatic nuclear cellular transfert ou transfert cellulaire de cellule somatique
SSEA-3 : stage-specific embryonic antigen 3
SSEA-4 : stage-specific embryonic antigen 4
SVF : sérum de veau foetal
TGF β : transforming growth factor beta
V-ATPase : vacuolar-type H-ATPase
VEGF : vascular endothelial growth factor.
VSX2 : the paired-like homeodomain transcription facteur
ZO-1 : zonula occludens-1

Table des illustrations

FIGURES :

FIGURE 1 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE L'ANATOMIE DE L'ŒIL.....	33
FIGURE 2 : ILLUSTRATION DE LA VARIATION DE LA PUPILLE SUIVANT L'ECLAIRAGE	36
FIGURE 3 : ILLUSTRATION DES DIFFERENTES POPULATIONS CELLULAIRES DE LA RETINE. CORRELATION ENTRE UNE COLORATION DE LA RETINE HUMAIN A L'HEMATOXYLINE ET EOSINE (A) ET UN SCHEMA ANATOMIQUE (B).....	37
FIGURE 4 : CARACTERISATION DES DEUX TYPES DE PHOTORECEPTEURS, LES BATONNETS ET LES CONES.....	38
FIGURE 5 : COUPE HISTOLOGIQUE ILLUSTRANT DIFFERENTES POPULATIONS CELLULAIRES DE LA FOVEOLA.....	40
FIGURE 6 : ILLUSTRATION REPRESENTANT L'ORGANISATION MORPHOLOGIQUE D'UNE CELLULE DE L'EPR.....	41
FIGURE 7 : RESUME DES DIFFERENTES FONCTIONS ASSUREES PAR LES CELLULES DE L'EPR.	42
FIGURE 8 : MECANISME DE LA PHAGOCYTOSE DES SEP PAR LES CELLULES DE L'EPR.	44
FIGURE 9 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES VOIES VISUELLES CHEZ L'HOMME.....	46
FIGURE 10 : VASCULARISATION DE L'ŒIL.	46
FIGURE 11 : PRINCIPALES ETAPES DANS LE DEVELOPPEMENT OCULAIRE.	48
FIGURE 12 : RESUME DU PATTERN D'EXPRESSION GENETIQUE SPECIFIQUE RESPONSABLE DE LA FORMATION DE L'ŒIL.....	53
FIGURE 13 : MECANISME DE LA PHOTOTRANSDUCTION DU SIGNAL LUMINEUX AU NIVEAU DES BATONNETS VIA L'ACTIVATION DE LA RHODOPSINE PAR LA LUMIERE.....	55
FIGURE 14 : A) CHAINE RESPIRATOIRE MITOCHONDRIALE RESPONSABLE DE LA PRODUCTION D'ENERGIE SOUS FORME ATP. B) DIFFERENTES REACTIONS ABOUTISSANT A LA PRODUCTION D'ERO SUITE A LA PHOSPHORYLATION OXYDATIVE.	60
FIGURE 15 : SCHEMA REPRESENTANT LA REACTION DE FENTON RESPONSABLE DE LA PRODUCTION DE RADICAUX HYDROXYLES A PARTIR DU FER.....	63
FIGURE 16 : LES DIFFERENTES ETAPES DE LA REACTION DE GLYCATION.....	65
FIGURE 17 : OBSERVATION DES CHANGEMENTS MORPHOLOGIQUES DES CELLULES DE L'EPR ENTRE UN SUJET JEUNE (23 ANS, A, C, E) ET UN SUJET AGE (75 ET 88 ANS, B, D, F).....	67
FIGURE 18 : QUANTIFICATION ET COMPARAISON ENTRE DE LA CONDUCTIVITE HYDRIQUE DE LA MEMBRANE DE BRUCH ET L'ACCUMULATION DE LIPIDES AU COURS DU TEMPS.....	68
FIGURE 19 : LOCALISATION IMMUNOHISTOLOGIQUE DE L'ACCUMULATION DES PTG AU NIVEAU DE LA MEMBRANE DE BRUCH D'UN SUJET JEUNE (A) ET D'UN SUJET AGE (B).	70
FIGURE 20 : FOND DE L'ŒIL PERMETTANT L'OBSERVATION DE DRUSEN MILIAIRES (A) ET DE DRUSEN SEREUX (B).....	73
FIGURE 21 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES DIFFERENCES CHANGEMENTS DE LA PIGMENTATION DES CELLULES DE L'EPR....	73
FIGURE 22 : ECHELLE D'ACUITE VISUELLE DE LOIN DE TYPE DE SNELLEN.	81
FIGURE 23 : REPRESENTATION DE LA VISION LORS DE LA PRESENCE D'UN SCOTOME CENTRAL.	82
FIGURE 24 : GRILLE D'AMSLER.....	83
FIGURE 25 : A) FOND DE L'ŒIL NORMAL. B) FOND DE L'ŒIL D'UN INDIVIDU ATTEINT D'UNE DMLA ATROPHIQUE. OBSERVATION D'UNE ATROPHIE GEOGRAPHIE (GA).....	84
FIGURE 26 : PREVALENCE (%) DE LA DMLA PAR CLASSES D'AGE DANS TROIS ETUDES : L'ETUDE POLA, L'ETUDE EUREYE ET UNE META-ANALYSE D'ETUDE REALISEES DANS LES POPULATIONS CAUCASIENNES DES PAYS INDUSTRIALISEES.	86

FIGURE 27 : NOMBRE DE PERSONNES DANS LA POPULATION GLOBALE ATTEINTES DE MVSI OU DE CECITE SELON L'ORIGINE ETHIQUE ET L'AGE.....	88
FIGURE 28 : SYSTEME DU COMPLEMENT EN CONDITION NORMALE (A) OU LORS DE SA CASCADE D'ACTIVATION ABOUTISSANT A LA LYE CELLULAIRE (B).....	90
FIGURE 29 : SCHEMATISATION DES PRINCIPALES STRATEGIES UTILISEES POUR DIFFERENCIER DES CELLULES SOUCHES EN CELLULES DE L'EPR <i>IN VITRO</i>	116
FIGURE 30 : MORPHOLOGIE DES CELLULES DE L'EPR DERIVEES DE CELLULES CSPI ET PROVENANT D'UN BIOPSIE.....	116
FIGURE 31 : APPLICATION POSSIBLE DES HCSPi EN MEDECINE REGENERATIVE OU DANS LE DEVELOPPEMENT DE NOUVELLES MOLECULES THERAPEUTIQUES.....	126
FIGURE 32 : A) SCHEMA TRIDIMENSIONNEL D'UNE MITOCHONDRIE COUPE LONGITUDINALEMENT. B) MICROSCOPIE ELECTRONIQUE D'UNE MITOCHONDRIE.....	205
FIGURE 33 : LOCALISATION AU NIVEAU DU GENOME MITOCHONDRIAL (A) ET SEQUENCE (B) DES COUPLES D'AMORCES UTILISES POUR L'AMPLIFICATION DES QUATRE REGIONS DE L'ADN MITOCHONDRIAL.....	209
FIGURE 34 : ANALYSE DE LA MORPHOLOGIE DES MITOCHONDRIES PAR MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A TRANSMISSION AU NIVEAU DE CELLULES HCSPi-EPR CONTROLE (A-C) ET DMLA (B-D).....	211
FIGURE 35 : MISE EN EVIDENCE DES MITOCHONDRIES PAR LE COLORANT MITOTRACKER (ROUGE) AU NIVEAU DES CELLULES ARPE-19 EN CONDITION CONTROLES ET LORS D'UN TRAITEMENT A 10 mM DE FE-NTA PENDANT 24 HEURES.....	212
FIGURE 36 : ANALYSE DU POTENTIEL MEMBRANAIRE MITOCHONDRIAL PAR CYTOMETRIE EN FLUX (A) ET REPRESENTATION GRAPHIQUE (B) EN CONDITION CONTROLE OU LORS DE TRAITEMENT AU FE-NTA DE 24 HEURES AU NIVEAU DES CELLULES HCSPi-EPR CONTROLE ET DMLA.....	214
FIGURE 37 : A) RELATIVE AMPLIFICATION DE L'ADN MITOCHONDRIAL DES CELLULES HCSPi-EPR CONTROLE (N=2) ET DMLA (N=2) EN CONDITION BASALE. B) TAUX DE LESIONS PAR 10 KILOBASES (KB) DETECTEES AU NIVEAU DE L'ADN MITOCHONDRIAL DES CELLULES HCSPi-EPR CONTROLE (N=1) ET DMLA (N=1) LORS D'UN TRAITEMENT AU FE-NTA DE 15 mM PENDANT 24 HEURES.....	216
FIGURE 38 : HYPOTHESE DU DEVELOPPEMENT DE LA DMLA BASE SUR L'IMPLICATION DES DOMMAGES DE L'ADN MITOCHONDRIALE AU COURS DU VIEILLISSEMENT PATHOLOGIQUE ABOUTISSANT AU DYSFONCTIONNEMENT DES CELLULES DE L'EPR.....	217
FIGURE 39 : ANALYSE DE LA PHAGOCYTOSE ET DE LA VIABILITE CELLULAIRE DES CELLULES ARPE-19 LORS DE DIFFERENTS TRAITEMENTS AU FE-NTA PENDANT 24 HEURES (A) 48 HEURES (B) ET 72 HEURES (C).....	219
FIGURE 40 : VIABILITE CELLULAIRE (A) ET PHAGOCYTOSE (B) DES CELLULES ARPE-19 EN CONDITION CONTROLE OU LORS DE TRAITEMENT AU FE-NTA DE 24 HEURES.....	220
FIGURE 41 : HYPOTHESE SUR L'INTERACTION ENTRE LE STRESS OXYDATIF ET DE LA PHAGOCYTOSE ET SON ROLE DANS LE DEVELOPPEMENT DE LA DMLA.....	221
FIGURE 42 : MORPHOLOGIE DES CELLULES ARPE-19 PAR OBSERVATION EN CONTRASTE DE PHASE APRES 4 SEMAINES EN CULTURE PROLONGEE DANS DU MILIEU A 1% OU 10% DE SERUM. COMPARAISON AVEC LES RESULTATS OBTENUS APRES 4 SEMAINES DE CULTURE DES ARPE-19 PAR SAMUEL AND AL., 2017.....	223
FIGURE 43 : MORPHOLOGIE DES CELLULES ARPE-19 PAR OBSERVATION EN CONTRASTE DE PHASE APRES 4 SEMAINES EN CULTURE PROLONGEE DANS DU MILIEU A 1 OU 10% DE SERUM LORS DE DIFFERENTS TRAITEMENTS AU FE-NTA PENDANT 24 HEURES.....	223

FIGURE 44 : VIABILITE CELLULAIRE DES CELLULES ARPE-19 APRES 4 SEMAINES EN CULTURE PROLONGEE DANS DU MILIEU A 1 OU 10% DE SERUM, EN CONDITION CONTROLE OU LORS DE TRAITEMENT AU FE-NTA DE 24 HEURES.	224
FIGURE 45 : PRODUCTION DE ERO PAR LES CELLULES ARPE-19 APRES 4 SEMAINES EN CULTURE PROLONGEE DANS DU MILIEU A 1 OU 10% DE SERUM, EN CONDITION CONTROLE OU LORS DE TRAITEMENT AU FE-NTA DE 24 HEURES.....	225
FIGURE 46 : RECAPITULATIF DES DIFFERENTES HYPOTHESES EXPLIQUANT L'ETIOLOGIE DE LA DMLA.	239

TABLEAUX :

TABLEAU I : RECAPITULATIF DES CARACTERISTIQUES DES DIFFERENTS CLASSES DE DRUSEN RETROUVES DANS LA MLA ET AU COURS DU VIEILLISSEMENT NORMAL*.....	72
TABLEAU II : CLASSIFICATION DU RISQUE DE PROGRESSION VERS UN STADE TARDIF DE LA DMLA SUIVANTS LE STADE DE LA MALADIE ET LES SIGNES CLINIQUES.	76
TABLEAU III : RECAPITULATIF DES PRINCIPAUX FACTEURS DE RISQUES GENETIQUES POUR LA DMLA, LEUR ROLE, LEUR LOCALISATION CHROMOSOMIQUE, LES PRINCIPAUX POLYMORPHISME ASSOCIES ET LES ODDS RATIO POUR LES FORMES HOMOZYGOTE (HM) ET HETEROZYGOTE (HZ).	92
TABLEAU IV : PRINCIPAUX MARQUEURS PROTEIQUES ET GENIQUES UTILISEES DANS LA LITTERATURE POUR COMPARER LES CSE ET LES CSPi.....	125

Avant-propos

Ce travail a été réalisé dans le cadre d'une collaboration avec le laboratoire I-STEM (Institut des cellules souches pour le traitement et l'étude des maladies monogéniques, U-861) basé à Evry et dirigé par le Pr. Marc Peschanski. Ainsi, j'ai été accueillie durant ma première année de thèse dans l'équipe « rétinopathies » du Pr. Christelle Monville et ai été formée aux techniques de reprogrammation cellulaire, de culture des cellules souches et de différenciation en cellules de l'épithélium pigmenté rétinien (EPR).

J'ai intégré le laboratoire LNEC (Laboratoire de neurosciences expérimentales et cliniques, U-1084) à Poitiers en juillet 2015, au début de ma deuxième année de thèse. Grâce au soutien de la région Poitou-Charentes et du CHU de Poitiers, nous avons pu commencer les prélèvements sanguins au niveau de sujets sains et de patients atteints de la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) atrophique en décembre 2015. Ainsi, en juillet 2016, nous avons développé deux banques (contrôle et DMLA) de cellules de EPR dérivées de cellules souches pluripotentes induites.

Dans ce manuscrit, je commencerai par vous présenter l'organe au centre de notre travail et responsable de la vision : l'œil. Je focaliserai ensuite le second chapitre sur le vieillissement et les facteurs responsables de ce phénomène. La troisième partie de l'introduction sera dédiée à la DMLA et aux différentes hypothèses étiopathogéniques qui nous ont intéressées pendant ce travail. Enfin, je terminerai sur les modèles cellulaires et animaux aujourd'hui à notre disposition pour l'étude de cette maladie en laboratoire, sujet central de notre projet.

Durant ma thèse, nous nous sommes principalement intéressés à l'hypothèse oxydative pouvant expliquer l'étiologie de la DMLA. Ainsi, nous avons étudié l'effet d'une accumulation intracellulaire de fer, responsable de la production importante d'espèces réactives à l'oxygène (Yu et al., 2017), sur le métabolisme des cellules de l'EPR. Nous avons étudié l'impact de cet environnement pro-oxydant sur l'activité principale de ces cellules: la phagocytose des segments externes des photorécepteurs et leur recyclage. En effet, il a précédemment été mis en évidence une diminution de l'efficacité de la phagocytose induite par le vieillissement ou lors d'un stress oxydatif (Chen et al., 2009). Par ailleurs,

une altération de cette fonction semble être impliquée dans la formation des drusens et la dégénérescence des cellules de la rétine (cellules de l'EPR et photorécepteurs) (Kolar, 2013; Soubrane et al., 2007).

Lors de ces travaux, nous avons observé en condition basale ou lors d'un stress oxydatif, un phénotype fonctionnel des cellules de l'EPR dérivées de patients atteints de la DMLA atrophique, distinct de celui des cellules de l'EPR contrôles, en réponse à un stress oxydatif. Ces résultats vous seront présentés sous la forme d'un article intitulé « Typical disease-phenotype of hiPSC-RPE derived from dry AMD patients ».

Précédemment à ces résultats, nous avons mis en place les différents protocoles nécessaires à cette étude grâce à la lignée cellulaire ARPE-19, classiquement utilisée *in vitro* pour l'étude des maladies rétiniennes. Nous avons alors observé des différences intéressantes entre cette lignée cellulaire et les cellules de l'EPR dérivées de cellules souches pluripotentes induites. Ces résultats font l'objet d'un second article, qui vous sera également présenté, intitulé « hRPE cells derived from induced pluripotent stem cells better recapitulate oxidative stress responses than ARPE-19 cells ».

La dernière partie des résultats sera consacrée aux travaux en cours.

Ce manuscrit se terminera par une discussion générale ainsi que les perspectives d'avenir de ce travail. En parallèle de ce projet de thèse, une étude similaire est actuellement réalisée au laboratoire pour l'étude de la forme exsudative de la DMLA.

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Chapitre I – L'œil : l'organe de la vision

I. Anatomie de l'œil

L'être humain possède cinq sens qui vont lui permettre d'évaluer son environnement : le toucher, le goût, l'ouïe, l'odorat, et la vue. L'œil, organe de la vision, va permettre de capter la lumière et de différencier les formes et les couleurs.

L'œil humain est composé d'un globe oculaire mesurant en moyenne 2,5 cm de diamètre et ayant un poids de 8 grammes. Cet organe, ainsi que ces appendices, sont placés au sein d'une cavité crânienne osseuse appelée « orbite » qui les protège, avec les paupières, de l'environnement externe. Le mouvement de l'œil est permis par l'action des six muscles oculo-moteurs (quatre muscles droits et deux muscles obliques).

L'œil est constitué de trois tuniques : la tunique externe (sclère, conjonctive et cornée), la tunique moyenne (choroïde, iris et cristallin) et la tunique interne (rétine et nerf optique) (Figure 1).

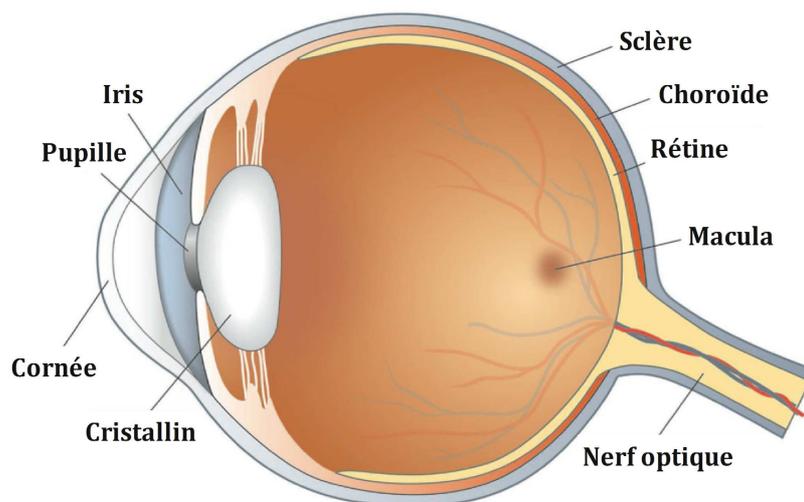


Figure 1 : Représentation schématique de l'anatomie de l'œil.
Adaptée d'après Frost, 2014.

II.1 - La tunique externe : une tunique conjonctive et résistante

A. La sclérotique ou sclère

La sclérotique est une membrane fibreuse, résistante, opaque et blanchâtre qui va former le « blanc de l'œil ». Elle a une épaisseur variant de 0,3 à 2 mm (Renard, 2009)

suivant la région oculaire (Renard, 2009). Elle permet de contenir la pression oculaire, de protéger l'œil de possibles dégâts mécaniques et lui confère sa forme et sa rigidité. Elle fait partie des membranes oculaires les plus solides et les plus résistantes.

Elle est constituée d'un tissu conjonctif dense formé de bandes fibreuses s'entrecroisant dans toutes les directions mais restant parallèles à la surface. La sclérotique est peu vascularisée et est nourrie par imbibition des couches avoisinantes.

Au niveau antérieur, la sclérotique va s'unir avec la conjonctive et la cornée. La jonction entre la sclère et la cornée est appelée le limbe, région particulièrement innervée et vascularisée.

Au niveau postérieur, cette membrane est reliée au nerf optique.

B. La conjonctive

La conjonctive est une fine membrane transparente de type muqueuse qui recouvre la face profonde des paupières et la face intérieure du globe oculaire. Elle est composée d'un épithélium de différentes cellules, dont les cellules caliciformes, et d'un chorion.

Les cellules caliciformes vont sécréter le mucus responsable de la lubrification de l'œil et de la production d'une partie du liquide lacrymal. La conjonctive possède quatre glandes responsables de la lubrification : la glande de Henle, de Wolfring, de Krause et de Manz.

C. La cornée

La cornée, membrane transparente réfractive au centre de la partie antérieure du globe oculaire, va transmettre la lumière à la rétine. Elle est majoritairement constituée de collagène et d'eau et s'organise en cinq couches cellulaires (de la superficie à la profondeur) : l'épithélium, la membrane de Bowman, le stroma cornéen, la membrane de Descemet et l'endothélium. La cornée, avasculaire, est directement en contact avec l'humeur aqueuse, liquide responsable du maintien de la pression oculaire.

II.2 - La tunique moyenne : un tissu pigmenté et très vascularisé

A. L'uvée

L'uvée est une zone constituée de la choroïde, de l'iris et du corps ciliaire.

- **La choroïde :** c'est une membrane vascularisée constituée de quatre couches : la couche de Haller, de Sattler, la choriocapillaire et la membrane de Bruch. Elle a deux rôles, elle permet l'apport de nutriments et d'oxygène à la rétine et sert d'écran à la lumière maintenant l'intérieur de l'œil en chambre noire.

La membrane de Bruch est une couche tissulaire, de 2 à 4 μm d'épaisseur, située entre les cellules de l'épithélium pigmenté rétinien (EPR) et la choriocapillaire (Curcio et al., 2001). Elle est constituée de cinq couches : la lame basale des cellules de l'EPR, la couche interne de collagène, la couche moyenne élastique, la couche de collagène externe et la lame basale des cellules endothéliales de la choroïde (Bonilha, 2008). Elle forme une barrière de filtration semi-perméable où passent les nutriments provenant de la choriocapillaire vers les photorécepteurs ainsi que les produits de dégradation issus du métabolisme des photorécepteurs et des cellules de l'EPR dans le sens opposé. Elle est donc fortement impliquée dans l'homéostasie de la rétine.

- **L'iris :** c'est la partie pigmentée visible de l'œil. Elle se situe dans l'humeur aqueuse, entre la cornée et le cristallin. De par sa capacité contractile, ce tissu va permettre de diminuer ou d'augmenter la quantité de lumière transmise par la partie centrale de la rétine. L'orifice, situé au centre de l'iris, est appelé pupille. Cette variation physiologique va être induite par la contraction ou la dilation de deux muscles : le sphincter irien (sous contrôle du système parasympathique) et le dilatateur (sous contrôle du système sympathique). Ainsi, une forte luminosité va provoquer une contraction du muscle sphincter et donc de l'iris (phénomène appelé myosis) ; inversement, une faible lumière permettra la dilation du muscle sphincter et une contraction du muscle dilatateur, on parle alors de mydriase (Figure 2).

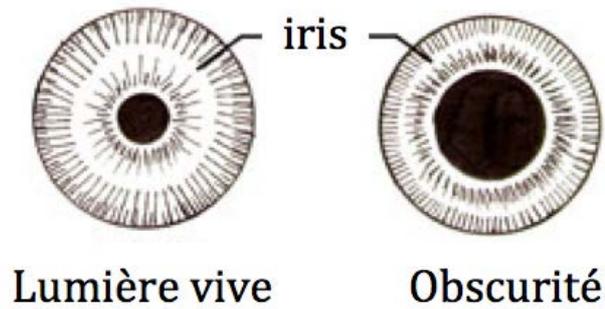


Figure 2 : Illustration de la variation de la pupille suivant l'éclairage
<http://www.futura-sciences.com/medecine-oeil-vision-dela-vision/>

- **Le corps ciliaire** : c'est la partie antérieure de la choroïde sur laquelle est attaché le cristallin par le biais de fibres zonulaires. On y retrouve les procès ciliaires qui vont sécréter l'humeur aqueuse.

B. Le cristallin

Le cristallin est une lentille biconvexe située derrière l'iris. Avec la cornée, il va permettre de focaliser l'image sur la rétine. Le cristallin est relié au muscle ciliaire par le zonule de Zinn ce qui lui confère la particularité de pouvoir modifier sa courbure et donc sa vergence, et permettre ainsi le phénomène d'accommodation. Ceci permet d'obtenir une image nette même si l'objet est proche de la rétine.

II.3 - La tunique interne, membrane nerveuse du globe oculaire

A. Organisation de la rétine

La rétine est l'organe sensible de la vision. D'une épaisseur de 0,5 mm (Kolb et al., 1995), elle recouvre 75% de la face interne du globe oculaire. Elle est composée de 10 couches cellulaires (Figure 3).

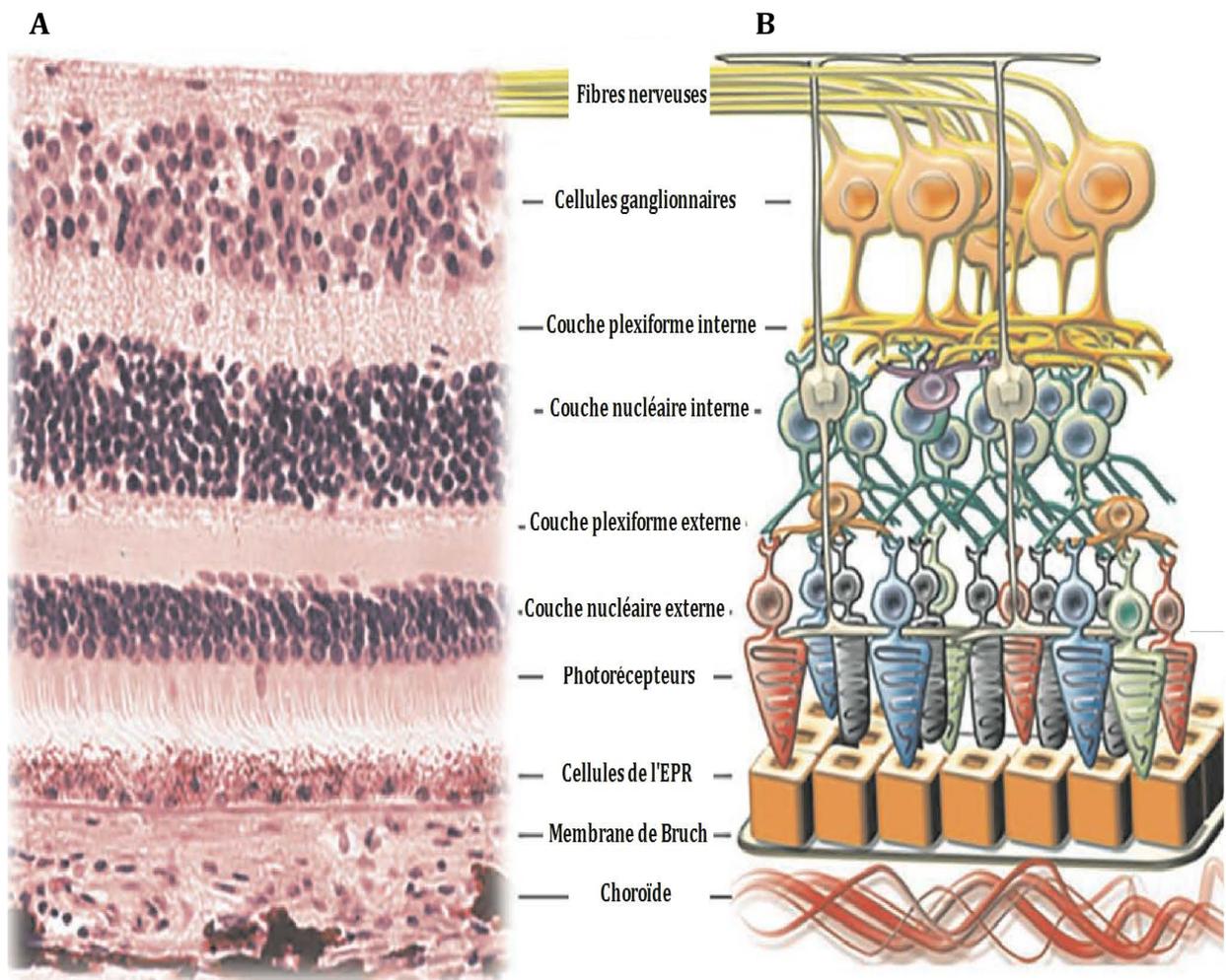


Figure 3 : Illustration des différentes populations cellulaires de la rétine. Corrélation entre une coloration de la rétine humaine à l'hématoxyline et éosine (A) et un schéma anatomique (B).

Adaptée d'après Galetta, 2015.

EPR : Epithélium pigmenté de la rétine

On trouve de la couche de la plus externe à la couche la plus interne :

- ***L'épithélium pigmentée de la rétine*** : caractérisé par des cellules polarisées et pigmentées formant une monocouche dont les digitations englobent les segments externes de photorécepteurs (SEP). L'implication de ces cellules dans l'homéostasie de la rétine sera décrite dans la partie B de cette section.

- ***La couche des photorécepteurs*** : on retrouve les cônes et les bâtonnets. À la base de la vision, la rétine est constituée d'environ 6,4 millions de cônes, permettant la vision des couleurs, et de 110 millions de bâtonnets, vision crépusculaire et nocturne en noir et blanc (Salesse, 2017). Ils captent la lumière sous forme de photons grâce à des

pigments visuels qui la transforment en signal électrique: c'est la phototransduction du signal lumineux (Parmeggiani et al., 2012; Pepe et al., 1989; Salesse, 2017).

Les bâtonnets et les cônes sont composés de quatre parties incluant un segment interne, un segment externe, un corps cellulaire et une terminaison synaptique (Figure 4). C'est la forme des SEP qui permet de différencier les deux types de photorécepteurs : pour les bâtonnets il est long, cylindrique avec de nombreux disques alors que le segment externe des cônes est plus court (Salesse, 2017).

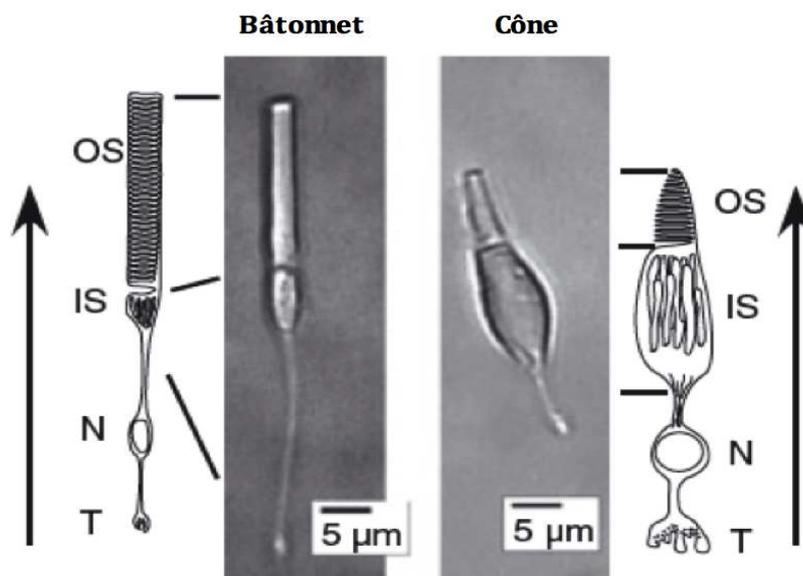


Figure 4 : Caractérisation des deux types de photorécepteurs, les bâtonnets et les cônes.

OS : Segment externe, IS : Segment interne N : noyau, T : terminaison synaptique.

Adaptée d'après Tachibanaki, 2006.

Les pigments visuels diffèrent selon le type de photorécepteurs. Ils sont localisés dans la membrane des disques des SEP. La rhodopsine est le pigment visuel spécifique des bâtonnets, les cônes en possèdent 3 différents : le pigment bleu, vert et rouge. On retrouve environ 25000 molécules de rhodopsine par disque de SEP, soit plus de $10,4 \times 10^7$ par bâtonnet (Salesse, 2017). Cette quantité de pigment va permettre l'absorption importante de lumière nécessaire à la transmission de l'information visuelle. Tous les pigments visuels sont constitués d'une partie sensible à la lumière : le 11-*cis* rétinol (Salesse, 2017).

Les bâtonnets sont spécifiques de la vision scotopique, contrairement aux cônes qui nous permettent la vision photopique. Ceci s'explique par une différence d'efficacité du mécanisme de phototransduction. Les bâtonnets sont 10^2 à 10^3 plus sensibles que les

cônes (Tachibanaki et al., 2006). De plus, les cônes retournent à leur état basal 10 fois plus rapidement que les bâtonnets, permettant une adaptation optimale à différents niveaux de luminosité. Les cônes ne saturent pas lors de fortes périodes d'illumination, contrairement aux bâtonnets (Salesse, 2017).

- **La membrane limitante externe** : zone d'adhérence entre les segments internes des photorécepteurs et les cellules de Müller. Ces cellules gliales ou astrocytes facilitent le transport des métabolites aux neurones rétiniens et participent au maintien de l'homéostasie rétinienne.

- **La couche nucléaire externe** : elle est constituée par les expansions internes des cellules photoréceptrices et par des corps cellulaires des cellules de Müller.

- **La couche plexiforme externe** : zone de contact synaptique entre les photorécepteurs et les cellules bipolaires (premier neurone impliqué dans la transmission du signal).

- **La couche nucléaire interne** : elle contient les corps cellulaires de 4 types de cellules : les cellules bipolaires, les cellules horizontales, les cellules amacrines et les cellules de Müller. Les cellules horizontales et amacrines sont des cellules d'association : elles vont permettre par leur axone et leurs dendrites la formation d'un réseau.

- **La couche plexiforme interne** : zone de jonction entre les interneurones et les cellules ganglionnaires.

- **La couche des cellules ganglionnaires** : les cellules ganglionnaires sont les cellules de transmission de l'information visuelle. Leurs corps cellulaires sont retrouvés dans la couche plexiforme interne et leurs longs axones vont former les fibres optiques.

- **La couche des fibres optiques** : les fibres optiques vont ensuite converger vers la papille et former ainsi le nerf optique.

- **La membrane liitante interne** : membrane interne constituée en partie par les pieds des cellules de Müller, en contact avec le vitré et remplissant la cavité vitrénne.

La macula est la région centrale de la rétine, correspondant à 4% de sa surface (Gehrs et al., 2006). Elle est responsable de la vision des détails et de la résolution de l'image observée (Kolb et al., 1995). Elle se situe du côté temporal sous la forme d'une ellipse de 3 x 2 mm² dépourvue en son centre de vaisseaux sanguins. Cette région de la macula forme une dépression appelée fovéa où sont concentrés les cônes et où les bâtonnets sont quasiment absents (Salesse, 2017). La fovéa est la zone d'acuité maximale (Gehrs et al., 2006; Hendrickson and Yuodelis, 1984). Sa partie centrale, la zone la plus fine de la rétine avec une épaisseur de 300 µm (Salesse, 2017), est nommée fovéola (Figure 5). Dans cette zone avasculaire, les SEP (essentiellement des cônes) sont directement exposés à la lumière permettant une détection hautement sensible du signal lumineux (Nivison-Smith et al., 2014).

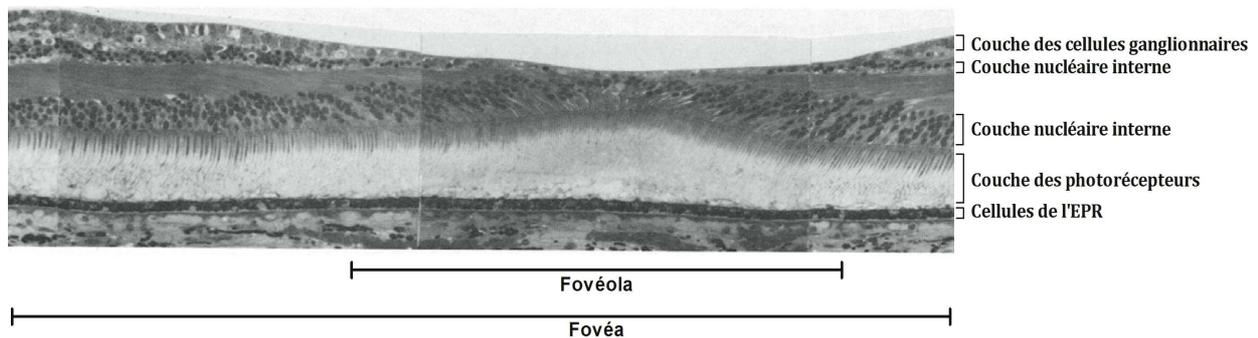


Figure 5 : Coupe histologique illustrant différentes populations cellulaires de la fovéola.
Adaptée d'après Hendrickson, 1984

B. Les cellules de l'épithélium pigmentaire de la rétine, cellules centrales dans l'homéostasie de la rétine

B.1 – Définition

L'épithélium pigmentaire est la couche cellulaire la plus externe de la rétine. Elle est caractérisée par une organisation en monocouche de cellules hexagonales unies entre elles par des jonctions serrées (Figure 6).

Les cellules de l'EPR sont des cellules pigmentées et hautement polarisées. Du côté apical, elles possèdent des microvilli qui interagissent avec les SEP des cônes et bâtonnets

(Bonilha, 2008). On estime que, dans la macula, une cellule de l'EPR est en contact avec 20 à 55 photorécepteurs (Nazari et al., 2015). En microscopie électronique, il est possible d'observer dans cette région la présence de pigments de mélanine, responsable de leur pigmentation.

Le noyau des cellules de l'EPR se situe au pôle basal (Garcia et al., 2015). Dans cette zone, les cellules de l'EPR sont séparées de la choroïde par la membrane de Bruch. C'est au niveau basal que s'effectuent les échanges métaboliques avec la choriocapillaire (Bonilha, 2008).

Au niveau protéique, les cellules de l'EPR sont caractérisées par l'expression de différents marqueurs tels que RPE65 (retinal pigment epithelium-specific 65 kDa), une enzyme du cycle visuelle ; ZO-1 (zonula occludens 1), une protéine des jonctions serrées ; la Bestrophine-1 ayant un rôle dans la régulation du calcium et du chlore et Pax6, un facteur de transcription participant au développement oculaire (Lu et al., 2009 ; Buchholz et al., 2009 ; Reichman et al., 2014).

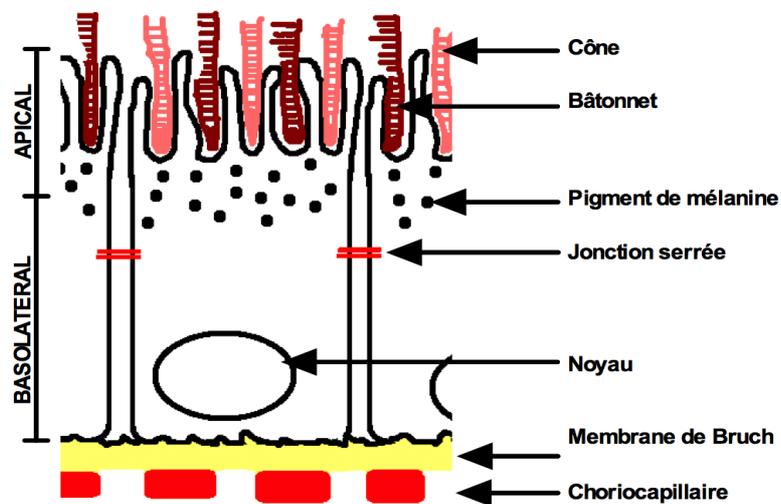


Figure 6 : Illustration représentant l'organisation morphologique d'une cellule de l'EPR

B.2 – Rôles biologiques des cellules de l'EPR

Les cellules de l'EPR sont essentielles au maintien de l'homéostasie cellulaire dans la rétine (Golestaneh et al., 2017). Outre leurs rôles dans le cycle visuel, elles participent fortement à la fonction des photorécepteurs (Figure 7).

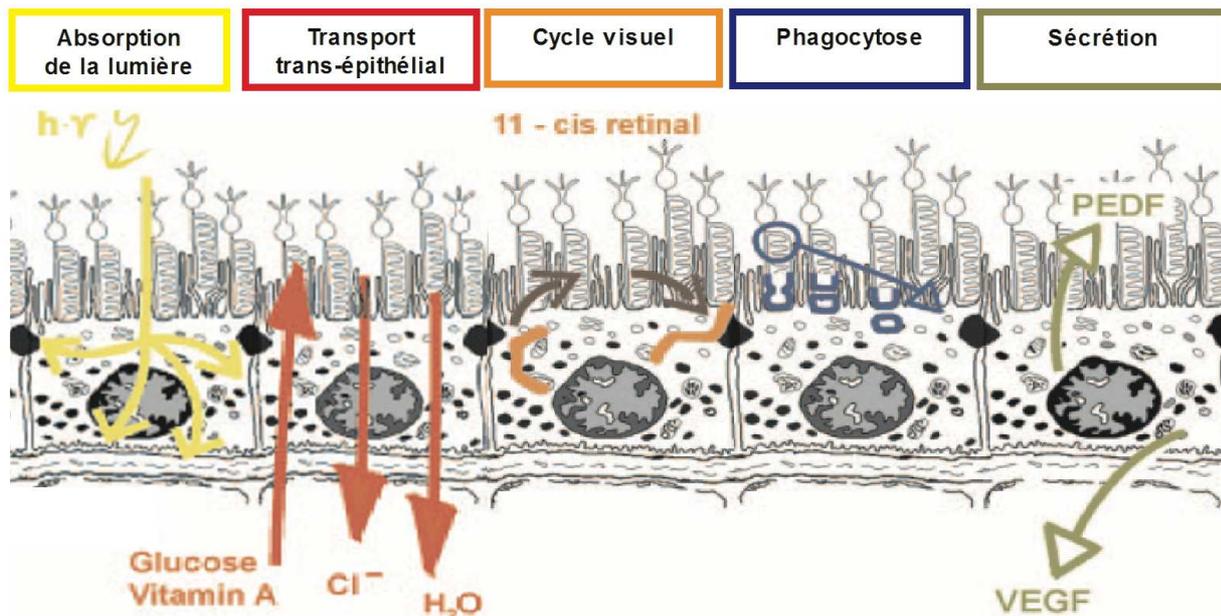


Figure 7 : Résumé des différentes fonctions assurées par les cellules de l'EPR.

h-γ : photons ; *PEDF* : pigment-epithelium derived fator ; *VEGF* : vascular endothelial growth factor ; *Cl⁻* : Chlore ; *H₂O* : eau.
Adaptée d'après Strauss, 2005.

- **Absorption de la lumière** : les cellules de l'EPR servent d'écran plus ou moins opaque selon le degré de leur pigmentation et la région rétinienne. En effet, les cellules de l'EPR absorbent environ 60% des photons non captés par les pigments visuels grâce à la mélanine (Strauss, 2005). Ce phénomène permet d'augmenter l'acuité visuelle et de diminuer le stress oxydatif induit par la luminosité (Raviv et al., 2014).

- **Transport trans-épithélial** : de par leur organisation en épithélium serré, les cellules de l'EPR forment une barrière de filtration semi-perméable entre les photorécepteurs et la choriocapillaire. Ainsi aucun passage de liquide ou de molécule soluble n'est possible entre les jonctions serrées de ces cellules, ce qui permet une séparation totale entre ces deux environnements distincts : la rétine et le système vasculaire (Nazari et al., 2015). Ce système est similaire à celui de la barrière hémato-encéphalique (Ballabh et al., 2004).

Le caractère polarisé des cellules de l'EPR est essentiel pour le transport des nutriments et des déchets. Ces transports, actifs et passifs, sont essentiels au métabolisme de la rétine qui dépend des apports de la choriocapillaire pour la partie externe, et des apports des

vaisseaux rétiniens pour la partie interne. Ainsi les nutriments et l'oxygène sont délivrés de la choriocapillaire aux photorécepteurs via les cellules de l'EPR ; l'efflux des déchets métaboliques et l'excès d'eau se fait par la partie basale de ces cellules vers le système vasculaire (Kay et al., 2013). Les cellules de l'EPR ont donc un rôle primordial dans le maintien de l'osmolarité : les photorécepteurs ont le métabolisme oxydatif le plus important de toutes les cellules chez les mammifères ce qui induit une production importante de déchets et d'eau (Bui et al., 2003).

- **Le cycle visuel** : les cellules de l'EPR vont permettre le recyclage et le transport de la vitamine A, élément essentiel au cycle visuel. Dans les photorécepteurs, la lumière va induire l'isomérisation et la réduction du 11-*cis* retinal en *tout-trans* retinal. Cette forme de la vitamine A est alors transférée dans les cellules de l'EPR et régénérée en 11-*cis* retinal actif qui retourne ensuite dans les photorécepteurs (Zhao et al., 2016).

- **Phagocytose et recyclage des SEP** : les cellules de l'EPR sont aussi responsables de la régénération des SEP, partie réceptrice du photorécepteur. Selon un cycle circadien (les bâtonnets au levée du jour et les cônes à la tombée la nuit), les disques les plus distaux sont, au fur et à mesure de l'exposition à la lumière, phagocytés par les cellules de l'EPR pour être recyclés (Bosch et al., 1993). On estime que chaque cellule de l'EPR phagocyte 2000 disques par jour. Suite à l'internalisation des SEP par phagocytose, ces éléments sont dégradés par les lysosomes (Kurz et al., 2007). Ainsi les SEP sont constamment et entièrement renouvelés en 7 à 10 jours (Bobu and Hicks, 2009).

Au niveau des SEP se trouve un domaine, dit « eat me », spécifiquement localisé dans leur partie distale (Mazzoni et al., 2014). Ainsi, la première phase de la phagocytose est la reconnaissance de ce domaine du SEP au niveau de la membrane apicale des cellules de l'EPR via les récepteurs tyrosine kinase *c-mer* (MerTK) et $\alpha_v\beta_5$ -intégrin (Finnemann, 2003). Ces deux récepteurs interagissent ensemble par l'intermédiaire d'une kinase d'adhésion focale (FAK). Ainsi, lors de la fixation du SEP sur l' $\alpha_v\beta_5$ -intégrin, le récepteur MerTK va être phosphorylé par FAK (Finnemann, 2003; Strauss, 2005) et initier la phagocytose. Il a été montré que le partenaire spécifique de MerTK est la protéine Gas 6 (growth arrest specific protein 6) mais l'implication de Gas 6 dans le mécanisme de la phagocytose n'est pas encore clairement établie. En effet, le modèle murin *Gas 6*^{-/-} ne

montre pas de dysfonctionnement de la phagocytose des SEP (Kevany and Palczewski, 2010).

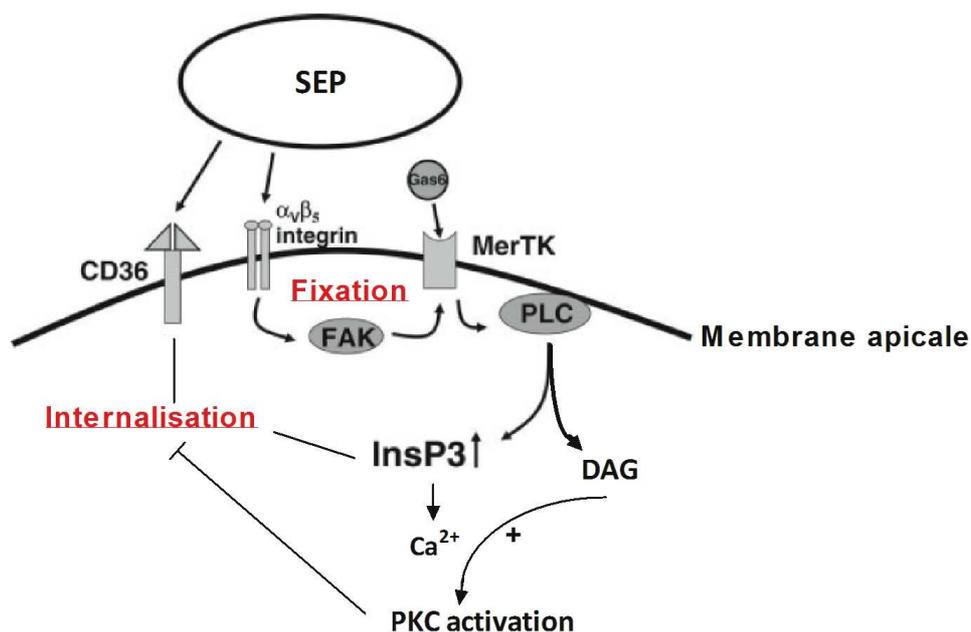


Figure 8 : Mécanisme de la phagocytose des SEP par les cellules de l'EPR.

SEP : Segments externes des photorécepteurs ; Gas 6 : growth arrest specific protein 6 ; MerTK : récepteur tyrosine kinase c-mer ; FAK : kinase d'adhésion focale ; PLC : phospholipase C ; InsP3 : inositol 1,4,5-triphosphate ; DAG : diacylglycérol ; PKC : protéine kinase C.

Modifiée d'après Strauss, 2005.

L'initiation de la phagocytose va induire une augmentation intracellulaire de inositol 1,4,5-triphosphate (InsP3) suite à l'hydrolyse de phosphatidylinositol-4,5-biphosphate (PIP2) par la phospholipase C (PLC). A partir de l'hydrolyse du PIP2 sera produit aussi du diacylglycérol (DAG) (Hall et al., 1991). C'est l'augmentation de l'InsP3 qui va induire l'internalisation du SEP via la formation d'un phagosome (Figure 8). Ce processus est régulé par le CD36 (Strauss, 2005).

L'InsP3 va augmenter la concentration intracellulaire de Ca^{2+} (Strauss, 2005) et le DAG, en association avec le Ca^{2+} , va activer la protéine kinase C (PKC) (Hall et al., 1991). L'association des deux processus, augmentation du Ca^{2+} intracellulaire et activation de la PKC, va réguler le processus de phagocytose par inhibition de l'internalisation (Strauss, 2005).

Une fois internalisé, le phagosome va subir un processus de maturation correspondant à une succession de fusion, d'abord avec des endosomes précoces, puis

tardifs et enfin avec des lysosomes (Kevany and Palczewski, 2010). La dernière structure formée est appelée un phagolysosome et va être digérée par le système lysosomal (Bosch et al., 1993). Ce système, hautement actif, est capable de dégrader des centaines de SEP par jour (Bonilha, 2008).

La cathepsine D, protéase aspartique principale du système lysosomal, est responsable de la dégradation de l'opsine en condition acide. L'opsine représente environ 85% des protéines présentes dans les SEP (Nguyen-Legros and Hicks, 2000). L'acidification de l'environnement est effectué par une pompe à proton, la V-ATPase (Vacuolar-type H-ATPase), présente au niveau de la membrane des lysosomes (Valapala et al., 2014).

- **Sécrétion de facteurs** : le deuxième rôle de la polarisation des cellules de l'EPR est la sécrétion de facteurs. En effet, elles sont responsables de la sécrétion de facteurs de croissance comme le PEDF (pigment epithelium derived factor, facteur neurotrophique et inhibiteur de l'angiogenèse), mais aussi des protéines de structure telle que l'hyaluronan (composant de la matrice extracellulaire). Cette fonction est essentielle au maintien du micro-environnement (Kay et al., 2013).

De plus, les cellules de l'EPR sont les cellules du système immunitaire de la rétine. En effet, l'œil possède un micro-environnement immunosuppresseur (Reinisalo et al., 2015 ; Sugita et al., 2016) dans lequel les cytokines telles que IL-1, IL-6 et IL-8 sont sécrétées par l'épithélium pigmentaire. Les cellules de l'EPR sont aussi à l'origine de la sécrétion de la protéine facteur H (CFH), un inhibiteur de la voie alterne du système du complément, une des voies de l'immunité innée (Parmeggiani et al., 2012).

C. Le nerf optique

Le nerf optique est le deuxième nerf crânien. Il mesure approximativement 40 mm de long pour un diamètre de 4 mm (Renard, 2009). Il est constitué d'environ 1,2 millions d'axones provenant des cellules ganglionnaires et se continue dans le chiasma optique (zone du cerveau où se croisent le contingent nasal des fibres optiques provenant de chaque œil). Ainsi une partie des informations provenant de l'œil gauche seront traitées par l'hémisphère cérébral droit et inversement. Les axones, appelés bandelettes optiques, rejoignent ensuite le corps genouillé latéral via le tractus optique (Figure 9). L'information

est acheminée par les radiations optiques jusqu'au niveau du cortex visuel primaire où elle est traitée et « vue ». L'image sera mémorisée dans les lobes occipitaux.

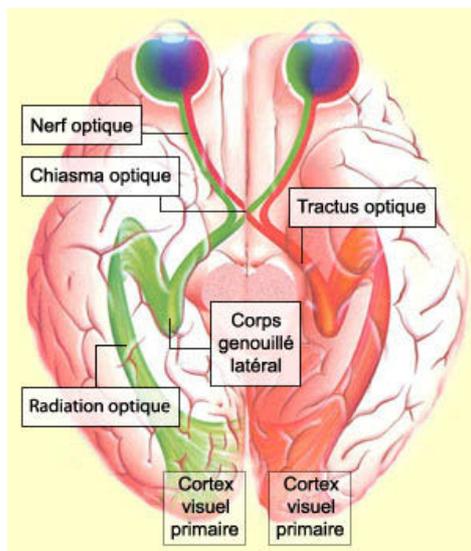


Figure 9 : Représentation schématique des voies visuelles chez l'Homme.

<http://tp-svt.pagesperso-orange.fr/vision.htm>

II.4 – Les réseaux vasculaires

La cavité orbitaire présente une vascularisation assez simple dont l'axe principal est l'artère ophtalmique. Il est divisé en deux systèmes : le système artériel et le système veineux (Figure 10).

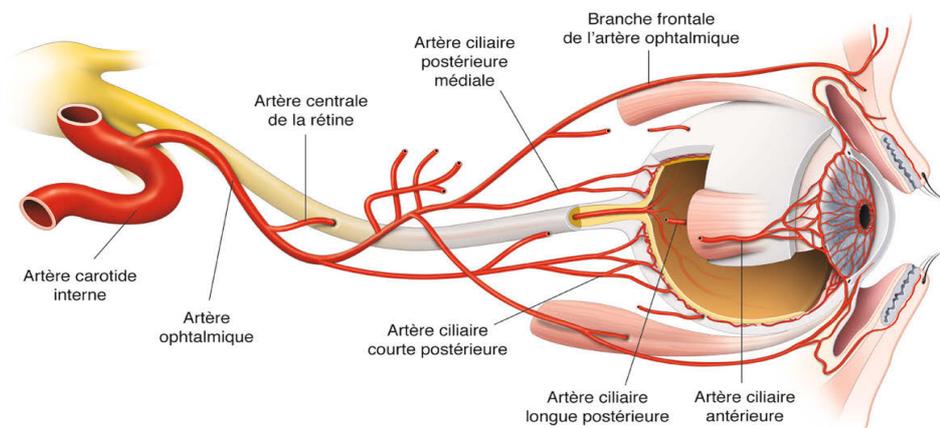


Figure 10 : Vascularisation de l'œil.

D'après Renard et Sellem, 2014.

A. Vascularisation artérielle

L'axe principal est l'artère ophtalmique, branche de la carotide interne (Renard and Sellem, 2014). Elle assure la vascularisation du globe oculaire et de ses annexes, c'est-à-dire tout le contenu orbitaire à l'exception d'une faible partie irriguée par des artères voisines : l'artère sous-orbitaire et l'artère faciale. L'artère ophtalmique pénètre dans l'orbite en compagnie du nerf optique en traversant la bandelette supéro-médiale du tendon de Zinn. Elle se dirige ensuite vers le fond de la partie interne du globe en croisant le nerf optique, généralement, par le dessus. Elle se termine dans les paupières, le front et le nez.

Elle va donner plusieurs branches :

- **L'artère angulaire** : cette artère mesure de $\frac{1}{2}$ à $\frac{3}{4}$ de mm de diamètre. Elle est oblique en bas et progresse sur la racine du nez (Renard, 2009). Elle se termine en anastomose avec l'artère faciale au niveau du bord inférieur de l'orbite. L'artère angulaire est aussi à l'origine de nombreuses collatérales innervant le sac lacrymal, l'orbiculaire et la peau, les téguments du front et enfin l'arcade pré-nasale.

- **Les branches frontales** : dont principalement l'artère frontale. Elle s'anastomose au niveau du nez avec les branches de l'artère nasale et palpébrale ; et se divise ensuite en deux branches : une superficielle qui se rend au tégument de la racine du nez, et une plus profonde qui remonte au niveau frontal.

- **Les artères à destinée optique** : on y retrouve l'artère centrale et les artères ciliaires. L'artère centrale au départ de la pupille se sépare en deux branches (supérieure et inférieure) puis en quatre artères rétiniennes d'un diamètre de 125 μm , deux temporales et deux nasales (Renard and Sellem, 2014). Les artères ciliaires vont vasculariser l'œil, via la choroïde, la sclère, l'uvée et la tête du nerf optique.

- **Les artères à destinée annexielle** : ces artères vont permettre la vascularisation des annexes de l'œil comme les glandes lacrymales (artères lacrymales), les fosses nasales (artères ethmoïdales), les muscles oculaires et ceux des paupières (artères musculaires et palpébrales) ainsi que la région supra-orbitaire (artère supra-orbitaire).

B. Vascularisation veineuse

La rétine, de par son activité hautement métabolique, est la région oculaire la plus vascularisée. Il existe deux réseaux veineux : le réseau capillaire rétinien et le réseau choroïdien.

- **Le réseau capillaire rétinien** : il correspond à un réseau de capillaires rétiniens issus de l'artère centrale de la rétine. Il est caractérisé par une disposition en un réseau profond et superficiel de capillaires interconnectés entre les deux réseaux, et non fenêtrés. Ils irriguent les couches superficielles du globe oculaire (cellules bipolaires, fibres optiques et cellules ganglionnaires).

- **Le réseau choroïdien** : il naît des artères ciliaires et vascularise la couche externe de la rétine dont les photorécepteurs et les cellules de l'EPR via la choroïde.

II. Embryologie de l'œil

III.1 – Mise en place morphologique de l'œil

Le développement des yeux va débuter, au moment de la gastrulation, par la différenciation d'une région du tube neural qui va s'invaginer pour donner les vésicules optiques (Renard, 2009) (Figure 11). Dans cette section seront brièvement expliquées les principales étapes du développement oculaire.

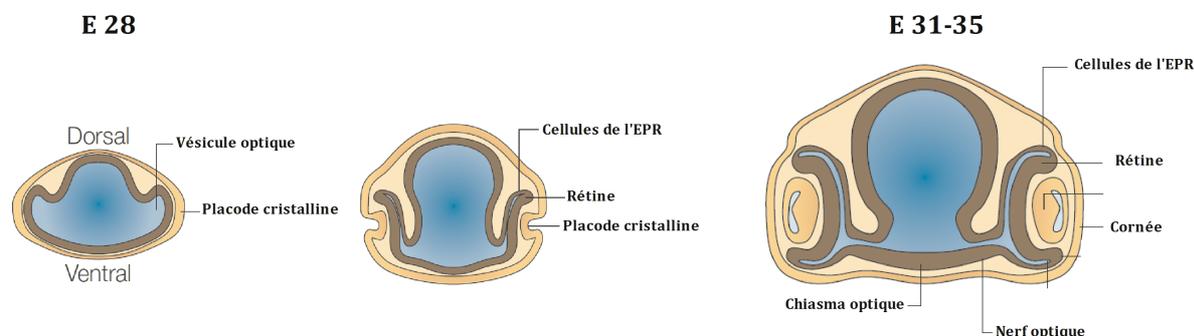


Figure 11 : Principales étapes dans le développement oculaire.

E : jour embryonnaire

Adaptée d'après Graw, 2003.

A. Formation de l'œil

- **Ébauche optique** : le développement oculaire débute aux alentours du 22^{ème} jour de l'embryogénèse (Renard, 2009). À ce moment apparaissent deux dépressions au niveau antérieur de la gouttière neurale : les fossettes optiques. Au 24^{ème} jour, suite à la neurulation et donc à la fermeture du tube neural, ces fossettes s'évagincent pour donner les vésicules optiques, reliées au tube neural par un pédoncule, le futur nerf optique (Cook et al., 1994; Graw, 2003; Renard and Sellem, 2014).

Entre la quatrième et sixième semaine, les vésicules optiques vont s'aplatir pour former la cupule optique (Ducasse A and Labrousse M, 2008). Ses bords inférieurs sont séparés par une fissure appelée fente embryonnaire qui s'étend sur le pédicule optique (Renard and Sellem, 2014). À ce stade de l'ébauche optique, les vésicules optiques viennent au contact de l'ectoderme où elles induisent la différenciation de la seconde ébauche : l'ébauche cristalline (Graw, 2003).

- **Ébauche cristalline** : en regard de la vésicule optique va apparaître vers le 27^{ème} jour, un épaissement de l'ectoderme de surface : la placode cristalline (Cook et al., 1994). À partir du 30^{ème} jour du développement, elle va s'invaginer en une fossette cristallinienne (Renard, 2009). Petit à petit, les deux bords de la fossette vont se rapprocher constituant une vésicule. À la sixième semaine, l'ébauche du cristallin s'est totalement séparée de l'ectoderme et recouvre la tête de l'embryon.

- **Evolution des ébauches** : l'ébauche du cristallin va induire la différenciation des vésicules optiques en cupules optiques. Ainsi, l'invagination des vésicules optiques sur elle-mêmes vont aboutir à la constitution d'une calotte à deux parois : l'une formant le feuillet externe et l'autre le feuillet interne. Le feuillet interne va être à l'origine de la rétine neurale, et le feuillet externe de la couche pigmentée de la rétine (Graw, 2003; Renard, 2009).

Au niveau des bords de la cupule optique il n'y aura pas de différenciation (rétine aveugle), le feuillet interne reste mince et les deux feuillets accolés tapissent en dedans des replis du mésenchyme (rétine ciliaire) et s'insinuent entre la vésicule cristallinienne et les plans superficiels (rétine irienne).

- **Formation de la rétine** : la différenciation de la rétine commence autour du 47^{ème} jour de gestation (Graw, 2003) avec l'apparition des cellules de Müller ainsi que des futures cellules ganglionnaires (Renard and Sellem, 2014). Les prolongements des cellules ganglionnaires formeront les fibres nerveuses rétiniennes qui atteignent le cerveau primitif en créant le futur chiasma optique vers la septième semaine. Les photorécepteurs eux, apparaissent dès la quinzième semaine (Graw, 2003).

Au troisième mois, la rétine va être séparée en 3 couches au niveau du feuillet externe : les grains externes, les grains internes et les cellules ganglionnaires (Renard, 2009).

Au sixième mois, la rétine est fonctionnelle. C'est en effet à ce stade qu'apparaît le réflexe photo-moteur (Renard, 2009).

- **Formation du cristallin** : au cours du deuxième mois du développement, la vésicule cristallinienne va se transformer. Les cellules de la paroi antérieure restent cubiques et de petite taille tandis que celles au niveau postérieur vont s'allonger et se multiplier à partir du 44^{ème} jour de gestation (Graw, 2003). Très rapidement, cette prolifération cellulaire va combler la cavité de la vésicule cristallinienne qui disparaît avant la fin du deuxième mois (Renard, 2009). La croissance du cristallin résulte ultérieurement de l'apposition de nouvelles cellules à partir de la zone équatoriale. Ce mécanisme de renouvellement perdurera jusqu'à l'âge adulte.

- **Formation de la cornée** : parallèlement à la formation de l'ébauche cristalline, une partie de l'ectoderme de surface donne naissance à la *membrane prima* ou lame de Hensen (Renard, 2009). Au stade de l'embryon de 9 à 12 mm apparaissent des cellules mésenchymateuses entre cette lame et l'ébauche cristalline. A la sixième semaine, la cupule rétinienne s'accroît brutalement ce qui va induire une modification morphologique de ces cellules mésenchymateuses : elles sont étirées en une couche continue et vont ainsi former l'endothélium postérieur de la cornée (Graw, 2003).

Au fur et à mesure du développement, l'épithélium prend de l'épaisseur par l'arrivée de cellules de la crête neurale. Il y a alors formation des différentes couches telle que la membrane de Descemet, visible à partir de la huitième semaine. Ainsi, au troisième mois, tous les constituants de la cornée sont présents à l'exception de la couche de Bowman qui n'apparaît que tardivement, au cinquième mois (Cook et al., 1994).

B. Formation des autres constituants oculaires

Pendant le développement de l'ébauche optique et cristalline, le mésenchyme situé à leur contact va se différencier pour former les autres constituants de l'œil (Renard, 2009). Ainsi, le mésenchyme situé dans la concavité de la cupule optique va être à l'origine du corps vitré.

La sclérotique et la choroïde se développent à partir du mésoderme qui enveloppe la cupule optique. Les cellules mésenchymateuses vont s'allonger, s'orienter et se rapprocher formant un feuillet serré et dense. En commençant par le pôle antérieur, ce feuillet va se séparer de la couche du mésoderme, qui donnera la choroïde, pour former la sclérotique. La délimitation entre la sclérotique et la choroïde est faite dès le troisième mois. Au cours du quatrième et cinquième mois, la condensation sclérale va aboutir au recouvrement de la totalité du globe oculaire jusqu'à l'entrée du nerf optique (Cook et al., 1994).

Au niveau des bords des cupules optiques, le mésenchyme va bourgeonner pour donner les corps et les procès ciliaires (Graw, 2003). Cette zone ciliaire va se prolonger par une évagination et se placer au niveau de la vésicule cristallinienne. Cette évagination aplatie est alors doublée par la rétine irienne et composée d'une fine couche de tissu conjonctif : le stroma et l'iris. Ces évaginations vont laisser au centre du disque de l'iris un orifice : la pupille.

Les muscles moteurs du globe oculaire ont une origine mésodermique et sont visibles dès que l'embryon mesure 13,5 mm. La transformation des cellules myogéniques intervient entre la cinquième et la huitième semaine du développement et ferait intervenir des cellules d'origine crestale. La musculature intrinsèque de l'œil, muscles ciliaires et ligament suspenseur du cristallin, se différencie au cinquième mois du développement à partir des cellules d'origine crestales de la région ciliaire tandis que le diamètre pupillaire dépend des éléments contractiles dérivés des crêtes neurales situées dans le stroma de l'iris (Renard, 2009).

C. Formation des paupières et des glandes lacrymales

Vers le deuxième mois, le mésoderme délimite autour de l'ébauche oculaire un bourrelet à la base de la formation progressive de deux replis, les futures paupières. Ainsi, progressivement, le bourrelet oculaire va s'accroître et se rabattre sur la cornée.

Au troisième mois les paupières sont soudées enfermant une cavité conjonctivale entre le futur épithélium conjonctival et la cornée.

Les follicules pileux apparaissent au niveau des paupières vers le cinquième mois.

Vers le septième - huitième mois, les paupières se séparent.

Les glandes lacrymales résultent du développement, à la dixième semaine, d'un bourgeon de l'ectoderme à l'angle du sac conjonctival qui ne deviendra mature qu'après la naissance.

III.2 - Implication génétique dans l'embryogenèse oculaire

La mise en place de l'œil est organisée de façon très ordonnée et précoce grâce à l'expression de différents facteurs de transcription à des moments précis de l'embryogenèse (Figure 12). Ainsi, des cascades d'expressions géniques vont être instaurées et induire la spécialisation cellulaire.

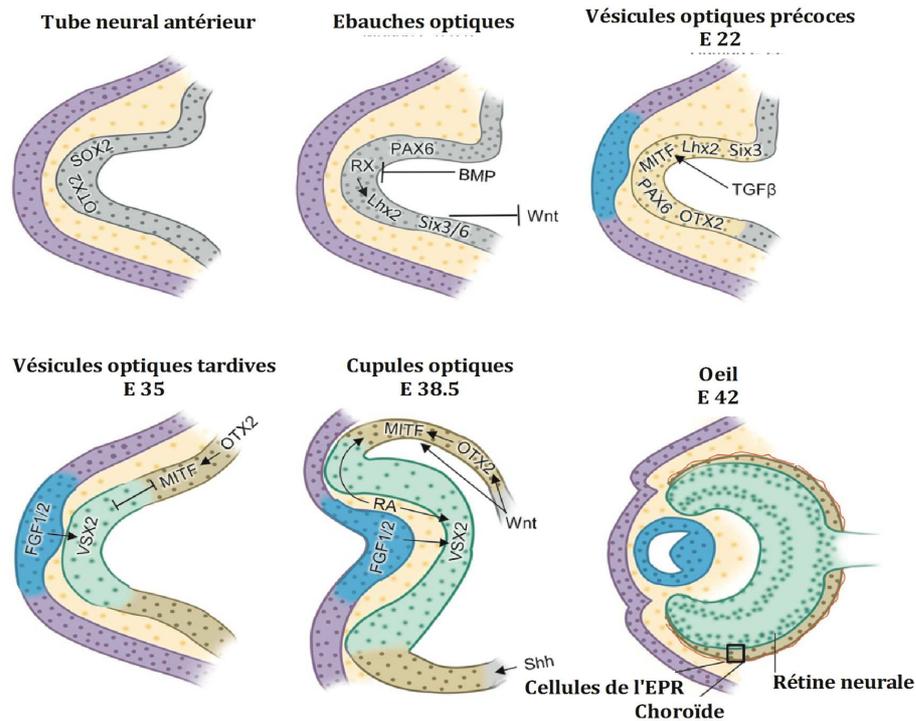


Figure 12 : Résumé du pattern d'expression génétique spécifique responsable de la formation de l'œil.

E : jour embryonnaire ; OTX2 : orthodenticle homeobox 2 ; RX : paired-type homeodomain transcription ; factor VSX2 : the paired-like homeodomain transcription facteur ; MITF : microphthalmia-associated transcription factor ; FGF1/2 : fibroblast growth factors ; BMP : bone morphogenetic protein ; Shh : sonichedgehog.

Adaptée d'après Parvini, 2014.

La formation des vésicules optiques est caractérisée par l'expression de OTX2 (orthodenticle homeobox 2), VSX2 (the paired-like homeodomain transcription facteur) et MITF (microphthalmia-associated transcription factor). Les cellules des vésicules optiques peuvent se différencier en cellules de la rétine neurale ou en cellules de l'EPR, destinée cellulaire définie par l'expression locale de MITF ou VSX2 (Parvini et al., 2014).

Au moins cinq facteurs ont été identifiés comme étant essentiels pour le développement des yeux : FGF1 et FGF2 (fibroblast growth factors), TGFβ (transforming growth factor beta), BMP (bone morphogenetic protein), Wnt and Shh (sonichedgehog) (Parvini et al., 2014). Par ailleurs, les travaux de Spemann de 1924 ont permis d'identifier que, parmi les gènes impliqués dans le développement oculaire, ceux responsables de l'induction du cristallin, tels que *Pax6* et *Sox2* découverts dans les années 1990, sont cruciaux dans la formation de l'œil.

