

Article dans Bulletin de l'Académie Nationale de Médecine FER ET PROTEINES REGULATRICES DANS LA RETINE NORMALE ET PATHOLOGIQUE

Jean-Claude Jeanny, Émilie Picard, Claire Sergeant, Laurent Jonet, Marina Yefimova, Yves Courtois

▶ **To cite this version:**

Jean-Claude Jeanny, Émilie Picard, Claire Sergeant, Laurent Jonet, Marina Yefimova, et al.. Article dans Bulletin de l'Académie Nationale de Médecine FER ET PROTEINES REGULATRICES DANS LA RETINE NORMALE ET PATHOLOGIQUE. Bulletin de l'Académie Nationale de Médecine, 2013, 197 (3), pp.661-74; discussion 674-5. inserm-02983671

HAL Id: inserm-02983671

https://inserm.hal.science/inserm-02983671

Submitted on 30 Oct 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.

Article dans Bulletin de l'Académie Nationale de Médecine

FER ET PROTEINES REGULATRICES DANS LA RETINE NORMALE ET PATHOLOGIQUE

Jean-Claude JEANNY[1], Emilie PICARD[1], Claire SERGEANT[2], Laurent JONET[1], Marina YEFIMOVA[13], Yves COURTOIS[1]

[1]INSERM, UMRS 872, Equipe 17, Physiopathologie des Maladies Oculaires : Innovations Thérapeutiques, Université René Descartes Sorbonne Paris Cité, Université Pierre et Marie Curie Paris, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Centre de Recherche des Cordeliers, 15 Rue de l'Ecole de Médecine, 75006 Paris, France.
[2]UMR5084, CNRS, Centre de Physique Nucléaire, Bordeaux-Gradignan, France.
[3]Institut Sechenov, Saint-Petersbourg, Russie.

RESUME
Le fer est un oligo-élément nécessaire au métabolisme cellulaire, mais en excès, il peut-être toxique. Il peut générer des radicaux libres oxygénés par le biais de la réaction de Fenton. Son accumulation a été mise en évidence dans la rétine de patients atteints de dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA). Nous avons montré son accumulation au niveau des segments des photorécepteurs dans deux modèles animaux de dégénérescence rétinienne d'origine génétique (rats RCS et souris Rd10), ainsi que le rôle protecteur de la transferrine vis-à-vis de la mort des photorécepteurs. Nos études soulignent le rôle thérapeutique potentiel de la Transferrine dans des maladies dégénératives de la rétine comme les rétinopathies pigmentaires et la DMLA.

SUMMARY
Iron is necessary for cell metabolism, but iron excess can be toxic. It can generate oxygen free radicals through the Fenton reaction. Iron accumulation was observed in the retina from patients with age-related macular degeneration (AMD). We have shown its accumulation in the photoreceptor segments in two animal models of genetic retinal degeneration (RCS rats and Rd10 mice). In these rodents, hTf intraperitoneally injected or expressed by genetic modification permitted to delay photoreceptor degeneration. Our studies highlight the therapeutical potential of Tf in degenerative processes like in retinitis pigmentosa and AMD.

MOTS CLES : Fer, Rétine, Transferrine, Dégénérescences, Photorécepteurs, Survie cellulaire.

KEY WORDS: Iron, Retina, Transferrin, Degeneration, Photoreceptors, Cell survival.

INTRODUCTION

Métabolisme du fer chez l'homme

Le fer de l'alimentation est réduit de l'état ferrique à ferreux dans la lumière du duodénum et du jéjunum proximal. Le fer ferreux libre est alors transporté au travers de la surface luminale dans les entérocytes par un transporteur de cation divalent (DMT1 pour « Divalent Metal Transporter-1 »). Afin d'atteindre le flux sanguin, il est ensuite transporté au travers de la membrane baso-latérale de l'entérocyte par une autre protéine transporteuse : la ferroportine (Fpn). Celle-ci est exprimée dans beaucoup de tissus (placenta, intestin, macrophages, hépatocytes, poumon, cerveau), y compris dans la rétine [1]. Elle fonctionne conjointement avec des ferroxidases, la ceruloplasmine (Cp) et l'hephaestine (Heph), qui oxydent le fer ferreux dans un état ferrique, ce qui permet son transport. De plus, une