Les relations entre Sox2, Pax6 et d'autres protéines de la famille Sox ou Six semblent être primordiales pour la mise en place correcte de cet organe sensoriel (Lengler et al., 2005). Ici ne seront présentés que brièvement les gènes Pax6 et Sox2.

- **Pax6** : le facteur de transcription Pax6 va être responsable de l'induction de cellules embryonnaires en cellules nerveuses (Kitazawa et al., 2017). En effet, chez les vertébrés, Pax6 est exprimé dans le système nerveux central, système dérivé du feuillet ectodermique et à la base de la neurorétine. Durant le développement oculaire, il est au sommet de la hiérarchie dans la cascade d'induction, d'où son importance majeure. L'expression de Pax6 va être restreinte aux placodes optiques puis retrouvée dans le développement des lentilles optiques, de la cornée mais aussi de l'épithélium olfactif. Elle va être à l'origine de la différenciation des cellules en fibres cristallines.

Dans les modèles animaux, la perte d'expression de Pax6 aboutit au phénotype « eyeless » chez la drosophile (Quiring et al., 1994) et « small eye » chez la souris (Hill et al., 1992). Chez l'homme il est responsable d'une aniridie, une absence quasi-totale et bilatérale de l'iris (Glaser et al., 1992).

- **Sox2** : Le facteur de transcription Sox2 est exprimé dans le tube neural durant le développement ainsi que dans les progéniteurs neuraux. Il participe au maintien des cellules souches, et particulièrement à celui des cellules souches neurales. Il n'agit pas seul et forme un complexe avec NANOG, OCT-4 et OCT-1. Ce complexe est souvent utilisé lors de la culture de cellules souches afin de maintenir leur auto-renouvellement (Boyer et al., 2005).

Dans le développement des yeux, il joue un rôle crucial de par son interaction avec Pax6 (Matsushima et al., 2011). Sox2 va être responsable de la régulation de différents gènes tels que Six3 (Beccari et al., 2012), un facteur de transcription impliqué dans le développement oculaire et du cerveau antérieur (Samuel et al., 2017). Chez l'homme, une mutation dans Six3 va être responsable d'une holoproencéphalie, une anomalie congénitale du cerveau résultant d'une absence de séparation en deux hémisphères. Cette maladie est souvent associée à une absence d'un ou des deux yeux (Ribeiro et al., 2006). Une anomalie de l'expression de Sox2 chez l'homme va être responsable d'anophtalmie (absence d'un yeux ou des deux à la naissance, degré extrême de la microphthalmie), de microphthalmie (réduction du globe oculaire) plus ou moins sévère (Lengler et al., 2005).

III. Phototransduction du signal visuel

A l'obscurité, un courant positif induit par des canaux sodiques et calciques situés au niveau des SEP des cônes va maintenir les photorécepteurs en état de dépolarisation. Ce phénomène est dépendant de la concentration en GMPc (guanosyle monophosphate cyclique) (Pepe et al., 1989).

Dans cette partie sera détaillée la transduction du signal visuel dans le cas de l'activation d'un bâtonnet via la rhodopsine (Figure 13).

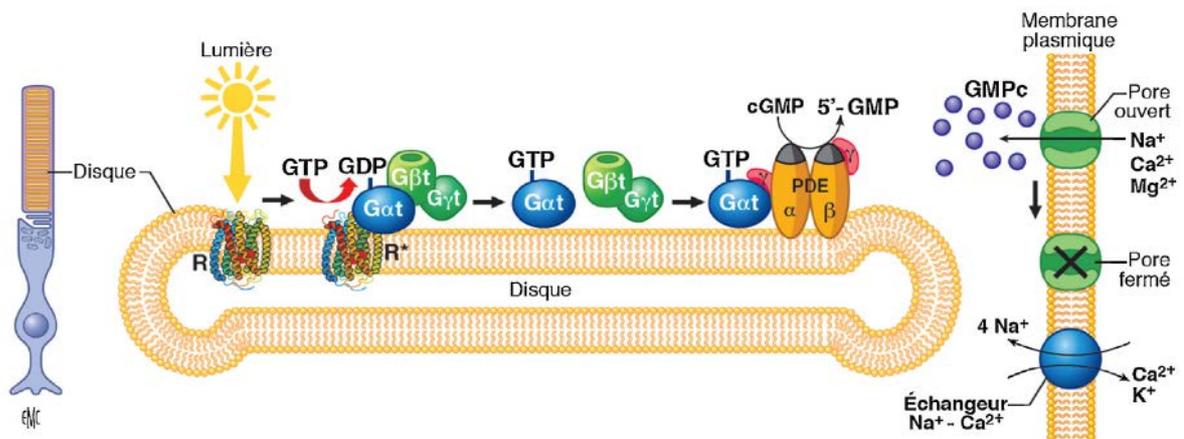


Figure 13 : Mécanisme de la phototransduction du signal lumineux au niveau des bâtonnets via l'activation de la rhodopsine par la lumière.

R : rhodopsine ; *R** : rhodopsine activée ; *GTP* : guanosine triphosphate ; *GDP* : guanosine diphosphate ; *G α* : sous-unité α de la transducine ; *G $\beta\gamma$* : sous-unité β de la transducine ; *G γ* : sous-unité γ de la transducine ; *PDE* : phosphodiésterase 6 ; *cGMP* : guanosyle monophosphate cyclique ; *5'-GMP* : 5-guanosine monophosphate ; *Na⁺* : sodium ; *Ca²⁺* : calcium ; *Mg²⁺* : magnésium ; *K⁺* : potassium.

D'après Salesse, 2017

Lors d'un signal lumineux la première étape de la phototransduction du signal est l'absorption de la lumière par la rhodopsine, phénomène appelé aussi photoisomérisation (Kukura, 2005). L'isomérisation du 11-*cis* retinal en *tout-trans* retinal va se réaliser en moins de 200 femtosecondes, induisant la transformation de la rhodopsine en métharhodopsine II (MII) en quelques millisecondes (Salesse, 2017). Sous cette forme particulière, la MII dévoile un site de fixation pour les protéines G telles que la transducine. Cette protéine est constituée de 3 sous unités (α , β et γ) et activée par l'échange du guanosine diphosphate (GDP) en guanosine triphosphate (GTP) via la MII. La MII est capable d'activer jusqu'à 1300 transducines par seconde (Salesse, 2017), c'est la première étape d'amplification du signal visuel.

La fraction α de la transducine, libérée suite à l'action de la MII, va activer à son tour la phosphodiesterase 6, enzyme retrouvée uniquement dans les photorécepteurs (Salesse, 2017). Elle permet l'hydrolyse du GMPc et ainsi réduit sa quantité intracellulaire. L'activité de la phosphodiesterase 6 est très élevée, environ 6000 à 8000 molécules de GMPc hydrolysées par seconde (Salesse, 2017). Il s'agit de la deuxième étape d'amplification du signal.

Cette cascade d'activation va être responsable de la fermeture de canaux sodiques et calciques au niveau de la membrane plasmique des disques des SEP, aboutissant à une chute importante du calcium intracellulaire ainsi qu'à une hyperpolarisation membranaire (Salesse, 2017). L'ensemble est associé à l'arrêt de libération du glutamate, un neurotransmetteur, au niveau synaptique (Stryer, 1988).

La phototransduction du signal est différente suivant les cônes et les bâtonnets. Ainsi, même si ce sont les mêmes protéines qui sont impliquées dans ce processus, l'amplification du système est 250 fois plus importante chez les cônes que chez les bâtonnets (Salesse, 2017).

Les signaux provenant des photorécepteurs convergent vers les mêmes cellules ganglionnaires via des cellules spécialisées : les cellules bipolaires. Chaque cellule bipolaire va être activée soit par différents bâtonnets, système très sensible mais de faible résolution, soit par un cône unique, système permettant une acuité visuelle maximale (Salesse, 2017). Les réponses de ces cellules vont être modulées par les cellules horizontales et amacrines.

Les potentiels d'action émis par les cellules ganglionnaires vont se propager le long de l'axone pour atteindre le cortex visuel.

INTRODUCTION

Chapitre II – Du vieillissement physiologique à la maculopathie liée à l'âge

I. Le vieillissement

Le vieillissement résulte de l'action combinée du temps qui passe, des facteurs génétiques et des facteurs environnementaux. Il y a trois grands facteurs modulant le vieillissement : les prédispositions génétiques, le stress oxydatif et la glycation des protéines.

Nous nous intéresserons particulièrement à ces deux derniers facteurs.

I.1 – Le stress oxydatif

A. Généralités

- **Définition** : Etant des organismes aérobies, nous produisons physiologiquement des espèces réactives de l'oxygène (ERO) comme lors de la phosphorylation oxydante mitochondriale, mécanisme de production énergétique essentiel à la survie cellulaire (Scott W. Cousins, 2015). Ces espèces réactives sont prises en charges par divers systèmes d'éliminations (les superoxydes dismutases, les catalases, la glutathion peroxydase, les vitamines C et E...) qui permettent de maintenir un niveau basal d'ERO faible en détoxifiant notre organisme (Balaban et al., 2005). Cependant, avec le vieillissement ou lors de l'apparition de certaines maladies, ces processus s'altèrent et la cellule ne parvient plus à éliminer suffisamment ces ERO : c'est le stress oxydatif. Cet excès nocif de radicaux libres va induire des altérations au niveau des protéines, des lipides et de l'ADN ; l'ensemble participant à la mort cellulaire (Jarrett and Boulton, 2012).

- **Production** : L'œil est un organe particulièrement exposé aux ravages du temps. En effet, la luminosité à laquelle sont soumis les yeux est à l'origine de la production d'un stress oxydatif important (Golestaneh et al., 2017).

La mitochondrie est l'organite responsable de la production d'environ 90% d'ERO totales (Balaban et al., 2005). Elle permet la production énergétique nécessaire au bon fonctionnement cellulaire grâce à la conversion de l'énergie des molécules organiques en molécules d'ATP directement utilisables par la cellule, via le cycle de Krebs et la phosphorylation oxydante.

Dans la chaîne respiratoire, il y a cinq étapes pour la production d'ATP (Figure 14 A) :

- 1) L'oxydation par l'enzyme NADH déshydrogénase au complexe I.
- 2) Les électrons provenant du complexe I sont acceptés par la coenzyme Q (CoQ). Il peut aussi accepter des électrons provenant du complexe II (enzyme succinate déshydrogénase).
- 3) CoQ donne les électrons au cytochrome B ou complexe III.
- 4) Les électrons sont transmis au cytochrome C, ou complexe IV. Ce phénomène s'associe à la réduction immédiate de l'oxygène en eau.
- 5) Dissipation finale de l'énergie (Complexe V) associée à une éjection de protons (Complexe UCP).

Les sites majoritairement producteurs d'ERO sont les complexes I et III via la conversion de 1 à 2 % des molécules d'oxygène en radicaux anions superoxydes ($O_2^{\cdot-}$). Ils peuvent ensuite être convertis en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) via la superoxyde dismutase, en peroxynitrite ($ONOO^-$) par association avec le monoxyde d'azote (NO) ou encore en radical hydroxyle (OH^{\cdot}) via la réaction de Fenton (Balaban et al., 2005) (Figure 14 B).

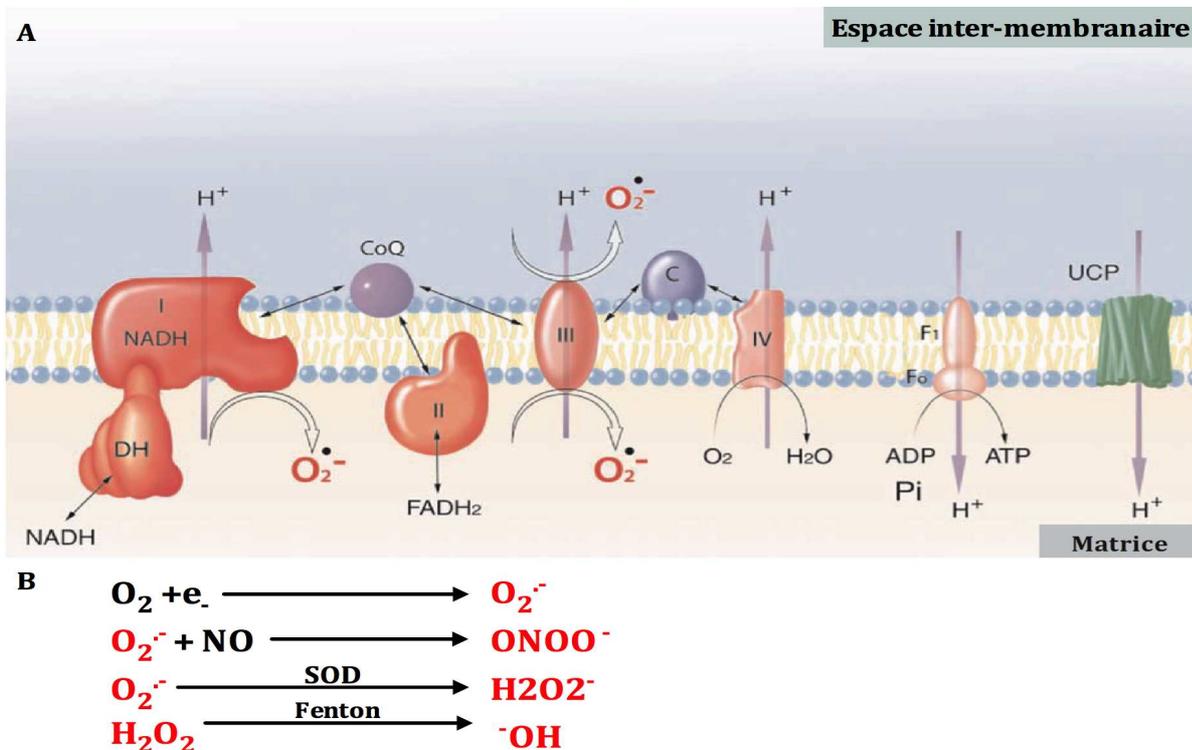


Figure 14 : A) Chaîne respiratoire mitochondriale responsable de la production d'énergie sous forme ATP. B) Différentes réactions aboutissant à la production d'ERO suite à la phosphorylation oxydative.

H⁺ : hydrogène ; O₂ : dioxygène ; O₂^{·-} : anion superoxyde ; NO : monoxyde d'azote ; ONOO⁻ : peroxynitrite ; H₂O₂ : peroxyde d'hydrogène ; OH[·] : radical hydroxyle.

Adaptée d'après Balaban, 2005.

- **Systèmes antioxydants** : on y retrouve des enzymes telles que le superoxyde dismutase (dismutation du superoxyde en dioxygène et peroxyde d'hydrogène), la catalase (dismutation du peroxyde d'hydrogène en eau et dioxygène), le glutathion peroxydase (transformation des hydroperoxydes organiques) et le glutathion réductase (réduction du disulfure de glutathion en glutathion) (Balaban et al., 2005; Jarrett and Boulton, 2012). Ces enzymes vont protéger la macula contre les ERO libérées, entre autres, lors de l'exposition à la lumière (Beatty et al., 2000). Il existe aussi des molécules antioxydantes, qui vont protéger des effets nocifs et oxydatifs des ERO : les vitamines C, E et les caroténoïdes (Wei et al., 2014).

- **Impact du stress oxydatif sur la cellule** : les ERO sont des espèces très réactives capables d'oxyder les protéines, les lipides et d'induire des dommages à l'ADN.

- **Oxydation des protéines** : les résidus les plus sensibles à l'oxydation sont la cystéine et la méthionine. Les ERO peuvent induire la production de ponts disulfures, d'acide sulfénique et de méthionine sulfoxyde, la fragmentation des chaînes polypeptidiques et la formation de groupements carbonylés. Ces modifications auront pour conséquences une diminution de l'activité enzymatique ainsi qu'une susceptibilité à la dégradation, une hydrophobicité et une augmentation de l'instabilité à la chaleur (Baraibar et al., 2013).

- **Oxydation des lipides et des glucides** : les lipides sont les constituants majoritaires des membranes. L'oxydation des lipides va aboutir à la formation de lipides peroxydés. Ces dérivés lipidiques, de par leur caractère plus hydrophile, vont perturber la perméabilité membranaire. On retrouve par exemple le malondialdéhyde. Ils vont ensuite se lier de façon covalente à d'autres protéines via les résidus histidine, lysine et cystéine, formant ainsi des produits terminaux de l'oxydation des lipides. Ces produits vont s'accumuler et induire des dégâts cellulaires importants (Kaemmerer et al., 2007; Krohne et al., 2010).

De la même façon qu'avec les lipides, les ERO peuvent oxyder les glucides.

- **Altération de l'ADN** : les ERO vont avoir la capacité de se fixer sur l'ADN grâce à leur forte affinité pour la thymine et la guanine. Ils vont alors convertir ces bases en glycol et 5-hydroxyméthyluracile pour la thymine, et en 8-hydroxyguanine et 8-hydroxy-2'-désoxyguanosine pour la guanine (Liang and Godley, 2003). Les ERO sont aussi

responsables de cassures au niveau de l'ADN après oxydation des désoxyriboses. Normalement ces altérations doivent être corrigées par les différents systèmes de réparation de l'ADN. Cependant, dans certains cas, ce phénomène est à la base de la création de mutations qui peuvent être à l'origine de pathologies.

B. Implication du fer dans le stress oxydatif

B.1 – Rôle physiologique

Le fer, oligo-élément essentiel à notre métabolisme, nous provient essentiellement de notre alimentation. Il est indispensable à de nombreuses réactions comme le cycle de Krebs, le transport d'oxygène ou la biosynthèse de l'ADN (Yu et al., 2017). Il est aussi important pour l'activité mitochondriale via la succinate déshydrogénase, les cytochromes a, b et c ou pour l'action du complexe fer-souffre de la chaîne respiratoire permettant la production d'ATP (Levi and Rovida, 2009 ; He et al., 2007).

Dans la rétine, le fer est particulièrement essentiel car il participe à la phototransduction du signal. En effet, l'exposition à la lumière des SEP va dégrader les disques contenant l'opsine. Ils sont alors phagocytés et recyclés par les cellules de l'EPR. Or, la production des nouveaux disques, via les lipides et l'enzyme désaturase d'acide gras, est dépendante du fer (Shichi, 1969). Le fer est aussi essentiel pour la synthèse du GMPc par la guanylate cyclase, nécessaire à la conversion du signal lumineux en signal électrique (K W Yau and Baylor, 1989). Enfin, l'activité de la RPE65, une isomérohydrolase trouvée dans les cellules de l'EPR et catalysant la transformation du *tout-trans* retinal en 11-*cis*-retinal, est aussi dépendante de la présence de fer (Cai et al., 2009).

Dans la plupart de nos tissus, le fer est importé depuis le sang grâce à la transferrine (Eid et al., 2014), une protéine capable de fixer deux molécules de Fe^{3+} . Ce fer est présent à la hauteur de 3 mg sous forme circulante chez l'adulte (He et al., 2007). Le fer peut être utilisé, stocké par la ferritine ou exporté (Ward et al., 2015). La ferritine, capable de séquestrer jusqu'à 4500 atomes de fer, est présente sous la forme de deux sous-unités : la H (Heavy) et la L (Light). La sous unité H va permettre l'oxydation du fer pour sa meilleure incorporation par la sous-unité L (Aisen et al., 2001).

Au niveau des cellules de l'EPR, le fer est transporté, par la transferrine, de la surface basolatérale des cellules jusqu'au côté apical où il est redistribué à la rétine neurale. Ce sont les cellules de l'EPR qui régulent le flux ferrique dans le système visuel (Chen et al., 2009). La transferrine transporte aussi le fer des cellules de l'EPR aux photorécepteurs via son récepteur (Yefimova et al., 2000). En effet, le récepteur à la transferrine est présent au niveau des segments internes des cônes et des bâtonnets.

B.2 – Rôle dans le vieillissement et le développement pathologique

Au cours du vieillissement, le fer s'accumule dans notre organisme (Chen et al., 2009). Même si cet élément est essentiel pour notre fonctionnement, son excès est néfaste et responsable de la production de stress oxydatif (Yu et al., 2017). Cette production d'ERO est associée au processus d'autophagie par les cellules de l'EPR. En effet, la dégradation d'organelles riches en fer, telles que les mitochondries, va induire une libération importante de cet élément. Lorsque le pH lysosomal est faible (pH4.5-5.5) et en présence de réducteurs, le fer va être réduit de sa forme Fe^{3+} en Fe^{2+} (Kurz et al., 2007). Ce Fe^{2+} participe à la réaction de Fenton produisant des radicaux hydroxyls à partir du peroxyde d'hydrogène (Chen et al., 2009) (Figure 15).

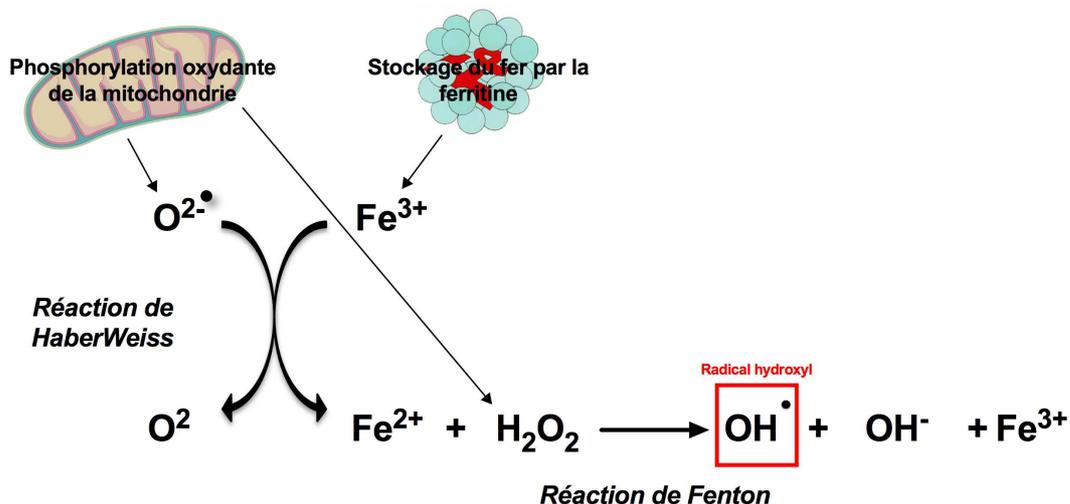


Figure 15 : Schéma représentant la réaction de Fenton responsable de la production de radicaux hydroxyles à partir du fer.

Fe : fer ; $O_2^{\bullet -}$: anion superoxyde ; O_2 : dioxygène ; H_2O_2 : peroxyde d'hydrogène ; OH^{\bullet} : radical hydroxyl ; OH^- : hydroxyde

Les radicaux hydroxyls sont les espèces les plus réactives des ERO. De plus, les lysosomes sont dépourvus d'enzymes responsables de la dégradation de l' H_2O_2 (glutathion

peroxydase par exemple), induisant inéluctablement la formation de radicaux hydroxyls ou d'ERO similaires (Kurz et al., 2007).

Les ERO induisent des dommages cellulaires et moléculaires qui semblent être impliqués dans de nombreuses pathologies comme la maladie de Alzheimer (He et al., 2007). De nombreuses études suggèrent qu'un métabolisme anormal du fer pourrait être à la base de diverses maladies oculaires (Song et al., 2016).

L'acéruplasminémie est une maladie cérébrale caractérisée par une dégénérescence rétinienne, une anémie, un diabète et des troubles neurologiques (Dusek et al., 2016). Il a été montré que les patients atteints de cette maladie ont une surcharge cérébrale en fer causée par un dysfonctionnement dans son exportation. Cette anomalie est due à une mutation dans le gène de la céruloplasmine, protéine responsable de la conversion du fer Fe^{2+} en Fe^{3+} , le Fe^{2+} n'étant pas pris en charge par la transferrine (Eid et al., 2014).

L'ataxie de Friedreich est une maladie neurodégénérative génétique caractérisée par une ataxie sévère (manque de coordination des mouvements volontaires). Une mutation dans la protéine mitochondriale frataxine aboutit à l'accumulation de fer dans les mitochondries (Tamarit et al., 2016). Dans la plupart des cas, cette maladie est associée à une neuropathie optique progressive et tardive pouvant provoquer une perte importante de la vision (He et al., 2007).

I.2 - La glycation des protéines

- **Définition** : la glycation des protéines est un phénomène primordial dans le processus du vieillissement. C'est une réaction chimique non enzymatique et post-traductionnelle résultant de la fixation de sucre sur les protéines (Kandarakis et al., 2014; Yamagishi et al., 2012). Il a été montré que les protéines glyquées, appelées aussi produits de la glycation avancée ou PTG (produits terminaux de la glycation) ont un rôle important dans la lésion tissulaire, le diabète, l'insuffisance rénale et le vieillissement vasculaire (Stitt, 2005).

- **Production** : la glycation des protéines se réalise en trois étapes (Figure 16).

- La formation de la base de Schiff par la fixation d'un sucre réducteur ou d'un aldéhyde au niveau d'une lysine (principalement, mais ils peuvent aussi se fixer sur d'autres résidus) au niveau de la fonction amine de la chaîne latérale.
- Le réarrangement d'Amadori induit soit par l'isomérisation de la base de Schiff soit par fixation d'un sucre oxydé.
- La réaction de Maillard, réaction complexe qui va aboutir à la formation des PTG.

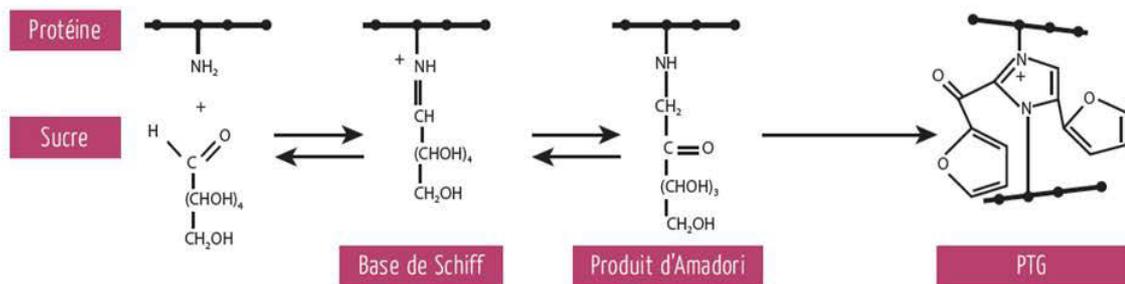


Figure 16 : Les différentes étapes de la réaction de glycation.

PTG : Produits terminaux de la glycation

<http://www.addiactive.com/peau/la-glycation-en-4-questions>

- **Impact de la glycation des protéines sur la cellule** : ce phénomène va avoir plusieurs conséquences. Tout d'abord, les protéines ainsi modifiées vont perdre leur propriété et induire des modifications du métabolisme et de la fonction cellulaire. Ainsi l'activité enzymatique de certaines protéines sera altérée. Deuxièmement, la glycation est responsable de la formation d'agrégats, comme lors de l'opacification du cristallin par exemple (Stitt, 2005).

De la même façon que le stress oxydatif, la glycation va induire des cassures au niveau de l'ADN. Il est par ailleurs important de noter que les protéines glyquées sont davantage sensibles au stress oxydatif et donc à la production d'ERO (Kandarakis et al., 2014).

II. Vieillessement de la rétine

Au niveau de la rétine, le vieillissement va induire un amincissement global dû à la mort neuronale et au raccourcissement des photorécepteurs (Bonilha, 2008). Trois zones

sont particulièrement exposées au vieillissement : la rétine neurale, les cellules de l'EPR et la membrane de Bruch.

II.1 - Vieillessement de la rétine neurale

Des modifications des photorécepteurs apparaissent au niveau de la rétine neurale avec le vieillissement. Ainsi, il a été montré que leur nombre de même que leur organisation changent (Song et al., 2011). Au point de vue morphologique, il a pu être observé une diminution des pigments photosensibles au niveau des cônes (Elsner et al., 2002).

Une diminution de la circulation veineuse et artérielle a aussi été mise en évidence chez la personne âgée, en particulier au niveau de la région maculaire (Kolar, 2013).

II.2 - Vieillessement des cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien

De nombreux changements morphologiques et fonctionnels surviennent avec le vieillissement au niveau des cellules de l'EPR (Bonilha, 2008).

Le vieillissement normal des cellules de l'EPR est caractérisé par l'accumulation de granules fluorescents : la lipofuscine (Sparrow et al., 2012) (Figure 17, C et D). Ainsi, alors que l'on peut observer quelques granules de lipofuscine dans les premières décades de la vie, ils remplissent l'intégralité du cytoplasme des cellules de l'EPR vers la 9^{ème} décade (Bonilha, 2008).

La lipofuscine provient d'une phagocytose des SEP moins efficace par les cellules de l'EPR. En effet, lors de la dégradation des SEP, certains complexes, trop volumineux pour être catabolisés par les lysosomes, s'accumulent sous la forme de dérivés de la vitamine A et/ou de la mélanine. De par la photo-oxydation, une partie de cette vitamine A va conduire à la formation de l'A2E (N-retinylidene-N-retinylethanolamine), un constituant important de la lipofuscine (Murdaugh et al., 2011). La photo-oxydation de l'A2E va amener à la formation de molécules très réactives telles que les PTG et les ERO (Wielgus et al., 2010). Afin de lutter contre ce stress oxydatif, des mécanismes de défense existent chez les cellules de l'EPR tels que la superoxyde dismutase et la catalase par exemple (Beatty et al., 2000). Cependant, avec l'âge, ils perdent petit à petit leur capacité antioxydante (Chang

et al., 2014). En effet, la partie apicale des cellules de l'EPR, où sont situés les microvili, est atrophiée avec le vieillissement. Plusieurs études ont montré la présence de protéines antioxydantes, telle que la superoxyde dismutase, au niveau des ces organelles (Bonilha, 2008). Ces résultats suggèrent que l'altération des microvili participe à l'environnement pro-oxydant de la rétine âgée. Les cellules de l'EPR sont donc particulièrement impliquées dans la production de stress oxydatif au cours du vieillissement.

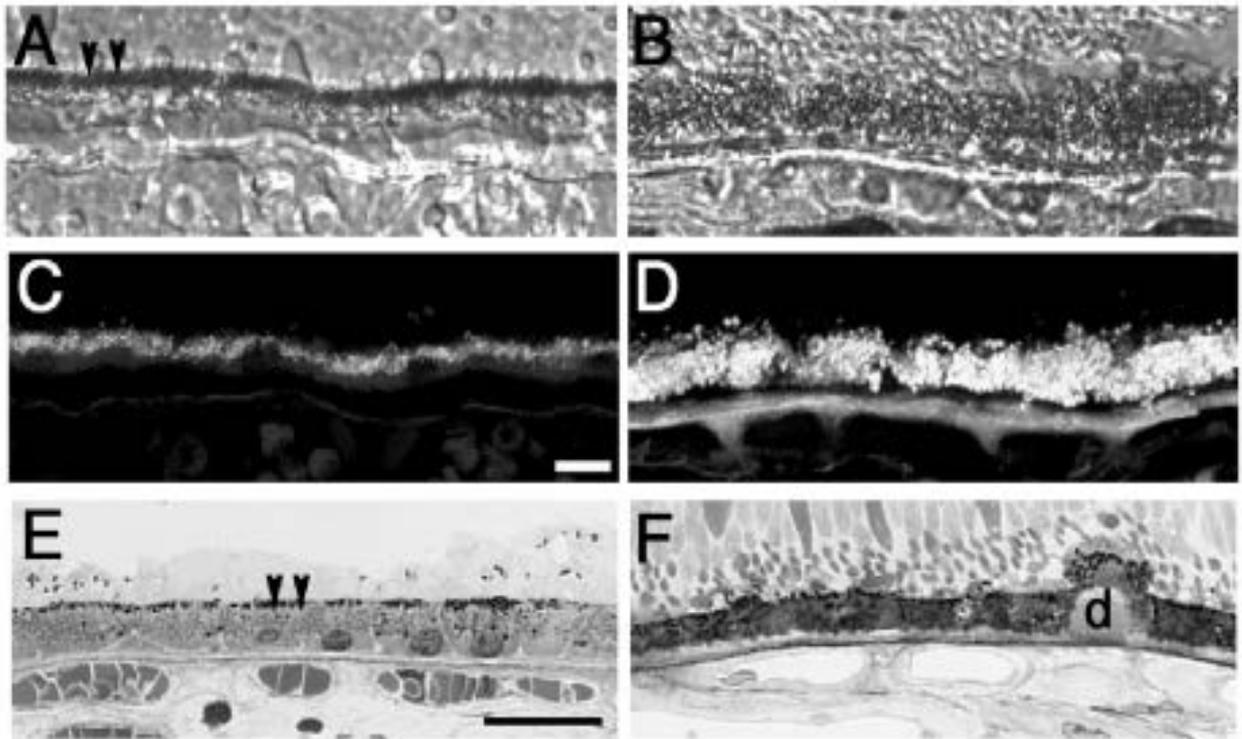


Figure 17 : Observation des changements morphologiques des cellules de l'EPR entre un sujet jeune (23 ans, A, C, E) et un sujet âgé (75 et 88 ans, B, D, F).

*Les flèches localisent les pigments de mélanine. d : drusen
D'après Bonilha, 2004*

Avec le vieillissement, la taille et la pigmentation des cellules de l'EPR se modifient (Bonilha, 2008; Kolar, 2013) (Figure 19, A-E et B-F). Ainsi, il a été montré que la mélanine représente 8% de la surface cellulaire chez des personnes âgées de 0 à 20 ans, et uniquement 3,5% pour un groupe allant de 41 à 90 ans (Feeney-Burns et al., 1984). La diminution de la pigmentation des cellules de l'EPR avec l'âge est variable suivant les individus. La perte de la mélanine est supposée être délétère pour la survie des cellules de l'EPR, les rendant plus vulnérables au stress oxydatif induit par l'exposition à la lumière (Feeney-Burns et al., 1984). Dans les cellules âgées de l'EPR, la mélanine est souvent associée aux lysosomes, mélanolysosomes, ou à la lipofuscine et à la mélanolipofuscine

(Bonilha, 2008; Soubrane et al., 2007). Dans la première décennie de la vie, on retrouve 6,9 granules de mélanolipofuscine par cellules, contre 15 après 61 ans (Feeney-Burns et al., 1984). Ils sont concentrés principalement au niveau de la macula.

II.3 – Vieillesse de la membrane de Bruch

Avec le vieillissement, de nombreuses modifications biochimiques et des dépôts, principalement lipidiques, aboutissent à l'épaississement, la calcification et la fragmentation de cette membrane ainsi qu'à une altération de sa fonction. En effet, il a été estimé qu'en dix décennies, la membrane de Bruch s'épaissit de 135%, passant de 2 à 4,7 μm (Ramrattan et al., 1994). De par ces accumulations lipidiques, la circulation des fluides, ou hydroperméabilité, à travers la membrane de Bruch est diminuée (Curcio and Johnson, 2013) (Figure 18). Ainsi, l'apport nutritionnel et ionique au niveau des photorécepteurs et des cellules de l'EPR ainsi que l'évacuation des déchets au travers de la choroïde est réduit (Cankova et al., 2011).

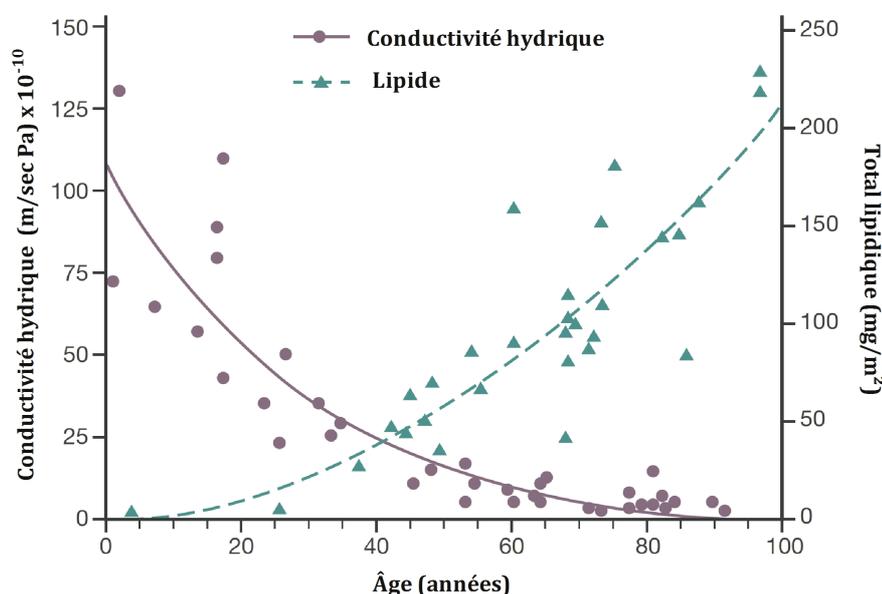


Figure 18 : Quantification et comparaison entre de la conductivité hydrique de la membrane de Bruch et l'accumulation de lipides au cours du temps
Adaptée d'après Curcio, 2013.

La réduction de la perméabilité membranaire va être induite par différents processus.

Au cours des premières décennies, il va être observée une diminution du nombre et de la taille des pores au niveau de la membrane de Bruch, formée par la structure réticulée des fibres de collagène. Les lipides ou les protéines dont le volume est trop important ne vont pas pouvoir traverser cette membrane et vont alors s'accumuler. Ainsi, au cours du vieillissement vont s'amasser, entre autres, des acides gras, des phospholipides, des esters et du cholestérol (Bonilha, 2008; Curcio et al., 2001). La présence de lipides est jugée nulle avant 30 ans et abondante pour un âge supérieur à 60 ans (Curcio and Johnson, 2013).

Au cours de la cinquième décennie, la membrane perd de plus en plus ses propriétés hydrophiles (Beattie et al., 2010; Sugino et al., 2011). Les PTG, provenant de la glycation des protéines dû au vieillissement normal, vont être retrouvés accumulés au niveau de cette membrane sous la forme de dépôts laminaires basaux et des drusen (Figure 19). Ces PTG vont favoriser les liaisons entre les fibres de collagène, constitutives de la membrane de Bruch, et vont ainsi réduire sa perméabilité membranaire (Glenn and Stitt, 2009).

Ces modifications, associées à l'épaississement de la membrane de Bruch, vont induire une diminution du transport des nutriments de la choroïde aux cellules de l'EPR et aux photorécepteurs (Gehrs et al., 2006). Ceci va impacter sur la fonction de la rétine au cours du temps, mais sans effet à l'échelle de vie humaine. En effet, l'espérance de vie du système de transport au niveau de la membrane de Bruch est aux alentours de 110 ans (Soubrane et al., 2007). Ainsi les modifications de la membrane de Bruch avec l'âge ne sont pas accompagnées d'un dysfonctionnement de la rétine (Kolar, 2013).

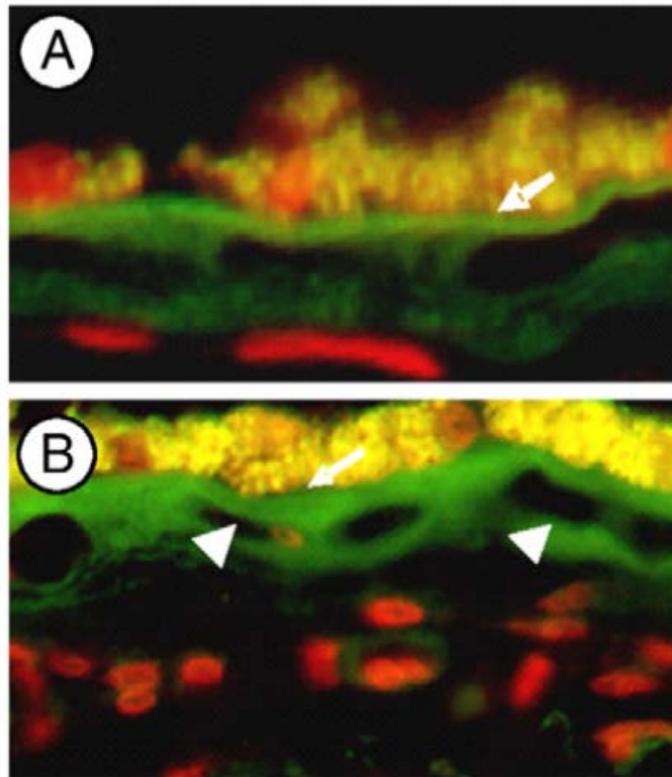


Figure 19 : Localisation immunohistologique de l'accumulation des PTG au niveau de la membrane de Bruch d'un sujet jeune (A) et d'un sujet âgé (B).

La couleur orange reflète l'auto fluorescence normale des cellules de l'EPR. L'immunoréactivité des PTG est visualisé en vert. Les têtes de flèches blanches montrent des accumulations de PTG.

D'après Glenn and Stitt, 2009.

On peut aussi observer, au cours de la vie, l'accumulation de débris provenant d'un métabolisme de dégradation insuffisant des cellules de l'EPR. Les déchets émanant des cellules de l'EPR sont normalement éliminés via les capillaires choroïdiens. Cependant, avec l'âge sont associées des modifications du système vasculaire. En effet, sur dix décennies, la densité de la choriocapillaire est diminuée de 45%, le diamètre des capillaires de 34% et leur épaisseur de 57% (Ramrattan et al., 1994). Le dysfonctionnement des cellules de l'EPR et les modifications de la choriocapillaire participent à la formation de dépôts au niveau de la membrane de Bruch (Okubo et al., 1999).

Même si l'origine des drusen n'est pas encore clairement comprise aujourd'hui, deux hypothèses pourraient expliquer leur apparition. Ils pourraient être issus de la dégradation des SEP par les cellules de l'EPR ou d'origine sérique. Cette seconde hypothèse est étayée par la présence de composés sériques dans ces dépôts (Soubrane et al., 2007). Les drusen dits miliaires sont extrêmement fréquents chez la personne après 50 ans mais restent habituellement stables (73%). Cependant ils peuvent aussi évoluer de

façon pathologique et sont d'ailleurs impliqués dans diverses pathologies oculaires telles que l'athérosclérose ou l'amylose (Soubrane et al., 2007). Ils sont aussi soupçonnés d'être à la base du développement de certaines pathologies comme la dégénérescence maculaire liée à l'âge ou DMLA (Kolar, 2013).

III. Maculopathie liée à l'âge

III.1 - Définition

La maculopathie liée à l'âge (MLA), appelée aussi DMLA précoce, est une maladie touchant la partie centrale de la rétine, la macula.

Au point de vue clinique, la MLA est caractérisée par la présence de drusen et/ou de modifications pigmentaires (hypo ou hyperpigmentation) des cellules de l'EPR dans la région maculaire (Kolar, 2013; Soubrane et al., 2007). Les premiers signes de la MLA apparaissent généralement autour de 50 ans mais n'ont pas toujours d'impact réel sur la vision des patients (Bowes Rickman et al., 2013 ; Nivison-Smith et al., 2014).

Selon l'étude EUREYE (European Eye study), on distingue différents stades dans la MLA (Augood et al., 2006) :

- *Stade 1* : présence de drusen isolés dont la taille est comprise en 63 μm et 125 μm ou d'altérations pigmentaires isolées.
- *Stade 2* : présence de drusen dont la taille est supérieure ou égale à 125 μm ou à la présence de drusen séreux de petite taille associé à des défauts de pigmentation.
- *Stade 3* : présence de drusen dont la taille est supérieure ou égale à 125 μm associée à des défauts de pigmentation.

III.2 - Aspect clinique

La caractéristique histopathologie de la MLA est la présence de drusen, accumulations extracellulaires constitués de phospholipides, de triglycérides, de cholestérol, d'ester de cholestérol, d'acides-gras insaturés, de lipides peroxydés et d'apolipoprotéines (Kolar, 2013). Ces dépôts ont été classés en 4 catégories suivant leur

diamètre, leur aspect, leur composition ainsi que leur localisation (Holz et al., 2004). (Tableau I).

Tableau I : Récapitulatif des caractéristiques des différentes classes de drusen retrouvés dans la MLA et au cours du vieillissement normal*.

Modifiée d'après Nivison-Smith, 2014 ; Soubrane, 2007 et Holz, 2004.

Types	Diamètre	Aspect	Localisation
*Drusen Miliaire	< 63µm	<ul style="list-style-type: none"> - Structure amorphe - Globuleux - Sphériques et nets - Hyalin - Couleur : blanc jaune 	Entre les cellules de l'EPR et la membrane de Bruch.
Drusen Séreux	> 125 µm	<ul style="list-style-type: none"> - Structure amorphe - Inhomogène - Granulaire et vésiculaire - Présence de fragment membranaire, de débris ou de calcification. - Bords flous - Couleur : jaune pâle 	Entre les cellules de l'EPR et la membrane de Bruch. Soulève l'épithélium pigmentaire formant une excroissance.
Dépôts laminaires basaux		<ul style="list-style-type: none"> - Structure amorphe - Bords flous 	Entre la membrane cytoplasmique et la membrane basale des cellules de l'EPR
Dépôts linéaires basaux		<ul style="list-style-type: none"> - Structure amorphe - Granulaire et vésiculaire - Présence de fragment membranaire, de débris 	Fine couche entre les drusen séreux et les drusen miliaires.

Les drusen miliaires et séreux sont décelables à l'examen du fond de l'œil (Figure 20). Au cours du temps, les drusen miliaires peuvent grossir et devenir des drusen séreux, ou évoluer vers l'atrophie. Les drusen séreux peuvent, eux aussi, augmenter de taille, devenir confluents et ainsi induire un décollement drusénoïde des cellules de l'EPR (Kolar, 2013).

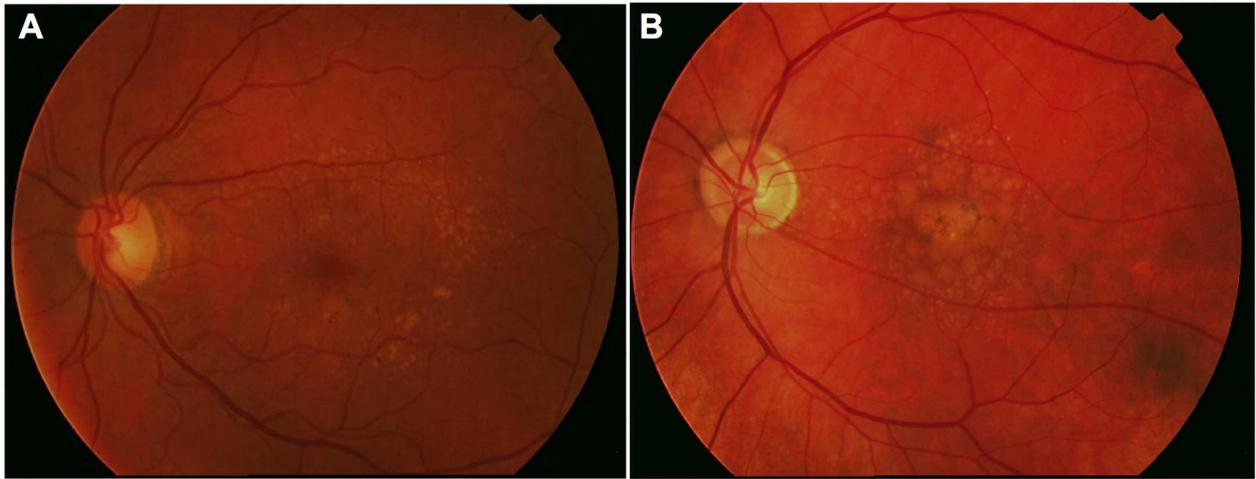


Figure 20 : Fond de l'œil permettant l'observation de drusen miliaires (A) et de drusen séreux (B).
D'après Kolar, 2013

L'altération des cellules de l'EPR est un marqueur de la MLA et est observable cliniquement par un examen de fond de l'œil (Nivison-Smith et al., 2014; Soubrane et al., 2007). L'hyperpigmentation apparaît sous forme de tâches foncées, avec des contours irréguliers, souvent au voisinage de dépigmentation. L'hypopigmentation est associée à une diminution des grains de mélanine dans les cellules de l'EPR ou à une atrophie de ces cellules (Figure 21, Nivison-Smith et al., 2014). Lors de l'examen du fond de l'œil, cette zone apparaît plus claire que la rétine avoisinante avec des bords nets et arrondis (Soubrane et al., 2007).

L'importance de l'hyperpigmentation des cellules de l'EPR est variable suivant les patients. Elle reflète l'existence d'une prolifération ou de migration des cellules de l'EPR (Figure 21, Nivison-Smith et al., 2014). Ces migrations pigmentaires sont principalement localisées au niveau de la macula (Soubrane et al., 2007).

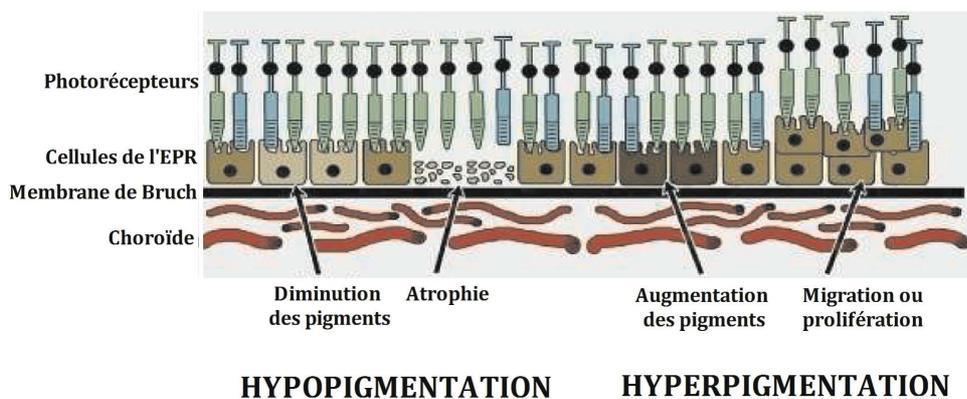


Figure 21: Représentation schématique des différences changements de la pigmentation des cellules de l'EPR.
Adaptée d'après Nivinson-Smith, 2014.

III. 3 – Epidémiologie de la MLA

Le risque de développer une MLA augmente avec l'âge. Aucune différence significative entre homme et femme n'a pu être observée (Klein et al., 1992 ; Mukesh et al., 2004).

Ainsi, dans une étude de 5 ans réalisée en Australie sur une population de 3271 participants âgés de 40 ans et plus, il a été mis en évidence que le risque de développer des drusen $\geq 250 \mu\text{m}$ est 11 fois plus important chez une personne de 80 ans ou plus par rapport à une personne dont l'âge se situe entre 40 et 49 ans (Mukesh et al., 2004). Durant les cinq ans de l'étude, l'incidence de la MLA a été de 17,3% (95% CI, 8.7-26) et 2,4 fois (95% CI, 0.83-6.9) plus fréquente chez les personnes de 80 ans et plus.

Dans la Beaver Dam Eye Study, réalisée sur 4926 participants de 43 à 86 ans, il a montré que les drusen sont présents dans 95% de la population (un ou deux, de petites tailles) (Klein et al., 1992). La présence de ces dépôts ne peut donc pas toujours être considérée comme un risque de développer une MLA (Klein et al., 2002). Cependant, lorsque ces drusen représentent une surface $\geq 157,686 \mu\text{m}^2$, ils sont associés à un risque multiplié par 2,7 de développer des anomalies de pigmentation (Klein et al., 1992).

Les altérations des cellules de l'EPR sont retrouvées dans 6% de la population générale pour l'hyperpigmentation et 4,5% pour l'hypopigmentation (Soubrane et al., 2007). La fréquence d'apparition de ces altérations pigmentaires augmente avec l'âge, représentant 13,1% de la population de plus de 40 ans. Ils peuvent être associés à une dégénérescence de l'épithélium pigmentaire présente dans 8,3% de cette population (Klein et al., 1992).

III.4 – Evolution de la maladie

Dans la majorité des cas, la maladie reste stable durant de nombreuses années (Soubrane et al., 2007). Cependant, la MLA peut aussi évoluer vers l'une des deux formes de la DMLA, justifiant une surveillance rigoureuse (Nivison-Smith et al., 2014)21/11/y 14:45.

Afin d'aider au diagnostic et pouvoir définir le traitement préventif le plus adapté et/ou l'inclusion dans des études cliniques, une classification a été établie par l'AREDS (Age-

Related Eye Disease Study) et est couramment utilisée en clinique pour prédire le risque d'évolution de la MLA vers la forme tardive de la maladie, la DMLA (Tableau II). Cette classification est basée sur l'apparence des signes cliniques, les drusen et la pigmentation des cellules de l'EPR, observée lors d'un examen du fond de l'œil (Nivison-Smith et al., 2014).

Ainsi, le risque de développer une DMLA est inférieur à 1% lorsqu'une personne atteinte de la MLA présente des drusen de diamètre inférieur à 125 µm et qu'ils ne sont pas associés à des altérations pigmentaires (Soubrane et al., 2007). Le risque s'accroît avec la taille des drusen et la présence des altérations pigmentaires. Lorsque le diamètre dépasse 125 µm, le risque de développer une DMLA dans les cinq ans augmente de 5,7 fois (Wang et al., 2003). De plus, lorsque les deux yeux sont atteints par la MLA, le risque d'une évolution vers la forme tardive dans les 5 ans est multiplié par 5 (Mukesh et al., 2004).

Suivant le type de modification pigmentaire, l'évolution de la MLA peut être différente. Au point de vue clinique, cette altération a acquis un pouvoir pronostic important (Soubrane et al., 2007). En effet, une hypopigmentation est plus souvent associée à une DMLA atrophique, et une hyperpigmentation est un signe de l'apparition de néo-vaisseaux, caractéristiques de la forme exsudative de la maladie (Kolar, 2013; Leveziel et al., 2009).

Tableau II : Classification du risque de progression vers un stade tardif de la DMLA suivant le stade de la maladie et les signes cliniques.

D'après Nivison-Smith, 2014.

Stade	Catégorie	Signes cliniques	Risque d'une forme tardive dans les 5 ans
Normal	0	Petits drusen dans 1/2 yeux ou des drusen intermédiaires dans un œil sans modification pigmentaire	0,4 %
	1	Drusen intermédiaires dans 1/2 yeux ou drusen larges dans 1 œil sans modification pigmentaire OU drusen larges dans 1/2 yeux ou des drusen intermédiaires dans 1 œil avec modification pigmentaire	3 %
MLA ou DMLA précoce	2	Drusen larges dans les 2 yeux sans modification pigmentaire OU Drusen intermédiaires dans 1/2 yeux ou drusen larges dans 1 œil avec modification pigmentaire OU Petits drusen dans 1/2 yeux ou des drusen intermédiaires dans 1 œil avec modification pigmentaire dans les 2 yeux	12 %
	3	Drusen larges dans les 2 yeux avec modification pigmentaire dans 1 œil OU Présence de drusen intermédiaires dans 1/2 yeux ou de larges drusen dans un œil avec modification pigmentaire dans les 2 yeux	26 %
DMLA tardive	4	Drusen larges avec modification pigmentaire dans les 2 yeux	47 %

INTRODUCTION

Chapitre III – La Dégénérescence Maculaire Liée à l'Âge

I. Définition

Décrite pour la première fois par Hutchinson en 1874 (De Jong, 2006; Kolar, 2013), la DMLA est une pathologie de la rétine touchant les personnes généralement après 60 ans et qui altère sévèrement la vision centrale (Gehrs et al., 2006). Actuellement, elle est définie comme « une atteinte maculaire tardive multifactorielle, apparaissant sur un terrain génétiquement prédéterminé, dont l'expression clinique est fonction des facteurs additionnels et environnementaux » (Soubrane et al., 2007).

La DMLA est la principale cause de cécité légale (selon le syndicat national des ophtalmologistes de France, la cécité légale est définie par une acuité visuelle inférieure à 1/20 pour le meilleur œil après correction) chez les personnes de plus de 65 ans (Bowes Rickman et al., 2013). Dans les pays industrialisés, ses manifestations cliniques sont retrouvées dans un tiers de la population de plus de 75 ans (Gehrs et al., 2006).

Il y a deux stades dans le développement de la DMLA : le stade précoce et le stade tardif (De Jong, 2006). Ce stade tardif est divisé en deux types de DMLA : la forme atrophique et la forme exsudative (Bowes Rickman et al., 2013; Gehrs et al., 2006). Dans les deux formes de la DMLA, la diminution de l'acuité visuelle est non douloureuse et uniquement centrale, sans atteinte périphérique (Kolar, 2013).

La DMLA atrophique, ou dite « sèche », atteint 1% de la population européenne âgée de plus de 60 ans (Soubrane et al., 2007). Elle correspond à environ 85% des cas cliniques de cette maladie (Koh et al., 2017; Kolar, 2013). Cette forme de la pathologie est caractérisée par une atrophie des cellules de la rétine (cellules de l'EPR et photorécepteurs) et de la choriocapillaire au sein de l'aire maculaire, zone où l'accumulation de drusen est très importante, ainsi que par un épaissement de la membrane de Bruch (Bowes Rickman et al., 2013 ; Nivison-Smith et al., 2014).

La DMLA exsudative est caractérisée par le développement des néovaisseaux choroïdiens (Moult et al., 2014 ; Rakoczy, 2017). On distingue deux types principaux de néo-vaisseaux : ceux dits occultes ou sous-épithéliaux, les plus fréquents ; et les néo-vaisseaux visibles ou pré-épithéliaux, plus rares. Dans cette forme de la maladie, l'accumulation des dépôts entre les cellules de l'EPR et la membrane de Bruch pourrait provoquer une hypoxie rétinienne et une accumulation de matériel pro-inflammatoire constituant des stimuli pro-

angiogéniques aboutissant à la néo-vascularisation (Stefánsson et al., 2011). C'est la forme la plus grave de la maladie, elle est en effet responsable de 85% des cas de perte sévère de la vision (Kolar, 2013).

Une personne peut être atteinte d'une DMLA atrophique sur un œil, et d'une DMLA exsudative sur le second ; une forme atrophique peut se compliquer d'une forme exsudative et inversement (Soubrane et al., 2007). Les deux formes apparaissent ou pas indépendamment l'une de l'autre (Kolar, 2013). Actuellement, il n'est pas encore déterminé si ces deux formes sont des manifestations distinctes de la même maladie ou si elles représentent des affections différentes avec des origines et des mécanismes pathologiques divers (De Jong, 2006).

Dans la suite de ce chapitre, nous nous focaliserons sur la forme atrophique de la maladie.

II. Aspect clinique de la DMLA atrophique

II.1 – Présentation clinique

La DMLA ne présente généralement pas de signes cliniques avant 55 ans (Gehrs et al., 2006; Salomon-Yves et al., 2014). Plusieurs symptômes doivent cependant alerter le patient sur une possible atteinte maculaire.

A. Symptômes fonctionnels

- ***La baisse d'acuité visuelle*** : c'est le symptôme principal de cette maladie. D'une évolution plus ou moins rapide, elle commencera souvent par une gêne dans la vision de près (lecture fatigante, besoin de l'utilisation d'un éclairage plus important, jaunissement des couleurs...) avant d'impacter la vision de loin (Datta et al., 2017; Kolar, 2013). Elle est généralement accompagnée d'une dégradation de la vision nocturne (Bowes Rickman et al., 2013). La diminution des contrastes se dégrade parallèlement à l'acuité visuelle de loin.

L'acuité visuelle est définie comme étant une « grandeur mesurant la capacité de l'œil à discriminer deux points distincts, en fonction de la distance les séparant et de l'éloignement de l'observateur ». Exprimée en dioptrie, l'acuité visuelle se mesure de loin et de près, par des tests recourant à des objets ou des lettres de taille variable, appelés optotypes.

Dans le cas du dépistage de la DMLA, l'optotype utilisé spécifiquement est l'échelle ETDRS (Early Treatments Diabetic Retinopathy Studies) basée sur celle de Snellen développée en 1862 par l'ophtalmologiste hollandais Herman Snellen (Ferris et al., 1982). Elle est constituée de 3 échelles permettant la mesure de la réfraction du patient (échelle R, puissance qui sera nécessaire à la correction pour que la vision redevienne normale) et l'acuité visuelle de chaque œil (échelle 1 pour l'œil gauche, et 2 pour l'œil droit). Chaque échelle représente 14 lignes de 5 lettres chacune, chaque ligne inférieure étant plus petite que la ligne supérieure suivant un coefficient constant de 1,2589 (Figure 22). La lecture est réalisée à 4 mètres sauf lorsque la vision est très basse, cas où la lecture est effectuée à 1 mètre.



Figure 22 : Echelle d'acuité visuelle de loin de type de Snellen.
D'après Soubrane, 2007.

La DMLA aboutit inéluctablement à une baisse sévère de l'acuité visuelle finale souvent inférieure à 1/10, généralement 5 à 10 ans après l'apparition de la maladie (Soubrane et al., 2007). La baisse visuelle est liée à l'extension de la zone d'atrophie qui

augmente en moyenne de 2.1 mm² par an (Sunness et al., 2007). Avec le temps, cette atrophie va s'étendre à la région fovéale, réduisant considérablement la vision.

- **Le scotome central** : il est appelée aussi tâche aveugle et accompagne généralement la diminution de l'acuité visuelle (Figure 23). La vision périphérique est, quant à elle, conservée même aux stades avancés de la maladie, puisque l'atteinte est principalement maculaire (Kolar, 2013).



Figure 23 : Représentation de la vision lors de la présence d'un scotome central.
<http://ophtalmologie.pro/le-champ-visuel-normal-et-les-alterations-pathologiques/>

- **L'apparition des métamorphosies** : ces déformations (horizontales, verticales ou obliques) constituent, avec la baisse visuelle et le scotome central, le syndrome maculaire (Figure 24). En règle générale, l'apparition des métamorphosies est prédictive de la formation de néo-vaisseaux (Kolar, 2013), même pour la forme atrophique où elle peut survenir dans 20 à 30% des cas (de Jong, 2006 ; Soubrane et al., 2007). Une distorsion soudaine de la vision accompagnée d'une diminution sévère de l'acuité visuelle chez une patient atteint de la forme atrophique de la DMLA est parfois prédictive d'une conversion de la maladie vers la forme exsudative (Kolar, 2013). Les métamorphosies sont systématiquement recherchées lors de l'examen oculaire avec le test de la grille d'Amsler par exemple.

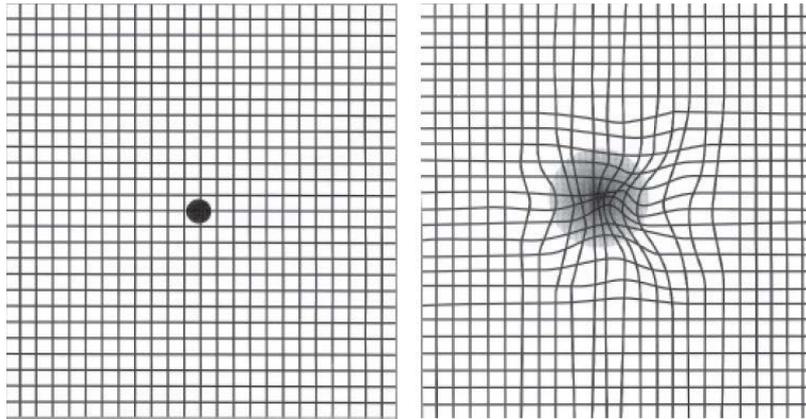


Figure 24 : Grille d'Amsler.

La grille d'Amsler, constituée de lignes horizontales et verticales, est un outil diagnostique qui aide à déceler les perturbations visuelles dues à des changements au niveau de la rétine, en particulier de la DMLA. Grille de gauche : observation normale. Grille de droite : observation des lignes déformées, signes d'un syndrome maculaire.

http://www.docvadis.fr/aobeffroi/page/L_oeil_et_les_examens/les_examens_des_yeux/la_grille_d_amsler.html

B. Symptômes anatomiques

Classiquement, c'est l'examen biomicroscopique du fond de l'œil qui permet d'établir le diagnostic. Chez un patient atteint de la DMLA, on peut observer la présence de drusen, d'altérations maculaires ainsi que quelques zones d'atrophie.

Les drusen sont une des caractéristiques de la maladie (Kolar, 2013). Premiers signes cliniques de la DMLA, ils sont localisés entre la membrane laminaire des cellules de l'EPR et la couche de collagène interne de la membrane de Bruch (Nivison-Smith et al., 2014).

Ces accumulations sont observables lors de l'examen du fond de l'œil quand leur taille est supérieure à 25 μm (De Jong, 2006). Les patients présentant des drusen dont la taille est supérieure à 125 μm ont plus de risques de développer la DMLA. Les drusen sont souvent associés à des altérations de l'épithélium pigmentaire de type hypo ou hyperpigmentation. Ce diagnostic est alors confirmé par un test d'acuité visuelle. Ainsi, les personnes ayant un résultat de l'ordre de 6/10 sont considérées comme atteintes de la DMLA (Soubrane et al., 2007). La DMLA est initialement unilatérale. Cependant, le risque de bilatérisation est d'environ 50% (Kolar, 2013).

La forme atrophique de la DMLA est spécifiquement caractérisée par la présence d'une atrophie chorio-rétinienne géographique (Figure 25), cliniquement définie par une

zone de perte des cellules de l'EPR (hypopigmentation) d'un diamètre supérieur à 175 μm associée à une atrophie de la choroïde (Nivison-Smith et al., 2014). Elle peut être aussi la conséquence secondaire d'un détachement des cellules de l'EPR ou d'une régression de la néovascularisation choroïdienne (Kolar, 2013). L'atrophie géographique va se développer plus ou moins rapidement suivant les patients. Il a été estimé que l'intervalle moyen entre l'apparition de la première zone d'atrophie et la cécité légale est d'environ 9 ans (Kolar, 2013).

Des études cliniques ont aussi montré une diminution du flux sanguin choroïdien au niveau de patients atteints de cette forme de la DMLA (Kolar, 2013).

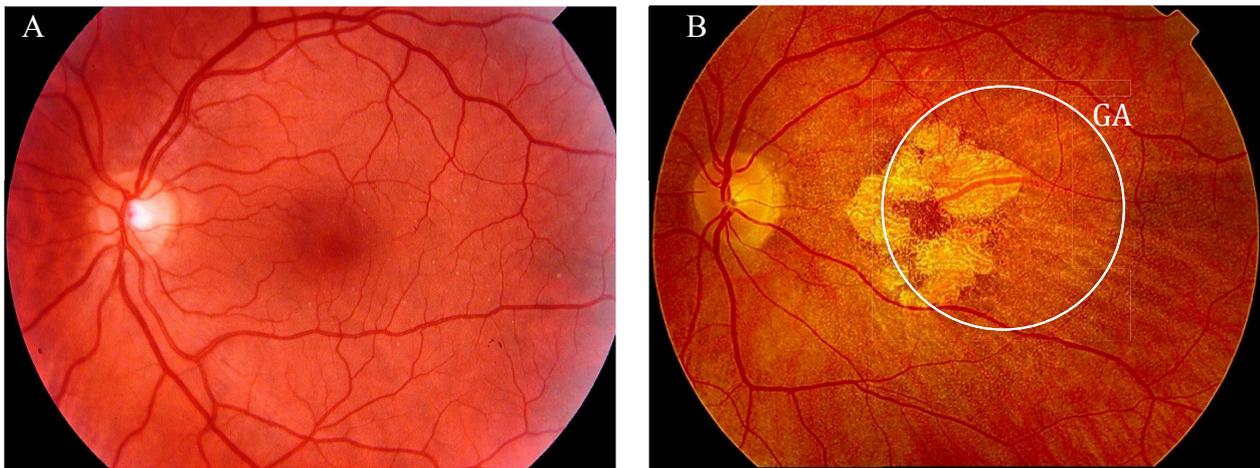


Figure 25 : A) Fond de l'œil normal. B) Fond de l'œil d'un individu atteint d'une DMLA atrophique. Observation d'une atrophie géographique (GA).

Adaptée d'après Soubrane, 2007.

II.2 - Epidémiologie

La DMLA affecte plus de 150 millions d'individus dans le monde (Zhang et al., 2017). En 2002, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) estime dans un rapport que 8,7% des cas de cécité dans le monde serait dus à cette pathologie, la classant ainsi à la troisième place, après la cataracte et le glaucome (Gehrs et al., 2006).

En Amérique du nord, en Europe et en Australie, la DMLA correspond à 50% des cas de perte de vision centrale (Parmeggiani et al., 2012). Cependant, sur le continent africain ou en Asie, la DMLA est loin d'être la première cause de malvoyance. Elle est responsable de 8% des cas au Japon, 1,9% au Nigéria et seulement 1% en Chine (Salomon-Yves et al.,

2014). Ces différences peuvent être expliquées par une hygiène alimentaire différente, une espérance de vie plus faible et un accès aux soins limités dans certaines parties du monde.

La majorité des études épidémiologiques portant sur la DMLA sont effectuées dans des pays industrialisés. De par l'augmentation de la longévité, il est prédit une hausse importante de la prévalence de cette maladie dans les prochaines décennies (Soubrane et al., 2007). Ainsi, aux Etats-Unis, il est estimé que le nombre de patients atteints de DMLA ou de MLA devrait atteindre 53 millions en 2020 contre 35 millions en 2000 (Johnson et al., 2000). Dans le monde, ce chiffre pourrait dépasser les 196 millions d'ici 2020 (Koh et al., 2017).

II.3 - Facteurs de risque individuels, systémiques et environnementaux

La DMLA est une maladie multifactorielle impliquant des facteurs de risques individuels, systémiques et environnementaux (Leveziel et al., 2009; Nivison-Smith et al., 2014).

A. Facteurs de risque individuels

A.1. L'âge

Des études épidémiologiques ont estimé que la prévalence des personnes de plus de 40 ans atteints d'une forme tardive DMLA est située entre 1,5 et 3,1% contre 3,69 et 7,7% pour les personnes de plus de 80 ans (Klein et al., 2007). L'âge est, en effet, le facteur de risque principal dans la DMLA (Leveziel et al., 2009). Ainsi, la prévalence de la DMLA s'accroît avec l'âge (Figure 26) passant de 50% des cas de cécité entre 75-84 ans à 75% après 85 ans (Parmeggiani et al., 2012).