hormone sérique récemment découverte, l'hepcidine, régule l'absorption du fer en déclenchant la dégradation de la ferroportine [2]. Au final, une fois que le fer a été absorbé par les entérocytes et qu'il en a été exporté, la majeure partie du fer non-héminique dans la circulation sanguine est lié à une autre protéine sérique : la transferrine (Tf). Le fer circulant transporté par la transferrine nécessite alors un mécanisme spécial pour traverser dans l'œil les barrières hémato-rétiniennes interne et externe (BHR), puisque la Tf seule ne le pourrait pas. La Tf, une glycoprotéine bilobée de 679 acides aminés et 79 kDa, chargée de deux molécules de fer Fe3+ se lie à son récepteur (TfR) au niveau des cellules des BHR. Après endocytose, le fer ferrique est libéré de la Tf du fait de l'acidification des endosomes [3]. Le complexe Tf-TfR retourne ensuite à la surface cellulaire et le fer se répartit entre trois pools distincts : les pools de transit, fonctionnel et de stockage.

- Le compartiment de transit est cytosolique et constitue une plaque tournante, à partir de laquelle les pools fonctionnels ou de stockage sont approvisionnés en fer. Le fer qu'il contient correspond soit au fer entré dans la cellule sous forme lié (ou non) à la Tf, soit au fer intracellulaire mobilisé à partir des sites fonctionnels et de stockage. Il s'agit donc d'un compartiment en équilibre entre les milieux intra- et extracellulaires. La présence d'un excès de fer est à l'origine de radicaux libres générant des lésions cellulaires potentiellement graves.

-Le pool fonctionnel correspond au fer nécessaire aux différentes voies métaboliques indispensables à la survie des cellules. Il s'agit plus particulièrement du fer incorporé dans les protéines héminiques (hémoglobine, cytochromes), mais aussi du fer cofacteur de multiples réactions enzymatiques.

-Le pool de stockage est représenté principalement par le fer incorporé au sein de la ferritine, voire de l'hémosidérine. La ferritine (Ft) est une protéine multimérique de 450 kDa, capable de fixer prés de 4500 atomes de fer ferrique [4]. La ferritine est la combinaison d'une chaine lourde (H-Ft) de 21kDa et d'une chaine légère (L-Ft) de 19,5kDa. Outre sa taille, la H-Ft diffère de la L-Ft par le fait qu'elle possède une activité ferroxidase qui lui permet de convertir rapidement le fer ferreux en fer ferrique ainsi stocké. Une homéostasie équilibrée du fer s'impose pour apporter le fer nécessaire aux fonctions cellulaires mais éviter simultanément sa toxicité lorsqu'il est en excès. Cet équilibre est médié par des protéines régulatrices (IRPs pour « Iron Regulatory Proteins »), qui contrôlent les taux de protéines reliées au fer. Ceci s'opère par la liaison des IRPs aux IREs (« Iron-responsive elements ») sur les ARN messagers, quand les taux de fer libre intracellulaire sont anormaux. Par exemple, un état de relative déficience en fer requiert une expression diminuée des protéines de stockage du fer, telle que la Ft, et une expression décrue de TfR. A ces fins, les IRPs se lient en 5' à l'IRE sur les ARNm de la Ft et empêchent sa traduction, alors que d'autres IRPs se lient en 3' à l'IRE de l'ARNm de la TfR, protégeant l'ARNm de sa dégradation et conduisant à une expression protéique accrue de TfR [3]. Toutes les étapes de transport, stockage, exportation et régulation sont résumées dans la Figure 1. En résumé, le fer est nécessaire au métabolisme cellulaire, mais en excès, il peut être toxique par la formation de radicaux libres oxygénés par le biais de la réaction de Fenton. Les taux de fer sont finement régulés et toute anomalie dans son homéostasie peut potentiellement être la cause de pathologies oculaires. Avant d'aborder ce point, voyons d'abord l'état des connaissances sur le rôle physiologique du fer et des protéines de son homéostasie dans la rétine.

<u>Fer et rétine normale</u>

La rétine est la couche du segment postérieur de l'œil, qui convertit le signal lumineux en un signal électrique, qui est véhiculé via les neurones jusqu'aux centres visuels dans le cerveau. Elle est constituée de deux couches : la rétine neurale ou neurosensorielle et l'épithélium pigmentaire de la rétine (EPR). Ce dernier absorbe l'excès de lumière et assure le maintien des photorécepteurs dont les segments externes sont constitués par un empilement de