Selon l'étude EUREYE réalisée sur une population européenne issue de 7 pays différents, 3,3% de la population de 65 ans et plus est atteinte de la DMLA, avec un rapport de 2 formes exsudatives pour une forme atrophique (à savoir que les formes mixtes sont considérées exsudatives)

Parallèlement à l'âge, on observe une augmentation du stress oxydatif, responsable de nombreux dysfonctionnements cellulaires impliqués dans de multiples maladies du vieillissement (Chang et al., 2014).

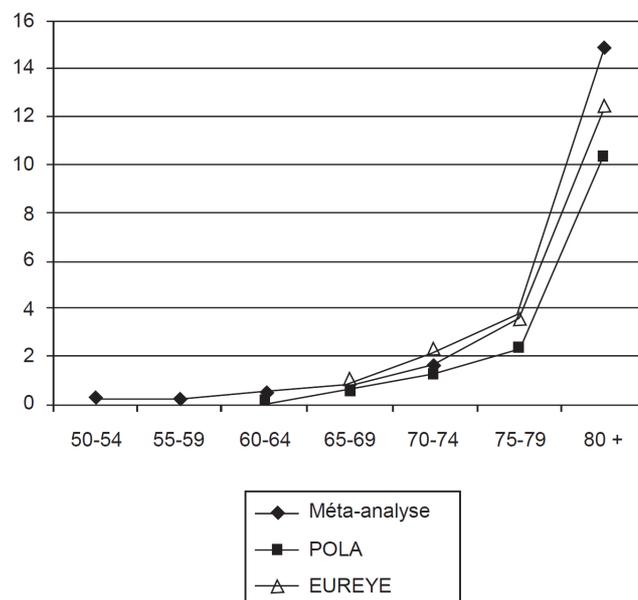


Figure 26 : Prévalence (%) de la DMLA par classes d'âge dans trois études : l'étude POLA, l'étude EUREYE et une méta-analyse d'étude réalisées dans les populations caucasiennes des pays industrialisés.
D'après Soubrane, 2007.

A.2. Le sexe

La question du rôle du sexe dans le développement de la DMLA est complexe. En effet, aucun lien entre sa prévalence et le sexe du patient n'a été démontré à l'heure actuelle (Chakravarthy et al., 2010; Rudnicka et al., 2012). Cependant, à travers le monde, les femmes représentent 2 personnes aveugles, ou atteintes de déficience visuelle, sur 3 avec un ratio de 1,46 (Stevens et al., 2013; Zetterberg, 2016). Ainsi, certaines études suggèrent une prévalence légèrement plus importante chez les femmes que chez les hommes (Chakravarthy et al., 2010; Smith et al., 1997). Ces différences pourraient être expliquées par une espérance de vie plus importante chez les femmes et un ajustement insuffisant pour l'âge dans les études statistiques (Soubrane et al., 2007).

A contrario, dans l'étude Beaver Dam Offspring Study (Klein, 2001), il a été mis en évidence que, dans la DMLA précoce et pour un âge inférieur à 55 ans, l'association sexe/DMLA est plus importante chez les hommes comparée aux femmes. Ceci pourrait

être expliqué par le système hormonal qui aurait un effet protecteur pour la jeune femme (Smith et al., 1997). Ainsi, après la ménopause, on ne retrouve naturellement plus de différences entre les deux sexes.

L'apparition de drusen avec l'âge a le même odds ratio (0,95) que ce soit chez un homme ou une femme. Cependant, ils sont significativement plus denses chez les hommes (OR : 1,90) (Klein, 2001). En ce qui concerne les cellules de l'EPR, l'étude Beaver Dam Offspring Study a montré que la dépigmentation de ces cellules est plus fréquente chez les hommes comparés aux femmes (OR : 2,79 et OR : 2,86 respectivement).

Au niveau chromosomique, aucune différence significative ($p=0,38-0,79$) dans l'incidence de la DMLA n'a été montrée pour les facteurs génétiques de CFH (rs1061170, rs1410996, and rs3766404), ARMS2 (rs10490924), et C3 (rs2230199) entre homme et femme (Popp et al., 2016).

A.3. L'origine ethnique

La proportion de cécité ou de déficience visuelle varie de façon importante à travers le monde (Figure 27). La déficience visuelle, aussi appelée malvoyance ou MVS (moderate and severe visual impairment), est définie comme une atteinte visuelle modérée ou sévère non améliorable par médicament, lunettes, lentilles ou intervention chirurgicale. Elle est caractérisée par une acuité visuelle comprise entre 1 et 3/10 pour le meilleur œil. Elle est estimée à 4-6% de la population africaine contre 16-24% de la population asiatique (Zetterberg, 2016).

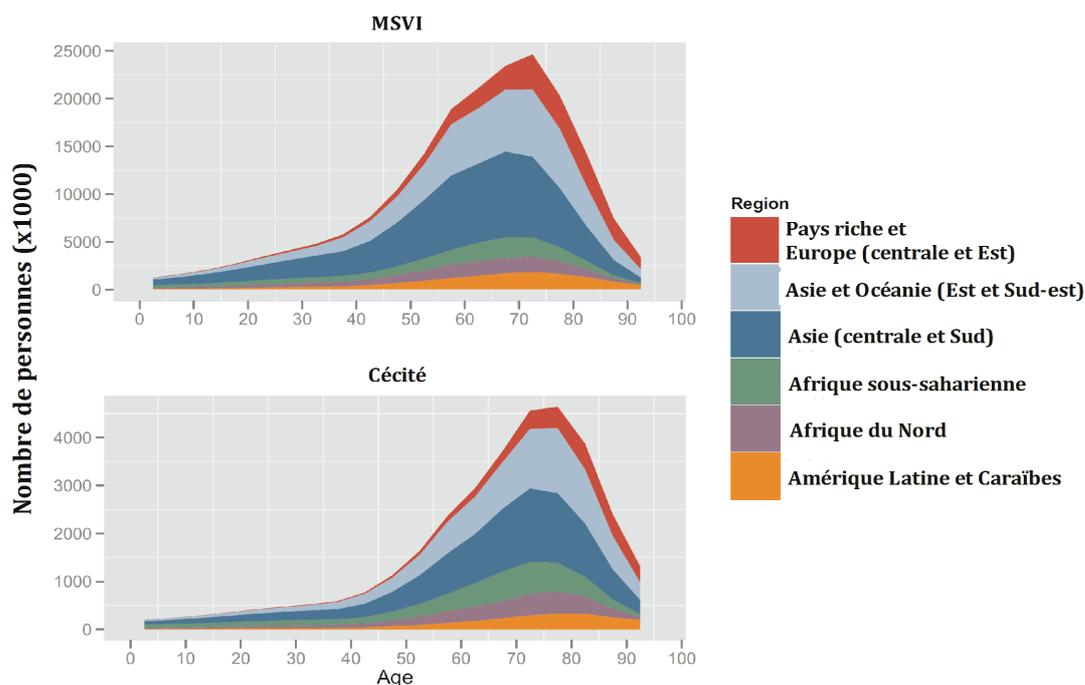


Figure 27 : Nombre de personnes dans la population globale atteintes de MSVI ou de cécité selon l'origine ethnique et l'âge.

Adapté d'après Stevens, 2013.

Dans le cas de la DMLA, plusieurs études affirment que le phénotype caucasien est plus à risque de développer cette maladie (AREDS rapport n°19, 2005; Zetterberg, 2016). En effet, selon l'étude MESA, la prévalence de la DMLA varie suivant l'origine ethnique : elle est de 2,4% chez les personnes mélanodermes, 4,2% chez les hispaniques ; 4,6% chez les sujets asiatiques et 5,4% chez les sujets caucasiens (Schachat et al., 1995). Pour les sujets âgés de 75 à 84 ans, cette prévalence est de 7,4% chez les personnes mélanodermes et de 15,8% chez les sujets caucasiens (Klein et al., 2006). Au niveau clinique, la présence de drusen intermédiaires et larges est plus importante chez les caucasiens avec un ratio de 1,8 (AREDS rapport n° 3, 2000).

Des disparités existent aussi au niveau de la forme de DMLA prépondérante suivant les continents (Leveziel et al., 2009). Ainsi, on observe une proportion plus importante de la forme atrophique dans la population norvégienne (Björnsson et al., 2006) islandaise (Jonasson et al., 2005) et indienne (Gupta et al., 2007) ; alors que la forme exsudative est plus fréquente au Japon (Kawasaki et al., 2008).

Un lien a été démontré entre origine ethnique et sexe. En effet, la prévalence de la DMLA est plus importante dans les pays industrialisés (ratio supérieur à 1,5) que dans les

régions du monde moins favorisées comme, par exemple, le sud du désert du Sahara où le ratio est de 1,1 (Zetterberg, 2016). Ce phénomène pourrait être expliqué par la différence entre l'espérance de vie, l'exposition aux facteurs environnementaux et le niveau socio-économique d'une femme et d'un homme, différence plus élevée dans les pays industrialisés.

B. Facteurs de risque génétiques

B.1. CFH, facteur de risque principal de la DMLA

- **Le facteur H du complément** : c'est une protéine de 155 kDa constituée de 20 domaines CCP (complement control protein) permettant la reconnaissance et la liaison avec différents ligands (Langford-Smith, 2013). Cette protéine est synthétisée dans le foie par les hépatocytes et participe à la régulation du système immunitaire via l'inhibition du système du complément. Dans le cas de la rétine, le facteur H du complément est sécrété par les cellules de l'EPR (Calippe et al., 2014).

Le polymorphisme CFH Y402H est le facteur de risque génétique majeur dans le développement de la DMLA (Clark et al., 2010)

- **Le système du complément** : la première défense d'un organisme contre un agent infectieux est le système immunitaire dit inné (Calippe et al., 2014; Mullins et al., 2017). On retrouve trois voies activées dans ce système : l'inflammation, le système du complément et les cellules du système inné.

Le système du complément est un groupe de 30 protéines dont l'action va induire la sécrétion rapide d'enzymes entraînant la lyse des corps étrangers (Arbore et al., 2017). Il a aussi un rôle important dans la chimiotaxie, dans l'opsonisation et la clairance des corps apoptotiques. Suivant le type d'agents infectieux, des voies différentes vont être mises en place : la voie alterne est activée par les bactéries, les virus, les levures ; la voie classique est activée par la reconnaissance antigène-anticorps ; et la voie des lectines est activée par des protéines globulaires (Mullins et al., 2017). Les 3 voies vont aboutir au clivage de la protéine C3 en C3a et C3b par la C3 convertase. C3 est le facteur pivot du système du complément : son clivage va permettre d'une part, l'assemblage du complexe d'attaque

membranaire (MAC) ; et d'autre part, le recrutement des globules blancs (Mullins et al., 2017).

En situation normale, la voie alterne du système du complément est à un niveau faible d'activation aboutissant à la présence constante de C3 clivée en C3a et C3b. Afin d'éviter une activation incontrôlée de ce système et donc de garder faible cette quantité de C3, le facteur H du complément va inhiber, en situation normale, l'action de la C3 convertase et de C3b via le co-facteur I.

Lors de la présence d'un agent infectieux, la liaison de CFH à celui-ci va lever l'inhibition permettant ainsi la mise en place de la cascade aboutissant à la formation du MAC (Figure 28).

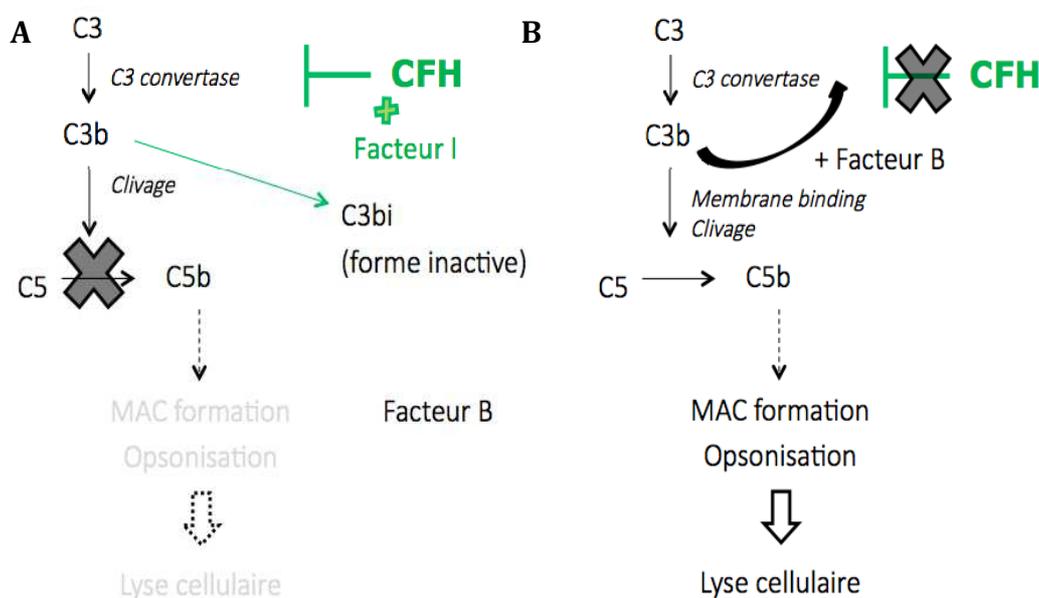


Figure 28 : Système du complément en condition normale (A) ou lors de sa cascade d'activation aboutissant à la lyse cellulaire (B).

C3 : Facteur C3 ; C3b : Fraction b de C3 ; C5 : Facteur C5 ; C3bi : forme inactive de C3b ; CFH : Facteur H du complément ; MAC : Complexe d'attaque membranaire.

- **Implication dans la DMLA :** le lien entre système du complément et développement de la DMLA a été clairement établi (Mullins et al., 2017). En effet, il existe différentes mutations de *CFH* impliquées dans le développement de cette maladie, dont la plus fréquente, le polymorphisme Y402H, présent à hauteur de 30% dans la population globale (Langford-Smith et al., 2013). Il correspond à un changement nucléotidique d'une tyrosine pour une histidine à la position 402. L'odds ratio du variant Y402H est d'environ 2-3 pour la forme hétérozygote et 6-7 pour la forme homozygote.

On ne connaît pas encore avec exactitude l'impact de ce polymorphisme, mais il semble que la mutation Y402H réduit la capacité du facteur H à réguler correctement le système du complément, aboutissant à sa suractivité (Nita et al., 2014). Ainsi, ce variant va provoquer une diminution de l'affinité de CFH pour d'autres molécules comme les glycosaminoglycanes, les malonaldéhydes, les lipides oxydés et la protéine C réactive ou CRP (Calippe et al., 2014; Nita et al., 2014). Cette réduction de liaison à la CRP semble faciliter l'inflammation chronique et induit une présence plus importante de cette protéine au niveau sanguin (Nita et al., 2014). Une étude réalisée sur 544 participants en Australie a mis en évidence qu'un taux élevé de la CRP au niveau du sang augmente de 19,3 (96% CI, 2,8-134) fois le risque de développer une DMLA (Robman et al., 2010). Par ailleurs, il a été montré, dans une étude américaine sur 44 individus, que les personnes atteintes d'une DMLA et porteuses du variant à risque ont un niveau de cytokines pro-inflammatoires plus important dans le sang comparés aux personnes sans allèle à risque (Cao et al., 2013).

Ce polymorphisme semble aussi être impliqué dans la formation des drusen. En effet, des études histopathologiques ont montré que les drusen contiennent, entre autre, des régulateurs du complément dont le facteur H du complément (Clark et al., 2010). De plus, les patients atteints d'une DMLA atrophique ont des dépôts plus denses lorsqu'il sont porteurs de l'allèle à risque du gène *CFH* (Calippe et al., 2014).

B.2. Autres facteurs de risque génétiques

Selon des études d'agrégation familiale, la contribution relative de l'hérédité dans l'étiologie de la DMLA serait d'au moins 25% (Hageman et al., 2005). Il y a quatre voies principales dans lesquelles on retrouve des polymorphismes à risque : l'homéostasie lipidique, la voie inflammatoire, l'organisation de la matrice cellulaire et le stress oxydatif (Tableau III).

Lors de la présence de plusieurs variants, le risque de développer une DMLA augmente considérablement. Ainsi, une personne double hétérozygote pour les variants à risque de *CFH* et *ARMS2* aura un odds ratio de 57,6 (Rivera et al., 2005). Si l'on ajoute à ces deux variants le polymorphisme du gène *C2*, on multiplie par 250 le risque de développer cette maladie (Scholl et al., 2009).

Tableau III : Récapitulatif des principaux facteurs de risque génétiques pour la DMLA, leur rôle, leur localisation chromosomique, les principaux polymorphismes associés et les odds ratio pour les formes homozygote (HM) et hétérozygote (HZ).

Rôle	Gène	Chromosome	Polymorphisme	Odds Ratio HZ/HM	Référence
Homéostasie lipidique	ApoE	19q13.2	rs429358	0,42	Kaur, 2006
	SCARB1	12q24.31	rs9919713	0,60	Meyers, 2014
	ELOVL4	6q14	Rs3812153	0,29/0,71	Conley, 2005
Voie inflammatoire	CFH	1q32	rs1061170	2,4/5,9	Zarepars, 2005
	CFB	6p21.3	rs4151667 rs641153	0,36 0,32/0,21	Gold, 2006 Spencer 2007
	C2	6p21.3	rs9332739	0,44	Spencer 2007
	C3	19p13.3- p13.2	rs2230199	1,55	Spencer 2007
Matrice cellulaire	HTRA1	10q26	rs11200638	1,43/4,96	Chen, 2011
	Fibulin 5	14q32.1	-	-	Stone 2004
Stress oxydatif	ARMS2	10q26.13	rs10490924	2,4/7,3	Conley, 2006
	ABCA4	1p22	rs1800553	5,2	Baum, 2003

C. Facteurs de risque environnementaux

C.1. Le tabac

Le tabac est responsable de la production de stress oxydatif, de l'activation du système du complément et d'une dérégulation du métabolisme lipidique

(Kunchithapautham et al., 2014). Même si certaines études ne montrent pas de lien significatif entre tabagisme et DMLA (Dandekar et al., 2006), de plus en plus d'analyses suggèrent que le tabac est le facteur environnemental le plus important dans la DMLA (Nivison-Smith et al., 2014; Yu et al., 2012) sans différence entre les hommes et les femmes (Khan et al., 2006).

Le tabac aurait un effet néfaste sur la rétine, les cellules de l'EPR et la choroïde. A l'heure actuelle, les mécanismes de son action ne sont pas encore clairement établis (AREDS rapport n° 3, 2000). Cependant, son rôle dans la diminution des molécules antioxydantes a été suggéré. En effet, un fumeur de 20 cigarettes par jour n'aurait que 72% du taux de β -carotène plasmatique d'une personne non fumeuse (Stryker et al., 1988).

Selon une méta-analyse (Beaver Dam Eye Study, the Rotterdam Study et the Blue Mountains Eye Study) regroupant 14 762 individus, le risque de développer une DMLA chez les fumeurs est 3 fois plus important que chez les non-fumeurs (Klein et al., 2013; Mitchell et al., 2002; Vingerling et al., 1996). Ainsi, l'odds ratio augmente, passant de 2,6 (forme exsudative) et 4,8 (forme atrophique) pour les fumeurs à 1,7 pour les non ou anciens fumeurs (Chakravarthy et al., 2007). Il apparaît, de plus, que le tabagisme induirait aussi une progression de la forme atrophique vers la forme exsudative de la DMLA.

Le tabagisme passif est, lui aussi, associé à une augmentation du risque de développer la DMLA avec un odds ratio de 1,87 (Khan et al., 2006).

C.2. Régime alimentaire

A travers les apports des vitamines, des lipides et des oméga 3, l'alimentation semble être impliquée dans le développement de la DMLA.

En effet, une alimentation riche en graisses va être responsable d'une augmentation du risque de développer une DMLA (Seddon et al., 2001). Ainsi, un taux de cholestérol élevé est associé à un risque relatif de développer une DMLA atrophique de 1,16 (IC95% ; 1,02-1,32 ; p=0,03) (Klein et al., 2013; Mitchell et al., 2002). L'implication des lipides est aussi confortée par le rôle de l'apolipoprotéine E, un transporteur de lipides, comme facteur de susceptibilité génétique (Golestaneh et al., 2017).

Souvent associée à une alimentation riche, l'obésité est aussi un facteur environnemental qui semble contribuer au risque d'être atteint de la DMLA (Zetterberg, 2016). Ainsi, le rapport n°19 de l'AREDS établit une association significative entre l'indice de masse corporel (IMC) et le prévalence de la DMLA atrophique, avec pour les sujets ayant un IMC supérieur à 30 un risque relatif de 1,93 (IC95% ; 1,25-2,65 ; p<0,05) (AREDS rapport n°19, 2005). Associé à d'autres facteurs de risque tels que l'âge et le tabac, ce risque relatif augmente à 2,15 (IC95%, 1,35-3,45 ; p=0,001) chez les personnes obèses comparées à celles ayant un IMC normal.

C.3. Autres facteurs de risque environnementaux

D'autres facteurs ont été suggérés comme étant à risque dans le développement de la DMLA tels que l'alcool, le niveau d'étude, l'hypertension, la couleur de l'iris, l'exposition à la lumière, les accidents cardio-vasculaires (AREDS rapport n°19, 2005; Leveziel et al., 2009 ; Soubrane et al., 2007 ; Zetterberg, 2016). Cependant, aucune association statistique n'a été mise en évidence pour aucun de ces paramètres.

III. Synthèse des mécanismes pathogéniques de la DMLA

Théorie de Hogan (1972) :

« La DMLA est causée par une anomalie primitive de l'épithélium pigmentaire, due à une mauvaise élimination des produits de dégradation des disques des photorécepteurs »

La membrane de Bruch, les cellules de l'EPR et les photorécepteurs constituent un ensemble fonctionnel au niveau du système visuel : l'atteinte d'un de ces composants peut affecter la totalité de cette structure (Soubrane et al., 2007). Une des hypothèses de la DMLA est que le dysfonctionnement des cellules de l'EPR soit l'évènement initial, suivi par la mort des photorécepteurs et par un amincissement de la choriocapillaire (Bonilha, 2008).

Lors du développement de la DMLA atrophique, il est observé une diminution de l'efficacité de la phagocytose des SEP par les cellules de l'EPR. Ce processus va entraîner une accumulation des disques d'opsine non recyclés (Wang et al., 2009).

En parallèle, à cause de l'accumulation importante de lipofuscine avec l'âge, les cellules de l'EPR perdent leur forme cubique et régulière en augmentant de volume, ce qui va aboutir à leur dégénérescence (Soubrane et al., 2007). Les cellules restantes vont se différencier et migrer vers ces zones de perte cellulaire, ceci permettant dans un premier temps de maintenir la continuité épithéliale. Lorsque ce processus n'est plus à même de conserver l'organisation en épithélium, une atrophie en résulte (Soubrane et al., 2007). Ces zones atrophiques sont souvent associées à des zones d'hyperpigmentation (Bowes Rickman et al., 2013). En effet, les cellules de l'EPR dont la taille a augmenté sont hyperpigmentées et contiennent de nombreux granules de lipofuscine et de mélanolipofuscine.

De par leur nombre et leur capacité de phagocytose qui a largement diminué, les cellules de l'EPR restantes ne peuvent plus éliminer tous les débris cellulaires (Kolar, 2013). Ces débris vont s'amplifier par la production, induite par les cellules de l'EPR, de métalloprotéinases de la matrice (MMPs). En effet, l'activité de ces protéines, responsables de la dégradation de la matrice extracellulaire, va être diminuée par l'atteinte des cellules de l'EPR (Kolar, 2013). L'ensemble va aboutir à la mise en place de phénomènes pro-inflammatoires et l'apparition de cellules mononucléaires entre la membrane de Bruch et les cellules de l'EPR. Ces cellules fusionnent généralement entre elles pour donner une cellule géante qui est plus spécifique de l'inflammation chronique.

Lors de l'extension de la zone atrophique, les dépôts deviennent de plus en plus présents. La couche nucléaire externe disparaît et la couche plexiforme externe repose directement sur les dépôts laminaires basaux (Soubrane et al., 2007). Les drusen régressent progressivement, à cause d'une part, de la diminution de débris cellulaires et d'autre part, par l'action des macrophages activés par la réaction inflammatoire secondaire déclenchée lors de la dégénérescence des cellules de l'EPR.

L'étape finale de ce processus dégénératif de la DMLA atrophique est la mort des photorécepteurs.

L'atteinte de la choroïde est plus tardive, elle survient après la dégénérescence des cellules de l'EPR (Kolar, 2013). En effet, la choriocapillaire présente sous les dépôts de la membrane de Bruch reste normale dans un premier temps, ce qui souligne que les

altérations de ce système sont secondaires. Avec l'extension de l'atrophie, la lumière des capillaires se rétrécit et les fenestrations diminuent, le réseau choroïdien s'interrompt au sein de la zone atrophique (Soubrane et al., 2007).

L'atrophie de la choriocapillaire est un processus que l'on retrouve dans de multiples affections telles que les rétinopathies pigmentaires, l'atrophie de gyrée et l'intoxication à la thioridazine. À tout moment, une néo vascularisation peut opérer. En effet, dans 10 à 15% des cas, la forme atrophique de la DMLA peut se transformer en forme exsudative (Soubrane et al., 2007).

IV. Les différentes hypothèses physiopathologiques de la DMLA

Les processus impliqués dans le développement de la DMLA sont les mêmes que ceux du vieillissement normal mais en accéléré. Distinguer ces deux processus semble donc être la clé pour la compréhension de la pathogénèse de la DMLA.

La fonction vitale d'un organe est définie au cours du temps par des facteurs génétiques et des facteurs environnementaux qui seront à l'origine de sa défaillance plus ou moins rapide. Dans le cas de la DMLA, certains facteurs comme les gènes de susceptibilité, l'exposition à la lumière ou le tabagisme, sont considérés comme des facteurs de risque puisque leurs actions semblent accélérer le déclin de la fonction visuelle via la mort des photorécepteurs. L'association de plusieurs facteurs de risque, individuels et/ou systémiques et/ou environnementaux, avec le vieillissement pourrait donc induire une cascade d'événements aboutissant au développement de la DMLA (Nivison-Smith et al., 2014). La question est de se demander quels facteurs provoquent cette accélération pathologique. De nombreuses hypothèses ont été posées : l'hypothèse inflammatoire, l'hypothèse oxydative et l'hypothèse du remodelage matriciel. La DMLA est une maladie complexe qui ne peut pas être expliquée par l'implication d'un seul système. Les trois hypothèses principales semblent donc être intriquées dans le processus physiopathologique.

IV.1 - L'hypothèse inflammatoire

L'hypothèse inflammatoire est basée principalement sur la mise en évidence de marqueurs de l'inflammation au niveau des cellules de l'EPR et des drusen au niveau de sujets atteints de la DMLA (Anderson et al., 2002).

Les drusen sont les premières manifestations cliniques de la DMLA (Gehrs et al., 2006; Nita et al., 2014). Ils sont constitués de protéines du système immunitaire, de lipides, de cholestérols, de protéines de la matrice et de carbohydrates (Nivison-Smith et al., 2014). La présence de composés ayant pour origine le système du complément, tels que C3, CFH et C5, suggère qu'un processus inflammatoire est impliqué dans la formation des drusen (Anderson et al., 2002; Gehrs et al., 2006).

Les drusen vont être responsables de nombreux dysfonctionnements. Au niveau de la membrane de Bruch, les drusen vont participer à son épaissement et ainsi altérer les mécanismes de transport entre la choroïde et les cellules de l'EPR (Nivison-Smith et al., 2014). La présence des drusen va aussi affecter l'activité lysosomale des cellules de l'EPR et le métabolisme du cholestérol (Boes Rickman, 2013), phénomène aboutissant à une augmentation de la production de débris par ces cellules et contribuant à la progression des drusen (Nivison-Smith et al., 2014). De plus, les drusen vont également impacter la survie des photorécepteurs et sont donc associés à l'amincissement de la couche nucléaire externe (Gehrs et al., 2006). En effet, dans les zones où sont retrouvés les drusen, les photorécepteurs présentent un phénotype morphologique et biochimique typique d'un processus de dégénération (Gehrs et al., 2006).

Des facteurs génétiques de risque pour le développement de la DMLA sont aussi impliqués dans le système inflammatoire, tels que les protéines du système du complément. Ainsi, il a été démontré que la réponse locale du système du complément est responsable de lésions précoces caractéristiques de dégénérescences maculaires, les dépôts laminaires basaux (Fernandez-Godino et al., 2015).

Cependant, il est possible que ces phénomènes inflammatoires soient la conséquence de processus oxydatifs sur le long terme. En effet, il a été mis en évidence que le stress oxydatif va moduler l'expression du facteur H du complément, l'inhibiteur

principal du système du complément (Wu et al., 2007). Ainsi, au niveau de cellules de l'EPR, l'induction d'un stress oxydatif va induire une diminution de l'expression de *CFH* via l'interféron gamma, une cytokine inflammatoire. Le déséquilibre inflammatoire retrouvé dans la DMLA pourrait donc être une conséquence d'un stress oxydatif initial important.

IV.2 - L'hypothèse oxydative

Le stress oxydatif est depuis longtemps considéré comme le facteur principal impliqué dans la dérégulation des cellules de l'EPR et le développement de la DMLA (Datta et al., 2017). En effet, la DMLA est une pathologie du vieillissement, processus caractérisé par une augmentation du stress oxydatif. De plus, plusieurs facteurs de risques environnementaux, tels que le tabac ou le régime alimentaire, sont impliqués dans la DMLA comme facteurs pro-oxydants. Depuis la dernière décennie, plus de 40 variants génétiques ont été identifiés comme étant associés à un risque de développer la DMLA, incluant des protéines impliquées dans le stress oxydatif (Datta et al., 2017).

De plus en plus d'études suggèrent que le fer joue un rôle dans la production des ERO et le développement de la DMLA. En effet, on retrouve une accumulation de fer anormale au niveau de la macula, des cellules de l'EPR et des drusen chez les personnes atteintes de cette maladie (Chen et al., 2009; Dentchev et al., 2005). Il a pu aussi être observé dans un modèle murin déficient pour la céruloplasmine et l'héphaestine (une enzyme ferroxidase synthétisée par le foie) une accumulation de fer dans la rétine avec l'âge associée à une dégénérescence rétinienne caractéristique de la DMLA (Chen et al., 2009). Il se révèle par ailleurs toxique pour les cellules de l'EPR et les photorécepteurs dans une autre pathologie oculaire, la sidérose, une atteinte de la vision causée par des dépôts intraoculaires de fer (He et al., 2007).

Le fer peut aussi être responsable de l'accumulation de lipofuscine à l'intérieur et à l'extérieur des cellules de l'EPR. La lipofuscine est un produit de la phagocytose, non dégradable et qui s'accumule au cours du temps dans le système lysosomal des cellules post-mitotiques comme les cellules de l'EPR (Sparrow and Boulton, 2005). Cette formation est due à une dégradation autophagique incomplète menant à la production intra-lysosomale de radicaux libres par le fer et mène à la diminution de l'autophagie, la perméabilisation de la membrane lysosomale et à l'apoptose. Dans les cellules de l'EPR, les protéines du métabolisme du fer ont pour rôle de maintenir un niveau faible de fer libre

permettant une autophagie importante et une résistance à l'environnement oxydatif. Un excès de fer, comme on peut le retrouver dans la DMLA, est donc associé à une diminution de l'autophagie et à une production de lipofuscine. Le stress oxydatif induit va sensibiliser le système lysosomal et favoriser la mort cellulaire (Karlsson and Kurz, 2016; Krohne et al., 2010a; Kurz et al., 2011).

Dans leur étude, Yefimova et al., ont établi dans un modèle animal de dégénérescence rétinienne, le rat RCS (Royal College of Surgeons), que l'accumulation de fer augmente avec la progression de la mort cellulaire et que cet excès n'est dû ni à un défaut d'absorption ni à un défaut de stockage (Yefimova et al., 2002). Cette augmentation intracellulaire de fer est en effet corrélée à une hausse de l'expression de la ferritine, protéine responsable du stockage intracellulaire (Chen et al., 2009). Au niveau fonctionnel, l'accumulation de fer aurait pour conséquence la diminution des interactions entre les cellules de l'EPR et les photorécepteurs (Yefimova et al., 2002). L'hypothèse est que l'altération de la communication entre cellules de l'épithélium pigmentaire et photorécepteurs aboutit à la formation de débris qui bloquent les voies de transit du fer induisant ainsi son accumulation. L'accumulation de fer est source de radicaux libres responsables de l'augmentation du stress oxydatif et de la dégénérescence des cellules de l'EPR.

D'un point de vue anatomique, la macula est une zone particulièrement exposée au stress oxydatif en raison de son exposition constante à la lumière et à la consommation importante d'oxygène dans ce tissu (Bonilha, 2008; Garcia et al., 2015 ; Khandhadia and Lotery, 2010). En effet, les cellules de l'EPR, dont le métabolisme est hautement énergétique, comportent de nombreuses mitochondries, l'organite responsable de la majorité de la production des ERO (Datta et al., 2017). Lors de la phagocytose des SEP par ces cellules, il y a par ailleurs génération d' H_2O_2 par l'enzyme NADH oxydase du phagosome, contribuant à une production de ERO élevée (Datta et al., 2017).

Pour se protéger de ce stress oxydant, différents mécanismes cellulaires existent, telle que l'autophagie. L'autophagie est un processus lysosomal responsable de la dégradation des constituants cellulaires endommagés ou non essentiels (Golestaneh et al., 2017). Elle va permettre le maintien de l'homéostasie cellulaire et participe à la protection contre le stress oxydatif (Datta et al., 2017). Or, il a été démontré que cette fonction est dérégulée dans les cellules de l'EPR provenant de patients souffrant de la DMLA atrophique

(Golestaneh et al., 2017). Ce dysfonctionnement peut affecter le système de fission/fusion mitochondriale, essentiel pour conserver des mitochondries fonctionnelles (Youle and van der Bliek, 2012). La présence de mitochondries dont la fonction est altérée au niveau de cellules de l'EPR sera responsable d'une surproduction de stress oxydatif (Golestaneh et al., 2017). De plus, une dérégulation de l'autophagie peut participer à l'accumulation intracellulaire (lipofuscine) et extracellulaire (drusen) de débris toxiques et induire un dysfonctionnement des cellules de l'EPR (Song et al., 2017). Ainsi, il a été observé que lors de l'induction d'un stress oxydant *in vitro*, les cellules de l'EPR montrent une altération de la phagocytose et de leur activité lysosomale (Chen et al., 2009). Ces phénomènes peuvent aussi contribuer à l'accumulation extracellulaire de déchets non dégradés.

IV.3 - L'hypothèse du remodelage matriciel

La matrice extracellulaire désigne l'ensemble des macromolécules extracellulaires du tissu conjonctif ou d'autres tissus. Cette structure est essentielle pour le transport de nutriments et dans la régulation de processus physiologiques telles que la différenciation, la migration ou l'adhésion cellulaire (Nita et al., 2014). L'hypothèse matricielle repose sur le principe que les anomalies de structure de la matrice extracellulaire rétinienne seraient à la base du développement de la DMLA. Plusieurs arguments sont en faveur de cette hypothèse.

Premièrement, les modifications structurales de la membrane de Bruch. En effet, de façon concomitante à l'accumulation de la lipofuscine dans les cellules de l'EPR, des dépôts (composés de collagène, de corps résiduels, de matériels granulaires ainsi que de dépôts cristallins) se forment au niveau de la membrane de Bruch provoquant son épaissement (Gehrs et al., 2006). Elle subit aussi une forte hyalinisation au niveau basal réduisant encore plus sa perméabilité (Soubrane et al., 2007).

La formation de dépôts est une des modifications morphologiques les plus précoces associées au développement de la DMLA (Nivison-Smith et al., 2014). Il existe deux types de dépôts basaux, ceux dits laminaires (entre la membrane des cellules de l'EPR et la membrane de Bruch) et ceux dits linéaires (entre la laminaire basale des cellules de l'EPR et la couche interne de collagène de la membrane de Bruch). Actuellement, il n'est pas encore exactement déterminé l'impact de ces dépôts sur le développement de la maladie.

Ils peuvent ainsi être, soit une conséquence du dysfonctionnement des cellules, soit participer à la pathogénèse de la DMLA en contribuant à la formation des drusen (Nivison-Smith et al., 2014; Sarks, 1976). En effet, il a été montré que l'accumulation de EFEMP1 (EGF Containing Fibulin Like Extracellular Matrix Protein 1), une protéine de la matrice extracellulaire de la famille des fibulines, aboutit à une matrice extracellulaire anormale associée à une hyperactivation du système du complément impliqué dans l'hypothèse inflammatoire de la DMLA (Fernandez-Godino et al., 2015). L'altération de la matrice extracellulaire pourrait donc être à l'origine de la production de dépôts, aboutissant au dysfonctionnement des cellules de l'EPR. Ceci contribuerait au développement de la DMLA (Glenn et al., 2012).

Deuxièmement, comme il l'a été mentionné dans le paragraphe intitulé « Autres facteurs génétiques », certains facteurs de risques génétiques associés au développement de la DMLA sont impliqués dans le remodelage matriciel telle que HTRA1 (high-temperature requirement A serine peptidase 1) ou la fibulin5.

V. Prévention & traitement de la DMLA

Actuellement il n'existe pas de traitement curatif pour la DMLA. Les patients atteints par la forme atrophique de la maladie sont reçus en consultation afin d'évaluer l'évolution de la dégénérescence mais aucune intervention n'est possible, en dehors de la rééducation visuelle à des stades avancés de la maladie.

La connaissance des facteurs de risque environnementaux constitue actuellement un enjeu majeur en terme de prévention de la DMLA (Leveziel et al., 2009). En effet, modifier ces facteurs est actuellement la seule approche possible pour diminuer les risques de développer cette maladie (Ho et al., 2011). Ainsi, pour les personnes atteintes de formes précoces de la DMLA, l'arrêt du tabac est préconisé, réduisant le risque de progression de la maladie vers le stade tardif (Noble and Chaudhary, 2010). De plus, une modification du régime alimentaire, avec une présence importante de fruits et de légumes, aurait un effet protecteur contre la DMLA (Tan et al., 2008). Depuis la mise en évidence de l'effet bénéfique des compléments alimentaires dans la DMLA (Carneiro and Andrade, 2017), l'AREDS recommande de prescrire, pour les personnes de 55 ans et plus, ainsi que pour

celles ayant un risque de développer une DMLA, une supplémentation alimentaire en vitamines et en zinc (Smailhodzic et al., 2014).

Afin de pouvoir mettre en place de nouvelles thérapeutiques, une meilleure compréhension des mécanismes sous-jacents de la DMLA est nécessaire. L'amélioration du diagnostic, avec le développement de techniques d'imagerie, est essentielle pour prévenir au plus tôt la perte d'acuité visuelle (Nivison-Smith et al., 2014). Un examen oculaire régulier chez la personne âgée et donc essentiel pour une meilleure prise en charge de la maladie. Ainsi pour un patient de plus de 55 ans sans facteur de risque, un examen tous les deux ans est recommandé (Kolar, 2013).

V.1 – Les compléments alimentaires

Aujourd'hui, les compléments alimentaires sont le seul traitement disponible pour diminuer le risque de développer une DMLA ou ralentir sa progression. L'implication de plusieurs facteurs a été confirmée par différentes études cliniques : les antioxydants (vitamines C, E et β -carotène principalement), le zinc, les carotène (lutéine et zeaxanthine) et les acides gras oméga 3 (Carneiro and Andrade, 2017).

L'étude AREDS, effectuée sur 4757 patients âgés de 55 à 80 ans, a analysé l'impact de différentes combinaisons antioxydantes sur la progression de la DMLA sur une période de 5 ans. Ainsi, les patients ont reçu quotidiennement une dose de 500 mg de vitamine C, 400 UI de vitamine E, 15 mg de β -carotène et 80 mg de zinc (Tan et al., 2008). Il est intéressant de noter que ces doses sont supérieures aux doses quotidiennes recommandées (McCusker et al., 2016). Dans cette étude, il ont montré une diminution de la progression de la DMLA lors d'une supplémentation alimentaire en zinc seul ou avec des antioxydants (vitamines C et E, β carotène) de 17% et 21% respectivement (AREDS 1 report n°8, 2001).

L'effet bénéfique de ce traitement nutritionnel a été conforté par une autre étude clinique, la Rotterdam study, avec cette fois-ci une diminution de l'incidence de la DMLA de 35% lors de la prise de ces compléments alimentaires (Ho et al., 2011).

Afin d'améliorer les effets positifs de cette supplémentation, une seconde étude (AREDS 2, 2013) durant laquelle les participants ont augmenté leur consommation en

caroténoïdes (via la lutéine et le zeaxanthine) et en oméga-3 (acide ocosaénoïque et eicosapentaénoïque) en plus de la combinaison d'antioxydants et de zinc a été réalisée. Cette association n'a pas permis d'obtenir un impact bénéfique plus important sur la diminution de la progression ou l'acuité visuelle. Cependant, le β carotène a été montré comme augmentant le risque de développer un cancer du poumon chez les ex-fumeurs. De plus, le β carotène est associé à un risque important de développer une DMLA exsudative (Tan et al., 2008). L'utilisation de la lutéine et la zeaxanthine, capable d'absorber la lumière bleue et de bloquer les ERO (Tan et al., 2008), est jugée plus appropriée dans la prévention/traitement de la DMLA. Ces deux composés ne sont pas synthétisés de façon endogène, ils sont retrouvés dans les fruits et légumes et donc apportés uniquement par l'alimentation (Carneiro and Andrade, 2017).

Pour la forme exsudative, plusieurs thérapies sont aussi basées sur la prise de compléments alimentaires visant à réguler la néovascularisation (Bowes Rickman et al., 2013). La prise de compléments alimentaires a donc un impact bénéfique sur le développement de la DMLA. Il a aussi été observé que la supplémentation alimentaire en vitamines pour un patient atteint d'une DMLA atrophique réduit le risque de conversion vers une forme exsudative de 25% (Kolar, 2013). Depuis la publication de ces résultats, de nombreux médecins suggèrent à leurs patients de prendre chaque jour des compléments alimentaires visant à renforcer leurs barrières antioxydantes (AREDS 1 report n°8, 2001).

Les facteurs génétiques semblent jouer un rôle important dans la réponse à certains compléments alimentaires (Leveziel et al., 2009). En effet, il a été montré qu'il existe des interactions possibles entre ces suppléments vitaminiques et antioxydants et des variants à risque. Ces interactions sont illustrées, par exemple, par une atténuation de l'effet bénéfique du traitement. Ainsi, après une thérapie de 12 ans, la maladie a progressé de 36% chez les patients avec le polymorphisme normal de *CFH* contre 57% pour ceux ayant le polymorphisme à risque. De plus, seulement 11% des personnes à risque pour *CFH* Y402H répondent de façon bénéfique au traitement au zinc contre 68% des patients au variant classique (Awh et al., 2013). Il semble même que la thérapie à base de zinc accélère la progression de maladie chez les personnes à risque pour *CFH* ($P=0,0111$).

Au point de vue cellulaire, une prise quotidienne de zinc semble avoir un impact sur le métabolisme du système de complément chez les patients DMLA (Smailhodzic et al., 2014). En effet, le zinc interagit avec *CFH* jouant ainsi sur l'activation du système du

complément. Dans le cas du variant Y402H, l'interaction de CFH avec les sites d'activation est diminuée ; ce processus semble exacerbé par la supplémentation en zinc (Awh et al., 2013).

Des résultats similaires ont été décrits pour le polymorphisme de ARMS2. Ainsi, la thérapie avec des antioxydants est associée avec une progression de la maladie sur 12 ans de 37% pour les patients avec un polymorphisme normal, 61,2% pour ceux ayant un allèle à risque et 76,6% pour ceux avec deux allèles à risque (Awh et al., 2013). La prise orale d'antioxydants serait responsable de dommages rétinien via un mécanisme non compris mais dépendant de la fonction de ARMS2 (Awh et al., 2013). Ainsi, il convient de prescrire dans leur cas un mélange constitué uniquement d'antioxydants. La découverte des variants impliqués dans la DMLA nous permettrait donc aujourd'hui de classer les patients suivant génotype et d'optimiser la prescription des compléments alimentaires.

V.2 – Réhabilitation de la basse vision

La réhabilitation de la basse vision dans la DMLA est proposée aux patients lorsque toutes possibilités thérapeutiques sont épuisées et que la malvoyance est avérée. Cette spécialité de médecine ophtalmique de réadaptation vise à restaurer la qualité de vie quotidienne et l'indépendance de personnes malvoyantes. En effet, les patients atteints de la DMLA vont avoir des difficultés à reconnaître des visages ou lire et ne peuvent plus conduire (Kolar, 2013; Slakter and Stur, 2005). Cette réduction de la qualité de vie est souvent associée à un état dépressif chez ces patients (Rovner et al., 2002). La réhabilitation de la basse vision a pour but l'utilisation du résidu visuel afin de faciliter les activités journalières (Soubrane et al., 2007).

Dans le cas de la DMLA, l'atteinte maculaire altère la perception des détails. Ainsi les aides visuelles sont basées sur les principes de grossissement (lunettes de Galilée ou de Kepler, loupes, agrandisseur électronique....) ainsi que l'utilisation du contraste (filtre, prismes...) ou l'amélioration de la qualité d'éclairage (Soubrane et al., 2007). Ceci peut être accompagné par des systèmes améliorés pour la vie quotidienne telle que l'utilisation de téléphones à grosses touches.

Si la vision est stabilisée, une rééducation orthoptique peut être mise en place afin que le patient s'habitue à la présence du scotome central. Ainsi, par stimulation des points préférentiels de fixation, cette rééducation va permettre une amélioration des gestes de la vie quotidienne. En effet, pour obtenir l'acuité visuelle maximale, l'image se place sur la macula pour être ensuite intégrée par le cortex visuel. Dans le cas de la DMLA, malgré l'atteinte maculaire, le système visuel des patients continue à utiliser cette région. Par la rééducation, le patient va réussir à trouver et à utiliser de façon constante d'autres zones de fixation situées en dehors de ce scotome central (Cohen, 2000).

Pour que ce type de rééducation fonctionne, la motivation et la coopération du patient est indispensable.

V.3 – Traitements chirurgicaux

La majorité des traitements chirurgicaux (laser, photothérapie dynamique, thermothérapie, radiothérapie) sont destinées à traiter la DMLA exsudative. Ils sont basés sur la technique d'angiographie qui permet de préciser le type de néovaisseaux présent ainsi que leurs localisations. Ces traitements peuvent être efficaces et réduire la progression de la maladie, uniquement si celle-ci a été décelée à un stade précoce. Aujourd'hui la majorité de ces traitements ont été remplacées par les injections intravitréennes d'anti-VEGF (Smailhodzic et al., 2014), bien plus performantes que les opérations chirurgicales.

Pour la forme atrophique, un essai clinique visant à ralentir la maladie a été réalisé via un laser de faible intensité de 1999 à 2006. Cependant, les résultats de cette étude ont montré que ce traitement était inefficace. Aujourd'hui il n'y a aucun traitement pour la DMLA atrophique. En effet, il est aujourd'hui impossible de réparer les cellules de l'EPR et les photorécepteurs endommagées dans cette maladie (Bowes Rickman et al., 2013). La recherche médicale et scientifique a donc pour objectif aujourd'hui de trouver de nouveaux traitements pour ralentir la progression constante des formes atrophiques et/ou pour reconstruire la rétine disparue ou détruite.

V.4 - Transplantation et médecine régénérative

Nota bene : Dans le chapitre IV, une partie est consacrée aux cellules souches embryonnaires et pluripotentes induites, à leurs productions et leurs utilisations.

Depuis la découverte des cellules souches, de nombreuses études ont été réalisées afin d'utiliser le potentiel de ces cellules dans le traitement de la DMLA. L'objectif de cette thérapie cellulaire serait d'obtenir *in vitro* des cellules de l'EPR et de les transplanter afin qu'elles remplacent les cellules déficientes chez les patients atteints de la DMLA.

Le premier essai clinique utilisant des cellules de l'EPR dérivées de cellules souches embryonnaires (CSE) a été réalisé en 2011 (Schwartz et al., 2012). Deux patients, un atteint de la maladie de Stargardt (une dystrophie rétinienne) et un de la forme atrophique de la DMLA, ont reçu une implantation d'environ 50 000 cellules de l'EPR dans un œil. Quatre mois après transplantation, une amélioration de leur vision a été observée.

Ces premiers résultats ont été confortés par un second essai clinique, incluant cette fois-ci 9 patients atteints de la DMLA atrophique, où une amélioration de la vision a été décrite 22 mois après transplantation (Schwartz et al., 2015). Une amélioration de la vision a aussi été observée, lors du premier essai clinique asiatique utilisant ces cellules au niveau de trois patients, 12 mois après transplantation (Song et al., 2015).

Aucun effet néfaste de la transplantation de ces cellules n'a été rapporté jusqu'à aujourd'hui (Tang et al., 2017).

Actuellement, il n'y a eu qu'un seul essai de thérapie cellulaire utilisant des cellules souches pluripotentes induites (CSPi) pour le traitement de la DMLA. Il a été réalisé au Japon par le Professeur Masayo Takahashi en 2014 via la transplantation autologue de cellules de l'EPR dérivées de cellules de peau chez une patiente atteinte de DMLA exsudative (Mandai et al., 2017). Au départ, deux patients avaient été intégrés à cette étude. Cependant, après analyse génétique, 3 délétions ont été détectées au niveau des CSPi dérivées du patient numéro 2. Malgré le succès de ces lignées au test de formation de tumeur, l'équipe du Professeur Takahashi a décidé de ne pas transplanter ces cellules à cause des possibles effets négatifs de ces délétions. Cet essai clinique a été suspendu en mars 2015 suite à la promulgation en Novembre 2014 de la loi japonaise sur la médecine

régénérative qui exige que les études cliniques ne soient réalisées qu'au sein d'une institution hospitalière, et non de recherche.

Un an après la transplantation, l'acuité visuelle de l'œil ayant reçu les cellules de l'EPR dérivées de CSPi ne s'est pas améliorée et n'a pas empiré non plus. La patiente signale une vision plus « lumineuse », certainement causée par le retrait de la membrane néo-vasculaire durant l'opération chirurgicale. Les analyses de tomographie par cohérence optique ont mis en évidence qu'un an après la transplantation, les cellules de l'EPR-CSPi sont toujours présentes et intégrées. Cependant, l'impact sur la survie et la fonctionnalité des photorécepteurs n'a pas encore été évalué.

Le 28 Mars 2017, un homme de 60 ans atteint de forme exsudative de la DMLA a été transplanté par le Professeur Takahashi, pour la première fois au monde, avec des cellules de l'EPR-CSPi dérivées d'une tierce personne.

INTRODUCTION

Chapitre IV – Modélisation de la DMLA

I. Les modèles animaux

La DMLA ne possède aujourd'hui aucun modèle, cellulaire ou animal, représentant l'ensemble du spectre de la maladie.

A l'exception des primates non humains, les animaux utilisés comme modèle en laboratoire ne possèdent pas de macula (Chader, 2002). De ce fait, les modèles animaux de la DMLA sont des modèles génétiques ou basés sur les similitudes pathologiques retrouvées avec d'autres pathologies oculaires telles que la maladie de Stargardt (Pascale et al., 2014).

Quelques exemples de modèles animaux génétiques seront détaillés dans cette section.

- **Le rat RCS** : c'est un modèle génétique de dégénérescence rétinienne (Strauss et al., 1998). Ces animaux possèdent une mutation au niveau du gène *Mertk* (Adachi et al., 2016), un répéteur tyrosine kinase impliqué dans la forme autosomique récessive de la rétinite pigmentaire (maladie génétique dégénérative de l'œil). L'altération de ce gène va induire un dysfonctionnement de la phagocytose par les cellules de l'EPR et aboutir à la mort des photorécepteurs (D'Cruz et al., 2000). Dans ce modèle, la dégénérescence commence dès 12 jours après la naissance et est totale au bout de 77 jours environ (Pardue et al., 2005). Dès 20 jours post-natal peuvent être observés chez les rats RCS des dépôts résultant d'une phagocytose insuffisante des SEP (Vollrath et al., 2001).

- **La souris *CCL2*** (chemokine ligand 2) : ce modèle murin a été développé par l'équipe d'Ambatti afin de modéliser la DMLA (Ambati et al., 2003). Ces animaux transgéniques sont déficients pour *Ccl2*, une cytokine, ce qui induit une anomalie dans le recrutement des macrophages au niveau des cellules de l'EPR et de la membrane de Bruch (Grossniklaus et al., 2010). Les souris *CCL2*^{-/-} développent les principales caractéristiques de la maladie d'un point de vue morphologique, ultra-structural et fonctionnel. Ainsi, à neuf mois, ces souris mutantes présentent une accumulation de lipofuscine et la présence de drusen, une atrophie des photorécepteurs et une néovascularisation choroïdienne (Ambati et al., 2003).

- **La souris ApoE** (apolipoprotéine E) : c'est un modèle de la DMLA basée sur l'implication du cholestérol dans le développement de la DMLA. Ainsi, les souris déficientes pour cette protéine vont avoir un niveau de cholestérol élevé comparé aux souris normales (Dithmar et al., 2000). Dans ce modèle animal, dès 2 mois, cette hypercholestérolémie est associée à des lésions similaires à celles retrouvées dans la DMLA telle que des dépôts au niveau de la membrane de Bruch (Grossniklaus et al., 2010).
- **La souris ABCA4** (ATP binding cassette subfamily A member 4) : c'est un modèle murin de la maladie de Stargardt (Pascale et al., 2014). Cette protéine est responsable du transport des dérivés de la vitamine A dans la rétine. Une mutation dans le gène *ABCA4* peut être responsable aussi du développement d'une rétinite pigmentaire ou d'une dystrophie rétinienne (Charbel Issa et al., 2013). Ces animaux présentent des signes électrophysiologiques de dégénérescence rétinienne dès 18 mois ainsi qu'une accumulation de lipofuscine.

II. Les modèles cellulaires

II.1 - Les cellules de l'EPR

A. Implication des cellules de l'EPR dans la DMLA

De nombreuses études considèrent qu'un dysfonctionnement des cellules de l'EPR est à la base du développement de la DMLA (Rabin et al., 2013 ; Radu et al., 2014 ; Wang et al., 2016).

Le stress oxydatif a un rôle essentiel dans le développement de la DMLA, comme dans celui de nombreuses maladies dégénératives (Balaban et al., 2005). Or, la rétine et particulièrement les cellules de l'EPR sont une source importante de stress oxydatif de par leur forte exposition à la lumière et leur métabolisme hautement énergétique (Bowes Rickman et al., 2013). En effet, l'épithélium pigmentaire a comme fonction, entre autre, la phagocytose des SEP, phénomène producteur d'ERO (Chen et al., 2016). De plus, les cellules de l'EPR, de par leurs fonctions variées, ont besoin de beaucoup d'énergies produites sous forme d'ATP via la phosphorylation oxydante dans les mitochondries. Pour

répondre à cette forte demande en ATP, un nombre important de mitochondries est retrouvé dans les cellules de l'EPR. Or, la majorité des ERO cellulaires (environ 90%) ont pour origine cet organite (Balaban et al., 2005) et de plus en plus d'études soutiennent le rôle prépondérant du métabolisme mitochondrial dans le vieillissement (Balaban et al., 2005 ; Terluk et al., 2015). Les cellules de l'EPR semblent donc prédisposées à une forte production d'ERO et de stress oxydatif, confirmant l'hypothèse de leur place centrale dans la pathogénèse de la DMLA (Balaban et al., 2005; Chen et al., 2016; Garcia et al., 2015; Golestaneh et al., 2017).

Une des caractéristiques de la DMLA est la formation de drusen (Mullins et al., 2000). Or, l'analyse par micrographie électronique des cellules de l'EPR a mis en évidence que ces cellules pouvaient exclure des composés via leur membrane basale sur le dessus ou directement sur les drusen. (Rabin et al., 2013). De plus, il a été montré *in vitro* que les cellules humaines fœtales de l'EPR sécrètent des dépôts riches en ApoE (Johnson et al., 2011), constituants importants des drusen, et que l'expression de ce gène est surexprimée au niveau de cellules de l'EPR de patients atteints de la DMLA (Golestaneh et al., 2017). L'ensemble de ces études suggère que les drusen sont, au moins en partie, un produit des cellules de l'EPR.

Ces drusen sont responsables, en association avec le dysfonctionnement des cellules de l'EPR et des photorécepteurs, de la mise en place d'une réaction inflammatoire dans la rétine (Calippe et al., 2014). Ce phénomène est régulé par la sécrétion via les cellules de l'EPR, de différents facteurs en réponse à des réactions immunitaires. En effet, l'épithélium pigmentaire est responsable de libération de diverses cytokines comme IL-1 et de l'expression du complexe d'attaque membranaire au niveau de la rétine (Nita et al., 2014; Parmeggiani et al., 2012; Planck et al., 1993). IL-1 a d'ailleurs été proposé comme marqueur potentiel de la progression de l'inflammation dans l'œil (Nagineni et al., 1994). Les cellules de l'EPR ont donc un rôle important dans le système immunitaire de la rétine. Certaines hypothèses suggèrent un rôle central de l'inflammation chronique dans le développement de la DMLA (Parmeggiani et al., 2012). Cette inflammation pourrait être associée à une hypoxie locale et à une dérégulation de la sécrétion de facteurs de croissance de la part des cellules de l'EPR (Strauss, 2005).

D'autres accumulations sont retrouvées dans les cellules de l'EPR, tels que les bis-rétinoïdes fluorescents qui sont caractéristiques de la maladie de Stargardt, une dystrophie héréditaire de la macula (Lenis et al., 2017). Il a été montré un possible lien dans l'étiologie de la DMLA et la maladie de Stargardt. En effet, dans les deux cas, la dégénérescence de photorécepteurs maculaires a pour hypothèse la perte cruciale des cellules de l'EPR (Radu et al., 2014).

On retrouve aussi la lipofuscine, un pigment cellulaire qui s'accumule au cours du vieillissement dans de nombreuses cellules de l'organisme (Höhn and Grune, 2013). Au niveau des cellules de l'EPR, la lipofuscine s'accumule au cours du temps suite à une dégradation incomplète des SEP suivie d'une peroxydation lipidique (Krohne et al., 2010b). Ce phénomène est donc à la base de la production de radicaux libres et de stress oxydatif (Kurz et al., 2007). Par ailleurs, il a été montré qu'une perturbation d'une ou de plusieurs étapes de la phagocytose des SEP par les cellules de l'EPR peut être à la base de nombreuses rétinopathies (Kevany and Palczewski, 2010).

B. Obtention des cellules de l'EPR

B.1 - Cellules de l'EPR d'origine native

Les cellules de l'EPR d'origine native sont prélevées soit au niveau de fœtus, soit au niveau de sujet adulte *post mortem*.

Après énucléation, les cellules de l'EPR sont mécaniquement séparées de la choroïde et mises en culture dans un milieu spécifique. Cette technique a d'abord été développée dans le laboratoire du Dr. Dean Bok (Hu and Bok, 2001), puis modifiée par le Dr. Sheldon Miller (Maminishkis et al., 2006).

Ces cellules de l'EPR normalement post-mitotiques, sont capables *in vitro*, de réactiver la prolifération cellulaire par l'ajout de facteurs de croissance dans le milieu de culture (Bertolotti et al., 2014). Ainsi, elles peuvent se multiplier pour reformer un épithélium monocellulaire. Lorsque qu'elles arrivent à confluence, les cellules de l'EPR initient une re-différenciation, appelée aussi re-morphogenèse, permettant d'établir à nouveau des jonctions serrées entre elles et de réexprimer les différents gènes spécifiques de ces cellules telles que la *Bestrophine-1* ou *RPE65* (Adijanto and Philp, 2014). Plusieurs

semaines en culture sont donc nécessaires pour que l'épithélium soit mature (Bertolotti et al., 2014).

Ces cellules primaires montrent alors une morphologie caractéristique des cellules de l'EPR d'origine native avec une organisation épithéliale, une pigmentation importante, des jonctions serrées, et des microvili au niveau apical. De plus, elles expriment les ARNm ainsi que les protéines essentielles à la fonctionnalité de ces cellules (Adijanto and Philp, 2014). Par ailleurs, elles sont aussi polarisées et conservent une sécrétion basale de VEGF et apicale de PEDF (Maminishkis et al., 2006).

Dernièrement, de nouvelles études utilisent *in vitro* des cellules de l'EPR obtenues à partir de cellules multipotentes retrouvées de façon rare au niveau de la rétine adulte : les cellules souches de l'EPR (SC-EPR) (Saini et al., 2017; Salero et al., 2012). Lors du développement oculaire, l'invagination des vésicules optiques va aboutir, entre autres, à la formation de la couche des cellules de l'EPR qui deviennent rapidement post-mitotiques. Cependant, Salero et al., ont identifié chez l'adulte une sous-population de cellules de l'EPR, capable de retrouver un caractère multipotent et de produire des progéniteurs de cellules de l'EPR neurales et adipo-mésenchymales : les CS-EPR. En effet, suivant des conditions de culture particulières, des cellules de l'EPR *post-mortem* peuvent se redifférencier en cellules souches neurales et sont capables de prolifération et de différenciation. Les cellules de l'EPR obtenues à partir des CS-EPR sont stables, polarisées et ont une morphologie caractéristique organisée en « nid d'abeilles » (Saini et al., 2017).

B.2 - Cellules de l'EPR obtenues à partir de cellules souches

Depuis la dernière décennie, de nombreux protocoles ont été établis dans le but d'obtenir des cellules de l'EPR fonctionnelles *in vitro* à partir de cellules souches (Parvini et al., 2014). Ces protocoles sont basés sur la différenciation spontanée, la différenciation par co-culture ou la différenciation par l'ajout de facteurs extrinsèques (Figure 29).

Dans cette partie, nous développerons quelques exemples.

- **Différenciation spontanée** : Les cellules de l'EPR peuvent être obtenues par différenciation spontanée, c'est-à-dire sans induction du destin cellulaire par des facteurs extrinsèques (Klimanskaya et al., 2004).

Le constituant principal du milieu de culture des cellules souches est le FGF2 (aussi connu sous le nom de basic FGF). Le FGF2 est indispensable au maintien de l'auto-renouvellement (Reichman et al., 2014). Pour obtenir des cellules de l'EPR *in vitro* par protocole de différenciation spontanée, il suffit de retirer le FGF2 du milieu de culture (Buchholz et al., 2009). Les premiers signes de pigmentation apparaissent au alentour des jours 20 à 35 sous la forme de petits spots (environ 1% des cellules totales). Après une soixantaine de jours, ces clusters de cellules pigmentées ont proliféré et sont mécaniquement isolés et transférés afin d'obtenir une population homogène de cellules de l'EPR. Vers le jour 115, l'épithélium pigmentaire ainsi obtenu possède les mêmes caractéristiques morphologiques et fonctionnelles que les cellules de l'EPR fœtales (Buchholz et al., 2009; Parvini et al., 2014).

- **Différenciation par co-culture** (Wang et al., 2010) : Des CSE de singe ont été différenciées en cellules de l'EPR par mise en co-culture avec des cellules mésenchymateuses de la moelle osseuse : les Pa6. La pigmentation est apparue dès la troisième semaine (8% d'efficacité) et les cellules de l'EPR obtenues sont semblables à celle d'origine fœtale (Haruta et al., 2004).

- **Différenciation par l'ajout de facteurs** : Afin de permettre l'apparition de la pigmentation plus tôt, dès 4 jours, on peut induire la différenciation spontanée par ajout dans du milieu pro-neural N2 (Reichman, 2014). Dans ce cas, les cellules de l'EPR sont obtenues en 21 jours. D'autres protocoles, impliquant plusieurs facteurs (Noggin, Dkk1, IGF1, SU5042 et l'Activin A entre autre) permettent d'obtenir des cellules de l'EPR en seulement 14 jours de différenciation (Buchholz et al., 2013).

II.3 – Les cellules ARPE-19

Les cellules ARPE-19 sont une lignée cellulaire humaine de cellules de l'EPR établie en 1986 par Amy Aotaki-Keen à partir d'une culture primaire provenant d'un donneur masculin de 19 ans. Suivant Dunn et al., ces cellules possèdent les mêmes caractéristiques

morphologiques que les cellules de l'EPR : des limites bien définies, une forme cubique et une légère pigmentation . De plus, elles expriment les marqueurs caractéristiques CRALBP et RPE65 et forment un épithélium en monocouche dont les cellules sont unies par jonctions serrées caractérisées par ZO-1.

Diverses études ont confirmé que ces cellules sont similaires à l'épithélium pigmentaire rétinien d'un point de vue fonctionnel. Par microscopie confocale et marquage immunocytochimique, il a été montré que les cellules ARPE-19 sont des cellules polarisées dont la distribution de marqueurs de surface cellulaire est identique à celle des cellules de l'EPR. Elles sont par ailleurs capables de phagocytose (Finnemann et al., 1997) ainsi que de sécréter des facteurs tels que FGF5 ou IL-6 de façon basolatérale (Dunn et al., 1998 ; Holtkamp et al., 1998).

Aujourd'hui, ces cellules sont couramment utilisées *in vitro* pour l'étude des maladies oculaires (Chen et al., 2009; Chong et al., 2017; Garcia et al., 2015; Krohne et al., 2010a). Les cellules ARPE-19 prolifèrent rapidement et permettent donc un accès facile et peu coûteux aux cellules de l'EPR.

Malgré ces avantages, il a été mis en évidence que les cellules ARPE-19 ne semblent pas être un modèle idéal d'épithélium pigmentaire *in vitro*. Dans un premier temps, contrairement à ce qu'a démontré Dunn et al. en 1996, plusieurs études montrent que les cellules ARPE-19 ne possèdent pas une morphologie similaire aux cellules de l'EPR (Samuel et al., 2017), avec des cellules plus allongées ressemblant davantage à des fibroblastes, avec peu voire pas de pigmentation (Ablonczy et al., 2011). De ce fait, les cellules ARPE-19 seraient plutôt représentatives d'une forme immature de cellule de l'EPR (Garcia et al., 2015). Malgré la formation d'un épithélium polarisé (Kamao et al., 2014), les cellules ARPE-19 ont un développement des jonctions serrées limité aboutissant à une résistance transmembranaire faible comparée aux cellules de l'EPR (Ablonczy et al., 2011). De plus, les cellules ARPE-19 auraient un profil d'expression génétique similaire aux cellules de l'EPR mais avec un niveau d'expression différent pour certains gènes tels que *RPE65*. Ainsi, Cai et al., ont mis en évidence des différences d'expression génétique au niveau de 35 gènes chez les cellules ARPE-19 comparé aux cellules de l'EPR adultes (Cai and Del Priore, 2006).

Ces différences peuvent être expliquées par les conditions de culture qui affectent le phénotype de ces cellules (Jr et al., 2006; Luo et al., 2006; Samuel et al., 2017). Ainsi, des conditions de culture à long terme (4 mois) et à faible concentration de sérum (sérum de veau fœtal ou SVF, 1%) permettraient d'obtenir des cellules ARPE-19 dont le phénotype morphologique et fonctionnel se rapproche de celui des cellules de l'EPR humaine.

III. Les cellules souches pluripotentes induites

I.1 - Définitions

Les cellules souches sont caractérisées par deux propriétés : l'auto-renouvellement et la différenciation cellulaire. En effet, ces cellules sont capables d'entretenir un pool infini de cellules souches et aussi de générer différents types de cellules spécialisées par différenciation cellulaire (Takahashi et al., 2007).

Les cellules souches se distinguent en fonction de leur potentiel de différenciation en quatre catégories :

- Au stade précoce de la morula, les cellules souches sont dites « totipotentes » : elles peuvent se différencier en tous types de cellules embryonnaires et extra-embryonnaires ; et ainsi même recréer un organisme entier.
- Au stade blastocyste, les cellules deviennent « pluripotentes » : elles sont capables de donner les différentes cellules des feuillets embryonnaires : l'ectoderme, l'endoderme et le mésoderme.
- Plus tard dans le développement, les cellules souches sont dites « multipotentes » ou « unipotentes » : elles vont se différencier de façon tissu-spécifique (exemple : cellules cérébrales, cellules épidermiques...) suivant les 3 feuillets embryonnaires. Elles peuvent alors donner tous les types de cellules retrouvés dans ce lignage spécifique.
- Une fois les cellules différenciées, elles ont perdu toutes leurs capacités de différenciation.

Chez l'adulte il existe différents types de cellules souches multipotentes, tels que les cellules souches mésenchymateuses ou les cellules souches hématopoïétiques, permettant ainsi la réparation tissulaire et le maintien de l'homéostasie cellulaire.

I.2 – Historique

La première démonstration de l'existence des cellules souches a été réalisée en 1895. C'est à cette époque que Hans Dreish, un biologiste et philosophe allemand, a mis en évidence que des cellules d'oursin isolées au stade 4 cellules étaient pour chacune capable de reproduire un organisme entier. Ce concept a ensuite été confirmé par Hans Spemann en 1902 par cette même expérience à partir d'œufs d'amphibiens.

Dans les années 1950, la technique du transfert cellulaire de cellule somatique (SNCT, somatic nuclear cellular transfert), aussi appelée clonage, fut développée. En effet, en 1952, Briggs et Kings ont transplanté un noyau isolé à partir d'un embryon de grenouille dans un ovocyte anucléé dans le but de déterminer son potentiel développemental. Ils ont pu observer que l'âge de l'embryon sur lequel était prélevé le noyau avait un impact sur le succès du clonage. Ainsi, ils ont établi que plus les cellules se différencient en un type cellulaire, plus elles perdent les informations correspondant aux autres lignages.

10 ans après cette découverte, Gurdon démontra grâce à des expériences de transplantations que des cellules adultes amphibiennes différenciées retiennent l'information génétique nécessaire pour permettre le développement de grenouilles clonées (Gurdon, 1962).

L'avancée majeure dans ce domaine fût le clonage du mouton Dolly (Wilmut et al., 1997). Cette expérience a mis en évidence que des cellules spécialisées pouvait retrouver, par modifications génétiques, un caractère totipotent et ainsi permettre le développement de tout un organisme. Cependant la majorité des animaux clonés montrent des phénotypes anormaux soulignant des défauts épigénétiques dans cette technique de clonage.

L'histoire de la reprogrammation cellulaire prit un nouvel essor après la découverte du clonage par l'isolement de cellules souches à partir de tératocarcinome. Cette lignée immortalisée a été nommée *embryonal carcinoma cells* ou EC (Kleinsmith and Pierce, 1964). Lorsque ces cellules ont été fusionnées avec des cellules somatiques, il a pu être observée une dominance du stade indifférencié dans les cellules hybrides, suggérant des facteurs solubles induisant ces capacités de différenciation et d'auto-renouvellement présentes dans les EC.

Les gènes exprimés spécifiquement dans les cellules souches ou ECATs (ES cell-associated transcripts) ont été déterminés grâce à l'analyse des marqueurs de séquences exprimées ou EST par le NCBI (National Center for Biological Information). Sur 24 ECATs isolées et analysées, un cocktail de 4 gènes (OSKM) fut découvert comme suffisant pour la reprogrammation cellulaire : *Oct3/4*, *Sox2*, *Klf4* et *c-Myc* (Takahashi et al., 2007). Effectivement, les cellules reprogrammées génétiquement par induction de ces facteurs possèdent les mêmes caractéristiques morphologiques et épigénétiques que les CSE, ainsi que la capacité de pluripotence et de différenciation dans les trois feuilletts embryonnaires (Ng and Choo, 2010). Ces nouvelles cellules ont été dénommées CSPi pour cellules souches pluripotentes induites.

I.3 – Stratégies de reprogrammation cellulaire

Il existe plusieurs stratégies de reprogrammation cellulaire pour obtenir des cellules souches pluripotentes : le SNCT, la fusion cellulaire et la génération de CSPi.

A. Le transfert cellulaire de cellule somatique ou SNCT

La technique SCNT, encore appelé « clonage » (Wilmut et al., 1997), est basée sur le transfert du noyau d'une cellule somatique dans un ovocyte préalablement anucléé (de Rham and Villard, 2014). Après stimulation électrique ou chimique, l'ovocyte va alors initier le développement d'un embryon qui possèdera les informations génétiques de la cellule somatique (Patel and Yang, 2010).

Depuis Gurdon en 1962, il a été établi que la reprogrammation cellulaire par transfert d'informations génétiques est réalisable sur toutes les cellules de mammifères, comme par exemple au niveau de cellules de primates non humains (Tachibana et al., 2013). Cependant, l'efficacité à produire des cellules souches par SCNT est faible. Dans une étude de 2007, sur 307 ovocytes de primates utilisés, seulement 2 lignées de CSPi ont pu être établies (Byrne et al., 2007).

Cette technique a d'autres limites. En effet, lors d'étude chez l'Homme, les embryons provenant de SCNT n'ont pas pu survivre après le stade 8 cellules. Cet arrêt développemental aurait été induit par un défaut d'activation transcriptionnelle des gènes du donneur. En effet, lorsque cette technique est réalisée chez la souris, la majorité des

gènes (<91%) sont exprimés correctement après 24 heures. Chez l'Homme, la majorité des transcrits (88%) ne sont pas exprimés correctement 24 heures après le SNCT (Egli et al., 2011).

B. La fusion cellulaire

La fusion cellulaire est l'hybridation d'une cellule somatique avec une cellule souche embryonnaire (CSE). L'hybride résultant possède les mêmes caractéristiques que n'importe quelle cellule souche, mais ne possède pas un caryotype normal (4N).

Cette technique a montré son efficacité sur des lignées murines (Tada et al., 2001) et humaines (Yu et al., 2006). Cependant, il n'existe pas aujourd'hui de techniques permettant de réduire le nombre de chromosome à 2, ce qui restreint considérablement l'utilisation de ces cellules tétraploïdes.

C. Génération de CSPi

Les CSPi sont des cellules souches dont la reprogrammation a été induite par des facteurs de transcription.

Grâce aux techniques de SCNT et de fusion cellulaire, il a pu être mis en évidence que certains facteurs ont un rôle prépondérant dans le maintien de la pluripotence des cellules souches. Il a été supposé que leurs expressions pouvaient aussi jouer un rôle important dans les mécanismes de reprogrammation des cellules somatiques en cellules souches (Takahashi and Yamanaka, 2006). Parmi ces facteurs, ont été décrits Oct3/4 (Niwa et al., 2000), Sox2 (Avilion et al., 2003) et Nanog (Mitsui et al., 2003).

En 2007, une étude a déterminé, à partir d'une sélection de 24 gènes candidats, qu'un cocktail de 4 gènes (*Oct3/4*, *Klf4*, *Sox2* et *c-Myc*) est suffisant pour générer des CSPi à partir de fibroblastes de souris (Takahashi and Yamanaka, 2006). Ce même cocktail a été dérivé ensuite pour la reprogrammation de CSPi humaines avec succès (Takahashi et al., 2007).

Depuis 2006 et la première reprogrammation de fibroblastes murins (Takahashi and Yamanaka, 2006), de nombreux développements nous permettent aujourd'hui de générer des CSPi à partir de différentes cellules somatiques telles que des cellules sanguines (Hubbard et al., 2014) ou des cellules mésenchymateuse de tissu adipeux (Zapata-Linares et al., 2016).

Aujourd'hui, différentes méthodes de reprogrammation directe existent basées sur l'utilisation de vecteurs viraux tels que le retrovirus pMXs (Lowry et al., 2008) ou MMLV (Zapata-Linares, 2016), le virus Sendai (Gerani-Naimi, 2016) ; ou de vecteurs non-viraux comme les épisomes (Okita, 2011) ou l'utilisation de microARN (He, 2014). Les techniques de reprogrammation non intégratives, comme les épisomes ou le virus Sendai, sont favorisées dans le but de pouvoir utiliser ces CSPi en médecine régénérative.

I.4 - Cellules Souches Embryonnaires versus Cellules Souches Pluripotentes induites

Les CSPi possèdent de nombreuses caractéristiques communes avec les CSE (Tableau IV) que ce soit au point de vue morphologique ou fonctionnel (Takahashi et al., 2007 ; Park et al., 2008 ; Aasen et al., 2008 ; He et al., 2014 ; Zapata-Linares et al., 2016). En effet, les CSPi et les CSE ont le même phénotype morphologique avec un ratio noyau/cytoplasme élevé et une phosphatase alcaline active. Elles présentent aussi la même expression de marqueurs protéiques de surface ainsi que la capacité à former des tératomes *in vitro* (Yu et al., 2007 ; Takahashi et al., 2007 ; Park et al., 2008 ; Aasen et al., 2008 ; He et al., 2014 ; Zapata-Linares et al., 2016).

Par ailleurs, les CSE et les CSPi expriment des profils génétiques semblables, mais non identiques (Narsinh et al., 2011). En effet, sur 32 266 gènes testés, 1267 montrent des niveaux d'expressions différents entre les CSPi et les CSE (Takahashi et al., 2007), une petite quantité de ces gènes étant attribuables à la mémoire épigénétique de la cellule somatique d'origine (Yu et al., 2007).

Comme pour les CSE, la culture prolongée des CSPi *in vitro* va aboutir à des modifications caryotypiques, spécifiquement au niveau des chromosomes 17 et 20 (Aasen et al., 2008).

Les deux caractéristiques essentielles des CSE sont les capacités d'auto-renouvellement et de différenciation (Yu et al., 2007 ; Takahashi et al., 2007 ; Park et al., 2008 ; Aasen et al., 2008 ; He et al., 2014 ; Zapata-Linares et al., 2016).

Les CSPi ont montré une prolifération robuste jusqu'à au moins 17 semaines post-reprogrammation et une capacité de différenciation en de multiples destins cellulaires (Yu et al., 2007). L'activité de la télomérase des CSE indique que le temps de dédoublement de

ces cellules se situe aux alentours des 48 heures (Cowan et al., 2004) ; les mêmes valeurs ont été retrouvées chez les CSPi (Takahashi et al., 2007).

De plus, de la même façon que les CSE ; les CSPi *in vitro* sont capables de donner toutes les différentes lignées cellulaires qui constituent les 3 feuillets embryonnaires. (Lowry et al., 2008).

Ces caractéristiques communes entre CSPi et CSE ont été retrouvées au niveau de cellules provenant de personnes saines ainsi que celles provenant de patients atteints de divers pathologies comme la maladie de Gaucher, la dystrophie de Duchenne et la maladie de Huntington (Park et al., 2008).

Les CSPi possèdent toutes les caractéristiques primordiales des CSE, permettant leur utilisation en recherche scientifique et médicale (Amabile and Meissner, 2009). Les CSPi sont de plus en plus utilisées en remplacement des CSE, ce qui est un atout considérable au point de vue éthique (Narsinh et al., 2011 ; Csobonyeiova et al., 2015) puisqu'elles ne nécessitent pas la destruction d'embryons.

Tableau IV : Principaux marqueurs protéiques et géniques utilisés dans la littérature pour comparer les CSE et les CSPi

Marqueurs protéiques	SSEA-3	Takahashi, 2007(Takahashi et al., 2007)1/ Park, 2008(Park et al., 2008)21 / Aasen, 2008(Aasen et al., 2008)22 Yu, 2007(Yu et al., 2007)20 / Marti, 2013 ²⁶ (Martí et al., 2013)
	SSEA-4	Takahashi, 2007(Takahashi et al., 2007)1/ Park, 2008 ²⁰ / Aasen, 2008 ²¹ Yu, 2007 ¹⁹ / Marti, 2013 ²⁶ (Martí et al., 2013)
	Tra1-60	Takahashi, 2007(Takahashi et al., 2007)1/ Park, 2008 ²⁰ / Aasen, 2008 ²¹ Yu, 2007 ¹⁹ / Marti, 2013 ²⁵ / He, 2014 ²²
	Tra1-81	Takahashi, 2007(Takahashi et al., 2007)1/ Park, 2008 ²⁰ / Aasen, 2008 ²¹ Yu, 2007 ¹⁹ / Marti, 2013 ²⁵ / He, 2014 ²² / Zapata-Linares, 2016 ²³
	NANOG	Takahashi, 2007(Takahashi et al., 2007)1/ Aasen, 2008 ²¹ / Marti, 2013 ²⁵ / Zapata-Linares, 2016 ²³
	OCT4	Park, 2008(Park et al., 2008)21 / Aasen, 2008 ²¹ / Marti, 2013 ²⁵ / He, 2014 ²² / Zapata-Linares, 2016 ²³
	SOX2	Aasen, 2008 ²¹ / Marti, 2013 ²⁵ / He, 2014 ²² / Zapata-Linares, 2016 ²³
Expression des gènes	Oct4	Takahashi, 2007(Takahashi et al., 2007)1/ Yu, 2007 ¹⁹ / Aasen, 2008 ²¹ Park, 2008 ²⁰ / Okita, 2011 ²⁶ / Zapata-Linares, 2016 ²³
	Sox2	Park, 2008 ²⁰ / Aasen, 2008 ²¹ / Okita, 2011 ²⁶ / Zapata-Linares, 2016 ²³
	NANOG	Takahashi, 2007(Takahashi et al., 2007)1/ Yu, 2007 ¹⁹ /Park, 2008 ²⁰ /Aasen, 2008 ²¹ / Okita, 2011 ²⁶ / Zapata-Linares, 2016 ²³
	REX1	Takahashi, 2007(Takahashi et al., 2007)1 / Park, 2008 ²⁰ /Aasen, 2008 ²¹ / Zapata-Linares, 2016 ²³

I.5 – Utilisation des cellules souches pluripotentes induites

De par leur capacité d'auto-renouvellement et de pluripotence, les CSPi sont un outil important dans la compréhension du développement et de la fonctionnalité du corps humain, dans la modélisation de maladie, pour le criblage de nouveaux traitements et pour la thérapie cellulaire (Figure 31) (Yu et al., 2007).

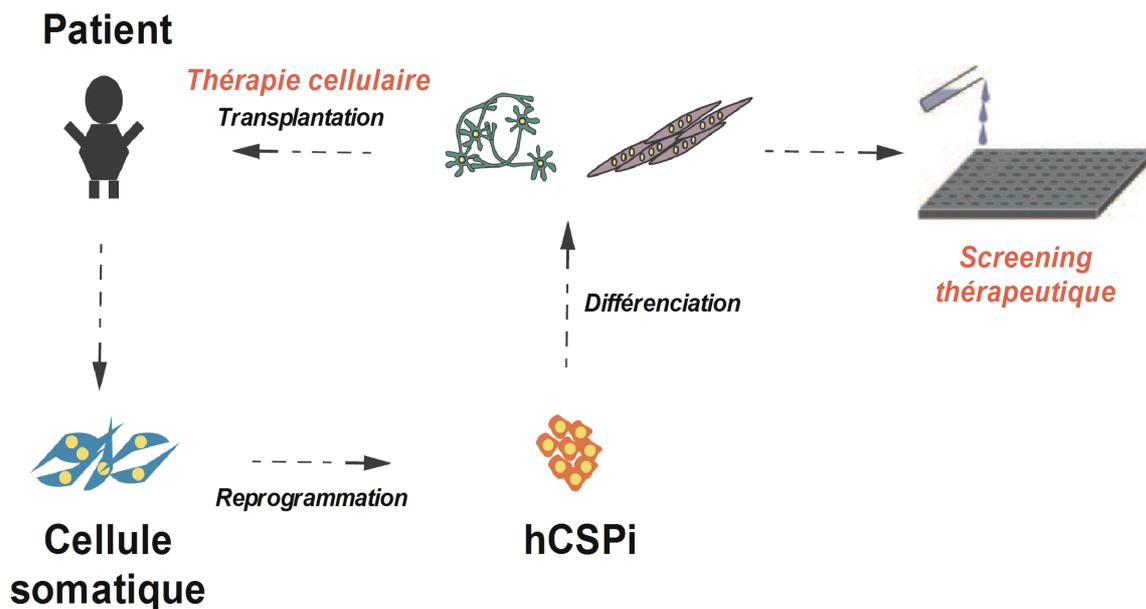


Figure 31 : Application possible des hCSPi en médecine régénérative ou dans le développement de nouvelles molécules thérapeutiques.

Adaptée d'après Tanabé, 2014.

A. La modélisation et le criblage pharmaceutique

Depuis la dernière décennie, les CSPi ont été fréquemment utilisées *in vitro* pour modéliser de nombreuses pathologies telles que la drépanocytose (Hanna et al., 2007), la maladie de Parkinson (Wernig et al., 2008) ou la sclérose en plaques (Dimos et al., 2008). Que ce soit dans le cas de maladie génétique ou multifactorielle, la technologie des CSPi permet d'obtenir en laboratoire une représentation de plus en plus proche de ce qu'il se passe *in situ*. Le développement et l'utilisation des CSPi *in vitro* est donc un outil essentiel pour la compréhension de la physiopathologie de certaines maladies, ainsi que pour le criblage rapide de nouvelles molécules pharmaceutiques et donc le développement de nouveaux traitements.

B. La médecine régénérative

Les CSPi peuvent aussi avoir comme application la médecine régénérative, technique visant la supplémentation ou le remplacement de cellules déficientes. En effet, de nombreuses maladies, causées par la mort ou par le dysfonctionnement de cellules spécifiques peuvent être candidates à la thérapie cellulaire basée sur l'utilisation des CSPi (Csobonyeiova et al., 2015). La technologie des CSPi comporterait plusieurs avantages : la production de cellules cibles et de façon illimitée sans destruction d'embryon, *a contrario* des CSE, et la limitation du risque de rejet dans le cas de transplantations autologues (de Rham et Villard, 2014).

Pour réussir une transplantation, trois paramètres doivent être validés : le groupe sanguin (ABO compatibilité), l'antigène leucocyte humain ou HLA et les antigènes secondaires. Théoriquement, dans le cas de transplantation autologue à partir de CSPi, aucun de ces paramètres ne peut poser problème puisque les cellules ont été reprogrammées à partir de cellules somatiques du patient lui-même. Cependant, à cause de diverses procédures règlementaires et de coûts économiques important, la production de CSPi, de tissus ou même d'organe pour chaque patient semble difficilement concevable. Afin de pallier à ce problème, il a été suggéré la création d'une haplobanque de CSPi constituée de cellules homozygotes pour l'HLA du groupe sanguin universel O, utilisable donc pour le plus grand nombre de patients (de Rham and Villard, 2014). Ainsi, une étude anglaise a déjà développé trois lignées de CSPi histocompatibles avec environ 1/3 de la population britannique (Taylor et al., 2011).

Depuis les vingt dernières années, de nombreuses avancées ont été réalisées en vue d'utiliser les cellules souches en médecine régénérative. Ainsi, en 2009, a été produit, pour la première fois, un épiderme adulte complet et fonctionnel à partir de CSE (Guenou et al., 2009). Ce dernier peut être utilisé pour traiter toutes pathologies de peau, les grands brûlés ou pour soigner les complications de certaines maladies comme le diabète. En 2014, Philippe Menasché a réalisé la première transplantation de cellules cardiaques provenant de CSE au niveau de patients d'insuffisance cardiaque sévère (Menasché et al., 2015). Cette opération a été couplée à un pontage coronarien. Malgré une amélioration de l'état de santé un an après la transplantation, il semble difficile d'estimer qu'elle ne soit due qu'à la seule transplantation des cellules cardiaques d'origine embryonnaire.

Actuellement, il n'y a eu qu'un seul essai de thérapie cellulaire utilisant des CSPi (Cf Chapitre II.V.4 – Transplantation et médecine régénérative).

OBJECTIFS DE LA THESE

La DMLA est devenue un problème majeur en terme de santé publique depuis plusieurs années et va s'amplifier avec le vieillissement prévu de la population. En effet, il n'existe pas à l'heure actuelle de traitement curatif pour cette maladie. Malgré l'existence de thérapies permettant de stabiliser la forme exsudative, aucun remède n'est disponible pour les personnes atteintes de la forme atrophique. La DMLA aboutit inéluctablement à la cécité légale ce qui a un impact important sur la qualité de vie des patients, cette maladie conduisant à la dépendance et à l'handicap.

Outre le développement de nouvelles thérapeutiques, l'objectif des prochaines années en ophtalmologie est une meilleure prévention de la DMLA. L'amélioration du diagnostic repose sur la compréhension des mécanismes physiopathologiques aboutissant au développement de la maladie. Ainsi, il est nécessaire de développer des modèles dans le but d'étudier la maladie en laboratoire afin de tester de nouvelles hypothèses physiopathologiques ou de nouvelles molécules potentiellement bénéfiques.

L'objectif de cette thèse a été le développement d'un modèle cellulaire humain permettant l'analyse de la pathogénie de la DMLA atrophique *in vitro*.

Ce travail repose sur deux parties :

1) La première partie a été **l'obtention et la caractérisation de cellules de l'EPR** à partir de cellules somatiques provenant de personnes saines (sans pathologie oculaire) et de patients atteints de la DMLA atrophique.

Les cellules de sang (cellules mononuclées du sang périphérique ou PBMC) ou de peau (fibroblastes) ont été reprogrammées en hCSPi par nucléofection des facteurs de Yamanaka. Les cellules obtenues ont été différenciées en cellules de l'EPR, via un protocole de différenciation spontanée. Les deux populations cellulaires, hCSPi et les cellules de l'EPR dérivées de hCSPi, ont été caractérisées morphologiquement et par l'analyse de l'expression de marqueurs typiques de leur population cellulaire respective.

2) La deuxième partie de ce travail s'est basée sur la **caractérisation phénotypique des deux populations de cellules de l'EPR (contrôle et DMLA)** basée sur les différentes hypothèses pathogéniques de la DMLA.

Nous avons cherché à mettre en évidence des différences mécanistiques entre les deux populations de cellules de l'EPR dans des conditions de culture mimant l'environnement micro oxydant de la DMLA. Ainsi, nous avons induit la production d'ERO par un traitement au fer (FeCL₃-sodium nitrilotriacétate ou Fe-NTA) pendant 24 heures. Dans ce projet, nous nous sommes principalement intéressés à l'hypothèse oxydative expliquant le développement de la DMLA et avons donc focalisé nos analyses sur la réponse cellulaire au stress oxydant, ainsi que sur les processus d'apoptose et les systèmes de dégradation protéique.

Article « Typical disease-phenotype of hiPSC-RPE derived from dry AMD patients » Audrey Voisin, Christelle Monville, Alexandra Plancheron, Anaïs Balbous, Afsaneh Gaillard, Nicolas Leveziel, Proceedings of the National Academy of Sciences, in submission (2017).

En parallèle de ce projet, un projet annexe a permis de valider notre modèle cellulaire par comparaison avec les cellules ARPE-19.

Article « hRPE cells derived from induced pluripotent stem cells better recapitulate oxidative stress responses than ARPE-19 cells » Audrey Voisin, Christelle Monville, Alexandra Plancheron, Anaïs Balbous, Afsaneh Gaillard, Nicolas Leveziel Investigative Ophthalmology and Visual Science, in submission (Juillet 2017).

Les deux articles seront présentés dans l'ordre de soumission.

RESULTATS

Résultats

Article I

« hRPE cells derived from induced pluripotent stem cells better recapitulate oxidative stress responses than ARPE-19 cells »

Audrey Voisin, Christelle Monville, Alexandra Plancheron, Anaïs Balbous, Afsaneh Gaillard,

Nicolas Leveziel

Aging & Disease, en soumission (2017).

- **Objectifs de l'étude** : La lignée ARPE-19 est couramment utilisée *in vitro* pour l'analyse de mécanismes physiopathologiques impliqués dans le développement de pathologies rétiniennes telle que la DMLA (Chen et al., 2009), ainsi que pour le screening thérapeutique (Saenz-de-Viteri et al., 2016 ; Sheu et al., 2015). Cependant, depuis plusieurs années, de nombreuses études ont pu mettre en évidence des différences morphologiques et génétiques entre les cellules ARPE-19 et les cellules humaines de l'EPR d'origine fœtale (Ablonczy et al., 2011), adulte (Cai and Del Priore, 2006) ou dérivées de CSE (Garcia et al., 2015). Ces cellules ont d'ailleurs été qualifiées de cellules de l'EPR immatures (Garcia et al., 2015).

Depuis la dernière décennie, l'optimisation des processus de reprogrammation et de différenciation cellulaire nous permet aujourd'hui de développer des modèles dérivés de hCSPi pour l'étude des maladies rétiniennes *in vitro* (Buchholz et al., 2013 ; Maruotti et al., 2013).

L'objectif de cette étude a été de comparer la lignée ARPE-19 avec des cellules de l'EPR dérivées de hCSPi (4 lignées provenant de sujets sans pathologie oculaire), en condition basale et lors d'un stress oxydant induit par le Fe-NTA pendant 24 heures. Ces résultats permettront (i) de confirmer que les cellules ARPE-19 présentent des différences importantes au point de vue morphologique et fonctionnel avec les cellules hCSPi-EPR (ii) de conforter l'application des hCSPi-EPR pour la modélisation de pathologies rétiniennes *in vitro*.

- **Résultats et discussion** : Les cellules ARPE-19, de par leur propriété de lignée cellulaire immortalisée, n'expriment pas la β -galactosidase, biomarqueur du vieillissement cellulaire. Cette enzyme est par ailleurs exprimée par 50% des cellules hCSPi-RPE, soulignant leur phénotype sénescence.

Le vieillissement est responsable, entre autre, de la production de stress oxydatif (Soubrane et al., 2007). Or, même si les taux d'ERO sont similaires en condition de base entre les deux populations, le traitement au Fe-NTA va induire une production de stress oxydatif plus importante chez les cellules hCSPi-EPR comparées au ARPE-19 (à partir d'une concentration de 10 mM pendant 24 heures). Ce stress oxydant va induire une mort

cellulaire au niveau des cellules hCSPi-EPR dès 10 mM, contrairement aux cellules ARPE-19 où la viabilité cellulaire ne sera significativement altérée qu'à partir de 20 mM. De plus, lors du traitement au Fe-NTA, les cellules ARPE-19 dégènèrent uniquement via le processus d'apoptose, tandis que des marqueurs nécrotiques sont retrouvés dans les populations de cellules hCSPi-EPR.

Nous avons montré pour la première fois des différences importantes entre la lignée cellulaire ARPE-19 et les cellules de l'EPR dérivées de hCSPi. Les cellules hCSPi-EPR, de par leur profil sénescence, semblent être plus à même de modéliser une pathologie du vieillissement telle que la DMLA. De plus, nous avons décrit que les cellules hCSPi-EPR sont plus sensibles au traitement au Fe-NTA, se traduisant par une production d'ERO plus importante et une survie cellulaire diminuée comparées aux cellules ARPE-19. Or, il a été établi que le stress oxydant induit par l'âge est responsable de dysfonctionnement de certaines fonctions principales des cellules de l'EPR telle que la phagocytose (Soubrane et al., 2007). Nous pouvons donc nous demander si le phénotype fonctionnel (phagocytose, activité lysosomale) de ces deux lignées cellulaires sont affectées de la même façon lors d'un stress oxydant. L'ensemble de ces résultats suggèrent donc que les hCSPi-EPR sont un modèle plus proche des cellules de l'EPR natives que le modèle des cellules ARPE-19 généralement utilisé. Ainsi, les résultats obtenus avec les cellules ARPE-19 doivent être confirmés par duplication des expériences en utilisant un autre modèle cellulaire tel que les cellules CSPi-EPR.

hRPE cells derived from induced pluripotent stem cells better recapitulate oxidative stress responses than ARPE-19 cells

Audrey Voisin^{1,2}, Christelle Monville³, Alexandra Plancheron³, Anaïs Balbous^{1,4}, Afsaneh Gaillard^{1,2}, Nicolas Leveziel^{1,4}

¹ INSERM, U1084, Experimental and Clinical Neurosciences Laboratory, Cellular Therapies in Brain Diseases Group, Poitiers, F-86022, France.

² University of Poitiers, Experimental and Clinical Neurosciences Laboratory, Cellular Therapies in Brain Diseases Group, Poitiers, F-86073, France.

³ INSERM, UMR861, I-Stem, AFM, Genopole Campus 1, Evry, F- 91030, France.

⁴ University Hospital of Poitiers, Poitiers, F-86021, France.

Corresponding author: Nicolas Leveziel

Postal address: INSERM U1084, University of Poitiers

Laboratoire de Neurosciences Experimentales et Cliniques-LNEC

Building B36, 1 rue Georges Bonnet,

BP 633, 86022 POITIERS cedex

Email address: nicolas.leveziel@yahoo.fr

Telephone number: (33) (0) 5 49 45 30 00 – Fax number: (33) (0) 5 49 45 30 50

Running title :RPE-iPSC : a more reliable model for AMD

PURPOSE: ARPE-19 cells line is currently used as an *in vitro* model for retinal diseases such as age-related degeneration (AMD). Up to now few studies show morphological and genetic differences between ARPE-19 cells and foetal or adult human retinal pigment epithelial (hRPE) cells. This study aims to compare ARPE-19 cells to RPE cells derived from human induced pluripotent stem cells (hiPSCs) in both normal and oxidative stress conditions.

METHODS: hiPSC obtained from peripheral venous blood samples or fibroblasts of individuals aged over 60 years were first reprogrammed to hiPSC and then were differentiated into RPE cells. Senescent cells were quantified by β -galactosidase activity in basal condition. Under Fe-NTA treatment, we evaluated the toxicity level of iron by MTT test and estimated the oxidative stress produced by detection of dichloro-dihydro-fluorescein diacetate (DCFH-DA). Cell death pattern was analyzed by Annexin V and propidium iodide (PI) test.

RESULTS: Only hiPSC-RPE cells expressed β -galactosidase activity ($48.1 \pm 10.70\%$), suggesting that these cells have a senescent profile. Treatment with 10 mM of FeNTA induced a higher reactive oxygen species (ROS) production and increased cell death in hiPSC-RPE cells than in ARPE-19 cells suggesting that hiPSC-RPE cells are more sensitive to oxidative stress. Moreover, morphological analysis and Annexin V and PI test suggested a necrotic cell death pattern induced by treatment in hiPSC-RPE cells which is not observed in ARPE-19 cells.

CONCLUSIONS: Collectively, our findings suggest that hiPSC-RPE cells are a more valuable *in vitro* model than ARPE-19 cells to mimic pathological processes observed in AMD.

Keywords: age-related macular degeneration, induced pluripotent stem cells, disease modeling, oxidative stress, ARPE-19 cells

INTRODUCTION

Age-related macular degeneration (AMD), the leading cause of irreversible blindness in the elderly population, affecting approximately 9% of the global population (WHO), is a complex multifactorial disease characterized by drusen formation and progressive degeneration of retinal pigment epithelial cells (RPE) and photoreceptors (De Jong, 2006). Etiology of AMD remains poorly understood and both genetic and environmental risk factors are involved in the development and progression of AMD, likely through induction of oxidative stress (Garcia et al., 2015; Jarrett and Boulton, 2012).

RPE cells, as components of the outer retinal blood barrier, play a key role by assuring nutriment and water input, vitamin A recycling, light absorption and phagocytosis of the outer segment of photoreceptor (Strauss, 2005). Aging of RPE cells induces mitochondrial damage, lysosomal dysregulation and accumulation of lipofuscin, suggesting that these cells have a central role in the pathogenesis of AMD (Ach et al., 2015; Chen et al., 2009; Terluk et al., 2015). ARPE-19 cells, an immortalized RPE cell line derived in 1986 by Amy Aotaki-Keen from the normal eyes of a 19-year-old male (Dunn et al., 1996), is currently used as an *in vitro* model for human RPE cells to test the therapeutic potential of molecules before animal studies or phase 1 clinical trials (Saenz-de-Viteri et al., 2016; Sheu et al., 2015). However, up to now, several studies have highlighted the morphological and genetic differences between ARPE-19 cells and foetal (Ablonczy et al., 2011) or adult (Cai and Del Priore, 2006) human retinal pigment epithelial (hRPE) cells. Recently, Garcia et al. (Garcia et al., 2015) modeled AMD *in vitro* using RPE cells derived from human embryonic stem cells (hES) and human pluripotent stem cells (hiPSC) and showed morphological differences with ARPE-19 cells. They suggested that ARPE-19 cells must be considered as immature RPE.

Since the past decade, many improvements in cell reprogramming and differentiation allow the generation of specific cell types such as RPE cells (Buchholz et al., 2013; Maruotti et al., 2013).

In a recent study, RPE cells derived from hiPSC were used to model retinal disease (Garcia et al., 2015; Singh et al., 2013).

Local response to chronic oxidative stress has been shown to be an important factor contributing to the development of AMD (Khandhadia and Lotery, 2010). Although the association between cumulative oxidative stress with age is not completely known, Chen et al. (Chen et al., 2009) showed that iron, an essential element in many metabolic processes that accumulates with normal aging, may contribute to the pathogenesis of AMD as a source of free radicals contributing to tissue damages through lipidic membranes alterations and proteins modifications (He et al., 2007).

As oxidative stress mediated RPE damage is thought to be a key factor in the pathogenesis of AMD, the aim of our study is to compare hRPE derived from iPSC to ARPE-19 cells under normal and oxidative stress conditions induced by iron (Fe-NTA). Iron is a natural element that accumulates with normal aging (Chen et al., 2009), and it has been observed that iron was more found into the retina, and especially into macular area and RPE cells, in people affected by dry AMD (Dentchev et al., 2005). We have shown that FeNTA induced higher reactive oxygen species (ROS) production and more cell death in hiPSC-RPE cells than in ARPE-19 cells, thereby suggesting that hiPSC-RPE cells are more sensitive to oxidative stress. Our findings suggest that RPE cells obtained from hiPSC are a more valuable *in vitro* model than ARPE-19 cells in mimicking the pathological processes observed in AMD. Moreover, these results point at the open new potential utility of hiPSC-RPE cells in pharmacological screening to develop new treatments.

MATERIALS & METHODS

Cell culture of ARPE-19

ARPE-19 cell line (American Type Culture Collections, Manassas, VA, USA) were maintained and passaged in standard culture dishes (Dutscher, Brumath, France) using DMEM/F12 media (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) with 10% fetal bovine serum (Sigma, Saint-Louis, MO, USA), 1% MEM in a humidified incubator, kept at 37°C in 5% CO₂. The media was changed every 2 to 3 days.

Generation of hiPSC from blood cells and fibroblasts

Blood from 2 individuals without known eye disease (65 and 71 y/o) was obtained with informed consent according to the Committee for Protection of Persons (n°20152528) and with the tenets of the Declaration of Helsinki. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated by Ficoll, and maintained in StemSPAN media (StemCell, Vancouver, Canada) supplemented with 50 ng/mL stem cell factor (R&D, Lille, France), 2 U/mL erythropoietin (R&D), 10 µg/mL fibroblast growth factor 2 (FGF2, Peprotech, Neuilly-sur-Seine, France), 1 mM dexamethasone (Sigma), 40 µg/mL insulin-like growth factor-1 (Miltenyi, Bergisch Gladbach, Germany), 10 µg/mL interleukin-3 (Miltenyi) and 50 ng/mL ascorbic acid (Sigma). Cells were nucleofected with Yamanaka factors (Addgene, Cambridge, MA, USA: pCXLE-hOCT3/4-shp53-F, pCXLE-hUL, pCXLE-hSK). At day 4 after nucleofection, cells were plated onto feeders (MTI Globalstem, Gaithersburg, MD, USA). During 10 days cells were cultured into DMEM/F12 media supplemented with: 10% of KnockOut™ Serum Replacement (KSR, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 10 µg/mL FGF2, 2 µM SB431542 (R&D), 0.5 µM PD0325901 (Euromedex, Souffleweyersheim, France), 2 µM thiazovivin (R&D), 3 µM CHIR99021 (Bertin Pharma, Montigny-le-Bretonneux, France), 0.5mM valproic acid (Sigma) and 0.25mM sodium butyrate (Sigma).

Two fibroblast cell lines (74 and 81 y/o) obtained from Coriell Institute for Medical Research

(New Jersey, NJ, USA) were nucleofected with Yamanaka factors using the same protocol as PBMC. At day 4 after nucleofection, DMEM/F12 media was supplemented with 10% KSR, 10 µg/mL FGF2, 2 µM SB431542, 0.5 µM PD0325901 and 0.5mM VPA.

At day 10 post-reprogramming, VPA and NaB were removed from the culture medium. At day 15 post-reprogramming, SB461542, PD0325901, CHIR99021 and thiazovivin were removed from the culture medium. hiPS colonies appeared around 10-15 days of culture and were picked around 2-3 weeks post nucleofection. The culture medium (DMEM F/12 + 20% KSR +10 µg/mL FGF2) was changed every day.

For statistical analysis, n corresponds to number of replicate, and N to number of cell lines.

Differentiation of hiPSC into RPE cells

To ensure chromosomal integrity differentiation of hiPSC was initiated before passage 10 (Brandl et al., 2014). hiPSC were differentiated into RPE cells by switching the culture medium to DMEM High Glucose (Invitrogen) supplemented with 20% KSR without FGF2 as previously described (Reichman et al., 2014). Pigmented areas with typical RPE appearance usually appeared three weeks after initiation of differentiation. Specific selection of RPE cells was obtained after manual transfer of the pigmented colonies into new plates (P0). hiPSC-RPE cells were cultured with DMEM High Glucose supplemented with 4% KSR. Medium was changed twice a week. hiPSC-RPE cells were passaged every 3 weeks up to two passages.

hiPSC and RPE Characterization

Cells were stained with pluripotency and RPE specific cell markers for immunostaining and flow cytometry analyses. Briefly, hiPSCs were fixed with cold 4% paraformaldehyde for 20 min and washed twice with phosphate buffer saline (PBS). Non-specific binding sites and permeabilization were performed using a blocking solution containing PBS, 0.1% Triton X-100 (Sigma), 5% Goat Serum and 5% Horse Serum (Sigma) for 1 hour. Cells were then incubated overnight at 4°C with the following primary antibodies diluted in blocking solution: Oct-4 (1/200, Abcam, Cambridge, MA, USA), Nanog (1/200, Abcam), ZO-1 (1/100, ThermoFischer,

Wathman, MA, USA), Bestrophine-1 (1/100, Novus Biological, Littleton, CO, USA), Pax6 (1/75, Abcam) and Tyrosinase (1/100, Abcam). Cells were washed twice in PBS, followed by staining with the secondary antibodies (for Oct-4, Bestrophine-1 and Tyrosinase: Donkey Anti-Rabbit IgG H&L Alexa Fluor 555 (Abcam); for Nanog, Pax6 and ZO-1: Goat Anti-Mouse IgG H&L Alexa Fluor 488 (Abcam) and nuclei were stained with DAPI (Invitrogen). Slides were mounted with Moviol (Sigma) and cells were observed with a Zeiss microscope and counted using ZEN software (Iéna, Germany).

For FACS analysis, hiPSCs were dissociated using Accutase (ThermoFischer) for 5 min at room temperature and incubated with the following primary conjugated antibodies: anti TRA-1-81-AlexaFluor 488 (1/25; BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA), anti SSEA3 -AlexaFluor 488 (1/10; BD Biosciences) for 30 min at 4°C in the dark. Cells were analyzed on FACS Verse (BD Biosciences) with 100,000 events acquired for each sample. Data were analyzed with FlowJo® software (Ashland, OR, USA).

For phosphatase alkaline activity, hiPSC were fixed with 95% ethanol and incubated 10 minutes with the Sigma Fast BCIP/NBT kit (Sigma) following the manufacturer's instructions.

Measure of senescence by β -Gal activity

The hiPSC-RPE cells were seeded in 24-well plates and allowed to mature for up to 3 weeks following final passage (P2). Cells at confluency showing typical cobblestone morphology and presence of pigmentation were stained with SA- β -gal (Dimri et al., 1995) assay detection kit (Abcam) according to the manufacturer's instructions. The percentage of SA- β -gal positive cells was calculated by counting the number of labeled cells manually with ZEN software.

Iron Treatment and induction of oxidative Stress

ARPE-19 cells (at confluency) and hiPSC-RPE cells (3 weeks after P2) were treated for 24 hours with FeCl₃-sodium nitrilotriacetate (Fe-NTA), at final concentrations of 5 to 20 mM as previously described (Awai et al., 1979).

Measurement of Oxidative Stress

After treatment of cells with Fe-NTA, cells were washed with PBS and incubated with 1mL of fresh culture medium supplemented by 10 µg/ml of DCFH-DA (Rosenkranz et al., 1992a) (Sigma) for 1 hour at 37°C. Cells were then washed with PBS and maintained in 1 mL of PBS-2% SVF culture medium. Fluorescence was measured with a microplate reader (Berthold Technologies, Bad Wildbad, Germany; excitation 488 nm, emission 535 nm) and intensity values were calculated with Mithras software (Berthold Technologies)

MTT test

MTT assay (Sigma) was used to determine cellular viability as previously described⁶. Briefly, after 24 hours of Fe-NTA exposure, medium was replaced with 0.5 mg/ml MTT. Following 3h30 incubation at 37°C, cells were lysed with DMSO (Taghiloo et al., 2017). Absorbance was then read at 540 nm and 620 nm (background) with a microplate reader (Tecan, Männedorf, Suisse) and analyzed with Magellan software (Tecan).

Analysis of cell death pattern

To discriminate apoptotic and necrotic cells, dual staining with fluorescent Annexin V (apoptotic cells) and propidium iodide (PI, necrotic cells) was performed using flow cytometry (Vermees et al., 1995). After Fe-NTA exposure, the cells were collected and incubated with Annexin V-FITC and PI solution (Abcam) in 100 µL of binding buffer for 5 minutes at RT in the dark. 20,000 cells per experiment were analyzed using FACS Verse (BD Biosciences) and FlowJo® software (Ashland, OR).

Analysis of phagocytosis

hiPSC-RPE cells were incubated 3 hours with fluorescent carbonylates-modified microspheres (ThermoFischer). The cells were then washed 3 times with PBS and maintained in 1 mL of PBS-2% SVF culture medium. Fluorescence (505/515 nm) was analyzed with FACS Verse (BD Biosciences) and FlowJo® software.

RESULTS

Derivation and characterization of hiPSC-RPE from Blood Cell and Fibroblasts

hiPSC showed typical hES-like morphology (Fig. 1A) and alkaline phosphatase activity (Fig. 1B). By using immunofluorescence and flow cytometry experiments, we showed that hiPSC colonies obtained from blood cells and fibroblasts expressed several human ESC-associated antigens such as OCT4 (Fig. 1C), NANOG (Fig. 1C), SSEA-3 (Fig. 1D) and TRA1-81 (Fig. 1D).

About 3 weeks after induction of RPE cell differentiation, pigmented clusters of hexagonal cells were visible (Fig. 2A). 3-4 weeks after manual isolation of pigmented clusters, they formed a confluent cell monolayer that displayed classical cobblestone morphology (Fig. 2B). Immunostaining demonstrated the presence of RPE specific marker protein bestrophine-1 (BEST-1), eye development markers Pax6, tight-junctions complex marker zonula occludens 1 (ZO-1) and melanin production markers tyrosinase (Fig. 2C).

We did not observe any difference in efficiency and timing in cell reprogramming and differentiation between PBMC and fibroblasts, and for all the other assays in the manuscript.

hiPSC-RPE express SA- β -Gal activity unlike ARPE-19

SA- β -Gal activity is present only in senescent cells and is not found in presenescent, quiescent or immortal cells (Dimri et al., 1995). As shown in Figure 3, SA- β -Gal activity was not observed in ARPE-19 cells while it was expressed in approximately 50% of hiPSC-RPE cells, thereby suggesting a senescent cell phenotype.

Morphological modifications and ROS production induced by Fe-NTA treatment

No morphological modification was observed during Fe-NTA treatment prior to a dose of 20 mM for ARPE-19 cells whereas hiPSC-RPE cells displayed a cell body volume increase (Fig. 4) from 15 mM of Fe-NTA.

The oxidation of DCFH by ROS to DCF, a green fluorescent oxidation product (Rosenkranz et

al., 1992a), was measured for each concentration of Fe-NTA. Fe-NTA treatment induced production of ROS in a dose-dependent manner in both cell lines (Fig. 5). However, ROS production was significantly higher in hiPSC-RPE cells compared to ARPE-19 cells at a dose of 10 mM and higher.

Cellular viability of ARPE-19 and hiPSC-RPE cells under oxidative stress

Cellular viability of both cell lines was determined under oxidative stress condition induced by Fe-NTA at different concentrations. For ARPE-19, induced cell death was not observed for Fe-NTA concentrations less than 20 mM, while induced cell death of hiPSC-RPE was observed at Fe-NTA concentrations equal or greater than 10 mM (Fig. 6).

Cell death pattern of ARPE-19 and hiPSC-RPE cells under oxidative stress

Cells positive for Annexin-V were considered early apoptotic and cells positive for PI were considered necrotic. Cell death patterns induced by Fe-NTA differed between ARPE-19 and hiPSC-RPE cells. In both cell lines an increase of Annexin-V positive cells was observed with increasing Fe-NTA concentrations. However, there were fewer necrotic ARPE-19 cells (< 3%) for any treatment while a dose-dependent increase of the necrotic marker PI was observed for hiPSC-RPE cells (Fig. 7). The proportion of necrotic cells was significantly higher in hiPSC-RPE cells than in ARPE-19 cells until 15 mM of Fe-NTA.

Phagocytosis activity of hiPSC-RPE Control and ARPE-19 under oxidative stress

For ARPE-19 cells, a significant decrease of phagocytosis activity from 5 mM of Fe-NTA ($56,3 \pm 9,11\%$) was observed (Fig. 8A). No significant difference in phagocytosis activity was observed in hiPSC-RPE for any treatment (Fig 8B).

DISCUSSION

Pathological mechanisms leading to AMD are not clearly understood, but initial cellular alterations have been observed in the RPE layer (Bowes Rickman et al., 2013). Determination of mechanisms involved in RPE degeneration is important to develop preventive and therapeutic strategies in AMD. However, there exist validated risk factors including aging, environmental factors (smoking, higher saturated lipid intake (Seddon JM et al., 2001)) and genetic factors (gene involved in lipid metabolism and in complement pathways (Clark et al., 2010; Raychaudhuri et al., 2011)). All these studies led to the hypothesis that oxidative stress may play a major role in AMD pathogenesis (Garcia et al., 2015; Jarrett and Boulton, 2012). Indeed, with aging process, physiological increase of oxidative stress is responsible of morphological and functional cell modifications (Balaban et al., 2005).

The present study aimed to compare ARPE-19 cells to RPE cells derived from hiPSC in both normal and oxidative stress conditions. hiPSC-RPE cells derived from somatic cells (PBMC and fibroblast) of aged individuals had characteristics similar to hRPE cells. Indeed, they expressed typical RPE cell markers such as ZO-1, Pax6, Tyrosinase and Bestrophine-1. hiPSC-RPE cells also displayed morphologic characteristics similar to hRPE cells with pigmentation and octagonal shapes.

The most prominent finding of our study is that hiPSC-RPE cells differ from ARPE-19 cells in terms of senescence profile and response to oxidative stress. Indeed, only hiPSC-RPE cells expressed SA- β -Gal activity characterizing senescence profile. Senescent hRPE cells observed during AMD accumulate lipofuscin (Sparrow et al., 2012) and are functionally and morphologically impaired (Soubrane et al., 2007). It has previously been shown that oxidative stress induced by aging leads to RPE cell phagocytosis and autophagy process dysfunctions (Golestaneh et al., 2017). Because aging is the main risk factor of AMD (Sharma et al., 2014), it is essential to include this parameter to study physiopathological mechanisms occurring in

AMD. In this context, the use of ARPE-19 cells may be considered as a very critical model for AMD.

In this study, we compared hiPSC-RPE cells to ARPE-19 cells under oxidative stress conditions induced by Fe-NTA treatment. ROS production and cell death were significantly higher in hiPSC-RPE cells, suggesting that these cells are more sensitive to iron accumulation than ARPE-19 cells. The vast majority of cellular ROS can be tracked to the mitochondria (Balaban et al., 2005), it could be interesting to further investigate mitochondrial activity. Indeed, Golestaneh et al. recently showed that post-mortem RPE cells obtained from AMD patients have lower mitochondrial activity (Golestaneh et al., 2017). Moreover, a recent study reported that post-mortem RPE from AMD patients has more mitochondrial DNA alterations when compared to control individuals (Terluk et al., 2015).

Additionally, we demonstrated that the cell death pattern under oxidative stress could differ between ARPE-19 and hRPE-iPSC cells. Indeed, hiPSC-RPE cells had a significant increase of necrotic markers during intracellular iron accumulation whereas ARPE-19 cells did not exhibit necrotic process, suggesting two distinct cell death pathways. Although Annexin V-PI test is commonly used to study cell death patterns, Sawai and al. (Sawai and Domae, 2011), showed that primary necrotic and post-apoptotic secondary necrotic cells could not be discriminated by this method. Indeed, they demonstrated that primary necrotic cells unexpectedly had Annexin V-positive/PI-negative staining before becoming PI-positive. They also demonstrated that primary necrotic and apoptotic Annexin V-positive/PI-negative cells can be discriminated by necrostatin-1, an inhibitor of primary necrosis by inhibition of RIP1. Apoptotic and necrotic cells can also be differentiated from each other by morphological differences (Parmeggiani et al., 2012). Indeed, apoptotic process is characterized by decreased cell size, with DNA fragmentation and without inflammation while necrosis is a passive process, leading to cell body volume increase, dilation of organelles, cellular breakdown and inflammation (Tsujimoto, 1997). In AMD lesions, histopathologic studies described an inflammatory component, with

cellular infiltration of microglial cells, recruitment of macrophages, complement activation and production of inflammatory related molecules (Donoso et al., 2006; Parmeggiani et al., 2012). An absence of cellular alteration was observed in our study in ARPE-19 cells under Fe-NTA treatment, whereas cell volume of hiPSC-RPE cells increased, suggesting a necrosis process in these cells. This hypothesis is consistent with the result of Annexin V-PI test. In this context, hiPSC-RPE cells are more prone to mimic AMD processes observed at the level of hRPE than ARPE-19 cells, which did not express a necrotic phenotype after exposure to oxidative stress.

Up until now few studies have highlighted critical differences between ARPE-19 and native RPE cells (Ablonczy et al., 2011; Cai and Del Priore, 2006). Indeed, despite a similar polarity organization with native RPE cells (Ablonczy et al., 2011; Dunn et al., 1998; Kamao et al., 2014), ARPE-19 cells don't have the typical cobblestone epithelial morphology (Samuel et al., 2017) and present little or no pigmentation (Ablonczy et al., 2011). They have a limited development of tight-junction complex resulting in low trans-epithelial resistance compared to hRPE cells (Ablonczy et al., 2011). Moreover, ARPE-19 cells have a gene expression profile similar to native RPE cells, but expression level is sometimes lower or absent, as in *RPE65*. Cai and al (Cai and Del Priore, 2006), observed that ARPE-19 cells also differ genetically from adult RPE cells cultured from human donors, with 35 genes which were expressed exclusively by adult RPE cells and 9 in ARPE-19 cells. These differences could be partially explained by culture conditions that affect the phenotype of ARPE-19 cells (Jr et al., 2006; Luo et al., 2006; Samuel et al., 2017). Indeed, numerous passages of ARPE-19 cells can lead to loss of hRPE cells native characteristics (Ablonczy et al., 2011; Samuel et al., 2017). Recently, Samuel and al (Samuel et al., 2017) showed that long-term culture with low serum concentration (1%) led to epithelial organization and progressive pigmentation of ARPE-19 cells. In addition, they observed that this RPE phenotype acquisition is associated with modifications of the functional gene expression involved in phagocytosis (*MERTK*), visual cycle (*RPE65*) and permeability (*claudin 2*). Thanks to the improvement of culture condition, ARPE-19 cells phenotypes tend to

resemble native hRPE cells. However, none of conditions culture allow us to obtain absolute same characteristics.

ARPE-19 cells is a useful tool for the establishment of protocols or for first molecular screening. However, our results are consistent with the need to find a more reliable model of human RPE cells to reproduce the cellular mechanisms involved in AMD.

Up to now, only morphological differences with RPE derived from iPSC cells have been described (Garcia et al., 2015). In our study, we demonstrated that ARPE-19 and hiPSC-RPE cells responded differently to intracellular accumulation of iron and confirmed that hiPSC-RPE cells model could be more sensitive to detect the toxicity of a potential therapeutic agent, which could not be detected at the same concentration by using ARPE-19 cells. The present study shows that sensitivity to oxidative stress is important in hiPSC-RPE cells than in ARPE-19 cell line, probably due to the senescent profile of these cells. We can hypothesize that these differences could be explained by distinct gene expression profiles in response to oxidative stress or aging. Chen and al. (Chen et al., 2010), described age-associated change of mTOR pathway in hRPE cells.

Similarly, differences in terms of ROS production between ARPE-19 and hiPSC-RPE cells under oxidative stress raise the question of modulation of phagocytosis or lysosomal activity. Indeed, we show in this study fonctionnal differences in phagocytosis between ARPE-19 and hiPSC-RPE cells.

In conclusion, our results suggest that ARPE-19 cells may not be a reliable model for investigation of pathogenesis mechanisms of hRPE cells during AMD.

hiPSC-RPE cells present the singular advantage of obtaining samples from affected patients with precisely defined phenotypes or genotypes. In this context, further studies are needed to compare hiPSC-RPE cells from healthy individuals to those from AMD patients.

Acknowledgments

The authors would like to thank Jeffrey Arsham for having reread and corrected our original English-language manuscript, and Adriana Delwail for her help during cytometry experiments.

REFERENCES

- [1] De Jong, P. (2006) Age-Related Macular Degeneration. *New England Journal of Medicine*, 355, 1474–85. <https://doi.org/10.1056/NEJMra062326>
- [2] Jarrett, S.G. and Boulton, M.E. (2012) Consequences of oxidative stress in age-related macular degeneration. *Molecular Aspects of Medicine*, 33, 399–417. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2012.03.009>
- [3] Garcia, T.Y., Gutierrez, M., Reynolds, J. and Lamba, D.A. (2015) Modeling the Dynamic AMD-Associated Chronic Oxidative Stress Changes in Human ESC and iPSC-Derived RPE Cells. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 56, 7480. <https://doi.org/10.1167/iovs.15-17251>
- [4] Strauss, O. (2005) The retinal pigment epithelium in visual function. *Physiological Reviews*, 85, 845–81. <https://doi.org/10.1152/physrev.00021.2004>
- [5] Terluk, M.R., Kappahn, R.J., Soukup, L.M., Gong, H., Gallardo, C., Montezuma, S.R. et al. (2015) Investigating Mitochondria as a Target for Treating Age-Related Macular Degeneration. *Journal of Neuroscience*, 35, 7304–11. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0190-15.2015>
- [6] Chen, H., Lukas, T.J., Du, N., Suyeoka, G. and Neufeld, A.H. (2009) Dysfunction of the Retinal Pigment Epithelium with Age: Increased Iron Decreases Phagocytosis and Lysosomal Activity. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 50, 1895. <https://doi.org/10.1167/iovs.08-2850>
- [7] Ach, T., Tolstik, E., Messinger, J.D., Zarubina, A.V., Heintzmann, R. and Curcio, C.A. (2015) Lipofuscin Redistribution and Loss Accompanied by Cytoskeletal Stress in Retinal Pigment Epithelium of Eyes With Age-Related Macular Degeneration. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 56, 3242–3252.
- [8] Dunn, K.C., Aotaki-Keen, A., Putkey, F.R. and Hjelmeland, L.M. (1996) ARPE-19, A Human Retinal Pigment Epithelial Cell Line with Differentiated Properties. *Experimental Eye Research*, 62, 155–70. <https://doi.org/10.1006/exer.1996.0020>
- [9] Sheu, S.-J., Chao, Y.-M., Liu, N.-C. and Chan, J.Y.H. (2015) Differential effects of bevacizumab, ranibizumab and aflibercept on cell viability, phagocytosis and mitochondrial bioenergetics of retinal pigment epithelial cell. *Acta Ophthalmologica*, 93, e631-643. <https://doi.org/10.1111/aos.12745>
- [10] Saenz-de-Viteri, M., Fernández-Robredo, P., Hernández, M., Bezunarte, J., Reiter, N., Recalde, S. et al. (2016) Single- and repeated-dose toxicity study of bevacizumab, ranibizumab, and aflibercept in ARPE-19 cells under normal and oxidative stress conditions. *Biochemical Pharmacology*, 103, 129–39. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2015.12.017>
- [11] Ablonczy, Z., Dahrouj, M., Tang, P.H., Liu, Y., Sambamurti, K., Marmorstein, A.D. et al. (2011) Human Retinal Pigment Epithelium Cells as Functional Models for the RPE In Vivo. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 52, 8614–20. <https://doi.org/10.1167/iovs.11-8021>
- [12] Cai, H. and Del Priore, L.V. (2006) Gene expression profile of cultured adult compared to immortalized human RPE. *Molecular Vision*, 12, 1–14.

- [13] Maruotti, J., Wahlin, K., Gorrell, D., Bhutto, I., Luty, G. and Zack, D.J. (2013) A Simple and Scalable Process for the Differentiation of Retinal Pigment Epithelium From Human Pluripotent Stem Cells. *Stem Cells Translational Medicine*, 2, 341–54. <https://doi.org/10.5966/sctm.2012-0106>
- [14] Buchholz, D.E., Pennington, B.O., Croze, R.H., Hinman, C.R., Coffey, P.J. and Clegg, D.O. (2013) Rapid and Efficient Directed Differentiation of Human Pluripotent Stem Cells Into Retinal Pigmented Epithelium. *Stem Cells Translational Medicine*, 2, 384–93. <https://doi.org/10.5966/sctm.2012-0163>
- [15] Singh, R., Shen, W., Kuai, D., Martin, J.M., Guo, X., Smith, M.A. et al. (2013) iPS cell modeling of Best disease: insights into the pathophysiology of an inherited macular degeneration. *Human Molecular Genetics*, 22, 593–607. <https://doi.org/10.1093/hmg/dds469>
- [16] Khandhadia, S. and Lotery, A. (2010) Oxidation and age-related macular degeneration: insights from molecular biology. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 12, e34. <https://doi.org/10.1017/S146239941000164X>
- [17] He, X., Hahn, P., Iacovelli, J., Wong, R., King, C., Bhisitkul, R. et al. (2007) Iron homeostasis and toxicity in retinal degeneration. *Progress in Retinal and Eye Research*, 26, 649–73. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2007.07.004>
- [18] Dentchev, T., Hahn, P. and Dunaief, J.L. (2005) Strong labeling for iron and the iron-handling proteins ferritin and ferroportin in the photoreceptor layer in age-related macular degeneration. *Archives of Ophthalmology (Chicago, Ill: 1960)*, 123, 1745–6. <https://doi.org/10.1001/archophth.123.12.1745>
- [19] Brandl, C., Zimmermann, S.J., Milenkovic, V.M., Rosendahl, S.M.G., Grassmann, F., Milenkovic, A. et al. (2014) In-Depth Characterisation of Retinal Pigment Epithelium (RPE) Cells Derived from Human Induced Pluripotent Stem Cells (hiPSC). *NeuroMolecular Medicine*, 16, 551–64. <https://doi.org/10.1007/s12017-014-8308-8>
- [20] Reichman, S., Terray, A., Slembrouck, A., Nanteau, C., Orieux, G., Habeler, W. et al. (2014) From confluent human iPS cells to self-forming neural retina and retinal pigmented epithelium. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111, 8518–23. <https://doi.org/10.1073/pnas.1324212111>
- [21] Dimri, G.P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C. et al. (1995) A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92, 9363–7.
- [22] Awai, M., Narasaki, M., Yamanoi, Y. and Seno, S. (1979) Induction of diabetes in animals by parenteral administration of ferric nitrilotriacetate. A model of experimental hemochromatosis. *The American Journal of Pathology*, 95, 663–73.
- [23] Rosenkranz, A., Schmaldienst, S., Stuhlmeier, K., Chen, W., Knapp, W. and Zlabinger, G. (1992) A Microplate Assay for the Detection of Oxidative Products Using 2',7'-Dichlorofluorescein-Diacetate. *Journal of Immunological Methods*, 156, 39–45. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(92\)90008-H](https://doi.org/10.1016/0022-1759(92)90008-H)
- [24] Taghiloo, S., Allahmoradi, E., Tehrani, M., Hossein-Nataj, H., Shekarriz, R., Janbabaie, G. et al. (2017) Frequency and functional characterization of Exhausted CD8⁺ T-cells in chronic

lymphocytic leukemia. *European Journal of Haematology*, <https://doi.org/10.1111/ejh.12880>

[25] Vermes, I., Haanen, C., Steffens-Nakken, H. and Reutellingsperger, C. (1995) A novel assay for apoptosis Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *Journal of Immunological Methods*, 184, 39–51. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(95\)00072-I](https://doi.org/10.1016/0022-1759(95)00072-I)

[26] Bowes Rickman, C., Farsiu, S., Toth, C.A. and Klingeborn, M. (2013) Dry Age-Related Macular Degeneration: Mechanisms, Therapeutic Targets, and Imaging. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 54, ORSF68-ORSF80. <https://doi.org/10.1167/iovs.13-12757>

[27] Seddon JM, Rosner B, Sperduto RD and et al. (2001) DIetary fat and risk for advanced age-related macular degeneration. *Archives of Ophthalmology*, 119, 1191–9. <https://doi.org/10.1001/archophth.119.8.1191>

[28] 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. *Biochemical Society Transactions*, 38, 1342–8. <https://doi.org/10.1042/BST0381342>

[29] Raychaudhuri, S., Iartchouk, O., Chin, K., Tan, P.L., Tai, A.K., Ripke, S. et al. (2011) A rare penetrant mutation in CFH confers high risk of age-related macular degeneration. *Nature Genetics*, 43, 1232–6. <https://doi.org/10.1038/ng.976>

[30] Balaban, R.S., Nemoto, S. and Finkel, T. (2005) Mitochondria, Oxidants, and Aging. *Cell*, 120, 483–95. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.02.001>

[31] Sparrow, J.R., Gregory-Roberts, E., Yamamoto, K., Blonska, A., Ghosh, S.K., Ueda, K. et al. (2012) The Bisretinoids of Retinal Pigment Epithelium. *Progress in Retinal and Eye Research*, 31, 121–35. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2011.12.001>

[32] Soubrane, G., Coscas, G. and Souied, É. (2007) Les DMLAs: [rapport présenté à la] Société française d'ophtalmologie. Elsevier-Masson, Issy-les-Moulineaux.

[33] Golestaneh, N., Chu, Y., Xiao, Y.-Y., Stoleru, G.L. and Theos, A.C. (2017) Dysfunctional autophagy in RPE, a contributing factor in age-related macular degeneration. *Cell Death & Disease*, 8, e2537. <https://doi.org/10.1038/cddis.2016.453>

[34] Sharma, K., Sharma, N.K. and Anand, A. (2014) Why AMD is a disease of ageing and not of development: mechanisms and insights. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 6. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2014.00151>

[35] Sawai, H. and Domae, N. (2011) Discrimination between primary necrosis and apoptosis by necrostatin-1 in Annexin V-positive/propidium iodide-negative cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 411, 569–73. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.06.186>

[36] Parmeggiani, F., Romano, M.R., Costagliola, C., Semeraro, F., Incorvaia, C., D'Angelo, S. et al. (2012) Mechanism of Inflammation in Age-Related Macular Degeneration. *Mediators of Inflammation*, 2012, 1–16. <https://doi.org/10.1155/2012/546786>

[37] Tsujimoto, Y. (1997) Apoptosis and necrosis: intracellular ATP level as a determinant for cell death modes. *Cell Death & Differentiation*, 4.

- [38] Donoso, L.A., Kim, D., Frost, A., Callahan, A. and Hageman, G. (2006) The Role of Inflammation in the Pathogenesis of Age-related Macular Degeneration. *Survey of Ophthalmology*, 51, 137–52. <https://doi.org/10.1016/j.survophthal.2005.12.001>
- [39] Dunn, K.C., Marmorstein, A.D., Bonilha, V.L., Rodriguez-Boulan, E., Giordano, F. and Hjelmeland, L.M. (1998) Use of the ARPE-19 cell line as a model of RPE polarity: basolateral secretion of FGF5. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 39, 2744–9.
- [40] Kamao, H., Mandai, M., Okamoto, S., Sakai, N., Suga, A., Sugita, S. et al. (2014) Characterization of Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Retinal Pigment Epithelium Cell Sheets Aiming for Clinical Application. *Stem Cell Reports*, 2, 205–18. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2013.12.007>
- [41] Samuel, W., Jaworski, C., Postnikova, O.A., Kutty, R.K., Duncan, T., Tan, L.X. et al. (2017) Appropriately differentiated ARPE-19 cells regain phenotype and gene expression profiles similar to those of native RPE cells. *Molecular Vision*, 23, 60.
- [42] Jr, E.G.H., Unda, R., Vidro, E., Muniz, A., Villazana-Espinoza, E.T. and Tsin, A. (2006) ARPE-19 Cell Growth and Cell Functions in Euglycemic Culture Media. *Current Eye Research*, 31, 1073–80. <https://doi.org/10.1080/02713680601052320>
- [43] Luo, Y., Zhuo, Y., Fukuhara, M. and Rizzolo, L.J. (2006) Effects of Culture Conditions on Heterogeneity and the Apical Junctional Complex of the ARPE-19 Cell Line. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 47, 3644–55. <https://doi.org/10.1167/iovs.06-0166>
- [44] Chen, Y., Wang, J., Cai, J. and Sternberg, P. (2010) Altered mTOR Signaling in Senescent Retinal Pigment Epithelium. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 51, 5314–9. <https://doi.org/10.1167/iovs.10-5280>

FIGURES

Figure 1: Characterisation of iPSC (A) Typical morphology of hES cell-like colony. (B) Alkaline phosphatase activity. (C) Representative immunofluorescence analysis of pluripotency specific markers of stem cells NANOG and OCT-4. Nuclei were stained with DAPI. (D) Quantitative flow cytometry analysis of typical ES cell surface markers TRA1-81 and SSEA-3.

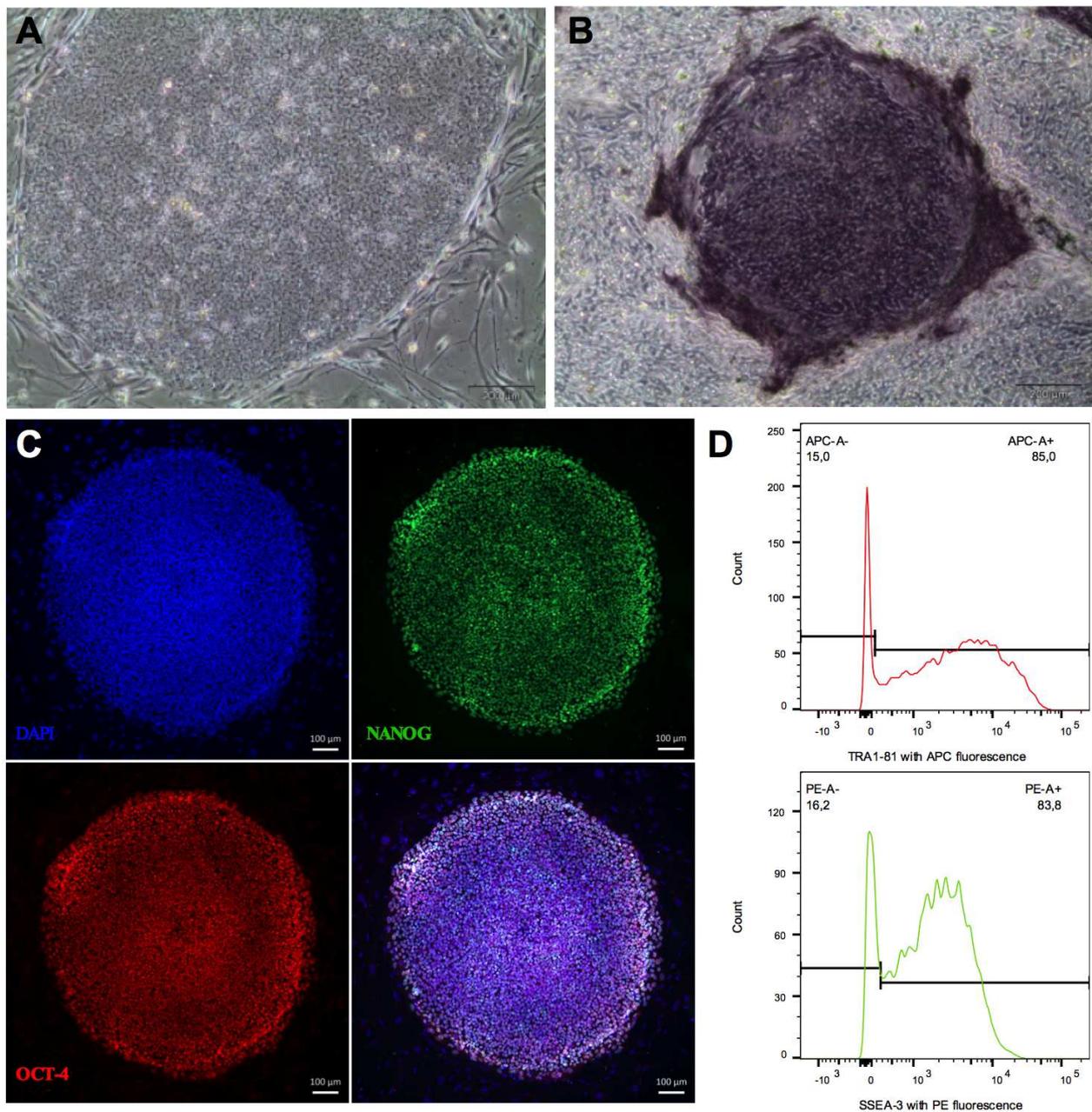


Figure 2: Differentiation and characterisation of iPSC-RPE cells (A) Time course of iPSC spontaneous differentiation into hRPE cells. (B) Typical morphology of hiPSC-RPE cells (C) Representative immunofluorescence analysis of markers expressed into hRPE cells ZO-1, Pax6, Tyrosinase and Bestrophine-1. Nuclei were stained with DAPI.

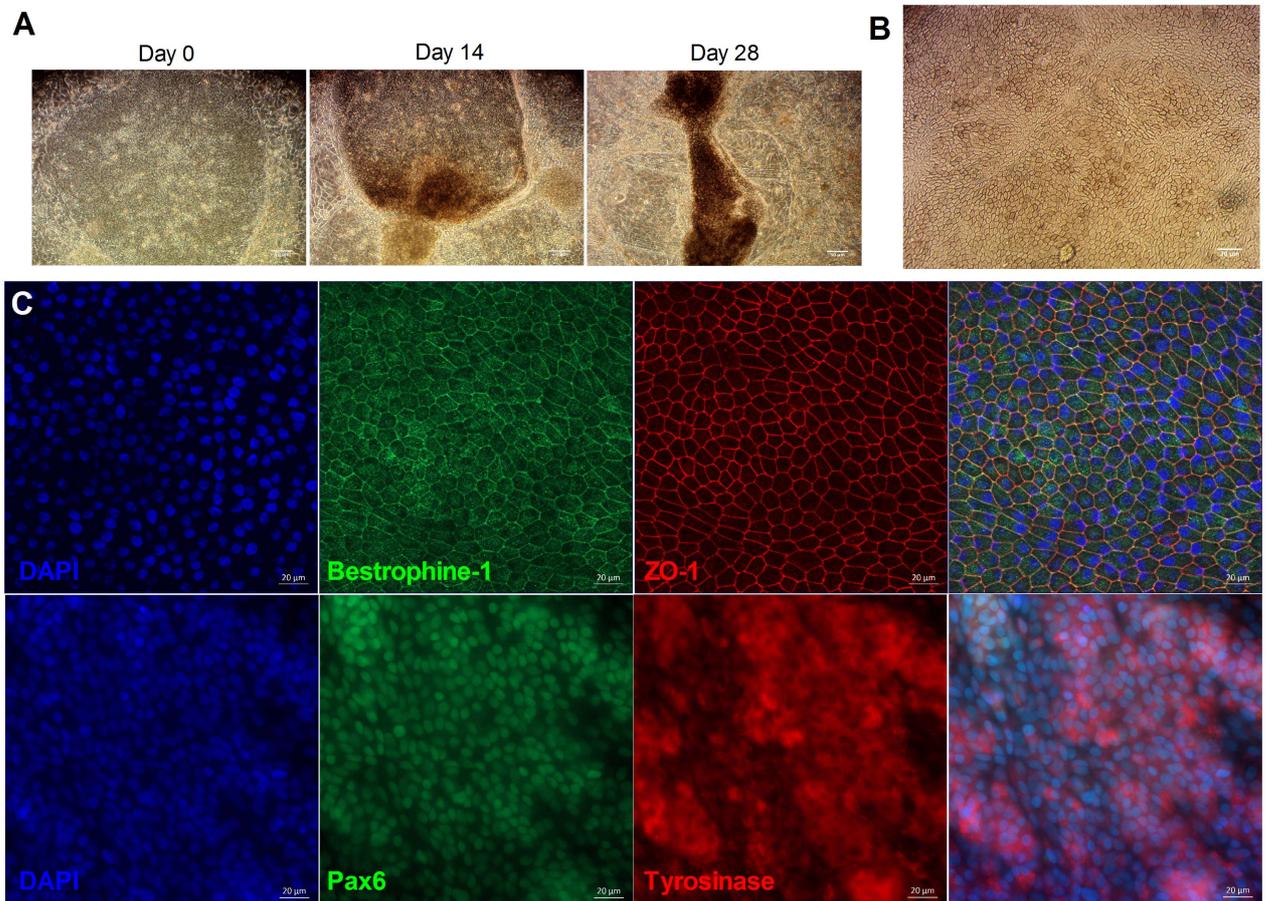


Figure 3: Senescent profile of iPSC-RPE cells (A) SA- β -Gal activity (blue) in ARPE-19 cells and hiPSC-RPE cells in basal condition (B) Quantification by manual counting of SA- β -Gal activity in ARPE-19 cells and hiPSC-RPE cells (N=4). Values are mean \pm SEM, 12 608 total cells count. Statistical analysis: T-test (two tail) ***p<0,001.