disques, qui contiennent un photopigment, la rhodopsine, nécessaire à la transduction du signal visuel. La rétine neurale est faite de photorécepteurs cônes et bâtonnets, de cellules bipolaires, amacrines, horizontales et de cellules ganglionnaires, ainsi que de trois types de cellules gliales : les astrocytes, cellules microgliales et cellules de Müller. Dans la rétine, le fer est nécessaire comme cofacteur pour les activités catalytiques de diverses enzymes : 1) la guanylate cyclase, l'enzyme impliquée dans la synthèse du GMP cyclique qui ouvre les canaux ioniques des photorécepteurs permettant leur hyperpolarisation, 2) RPE65, l'enzyme, spécifique de l'EPR, responsable de la conversion du all trans-retinyl ester en 11-cis retinol [5,6], 3) l'aconitase, l'enzyme nécessaire pour la synthèse du principal neurotransmetteur rétinien, le glutamate, 4) la désaturase des acides gras pour la formation des nouvelles membranes des disques des segments externes des photorécepteurs [7]. Il a donc un rôle physiologique essentiel, mais du fait de la grande toxicité des ions fer libre, son homéostasie est finement regulée par des protéines de transport, de stockage et de régulation. Les deux premières fonctions sont principalement assurées respectivement par la transferrine (Tf) et la ferritine (Ft). La céruloplasmine (Cp), les récepteurs de la transferrine (RTf), la ferroportine (Fpn), l'héphaestine (Heph), les « iron regulatory proteins » (IRP1 et IRP2), l'HFE et l'hepcidine (Hepc), déjà citées précédemment, sont les autres protéines connues pour un rôle dans le métabolisme du fer. Toutes sont synthétisées et présentes dans la rétine externe (Figure 2). La Tf, à titre d'exemple, est secrétée par les cellules gliales de Müller, les photorécepteurs et les cellules épithéliales pigmentées de la rétine. Ainsi la Tf délivre le fer à toutes les cellules ou structures rétiniennes qui possèdent des RTf.

Si le fer est nécessaire au bon fonctionnement cellulaire, son accumulation au sein des tissus peut générer des lésions par libération de radicaux libres par le biais de la Réaction de Fenton ($Fe^{2+} + H_2O_2 \longrightarrow Fe^{3+} + OH° + HO^-$). Cette réaction conduit à la production de radicaux hydroxyles OH°, des entités très réactives et très oxydantes, qui entraînent des lésions des membranes lipidiques par peroxydation, ainsi que de l'ADN et des protéines, conduisant à des dysfonctionnements cellulaires et à l'apoptose. Si de telles modifications dans l'homéostasie du fer ont déjà été observées chez des patients atteints de pathologies neurodégénératives, telles que les maladies d'Alzheimer, de Parkinson et d'Huntington ou l'ataxie de Friedreich, en comparaison, peu d'informations sur le rôle du fer et son implication dans les maladies dégénératives de la rétine ont été décrites [8,9].

Fer et rétine pathologique

Depuis très longtemps, on savait seulement, selon des constatations cliniques chez l'homme, que du fer présent en tant que corps étranger dans l'œil provoquait une sidérose, qui se caractérise par une atrophie du RPE et des PRs. Par ailleurs, les sujets atteints d'acéruloplasminémie, qui est une maladie récessive autosomique, qui présente un déficit en céruloplasmine (enzyme permettant la transformation du fer ferreux toxique à l'état libre, en fer ferrique), peuvent avoir une dégénérescence rétinienne par atrophie des photorécepteurs.

Une des pathologies communes de la rétine, la Dégénérescence Maculaire Liée à l'Age (DMLA), touche les personnes de plus de 60 ans (1,2 million de personnes en France). Elle existe sous deux formes, une forme sèche ou atrophique (80% des cas) et une forme humide ou exsudative (20% des cas). Cette dernière se caractérise par l'apparition au fond d'œil de néovaisseaux d'origine choroïdienne, la choroïde étant le réseau vasculaire de la rétine externe, sous l'EPR, pour l'apport de l'oxygène et des nutriments. La DMLA est une dégénérescence progressive des photorécepteurs, au niveau d'une zone de la rétine centrale appelée macula, et conduisant à une perte de la vision précise et de celle des couleurs. Le premier signe précoce d'apparition de la maladie est l'accumulation sous l'EPR de dépôts appelés drusen. Ces drusen sont constitués de composants de la matrice extracellulaire, de médiateurs de l'immunité, de protéines et de lipides (oxydés). Le taux de fer dans la macula

tend à augmenter avec l'âge chez l'homme, et chez des patients atteints de DMLA, une accumulation de fer est observée dans l'EPR et la membrane de Bruch, ainsi que dans les drusen [10]. Notre hypothèse est que la destruction de l'EPR et des photorécepteurs pourrait résulter de dommages oxydatifs découlant d'un excès de fer dans ces structures.