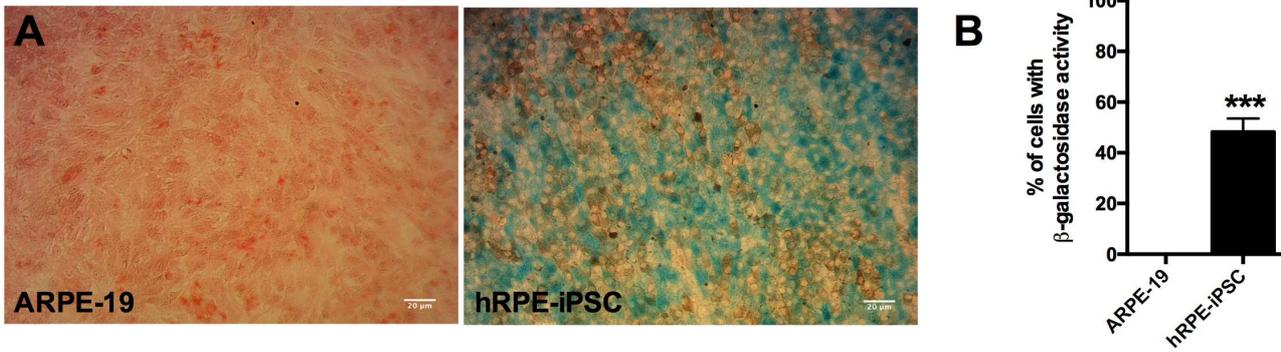


Figure 4: Morphological modifications induced by 24 hours of 15 mM Fe-NTA treatment in ARPE-19 cells and hiPSC-RPE cells compared to control situation without treatment.

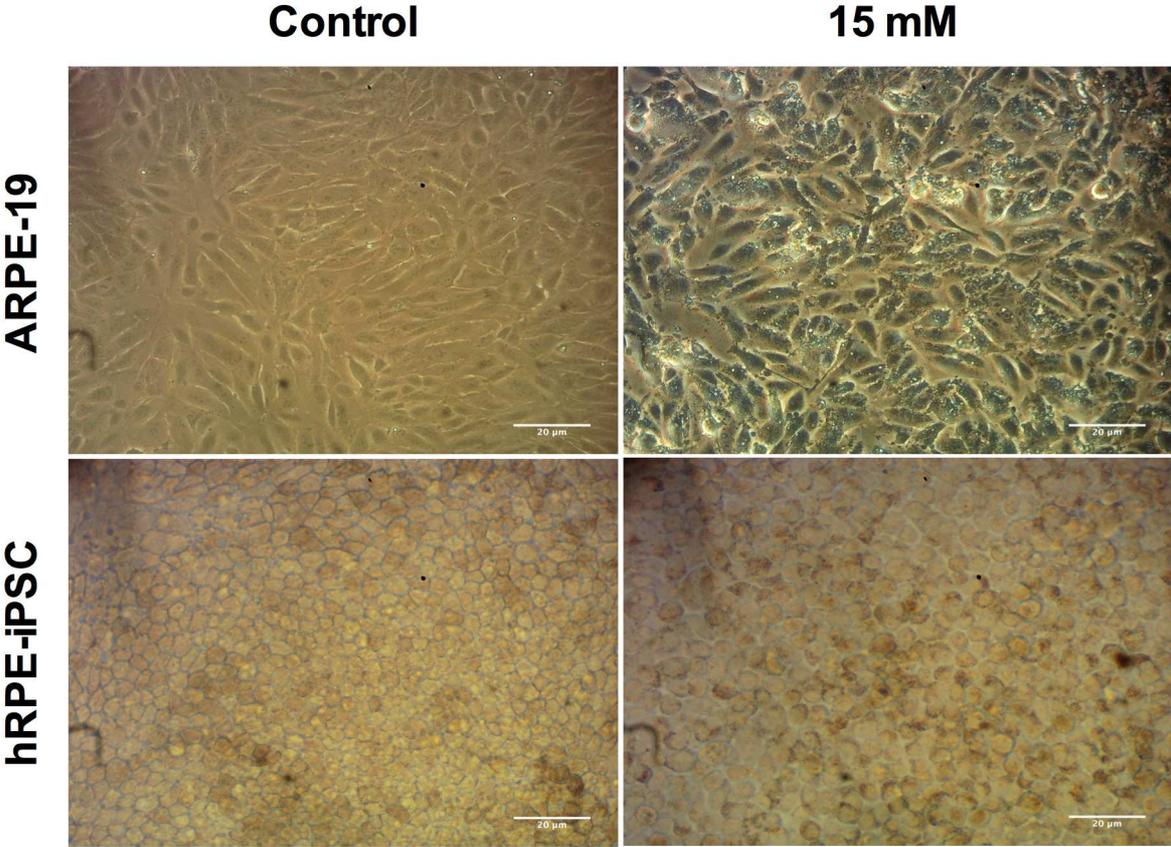


Figure 5: Quantification of DCFH-DA oxidation induced by Fe-NTA treatment during 24 hours in ARPE-19 cells (n=12) and hiPSC-RPE cells (N=4, n=3 per cell line). Statistical analysis: (A-B) One way ANOVA, post hoc Dunnet's (C) ANOVA Two-Way, post hoc Sidak. Comparison of each dose with Control condition for ARPE-19 cells (A) and hiPSC-RPE cells (B) and between ARPE-19 cells and hiPSC-RPE cells for each dose (C). *p<0,05**p<0,01***p<0,0001

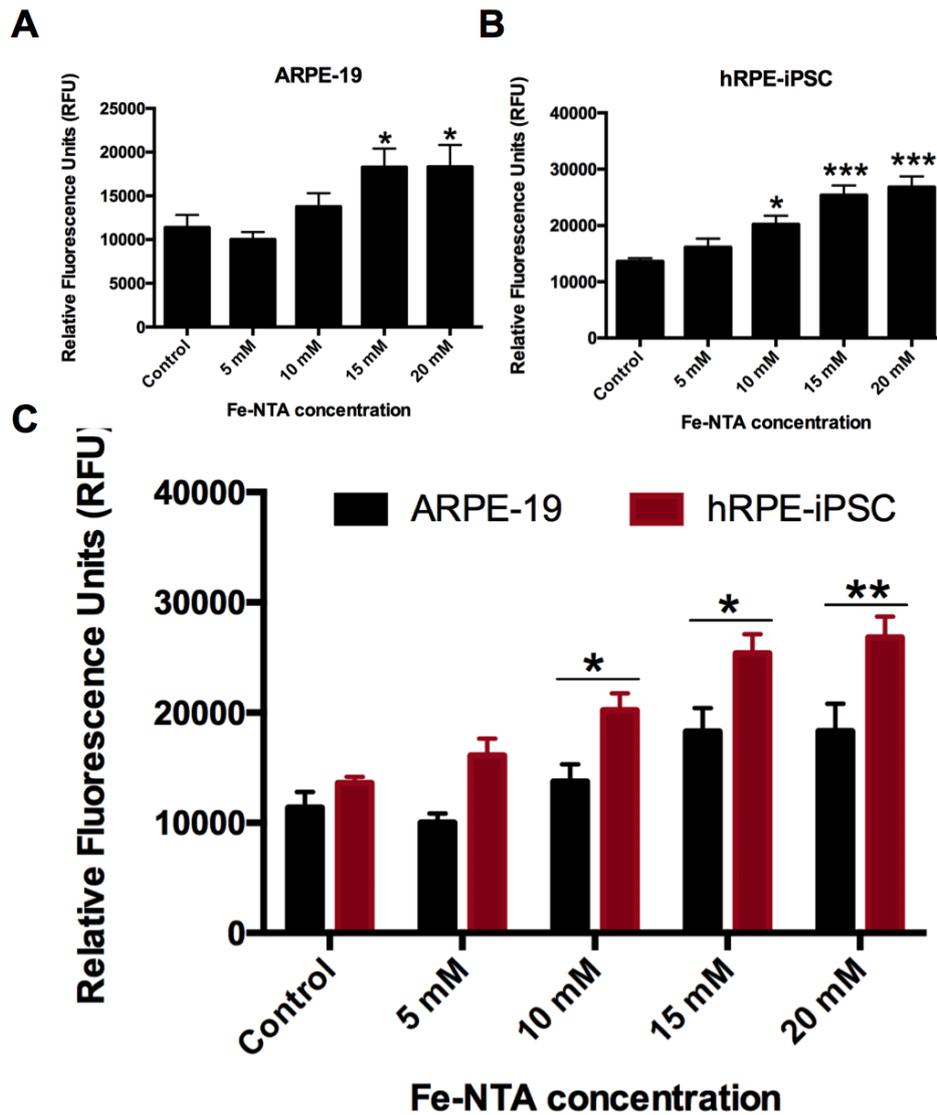


Figure 6: Quantification by MTT test of cell death induced by Fe-NTA treatment during 24 hours in ARPE-19 cells (n=12) and hiPSC-RPE cells (N=4, n=3 per cell line). Statistical analysis: (A-B) One way ANOVA, post hoc Dunnet's (C) ANOVA Two-Way, post hoc Sidak. Comparison of each dose with control condition for ARPE-19 cells (A) and hiPSC-RPE cells (B) and between ARPE-19 cells and hiPSC-RPE cells for each dose (C). *p<0,05**p<0,01***p<0,0001

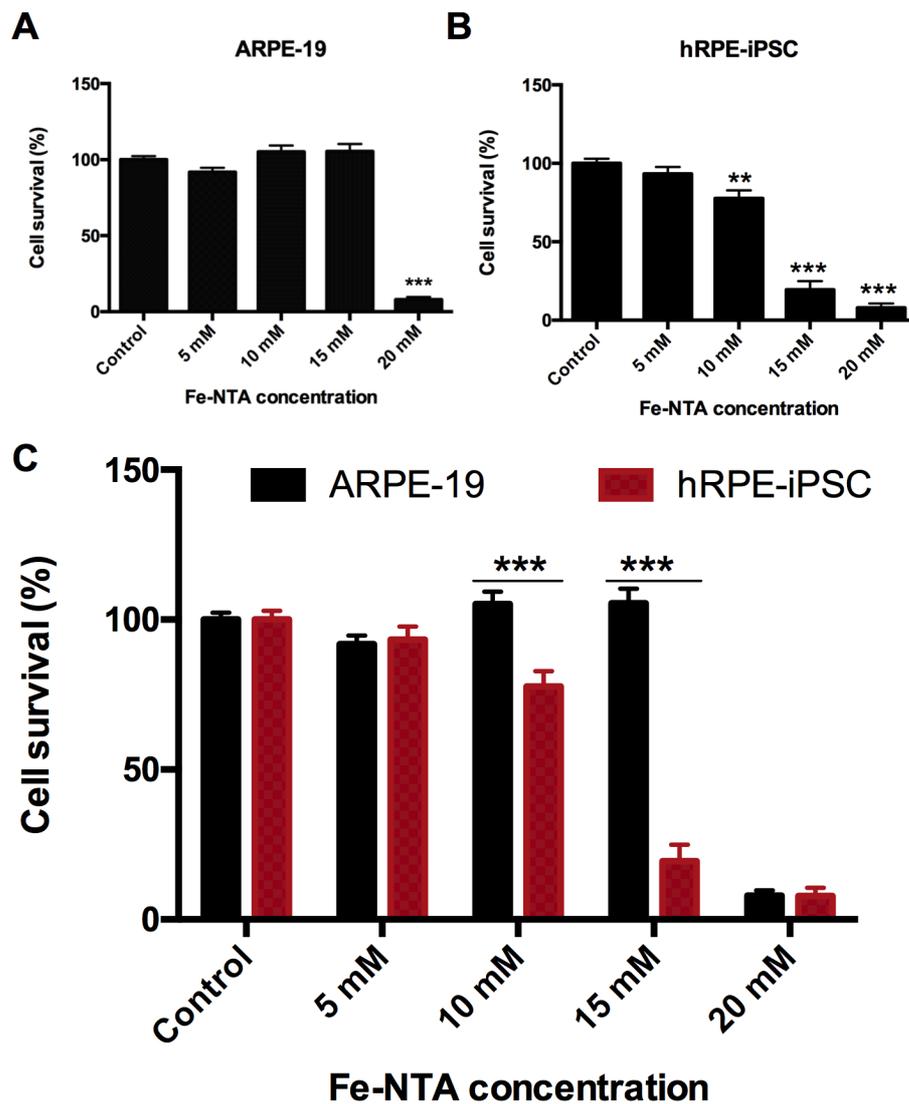


Figure 7: Analysis of cell death pattern in ARPE-19 cells and iPSC-RPE cells during oxidative stress exposure. (A) Flow cytometry analysis of cell death during Fe-NTA treatment by Annexin V PI test in ARPE-19 cells (n=5) and hiPSC-RPE cells (N=4, n=1 per cell line). Comparison between ARPE-19 cells and hiPSC-RPE cells of Annexin V cells (B) and PI cells (C) proportion during Fe-NTA treatment. Statistical analysis: ANOVA Two-Way, post hoc Bonferroni. Comparison of each doses between ARPE-19 cells and hiPSC-RPE cells for each dose (*).

*p<0,05

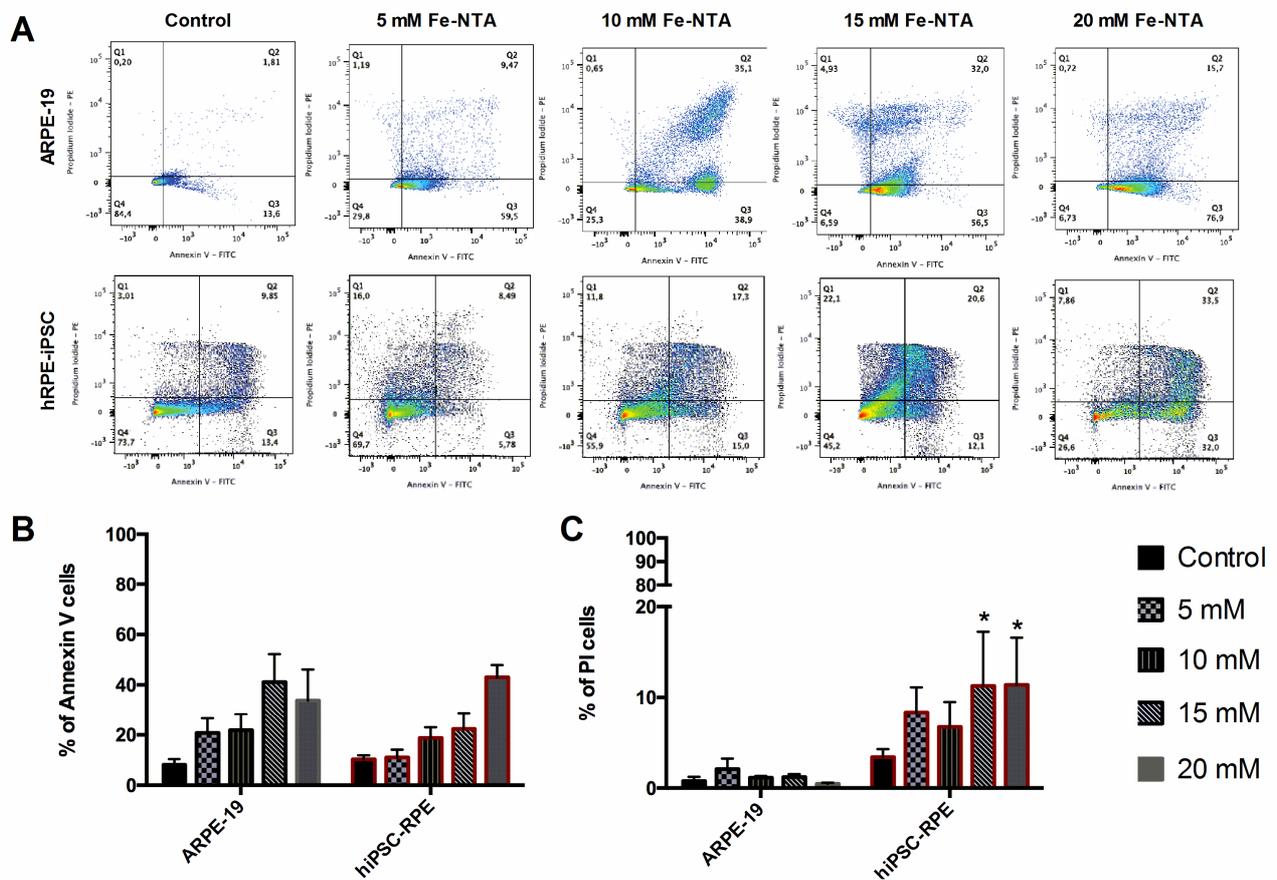
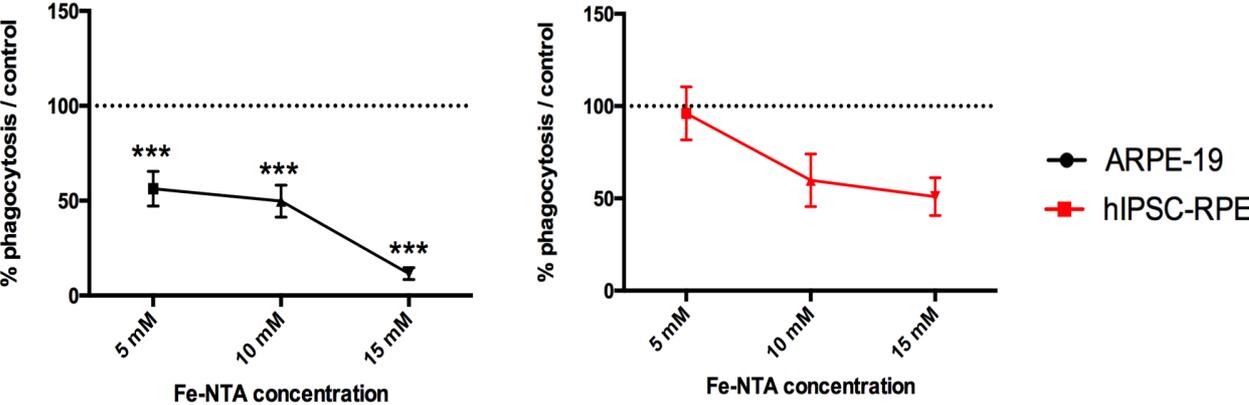


Figure 8: Analysis of phagocytosis activity in ARPE-19 (A) cells and iPSC-RPE (B) cells during oxidative stress exposure. ARPE-19 cells (n=5) and hiPSC-RPE cells (N=4, n=2 per cell line). Statistical analysis: ANOVA One-Way, post hoc Dunnet's. Comparison of each doses with control situation (*).***p<0,001



Résultats

Article II

« Typical disease-phenotype of hiPSC-RPE derived from dry AMD patients »

Audrey Voisin, Christelle Monville, Alexandra Plancheron, Anaïs Balbous, Afsaneh Gaillard,
Nicolas Leveziel

Proceedings of the National Academy of Sciences, en attente (2017).

- **Objectifs de l'étude** : Il n'existe actuellement pas de modèle cellulaire ou animal approprié permettant l'étude de la DMLA *in vitro* ou *in vivo*. Nous avons, par ailleurs, confirmé par notre première étude que des différences importantes existent entre les cellules ARPE-19 et les cellules CSPi-EPR.

Le manque d'information sur les mécanismes initiaux concourant à l'apparition de cette maladie a pour conséquence l'absence de traitement curatif. Une meilleure compréhension de la DMLA reste donc nécessaire afin d'optimiser le diagnostic et de développer de nouvelles thérapies.

De nombreuses études ont montré l'implication des cellules de l'EPR, leur dysfonctionnement ainsi que leur dégénérescence, dans le développement de la DMLA (Chen et al., 2009 ; Golestaneh et al., 2017 ; Saini et al., 2017). Ainsi, dans le but d'étudier cette pathologie *in vitro*, nous avons développé 12 lignées de cellules de l'EPR dérivées de hCSPi provenant soit de patients sains, soit de patients atteints par la DMLA atrophique. Le diagnostic de la maladie, obtenu par caractérisation du phénotype oculaire via des examens d'auto-fluorescence et d'OCT (tomographie par cohérence optique), a été réalisé dans le service d'ophtalmologie du CHU de Poitiers. Le prélèvement d'un échantillon de sang veineux au plis du coude a été réalisé dans le cadre d'une collection biologique.

Dans cette étude, nous avons comparé ces deux types de population, hCSPi-EPR contrôle et hCSPi-EPR DMLA, en condition basale ou lors d'une culture en milieu pro-oxydant via un traitement au fer (Fe-NTA). Comme il a été montré précédemment, l'utilisation du fer sous forme de Fe-NTA permet d'induire son accumulation intracellulaire (Chen et al., 2009). Cet élément s'accumule normalement avec le vieillissement mais de façon plus importante au niveau de la macula et des cellules de l'EPR des patients atteints par la DMLA atrophique (Chen et al., 2009; Dentchev et al., 2005). Le fer semble donc être la molécule de choix pour induire un stress oxydatif permettant l'étude de la DMLA *in vitro*.

L'objectif de cette étude a été de mettre en évidence des différences phénotypiques et/ou fonctionnelles, en condition basale ou sous l'effet d'un stress oxydatif induit par le Fe-NTA, entre les cellules de hCSPi-EPR contrôle (6 lignées) et hCSPi-EPR DMLA (6 lignées).

- **Résultats et discussion** : Nous n'avons pas observé de différence dans les processus de reprogrammation et de différenciation cellulaire entre les échantillons sains ou atteints par la DMLA. Par contre, les deux populations cellulaires expriment de façon similaire la β -galactosidase. Cette enzyme est spécifiquement exprimée dans les cellules sénescentes (Dimri et al., 1995). Ici, nous avons donc développé un modèle cellulaire pertinent pour l'étude d'une maladie du vieillissement affectant primitivement les cellules de l'EPR telle que la DMLA.

Afin de valider l'induction d'un stress oxydatif par le Fe-NTA, nous avons mesuré le taux d'ERO produites lors d'un traitement de 24 heures. Nous avons pu observer une augmentation dose-dépendante des ERO dans les deux populations, mais significativement plus importante chez les hCSPi-EPR DMLA que chez les hCSPi-EPR contrôle à partir de 10 mM de Fe-NTA. Cette production supérieure peut être liée à des changements morphologiques et/ou fonctionnels de certaines organelles, telles que les mitochondries. En effet, il a été décrit précédemment qu'il y a d'avantage de mitochondries altérées, d'autophagosomes et d'accumulation lipidique au niveau des cellules de l'EPR-DMLA *post-mortem* comparées à des cellules de l'EPR dérivées de sujets sains (Golestaneh et al., 2017).

Cette production importante d'ERO est corrélée à une mort cellulaire plus importante dans cette population hCSPi-EPR DMLA, même pour une faible dose de Fe-NTA (5mM) comparé aux hCSPi-EPR contrôle. Ces résultats suggèrent que les hCSPi-EPR DMLA sont plus sensible au stress oxydatif induit par le Fe-NTA.

Nous avons aussi pu observer des différences fonctionnelles entre les cellules de l'EPR contrôle et DMLA. Ainsi, en condition de base, l'activité de phagocytose au niveau des cellules de l'EPR DMLA semble être altérée (3,7% de la population totale) comparée à celles des hCSPi-EPR contrôles (12,3% de la population totale). Une des hypothèse étiopathogénique de la DMLA est la dérégulation des cellules de l'EPR, et principalement de leur activité de phagocytose, résultant entre autre de la formation de drusen (Wang et al., 2009). Dans cette étude, nous confirmons *in vitro* que les cellules de l'EPR provenant de patients atteints par la DMLA ont une capacité de phagocytose inférieure aux cellules de l'EPR provenant de sujets sains.

Comme il a pu être montré avec la lignée ARPE-19 dans une précédente étude (Chen et al., 2009), la phagocytose est inhibée lors d'une accumulation intracellulaire de fer au niveau des hCSPi-EPR (7.17% à 15 mM). Celle des hCSPi-EPR DMLA ; déjà faible de base, reste inchangée quelles que soient les conditions de traitement.

En s'intéressant au système lysosomal via la mise en évidence de la Cathepsine D, nous avons pu observer que l'expression de cette protéine était différente entre les cellules hCSPi-EPR contrôle et DMLA. La Cathepsine D est présente sous deux formes : la forme mature (active) et la forme immature (passive). Aucune différence n'a été mise en évidence au niveau du taux de la protéine mature entre les deux populations en condition basale ; cependant, ce traitement va induire une augmentation de la présence de la forme immature, plus rapide au niveau des hCSPi-EPR contrôle (dès 5 mM) comparés aux hCSPi-EPR DMLA. La présence de la Cathepsine D a déjà été associée à l'accumulation des SEP non dégradés, participant à la formation de drusen (Rakoczy et al., 1996).

L'ensemble de ces résultats suggère que les hCSPi-EPR DMLA ont un phénotype cellulaire distinct des cellules contrôle en réponse à un stress oxydatif qui peut permettre la mise en évidence *in vitro* de mécanismes physiopathologiques impliqués dans le développement de la DMLA. Ce modèle peut être aussi utile pour le screening de nouvelles molécules thérapeutiques.

Typical disease-phenotype of hiPSC-RPE derived from dry AMD patients

Audrey Voisin^{1,2}, Christelle Monville³, Alexandra Plancheron³, Anaïs Balbous-Gautier^{1,4},
Afsaneh Gaillard^{1,2}, Nicolas Leveziel^{1,4,a}

1 INSERM U1084, Experimental and Clinical Neurosciences Laboratory, Cellular Therapies in Brain Diseases Group, University of Poitiers, 86022 Poitiers Cedex, France.

2 Université de Poitiers, U1084, 86073 Poitiers Cedex, France.

3 INSERM UMR861, I-Stem, AFM, Genopole Campus 1, 91030 Evry, France.

4 CHU de Poitiers, 86021 Poitiers Cedex, France.

Classification : BIOLOGICAL SCIENCES

^a To whom correspondence should be addressed: Nicolas.leveziel@chu-poitiers.fr

Keywords: dry age-related macular degeneration – induced pluripotent stem cells – oxidative stress – retinal epithelial pigment – phenotype

Age-related macular degeneration (AMD) is partly characterized by retinal pigment epithelial (RPE) cells dysfunction, leading to secondary degeneration of photoreceptors. The lack of an appropriate *in vitro* model that could mimic RPE dysfunction is a major limitation to understanding of mechanisms leading to development of AMD. This study aimed to compare hiPSC-RPE derived from dry AMD patients to hiPSC-RPE derived from healthy individuals. hiPSC derived from erythroblasts obtained from peripheral venous blood or from fibroblasts of healthy individuals (62.5 ± 17.5 y/o) or patients affected by dry AMD (77 y/o ± 7) were differentiated into RPE cells. Twelves hiPSC-RPE colonies (6 control, 6 AMD) were characterized morphologically, by using immunofluorescence staining and by flow cytometry. Senescent cells were quantified by β -galactosidase activity in basal condition. The toxicity level of iron after Fe-NTA treatment was evaluated by MTT test and the oxidative stress level was measured by detection of dichloro-dihydro-fluorescein diacetate. Cell death pattern was analyzed by Annexin V and propidium iodide test. The RPE functionality, phagocytosis and lysosomal activity were analyzed by FACS and by western-blotting. Both hiPSC-RPE Control and AMD cells expressed β -galactosidase activity, suggesting that these cells have a senescent profile. Treatment with FeNTA induced a higher ROS production and increased cell death in hiPSC-RPE AMD cells than hiPSC-RPE Control cells. Functional analysis showed dysregulation in phagocytosis process in hiPSC-RPE AMD but not in hiPSC-RPE Control. These findings demonstrate that hiPSC-RPE AMD cells have a typical disease phenotype compared to hiPSC-RPE Control cells in pro-oxidant environment.

SIGNIFICANCE STATEMENT:

Age-related macular degeneration is a late retinal disease leading to blindness. Today, we don't have any curative treatment caused by a lack of information of pathological mechanism of AMD. Indeed, they do not exist reliable cellular or animal model for this disease. In your study, we develop a cellular model using induced pluripotent stem cell (iPSC) derived from both healthy people and patients affected by AMD. iPSC-Retinal pigment epithelial (RPE) cells from patients affected by dry AMD are a typical disease phenotype compared to healthy people. Our data suggest that iPSC-RPE derived from AMD patient could be a useful model to study AMD in vitro, to highlight pathological pathway, to screen drug and develop new therapies.

INTRODUCTION

Age-related macular degeneration (AMD), a multifactorial disease caused by age, genetic and environmental factors (Sharma et al., 2014), is the leading cause of blindness in the elderly population in developed countries (De Jong, 2006). The disease is characterized by the accumulation of drusen, extracellular deposits of proteins and lipids and by progressive cellular degeneration of retinal pigment epithelial (RPE) cells located into the macular area (Gehrs et al., 2006). The exudative form of AMD is characterized by neovascularization; and the atrophic form, also called dry form, is characterized by progressive RPE cells degeneration associated with photoreceptors loss (Gehrs et al., 2006). The overall prevalence of the atrophic form represents almost 54% of late AMD forms (Owen et al., 2012) . The understanding of the molecular mechanisms involved in AMD has been challenging by the lack of appropriate *in vitro* model (Golestaneh et al., 2016).

Induced pluripotent stem cells (iPSC) derived from somatic cell lines are indistinguishable from embryonic stem (ES) cells in terms of morphology, proliferation, gene expression, and teratoma formation (Ng and Choo, 2010). They also have the ability to be expanded indefinitely in culture and to differentiate into multiple lineages (Reichman et al., 2014). Improved methods for cell reprogramming and differentiation allow to obtain specific populations of retinal cells (Buchholz et al., 2013; Maruotti et al., 2013). Since the last decade, the generation of retinal pigment epithelial (RPE) cells from hiPSC is investigated to model ocular disorders associated with dysfunction of RPE cells (Parvini et al., 2014).

RPE cells are highly polarized monolayer cells characterized by pigmentation, octagonal morphology and tight junction. RPE cells play a key role in maintaining normal vision by many functions as retinal blood barrier, nutriment and water input, light absorption and phagocytosis of outer segment of photoreceptor (Strauss, 2005) (Bonilha, 2008). Several studies show morphological and functional changes in RPE cells induced by aging (mitochondrial damages, lysosomal dysregulation, accumulation of lipofuscin....) suggesting that these cells play a role in

the pathogenesis of AMD (Ach et al., 2015; Chen et al., 2009; Terluk et al., 2015). Chronic oxidative stress is known to be an important contributing environmental factor to the development of AMD (Rabin et al., 2013). Previous studies show *in vitro* that exposure to drug inducing oxidative stress lead to alteration in RPE morphology and activity (Rabin et al., 2013; Song et al., 2016).

This study aimed to compare hiPSC-RPE cells derived from healthy individuals and patients suffering from dry AMD under oxidative stress condition to highlight pathological mechanism involved in AMD pathogenesis.

RESULTS

Patients

Individuals included in the control group (6 cells lines, 62.8 ± 16 y/o) were patients with normal fundus examination and no history of visual impairment (Fig. 1.A, D). Imaging of fundus in a patient included in the atrophic AMD group (6 cells lines, 77.5 ± 7 y/o) presented large range of atrophy during optical coherence tomography and fundus examination (Figure 1.B-C, D).

Derivation and characterization of hiPSC-RPE from Blood Cell and Fibroblasts (Fig. 2)

We did not observe notable difference in efficiency and timing in cell reprogramming and differentiation between cells from healthy people and people affected by dry AMD.

hiPSC showed typical hES-like morphology and had alkaline phosphatase activity (Fig. 2A).

hiPSC-RPE cells formed a confluent monolayer displaying the classical cobblestone morphology (Fig.2B). Transmission electronic microscopy shows typical maturation patterns of hiPSC-RPE cells, including microvilli, melanosomes, basal nuclei and mitochondria (Fig. 2C).

Flow cytometry revealed expression of two key pluripotency markers SSEA-3 and TRA-1-81 (Fig. 2D). This result was confirmed by immunofluorescence labeling of hiPSC colonies with the expression of two other characteristics markers of stem cells OCT4 and NANOG (Fig. 2E).

Flow cytometry analysis of RPE cells demonstrated the presence of TYRP1 and α -cytokeratine and the absence of Lin28, an other typical pluripotency (Fig. 2D). This result was confirmed by immunostaining with the expression of RPE specific marker protein bestrophine-1, eye development markers Pax6, tight junction marker zonula occludens 1 (ZO-1) and melanin production markers tyrosinase (TYRP1) (Fig. 2E).

Both hiPSC-RPE Control and AMD cells express senescence-associated beta-galactosidase (SA- β -Gal)

SA- β -Gal activity is present only in senescent cells and is not found in presenescent, quiescent or immortal cells (Dimri et al., 1995). As shown in Figure 3, SA- β -Gal activity was observed in

both hiPSC-RPE Control and AMD cells, in $49.8\pm 6.3\%$ and $75.7\pm 6.5\%$ of cells respectively ($p=0.0579$), suggesting a phenotype of senescent cell for these two cell populations.

Fe-NTA exposure induce higher production of ROS in hiPSC-RPE AMD than control

The oxidation of dichloro-dihydro-fluorescein (DCFH) by ROS to 2',7'-dichlorofluorescein DCF, a green fluorescent oxidation product (Rosenkranz et al., 1992b), was measured for at different concentrations of Fe-NTA. Fe-NTA treatment induced production of ROS in a dose-dependent manner in both cell lines (Fig. 4. A-B). The ROS production was significantly higher in hiPSC-RPE AMD cells compared to hiPSC-RPE Control cells from 10mM ($p<0,05$) (Fig. 4C).

Cellular viability of hiPSC-RPE Control and AMD under oxidative stress

Cellular viability of both cell lines was determined under oxidative stress condition induced by Fe-NTA at different concentrations. Cell death was not observed for Fe-NTA concentrations inferior to 10 mM in hiPSC-RPE Control cells (Fig. 5.A), contrary Fe-NTA induced cell death of hiPSC-RPE AMD cells at concentrations equal or superior to 5 mM (Fig. 5B). The cellular viability of hiPSC-RPE AMD cells is significantly lower than hiPSC-RPE Control cells (Fig. 5C). We observed 50% of hiPSC-RPE Control and AMD cell survival at 16.3 and 14.2 mM of Fe-NTA respectively.

Cell death pattern of hiPSC-RPE Control and AMD cells under oxidative stress

In both cell population, a dose-dependent increase of Annexin V positive cells was observed during Fe-NTA treatment (Fig. 6A). The proportion of apoptotic cells was significantly higher in hiPSC-RPE AMD cells only for a dose of 20 mM of Fe-NTA ($p<0,05$). There were fewer necrotic hiPSC-RPE Control cells ($<10\%$) and AMD cells ($< 5\%$) for all concentration without difference between hiPSC-RPE Control cells and hiPSC-RPE AMD cells (Fig. 6B).

Phagocytosis activity of hiPSC-RPE Control and AMD cells under oxidative stress

In control condition, hiPSC-RPE AMD cells had a lower phagocytosis activity ($3,7\pm 0,76\%$) than hiPSC-RPE Control cells ($12.34\pm 1,42\%$) (Figure 7). For hiPSC-RPE Control cells, a

significant decrease of phagocytosis activity from 15 mM of Fe-NTA ($7,17 \pm 1,26\%$) was observed. No difference in phagocytosis activity was observed in hiPSC-RPE AMD for any treatment. The levels of phagocytosis of both hiPSC-RPE Control and AMD are similar from 10 mM.

Lysosomal activity of hiPSC-RPE Control and AMD cells under oxidative stress

Although the amount of mature Cathepsin D protein was not apparently affected measured by western blot assay during Fe-NTA exposure, however, a dose-dependent increase of the amount of immature Cathepsin D (pro CatD) in both hiPSC-RPE Control and AMD cells was observed (Fig. 8A-B). This increase was significantly higher in hiPSC-RPE Control cells than in hiPSC-RPE AMD cells for 5mM of Fe-NTA .

DISCUSSION

AMD is the most common cause of legal blindness among people over 60 years old (Gehrs et al., 2006). In dry AMD, RPE cells are degenerate, leading to photoreceptor death and formation of large range of atrophy (Saini et al., 2017). Since the last decade, many improvements in cell reprogramming and differentiation has been made to elucidate pathological mechanism leading to AMD. Thus, a deeper understanding of mechanisms underlying dry AMD is necessary to develop new promising therapy.

In our study, 12 cell lines, 6 from healthy individuals and 6 from patients suffering from dry AMD were obtained and derived into iPSC-RPE cells. In both case, hiPSC-RPE cells had similar characteristics than human RPE cells, with typical expression of RPE cell markers such as ZO-1, Pax6, Tyrosinase and Bestrophine-1 and typical cobblestone epithelial morphology and pigmentation (Samuel et al., 2017).

As previously described, aging is the major risk factor of AMD development (22). Morphological changes of RPE cells related to aging include loss of melanin granules, increase of the density of residual body and accumulation of lipofuscin (Bonilha, 2008). Here, we demonstrate that both hiPSC-RPE Control and AMD cells derived from aged individuals expressed a senescent profile, one key feature of AMD.

ROS are generated during normal metabolic process such as glycolysis and Krebs's cycle, processes necessary to ATP production (Khandhadia and Lotery, 2010). Classically, oxidative stress is minimized by antioxidant system such as glutathione peroxidase or superoxide dismutase system (Jarrett and Boulton, 2012). Age is also associated with an increase of oxidative stress and ROS production (Praticò, 2002). Moreover, in retina, the macula possess the higher metabolic activity, with the higher ratio of RPE cells by photoreceptor, leading to a significant production of ROS accumulated into RPE cells during aging (Garcia et al., 2015). However, with age, RPE cells loss the ability to compensate ROS production by protective mechanisms, resulting in oxidative damage (Jarrett and Boulton, 2012). Thereby, currently

treatment used to slow the progression of dry AMD consist on diet supplementation of antioxidants (Smailhodzic et al., 2014). In our study, we did not observed any difference in basal condition between hiPSC-RPE AMD cells and hiPSC-RPE Control cells in terms of ROS level. However, Fe-NTA treatment led to a higher production of ROS and cell death in hiPSC-RPE AMD cells compared to hiPSC-RPE Control cells, suggesting that hiPSC-RPE AMD cells were more sensitive to oxidative stress that hiPSC-RPE Control cells. The higher production of ROS in hiPSC-RPE AMD cells may be explain by difference in cellular organization leading to oxidative stress. Indeed, it has been shown by using electron microscopy that RPE obtained from post-mortems AMD eye had a distinct disease morphology such as more accumulation of damaged mitochondria, autophagosomes and of lipid droplets compared to RPE from healthy people (Golestaneh et al., 2017). They also observed, that endoplasmic reticulum in hiPSC-RPE AMD cells was wider and irregular compared to healthy people. Endoplasmic reticulum stress could induce secretion of VEGF that could be involved in the lysosomal accumulation of lipofuscine within the RPE cells (Salminen et al., 2010).

The accumulation of lipofuscin (Ach et al., 2015) into senescent RPE cells, is often considered as an hallmark of ageing (Kurz et al., 2007). Indeed, lipofuscin accumulation leads to dysregulation of RPE function such as phagocytosis of rod outer-segment (Souied, 2013) . In line with previous study, we observed an inhibition of phagocytosis activity during Fe-NTA exposure only in hiPSC-RPE Control cells. Interestingly, the levels of basal phagocytosis of hiPSC-RPE AMD cells is significantly lower than hiPSC-RPE Control cells. Phagocytosis of RPE cells is essential for renewal of the outer segment of photoreceptor (Mukherjee et al., 2007) and dysregulation of RPE causes degeneration of photoreceptors leading progressive visual loss(Bosch et al., 1993). Our results suggest that RPE dysfunction observed in hiPSC-RPE AMD could partly explain the pathological mechanism leading to AMD (Tian et al., 2017). However, which step of phagocytosis process are altered was not investigated in this study.

The last stage of RPE phagocytosis is the digestion of outer segment by autophagy (Bosch et al.,

1993). Digestion of POS requires Cathepsin D proteolytic activity in the lysosome (Wang et al., 2009). Cathepsin D is a lysosomal aspartic endopeptidase found into the lysosome as pro-Cathepsin D, also called immature form. In acidic environment, cleavage of N-terminal lead to activation of the mature form of Cathepsine D. As previously described with an immortalized cell model of RPE, ARPE-19, iron accumulation increases the immature form of the Cathepsin D, without any change in the mature form (Chen et al., 2009). In our study, however, we did not observed any difference in both basal and oxidative stress condition for the mature form of the Cathepsin D in hiPSC-RPE AMD cells and hiPSC-RPE Control cells. In addition, we have shown a dose-dependent increase of the immature form of the Cathepsin D during oxidative stress condition in both populations, but this increase appeared faster for hiPSC-RPE Control cells. Chen and al (Chen et al., 2009) hypothesized that iron overload in ARPE-19 inhibited the conversion of immature Cathepsin D to mature form. Any abnormalities in this enzyme system may have pathological consequences (Rakoczy et al., 1996) . Indeed, the presence of Cathepsin D has been demonstrated to be link with an accumulation of undigested POS-derived debris, which could participate to the drusens formation.

In our study, for the first time, we compare hiPSC-RPE derived from somatic cells of healthy peoples and patients affected by AMD. Taken together, our results demonstrate that hiPSC-RPE cells from patients affected by dry AMD had a distinct functional phenotype in response of oxidative stress compared to hiPSC-RPE Control cells. Recently, Golestaneh and al. (Golestaneh et al., 2016) , obtained the same typical phenotype with hiPSC-RPE derived from post-mortem RPE cells as control population in response of oxidative stress induced by H₂O₂. H₂O₂ is currently used *in vitro* to induce rapidly oxidative stress. In our study, iron is chosen to induce iron accumulation to mimic the oxidant microenvironment that is observed in AMD. Iron is a natural element that accumulates with normal aging (Chen et al., 2009). Additionally, it has been observed that iron was more abundant into the retina, and especially into macular area and RPE cells, in people affected by dry AMD (Dentchev et al., 2005). Specific iron accumulation

was already associated in RPE cells and photoreceptor degeneration in other retinal injury (He et al., 2007). Oxidative stress induced by iron was responsible of specific activation pathway such as ferroptosis (Dixon et al., 2012). Taken all together, these results suggested that iron was a more reliable tool than H₂O₂ (i) to induce oxidative stress *in vitro* (ii) to study *in vitro* oxidative stress mechanisms that occurs *in vivo* in RPE cells of AMD patients.

However, Golestaneh and al.(Golestaneh et al., 2017), did not observed difference between hiPSC-RPE derived from skin or post-mortem RPE cells, suggesting that RPE derived from somatic cells such as skin or blood cells are able to exhibit disease characteristic *in vitro*. Indeed, another recent study showed that tissue origin does not affect the phenotype or functionality of iPSC-RPE cells(Saini et al., 2017).

Since the last five years, disease specific iPSC have been developed to study several pathologies in a “dish” such as Best disease (Singh et al., 2013) or Parkinson disease (Sánchez-Danés et al., 2012) . hiPSC cells could be a useful tool to investigate physiopathological mechanisms of disorders *in vitro* because they possess the same genetic informations as the patients they derived from (Csobonyeiova et al., 2015) . Moreover, production of iPSC from biopsy or blood allow the obtaining of RPE cells from patients and the study of pathological mechanisms possibly leading to AMD *in vitro*.

RPE cells derived from patient could be used as a cell source for cellular therapy in AMD (Takahashi, 2016) . In the case that, RPE cells derived from somatic cells conserved the abnormalities observed in native RPE cells of patient affected by dry AMD, it will be better to consider only RPE cells from healthy people to development of new therapy such as transplantation.

hiPSC-RPE AMD cells are more sensitive to oxidative stress and produce more reactive oxygen species (ROS) with dysregulation of phagocytosis and lysosomal activities in basal condition and during oxidative stress exposure. Collectively, theses result supports the evidence that (i) oxidative stress of RPE cells has a central role in the pathogenesis of AMD (ii) hiPSC-RPE cells

derived from skin of people affected by AMD have a disease phenotype and (iii) will be a useful tool to study pathological mechanisms leading to development of AMD.

MATERIELS & METHODS

Patients

Peripheral venous blood samples from individuals without known eye disease and patients affected by dry AMD were obtained according to Committee for Protection of Persons (n°20152528) and with the tenets of the Declaration of Helsinki. Fibroblast cell lines were obtained from Coriell Institute for medical Research (New Jersey, NJ, USA).

Retinal phenotype of atrophic AMD patients was assessed by multimodal imaging including auto-fluorescence and OCT scans (Spectralis®, Heidelberg Engineering, Germany).

hiPSC Generation from blood cells and fibroblasts

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated from blood by Ficoll. The PBMC were maintained in StemSPAN media (StemCell, Vancouver, Canada) supplemented with 50 ng/mL SCF (R&D, Lille, France), 2 U/mL EPO (R&D), 10 µg/mL FGF2 (Peprotech, Neuilly-sur-Seine, France), 500 U/mL, 1 mM dexamethasone (Sigma), 40 µg/mL IGF-1 (Miltenyi, Bergisch Gladbach, Germany), 10 µg/mL IL-3 (Miltenyi) and 50 ng/mL ascorbic acid (Sigma). Cells were nucleofected with Yamanaka factors (Addgene, Cambridge, MA, USA: pCXLE-hOCT3/4-shp53-F, pCXLE-hUL, pCXLE-hSK). At day 4 after nucleofection, cells were plated onto feeders (MTI Globalstem, Gaithersburg, MD, USA). During 10 days cells were cultured into DMEM/F12 media supplemented with: 10% KSR (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 10 µg/mL FGF2, 2 µM SB431542 (R&D), 0.5 µM PD0325901 (Euromedex, Souffleweyersheim, France), 2 µM thiazovivin (R&D), 3 µM CHIR99021 (Bertin Pharma, Montigny-le-Bretonneux, France), 0.5 mM VPA (Sigma) and 0.25 mM NaB (Sigma).

Fibroblast cell lines were nucleofected with Yamanaka factors using the same protocol than PBMC. At day 4 after nucleofection, DMEM/F12 media was supplemented with 10% KSR, 10 µg/mL FGF2, 2 µM SB431542, 0.5 µM PD0325901 and 0.5 mM VPA.

At day 10 post-reprogramming, VPA and NaB were removed from the culture medium. At day 15 post-reprogramming, SB461542, PD0325901, CHIR99021 and thiazovivin were removed

from the culture medium. hiPS colonies appeared around 15-20 days of culture and were picked about 2-3 weeks post nucleofection. The culture medium (DMEM F/12 + 20% KSR +10 µg/mL FGF2) was changed every day.

Differentiation of hiPSC into RPE

To ensure chromosomal integrity differentiation of hiPSC was initiated before passage 10¹⁸. hiPSC were differentiated into RPE cells by switching the culture medium to DMEM High Glucose (Invitrogen) supplemented with 20% KSR without FGF2 as previously described. Pigmented areas with typical RPE appearance usually appeared three weeks after initiation of differentiation. Specific selection of RPE cells was obtained after manual transfer of the pigmented colonies into new plates (P0). hiPSC-RPE cells were cultured with DMEM High Glucose supplemented with 4% KSR. Medium was changed twice a week. hiPSC-RPE cells were passaged every 3 weeks up to two passages.

hiPSC and RPE Characterization

Cells were stained with pluripotency and RPE specific cell markers for immunostaining and flow cytometry analyses. Briefly, hiPSCs were fixed with cold 4% paraformaldehyde for 20 min and washed twice with phosphate buffer saline (PBS). Non-specific binding sites and permeabilization were performed using a blocking solution containing PBS, 0.1% Triton X-100 (Sigma), 5% Goat Serum and 5% Horse Serum (Sigma) for 1 hour. Cells were then incubated overnight at 4°C with the following primary antibodies diluted in blocking solution: Oct-4 (1/200, Abcam, Cambridge, MA, USA), Nanog (1/200, Abcam), ZO-1 (1/100, ThermoFischer, Waltham, MA, USA), Bestrophine-1 (1/100, Novus Biological, Littleton, CO, USA), Pax6 (1/75, Abcam) and Tyrosinase (1/100, Abcam). Cells were washed twice in PBS, followed by staining with the secondary antibodies (for Oct-4, Bestrophine-1 and Tyrosinase: Donkey Anti-Rabbit IgG H&L Alexa Fluor 555 (Abcam); for Nanog, Pax6 and ZO-1: Goat Anti-Mouse IgG H&L Alexa Fluor 488 (Abcam)). Nuclei were stained with DAPI (Invitrogen) and slides were

mounted with Moviol (Sigma). Cells were observed with a Zeiss microscope and counted using ZEN software (Iéna, Germany).

For FACS analysis, hiPSCs were dissociated using Accutase (ThermoFischer) for 5 min at room temperature, then washed with DMEM/F12 media with 10% KSR and incubated with the following primary conjugated antibodies: anti TRA-1-81-AlexaFluor 488 (1/25; BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA), anti SSEA3 -AlexaFluor 488 (1/10; BD Biosciences) for 30 min at 4°C in the dark. Stained cells were washed twice in PBS supplemented with 2% SVF. Cells were analyzed on FACS Verse (BD Biosciences) with 100,000 events acquired for each sample. Data were analyzed with FlowJo® software (Ashland, OR, USA).

For phosphatase alkaline activity, hiPSC were fixed with 95% ethanol and incubated 10 minutes with the Sigma Fast BCIP/NBT kit (Sigma) following the manufacturer's instructions.

Transmission electron microscopy

The suspensions of retina cells were fixed for 1h with 2.5% glutaraldehyde in 1 M phosphate buffer, pH 7.1. After PBS washes, cells were post-fixed for 45 min in 1% osmium tetroxide in phosphate buffer. Dehydration was carried out using successive incubations of increasing ethanol concentrations (from 50% to 100%). In all this experimental protocol, each incubation has been centrifuged at 1000 rpm for 5 min, room temperature. Cell pellets were included in epon resin and after 24 h of polymerisation, 70 nm sections were revalidez using an ultracut UC6 of LEICA. Uranyl acetate (2% in 70% ethanol) and lead citrate were used as contrasting agent. Pictures have been obtained on JEOL 1010 electron microscope at 80 KV with Olympus digital camera (Quemesa) using Item software.

Measure of senescence by β -Gal activity

The hiPSC-RPE cells were seeded in 24-well plates and allowed to mature for up to 3 weeks following final passage (P2). Cells at confluency showing typical cobblestone morphology and presence of pigmentation were stained with SA- β -gal¹⁹ assay detection kit (Abcam) according to the manufacturer's instructions. The percentage of SA- β -gal positive cells was calculated by

counting the number of labeled cells manually with ZEN software.

Iron Treatment and Induction of Oxidative Stress

ARPE-19 cells (at confluency) and hiPSC-RPE cells (3 weeks after P2) were treated for 24 hours with FeCl₃-sodium nitrilotriacetate (Fe-NTA), at final concentrations of 5 to 20 mM as previously described²⁰.

Oxidative Stress measurement

After treatment of cells with Fe-NTA, cells were washed with PBS and incubated with 1mL of fresh culture medium supplemented with 10 µg/ml of DCFH-DA (Rosenkranz et al., 1992b) (Sigma) for 1 hour at 37°C. The cells were then washed with PBS and maintained in 1 mL of PBS-2% SVF culture medium. Fluorescence was measured with a microplate reader (Berthold Technologies, Bad Wildbad, Germany; excitation 488 nm, emission 535 nm) and the intensity values were calculated with Mithras software (Berthold Technologies).

MTT test

MTT assay (Sigma) was used to reflect cellular viability as previously described(Chen et al., 2009). Briefly, after 24 hours of Fe-NTA exposure, medium was replaced with 0.5 mg/ml MTT. Following 3h30 incubation at 37°C, cells were lysed with DMSO(Taghiloo et al., 2017). Absorbance was then read at 540 nm and 620 nm (background) with a microplate reader (Tecan, Männedorf, Suisse) and analyzed with Magellan software (Tecan).

Analysis of cell death pattern

To discriminate apoptosis and necrosis, dual staining with fluorescent Annexin V (apoptotic cells) and propidium iodide (PI, necrotic cells) has been performed using flow cytometry(Vermes et al., 1995). After Fe-NTA exposure, cells were collected and incubated with Annexin V-FITC and PI solution (Abcam, ab14085) in 100 µL of 1X binding buffer for 5 minutes at RT in the dark. 20 000 cells per experiment were analyzed using FACS Verse (BD Biosciences) and FlowJo® software (Ashland, OR).

Analysis of phagocytosis

hiPSC-RPE cells were incubated 3 hours with fluorescent carbonylates-modified microspheres (ThermoFischer). The cells were then washed 3 times with PBS and maintained in 1 mL of PBS-2% SVF culture medium. Fluorescence (505/515 nm) was analyzed with FACS Verse (BD Biosciences) and FlowJo® software (Ashland, OR).

Western Blot

hiPSC-RPE cells were lysed in the extraction buffer containing 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10% NP40, 0.1% de SDS, 12 mM sodium desoxycholate, 1 mM Na₃VO₄, 1 mM NaF and 2 mM PMSF. Cells were sonicated for 10 seconds before protein concentration determination by the Bradford colorimetric assay. Forty micrograms of proteins were separated on SDS-PAGE and electrotransferred onto polyvinylidene difluoride membranes. The membrane was blocked in 5% non-fat milk and 0.1% Tween 20 in phosphate-buffered saline (PBS) and then was incubated with primary antibodies (Transferrin, Santacruz; β -Actin, Invitrogen; Cathepsin D, GeneTex) at 4°C overnight (Table 1). The membrane was rinsed with 0.1% Tween 20 in PBS and incubated with secondary antibody for 1 hour. Blots were developed by enhanced chemiluminescence (ECL). Relative band density was determined with ImageJ software (developed by Wayne Rasband, National Institutes of Health, Bethesda, MD; available at <http://rsb.info.nih.gov/ij/index.html>). β -Actin was used as loading and quality control.

ACKNOWLEDGMENT

The authors would like to thank Jeffrey Arsham for having reread and corrected our original English-language manuscript, Adriana Delwail for her help during cytometry experiments and Emile Béré for the electronic microscopy analysis.

REFERENCES

1. Sharma K, Sharma NK, Anand A (2014) Why AMD is a disease of ageing and not of development: mechanisms and insights. *Front Aging Neurosci* 6. doi:10.3389/fnagi.2014.00151.
2. De Jong P (2006) Age-Related Macular Degeneration. *N Engl J Med* 355(14):1474–1485.
3. Gehrs KM, Anderson DH, Johnson LV, Hageman GS (2006) Age - related macular degeneration—emerging pathogenetic and therapeutic concepts. *Ann Med* 38(7):450–471.
4. Owen CG, et al. (2012) The estimated prevalence and incidence of late stage age related macular degeneration in the UK. *Br J Ophthalmol* 96(5):752–756.
5. Golestaneh N, et al. (2016) Repressed SIRT1/PGC-1 α pathway and mitochondrial disintegration in iPSC-derived RPE disease model of age-related macular degeneration. *J Transl Med* 14. doi:10.1186/s12967-016-1101-8.
6. Ng VY, Choo AB (2010) iPS and ES cells: do both roads lead to Rome. *Open Stem Cell J* 2:8–17.
7. Reichman S, et al. (2014) From confluent human iPS cells to self-forming neural retina and retinal pigmented epithelium. *Proc Natl Acad Sci* 111(23):8518–8523.
8. Buchholz DE, et al. (2013) Rapid and Efficient Directed Differentiation of Human Pluripotent Stem Cells Into Retinal Pigmented Epithelium. *Stem Cells Transl Med* 2(5):384–393.
9. Maruotti J, et al. (2013) A Simple and Scalable Process for the Differentiation of Retinal Pigment Epithelium From Human Pluripotent Stem Cells. *Stem Cells Transl Med* 2(5):341–354.
10. Parvini M, et al. (2014) Human Pluripotent Stem Cell-Derived Retinal Pigmented Epithelium in Retinal Treatment: from Bench to Bedside. *Mol Neurobiol* 50(2):597–612.
11. Strauss O (2005) The retinal pigment epithelium in visual function. *Physiol Rev* 85(3):845–881.
12. Bonilha VL (2008) Age and disease-related structural changes in the retinal pigment epithelium. *Clin Ophthalmol Auckl NZ* 2(2):413–424.
13. Ach T, et al. (2015) Lipofuscin Redistribution and Loss Accompanied by Cytoskeletal Stress in Retinal Pigment Epithelium of Eyes With Age-Related Macular Degeneration Lipofuscin Redistribution in AMD. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 56(5):3242–3252.
14. Chen H, Lukas TJ, Du N, Suyeoka G, Neufeld AH (2009) Dysfunction of the Retinal Pigment Epithelium with Age: Increased Iron Decreases Phagocytosis and Lysosomal Activity. *Investig Ophthalmology Vis Sci* 50(4):1895.
15. Terluk MR, et al. (2015) Investigating Mitochondria as a Target for Treating Age-

Related Macular Degeneration. *J Neurosci* 35(18):7304–7311.

16. Rabin DM, Rabin RL, Blenkinsop TA, Temple S, Stern JH (2013) Chronic oxidative stress upregulates Drusen-related protein expression in adult human RPE stem cell-derived RPE cells: a novel culture model for dry AMD. *Aging* 5(1):51–66.
17. Song D, et al. (2016) AMD-like retinopathy associated with intravenous iron. *Exp Eye Res* 151:122–133.
18. Dimri GP, et al. (1995) A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(20):9363–9367.
19. Rosenkranz AR, et al. (1992) A microplate assay for the detection of oxidative products using 2', 7' -dichlorofluorescein-diacetate. *J Immunol Methods* 156(1):39–45.
20. Saini JS, et al. (2017) Nicotinamide Ameliorates Disease Phenotypes in a Human iPSC Model of Age-Related Macular Degeneration. *Cell Stem Cell*. doi:10.1016/j.stem.2016.12.015.
21. Samuel W, et al. (2017) Appropriately differentiated ARPE-19 cells regain phenotype and gene expression profiles similar to those of native RPE cells. *Mol Vis* 23:60.
22. Khandhadia S, Lotery A (2010) Oxidation and age-related macular degeneration: insights from molecular biology. *Expert Rev Mol Med* 12:e34.
23. Jarrett SG, Boulton ME (2012) Consequences of oxidative stress in age-related macular degeneration. *Mol Aspects Med* 33(4):399–417.
24. Praticò D (2002) Lipid peroxidation and the aging process. *Sci Aging Knowl Environ SAGE KE* 2002(50):re5.
25. Garcia TY, Gutierrez M, Reynolds J, Lamba DA (2015) Modeling the Dynamic AMD-Associated Chronic Oxidative Stress Changes in Human ESC and iPSC-Derived RPE Cells. *Investig Ophthalmology Vis Sci* 56(12):7480.
26. Smailhodzic D, et al. (2014) Zinc Supplementation Inhibits Complement Activation in Age-Related Macular Degeneration. *PLoS ONE* 9(11):e112682.
27. Golestaneh N, Chu Y, Xiao Y-Y, Stoleru GL, Theos AC (2017) Dysfunctional autophagy in RPE, a contributing factor in age-related macular degeneration. *Cell Death Dis* 8(1):e2537.
28. Salminen A, Kauppinen A, Hyttinen JM, Toropainen E, Kaarniranta K (2010) Endoplasmic reticulum stress in age-related macular degeneration: trigger for neovascularization. *Mol Med Camb Mass* 16(11–12):535–542.
29. Kurz T, Terman A, Brunk UT (2007) Autophagy, ageing and apoptosis: The role of oxidative stress and lysosomal iron. *Arch Biochem Biophys* 462(2):220–230.
30. SOUIED É Génétique de la DMLA. *L'ACADÉMIE Natl MÉDECINE*:1333.

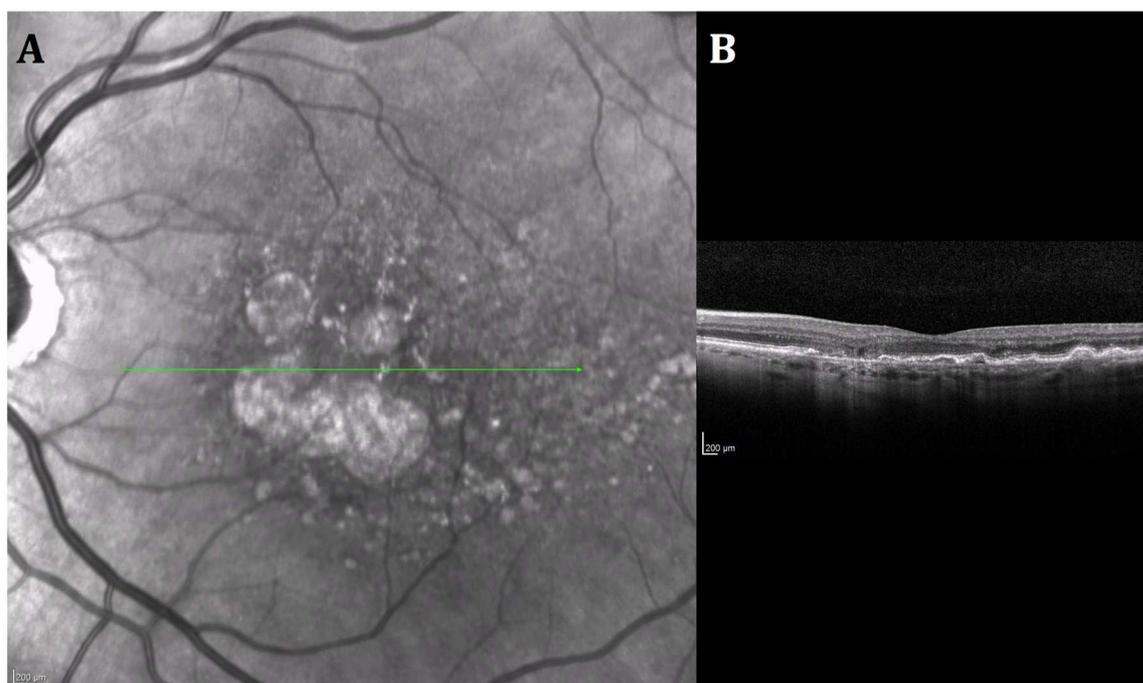
31. Sundelin, S., Wihlmark, U., Nilsson S E G., Brunk, T. (1998). Lipofuscin Accumulation in Cultured Retinal Pigment Epithelial Cells Reduces Their Phagocytic Capacity. *Current Eye Research*.
32. Mukherjee PK, et al. (2007) Photoreceptor outer segment phagocytosis attenuates oxidative stress-induced apoptosis with concomitant neuroprotectin D1 synthesis. *Proc Natl Acad Sci* 104(32):13158–13163.
33. Bosch E, Horwitz J, Bok D (1993) Phagocytosis of outer segments by retinal pigment epithelium: phagosome-lysosome interaction. *J Histochem Cytochem* 41(2):253–263.
34. Tian B, et al. (2017) Atorvastatin Promotes Phagocytosis and Attenuates Pro-Inflammatory Response in Human Retinal Pigment Epithelial Cells. *Sci Rep* 7(1):2329.
35. Wang AL, et al. (2009) Autophagy and exosomes in the aged retinal pigment epithelium: possible relevance to drusen formation and age-related macular degeneration. *PloS One* 4(1):e4160.
36. Rakoczy PE, Baines M, Kennedy CJ, Constable IJ (1996) Correlation Between Autofluorescent Debris Accumulation and the Presence of Partially Processed Forms of Cathepsin D in Cultured Retinal Pigment Epithelial Cells Challenged with Rod Outer Segments. *Exp Eye Res* 63(2):159–167.
37. Dentchev T, Hahn P, Dunaief JL (2005) Strong labeling for iron and the iron-handling proteins ferritin and ferroportin in the photoreceptor layer in age-related macular degeneration. *Arch Ophthalmol Chic Ill 1960* 123(12):1745–1746.
38. He X, et al. (2007) Iron homeostasis and toxicity in retinal degeneration. *Prog Retin Eye Res* 26(6):649–673.
39. Dixon SJ, et al. (2012) Ferroptosis: An Iron-Dependent Form of Nonapoptotic Cell Death. *Cell* 149(5):1060–1072.
40. Singh R, et al. (2013) iPS cell modeling of Best disease: insights into the pathophysiology of an inherited macular degeneration. *Hum Mol Genet* 22(3):593–607.
41. Sánchez-Danés A, et al. (2012) Disease-specific phenotypes in dopamine neurons from human iPS-based models of genetic and sporadic Parkinson's disease. *EMBO Mol Med* 4(5):380–395.
42. Csobonyei M, Polak S, Koller J, Danisovic L (2015) Induced pluripotent stem cells and their implication for regenerative medicine. *Cell Tissue Bank* 16(2):171–180.
43. Takahashi M (2016) [Retinal Cell Therapy Using iPS Cells]. *Nippon Ganka Gakkai Zasshi* 120(3):210–224; discussion 225.
44. Taghiloo S, et al. (2017) Frequency and functional characterization of Exhausted CD8⁺

T-cells in chronic lymphocytic leukemia. *Eur J Haematol*. doi:10.1111/ejh.12880.

45. Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutellingsperger C (1995) A novel assay for apoptosis Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods* 184(1):39–51.

FIGURES

Figure 1: Clinical information of healthy people and patients affected by AMD included in this study. Fundus examination and optical tomography coherence imaging of patient affected by AMD (A-B). Donors characteristic and clinicals information (C)



C

Name	Sex	Age (years)	Age of diagnostic (years)	Clinical informations
AMD 1	Male	72	59	Bilateral
AMD 2	Male	79	78	Bilateral
AMD 3	Female	76	74	One eye
AMD 4	Male	72	70	
AMD 5	Male	75	71	Bilateral
AMD 6	Female	91	89	Bilateral
Control 1	Female	65	-	-
Control 2	Male	71	-	-
Control 3	Male	81	-	-
Control 4	Male	74	-	-
Control 5	Female	40	-	-
Control 6	Male	46	-	-

Figure 2: Characterisation of hiPSC and hiPSC-RPE cells (A) Alkaline phosphatase activity of hiPSC cells (B) Typical morphology of hiPSC-RPE. (C) *Transmission electron microscopy* analysis of RPE cells showing typical morphologic features such as basal nuclei, microvilli, and pigmentary granules. (D) Quantitative flow cytometry analysis of both typical embryonic stem cell surface markers TRA1-81, SSEA-3 and Lin 28 and of typical RPE cell surface markers TYRP1 and α -cytokeratine. (E) Representative immunofluorescence analysis of pluripotency specific markers of both stem cells NANOG and OCT-4 and of typical RPE cell surface markers BEST-1, PAX6, ZO-1 and TYRP1. Nuclei were stained with DAPI.

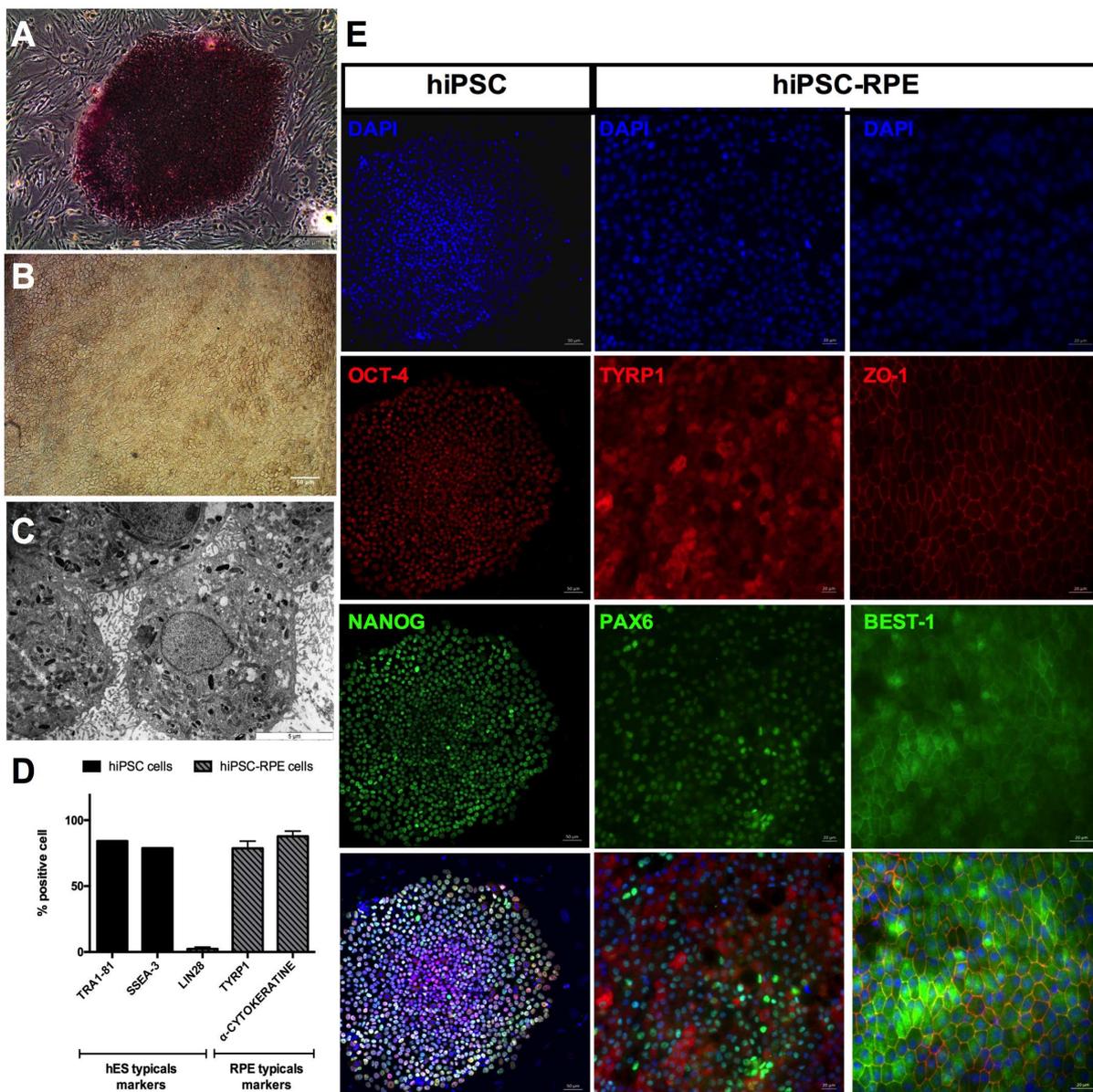


Figure 3: Senescent phenotype of both hiPSC-RPE control and AMD cells. (A) SA- β -Gal activity (blue) in both hiPSC-RPE Control and AMD cells (B) Quantification by manual counting of SA- β -Gal activity in both hiPSC-RPE Control (N=5) and AMD (N=4). Values are mean \pm SEM, hiPSC-RPE Control: 16 451 cells count; hiPSC-RPE AMD: 12 829 cells count. Statistical analysis: T-test (two tail).

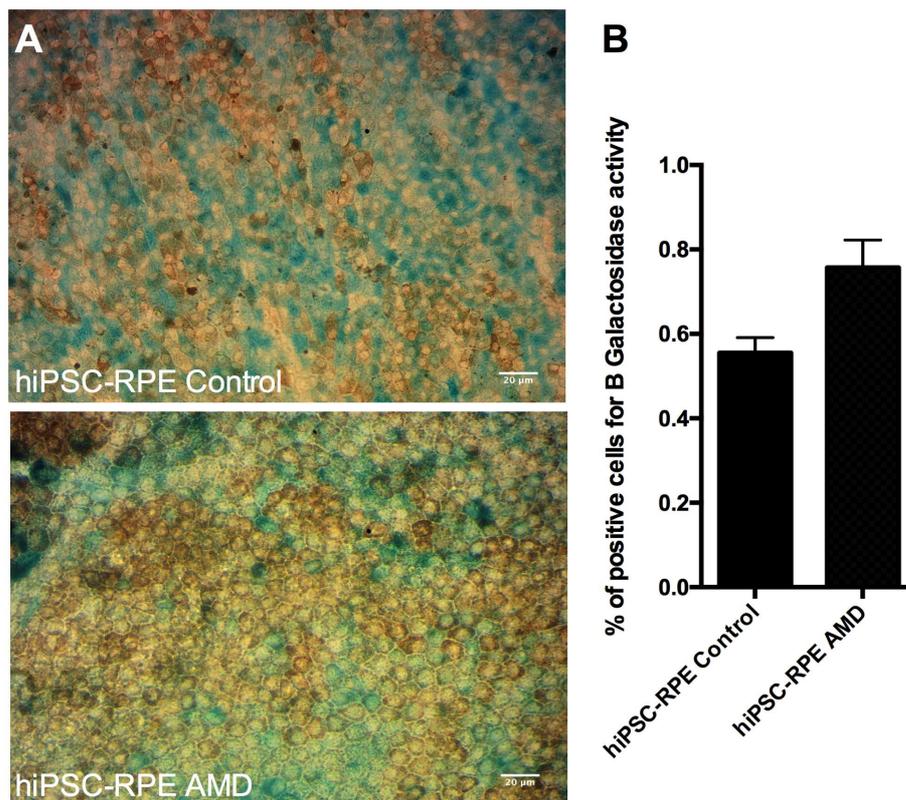


Figure 4: Quantification of DCFH-DA oxidation induced by Fe-NTA treatment during 24 hours in both hiPSC-RPE Control and AMD cells. Comparison of each dose with Control condition for hiPSC-RPE Control cells (A) and hiPSC-RPE AMD cells (B) and between hiPSC-RPE Control cells and AMD cells for each dose (C). Control cells (N=5) and AMD cells (N=6), triplicate per cell line. Statistical analysis: ANOVA Two-Way, post hoc Bonferroni. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,0001$

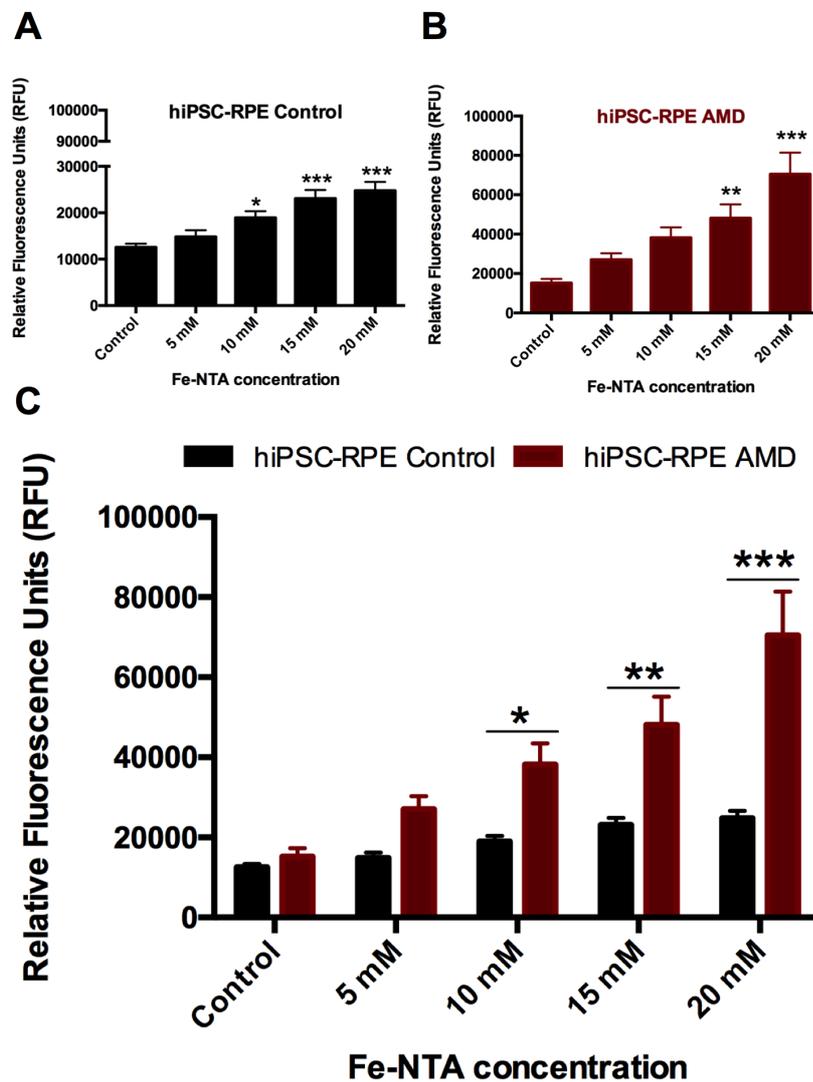


Figure 5: Quantification by MTT test of cell death induced by Fe-NTA treatment during 24 hours in both hiPRC-RPE control and AMD cells. Comparison of each doses with control condition for hiPSC-RPE Control cells (A) and hiPSC-RPE AMD cells (B) and between hiPSC-RPE Control cells and AMD cells (C). Control cells (N=6) and AMD cells (N=6), triplicate per cell line. Statistical analysis: ANOVA One-Way, post hoc Dunnet's (A-B), ANOVA Two-Way, post hoc Bonferroni (C). * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,0001$

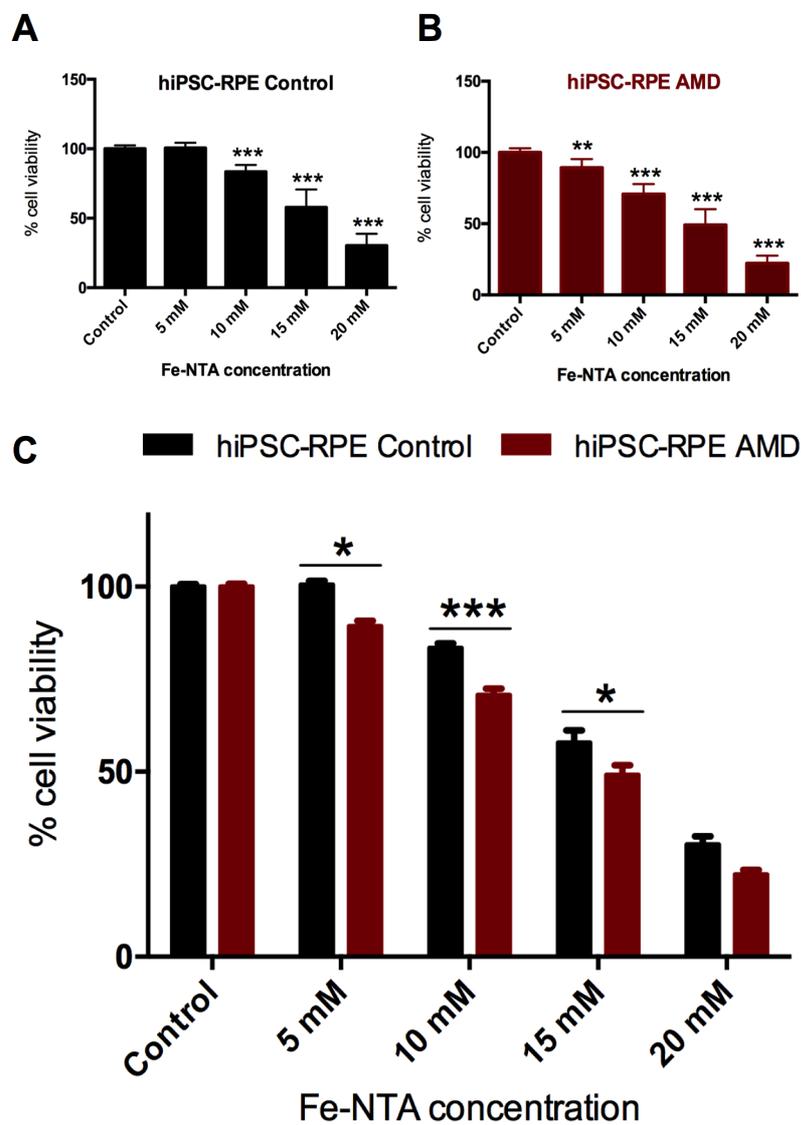


Figure 6: Flow cytometry analysis of cell death during Fe-NTA treatment by Annexin V/propidium iodide (PI) test in both hiPRC-RPE Control and AMD cells. Percentage of Annexin V positive cells (A) and PI positive cells (B) during Fe-NTA exposure. Control (N=4) and AMD (N=6), one analyse per cell line. Statistical analysis : ANOVA One-Way, post hoc Dunnet's (A-B), ANOVA Two-Way, post hoc Bonferroni (C). Comparison of each doses between hiPSC-RPE Control and hiPSC-RPE AMD for each dose. *p<0,05

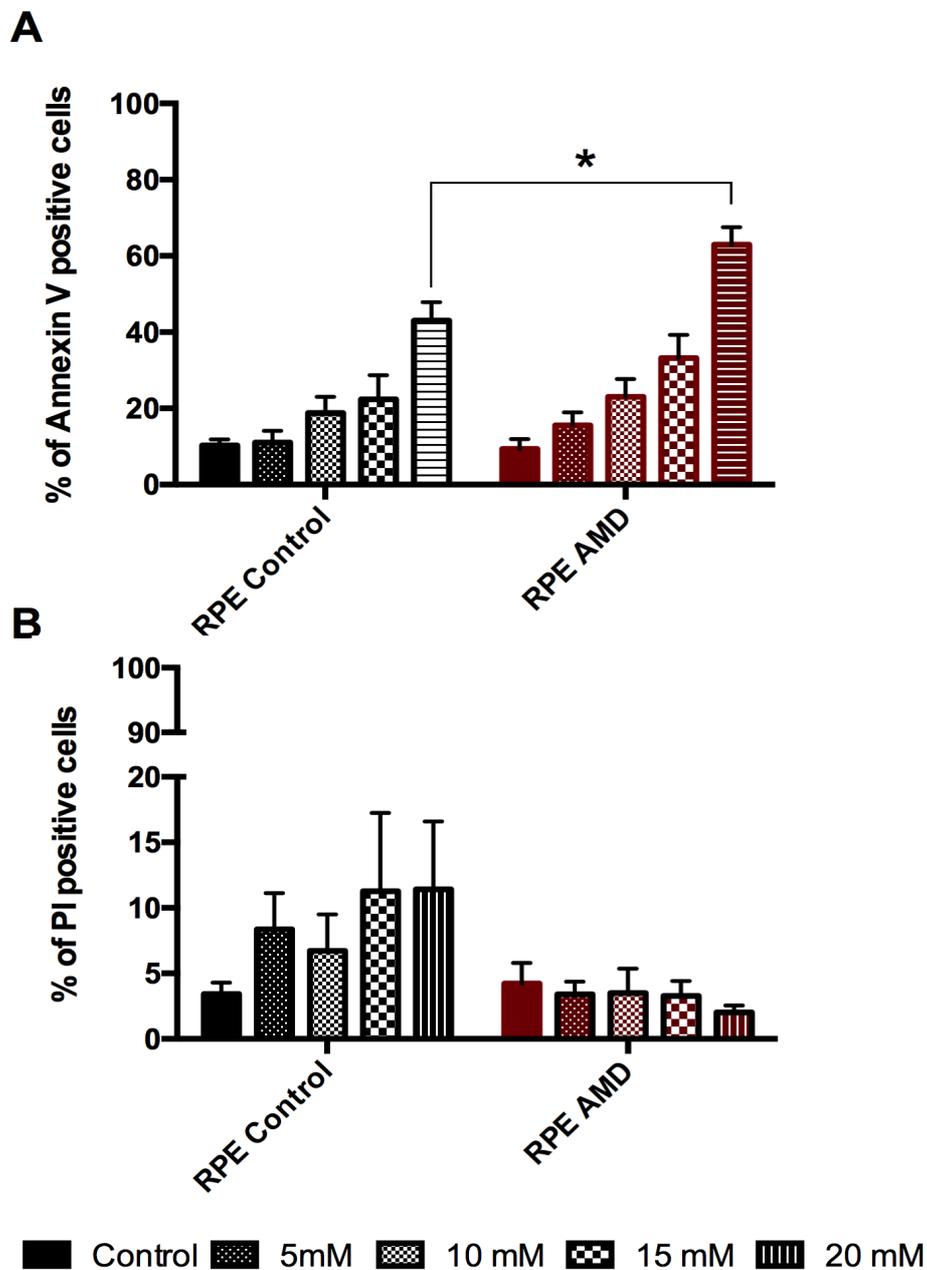


Figure 7: Analysis of hiPSC-RPE cells phagocytosis activity during oxidative stress induced by Fe-NTA treatment. (A) Flow cytometry analysis of phagocytosis by fluorescent carbonylates-modified microspheres during Fe-NTA treatment in both hiPSC-RPE Control (N=6) and AMD (N=6), two analyses per cell line. (B) Comparison between hiPSC-RPE Control and hiPSC-RPE AMD of phagocytosis during Fe-NTA exposure. Statistical analysis : ANOVA Two-Way, post hoc Bonferroni. Comparison of each doses with control condition for hiPSC-RPE Control cells (*) and hiPSC-RPE AMD cells and between hiPSC-RPE Control cells and AMD cells (†). * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,0001$

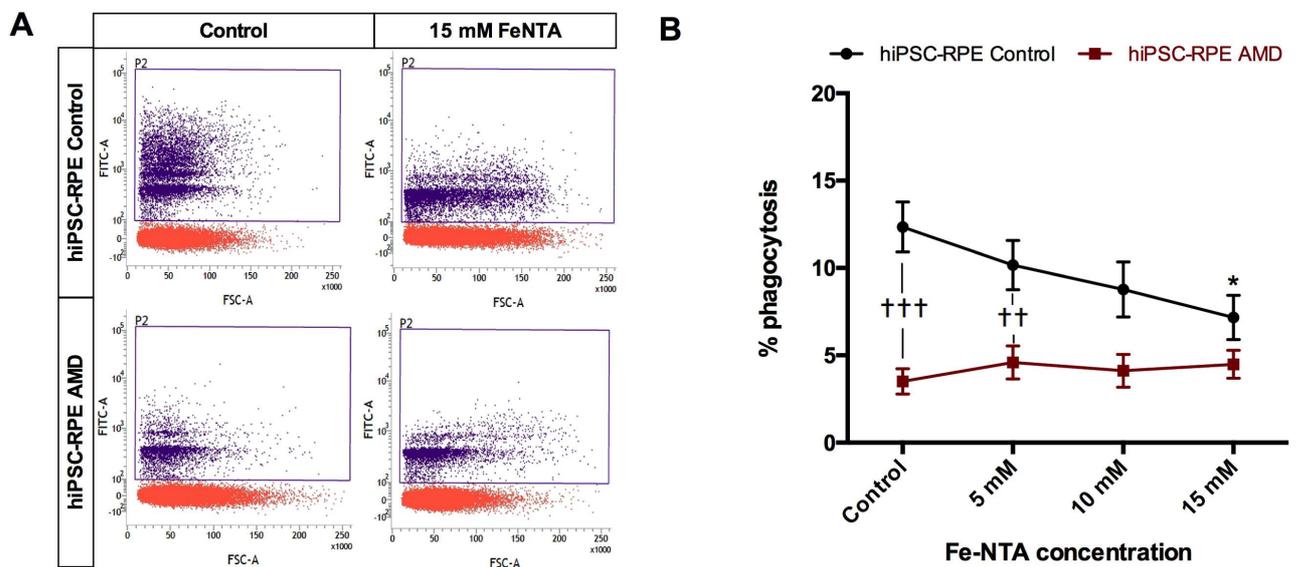
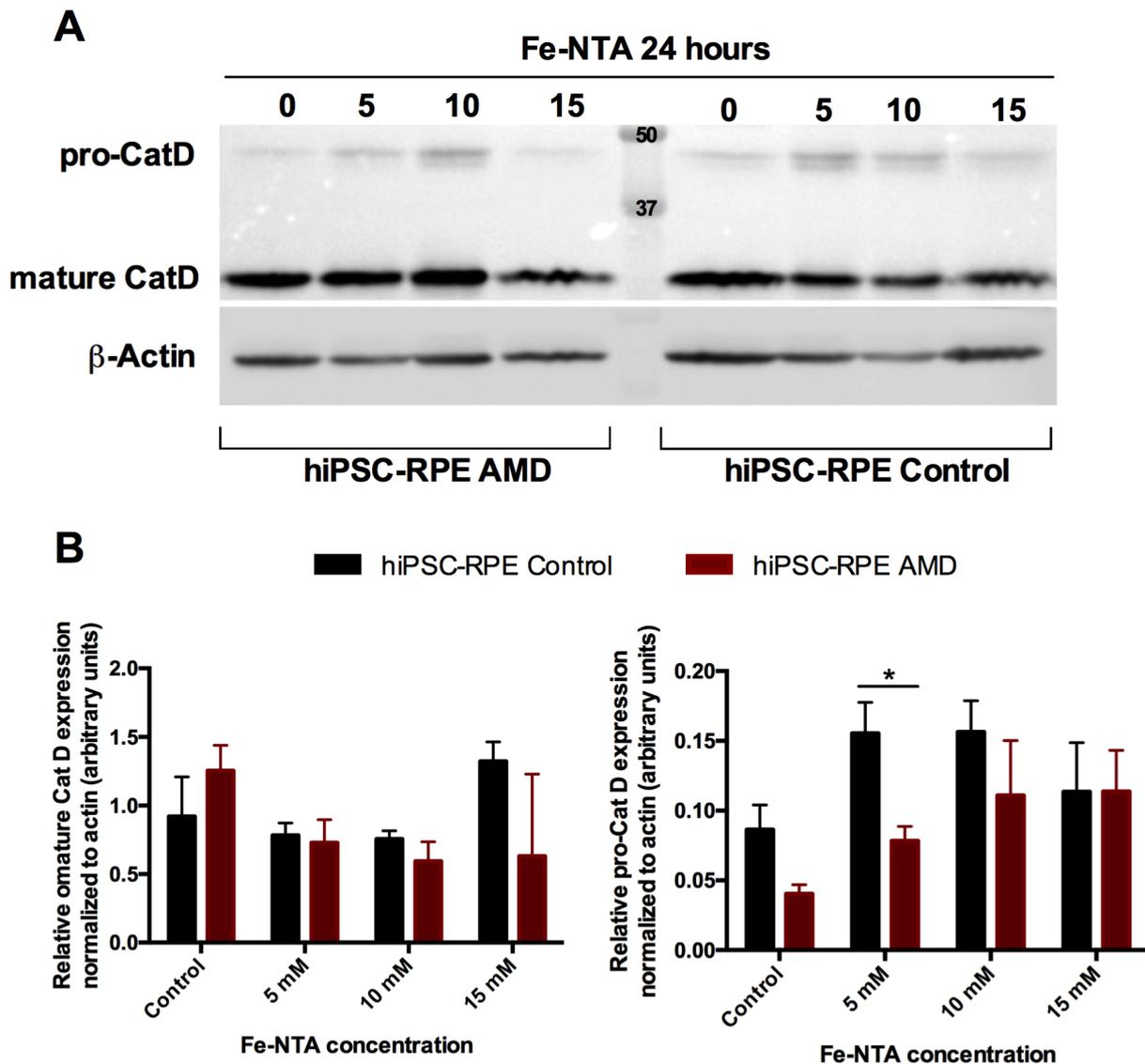


Figure 8: Analysis of hiPSC-RPE cells lysosomal activity during oxidative stress induced by Fe-NTA treatment (A) Western blot analysis of pro-CatD and mature CatD during Fe-NTA treatment in both hiPSC-RPE Control and AMD. (B) Western blot quantification of pro-CatD and mature CatD during Fe-NTA treatment in both hiPSC-RPE Control (N=6) and AMD (N=6), one analyse per cell line. Statistical analysis : ANOVA Two-Way, post hoc Fisher LSD. Comparison of each doses between hiPSC-RPE Control cells and AMD cells (*). *p<0,05



Résultats

Travaux en cours

I. Analyse du métabolisme mitochondrial

Les mitochondries sont des organelles intracellulaires indispensables au fonctionnement et à la survie des cellules de l'EPR (Scott W. Cousins, 2015). Elles sont constituées de deux membranes (intérieure et extérieure) et de deux compartiments (chambre extérieure et intérieure) (Figure 32. A-B). Tandis que la membrane externe entoure la mitochondrie, la membrane interne se projette dans la cavité mitochondriale et forme un réseau d'invaginations appelées crêtes mitochondriales. Cette membrane permet la division de la mitochondrie en deux chambres : la chambre extérieure, correspondant à l'espace entre les deux membranes ; la chambre intérieure contenant la matrice mitochondriale, matériel généralement dense et homogène constitué de granules, de cristaux protéiniques, de minéraux et d'ADN (Callen and Perasso, 2005; Robertis, 1983).

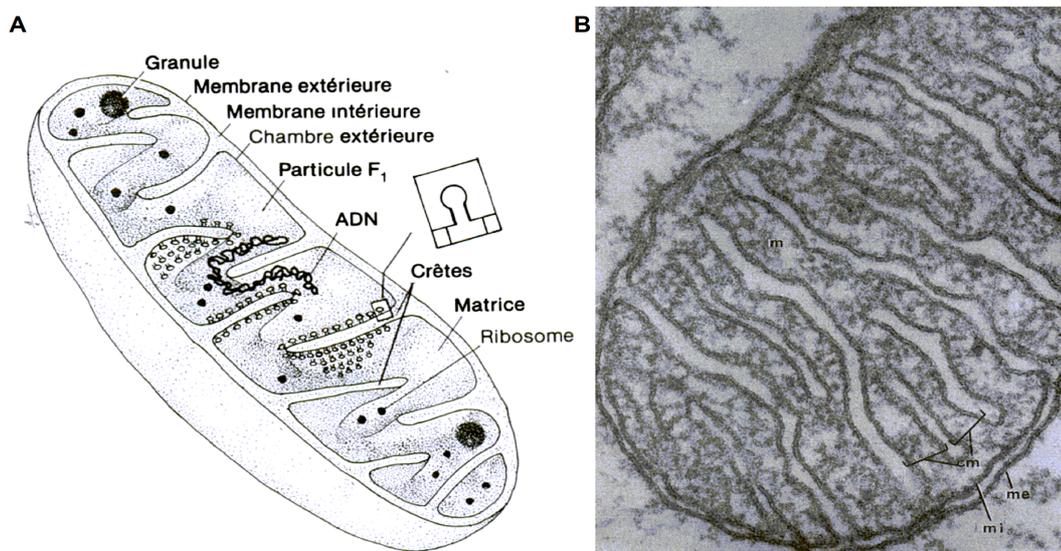


Figure 32 : A) Schéma tridimensionnel d'une mitochondrie coupé longitudinalement. B) Microscopie électronique d'une mitochondrie.

Matrice (m), membrane externe (me), membrane interne (mi), crêtes mitochondriales (cm).

Adaptée d'après Robertis, 1993.

De plus en plus d'études suggèrent un rôle central du dysfonctionnement mitochondrial dans le développement de la DMLA (Feher et al., 2006 ; Karunadharma et al., 2010 ; Terluk et al., 2015). Une analyse approfondie de cette organelle peut donc mettre en évidence des mécanismes cellulaires importants pour la compréhension de cette maladie.

I.1 – Matériels & méthodes

- ***Analyse de la morphologie mitochondriale***

1-Microscopie électronique à transmission : Les cellules CSPi-EPR sont détachées par 5 minutes de tryple (Invitrogen) à 37°C puis fixées pendant 1 heure avec PBS (tampon phosphate salin) avec 2,5 % de glutaraldéhyde, pH 7,1. Après plusieurs rinçages au PBS, les cellules sont post-fixées pendant 45 minutes dans une solution de PBS-tétroxyde d'osmium 1%. Les échantillons sont ensuite déshydratés par des incubations successives dans des bains d'éthanol à concentrations croissantes (50% jusqu'à 100%). Après chaque incubation les cellules sont centrifugées 5 minutes à 1000 rotations par minutes à température ambiante. Le culot cellulaire est inclus dans une résine epon après 24 heures de polymérisation, puis coupé à l'ultramicrotome UC6 (Leica Biosystem) en coupes de 70 nm. Les coupes sont ensuite incubées avec des agents contrastants, l'acétate d'uranyle 2% et du citrate, puis observées au microscope électronique JEM-1010 (JEOL) à 80 KeV (kilolectron-volt). Les clichés ont été obtenus avec une caméra digitale Olympus (Quemesa) via le logiciel de traitement d'image iTEM.

2-Immunoflorescence du réseau mitochondrial : Le réseau mitochondrial a été mis en évidence grâce au kit MitoTracker® Red CMXRos (Invitrogen) suivant les recommandations du fabricant. Après 24 heures de traitement au Fe-NTA, les cellules cultivées sur labteck sont incubées 15 minutes à 37°C avec 20 mM du colorant MitoTracker Red CMX Ros (excitation : 579 nm / émission : 599 nm). Après deux rinçages au PBS, les cellules sont fixées au PBS-PFA (paraformaldéhyde) 4% pendant 20 minutes à 4°C. Les noyaux sont colorés par incubation avec du DAPI (4',6-diamidino-2-phénylindole ; Invitrogen) au 1/500 dans du PBS-Triton 0,5%. Les lames, montées au Moviol (Sigma), sont observées à l'aide du microscope Zeiss et l'analyse par le logiciel Zen.

- ***Mesure du potentiel membranaire mitochondrial*** : Dans notre étude, nous avons mesuré le potentiel membranaire mitochondrial en condition basale et lors de différents traitements au Fe-NTA pendant 24 heures. La fluorescence de la sonde DiOC₂(3) (3,3'-Diethyloxacarbocyanine iodide) est corrélée au potentiel mitochondrial, ainsi une

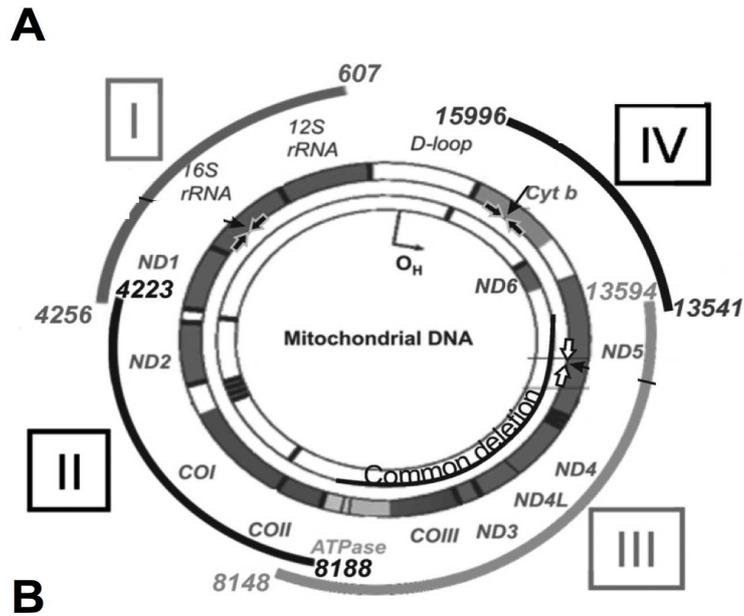
diminution de la fluorescence est signe d'une altération fonctionnelle des mitochondries. Ce paramètre est utilisé pour déterminer la viabilité mitochondriale (Zorova et al., 2017). Nous avons déterminé le potentiel membranaire mitochondrial en quantifiant la fluorescence de la sonde DiOC₂(3) (Kit MitoProbe™ DiOC₂(3) Assay, Invitrogen). Les cellules sont détachées par 5 minutes de tryple (Invitrogen) à 37°C puis filtrées sur tamis 100 µm. 1 000 000 cellules sont remises en suspension dans 1 mL de PBS-SVF (sérum de veau fœtal) 2% et incubées 30 minutes à 37°C avec 5 µL de DiOC₂(3) (excitation : 482 nm / émission : 488 nm). Pour le contrôle négatif, les cellules sont au préalable incubées 5 minutes à 37°C avec 1 µL de CCCP (Carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone). Après deux rinçages au PBS, les cellules sont reprises dans 500 µL de PBS-SVF 2% et analysées par le FACS Verse (BD Biosciences). Les résultats ont été traités via le logiciel FlowJo v10.

- **Quantification des lésions de l'ADN mitochondrial (ADNmt) :** Le génome mitochondrial, d'une taille de 16,6 kb, est circulaire et code pour 13 protéines participant à la chaîne respiratoire des électrons (Terluk et al., 2015). Contrairement à l'ADN génomique (ADNg), le ADNmt est constitué essentiellement d'exons. Ainsi, les dommages induits par les ERO peuvent produire des mutations graves pour le fonctionnement de cette organelle. La long-extension PCR (LX-PCR) est une technique permettant la mise en évidence de dommages au niveau de l'ADNmt (Santos et al., 2002, 2002). Elle est basée sur le principe suivant lequel les lésions à l'ADN (cassure, apparition de dimères...) vont ralentir ou bloquer les ADN polymérases thermostables, empêchant la synthèse d'un produit complet. Ainsi, lors de la LX-PCR, une amplification faible est le résultat d'un génome mitochondrial endommagé (Terluk et al., 2015).

1-Extraction de l'ADNg : les ADNg ont été extraits à partir de culots secs de PBMC via le Kit Nucleospin Tissue (Macherey-Nagel). Leur intégrité a été vérifiée par migration sur gel d'agarose 1%. Une mesure de la concentration d'ADN et de sa qualité, a été effectuée par spectrophotométrie (mesure de la densité optique à 260 nm et rapport DO 260 / DO 280). Les échantillons d'ADN ont été stockés à -20°C jusqu'à utilisation.

2-LX-PCR : 200 ng d'ADNg sont amplifiés suivant les instructions du Kit AccuPrime Taq DNA Polymerase System (Invitrogen). Les 5 couples d'amorces utilisés

pour l'étude des différentes régions de ADNmt (Figure 33) ainsi que les cycles de PCR utilisés ont été décrits précédemment dans la littérature (Karunadharma et al., 2010; Terluk et al., 2015). Brièvement, la dénaturation commence, pour les régions I à IV, par une phase d'initiation de 30 secondes à 94°C. Elle est suivie par une étape de dénaturation à 94°C pendant 30 secondes de 21 cycles pour la région I et 25 cycles pour les régions II, II et IV. Pour l'ensemble des amorces, la phase d'hybridation/extension est réalisée pendant 30 secondes à 57°C. L'extension finale est effectuée à 68°C pendant 4 minutes pour les régions I et II, 6 minutes pour la région III et 2 minutes et 30 secondes pour la région IV. Pour prendre en compte les différences du contenu en ADNmt entre les individus, chaque amplification est normalisée par l'amplification d'une petite région du ADNmt (191 ADNmt) (Terluk et al., 2015). En effet, la probabilité qu'un dommage à l'ADN survienne dans cette région étant faible, sa mesure permet de déterminer le nombre relatif de molécules de ADNmt par échantillon. Pour les amorces du fragment 191 bp ADNmt (Total ADNmt), la dénaturation initiale, similaire aux autres régions, est suivie par 19 cycles de dénaturation à 94°C pendant 30 secondes. L'hybridation/extension ainsi que l'extension finale sont réalisées à 55°C pendant 30 secondes.



Amorces	Direction	Séquence (5'-3')
Région I	Sens	CAC TGA AAA TGT TTA GAC GGG CTC ACA
	Anti sens	GAG GGG GAA TGC TGG AGA TTG TAA TG
Région II	Sens	CCA TCA CCA TTA CAA TCT CCA GCA TTC C
	Anti sens	CTC CAC AGA TTT CAG AGC ARR GAC CG
Région III	Sens	GAC CGG GGG TAT ACT ACG GT
	Anti sens	TGT CAG GGA GGT AGC GAT GA
Région IV	Sens	CAT ACA CAA ACG CCT GAG CCC TAT CT
	Anti sens	GCT TTG GGT GCT AAT GGT GGA GTT AAA
ADNmt Total	Sens	CAG TGA AAT TGA CCT GCC CGT GAA
	Anti sens	CTC TAG CAT GTA CTG CTC GGA GGT

Figure 33 : Localisation au niveau du génome mitochondrial (A) et séquence (B) des couples d'amorces utilisés pour l'amplification des quatre régions de l'ADN mitochondrial.
Modifiée d'après Karunadharm, 2010.

3-Quantification de l'ADNmt amplifié: le kit Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Assay Kit (Invitrogen) a été utilisé suite à la LX-PCR pour quantifier l'ADN mitochondrial amplifié suivant les instructions du fabricant. Ainsi, 2 µL de produits PCR ont été dilués au 1/50 dans du tampon TE (fourni avec le kit) dans un puits de plaque 96 puits. Les échantillons sont ensuite incubés 3 minutes à l'obscurité avec 100 µL du réactif Quant-iT PicoGreen (excitation : 480 nm / émission : 520 nm) avant d'effectuer la lecture de la fluorescence grâce à l'appareil Mitras (Berthold Technologies, excitation : 485 nm / émission : 535 nm).

4-Calcul des lésions à l'ADN des mitochondries: la fréquence des altérations de l'ADNmt est calculée suivant l'équation de Poisson et assumant une distribution aléatoire des lésions (Terluk et al., 2015). Ainsi, l'équation $f(x)=e^{-\lambda} \lambda^x/x!$ ($x=0$ pour les molécules d'ADN sans lésions) permet le calcul de la fréquence des lésions (λ).

Elle peut être redéfinie par, $x=0$, $\lambda=-\ln A_D/A_0$ (A_D , amplification d'ADN endommagés / A_0 , amplification d'ADN non endommagé) (Karunadharma et al., 2010). En d'autres termes, la fréquence des lésions induites en milieu pro-oxydant par 10 kb au niveau du génome mitochondrial a été calculée en divisant l'amplification de l'échantillon en condition basale par celle lors d'un traitement à 15 mM de Fe-NTA pendant 24 heures. Chaque amplification a été normalisée par l'amplification de l'ADN mitochondrial total (Total mt DNA).

I.2 – Résultats & Perspectives

Avec le vieillissement, le système mitochondrial va subir de multiples changements morphologiques et fonctionnels (Lefevre et al., 2017; Shigenaga et al., 1994). Ainsi, le nombre de mitochondries et leur densité matricielle vont diminuer (Bianchi et al., 2013 ; Payne and Chinnery, 2015). Par microscopie électronique, nous avons analysé la morphologie de ces organelles au niveau des cellules hCSPi-EPR contrôle et DMLA. Généralement de forme allongée, nous avons observé dans cette analyse un aspect arrondi des mitochondries dans les deux populations de cellules (Figure 34. A-B). Ce changement morphologique a déjà été observé et est généralement associé au processus de sénescence (Bianchi et al., 2013). Certaines mitochondries présentent aussi une désorganisation membranaire signe de ferroptose (Figure 34. C-D) avec une perte des crêtes accompagnée d'une diminution de la densité en électrons de la matrice. L'ensemble de ces observations confirme les résultats obtenus par l'analyse de la β -Galactosidase (Cf. Article « Typical disease-phenotype of hiPSC-RPE derived from dry AMD ») : les cellules hCSPi-EPR dérivés de cellules âgées conservent les modifications morphologiques liées au vieillissement. Bianchi et al., ont mis en évidence que ces altérations, induites physiologiquement avec l'âge, sont plus accentuées au niveau des cellules de l'EPR dérivées de patients DMLA comparés à des sujets sains, avec des mitochondries plus petites et moins nombreuses (Bianchi et al., 2013). Dans notre étude, nous n'avons pas observé de différences morphologiques au niveau mitochondrial entre les cellules hCSPi-EPR contrôles et DMLA (Figure 34).

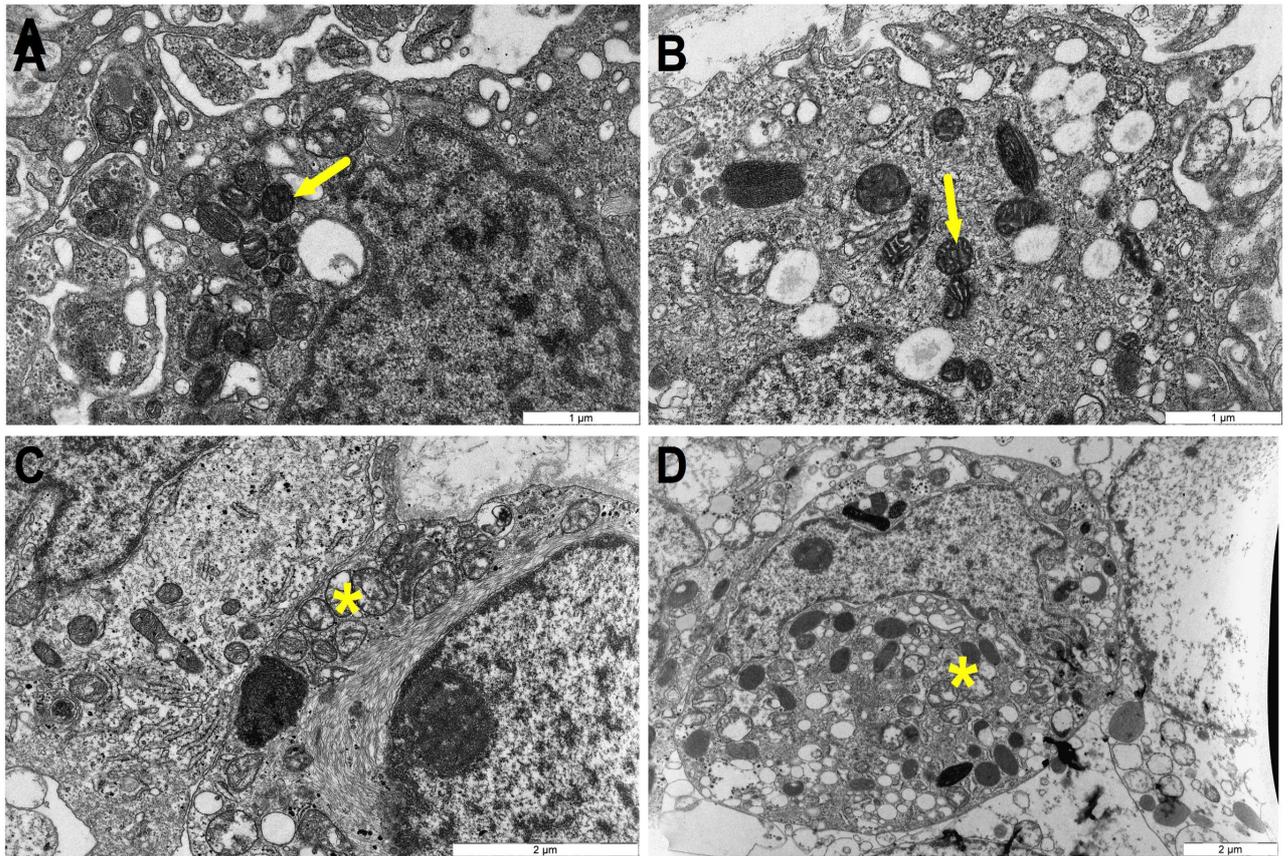


Figure 34 : Analyse de la morphologie des mitochondries par microscopie électronique à transmission au niveau de cellules hCSPi-EPR contrôle (A-C) et DMLA (B-D).

Les mitochondries sont désignées par une flèche. Une altération de l'organisation est signalée par un astérisque.

Une interruption entre les membranes interne et externe des mitochondries peut aussi être observée au niveau de cellules de l'EPR provenant de sujet sains et de patients DMLA, caractéristique d'altérations pré-apoptotiques (Bianchi et al., 2013). Aujourd'hui, la voie de mort cellulaire impliquée dans la dégénérescence des cellules de l'EPR au cours de la DMLA n'est pas encore clairement établie (Hanus et al., 2013 ; Liang and Godley, 2003). En effet, même si de nombreuses études postulent que l'apoptose est le mécanisme principal (Zhu et al., 2016), l'analyse histopathologique des lésions survenant lors du développement de la DMLA décrit des processus inflammatoires (infiltration de cellules microgliales, recrutement de macrophages et activation du système du complément) spécifiquement retrouvés dans la nécrose (Donoso et al., 2006 ; Parmeggiani et al., 2012). L'apoptose peut être mise en évidence par la fragmentation mitochondriale (Sugioka et al., 2004). Les mitochondries sont des organelles dynamiques, en constant processus de fusion et de fission. Cette dynamique est essentielle pour le maintien de la forme, de la taille et de la fonction des mitochondries (Sauvanet et al., 2010).

Au niveau de la figure 35, nous pouvons observer, au niveau des cellules ARPE-19, qu'en condition basale les mitochondries ont une morphologie filamenteuse. Lors d'un traitement de 10 mM de Fe-NTA pendant 24 heures, alors que la viabilité cellulaire n'est pas altérée (Cf. Article « hRPE cells derived from induced pluripotent stem cells better recapitulate oxidative stress responses than ARPE-19 cells »), il apparaît un aspect ponctué des mitochondries, traduisant un fractionnement de ces organelles. Or, la fission mitochondriale serait stimulée par la présence du cytochrome c (Chan, 2012). *A contrario*, la fusion mitochondriale protège des stimuli apoptotiques. Par ces observations nous confortons l'hypothèse selon laquelle les cellules de l'EPR dégénèrent par apoptose lors d'un stress oxydatif.

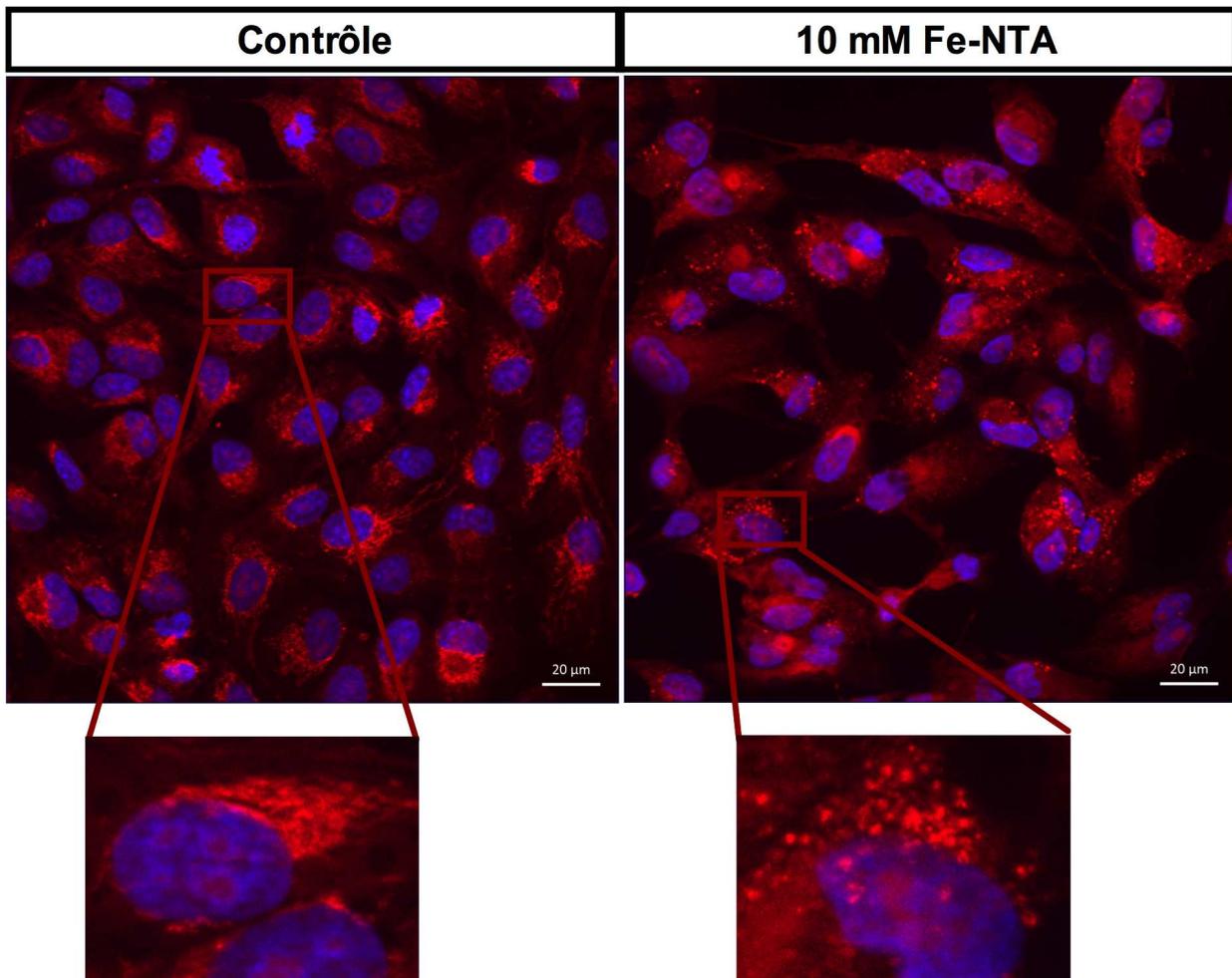


Figure 35 : Mise en évidence des mitochondries par le colorant mitotracker (rouge) au niveau des cellules ARPE-19 en condition contrôle et lors d'un traitement à 10 mM de Fe-NTA pendant 24 heures.
Les noyaux sont colorés au DAPI.

Nous avons précédemment mis en évidence que les cellules ARPE-19 et hCSPi-EPR présentent l'expression de marqueurs pro-apoptotiques lors des traitements au Fe-NTA (Cf. Article « hRPE cells derived from induced pluripotent stem cells better recapitulate oxidative stress responses than ARPE-19 cells »). Cependant, cette analyse avait aussi révélé la présence de marqueurs nécrotiques, uniquement au niveau des cellules hCSPi-EPR. Le mécanisme de mort impliqué dans la mort des cellules ARPE-19 peut donc être différent de celui des cellules hCSPi-EPR. La présence d'apoptose dans la dégénérescence de ces cellules dans la DMLA doit donc être confirmée par l'analyse du dynamisme des mitochondries au niveau des cellules hCSPi-EPR.

Le stress oxydatif est un des facteurs principaux impliqués dans le vieillissement et dans la dégénérescence des cellules de l'EPR (Shigenaga et al., 1994). La production d'ERO va avoir des conséquences importantes sur la morphologie et le fonctionnement des mitochondries (Balaban et al., 2005). En effet, il a été mis en évidence dès 1979 qu'un stress oxydant va induire une augmentation abrupte de la perméabilité membranaire mitochondriale (Haworth and Hunter, 1979). Le potentiel membranaire des mitochondries est généré par des pompes à protons localisées au niveau des complexes I, II et IV de la mitochondrie (Zorova et al., 2017). Avec le gradient de protons, le potentiel membranaire est essentiel au stockage de l'énergie (ATP). Il est stable au cours du temps, permettant le maintien du fonctionnement cellulaire normal.

Lors de l'analyse du potentiel membranaire mitochondrial, les cellules hCSPi-EPR DMLA se sont réparties selon deux profils (Figure 36. A-B) :

- Le groupe 1 dont le potentiel membranaire mitochondrial est similaire à celui des hCSPi-EPR contrôle, que ce soit en condition basale ou lors de l'accumulation intracellulaire de Fe-NTA. Ainsi, en l'absence de traitement, $91,8 \pm 1,6$ % des cellules contrôles et $84,93 \pm 7,02$ % des cellules DMLA possèdent des mitochondries fonctionnelles. Lors du stress oxydant induit par le fer, le potentiel membranaire mitochondrial va être altéré de façon dose-dépendante.

- Le groupe 2 dont le potentiel membranaire mitochondrial est altéré dans 80% de la population cellulaire en condition basale. De façon similaire aux hCSPi-EPR contrôle et DMLA groupe 1, les différents traitements au fer vont induire un dysfonctionnement supérieur du réseau mitochondrial.

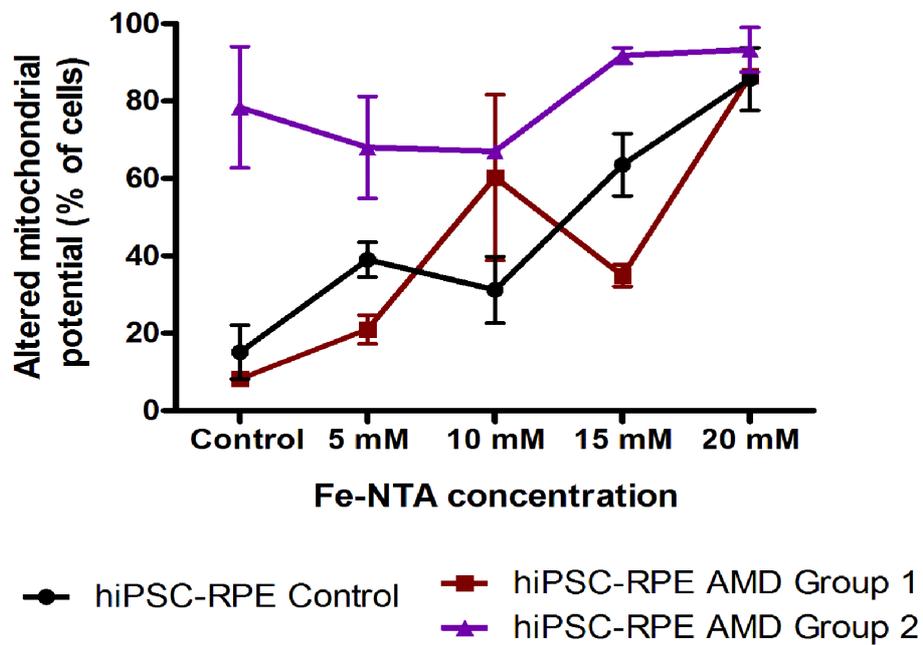
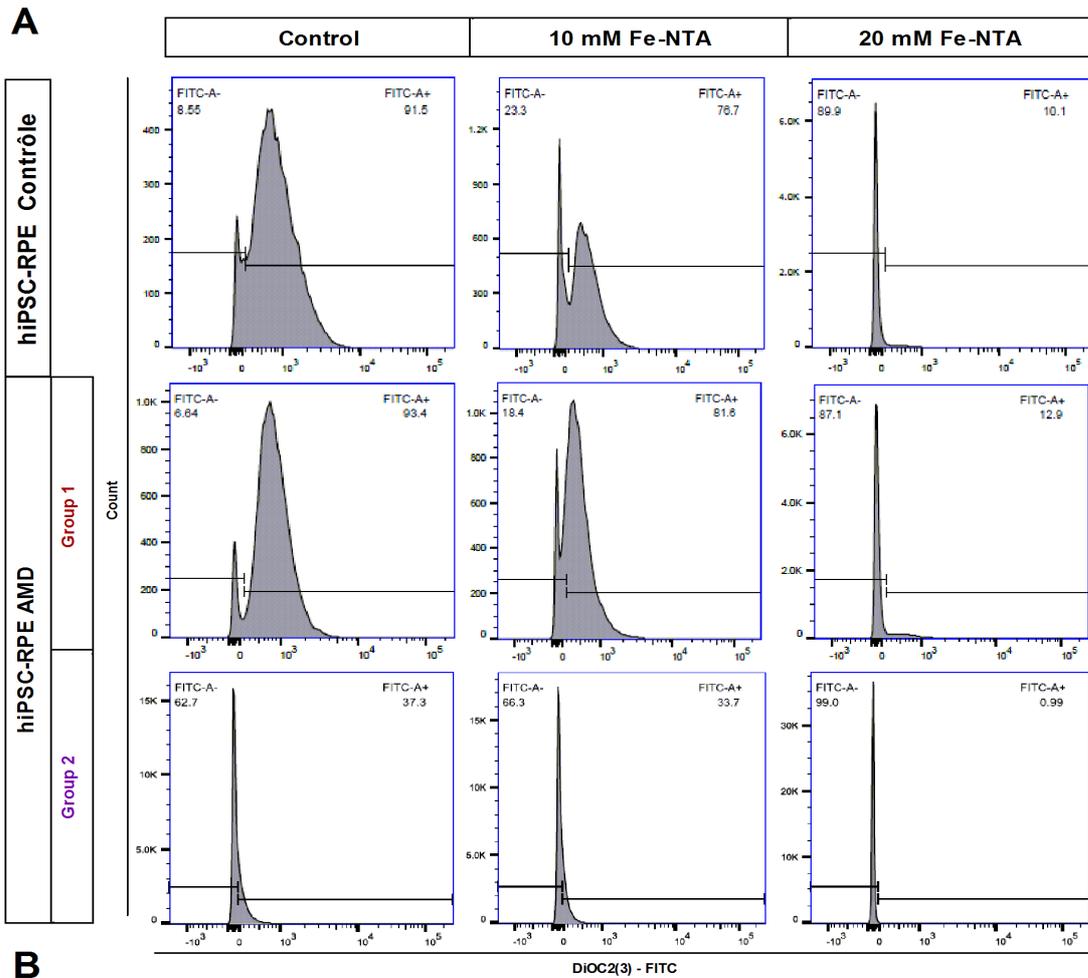


Figure 36 : Analyse du potentiel membranaire mitochondrial par cytométrie en flux (A) et représentation graphique (B) en condition contrôle ou lors de traitement au Fe-NTA de 24 heures au niveau des cellules hCSPi-EPR contrôle et DMLA.

hCSPi-EPR contrôle (N=3) et DMLA (N=4, 2 par groupes).

Même si ces observations restent à confirmer, ces résultats préliminaires décrivent la présence prépondérante de mitochondries altérées au niveau du groupe 2 des cellules hCSPi-EPR DMLA. L'hétérogénéité du réseau mitochondrial a déjà été décrit dans la littérature et semble être en lien avec le déséquilibre entre fragmentation et fusion mitochondriale induit par le stress oxydatif (Zorova et al., 2017). Ainsi, les ERO vont induire la ségrégation des mitochondries en deux types de population suivant le potentiel membranaire mitochondrial : les mitochondries normales et celles ayant subi des dommages (Zorov et al., 2016). En condition physiologique, les mitochondries endommagées vont être dégradées par mitophagie et être remplacées (Bingol and Sheng, 2016). Ainsi, les organelles altérées vont être ubiquitinylées puis éliminées par autophagie avec la participation des protéines PINK1, Nix et LC3 (Zorov et al., 2016). Avec le vieillissement, les systèmes de dégradation et/ou de réparations mitochondriales vont être moins efficaces. La proportion importante de mitochondries altérées au niveau des hCSPi-EPR DMLA du groupe 2 peut être expliquée par un dysfonctionnement du système de contrôle qualité des mitochondries, aboutissant à une accumulation de ces organelles endommagées (Zorov et al., 2016). L'analyse des processus de dégradation nous permettra de conforter cette hypothèse.

Le dysfonctionnement mitochondrial induit par le stress oxydatif peut être expliqué par l'altération de l'ADNmt (Balaban et al., 2005). Plusieurs études ont par ailleurs mis en évidence que l'ADNmt est plus susceptible aux dommages induits par les ERO que l'ADN nucléaire (Santos et al., 2002). Cette différence peut être expliquée par la proximité de l'ADNmt du site de production d'ERO. Ainsi, suivant un cercle vicieux, la production de stress oxydatif va induire des dommages à l'ADNmt, aboutissant à une plus grande production d'ERO (Balaban et al., 2005). Dans le cas de la DMLA, plusieurs études ont mis en évidence des altérations de l'ADNmt au niveau de cellules de l'EPR post-mortem de patients atteints par cette maladie (Karunadharma et al., 2010; Terluk et al., 2015).

Nous avons quantifié par LX-PCR le taux de lésions au niveau de l'ADNmt des cellules hCSPi-EPR contrôle et DMLA. Dans ces résultats préliminaires, nous n'avons observé aucune différence en condition basale dans l'amplification relative de l'ADNmt entre les deux types de population (Figure 37.A). Le stress oxydatif induit par le traitement au Fe-NTA (15 mM pendant 24 heures) a provoqué des lésions au niveau du génome mitochondrial des hCSPi-EPR de façon similaire entre les cellules contrôle et DMLA, à

l'exception de la région II et IV. En effet, dans ces régions, le nombre de lésions par 10 kilobases est environ 3 à 4 fois plus important au niveau des cellules dérivées de patients atteints par la DMLA (Figure 37.B).

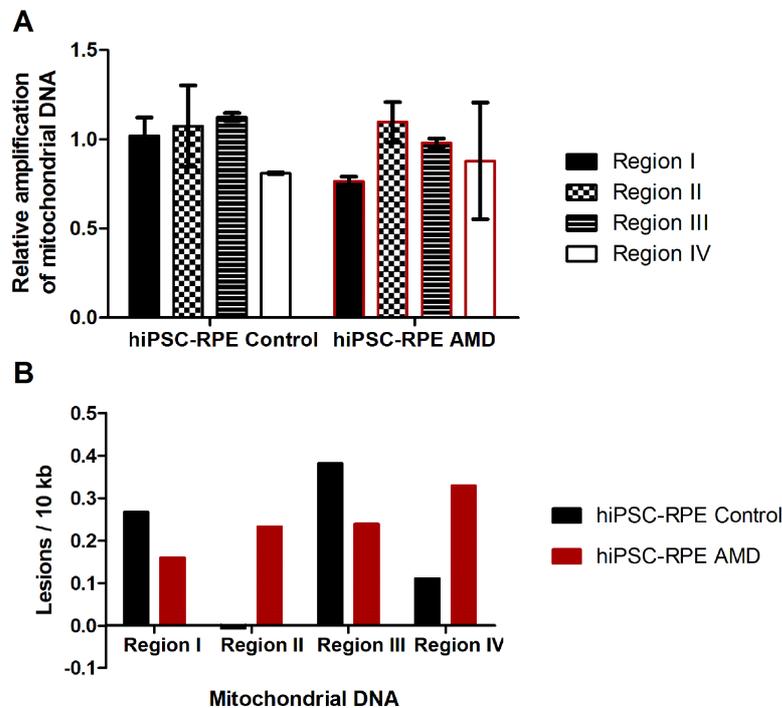


Figure 37 : A) Relative amplification de l'ADN mitochondrial des cellules hCSPI-EPR contrôle (N=2) et DMLA (N=2) en condition basale. B) Taux de lésions par 10 kilobases (kb) détectées au niveau de l'ADN mitochondrial des cellules hCSPI-EPR contrôle (N=1) et DMLA (N=1) lors d'un traitement au Fe-NTA de 15 mM pendant 24 heures.

Ces observations doivent être confortées par l'augmentation du nombre de lignées et une analyse statistique. Cependant, ces premiers résultats corroborent ceux de Terluk et al., publiés en 2015 (Terluk et al., 2015). Dans leurs travaux, ils ont mis en évidence la présence de dommages à l'ADNmt au niveau de cellules de l'EPR *post-mortem* provenant de patients atteints de la DMLA, principalement au niveau des régions I, II et IV. Ces régions sont impliquées dans la production d'ATP et la régulation de la transcription. La présence de mutations dans ces régions du génome mitochondrial pourrait aboutir à une production incorrecte des protéines mitochondriales. Il a en effet été montré que la proportion de protéines mitochondriales endommagées était liée à la progression de la DMLA (Karunadharma et al., 2010; Nordgaard et al., 2008). Les dommages au niveau de l'ADNmt pourraient donc être en partie responsables du dysfonctionnement des cellules de l'EPR dans le développement de la DMLA (Figure 38, Nordgaard et al., 2008).

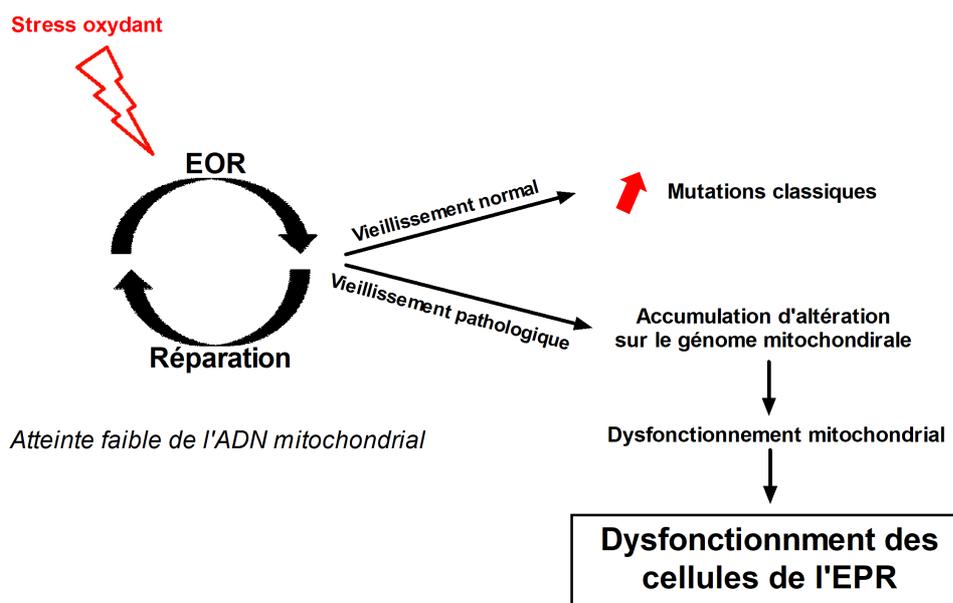


Figure 38 : Hypothèse du développement de la DMLA basé sur l'implication des dommages de l'ADN mitochondriale au cours du vieillissement pathologique aboutissant au dysfonctionnement des cellules de l'EPR. Modifiée d'après Karundharma, 2010.

La mitochondrie semble donc être particulièrement impliquée dans la physiopathologie de la DMLA. La protection de cette organelle contre le stress oxydatif et le maintien de sa fonction semble être une stratégie thérapeutique intéressante pour le traitement de cette maladie. En effet, des études cliniques ont mis en évidence une stabilisation de la vision chez des patients atteints de forme précoce de la DMLA en utilisant une combinaison d'antioxydants et de molécules ciblant le fonctionnement mitochondrial (acétyl-L-carnitine) (Feher et al., 2006).

II. Etude de la physiologie des cellules ARPE-19 dans différentes conditions de culture en milieu pro-oxydant

II.1 – Matériels & méthodes

L'ensemble des informations nécessaires à la compréhension et reproduction des expériences (composition des milieux, traitement au Fe-NTA, mesure de la viabilité cellulaire par le MTT (sel de tétrazolium) test, mesure de la production de ERO par le DCFH-DA (dichloro-dihydro-fluorescein diacetate), étude de la phagocytose) sont présentées dans la partie « Material & methods » de l'article intitulé « hRPE cells derived

from induced pluripotent stem cells better recapitulate oxidative stress responses than ARPE-19 cells ».

Brièvement, les cellules ARPE-19 ont été maintenues en culture dans du milieu DMEM F12, 10% SVF, 1% d'acides aminées non essentiels et 0,1% de β -mercaptoéthanol. À confluence, elles ont été traitées à différentes concentrations de Fe-NTA (5, 10, 15 et 20 mM) pendant 24, 48 ou 72 heures. À la fin des différents traitements, la survie cellulaire (test colorimétrique MTT), la production de stress oxydatif (test de luminescence DCFH-DA) et la phagocytose (billes fluorescentes, cytométrie en flux) ont été analysées.

De plus, nous avons aussi observé les changements morphologiques des cellules ARPE-19 induits par une culture prolongée pendant 4 semaines. Suivant le protocole établi par Samuel and al., nous avons diminué la concentration de sérum dans le milieu de culture à 1% (Samuel et al., 2017). Pour s'assurer que ces modifications étaient liées uniquement à la durée de culture, nous avons aussi réalisé ces expériences avec du milieu ayant une concentration de sérum classique (10%).

II.2 – Résultats & Perspectives

A. Effet d'un stress oxydatif succinct et chronique sur la phagocytose des cellules ARPE-19

Dans l'article intitulé « hRPE cells derived from induced pluripotent stem cells better recapitulate oxidative stress responses than ARPE-19 cells », nous avons mis en évidence que l'accumulation de Fe-NTA au niveau des cellules ARPE-19 est responsable de la production d'ERO ainsi que de l'apparition d'une mort cellulaire par apoptose.

Nous nous sommes par la suite intéressés à l'impact de ce stress oxydatif sur la fonction principale de ces cellules, la phagocytose. En effet, il avait été montré précédemment qu'une accumulation intracellulaire de fer était responsable de l'inhibition de la phagocytose au niveau des cellules ARPE-19 (Chen et al., 2009). Lors de nos travaux, nous avons conforté ces résultats en mettant en évidence une diminution de la phagocytose en absence d'une atteinte de la viabilité cellulaire (Figure 39.A). Cette inhibition semble être dose-dépendante, ainsi $53,61 \pm 7,5\%$ des cellules phagocytent pour une dose de 5mM, $47,39 \pm 7,01\%$ pour 10 mM et seulement $19,82 \pm 9,9\%$ pour 15 mM de Fe-NTA.

Lors des traitements chroniques de 48 et 72 heures (Figure 39. B-C), la viabilité cellulaire semble altérée plus rapidement que lors d'un traitement unique, dès 10 mM de Fe-NTA ($76,85 \pm 7,9\%$ pour 48 heures et $76,10 \pm 5,4\%$ pour 72 heures). Cette diminution de la survie cellulaire paraît être corrélée à une augmentation de la phagocytose. Ainsi, alors que cette fonction semble inhibée pour une dose de 5 mM ($53,6 \pm 7,5\%$ à 24h ; $37,9 \pm 8\%$ à 48 heures ; $19,1 \pm 5,2\%$ à 72 heures) aucun changement n'est observé à 10 mM de Fe-NTA lors de traitements de 48 et 72 heures ($81,29 \pm 20,6\%$ et $62,14 \pm 23,9\%$ respectivement). *A contrario*, lorsque la survie cellulaire paraît altérée (15 mM de Fe-NTA pendant 48 et 72 heures, $67,9 \pm 8\%$ et $75,89 \pm 4,8\%$ respectivement), la phagocytose est supérieure à celle observée en une situation basale ($159,3 \pm 23,3\%$ à 48h et $173,6 \pm 22\%$ à 72 heures).

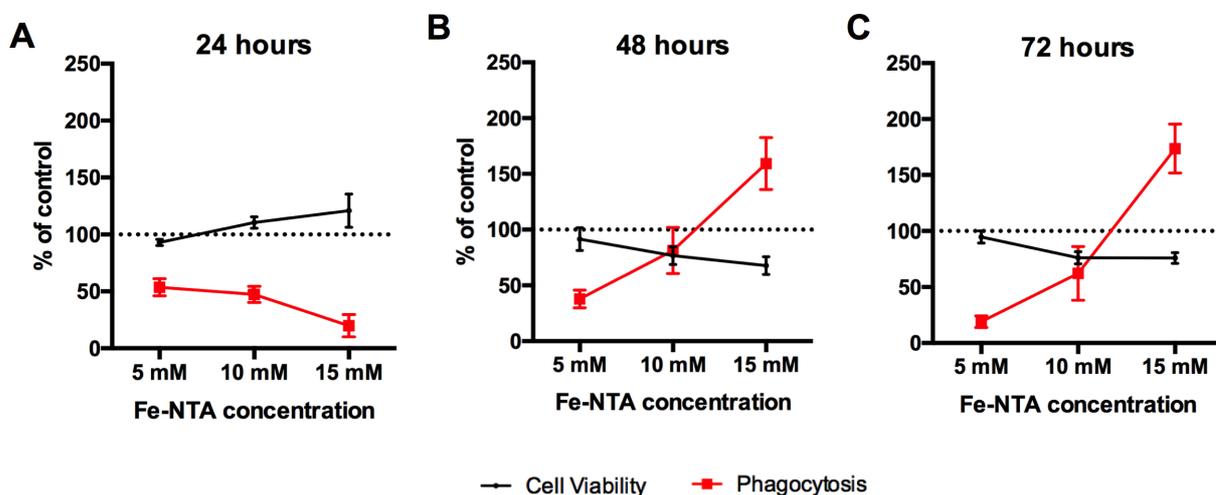


Figure 39: Analyse de la phagocytose et de la viabilité cellulaire des cellules ARPE-19 lors de différents traitements au Fe-NTA pendant 24 heures (A) 48 heures (B) et 72 heures (C).

Suite à ces premières observations qui doivent être confirmées par une augmentation de nombre d'échantillons et une analyse statistique, nous avons supposé que la viabilité cellulaire avait un impact sur l'activité de phagocytose. Lors de l'analyse de cette fonction suite à un traitement succinct de 24 heures, les doses utilisées pour induire une accumulation intracellulaire de fer n'avaient pas d'impact sur la survie des cellules. Afin de confirmer les résultats obtenus lors des traitements chroniques de 48 et 72 heures, nous avons donc réitéré ces expériences après un traitement de 24 heures en augmentant la concentration de Fe-NTA ajoutée dans le milieu. Dans l'article intitulé « hRPE cells derived from induced pluripotent stem cells better recapitulate oxidative stress responses than ARPE-19 cells », nous avons montré que la survie des cellules ARPE-19 chute drastiquement entre 15 mM ($120 \pm 14,7\%$) et 20 mM de Fe-NTA pendant 24 heures ($7,96$

± 1,7%). Nous avons donc évalué, dans un premier temps, la dose de Fe-NTA minimale, se situant en 15 et 20 mM, nécessaire pour réduire la survie des cellules ARPE-19 après 24 heures en milieu pro-oxydant. Ainsi, nous avons observé une diminution dose-dépendante de la viabilité cellulaire, qui semble être particulièrement importante à partir de 16 mM de Fe-NTA (Figure 40.A).

Deuxièmement, nous avons quantifié l'efficacité de la phagocytose pour chacune des doses et corrélié ces résultats à la survie cellulaire (Figure 40.B). Avant 15,5 mM de Fe-NTA, dose limite où la survie des cellules ne semble pas altérée, la phagocytose est inhibée de façon dose-dépendante. A partir d'une dose de 16 mM de Fe-NTA, la phagocytose des cellules ARPE-19 augmente se rapprochant de la condition contrôle. Pour des doses supérieures à 16 mM, la phagocytose est de nouveau largement diminuée.

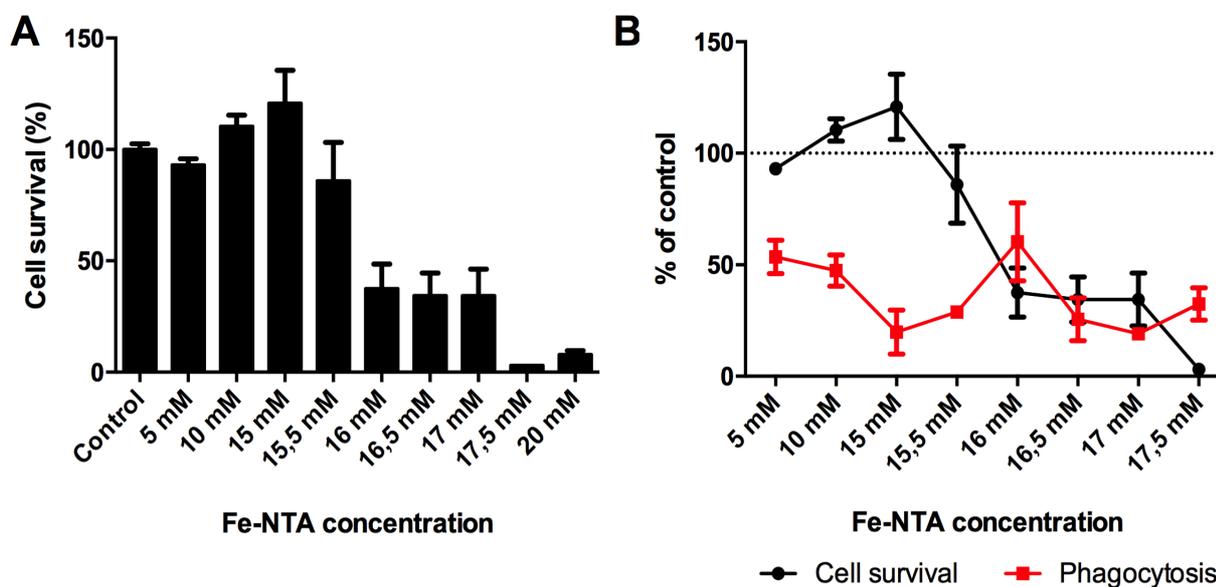


Figure 40 : Viabilité cellulaire (A) et activité de phagocytose (B) des cellules ARPE-19 en condition contrôle ou lors de traitement au Fe-NTA de 24 heures.

L'ensemble de ces observations conforte l'hypothèse selon laquelle, lors du vieillissement, la phagocytose des cellules de l'EPR est altérée (Wang et al., 2009). Il a été montré que la diminution de cette fonction cellulaire serait impliquée dans le développement de la DMLA, et particulièrement dans la formation des drusen (Tian et al., 2017). Ainsi, en accordance avec nos résultats et les mécanismes pathologiques déjà connus comme participant au développement de la maladie, nous avons établi l'hypothèse (Figure 41) suivante : au cours du vieillissement, l'augmentation du stress oxydatif va

aboutir à une diminution de la phagocytose (Li, 2013; Tian et al., 2017). Lorsque la quantité d'ERO produite dépasse un seuil et atteint la viabilité cellulaire, les cellules de l'EPR vont augmenter leur capacité de phagocytose afin de se protéger et de dégrader les constituants néfastes à la survie. Il est possible que des facteurs moléculaires responsables de l'homéostasie cellulaire participent à cette activation de la phagocytose. Cette fonction étant associée à la production de déchets, une phagocytose excessive peut être à l'origine de la production de déchets importants, s'accumulant et participant à la formation des drusen. Cependant, ce mécanisme de défense ne serait que transitoire, présent lors d'une souffrance cellulaire et avant un processus de dégénérescence des cellules de l'EPR, stade critique où la phagocytose est à nouveau largement inhibée. A cette étape, les cellules de l'EPR ne seraient plus à même d'éliminer tous les débris cellulaires et induiraient alors la production de MMPs, protéines responsables de la dégradation de la matrice extracellulaire (Kolar, 2013). Une quantification de la production des MMPs lors de nos différents traitements pro-oxydant pourrait conforter notre hypothèse.

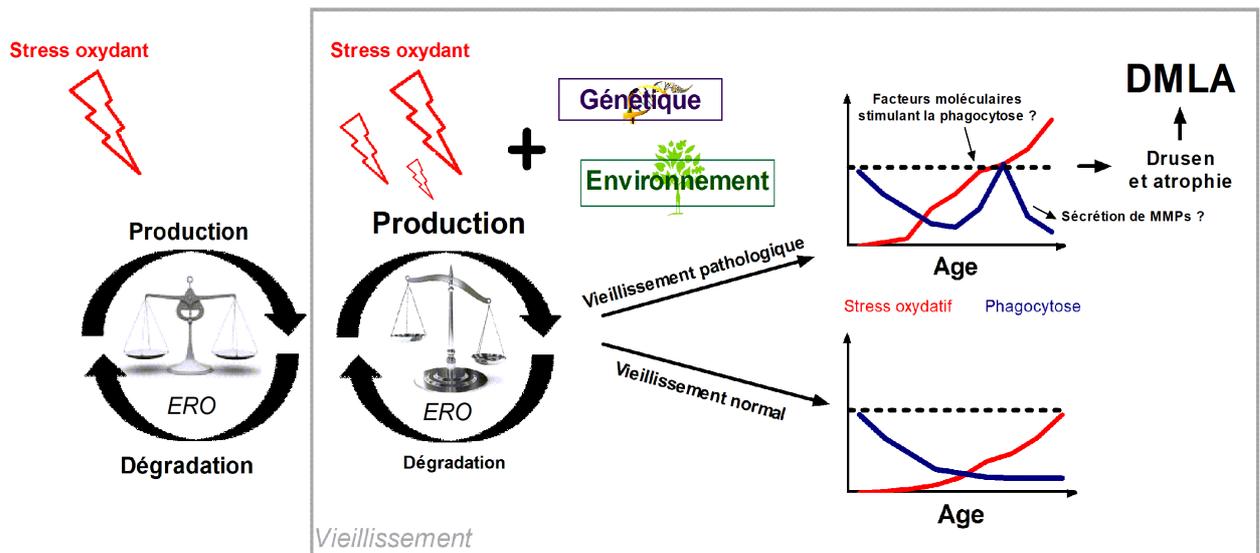


Figure 41 : Hypothèse sur l'interaction entre le stress oxydatif et de la phagocytose et son rôle dans le développement de la DMLA.

B. Impact de la culture prolongée sur la réponse au stress oxydatif

Les cellules ARPE-19 sont couramment utilisées *in vitro* pour modéliser les cellules de l'EPR et étudier les pathologies rétinienne. Cependant, de nombreuses études ont mis en évidence des différences importantes entre ces cellules immortalisées et des cellules de l'EPR natives (Ablonczy et al., 2011 ; Cai and Del Priore, 2006). Malgré une polarisation

cellulaire similaire, les cellules ARPE-19 ne possèdent pas la même morphologie que les cellules de l'EPR humaines et sont peu ou pas pigmentées (Dunn et al., 1998; Kamao et al., 2014; Samuel et al., 2017). De plus, l'épithélium que forme ces cellules ne permet pas l'étude de sa fonction de barrière hémato rétinienne. En effet, les jonctions ZO-1 se développent de façon limitée dans ce modèle cellulaire, aboutissant à une résistance transmembranaire inférieure comparée aux cellules natives de l'EPR (Ablonczy et al., 2011). Des différences au niveau de l'expression génique ont aussi été observées avec 35 gènes retrouvés exclusivement au niveau des cellules humaines de l'EPR (Cai and Del Priore, 2006). Ces différences observées entre cellules ARPE-19 et cellules humaines de l'EPR remettent en question la validité de ce modèle cellulaire, que ce soit pour l'étude des pathologies oculaires *in vitro* ou pour le screening de molécules thérapeutiques (Saenz-de-Viteri et al., 2016 ; Sheu et al., 2015).

Récemment, Samuel and al., ont observé qu'une culture dite à long terme (4 semaines et 4 mois) des cellules ARPE-19 dans un milieu appauvri en sérum (1%) permet d'obtenir un phénotype cellulaire semblable aux cellules de l'EPR, avec une organisation épithéliale et l'apparition de la pigmentation (Samuel et al., 2017). Ces changements ont été associés à des modifications de l'expression de différents gènes essentiels pour le fonctionnement des cellules de l'EPR: *MERTK*, *RPE65* et le gène de la *claudin2* (impliqué dans la perméabilité membranaire).

Dans le but de conforter les résultats obtenus dans l'article I intitulé « hrPE cells derived from induced pluripotent stem cells better recapitulate oxidative stress responses than ARPE-19 cells », nous avons dupliqué les expériences réalisées avec des cellules maintenues en culture pendant 4 semaines au lieu de 7 jours. Les résultats pour les cultures à très long terme (4 mois) sont en cours de réalisation et ne seront pas présentés dans ce manuscrit.

Selon Samuel et al., les cellules ARPE-19 acquièrent une morphologie fibroblastique après 4 jours de culture jusqu'à environ 2 semaines *in vitro*. Au bout de 4 semaines, il y a émergence de groupes de cellules hexagonales organisées en épithélium de façon similaire aux cellules de l'EPR (Samuel et al., 2017). Nous ne sommes pas parvenus à reproduire ces résultats. En effet, après 4 semaines de cultures, les cellules ARPE-19 cultivées dans du milieu à 1% ou 10% de sérum ont conservé leur morphologie fibroblastique, sans

organisation épithéliale (Figure 42). Ces différences peuvent être expliquées par une composition du milieu de culture différent dans notre étude de celui utilisé par Samuel et al.

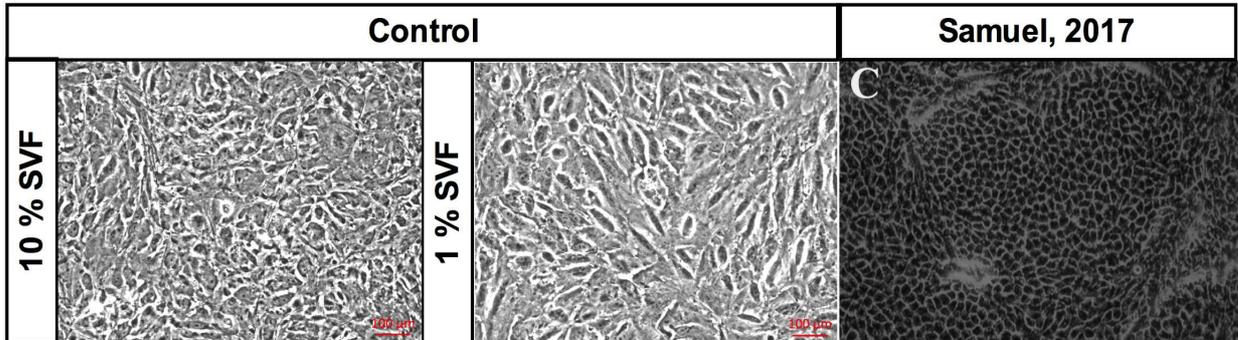


Figure 42 : Morphologie des cellules ARPE-19 par observation en contraste de phase après 4 semaines en culture prolongée dans du milieu à 1% ou 10% de sérum. Comparaison avec les résultats obtenus après 4 semaines de culture des ARPE-19 par Samuel and al., 2017.

Malgré l'absence de différences morphologiques en condition basale, nous avons observé une sensibilité plus importante au stress oxydatif induit par le Fe-NTA des cellules ARPE-19 cultivées en 1% de sérum. En effet, alors qu'à 15 mM de Fe-NTA nous pouvons observer une modification morphologique pouvant traduire un début de souffrance des cellules ARPE-19 en condition 10% de sérum, la survie cellulaire semble être largement atteinte pour les cellules en faible concentration de sérum (Figure 43).

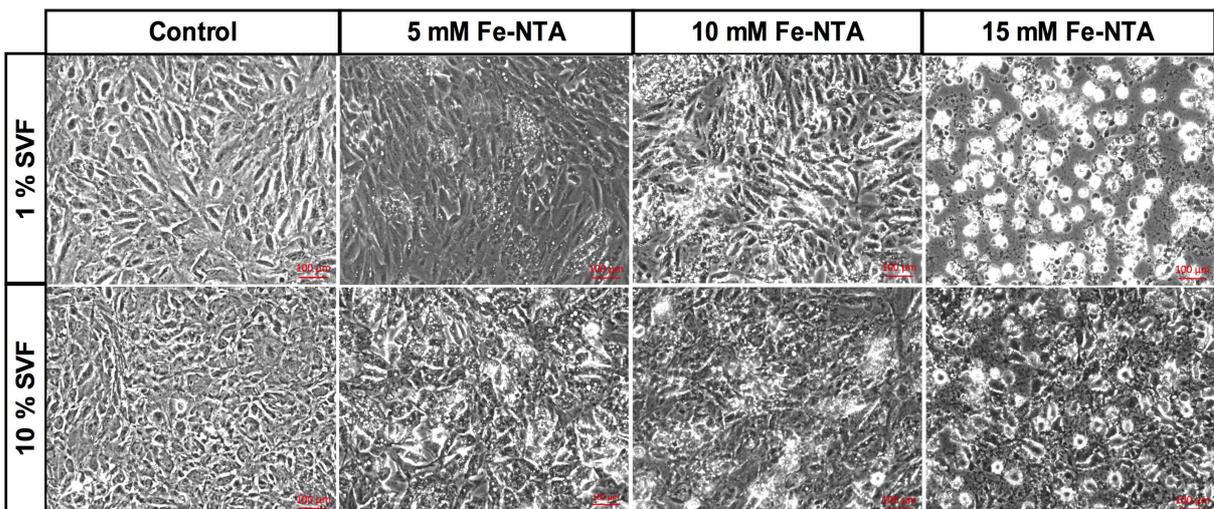


Figure 43 : Morphologie des cellules ARPE-19 par observation en contraste de phase après 4 semaines en culture prolongée dans du milieu à 1 ou 10% de sérum lors de différents traitements au Fe-NTA pendant 24 heures.

Afin de conforter l'observation réalisée en microscopie optique, nous avons quantifié la viabilité cellulaire en condition basale et après 24 heures de traitements au Fe-NTA (Figure 44). La viabilité cellulaire des cellules ARPE-19 en culture prolongée avec 10% de sérum est similaire à celle obtenue dans des conditions de culture classique (Cf. Figure 6 de l'article I « hRPE cells derived from induced pluripotent stem cells better recapitulate oxidative stress responses than ARPE-19 cells »). En effet, aucune mort cellulaire pour cette population de cellule n'est observable avant 20 mM de Fe-NTA ($4,17 \pm 1\%$ de survie cellulaire pour 20 mM de Fe-NTA). Pour les cellules ARPE-19 cultivées en basse concentration de sérum, la viabilité cellulaire diminue de façon dose-dépendante à la concentration de Fe-NTA. Elle est significativement plus faible comparée aux cellules ARPE-19 en condition 10% de sérum, pour des concentrations de 5 mM ($91,98 \pm 8,9\%$ versus $125,93 \pm 22,1\%$) à 15 mM ($62,86 \pm 7,6\%$ versus $114,93 \pm 15,7\%$) de Fe-NTA. La concentration de sérum dans le milieu de culture semble donc impacter la résistance des cellules ARPE-19 au stress oxydatif.

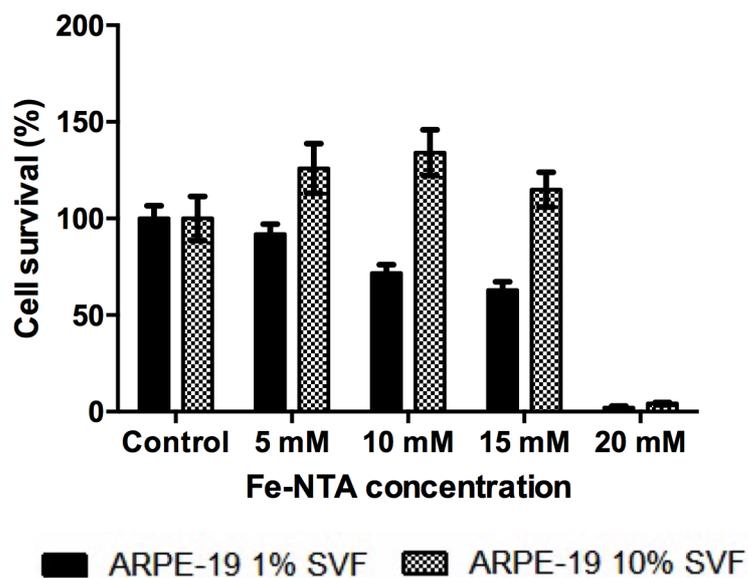


Figure 44 : Viabilité cellulaire des cellules ARPE-19 après 4 semaines en culture prolongée dans du milieu à 1 ou 10% de sérum, en condition contrôle ou lors de traitement au Fe-NTA de 24 heures.

Cette différence de sensibilité au Fe-NTA peut être expliquée par une production de stress oxydatif plus importante au niveau des cellules ARPE19 en condition 1% de sérum. En situation basale, les cellules ARPE-19 cultivées en condition de basse concentration de sérum présentent une production d'ERO 4 fois plus importante que les cellules cultivées avec 10% de sérum (Figure 45). Lors de l'induction d'un stress oxydatif par le Fe-NTA, la

production d'ERO dans les deux augmente de façon dose-dépendante mais sans différence importante entre les deux populations.

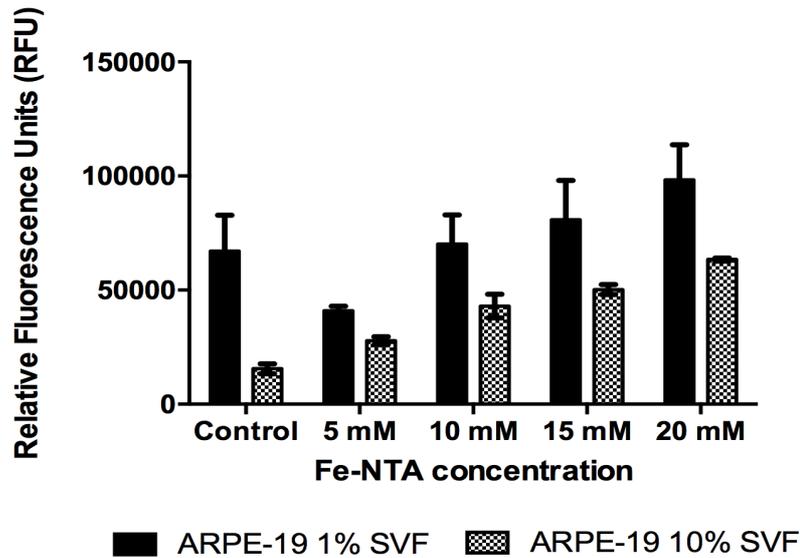


Figure 45 : Production de ERO par les cellules ARPE-19 après 4 semaines en culture prolongée dans du milieu à 1 ou 10% de sérum, en condition contrôle ou lors de traitement au Fe-NTA de 24 heures.

Aux vues de ces résultats préliminaires, nous soutenons l'hypothèse selon laquelle les conditions de culture des cellules ARPE-19 influencent leur phénotype. En effet, même si elles ne forment pas un épithélium similaire aux cellules natives de l'EPR même après 4 semaines *in vitro*, nous avons pu mettre en évidence que ces cellules, lorsqu'elles sont maintenues dans du milieu à 1% de sérum, semblent devenir plus sensibles au stress oxydatif. L'impact de ces conditions de culture sur la fonction des cellules ARPE-19 restent encore à être établis mais il a déjà été mis en évidence qu'après 4 mois de culture, ces cellules expriment différemment plus de 3000 gènes impliqués dans le cycle visuel, la phagocytose, la synthèse de pigment... (Samuel et al., 2017).

Grâce aux améliorations des conditions de culture, il est possible d'obtenir aujourd'hui des cellules ARPE-19 dont le phénotype cellulaire ressemble à celui des cellules natives de l'EPR. Cependant, aucune condition ne permet d'obtenir exactement les mêmes caractéristiques que les cellules de l'EPR fœtales ou adultes. Ainsi, les résultats obtenus avec ce modèle doivent nécessairement être confirmés avec des cellules natives de l'EPR ou dérivées de hCSPi.

***DISCUSSION &
PERSPECTIVES***

Première cause de baisse d'acuité visuelle dans les pays industrialisés comme la France, la DMLA est une pathologie de la rétine touchant principalement les personnes après 60 ans (Gehrs et al., 2006). Cette maladie est caractérisée par deux processus pathologiques : l'atteinte de la macula, région centrale de la rétine, et la formation de drusen entre la membrane de Bruch et les cellules de l'EPR (Bowes Rickman et al., 2013 ; Nivison-Smith et al., 2014).

Il existe deux formes de DMLA : la forme exsudative dite « humide » et la forme atrophique dite « sèche » (Soubrane et al., 2007). La DMLA exsudative est caractérisée par une néo-vascularisation choroïdienne et bénéficie actuellement de traitements visant la destruction des néo-vaisseaux tels que l'injection de molécules anti-VEGF (Rosenfeld et al., 2006). La forme atrophique correspond à 54% des cas cliniques en Europe et se définit par une atrophie géographique intéressant principalement les couches externes de la rétine (cellules de l'EPR et photorécepteurs) (Owen et al., 2012). Cette zone résulte de la dégénérescence des cellules de l'EPR, des photorécepteurs et de la choriocapillaire (Bowes Rickman et al., 2013 ; Nivison-Smith et al., 2014).

La prévalence globale de la DMLA augmentant avec l'âge (Parmeggiani et al., 2012), cette maladie pose de réels problèmes en terme de santé publique au vue de l'accroissement de l'espérance de vie. En effet, à l'heure actuelle, il n'existe aucun traitement pour les patients atteints de la forme atrophique de la maladie (Owen et al., 2012). Actuellement, il n'est pas encore élucidé si ces deux formes, atrophique et exsudative, correspondent à deux atteintes particulières de la même maladie, ou si elles sont deux entités distinctes avec des mécanismes indépendants (De Jong, 2006).

Selon les différentes hypothèses étiopathogéniques (hypothèse inflammatoire, hypothèse oxydative et hypothèse matricielle), le dysfonctionnement des cellules de l'EPR est au centre des événements physiopathologiques de la DMLA (Anderson et al., 2002 ; Datta et al., 2017 ; Glenn et al., 2012). Indispensables à l'homéostasie cellulaire, les cellules de l'EPR ont de nombreux rôles tels que l'apport de nutriment via la choroïde, la protection contre la lumière grâce à leur pigmentation, la phagocytose et le recyclage des SEP (Golestaneh et al., 2017 ; Strauss, 2005). Au cours du vieillissement normal, le stress oxydatif et la glycation des protéines vont aboutir à des modifications structurales et fonctionnelles de la rétine, principalement au niveau des photorécepteurs, de la

membrane de Bruch et des cellules de l'EPR (Bonilha, 2008; Cankova et al., 2011 ; Nivison-Smith et al., 2014). Le dysfonctionnement des cellules de l'EPR, dont la sénescence va être caractérisée entre autres par l'accumulation intracellulaire de lipofuscine (Sparrow et al., 2012), va provoquer des altérations dans les échanges entre photorécepteurs et vaisseaux sanguins (Cankova et al., 2011). Des déchets cellulaires vont alors s'accumuler et former des drusen, favorisant ainsi la mort des photorécepteurs ainsi que la perte de la vision centrale.

Mon travail de thèse consistait en (1) l'obtention et la caractérisation de cellules de l'EPR à partir de cellules somatiques de personnes sans pathologie oculaire et atteintes par la DMLA atrophique (2) la comparaison entre ces deux populations de cellules *in vitro*, en condition basale ou lors de l'induction d'un stress oxydatif, afin de mettre en évidence des différences morphologiques et fonctionnelles.

Cette étude a investigué l'hypothèse oxydative dans la physiopathologie de la DMLA et a eu pour but une meilleure connaissance de la physiopathologie de cette maladie, nécessaire pour le développement de nouvelles thérapeutiques.

Nous avons obtenu 12 lignées de cellules de l'EPR, 6 lignées dérivées de personnes sans pathologie oculaire (appelées lignées contrôles) et 6 autres provenant de personnes atteintes d'une forme atrophique de la DMLA (appelées lignées DMLA). La reprogrammation en hCSPi a été réalisée à partir de cellules sanguines (PBMC) ; à l'exception de 4 échantillons contrôles, où des fibroblastes du derme ont été utilisés. De par leur facilité d'obtention, la majorité des études utilisent aujourd'hui des fibroblastes, des cellules sanguines et même de l'urine pour produire des hCSPi (Afzal et al., 2017; Gerami-Naini et al., 2016; Hubbard et al., 2014).

Nous n'avons observé aucune différence au cours du processus d'obtention des hCSPi entre les cellules contrôles et les cellules issues de patients affectés par la maladie. Même si l'efficacité de la reprogrammation cellulaire est variable entre les individus, elle ne dépend pas de la présence ou non d'une maladie ou de l'âge du donneur (Sánchez-Danés et al., 2012).

Comme il est décrit dans la littérature (Martí et al., 2013), les hCSPi ont été caractérisées par différentes techniques (immunocytochimie, phosphatase alcaline, cytométrie en flux...) sans montrer de différences morphologiques et/ou fonctionnelles entre les deux

types de population (contrôles et DMLA). Cependant, l'analyse caryotypique n'étant pas finalisée, nous ne pouvons déterminer s'il y a eu présence ou non de modifications génétiques lors de l'utilisation de ces cellules. En effet, il a été établi que le maintien prolongé des hCSPi en culture aboutit à la formation d'anomalies génétiques (Martí et al., 2013). Afin de garantir l'intégrité chromosomique, les cellules hCSPi ont été différenciées en cellules de l'EPR avant d'atteindre le passage 10 (Brandl et al., 2014).

L'origine des cellules (contrôle ou DMLA) n'a pas non plus eu d'impact sur le protocole de différenciation des cellules hCSPi en cellules de l'EPR. Toutes les lignées que nous avons obtenues possèdent les mêmes caractéristiques que les cellules natives de l'EPR (Brandl et al., 2014; Nazari et al., 2015; Parvini et al., 2014). D'un point de vue morphologique, les 12 lignées de hCSPi-EPR forment un épithélium serré et pigmenté constitué de cellules hexagonales. Par l'analyse en microscopie électronique, nous avons observé la présence de microvili au niveau apical, confirmant que les cellules sont polarisées. Grâce aux techniques d'immunocytochimie et de cytométrie en flux, nous avons aussi mis en évidence au niveau de ces hCSPi-EPR la présence de marqueurs spécifiques des cellules de l'EPR tels que Pax6, la tyrosinase, la bestrophine-1 et ZO-1 ; ainsi que l'absence de facteur de pluripotence. Les hCSPi-EPR sont par ailleurs fonctionnelles et capables de phagocytose, rôle central de ces cellules.

Afin d'obtenir une caractérisation complète des cellules hCSPi-EPR, d'autres analyses doivent être effectuées. Ainsi, les résultats d'immunocytochimie et de cytométrie en flux doivent être confortés via la quantification par RT-qPCR (reverse transcription – réaction en chaîne par polymérase quantitative) de l'expression de certains gènes caractéristiques des cellules de l'EPR tels que RPE65 et MERTK (Brandl et al., 2014; Nazari et al., 2015). De plus, la mesure de la résistance transmembranaire ainsi que le dosage des cytokines et/ou facteurs de croissance manquent pour valider le caractère polarisé des cellules hCSPi-EPR obtenues (Kamao et al., 2014).

En condition basale, nous avons pu observer que les cellules hCSPi-EPR contrôle et DMLA présentent une activité β -Galactosidase, reflétant le caractère sénescence de ces cellules. Les processus impliqués dans le développement de la DMLA sont les mêmes que ceux du vieillissement normal mais en accélérés. La question est donc de se demander quels facteurs provoquent cette accélération pathologique (Sharma et al., 2014). Contrairement aux cellules ARPE-19, les cellules de l'EPR dérivées de hCSPi provenant de

sujets âgés permettent de prendre en considération l'impact de l'âge sur le métabolisme cellulaire, atout primordial pour l'étude de la DMLA *in vitro*.

Aujourd'hui, nous ne savons pas si la sénescence observée chez les hCSPi-EPR est due aux conditions de culture prolongées que nécessitent ces cellules ou à l'âge avancé des donneurs. Il serait donc intéressant d'observer l'activité β -Galactosidase au niveau de cellules hCSPi-EPR dérivées de personnes jeunes dans les mêmes conditions de culture. En effet, ces résultats pourraient être pris en compte pour la mise en place de la thérapie cellulaire dans la DMLA. Nous savons que le vieillissement est associé à des changements morphologiques et fonctionnels (Bonilha, 2008). Le bénéfice d'une transplantation de cellules de l'EPR au niveau d'un patient atteint de la DMLA pourrait donc être augmenté dans le cas d'une transplantation hétérologue de cellules fonctionnelles et non sénescents, comparé à une transplantation autologue de hCSPi-EPR dérivées de cellules somatiques âgées.

Le stress oxydatif a un rôle central dans le vieillissement ainsi que dans la DMLA (Datta et al., 2017 ; Jarrett and Boulton, 2012). Ainsi, nous nous sommes particulièrement intéressés aux changements morphologiques et fonctionnels des cellules de l'EPR induits par un micro-environnement pro-oxydant. Dans nos travaux, nous avons choisi d'induire une accumulation intracellulaire de fer, responsable de la production d'ERO via la réaction de Fenton (Chen et al., 2009). Cet élément a une place importante dans le métabolisme normal mais aussi dans le développement de la DMLA. En effet, il a été observé que le fer s'accumule au niveau des cellules de l'EPR de la zone maculaire, particulièrement chez les patients atteints de la DMLA (Chen et al., 2009 ; Dentchev et al., 2005). De ce fait, plusieurs études se sont basées sur l'utilisation du fer pour mimer le micro-environnement oxydatif de cette maladie (Chen et al., 2009 ; Karlsson and Kurz, 2016 ; Song et al., 2016). Song et al., ont même généré un modèle murin présentant les principales caractéristiques histologiques de la DMLA (un épaississement de la membrane de Bruch associé à des dépôts de protéines et une hypertrophie des cellules de l'EPR) par injection intraveineuse hebdomadaire de fer (Song et al., 2016). Cette dérégulation de l'homéostasie ferrique est aussi accompagnée d'une dégénération rétinienne au niveau d'un autre modèle murin de la DMLA, le rat RCS (Jeanny et al., 2013).

Dans notre étude, nous avons donc traité les cellules pendant 24 heures à différentes concentrations de Fe-NTA. Dans la pathophysiologie de la DMLA, le stress oxydatif est

qualifié de chronique (Rabin et al., 2013). De ce fait, on peut considérer que des traitements répétés sur une longue durée aurait été préférable à un traitement unique sur 24 heures. Ainsi, malgré la mise en évidence dans notre projet de différences significatives entre les hCSPi-EPR contrôle et DMLA lors d'un simple traitement sur 24 heures, il serait intéressant de conforter ces résultats avec l'analyse de plusieurs traitements réalisés sur une durée plus longue. En effet, il a été mis en évidence qu'un stress oxydatif, s'il est aigu ou chronique, peut influencer différemment le métabolisme cellulaire des cellules de l'EPR. Ainsi, alors que l'autophagie est augmentée lors d'un stress oxydant induit pendant 3 à 24 heures, cette fonction cellulaire est inhibée après 14 jours en milieu pro-oxydant (Mitter et al., 2014). De plus, l'analyse de la fonctionnalité des cellules de l'EPR lors d'un stress chronique pourrait mettre en lumière des différences non observées, car trop faibles, lors d'un stress court entre les deux populations de cellules contrôle et DMLA.

Lors de l'accumulation intracellulaire de fer, nous avons observé un phénotype particulier des cellules hCSPi-EPR DMLA. Alors qu'en condition basale, le taux de stress oxydatif est similaire entre les deux populations, les cellules dérivées de patients affectés par la DMLA sont responsables, dans des conditions d'environnement pro-oxydant, d'une production d'ERO plus importante que les hCSPi-EPR contrôle. Deux hypothèses peuvent expliquer cette surproduction d'ERO par les cellules hCSPi-EPR DMLA : (i) avec le vieillissement, les cellules de l'EPR produisent plus d'ERO et perdent en parallèle leur capacité antioxydante (Jarrett and Boulton, 2012; Praticò, 2002). Il est donc possible que ces systèmes de protection au niveau des cellules issues de patients DMLA soient davantage altérés. En effet, la protection contre le stress oxydatif a un rôle majeur dans le développement de la maladie. Ainsi, les souris déficientes pour la superoxyde dismutase 1 ou 2 vont présenter un phénotype spécifique de la DMLA. (Jarrett and Boulton, 2012). Récemment, un nouveau modèle murin de la DMLA a été mis en évidence possédant une mutation ou niveau du gène *Nrf2* (nuclear factor erythroid 2-related factor), codant pour un facteur de transcription nécessaire à l'expression de nombreuses enzymes antioxydantes (Jarrett and Boulton, 2012). Ces animaux présentent des drusen, des accumulations de lipofuscine et de protéines inflammatoires ainsi qu'une dégénérescence progressive de la rétine (Vu and Hulleman, 2017). Pour analyser l'efficacité des systèmes antioxydants au niveau des hCSPi-EPR contrôle et DMLA, nous devons quantifier par RT-qPCR l'expression des gènes des enzymes responsables de la dégradation des ERO telles que la superoxyde dismutase ou la glutathion peroxydase (Balaban et al., 2005). (ii) La

seconde hypothèse suppose que cette surproduction d'ERO est la conséquence d'anomalies structurales et fonctionnelles des mitochondries qui seraient présentes de façon prépondérante chez les sujets DMLA. Cette théorie repose sur l'observation en microscopie électronique d'une organisation cellulaire différente au niveau de cellules de l'EPR post-mortem issues de sujets atteints par la DMLA (Golestaneh et al., 2017). Cette étude a mis en évidence une accumulation plus importante de mitochondries altérées, de lipides et d'autophagosomes au niveau de cellules de l'EPR DMLA en comparaison avec des cellules provenant de sujets sains. De plus une seconde étude a montré que l'ADN mitochondrial présente des lésions plus importantes au niveau de cellules issues de patients DMLA (Karunadharma et al., 2010 ; Terluk et al., 2015). L'âge est donc associé à des altérations fonctionnelles et morphologiques des mitochondries, organites retrouvés de façon abondante au niveau des cellules de l'EPR (Lefevre et al., 2017). Or, les mitochondries sont responsables en condition physiologique de 90% des ERO produits (Balaban et al., 2005). Un dysfonctionnement du système mitochondrial peut donc aboutir à une surproduction de stress oxydatif. Il est intéressant de noter que, malgré une altération constitutive des mitochondries avec l'âge, toute personne âgée ne développe pas une DMLA (Lefevre et al., 2017). En effet, cette pathologie est aussi associée à des facteurs de risques génétiques et environnementaux pouvant avoir un rôle dans la production de stress oxydatif tel que la mutation dans le gène ARMS2 codant pour une protéine mitochondriale (Kanda et al., 2007). La mitochondrie, par son dysfonctionnement, semble donc être particulièrement impliquée dans la physiopathologie de la DMLA.

L'excès d'ERO va être responsable de modifications au niveau des protéines, lipides et de l'ADN ; aboutissant à la mort cellulaire (Jarrett and Boulton, 2012). Ainsi, dans notre étude, nous avons montré que les hCSPI-EPR DMLA, puisqu'elles produisent plus d'ERO, sont plus sensibles au stress oxydatif comparés aux cellules contrôle. En effet, la viabilité cellulaire des cellules DMLA était significativement moins importante pour des doses faibles de Fe-NTA comparés aux cellules contrôle.

L'apport alimentaire de composés antioxydants est actuellement utilisé en prévention et pour le traitement de la DMLA (Carneiro and Andrade, 2017). Dans notre étude, il serait intéressant de rétablir la viabilité cellulaire des cellules hCSPI-EPR DMLA en milieu pro-oxydant à un niveau similaire à celles de cellules contrôle. Deux voies mécanistiques

peuvent alors être envisagées : la réduction de la production d'ERO ou l'augmentation de leur dégradation par les systèmes antioxydants. De plus, l'utilisation de composés thérapeutiques déjà établis comme étant actifs au niveau des cellules de l'EPR permettrait de confirmer l'utilité de ce modèle cellulaire pour le screening thérapeutique. En parallèle, nous pourrions observer si le bénéfice apporté par ces molécules antioxydantes est similaire entre les hCSPi-EPR contrôles et DMLA. Actuellement, de nombreuses molécules utilisées dans le traitement de la DMLA exsudative (bevacizumab, ranibizumab et etafilibercept), ont été testées sur des modèles cellulaires telles que les cellules ARPE-19 (Saenz-de-Viteri et al., 2016 ; Sheu et al., 2015). Lors de l'accumulation intracellulaire de fer, nous avons observé des différences importantes au niveau de la survie des cellules hCSPi-EPR et des cellules ARPE-19. En effet, les cellules ARPE-19 ont montré une viabilité cellulaire intacte à des doses où elle était significativement altérée pour les hCSPi-EPR. De par cette sensibilité plus importante au stress oxydatif et afin de déterminer la concentration minimale nécessaire, il serait plus approprié d'utiliser les cellules hCSPi-EPR comme modèle cellulaire pour le test des composés pharmaceutiques lors des études pré-cliniques en remplacement des cellules ARPE-19.

Avec l'âge, la production d'ERO est un évènement central dans la physiopathologie de la DMLA. Il est responsable de dérégulation importante des fonctions principales des cellules de l'EPR (Wang et al., 2009). Ainsi, la lipofuscine produite par le stress oxydatif, va induire un dysfonctionnement de la phagocytose des cellules de l'EPR (Li, 2013). Or, la dégradation des SEP par autophagie via la phagocytose est cruciale pour la fonction visuelle. Certaines hypothèses supposent donc que la diminution de la phagocytose est impliquée dans le développement de la DMLA et particulièrement dans la formation des drusen (Tian et al., 2017). En effet, l'altération de cette fonction aboutit à une accumulation de SEP, une dégénérescence de la rétine et à la cécité au niveau de différents modèle animaux et humains de la DMLA (Li, 2013). Ainsi, il a été montré au niveau de rats âgés, que la phagocytose des SEP, est réduite de 80% (Tian et al., 2017). Ce vieillissement de la rétine chez l'animal est aussi associé à une accumulation de fer au niveau des cellules de l'EPR (Li, 2013). Il a, par ailleurs, été confirmé *in vitro* que le stress oxydatif induit par l'accumulation intracellulaire de fer au niveau de cellules ARPE-19 est responsable d'une diminution de l'activité lysosomale et de la phagocytose (Chen et al., 2009).

Dans notre étude, nous avons conforté ces résultats par l'étude de cette fonction au niveau de notre modèle cellulaire, les hCSPi-EPR. Alors que la phagocytose des cellules hCSPi-EPR contrôle a été inhibée après un traitement de 24 heures à 15 mM de Fe-NTA, l'altération de la phagocytose des cellules de l'EPR DMLA a été observée sans l'induction d'un stress oxydant. Ainsi, en condition basale, le taux de billes phagocytées a été significativement plus bas au niveau des cellules hCSPi-EPR DMLA comparés aux cellules contrôle. Lors des différents traitements, l'inhibition de la phagocytose n'a pas pu être observée chez les cellules DMLA, ceci s'expliquant par une activité déjà très faible en condition basale. Ces observations confirment le rôle prépondérant de la phagocytose dans le développement de la DMLA et supposent que cette fonction soit particulièrement endommagée au niveau des cellules de l'EPR des patients atteints par cette maladie. La réduction de la phagocytose n'a pas seulement un impact sur l'homéostasie cellulaire, mais affecte la survie des cellules de l'EPR et des photorécepteurs (Li, 2013).

Dans nos travaux, la phagocytose a été analysée après 3 heures d'incubation avec des billes de polystyrène. Il a été établi que suivant les lignées cellulaires, la vitesse de phagocytose est différente (Mazzoni et al., 2014). Ainsi, les cellules ARPE-19 vont lier les SEP en 1 à 2 heures et les internaliser en 4 à 6 heures (Lakkaraju et al., 2007). Pour les cellules hCSPi-EPR, les études montrent un temps de phagocytose semblable aux cellules immortalisées mais une efficacité de phagocytose plus basse (Mao and Finnemann, 2013; Mazzoni et al., 2014). En effet, nous avons pu observer un pourcentage de cellules ayant phagocyté moitié moins important au niveau des cellules hCSPi-EPR comparées aux cellules ARPE-19 après 3h d'incubation. Comme les cellules de l'EPR phagocytent selon un rythme circadien (Kevany and Palczewski, 2010), les résultats obtenus doivent être confirmés par une analyse de la phagocytose après un temps d'incubation supérieur à 3h. De plus, il est important de noter que dans nos travaux, l'analyse de la phagocytose a été réalisée via l'utilisation de billes de polystyrène et non à des SEP humains, bovins ou porcins (Chen et al., 2009). Au niveau des rat RCS, alors que la phagocytose des SEP est abolie, les cellules de l'EPR restent capables d'internaliser des billes de latex (Mazzoni et al., 2014). Il est donc possible que ces billes soient internalisées par des mécanismes différents de ceux des SEP. En effet, les cellules de l'EPR peuvent phagocyter de façon non spécifique (Strauss, 2005). La duplication de ces résultats avec des SEP d'origine humaine ou animale, ainsi que l'étude mécanistique de la phagocytose est donc nécessaire. Ainsi, il serait intéressant de quantifier le taux intracellulaire d'AMPc, modulateur de la

phagocytose en aval du signal $\text{InsP3}/\text{Ca}^{2+}$ (Kevany and Palczewski, 2010). Le taux d'AMPc peut être influencé par différentes protéines telles que *Klotho*, connue pour réguler la réponse au stress oxydatif au niveau des cellules de l'EPR (Choudhary et al., 2016). Il s'avère que les souris déficientes pour le gène *Klotho* présentent une dégénérescence des photorécepteurs, une réduction de la synthèse de mélanine et une dérégulation de la phagocytose des SEP (Kokkinaki et al., 2013). L'expression de cette protéine pourrait donc être différente chez les cellules de l'EPR DMLA comparés aux cellules contrôle.

La phagocytose est généralement associée au processus d'autophagie (Bosch et al., 1993 ; Chen et al., 2009). Une fois les SEP internalisés et après maturation du phagosome, ils sont dégradés par le système lysosomal (Kevany and Palczewski, 2010). La cathepsine D étant l'enzyme principale de ce système (Benes et al., 2008), nous avons quantifié la présence de cette protéine dans les deux populations de cellules. L'accumulation intracellulaire de fer au niveau de cellules ARPE-19 a été montrée comme responsable d'une augmentation de la forme immature de la Cathepsine D sans variation de la forme mature (Chen et al., 2009). Nous avons observé la même cinétique au niveau des hCSPi-EPR contrôle et DMLA. Cependant, pour de faibles concentrations de Fe-NTA, l'augmentation de forme immature de la cathepsine D est minime chez les cellules DMLA comparée aux cellules contrôle. Chen et al., ont suggéré que l'accumulation intracellulaire de fer pourrait aboutir à l'inhibition de la cathepsine B, responsable de la maturation de la cathepsine D (Chen et al., 2009), expliquant l'augmentation uniquement de la forme immature lors de notre traitement.

Dans notre étude, nous n'avons pas déterminé l'impact du stress oxydatif sur l'activité de la cathepsine D. En condition physiologique, le stress oxydant va induire une augmentation de l'activité autophagique dans le but de dégrader les constituants cellulaires endommagés (Mitter et al., 2014). Or, lors d'une étude sur le modèle des cellules ARPE-19, il a été montré que l'accumulation intracellulaire de fer réduit l'activité de cette enzyme (Chen et al., 2009). De plus, une dysrégulation de l'autophagie a aussi été observée au niveau de culture post-mortem de cellules de l'EPR DMLA (Golestaneh et al., 2017). Dans cette étude, il a été mis en évidence que le flux autophagique est altéré au niveau des cellules de l'EPR DMLA, et que ce dysfonctionnement est associé à une morphologie anormale des lysosomes. Ces modifications structurales et fonctionnelles des lysosomes peuvent être dûes à une accumulation de SEP non digérés. En effet, le stress

oxydatif induit par le vieillissement cellulaire va aboutir à la peroxydation lipidique de certaines constituantes des SEP et responsable de la production d'aldéhydes comme le 4-hydroxynonanal ou le malondialdéhyde, empêchant leurs dégradations par le système lysosomal (Krohne et al., 2010b). L'accumulation intralysosomale de ces produits a aussi été impliquée dans la production de lipofuscine, un constituant cellulaire qui s'accumule normalement avec le vieillissement. Longtemps considéré comme un simple marqueur du vieillissement, la lipofuscine est en réalité un composé cytotoxique pour les cellules post-mitotiques, telles que les neurones ou les cellules de l'EPR, qui sont incapables de réduire son accumulation grâce à la division cellulaire. Certaines études suggèrent qu'il existe une limite de tolérance pour l'accumulation de ce composé, spécifique à chaque type cellulaire. Ainsi, lorsque la lipofuscine est présente de façon trop importante, elle est responsable d'une diminution des fonctions des cellules de l'EPR et ainsi aboutit au développement de la DMLA (Sundelin et al., 1998). Une des hypothèses expliquant la cytotoxicité de la lipofuscine est son rôle dans la production d'ERO via la réaction de Fenton (Höhn and Grune, 2013). En effet, elle est capable d'incorporer le fer, oligo-élément abondamment accumulé au niveau des cellules de l'EPR des patients atteints par la DMLA, et ainsi de produire des radicaux libres (Chen et al., 2009; Dentchev et al., 2005). De plus, la lipofuscine est responsable d'une inhibition du protéasome par compétition avec les protéines oxydées (Höhn and Grune, 2013). L'activité de ce système est aussi réduite lors du vieillissement ou d'un stress oxydatif (Song et al., 2017). Avec l'autophagie, le système du protéasome constitue une des voies principales impliquées dans la dégradation des constituants cellulaires (Mitter et al., 2014). Ce système est impliqué dans la dégradation sélective des protéines à courtes vies anormales ou trouvées de façon excessive (Puyal et al., 2008). Ainsi, même si la pathogénèse de la DMLA reste aujourd'hui mal comprise, de nombreuses évidences supportent l'implication du stress oxydatif et d'un dysfonctionnement des systèmes de dégradations protéiques (Golestaneh et al., 2017 ; Kaarniranta et al., 2016 ; Mitter et al., 2014 ; Song et al., 2017). Ainsi, il semble qu'un dysfonctionnement du système lysosomal soit d'ailleurs impliqué dans la formation des drusen (Song et al., 2017). En effet, bien que l'origine des drusen reste discutée, ils sont, entre autres, la conséquence d'une dégradation incomplète de débris cellulaires. Une analyse approfondie des différents systèmes de dégradation protéique est essentielle pour une meilleure compréhension des mécanismes physiopathologiques de la DMLA. Les

processus impliqués dans le développement de la DMLA semblent être les mêmes que ceux du vieillissement normal mais en accélérés (Figure 46).

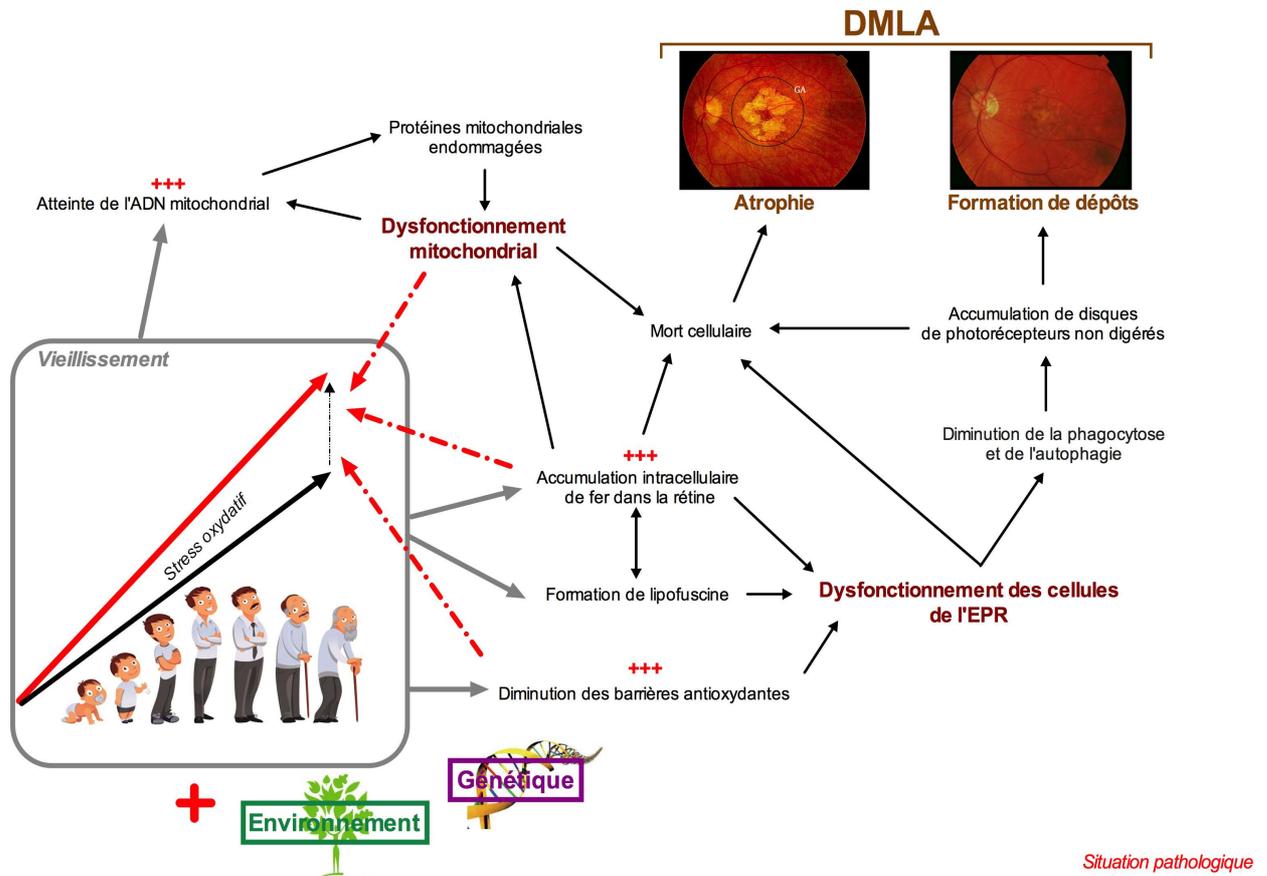


Figure 46 : Récapitulatif des différentes hypothèses expliquant l'étiologie de la DMLA.

Dans ce travail de thèse, nous avons développé un modèle cellulaire utile pour la compréhension de la DMLA. En effet, l'étude du dysfonctionnement des cellules de l'EPR en milieu pro-oxydant est essentielle pour la mise en évidence de nouvelles cibles thérapeutiques. Cependant, l'inconvénient de l'utilisation des hCSPi-EPR pour la modélisation *in vitro* et le screening thérapeutique est l'absence d'information sur l'impact visuel (Singh et al., 2015). Ainsi, la suite de ce projet est la validation de la fonctionnalité de ces cellules grâce à la transplantation sous-rétinienne des cellules hCSPi-EPR dans un modèle murin de la DMLA, le rat RCS (Kamao et al., 2014). Pour rappel, le rat RCS est caractérisé par une dégénérescence des photorécepteurs dès le 12^{ème} jour post natal, aboutissant à un cécité totale au 77^{ème} jour après la naissance (Pardue et al., 2005). Il a déjà été mis en évidence par différentes études que la transplantation de cellules de l'EPR dérivées de cellules souches permet une amélioration de l'acuité visuelle chez le rat, la souris, le lapin ou le porc (Bracha et al., 2017 ; Coffey et al., 2002 ; Lund et al., 2006 ;

Thomas et al., 2016). Ainsi, nous focaliserons nos analyses sur la survie des hCSPi-EPR contrôle et DMLA ainsi que celle des photorécepteurs au niveau des rats RCS transplantés. Dans un premier temps, nous conforterons l'effet bénéfique de la transplantation de ces cellules sur l'acuité visuelle. Ensuite, nous chercherons à mettre en évidence des différences au point de vue morphologique, intégratif et fonctionnel entre la transplantation de cellules hCSPi-EPR contrôle et celle de cellules dérivées de patients atteints par la DMLA.

Aujourd'hui les thérapies cellulaires dans les dystrophies rétiniennes se basent sur le remplacement des photorécepteurs (par des cellules précurseurs de la rétine) ou des cellules de l'EPR pour maintenir la fonction visuelle chez le patient (Nazari, 2015). En effet, la réparation des cellules de l'EPR dans le but de traiter les dégénérescences rétiniennes est un réel espoir thérapeutique (Salero et al., 2012). Depuis 2012 et la première transplantation de cellules de l'EPR dérivées de hCSE, les essais cliniques visant le remplacement des cellules de l'EPR déficientes se multiplient (Bracha et al., 2017). Dans le cas de la DMLA, la première étude clinique utilisant les cellules hCSPi-EPR a été réalisée en 2014 par une transplantation autologue chez une patiente atteinte de la DMLA exsudative. Aucune amélioration de l'acuité visuelle n'a été observée un an après la transplantation, malgré une intégration des cellules transplantées (Mandai et al., 2017). Si les cellules hCSPi-EPR utilisées pour cette transplantation ont conservé, telle que nous l'avons mis en évidence dans notre étude, un phénotype-malade particulier ; cela pourrait expliquer l'absence d'effet bénéfique sur l'acuité visuelle. Même si ces observations doivent être confortées par des études plus approfondies, les résultats obtenus par l'analyse *in vitro* de cellules hCSPi-EPR contrôles et DMLA questionnent sur l'avantage que pourrait apporter la transplantation hétérologue de cellules de l'EPR dérivées de personnes jeunes sans phénotype pathologique.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

- Aasen, T., Raya, A., Barrero, M.J., Garreta, E., Consiglio, A., Gonzalez, F., Vassena, R., Bilić, J., Pekarik, V., Tiscornia, G., et al. (2008). Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes. *Nat. Biotechnol.* *26*, 1276–1284.
- Ablonczy, Z., Dahrouj, M., Tang, P.H., Liu, Y., Sambamurti, K., Marmorstein, A.D., and Crosson, C.E. (2011). Human Retinal Pigment Epithelium Cells as Functional Models for the RPE In Vivo. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* *52*, 8614–8620.
- Ach, T., Tolstik, E., Messinger, J.D., Zarubina, A.V., Heintzmann, R., and Curcio, C.A. (2015). Lipofuscin Redistribution and Loss Accompanied by Cytoskeletal Stress in Retinal Pigment Epithelium of Eyes With Age-Related Macular Degeneration. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* *56*, 3242–3252.
- Adachi, K., Takahashi, S., Yamauchi, K., Mounai, N., Tanabu, R., and Nakazawa, M. (2016). Optical Coherence Tomography of Retinal Degeneration in Royal College of Surgeons Rats and Its Correlation with Morphology and Electroretinography. *PLoS ONE*, *11*(9): e0162835.
- Adijanto, J., and Philp, N.J. (2014). Cultured Primary Human fetal Retinal Pigment Epithelium (hfRPE) as a model for evaluating RPE metabolism. *Exp. Eye Res.* *126*, 77–84.
- Afzal, M.Z., Gartz, M., Klyachko, E.A., Khan, S.S., Shah, S.J., Gupta, S., Shapiro, A.D., Vaughan, D.E., and Strande, J.L. (2017). Generation of human iPSCs from urine derived cells of a non-affected control subject. *Stem Cell Res.* *18*, 33–36.
- Aisen, P., Enns, C., and Wessling-Resnick, M. (2001). Chemistry and biology of eukaryotic iron metabolism. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *33*, 940–959.
- Amabile, G., and Meissner, A. (2009). Induced pluripotent stem cells: current progress and potential for regenerative medicine. *Trends Mol. Med.* *15*, 59–68.
- 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.
- Anderson, D.H., Mullins, R.F., Hageman, G.S., and Johnson, L.V. (2002). A role for local inflammation in the formation of drusen in the aging eye. *Am. J. Ophthalmol.* *134*, 411–431.
- Arbore, G., Kemper, C., and Kolev, M. (2017). Intracellular complement - the complosome - in immune cell regulation. *Mol. Immunol.* *89*, 2-9.
- AREDS 1 report n°8 (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. Chic. Ill 1960* *119*, 1417–1436.
- AREDS 2 (2013). Lutein + zeaxanthin and omega-3 fatty acids for age-related macular

degeneration: The age-related eye disease study 2 (areds2) randomized clinical trial. *JAMA* 309, 2005–2015.

AREDS rapport n° 3, A.-R.E.D.S.R. (2000). Risk factors associated with age-related macular degeneration: a case-control study in the age-related eye disease study: age-related eye disease study report number 3. *Ophthalmology* 107, 2224–2232.

AREDS rapport n°19 (2005). Risk Factors for the Incidence of Advanced Age-Related Macular Degeneration in the Age-Related Eye Disease Study (AREDS) AREDS Report No. 19. *Ophthalmology* 112, 533–539.

Augood, C.A., Vingerling, J.R., de Jong, P.T., Chakravarthy, U., Seland, J., Soubrane, G., Tomazzoli, L., Topouzis, F., Bentham, G., Rahu, M., et al. (2006). Prevalence of age-related maculopathy in older Europeans: the European Eye Study (EUREYE). *Arch. Ophthalmol.* 124, 529–535.

Avilion, A.A., Nicolis, S.K., Pevny, L.H., Perez, L., Vivian, N., and Lovell-Badge, R. (2003). Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes Dev.* 17, 126–140.

Awai, M., Narasaki, M., Yamanoi, Y., and Seno, S. (1979). Induction of diabetes in animals by parenteral administration of ferric nitrilotriacetate. A model of experimental hemochromatosis. *Am. J. Pathol.* 95, 663–673.

Awh, C.C., Lane, A.-M., Hawken, S., Zanke, B., and Kim, I.K. (2013). CFH and ARMS2 Genetic Polymorphisms Predict Response to Antioxidants and Zinc in Patients with Age-related Macular Degeneration. *Ophthalmology* 120, 2317–2323.

Balaban, R.S., Nemoto, S., and Finkel, T. (2005). Mitochondria, Oxidants, and Aging. *Cell* 120, 483–495.

Ballabh, P., Braun, A., and Nedergaard, M. (2004). The blood-brain barrier: an overview: structure, regulation, and clinical implications. *Neurobiol. Dis.* 16, 1–13.

Baraibar, M.A., Ladouce, R., and Friguet, B. (2013). Proteomic quantification and identification of carbonylated proteins upon oxidative stress and during cellular aging. *J. Proteomics* 92, 63–70.

Beattie, J.R., Pawlak, A.M., Boulton, M.E., Zhang, J., Monnier, V.M., McGarvey, J.J., and Stitt, A.W. (2010). Multiplex analysis of age-related protein and lipid modifications in human Bruch's membrane. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 24, 4816–4824.

Beatty, S., Koh, H., Phil, M., Henson, D., and Boulton, M. (2000). The role of oxidative stress in the pathogenesis of age-related macular degeneration. *Surv. Ophthalmol.* 45, 115–134.

Beccari, L., Conte, I., Cisneros, E., and Bovolenta, P. (2012). Sox2-mediated differential

activation of Six3.2 contributes to forebrain patterning. *Dev. Camb. Engl.* *139*, 151–164.

Benes, P., Vetvicka, V., and Fusek, M. (2008). Cathepsin d – many functions of one aspartic protease. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* *68*, 12–28.

Bertolotti, E., Neri, A., Camparini, M., Macaluso, C., and Marigo, V. (2014). Stem cells as source for retinal pigment epithelium transplantation. *Prog. Retin. Eye Res.* *42*, 130–144.

Bianchi, E., Scarinci, F., Ripandelli, G., Feher, J., Pacella, E., Magliulo, G., Gabrieli, C.B., Plateroti, R., Plateroti, P., Mignini, F., et al. (2013). Retinal pigment epithelium, age-related macular degeneration and neurotrophic keratouveitis. *Int. J. Mol. Med.* *31*, 232–242.

Bingol, B., and Sheng, M. (2016). Mechanisms of mitophagy: PINK1, Parkin, USP30 and beyond. *Free Radic. Biol. Med.* *100*, 210–222.

Björnsson, Ó.M., Syrdalen, P., Bird, A.C., Peto, T., and Kinge, B. (2006). The prevalence of age-related maculopathy (ARM) in an urban Norwegian population: the Oslo Macular Study. *Acta Ophthalmol. Scand.* *84*, 636–641.

Bobu, C., and Hicks, D. (2009). Regulation of Retinal Photoreceptor Phagocytosis in a Diurnal Mammal by Circadian Clocks and Ambient Lighting. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* *50*, 3495–3502.

Bonilha, V.L. (2008). Age and disease-related structural changes in the retinal pigment epithelium. *Clin. Ophthalmol. Auckl. NZ* *2*, 413–424.

Bosch, E., Horwitz, J., and Bok, D. (1993). Phagocytosis of outer segments by retinal pigment epithelium: phagosome-lysosome interaction. *J. Histochem. Cytochem.* *41*, 253–263.

Bowes Rickman, C., Farsiu, S., Toth, C.A., and Klingeborn, M. (2013). Dry Age-Related Macular Degeneration: Mechanisms, Therapeutic Targets, and Imaging. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* *54*, ORSF68-ORSF80.

Boyer, L.A., Lee, T.I., Cole, M.F., Johnstone, S.E., Levine, S.S., Zucker, J.P., Guenther, M.G., Kumar, R.M., Murray, H.L., Jenner, R.G., et al. (2005). Core Transcriptional Regulatory Circuitry in Human Embryonic Stem Cells. *Cell* *122*, 947–956.

Bracha, P., Moore, N.A., and Ciulla, T.A. (2017). Induced pluripotent stem cell-based therapy for age-related macular degeneration. *Expert Opin. Biol. Ther.* *17*(9):1113-1126.

Brandl, C., Zimmermann, S.J., Milenkovic, V.M., Rosendahl, S.M.G., Grassmann, F., Milenkovic, A., Hehr, U., Federlin, M., Wetzel, C.H., Helbig, H., et al. (2014). In-Depth Characterisation of Retinal Pigment Epithelium (RPE) Cells Derived from Human Induced Pluripotent Stem Cells (hiPSC). *NeuroMolecular Med.* *16*, 551–564.

Buchholz, D.E., Hikita, S.T., Rowland, T.J., Friedrich, A.M., Hinman, C.R., Johnson, L.V., and Clegg, D.O. (2009). Derivation of functional retinal pigmented epithelium from induced

pluripotent stem cells. *Stem Cells* 27, 2427–2434.

Buchholz, D.E., Pennington, B.O., Croze, R.H., Hinman, C.R., Coffey, P.J., and Clegg, D.O. (2013). Rapid and Efficient Directed Differentiation of Human Pluripotent Stem Cells Into Retinal Pigmented Epithelium. *Stem Cells Transl. Med.* 2, 384–393.

Bui, B.V., Kalloniatis, M., and Vingrys, A.J. (2003). The contribution of glycolytic and oxidative pathways to retinal photoreceptor function. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 44, 2708–2715.

Byrne, J.A., Pedersen, D.A., Clepper, L.L., Nelson, M., Sanger, W.G., Gokhale, S., Wolf, D.P., and Mitalipov, S.M. (2007). Producing primate embryonic stem cells by somatic cell nuclear transfer. *Nature* 450, 497–502.

Cai, H., and Del Priore, L.V. (2006). Gene expression profile of cultured adult compared to immortalized human RPE. *Mol. Vis.* 12, 1–14.

Cai, X., Conley, S.M., and Naash, M.I. (2009). RPE65: Role in the visual cycle, human retinal disease, and gene therapy. *Ophthalmic Genet.* 30, 57.

Calippe, B., Guillonnet, X., and Sennlaub, F. (2014). Complement factor H and related proteins in age-related macular degeneration. *C. R. Biol.* 337, 178–184.

Callen, J.-C., and Perasso, R. (2005). *Biologie cellulaire - 2e éd.: Des molécules aux organismes* (Dunod).

Cankova, Z., Huang, J.-D., Kruth, H.S., and Johnson, M. (2011). Passage of Low-density Lipoproteins Through Bruch's Membrane and Choroid. *Exp. Eye Res.* 93, 947–955.

Cao, S., Ko, A., Partanen, M., Pakzad-Vaezi, K., Merkur, A.B., Albani, D.A., Kirker, A.W., Wang, A., Cui, J.Z., Forooghian, F., et al. (2013). Relationship between Systemic Cytokines and Complement Factor H Y402H Polymorphism in Patients With Dry Age-Related Macular Degeneration. *Am. J. Ophthalmol.* 156, 1176–1183.

Carneiro, Â., and Andrade, J.P. (2017). Nutritional and Lifestyle Interventions for Age-Related Macular Degeneration: A Review. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2017:6469138.

Chader, G.J. (2002). Animal models in research on retinal degenerations: past progress and future hope. *Vision Res.* 42, 393–399.

Chakravarthy, U., Augood, C., Bentham, G.C., de Jong, P.T.V.M., Rahu, M., Seland, J., Soubrane, G., Tomazzoli, L., Topouzis, F., Vingerling, J.R., et al. (2007). Cigarette Smoking and Age-Related Macular Degeneration in the EUREYE Study. *Ophthalmology* 114, 1157–1163.

Chakravarthy, U., Wong, T.Y., Fletcher, A., Piau, E., Evans, C., Zlateva, G., Buggage, R., Pleil, A., and Mitchell, P. (2010). Clinical risk factors for age-related macular degeneration: a

systematic review and meta-analysis. *BMC Ophthalmol.* 10, 1.

Chan, D.C. (2012). Fusion and fission: interlinked processes critical for mitochondrial health. *Annu. Rev. Genet.* 46, 265–287.

Chang, Y.-C., Chang, W.-C., Hung, K.-H., Yang, D.-M., Cheng, Y.-H., Liao, Y.-W., Woung, L.-C., Tsai, C.-Y., Hsu, C.-C., Lin, T.-C., et al. (2014). The generation of induced pluripotent stem cells for macular degeneration as a drug screening platform: identification of curcumin as a protective agent for retinal pigment epithelial cells against oxidative stress. *Front. Aging Neurosci.* 6:191.

Charbel Issa, P., Barnard, A.R., Singh, M.S., Carter, E., Jiang, Z., Radu, R.A., Schraermeyer, U., and MacLaren, R.E. (2013). Fundus Autofluorescence in the *Abca4*^{-/-} Mouse Model of Stargardt Disease—Correlation With Accumulation of A2E, Retinal Function, and Histology. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 54, 5602–5612.

Chen, H., Lukas, T.J., Du, N., Suyeoka, G., and Neufeld, A.H. (2009). Dysfunction of the Retinal Pigment Epithelium with Age: Increased Iron Decreases Phagocytosis and Lysosomal Activity. *Investig. Ophthalmology Vis. Sci.* 50, 1895.

Chen, M., Rajapakse, D., Fraczek, M., Luo, C., Forrester, J.V., and Xu, H. (2016). Retinal pigment epithelial cell multinucleation in the aging eye – a mechanism to repair damage and maintain homeostasis. *Aging Cell* 15, 436–445.

Chen, Y., Wang, J., Cai, J., and Sternberg, P. (2010). Altered mTOR Signaling in Senescent Retinal Pigment Epithelium. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 51, 5314–5319.

Chong, Y.S., Mai, C.W., Leong, C.O., and Wong, L.C. (2017). Lutein improves cell viability and reduces Alu RNA accumulation in hydrogen peroxide challenged retinal pigment epithelial cells. *Cutan. Ocul. Toxicol.* 1–27.

Choudhary, P., Gutteridge, A., Impey, E., Storer, R.I., Owen, R.M., Whiting, P.J., Bictash, M., and Benn, C.L. (2016). Targeting the cAMP and Transforming Growth Factor- β Pathway Increases Proliferation to Promote Re-Epithelialization of Human Stem Cell-Derived Retinal Pigment Epithelium. *Stem Cells Transl. Med.* 5, 925–937.

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.

Coffey, P.J., Girman, S., Wang, S.M., Hetherington, L., Keegan, D.J., Adamson, P., Greenwood, J., and Lund, R.D. (2002). Long-term preservation of cortically dependent visual function in RCS rats by transplantation. *Nat. Neurosci.* 5, 53–56.

Cohen, S.Y. (2000). Guide pratique de rééducation des basses visions: réhabilitation visuelle des

personnes adultes malvoyantes atteintes de DMLA ou autres maladies maculaires (Elsevier Masson).

Cook, Jakobiec FA, and Ozanics (1994). Prenatal development of the eye and its adnexa. In Tasman W, Jaeger E, eds. *Duane's Foundations of Clinical Ophthalmology*. Philadelphia: Lippincott.

Cowan, C.A., Klimanskaya, I., McMahon, J., Atienza, J., Witmyer, J., Zucker, J.P., Wang, S., Morton, C.C., McMahon, A.P., Powers, D., et al. (2004). Derivation of Embryonic Stem-Cell Lines from Human Blastocysts. *N. Engl. J. Med.* *350*, 1353–1356.

Csobonyeiova, M., Polak, S., Koller, J., and Danisovic, L. (2015). Induced pluripotent stem cells and their implication for regenerative medicine. *Cell Tissue Bank.* *16*, 171–180.

Curcio, C.A., and Johnson, M. (2013). Structure, function, and pathology of Bruch's membrane. *Elastic* *146*, 210–213.

Curcio, C.A., Millican, C.L., Bailey, T., and Kruth, H.S. (2001). Accumulation of cholesterol with age in human Bruch's membrane. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* *42*, 265–274.

Dandekar, S.S., Jenkins, S.A., Peto, T., Bird, A.C., and Webster, A.R. (2006). Does smoking influence the type of age related macular degeneration causing visual impairment? *Br. J. Ophthalmol.* *90*, 724–727.

Datta, S., Cano, M., Ebrahimi, K., Wang, L., and Handa, J.T. (2017). The impact of oxidative stress and inflammation on RPE degeneration in non-neovascular AMD. *Prog. Retin. Eye Res.* *60*, 201-218.

D'Cruz, P.M., Yasumura, D., Weir, J., Matthes, M.T., Abderrahim, H., LaVail, M.M., and Vollrath, D. (2000). Mutation of the receptor tyrosine kinase gene *Mertk* in the retinal dystrophic RCS rat. *Hum. Mol. Genet.* *9*, 645–651.

De Jong, P. (2006). Age-Related Macular Degeneration. *N. Engl. J. Med.* *355*, 1474–1485.

Dentchev, T., Hahn, P., and Dunaief, J.L. (2005). Strong labeling for iron and the iron-handling proteins ferritin and ferroportin in the photoreceptor layer in age-related macular degeneration. *Arch. Ophthalmol. Chic. Ill 1960* *123*, 1745–1746.

Dimos, J.T., Rodolfa, K.T., Niakan, K.K., Weisenthal, L.M., Mitsumoto, H., Chung, W., Croft, G.F., Saphier, G., Leibel, R., Golland, R., et al. (2008). Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons. *Science* *321*, 1218–1221.

Dimri, G.P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., Medrano, E.E., Linskens, M., Rubelj, I., and Pereira-Smith, O. (1995). A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *92*, 9363–9367.

Dithmar, S., Curcio, C.A., Le, N.-A., Brown, S., and Grossniklaus, H.E. (2000). Ultrastructural

- Changes in Bruch's Membrane of Apolipoprotein E-Deficient Mice. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* *41*, 2035–2042.
- Dixon, S.J., Lemberg, K.M., Lamprecht, M.R., Skouta, R., Zaitsev, E.M., Gleason, C.E., Patel, D.N., Bauer, A.J., Cantley, A.M., Yang, W.S., et al. (2012). Ferroptosis: An Iron-Dependent Form of Nonapoptotic Cell Death. *Cell* *149*, 1060–1072.
- Donoso, L.A., Kim, D., Frost, A., Callahan, A., and Hageman, G. (2006). The Role of Inflammation in the Pathogenesis of Age-related Macular Degeneration. *Surv. Ophthalmol.* *51*, 137–152.
- Ducasse A, and Labrousse M (2008). Anatomie et Histologie des vaisseaux destinés au globe oculaire.
- Dunn, K.C., Aotaki-Keen, A., Putkey, F.R., and Hjelmeland, L.M. (1996). ARPE-19, A Human Retinal Pigment Epithelial Cell Line with Differentiated Properties. *Exp. Eye Res.* *62*, 155–170.
- Dunn, K.C., Marmorstein, A.D., Bonilha, V.L., Rodriguez-Boulan, E., Giordano, F., and Hjelmeland, L.M. (1998). Use of the ARPE-19 cell line as a model of RPE polarity: basolateral secretion of FGF5. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* *39*, 2744–2749.
- Dusek, P., Schneider, S.A., and Aaseth, J. (2016). Iron chelation in the treatment of neurodegenerative diseases. *J Trace Elem Med Biol.* *38*, 81-92.
- Egli, D., Chen, A.E., Saphier, G., Ichida, J., Fitzgerald, C., Go, K.J., Acevedo, N., Patel, J., Baetscher, M., Kearns, W.G., et al. (2011). Reprogramming within hours following nuclear transfer into mouse but not human zygotes. *Nat. Commun.* *2*, 488.
- Eid, C., Hémadi, M., Ha-Duong, N.-T., and El Hage Chahine, J.-M. (2014). Iron uptake and transfer from ceruloplasmin to transferrin. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* *1840*, 1771–1781.
- Elsner, A.E., Burns, S.A., and Weiter, J.J. (2002). Cone photopigment in older subjects: decreased optical density in early age-related macular degeneration. *J. Opt. Soc. Am. A Opt. Image Sci. Vis.* *19*, 215–222.
- Feeney-Burns, L., Hilderbrand, E.S., and Eldridge, S. (1984). Aging human RPE: morphometric analysis of macular, equatorial, and peripheral cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* *25*, 195–200.
- Feher, J., Kovacs, I., Artico, M., Cavallotti, C., Papale, A., and Balacco Gabrieli, C. (2006). Mitochondrial alterations of retinal pigment epithelium in age-related macular degeneration. *Neurobiol. Aging* *27*, 983–993.
- Fernandez-Godino, R., Garland, D.L., and Pierce, E.A. (2015). A local complement response by RPE causes early-stage macular degeneration. *Hum. Mol. Genet.* *24*, 5555–5569.
- Ferris, F.L., Kassoff, A., Bresnick, G.H., and Bailey, I. (1982). New visual acuity charts for

clinical research. *Am. J. Ophthalmol.* *94*, 91–96.

Finnemann, S.C. (2003). Focal adhesion kinase signaling promotes phagocytosis of integrin-bound photoreceptors. *EMBO J.* *22*, 4143–4154.

Finnemann, S.C., Bonilha, V.L., Marmorstein, A.D., and Rodriguez-Boulan, E. (1997). Phagocytosis of rod outer segments by retinal pigment epithelial cells requires alpha(v)beta5 integrin for binding but not for internalization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *94*, 12932–12937.

Garcia, T.Y., Gutierrez, M., Reynolds, J., and Lamba, D.A. (2015). Modeling the Dynamic AMD-Associated Chronic Oxidative Stress Changes in Human ESC and iPSC-Derived RPE Cells. *Investig. Ophthalmology Vis. Sci.* *56*, 7480.

Gehrs, K.M., Anderson, D.H., Johnson, L.V., and Hageman, G.S. (2006). Age-related macular degeneration—emerging pathogenetic and therapeutic concepts. *Ann. Med.* *38*, 450–471.

Gerami-Naini, B., Smith, A., Maione, A.G., Kashpur, O., Carpinito, G., Veves, A., Mooney, D.J., and Garlick, J.A. (2016). Generation of Induced Pluripotent Stem Cells from Diabetic Foot Ulcer Fibroblasts Using a Nonintegrative Sendai Virus. *Cell. Reprogramming* *18*, 214–223.

Glaser, T., Walton, D.S., and Maas, R.L. (1992). Genomic structure, evolutionary conservation and aniridia mutations in the human PAX6 gene. *Nat. Genet.* *2*, 232–239.

Glenn, J.V., and Stitt, A.W. (2009). The role of advanced glycation end products in retinal ageing and disease. *Biochim. Biophys. Acta* *1790*, 1109–1116.

Glenn, J.V., Mahaffy, H., Dasari, S., Oliver, M., Chen, M., Boulton, M.E., Xu, H., Curry, W.J., and Stitt, A.W. (2012). Proteomic profiling of human retinal pigment epithelium exposed to an advanced glycation-modified substrate. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* *250*, 349–359.

Golestaneh, N., Chu, Y., Cheng, S.K., Cao, H., Poliakov, E., and Berinstein, D.M. (2016). Repressed SIRT1/PGC-1 α pathway and mitochondrial disintegration in iPSC-derived RPE disease model of age-related macular degeneration. *J. Transl. Med.* *14*:344.

Golestaneh, N., Chu, Y., Xiao, Y.-Y., Stoleru, G.L., and Theos, A.C. (2017). Dysfunctional autophagy in RPE, a contributing factor in age-related macular degeneration. *Cell Death Dis.* *8*, e2537.

Graw, J. (2003). The genetic and molecular basis of congenital eye defects. *Nat. Rev. Genet.* *4*, 876–888.

Grossniklaus, H.E., Kang, S.J., and Berglin, L. (2010). Animal Models of Choroidal and Retinal Neovascularization. *Prog. Retin. Eye Res.* *29*, 500–519.

Guenou, H., Nissan, X., Larcher, F., Feteira, J., Lemaitre, G., Saidani, M., Del Rio, M., Barrault, C.C., Bernard, F.-X., Peschanski, M., et al. (2009). Human embryonic stem-cell derivatives for full reconstruction of the pluristratified epidermis: a preclinical study. *Lancet Lond. Engl.* *374*,

1745–1753.

Gupta, S.K., Murthy, G.V.S., Morrison, N., Price, G.M., Dherani, M., John, N., Fletcher, A.E., and Chakravarthy, U. (2007). Prevalence of early and late age-related macular degeneration in a rural population in northern India: the INDEYE feasibility study. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* *48*, 1007–1011.

Gurdon, J.B. (1962). The developmental capacity of nuclei taken from intestinal epithelium cells of feeding tadpoles. *J. Embryol. Exp. Morphol.* *10*, 622–640.

Hageman, G.S., Anderson, D.H., Johnson, L.V., Hancox, L.S., Taiber, A.J., Hardisty, L.I., Hageman, J.L., Stockman, H.A., Borchardt, J.D., Gehrs, K.M., et al. (2005). A common haplotype in the complement regulatory gene factor H (HF1/CFH) predisposes individuals to age-related macular degeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 7227–7232.

Hall, M.O., Abrams, T.A., and Mittag, T.W. (1991). ROS ingestion by RPE cells is turned off by increased protein kinase C activity and by increased calcium. *Exp. Eye Res.* *52*, 591–598.

Hanna, J., Wernig, M., Markoulaki, S., Sun, C.-W., Meissner, A., Cassady, J.P., Beard, C., Brambrink, T., Wu, L.-C., Townes, T.M., et al. (2007). Treatment of Sickle Cell Anemia Mouse Model with iPS Cells Generated from Autologous Skin. *Science* *318*, 1920–1923.

Hanus, J., Zhang, H., Wang, Z., Liu, Q., Zhou, Q., and Wang, S. (2013). Induction of necrotic cell death by oxidative stress in retinal pigment epithelial cells. *Cell Death Dis.* *4*, e965.

Haruta, M., Sasai, Y., Kawasaki, H., Amemiya, K., Ooto, S., Kitada, M., Suemori, H., Nakatsuji, N., Ide, C., Honda, Y., et al. (2004). In vitro and in vivo characterization of pigment epithelial cells differentiated from primate embryonic stem cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* *45*, 1020–1025.

Haworth, R.A., and Hunter, D.R. (1979). The Ca²⁺-induced membrane transition in mitochondria. II. Nature of the Ca²⁺ trigger site. *Arch. Biochem. Biophys.* *195*, 460–467.

He, X., Hahn, P., Iacovelli, J., Wong, R., King, C., Bhisitkul, R., Massaro-Giordano, M., and Dunaief, J.L. (2007). Iron homeostasis and toxicity in retinal degeneration. *Prog. Retin. Eye Res.* *26*, 649–673.

He, X., Cao, Y., Wang, L., Han, Y., Zhong, X., Zhou, G., Cai, Y., Zhang, H., and Gao, P. (2014). Human Fibroblast Reprogramming to Pluripotent Stem Cells Regulated by the miR19a/b-PTEN Axis. *PLoS ONE.* *9*, e95213.

Hendrickson, A.E., and Yuodelis, C. (1984). The morphological development of the human fovea. *Ophthalmology.* *91*, 603–612.

Hill, R.E., Favor, J., Hogan, B.L., Ton, C.C., Saunders, G.F., Hanson, I.M., Prosser, J., Jordan, T., Hastie, N.D., and van Heyningen, V. (1992). Mouse Small eye results from mutations in a

paired-like homeobox-containing gene. *Nature*. 355, 750.

Ho, L., van Leeuwen, R., Witteman, J.C., van Duijn, C.M., Uitterlinden, A.G., Hofman, A., de Jong, P.T., Vingerling, J.R., and Klaver, C.C. (2011). Reducing the genetic risk of age-related macular degeneration with dietary antioxidants, zinc, and ω -3 fatty acids: the Rotterdam study. *Arch. Ophthalmol.* 129, 758–766.

Höhn, A., and Grune, T. (2013). Lipofuscin: formation, effects and role of macroautophagy. *Redox Biol.* 1, 140–144.

Holtkamp, G.M., Van Rossem, M., de Vos, A.F., Willekens, B., Peek, R., and Kijlstra, A. (1998). Polarized secretion of IL-6 and IL-8 by human retinal pigment epithelial cells. *Clin. Exp. Immunol.* 112, 34–43.

Holz, F.G., Pauleikhoff, D., Spaide, R.F., and Bird, A.C. (2004). Age-related macular degeneration (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg).

Hu, J., and Bok, D. (2001). A cell culture medium that supports the differentiation of human retinal pigment epithelium into functionally polarized monolayers. *Mol. Vis.* 7, 14–19.

Hubbard, J.J., Sullivan, S.K., Mills, J.A., Hayes, B.J., Torok-Storb, B.J., and Ramakrishnan, A. (2014). Efficient iPS Cell Generation from Blood Using Episomes and HDAC Inhibitors. *J. Vis. Exp.* 92, e52009.

Jarrett, S.G., and Boulton, M.E. (2012). Consequences of oxidative stress in age-related macular degeneration. *Mol. Aspects Med.* 33, 399–417.

Jeanny, J.-C., Picard, E., Sergeant, C., Jonet, L., Yefimova, M., and Courtois, Y. (2013). [Iron and regulatory proteins in the normal and pathological retina]. *Bull. Acad. Natl. Med.* 197, 661-674-675.

Johnson, L.V., Forest, D.L., Banna, C.D., Radeke, C.M., Maloney, M.A., Hu, J., Spencer, C.N., Walker, A.M., Tsie, M.S., Bok, D., et al. (2011). Cell culture model that mimics drusen formation and triggers complement activation associated with age-related macular degeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, 18277–18282.

Johnson, R.L., Ettlinger, C.F., and Shealy, J.E. (2000). Update on injury trends in alpine skiing. In *Skiing Trauma and Safety: Thirteenth Volume*, (ASTM International).

Jonasson, F., Arnarsson, A., Peto, T., Sasaki, H., Sasaki, K., and Bird, A.C. (2005). 5-year incidence of age-related maculopathy in the Reykjavik Eye Study. *Ophthalmology* 112, 132–138.

Jr, E.G.H., Unda, R., Vidro, E., Muniz, A., Villazana-Espinoza, E.T., and Tsin, A. (2006). ARPE-19 Cell Growth and Cell Functions in Euglycemic Culture Media. *Curr. Eye Res.* 31, 1073–1080.

- K W Yau, and Baylor, and D.A. (1989). Cyclic GMP-Activated Conductance of Retinal Photoreceptor Cells. *Annu. Rev. Neurosci.* *12*, 289–327.
- Kaarniranta, K., Tokarz, P., Koskela, A., Paterno, J., and Blasiak, J. (2016). Autophagy regulates death of retinal pigment epithelium cells in age-related macular degeneration. *Cell Biol. Toxicol* *33*(2), 113-128.
- Kaemmerer, E., Schutt, F., Krohne, T.U., Holz, F.G., and Kopitz, J. (2007). Effects of lipid peroxidation-related protein modifications on RPE lysosomal functions and POS phagocytosis. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* *48*, 1342–1347.
- Kamao, H., Mandai, M., Okamoto, S., Sakai, N., Suga, A., Sugita, S., Kiryu, J., and Takahashi, M. (2014). Characterization of Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Retinal Pigment Epithelium Cell Sheets Aiming for Clinical Application. *Stem Cell Rep.* *2*, 205–218.
- Kanda, A., Chen, W., Othman, M., Branham, K.E.H., Brooks, M., Khanna, R., He, S., Lyons, R., Abecasis, G.R., and Swaroop, A. (2007). A variant of mitochondrial protein LOC387715/ARMS2, not HTRA1, is strongly associated with age-related macular degeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 16227–16232.
- Kandarakis, S.A., Piperi, C., Topouzis, F., and Papavassiliou, A.G. (2014). Emerging role of advanced glycation-end products (AGEs) in the pathobiology of eye diseases. *Prog. Retin. Eye Res.* *42*, 85–102.
- Karlsson, M., and Kurz, T. (2016). Attenuation of iron-binding proteins in ARPE-19 cells reduces their resistance to oxidative stress. *Acta Ophthalmol.* *94*(6):556-64
- Karunadharma, P.P., Nordgaard, C.L., Olsen, T.W., and Ferrington, D.A. (2010). Mitochondrial DNA Damage as a Potential Mechanism for Age-Related Macular Degeneration. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* *51*, 5470–5479.
- Kawasaki, R., Wang, J.J., Ji, G., Taylor, B., Oizumi, T., Daimon, M., Kato, T., Kawata, S., Kayama, T., Tano, Y., et al. (2008). Prevalence and risk factors for age-related macular degeneration in an adult Japanese population: the Funagata study. *Ophthalmology* *115*, 1376–1381, 1381-2.
- Kay, P., Yang, Y.C., and Paraoan, L. (2013). Directional protein secretion by the retinal pigment epithelium: roles in retinal health and the development of age-related macular degeneration. *J. Cell. Mol. Med.* *17*, 833–843.
- Kevany, B.M., and Palczewski, K. (2010). Phagocytosis of retinal rod and cone photoreceptors. *Physiol. Bethesda Md.* *25*, 8–15.
- Khan, J.C., Thurlby, D.A., Shahid, H., Clayton, D.G., Yates, J.R.W., Bradley, M., Moore, A.T., and Bird, A.C. (2006). Smoking and age related macular degeneration: the number of pack years

of cigarette smoking is a major determinant of risk for both geographic atrophy and choroidal neovascularisation. *Br. J. Ophthalmol.* *90*, 75–80.

Khandhadia, S., and Lotery, A. (2010). Oxidation and age-related macular degeneration: insights from molecular biology. *Expert Rev. Mol. Med.* *12*, e34.

Kitazawa, K., Hikichi, T., Nakamura, T., Sotozono, C., Kinoshita, S., and Masui, S. (2017). PAX6 regulates human corneal epithelium cell identity. *Exp. Eye Res.* *154*, 30–38.

Klein, R. (2001). The Prevalence of Age-Related Macular Degeneration and Associated Risk Factors. *Arch. Ophthalmol.* *128*, 750.

Klein, R., Klein, B.E., and Linton, K.L. (1992). Prevalence of age-related maculopathy. The Beaver Dam Eye Study. *Ophthalmology* *99*, 933–943.

Klein, R., Klein, B.E., Tomany, S.C., Meuer, S.M., and Huang, G.-H. (2002). Ten-year incidence and progression of age-related maculopathy: The Beaver Dam eye study. *Ophthalmology* *109*, 1767–1779.

Klein, R., Klein, B.E.K., Knudtson, M.D., Wong, T.Y., Cotch, M.F., Liu, K., Burke, G., Saad, M.F., and Jacobs, D.R. (2006). Prevalence of Age-Related Macular Degeneration in 4 Racial/Ethnic Groups in the Multi-ethnic Study of Atherosclerosis. *Ophthalmology* *113*, 373–380.

Klein, R., Klein, B.E.K., Knudtson, M.D., Meuer, S.M., Swift, M., and Gangnon, R.E. (2007). Fifteen-year cumulative incidence of age-related macular degeneration: the Beaver Dam Eye Study. *Ophthalmology* *114*, 253–262.

Klein, R., Myers, C.E., Meuer, S.M., Gangnon, R.E., Sivakumaran, T.A., Iyengar, S.K., Lee, K.E., and Klein, B.E.K. (2013). Risk Alleles in CFH and ARMS2 and the Long-term Natural History of Age-Related Macular Degeneration: The Beaver Dam Eye Study. *JAMA Ophthalmol.* *131*, 383.

Kleinsmith, L.J., and Pierce, G.B. (1964). Multipotentiality of Single Embryonal Carcinoma Cells. *Cancer Res.* *24*, 1544–1551.

Klimanskaya, I., Hipp, J., Rezai, K.A., West, M., Atala, A., and Lanza, R. (2004). Derivation and comparative assessment of retinal pigment epithelium from human embryonic stem cells using transcriptomics. *Cloning Stem Cells.* *6*, 217–245.

Koh, L.H.L., Agrawal, R., Khandelwal, N., Sai Charan, L., and Chhablani, J. (2017). Choroidal vascular changes in age-related macular degeneration. *Acta Ophthalmol.* *95*(7):e597-e601.

Kokkinaki, M., Abu-Asab, M., Gunawardena, N., Ahern, G., Javidnia, M., Young, J., and Golestaneh, N. (2013). Klotho Regulates Retinal Pigment Epithelial Functions and Protects Against Oxidative Stress. *J. Neurosci.* *33*, 16346–16359.

- Kolar, P. (2013). Petr Kolar (2013). Classification and Clinical Features of AMD, Age-Related Macular Degeneration - Etiology, Diagnosis and Management - A Glance at the Future, Dr. Giuseppe Lo Giudice (Ed.), InTech.
- Kolb, H., Fernandez, E., and Nelson, R. (1995). *Webvision : The Organisation of the Retina and the Visual System* (University of Utah Health Sciences Center).
- Krohne, T.U., Stratmann, N.K., Kopitz, J., and Holz, F.G. (2010a). Effects of lipid peroxidation products on lipofuscinogenesis and autophagy in human retinal pigment epithelial cells. *Exp. Eye Res.* *90*, 465–471.
- Krohne, T.U., Kaemmerer, E., Holz, F.G., and Kopitz, J. (2010b). Lipid peroxidation products reduce lysosomal protease activities in human retinal pigment epithelial cells via two different mechanisms of action. *Exp. Eye Res.* *90*, 261–266.
- Kukura, P. (2005). Structural Observation of the Primary Isomerization in Vision with Femtosecond-Stimulated Raman. *Science* *310*, 1006–1009.
- Kunchithapautham, K., Atkinson, C., and Rohrer, B. (2014). Smoke Exposure Causes Endoplasmic Reticulum Stress and Lipid Accumulation in Retinal Pigment Epithelium through Oxidative Stress and Complement Activation. *J. Biol. Chem.* *289*, 14534–14546.
- Kurz, T., Terman, A., and Brunk, U.T. (2007). Autophagy, ageing and apoptosis: The role of oxidative stress and lysosomal iron. *Arch. Biochem. Biophys.* *462*, 220–230.
- Kurz, T., Gustafsson, B., and Brunk, U.T. (2011). Cell sensitivity to oxidative stress is influenced by ferritin autophagy. *Free Radic. Biol. Med.* *50*, 1647–1658.
- Lakkaraju, A., Finnemann, S.C., and Rodriguez-Boulan, E. (2007). The lipofuscin fluorophore A2E perturbs cholesterol metabolism in retinal pigment epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 11026–11031.
- Langford-Smith, A., Keenan, T.D.L., Clark, S.J., Bishop, P.N., and Day, A.J. (2013). The Role of Complement in Age-Related Macular Degeneration: Heparan Sulphate, a ZIP Code for Complement Factor H? *J. Innate Immun.* *6*(4), 407-16.
- Lefevre, E., Toft-Kehler, A.K., Vohra, R., Kolko, M., Moons, L., and Van Hove, I. (2017). Mitochondrial dysfunction underlying outer retinal diseases. *Mitochondrion.* *36*, 66-76.
- Lengler, J., Bittner, T., Münster, D., Gawad, A.E.-D.A., and Graw, J. (2005). Agonistic and antagonistic action of AP2, Msx2, Pax6, Prox1 AND Six3 in the regulation of Sox2 expression. *Ophthalmic Res.* *37*, 301–309.
- Lenis, T.L., Sarfare, S., Jiang, Z., Lloyd, M.B., Bok, D., and Radu, R.A. (2017). Complement modulation in the retinal pigment epithelium rescues photoreceptor degeneration in a mouse model of Stargardt disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *114*, 3987–3992.

- Leveziel, N., Delcourt, C., Zerbib, J., Dollfus, H., Kaplan, J., Benlian, P., Coscas, G., Souied, E.H., and Soubrane, G. (2009). Epidémiologie de la dégénérescence maculaire liée à l'âge. *J. Français Ophtalmol.* 32, 440–451.
- Li, W. (2013). Phagocyte dysfunction, tissue aging and degeneration. *Ageing Res. Rev.* 12, 1005-12.
- Liang, F.-Q., and Godley, B.F. (2003). Oxidative stress-induced mitochondrial DNA damage in human retinal pigment epithelial cells: a possible mechanism for RPE aging and age-related macular degeneration. *Exp. Eye Res.* 76, 397–403.
- Lowry, W.E., Richter, L., Yachechko, R., Pyle, A.D., Tchieu, J., Sridharan, R., Clark, A.T., and Plath, K. (2008). Generation of human induced pluripotent stem cells from dermal fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105, 2883–2888.
- Lu, B., Malcuit, C., Wang, S., Girman, S., Francis, P., Lemieux, L., Lanza, R., and Lund, R. (2009). Long-Term Safety and Function of RPE from Human Embryonic Stem Cells in Preclinical Models of Macular Degeneration. *Stem Cells.* 27, 2126–2135.
- Lund, R.D., Wang, S., Klimanskaya, I., Holmes, T., Ramos-Kelsey, R., Lu, B., Girman, S., Bischoff, N., Sauv e, Y., and Lanza, R. (2006). Human Embryonic Stem Cell–Derived Cells Rescue Visual Function in Dystrophic RCS Rats. *Cloning Stem Cells.* 8, 189–199.
- Luo, Y., Zhuo, Y., Fukuhara, M., and Rizzolo, L.J. (2006). Effects of Culture Conditions on Heterogeneity and the Apical Junctional Complex of the ARPE-19 Cell Line. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 47, 3644–3655.
- Maminishkis, A., Chen, S., Jalickee, S., Banzon, T., Shi, G., Wang, F.E., Ehalt, T., Hammer, J.A., and Miller, S.S. (2006). Confluent monolayers of cultured human fetal retinal pigment epithelium exhibit morphology and physiology of native tissue. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 47, 3612–3624.
- Mandai, M., Watanabe, A., Kurimoto, Y., Hirami, Y., Morinaga, C., Daimon, T., Fujihara, M., Akimaru, H., Sakai, N., Shibata, Y., et al. (2017). Autologous Induced Stem-Cell-Derived Retinal Cells for Macular Degeneration. *N. Engl. J. Med.* 376, 1038–1046.
- Mao, Y., and Finnemann, S.C. (2013). Analysis of Photoreceptor Outer Segment Phagocytosis by RPE Cells in Culture. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 935, 285–295.
- Mart ı, M., Mulero, L., Pardo, C., Morera, C., Carri o, M., Laricchia-Robbio, L., Esteban, C.R., and Belmonte, J.C.I. (2013). Characterization of pluripotent stem cells. *Nat. Protoc.* 8, 223–253.
- Maruotti, J., Wahlin, K., Gorrell, D., Bhutto, I., Luty, G., and Zack, D.J. (2013). A Simple and Scalable Process for the Differentiation of Retinal Pigment Epithelium From Human Pluripotent Stem Cells. *Stem Cells Transl. Med.* 2, 341–354.

Matsushima, D., Heavner, W., and Pevny, L.H. (2011). Combinatorial regulation of optic cup progenitor cell fate by SOX2 and PAX6. *Dev. Camb. Engl.* *138*, 443–454.

Mazzoni, F., Safa, H., and Finnemann, S.C. (2014). Understanding photoreceptor outer segment phagocytosis: Use and utility of RPE cells in culture. *Exp. Eye Res.* *0*, 51–60.

McCusker, M.M., Durrani, K., Payette, M.J., and Suchecki, J. (2016). An eye on nutrition: The role of vitamins, essential fatty acids, and antioxidants in age-related macular degeneration, dry eye syndrome, and cataract. *Clin. Dermatol.* *34*, 276–285.

Menasché, P., Vanneaux, V., Hagège, A., Bel, A., Cholley, B., Cacciapuoti, I., Parouchev, A., Benhamouda, N., Tachdjian, G., Tosca, L., et al. (2015). Human embryonic stem cell-derived cardiac progenitors for severe heart failure treatment: first clinical case report. *Eur. Heart J.* *36*, 2011–2017.

Mitchell, P., Wang, J.J., Smith, W., and Leeder, S.R. (2002). Smoking and the 5-year incidence of age-related maculopathy: the Blue Mountains Eye Study. *Arch. Ophthalmol. Chic. Ill 1960* *120*, 1357–1363.

Mitsui, K., Tokuzawa, Y., Itoh, H., Segawa, K., Murakami, M., Takahashi, K., Maruyama, M., Maeda, M., and Yamanaka, S. (2003). The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell* *113*, 631–642.

Mitter, S.K., Song, C., Qi, X., Mao, H., Rao, H., Akin, D., Lewin, A., Grant, M., Dunn, W., Ding, J., et al. (2014). Dysregulated autophagy in the RPE is associated with increased susceptibility to oxidative stress and AMD. *Autophagy* *10*, 1989–2005.

Moult, E., Choi, W., Waheed, N.K., Adhi, M., Lee, B., Lu, C.D., Jayaraman, V., Potsaid, B., Rosenfeld, P.J., Duker, J.S., et al. (2014). Ultrahigh-Speed Swept-Source OCT Angiography in Exudative AMD. *Ophthalmic Surg. Lasers Imaging Retina* *45*, 496–505.

Mukesh, B.N., Dimitrov, P.N., Leikin, S., Wang, J.J., Mitchell, P., McCarty, C.A., and Taylor, H.R. (2004). Five-year incidence of age-related maculopathy. *Ophthalmology* *111*, 1176–1182.

Mukherjee, P.K., Marcheselli, V.L., Vaccari, J.C. de R., Gordon, W.C., Jackson, F.E., and Bazan, N.G. (2007). Photoreceptor outer segment phagocytosis attenuates oxidative stress-induced apoptosis with concomitant neuroprotectin D1 synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *104*, 13158–13163.

Mullins, R.F., Russell, S.R., Anderson, D.H., and Hageman, G.S. (2000). 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. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *14*, 835–846.

- Mullins, R.F., Warwick, A.N., Sohn, E.H., and Lotery, A.J. (2017). From compliment to insult: genetics of the complement system in physiology and disease in the human retina. *Hum. Mol. Genet.* *26*, R51-R57.
- Murdaugh, L.S., Mandal, S., Dill, A.E., Dillon, J., Simon, J.D., and Gaillard, E.R. (2011). Compositional studies of human RPE lipofuscin: mechanisms of molecular modifications. *J. Mass Spectrom.* *JMS 46*, 90–95.
- Nagineeni, C.N., Detrick, B., and Hooks, J.J. (1994). Synergistic effects of gamma interferon on inflammatory mediators that induce interleukin-6 gene expression and secretion by human retinal pigment epithelial cells. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* *1*, 569–577.
- Narsinh, K.H., Plews, J., and Wu, J.C. (2011). Comparison of Human Induced Pluripotent and Embryonic Stem Cells: Fraternal or Identical Twins? *Mol. Ther.* *19*, 635–638.
- Nazari, H., Zhang, L., Zhu, D., Chader, G.J., Falabella, P., Stefanini, F., Rowland, T., Clegg, D.O., Kashani, A.H., Hinton, D.R., et al. (2015). Stem cell based therapies for age-related macular degeneration: The promises and the challenges. *Prog. Retin. Eye Res.* *48*, 1–39.
- Ng, V.Y., and Choo, A.B. (2010). iPS and ES cells: do both roads lead to Rome. *Open Stem Cell J* *2*, 8–17.
- Nguyen-Legros, J., and Hicks, D. (2000). Renewal of photoreceptor outer segments and their phagocytosis by the retinal pigment epithelium. *Int. Rev. Cytol.* *196*, 245–313.
- Nita, M., Grzybowski, A., Ascaso, F.J., and Huerva, V. (2014). Age-Related Macular Degeneration in the Aspect of Chronic Low-Grade Inflammation (Pathophysiological ParaInflammation). *Mediators Inflamm.* *2014*, 1–10.
- Nivison-Smith, L., Milston, R., Madigan, M., and Kalloniatis, M. (2014). Age-related macular degeneration: linking clinical presentation to pathology. *Optom. Vis. Sci.* *91*, 832–848.
- Niwa, H., Miyazaki, J., and Smith, A.G. (2000). Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat. Genet.* *24*, 372–376.
- Noble, J., and Chaudhary, V. (2010). Age-related macular degeneration. *Can. Med. Assoc. J.* *182*, 1759–1759.
- Nordgaard, C.L., Karunadharma, P.P., Feng, X., Olsen, T.W., and Ferrington, D.A. (2008). Mitochondrial Proteomics of the Retinal Pigment Epithelium at Progressive Stages of Age-Related Macular Degeneration. *Investig. Ophthalmology Vis. Sci.* *49*, 2848.
- Okita, K., Matsumura, Y., Sato, Y., Okada, A., Morizane, A., Okamoto, S., Hong, H., Nakagawa, M., Tanabe, K., Tezuka, K., et al. (2011). A more efficient method to generate integration-free human iPS cells. *Nat. Methods* *8*, 409–412.
- Okubo, A., Rosa, R.H., Bunce, C.V., Alexander, R.A., Fan, J.T., Bird, A.C., and Luthert, P.J.

(1999). The relationships of age changes in retinal pigment epithelium and Bruch's membrane. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* *40*, 443–449.

Owen, C.G., Jarrar, Z., Wormald, R., Cook, D.G., Fletcher, A.E., and Rudnicka, A.R. (2012). The estimated prevalence and incidence of late stage age related macular degeneration in the UK. *Br. J. Ophthalmol.* *96*, 752–756.

Pardue, M.T., Phillips, M.J., Yin, H., Sippy, B.D., Webb-Wood, S., Chow, A.Y., and Ball, S.L. (2005). Neuroprotective Effect of Subretinal Implants in the RCS Rat. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* *46*, 674–682.

Park, I.-H., Arora, N., Huo, H., Maherali, N., Ahfeldt, T., Shimamura, A., Lensch, M.W., Cowan, C., Hochedlinger, K., and Daley, G.Q. (2008). Disease-specific induced pluripotent stem (iPS) cells. *Cell* *134*, 877–886.

Parmeggiani, F., Romano, M.R., Costagliola, C., Semeraro, F., Incorvaia, C., D'Angelo, S., Perri, P., De Palma, P., De Nadai, K., and Sebastiani, A. (2012). Mechanism of Inflammation in Age-Related Macular Degeneration. *Mediators Inflamm.* *2012*, 1–16.

Parvini, M., Satarian, L., Parivar, K., Javan, M., Tondar, M., Ahmad, S., and Baharvand, H. (2014). Human Pluripotent Stem Cell-Derived Retinal Pigmented Epithelium in Retinal Treatment: from Bench to Bedside. *Mol. Neurobiol.* *50*, 597–612.

Pascale, M., Salomon-Yves, C., Alain, G., Franck, F., Isabelle, M., Bénédicte, D., Michel, W., Catherine, V.-C., and Jean-François, K. (2014). *Hérédodégénérescences rétiniennes (volume 2 - coffret rétine)* (Lavoisier).

Patel, M., and Yang, S. (2010). Advances in Reprogramming Somatic Cells to Induced Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell Rev.* *6*, 367–380.

Payne, B.A.I., and Chinnery, P.F. (2015). Mitochondrial dysfunction in aging: Much progress but many unresolved questions. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* *1847*, 1347–1353.

Pepe, I.M., Panfoli, I., and Hamm, H.E. (1989). Visual transduction in vertebrate photoreceptors. *Cell Biochem. Biophys.* *14*, 129–137.

Planck, S.R., Huang, X.N., Robertson, J.E., and Rosenbaum, J.T. (1993). Retinal pigment epithelial cells produce interleukin-1 beta and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in response to interleukin-1 alpha. *Curr. Eye Res.* *12*, 205–212.

Popp, N.A., Agrón, E., Hageman, G.S., Tuo, J., Chew, E.Y., and Chan, C.-C. (2016). No Sex Differences in the Frequencies of Common Single Nucleotide Polymorphisms Associated with Age-Related Macular Degeneration. *Curr. Eye Res.* *42*, 470-475.

Praticò, D. (2002). Lipid peroxidation and the aging process. *Sci. Aging Knowl. Environ.* *50*, re5.

Puyal, J., Ginet, V., Vaslin, A., and Clarke, P.G.H. (2008). L'autophagie remplaçant de luxe du protéasome. *Médecine/Sciences* 24, 19–21.

Quiring, R., Walldorf, U., Kloter, U., and Gehring, W.J. (1994). Homology of the eyeless gene of *Drosophila* to the Small eye gene in mice and Aniridia in humans. *Science* 265, 785–789.

Rabin, D.M., Rabin, R.L., Blenkinsop, T.A., Temple, S., and Stern, J.H. (2013). Chronic oxidative stress upregulates Drusen-related protein expression in adult human RPE stem cell-derived RPE cells: a novel culture model for dry AMD. *Aging* 5, 51–66.

Radu, R.A., Hu, J., Jiang, Z., and Bok, D. (2014). Bisretinoid-mediated Complement Activation on Retinal Pigment Epithelial Cells Is Dependent on Complement Factor H Haplotype. *J. Biol. Chem.* 289, 9113–9120.

Rakoczy, P.E., Baines, M., Kennedy, C.J., and Constable, I.J. (1996). Correlation Between Autofluorescent Debris Accumulation and the Presence of Partially Processed Forms of Cathepsin D in Cultured Retinal Pigment Epithelial Cells Challenged with Rod Outer Segments. *Exp. Eye Res.* 63, 159–167.

Ramrattan, R.S., van der Schaft, T.L., Mooy, C.M., de Bruijn, W.C., Mulder, P.G., and de Jong, P.T. (1994). Morphometric analysis of Bruch's membrane, the choriocapillaris, and the choroid in aging. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 35, 2857–2864.

Raviv, S., Bharti, K., Rencus-Lazar, S., Cohen-Tayar, Y., Schyr, R., Evantal, N., Meshorer, E., Zilberberg, A., Idelson, M., Reubinoff, B., et al. (2014). PAX6 Regulates Melanogenesis in the Retinal Pigmented Epithelium through Feed-Forward Regulatory Interactions with MITF. *PLoS Genet.* 10, e1004360.

Raychaudhuri, S., Iartchouk, O., Chin, K., Tan, P.L., Tai, A.K., Ripke, S., Gowrisankar, S., Vemuri, S., Montgomery, K., Yu, Y., et al. (2011). A rare penetrant mutation in CFH confers high risk of age-related macular degeneration. *Nat. Genet.* 43, 1232–1236.

Reichman, S., Terray, A., Slembrouck, A., Nanteau, C., Orioux, G., Habeler, W., Nandrot, E.F., Sahel, J.-A., Monville, C., and Goureau, O. (2014). From confluent human iPS cells to self-forming neural retina and retinal pigmented epithelium. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111, 8518–8523.

Reinisalo, M., Kårlund, A., Koskela, A., Kaarniranta, K., and Karjalainen, R.O. (2015). Polyphenol Stilbenes: Molecular Mechanisms of Defence against Oxidative Stress and Aging-Related Diseases. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2015, 1–24.

Renard (2009). Livre - anatomie de l'oeil et de ses annexes - les annexes du globe: l'orbite, paupieres, voies et glandes lacrymales, les muscles oculo-moteurs, la conjunctive - le globe oculaire: la sclerotique, la cornée, l'iris, chroïde, corps ciliaire, région de l'angle.- Edition Masson.

Renard, and Sellem (2014). Anatomie de la tête et de la portion antérieure du nerf optique - Rapport SFO 2014 - Glaucome primitif à angle ouvert - Chapitre 6.

de Rham, C., and Villard, J. (2014). Potential and Limitation of HLA-Based Banking of Human Pluripotent Stem Cells for Cell Therapy. *J. Immunol. Res.* 2014, 1–6.

Ribeiro, L.A., El-Jaick, K.B., Muenke, M., and Richieri-Costa, A. (2006). SIX3 mutations with holoprosencephaly. *Am. J. Med. Genet. A.* 140, 2577–2583.

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.

Robertis, E.D.P.D. (1983). *Biologie cellulaire et moléculaire* (Presses Université Laval).

Robman, L., Baird, P.N., Dimitrov, P.N., Richardson, A.J., and Guymer, R.H. (2010). C-Reactive Protein Levels and Complement Factor H Polymorphism Interaction in Age-related Macular Degeneration and Its Progression. *Ophthalmology* 117, 1982–1988.

Rosenfeld, P.J., Brown, D.M., Heier, J.S., Boyer, D.S., Kaiser, P.K., Chung, C.Y., and Kim, R.Y. (2006). Ranibizumab for Neovascular Age-Related Macular Degeneration. *N. Engl. J. Med.* 355, 1419–1431.

Rosenkranz, A., Schmaldienst, S., Stuhlmeier, K., Chen, W., Knapp, W., and Zlabinger, G. (1992a). A Microplate Assay for the Detection of Oxidative Products Using 2',7'-Dichlorofluorescein-Diacetate. *J. Immunol. Methods* 156, 39–45.

Rosenkranz, A.R., Schmaldienst, S., Stuhlmeier, K.M., Chen, W., Knapp, W., and Zlabinger, G.J. (1992b). A microplate assay for the detection of oxidative products using 2', 7'-dichlorofluorescein-diacetate. *J. Immunol. Methods* 156, 39–45.

Rovner, B.W., Casten, R.J., and Tasman, W.S. (2002). Effect of Depression on Vision Function in Age-Related Macular Degeneration. *Arch. Ophthalmol.* 120, 1041–1044.

Rudnicka, A.R., Jarrar, Z., Wormald, R., Cook, D.G., Fletcher, A., and Owen, C.G. (2012). Age and Gender Variations in Age-related Macular Degeneration Prevalence in Populations of European Ancestry: A Meta-analysis. *Ophthalmology* 119, 571–580.

Saenz-de-Viteri, M., Fernández-Robredo, P., Hernández, M., Bezunartea, J., Reiter, N., Recalde, S., and García-Layana, A. (2016). Single- and repeated-dose toxicity study of bevacizumab, ranibizumab, and aflibercept in ARPE-19 cells under normal and oxidative stress conditions. *Biochem. Pharmacol.* 103, 129–139.

Saini, J.S., Corneo, B., Miller, J.D., Kiehl, T.R., Wang, Q., Boles, N.C., Blenkinsop, T.A., Stern, J.H., and Temple, S. (2017). Nicotinamide Ameliorates Disease Phenotypes in a Human iPSC Model of Age-Related Macular Degeneration. *Cell Stem Cell*. *20*, 635-647

Salero, E., Blenkinsop, T.A., Corneo, B., Harris, A., Rabin, D., Stern, J.H., and Temple, S. (2012). Adult Human RPE Can Be Activated into a Multipotent Stem Cell that Produces Mesenchymal Derivatives. *Cell Stem Cell* *10*, 88–95.

Salesse, C. (2017). Physiologie du signal visuel r?tinien?: de la phototransduction jusqu?au cycle visuel. *J. Franais Ophtalmol.* *40*, 239–250.

Salminen, A., Kauppinen, A., Hyttinen, J.M., Toropainen, E., and Kaarniranta, K. (2010). Endoplasmic reticulum stress in age-related macular degeneration: trigger for neovascularization. *Mol. Med. Camb. Mass* *16*, 535–542.

Salomon-Yves, C., Eric, S., and Gabriel, Q. (2014). Dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) / Myopie et étiologies de la néovascularisation choroïdienne (volume 7 - coffret rétine) (Lavoisier).

Samuel, W., Jaworski, C., Postnikova, O.A., Kutty, R.K., Duncan, T., Tan, L.X., Poliakov, E., Lakkaraju, A., and Redmond, T.M. (2017). Appropriately differentiated ARPE-19 cells regain phenotype and gene expression profiles similar to those of native RPE cells. *Mol. Vis.* *23*, 60.

Sánchez-Danés, A., Richaud-Patin, Y., Carballo-Carbajal, I., Jiménez-Delgado, S., Caig, C., Mora, S., Di Guglielmo, C., Ezquerro, M., Patel, B., Giralt, A., et al. (2012). Disease-specific phenotypes in dopamine neurons from human iPSC-based models of genetic and sporadic Parkinson's disease. *EMBO Mol. Med.* *4*, 380–395.

Santos, J.H., Mandavilli, B.S., and Van Houten, B. (2002). Measuring oxidative mtDNA damage and repair using quantitative PCR. *Mitochondrial DNA Methods Protoc.* 159–176.

Sarks, S.H. (1976). Ageing and degeneration in the macular region: a clinico-pathological study. *Br. J. Ophthalmol.* *60*, 324–341.

Sauvanet, C., Arnauné-Pelloquin, L., David, C., Belenguer, P., and Rojo, M. (2010). Dynamique et morphologie mitochondriales - Acteurs, mécanismes et pertinence fonctionnelle. *médecine/sciences* *26*, 823–829.

Sawai, H., and Domae, N. (2011). Discrimination between primary necrosis and apoptosis by necrostatin-1 in Annexin V-positive/propidium iodide-negative cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *411*, 569–573.

Schachat, A.P., Hyman, L., Leske, M.C., Connell, A.M., and Wu, S.Y. (1995). Features of age-related macular degeneration in a black population. The Barbados Eye Study Group. *Arch. Ophthalmol. Chic. Ill 1960* *113*, 728–735.

Scholl, H.P.N., Fleckenstein, M., Fritsche, L.G., Schmitz-Valckenberg, S., Göbel, A., Adrion, C., Herold, C., Keilhauer, C.N., Mackensen, F., Mößner, A., et al. (2009). CFH , C3 and ARMS2 Are Significant Risk Loci for Susceptibility but Not for Disease Progression of Geographic Atrophy Due to AMD. *PLOS ONE* 4, e7418.

Schwartz, S.D., Hubschman, J.-P., Heilwell, G., Franco-Cardenas, V., Pan, C.K., Ostrick, R.M., Mickunas, E., Gay, R., Klimanskaya, I., and Lanza, R. (2012). Embryonic stem cell trials for macular degeneration: a preliminary report. *The Lancet* 379, 713–720.

Schwartz, S.D., Regillo, C.D., Lam, B.L., Elliott, D., Rosenfeld, P.J., Gregori, N.Z., Hubschman, J.-P., Davis, J.L., Heilwell, G., Spirm, M., et al. (2015). Human embryonic stem cell-derived retinal pigment epithelium in patients with age-related macular degeneration and Stargardt’s macular dystrophy: follow-up of two open-label phase 1/2 studies. *The Lancet* 385, 509–516.

Scott W. Cousins (2015). Role of Mitochondrial Dysfunction in Dry Age-Related Macular Degeneration. *Retina Today*.

Seddon, J.M., Rosner, B., Sperduto, R.D., Yannuzzi, L., Haller, J.A., Blair, N.P., and Willett, W. (2001). Dietary fat and risk for advanced age-related macular degeneration. *Arch. Ophthalmol. Chic. Ill* 1960 119, 1191–1199.

Seddon JM, Rosner B, Sperduto RD, and et al (2001). Dietary fat and risk for advanced age-related macular degeneration. *Arch. Ophthalmol.* 119, 1191–1199.

Sharma, K., Sharma, N.K., and Anand, A. (2014). Why AMD is a disease of ageing and not of development: mechanisms and insights. *Front. Aging Neurosci.* 6:151.

Sheu, S.-J., Chao, Y.-M., Liu, N.-C., and Chan, J.Y.H. (2015). Differential effects of bevacizumab, ranibizumab and aflibercept on cell viability, phagocytosis and mitochondrial bioenergetics of retinal pigment epithelial cell. *Acta Ophthalmol. (Copenh.)* 93, e631-643.

Shichi, H. (1969). Microsomal electron transfer system of bovine retinal pigment epithelium. *Exp. Eye Res.* 8, 60–68.

Shigenaga, M.K., Hagen, T.M., and Ames, B.N. (1994). Oxidative damage and mitochondrial decay in aging. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91, 10771–10778.

Singh, R., Shen, W., Kuai, D., Martin, J.M., Guo, X., Smith, M.A., Perez, E.T., Phillips, M.J., Simonett, J.M., Wallace, K.A., et al. (2013). iPS cell modeling of Best disease: insights into the pathophysiology of an inherited macular degeneration. *Hum. Mol. Genet.* 22, 593–607.

Singh, R., Kuai, D., Guziewicz, K.E., Meyer, J., Wilson, M., Lu, J., Smith, M., Clark, E., Verhoeven, A., Aguirre, G.D., et al. (2015). Pharmacological Modulation of Photoreceptor Outer Segment Degradation in a Human iPS Cell Model of Inherited Macular Degeneration. *Mol. Ther.* 23, 1700–1711.

- Slakter, J.S., and Stur, M. (2005). Quality of Life in Patients With Age-related Macular Degeneration: Impact of the Condition and Benefits of Treatment. *Surv. Ophthalmol.* *50*, 263–273.
- Smailhodzic, D., van Asten, F., Blom, A.M., Mohlin, F.C., den Hollander, A.I., van de Ven, J.P.H., van Huet, R.A.C., Groenewoud, J.M.M., Tian, Y., Berendschot, T.T.J.M., et al. (2014). Zinc Supplementation Inhibits Complement Activation in Age-Related Macular Degeneration. *PLoS ONE* *9*, e112682.
- Smith, W., Mitchell, P., and Wang, J.J. (1997). Gender, oestrogen, hormone replacement and age-related macular degeneration: results from the Blue Mountains Eye Study. *Aust. N. Z. J. Ophthalmol.* *25 Suppl 1*, S13-15.
- Song, C., Mitter, S.K., Qi, X., Beli, E., Rao, H.V., Ding, J., Ip, C.S., Gu, H., Akin, D., Dunn, W.A., et al. (2017). Oxidative stress-mediated NFκB phosphorylation upregulates p62/SQSTM1 and promotes retinal pigmented epithelial cell survival through increased autophagy. *PloS One* *12*, e0171940.
- Song, D., Kanu, L.N., Li, Y., Kelly, K.L., Bhuyan, R.K., Aleman, T., Morgan, J.I.W., and Dunaief, J.L. (2016). AMD-like retinopathy associated with intravenous iron. *Exp. Eye Res.* *151*, 122–133.
- Song, H., Chui, T.Y.P., Zhong, Z., Elsner, A.E., and Burns, S.A. (2011). Variation of cone photoreceptor packing density with retinal eccentricity and age. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* *52*, 7376–7384.
- Song, W.K., Park, K.-M., Kim, H.-J., Lee, J.H., Choi, J., Chong, S.Y., Shim, S.H., Del Priore, L.V., and Lanza, R. (2015). Treatment of macular degeneration using embryonic stem cell-derived retinal pigment epithelium: preliminary results in Asian patients. *Stem Cell Rep.* *4*, 860–872.
- Soubrane, G., Coscas, G., and Souied, É. (2007). *Les DMLAs*. Société française d'ophtalmologie (Issy-les-Moulineaux: Elsevier-Masson).
- Souied, É (2013). Génétique de la DMLA. *Bull. Acad. Natle Méd.* *17(7)*, 1333-1338.
- Sparrow, J.R., and Boulton, M. (2005). RPE lipofuscin and its role in retinal pathobiology. *Exp. Eye Res.* *80*, 595–606.
- Sparrow, J.R., Gregory-Roberts, E., Yamamoto, K., Blonska, A., Ghosh, S.K., Ueda, K., and Zhou, J. (2012). The Bisretinoids of Retinal Pigment Epithelium. *Prog. Retin. Eye Res.* *31*, 121–135.
- Stefánsson, E., Geirsdóttir, Á., and Sigurdsson, H. (2011). Metabolic physiology in age related macular degeneration. *Prog. Retin. Eye Res.* *30*, 72–80.

- Stevens, G.A., White, R.A., Flaxman, S.R., Price, H., Jonas, J.B., Keeffe, J., Leasher, J., Naidoo, K., Pesudovs, K., Resnikoff, S., et al. (2013). Global Prevalence of Vision Impairment and Blindness. *Ophthalmology* *120*, 2377–2384.
- Stitt, A.W. (2005). The Maillard Reaction in Eye Diseases. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *1043*, 582–597.
- Strauss, O. (2005). The retinal pigment epithelium in visual function. *Physiol. Rev.* *85*, 845–881.
- Strauss, O., Stumpff, F., Mergler, S., Wienrich, M., and Wiederholt, M. (1998). The Royal College of Surgeons rat: an animal model for inherited retinal degeneration with a still unknown genetic defect. *Acta Anat. (Basel)* *162*, 101–111.
- Stryer, L. (1988). Molecular Basis of Visual Excitation. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* *53*, 283–294.
- Stryker, W.S., Kaplan, L.A., Stein, E.A., Stampfer, M.J., Sober, A., and Willett, W.C. (1988). The relation of diet, cigarette smoking, and alcohol consumption to plasma beta-carotene and alpha-tocopherol levels. *Am. J. Epidemiol.* *127*, 283–296.
- Sugino, I.K., Gullapalli, V.K., Sun, Q., Wang, J., Nunes, C.F., Cheewatrakoolpong, N., Johnson, A.C., Degner, B.C., Hua, J., Liu, T., et al. (2011). Cell-Deposited Matrix Improves Retinal Pigment Epithelium Survival on Aged Submacular Human Bruch's Membrane. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* *52*, 1345–1358.
- Sugioka, R., Shimizu, S., and Tsujimoto, Y. (2004). Fzo1, a protein involved in mitochondrial fusion, inhibits apoptosis. *J. Biol. Chem.* *279*, 52726–52734.
- Sugita, S., Iwasaki, Y., Makabe, K., Kimura, T., Futagami, T., Suegami, S., and Takahashi, M. (2016). Lack of T Cell Response to iPSC-Derived Retinal Pigment Epithelial Cells from HLA Homozygous Donors. *Stem Cell Rep.* *7*(4), 619–634.
- Sundelin, S., Wihlmark, U., Nilsson S E G., Brunk, T. (1998). Lipofuscin Accumulation in Cultured Retinal Pigment Epithelial Cells Reduces Their Phagocytic Capacity. *Current Eye Research.* *17*(8), 851–857.
- Sunness, J.S., Margalit, E., Srikumaran, D., Applegate, C.A., Tian, Y., Perry, D., Hawkins, B.S., and Bressler, N.M. (2007). The Long-term Natural History of Geographic Atrophy from Age-Related Macular Degeneration. *Ophthalmology* *114*, 271–277.
- Tachibana, M., Amato, P., Sparman, M., Gutierrez, N.M., Tippner-Hedges, R., Ma, H., Kang, E., Fulati, A., Lee, H.-S., Sritanaudomchai, H., et al. (2013). Human Embryonic Stem Cells Derived by Somatic Cell Nuclear Transfer. *Cell* *153*, 1228–1238.
- Tachibanaki, S., Shimauchi-Matsukawa, Y., Arinobu, D., and Kawamura, S. (2006). Molecular

Mechanisms Characterizing Cone Photoresponses. *Photochem. Photobiol.* 83(1), 19-26.

Tada, M., Takahama, Y., Abe, K., Nakatsuji, N., and Tada, T. (2001). Nuclear reprogramming of somatic cells by in vitro hybridization with ES cells. *Curr. Biol.* 11, 1553–1558.

Taghilo, S., Allahmoradi, E., Tehrani, M., Hossein-Nataj, H., Shekarriz, R., Janbabaie, G., Abediankenari, S., and Asgarian-Omran, H. (2017). Frequency and functional characterization of Exhausted CD8⁺ T-cells in chronic lymphocytic leukemia. *Eur. J. Haematol.* 98(6), 622-631.

Takahashi, M. (2016). [Retinal Cell Therapy Using iPS Cells]. *Nippon Ganka Gakkai Zasshi* 120, 210–224; discussion 225.

Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2006). Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell* 126, 663–676.

Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., and Yamanaka, S. (2007). Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell* 131, 861–872.

Tamarit, J., Obis, È., and Ros, J. (2016). Oxidative stress and altered lipid metabolism in Friedreich ataxia. *Free Radic. Biol. Med.* 100, 138–146.

Tan, J.S.L., Wang, J.J., Flood, V., Rochtchina, E., Smith, W., and Mitchell, P. (2008). Dietary Antioxidants and the Long-term Incidence of Age-Related Macular Degeneration. *Ophthalmology* 115, 334–341.

Tang, Z., Zhang, Y., Wang, Y., Zhang, D., Shen, B., Luo, M., and Gu, P. (2017). Progress of stem/progenitor cell-based therapy for retinal degeneration. *J. Transl. Med.* 15:99.

Taylor, C.J., Bolton, E.M., and Bradley, J.A. (2011). Immunological considerations for embryonic and induced pluripotent stem cell banking. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 366, 2312–2322.

Terluk, M.R., Kappahn, R.J., Soukup, L.M., Gong, H., Gallardo, C., Montezuma, S.R., and Ferrington, D.A. (2015). Investigating Mitochondria as a Target for Treating Age-Related Macular Degeneration. *J. Neurosci.* 35, 7304–7311.

Thomas, B.B., Zhu, D., Zhang, L., Thomas, P.B., Hu, Y., Nazari, H., Stefanini, F., Falabella, P., Clegg, D.O., Hinton, D.R., et al. (2016). Survival and Functionality of hESC-Derived Retinal Pigment Epithelium Cells Cultured as a Monolayer on Polymer Substrates Transplanted in RCS Rats. *Investig. Ophthalmology Vis. Sci.* 57, 2877.

Tian, B., Al-Moujahed, A., Bouzika, P., Hu, Y., Notomi, S., Tsoka, P., Miller, J.W., Lin, H., and Vavvas, D.G. (2017). Atorvastatin Promotes Phagocytosis and Attenuates Pro-Inflammatory Response in Human Retinal Pigment Epithelial Cells. *Sci. Rep.* 7, 2329.

Tsujimoto, Y. (1997). Apoptosis and necrosis: intracellular ATP level as a determinant for cell

death modes. *Cell Death Differ.* 4(6), 249-434.

Valapala, M., Wilson, C., Hose, S., Bhutto, I.A., Grebe, R., Dong, A., Greenbaum, S., Gu, L., Sengupta, S., Cano, M., et al. (2014). Lysosomal-mediated waste clearance in retinal pigment epithelial cells is regulated by CRYBA1/ β A3/A1-crystallin via V-ATPase-MTORC1 signaling. *Autophagy* 10, 480–496.

Vermes, I., Haanen, C., Steffens-Nakken, H., and Reutellingsperger, C. (1995). A novel assay for apoptosis Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J. Immunol. Methods* 184, 39–51.

Vingerling, J.R., Hofman, A., Grobbee, D.E., and de Jong, P.T. (1996). Age-related macular degeneration and smoking. The Rotterdam Study. *Arch. Ophthalmol. Chic. Ill 1960* 114, 1193–1196.

Vollrath, D., Feng, W., Duncan, J.L., Yasumura, D., D’Cruz, P.M., Chappelow, A., Matthes, M.T., Kay, M.A., and LaVail, M.M. (2001). Correction of the retinal dystrophy phenotype of the RCS rat by viral gene transfer of Mertk. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 12584–12589.

Vu, K.T., and Hulleman, J.D. (2017). An inducible form of NRF2 confers enhanced protection against acute oxidative stresses in RPE cells. *Exp. Eye Res.* 164, 31-36.

Wang, A.L., Lukas, T.J., Yuan, M., Du, N., Tso, M.O., and Neufeld, A.H. (2009). Autophagy and exosomes in the aged retinal pigment epithelium: possible relevance to drusen formation and age-related macular degeneration. *PloS One* 4, e4160.

Wang, J.J., Foran, S., Smith, W., and Mitchell, P. (2003). Risk of age-related macular degeneration in eyes with macular drusen or hyperpigmentation: the Blue Mountains Eye Study cohort. *Arch. Ophthalmol. Chic. Ill 1960* 121, 658–663.

Wang, N.-K., Tosi, J., Kasanuki, J.M., Chou, C.L., Kong, J., Parmalee, N., Wert, K.J., Allikmets, R., Lai, C.-C., Chien, C.-L., et al. (2010). Transplantation of reprogrammed embryonic stem cells improves visual function in a mouse model for retinitis pigmentosa. *Transplantation* 89, 911–919.

Wang, X., Yang, H., Yanagisawa, D., Bellier, J.-P., Morino, K., Zhao, S., Liu, P., Vigers, P., and Tooyama, I. (2016). Mitochondrial ferritin affects mitochondria by stabilizing HIF-1 α in retinal pigment epithelium: implications for the pathophysiology of age-related macular degeneration. *Neurobiol. Aging* 47, 168–179.

Ward, R.J., Dexter, D.T., and Crichton, R.R. (2015). Ageing, neuroinflammation and neurodegeneration. *Front. Biosci. Sch. Ed.* 7, 189–204.

Wei, W., Li, L., Zhang, Y., Geriletu, Yang, J., Zhang, Y., and Xing, Y. (2014). Vitamin C Protected Human Retinal Pigmented Epithelium from Oxidant Injury Depending on Regulating

SIRT1. *Sci. World J.* 2014:7506634.

Wernig, M., Zhao, J.-P., Pruszak, J., Hedlund, E., Fu, D., Soldner, F., Broccoli, V., Constantine-Paton, M., Isacson, O., and Jaenisch, R. (2008). Neurons derived from reprogrammed fibroblasts functionally integrate into the fetal brain and improve symptoms of rats with Parkinson's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 5856–5861.

Wielgus, A.R., Collier, R.J., Martin, E., Lih, F.B., Tomer, K.B., Chignell, C.F., and Roberts, J.E. (2010). Blue light induced A2E oxidation in rat eyes--experimental animal model of dry AMD. *Photochem. Photobiol. Sci. Off. J. Eur. Photochem. Assoc. Eur. Soc. Photobiol.* 9, 1505–1512.

Wilmut, I., Schnieke, A.E., McWhir, J., Kind, A.J., and Campbell, K.H. (1997). Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 385, 810–813.

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.

Yamagishi, S., Maeda, S., Matsui, T., Ueda, S., Fukami, K., and Okuda, S. (2012). Role of advanced glycation end products (AGEs) and oxidative stress in vascular complications in diabetes. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* 1820, 663–671.

Yefimova, M.G., Jeanny, J.-C., Guillonneau, X., Keller, N., Nguyen-Legros, J., Sergeant, C., Guillou, F., and Courtois, Y. (2000). Iron, Ferritin, Transferrin, and Transferrin Receptor in the Adult Rat Retina. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 41, 2343–2351.

Yefimova, M.G., Jeanny, J.-C., Keller, N., Sergeant, C., Guillonneau, X., Beaumont, C., and Courtois, Y. (2002). Impaired Retinal Iron Homeostasis Associated with Defective Phagocytosis in Royal College of Surgeons Rats. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 43, 537–545.

Youle, R.J., and van der Bliek, A.M. (2012). Mitochondrial Fission, Fusion, and Stress. *Science* 337, 1062–1065.

Yu, A.L., Birke, K., Burger, J., and Welge-Lussen, U. (2012). Biological Effects of Cigarette Smoke in Cultured Human Retinal Pigment Epithelial Cells. *PLoS ONE.* 7(11), e48501.

Yu, H., Guo, P., Xie, X., Wang, Y., and Chen, G. (2017). Ferroptosis, a new form of cell death, and its relationships with tumourous diseases. *J. Cell. Mol. Med.* 21, 648–657.

Yu, J., Vodyanik, M.A., He, P., Slukvin, I.I., and Thomson, J.A. (2006). Human embryonic stem cells reprogram myeloid precursors following cell-cell fusion. *Stem Cells Dayt. Ohio* 24, 168–176.

Yu, J., Vodyanik, M.A., Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J.L., Tian, S., Nie, J., Jonsdottir, G.A., Ruotti, V., Stewart, R., et al. (2007). Induced pluripotent stem cell lines

derived from human somatic cells. *Science* 318, 1917–1920.

Zapata-Linares, N., Rodriguez, S., Mazo, M., Abizanda, G., Andreu, E.J., Barajas, M., Prosper, F., and Rodriguez-Madoz, J.R. (2016). Generation and characterization of human iPSC line generated from mesenchymal stem cells derived from adipose tissue. *Stem Cell Res.* 16, 20–23.

Zetterberg, M. (2016). Age-related eye disease and gender. *Maturitas* 83, 19–26.

Zhang, X.-Y., Ng, T.K., Brelén, M.E., Chan, K.P., Wu, D., Yung, J.S.Y., Cao, D., Wang, Y., Zhang, S., Chan, S.O., et al. (2017). Disruption of retinal pigment epithelial cell properties under the exposure of cotinine. *Sci. Rep.* 7, 3139.

Zhao, X., Pack, W., Khan, N.W., and Wong, K.Y. (2016). Prolonged Inner Retinal Photoreception Depends on the Visual Retinoid Cycle. *J. Neurosci.* 36, 4209–4217.

Zhu, Y., Zhao, K., Tong, Y., Zhou, Y., Wang, Y., Zhao, P., and Wang, Z. (2016). Exogenous NAD⁺ decreases oxidative stress and protects H₂O₂-treated RPE cells against necrotic death through the up-regulation of autophagy. *Sci. Rep.* 6, 26322.

Zorov, D.B., Popkov, V.A., Zorova, L.D., Vorobjev, I.A., Pevzner, I.B., Silachev, D.N., Zorov, S.D., Jankauskas, S.S., Babenko, V.A., and Plotnikov, E.Y. (2016). Mitochondrial Aging: Is There a Mitochondrial Clock? *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* 72(9), 1171-1179.

Zorova, L.D., Popkov, V.A., Plotnikov, E.Y., Silachev, D.N., Pevzner, I.B., Jankauskas, S.S., Babenko, V.A., Zorov, S.D., Balakireva, A.V., Juhaszova, M., et al. (2017). Mitochondrial membrane potential. *Anal. Biochem.* pii:S003-2697(17)30293-2.

Résumé

Première cause de baisse d'acuité visuelle dans les pays industrialisés, la dégénérescence maculaire liée l'âge (DMLA) est une pathologie de la rétine touchant principalement les personnes après 55 ans. Elle est caractérisée par une dégénérescence de la zone maculaire de la rétine et par la formation de drusens. Il existe deux formes de la maladie : la forme exsudative et la forme atrophique. Dans notre étude, nous nous sommes focalisés sur la DMLA atrophique, actuellement sans traitement curatif et qui correspond à environ 50% des cas cliniques en Europe. Malgré de nombreuses recherches, les causes de la DMLA restent encore mal comprises même si des facteurs environnementaux (sénescence, accumulation de lipofuscine, stress oxydatif) et génétiques sont probablement combinés. Selon l'hypothèse étiopathogénique, le dysfonctionnement des cellules de l'épithélium pigmenté de la rétine (EPR) est au centre des événements physiopathologiques de la DMLA. A partir de sujets sains et de patients atteints de la DMLA atrophique, nous avons obtenu des cellules de l'EPR dérivées de cellules souches pluripotentes induites et développé un modèle cellulaire humain utile pour la compréhension des mécanismes physiopathologiques de la DMLA. Ainsi, l'étude morphologique et fonctionnelle de ces deux populations de cellules a souligné un phénotype particulier des cellules de l'EPR provenant de patients atteints pas la DMLA en condition basale et en milieu pro-oxydant. Ce modèle cellulaire pourra nous permettre d'approfondir nos connaissances sur les mécanismes amenant au développement de la DMLA et pourra aussi être utilisé pour le screening des molécules au cours des étapes précliniques.

Mots-clés : DMLA – cellules de l'EPR – cellules souches pluripotentes induites – modèle cellulaire – stress oxydatif - fer

Abstract

First cause of irreversible visual dysfunction in industrialized countries, age-related macular degeneration (AMD) is a retinal disease affecting people after 55 years old. AMD is characterized by the macular degeneration of retina and by formation of drusen. There exist two forms of the disease: the exudative and the atrophic forms. In our study, we focused only on the atrophic one, corresponding to approximately 50% of the clinical cases in Europe, that still today without curative therapy. Despite many researches, AMD's etiology remains unclear even if environmental and genetics factors would be involved. According to the etiopatogenic hypothesis, RPE cells dysfunction has a central role in the physiopathological events leading to AMD. From healthy subjects and patients affected by atrophic AMD, we obtained RPE cells derived from induced pluripotent stem cells and developed a useful human cellular model for the understanding of AMD mechanisms. Indeed, the morphological and functional study of the two types of cells populations underlined a particular phenotype for the RPE cells derived from AMD patients. This cellular model will allow us to have a better understanding of mechanisms leading to AMD and will also be used to screen therapeutic molecules before clinical studies.

Keywords: AMD – RPE cells – induced pluripotent stem cells – cellular model – oxidative stress - iron