TRAVAUX PERSONNELS SUR FER ET RETINE NORMALE ET PATHOLOGIQUE

Depuis quelques années, nous nous sommes intéressés, avec Yves Courtois, Marina Yefimova et Emilie Picard, au cycle du fer dans la rétine normale et pathologique au moyen de modèles cellulaires *in vitro* et de modèles animaux de dégénérescence rétinienne d'origine génétique. Nous nous restreindrons ici à développer successivement la recherche du fer dans la rétine externe, ainsi que le rôle neuroprotecteur de la transferrine vis-à-vis des photorécepteurs.

Nous avons d'abord étudié la distribution du fer dans la rétine du rat au cours de l'ontogenèse, ainsi que celle de la transferrine, de la ferritine et du récepteur de la transferrine. Les données obtenues suggéraient l'existence d'un cycle autonome du fer : la transferrine synthétisée par l'épithélium pigmentaire participant au transport du fer vers les photorécepteurs via un récepteur spécifique de la transferrine, présent à leur surface [11].

Nous avons aussi effectué une étude similaire chez le rat RCS, qui développe une dégénérescence héréditaire (mutation dans le gène MERTK) des photorécepteurs de PN23 à PN53 et mime les rétinopathies pigmentaires humaines. Celle-ci a été entreprise avec la collaboration de Claire Sergeant.

Analyse par PIXE (Proton Induced X-Ray Emission) du fer dans la rétine de rats RCS

La concentration en fer et sa distribution tissulaire ont été abordées dans la rétine de rats normaux et RCS à PN35 et PN55. Des coupes à congélation de 20 µm d'épaisseur ont été collectées sur des cibles en aluminium recouvertes d'un film de Formvar et lyophilisées avant analyse par PIXE. Cette méthode avec une microsonde de protons permet une analyse, de part les spectres d'émission de rayons-X, des contenus en métaux (Fe, Cu, Zn …) ou autres éléments dans différentes couches rétiniennes, en particulier celle des photorécepteurs, qui sont identifiées après irradiation par une coloration au bleu de Toluidine (Figure 3). Le contenu en fer, exprimé en µg/g de poids sec et déterminé à PN35, est plus élevé dans les segments internes que dans les segments externes, à la fois chez les rats normaux et RCS (Tableau 1). Quand ces deux segments sont confondus pour permettre une comparaison des teneurs en fer à PN35 et PN55, une accumulation de fer intervient chez le rat RCS, dans la zone des photorécepteurs en voie de dégénérescence (Tableau 1). On considère que cette accumulation entraîne la production de radicaux libres toxiques et par voie de conséquence conduit à la mort par apoptose des photorécepteurs [12-15].

Nous avons étendu cette étude à un autre modèle de dégénérescence rétinienne d'origine génétique, celui de la souris Rd10, qui présente une mutation dans le gène de la sous-unité β de la phosphodiesterase).

Analyse par PIXE du fer dans la rétine de souris Rd10

Les rétines de souris âgées de 2, 3 et 4 semaines ont été étudiées. Leur contenu en potassium est similaire chez les deux types de souris, quel que soit le stade de développement considéré. En revanche, le contenu en fer total (héminique ou non) est plus élevé dans les segments des photorécepteurs chez les souris Rd10 que chez les souris WT et cette accumulation de fer est accrue en fonction du temps, comme chez le rat RCS (Figure 4).

Nous avons poursuivi l'étude de ces deux modèles animaux de dégénérescence rétinienne en abordant le rôle potentiel de la transferrine, qui assure la distribution du fer à travers tout l'organisme, mais qui a aussi la capacité de le chélater et d'être ainsi un anti-

oxydant. Elle est également impliquée dans la différenciation et la croissance et peut jouer le rôle de facteur de survie et de prolifération. Dans un premier temps, nous avons montré le rôle de la surexpression de la transferrine humaine en conditions de stress oxydatif par ajout de fer *in vitro* sur la survie des cellules gliales de Müller [16].

Après quoi, nous avons tenté de répondre à la question suivante : **la transferrine peut-elle avoir un effet neuroprotecteur vis-à-vis des photorécepteurs chez le rat RCS et la souris Rd10?**

Effet de l'injection intrapéritonéale de Transferrine humaine chez le rat RCS

Quatre rats RCS âgés de 17 jours après la naissance (PN17) ont reçu tous les deux jours une injection intrapéritonéale (IP) de 48mg/ml d'apoTfh (sans fer). Pendant les 10 premiers jours (PN17-PN27), les rats ont reçu 0,25ml de solution de Tfh. Les 10 jours suivants, ils ont reçu 0,5ml et ensuite jusqu'à la date du sacrifice (PN52), le volume injecté a été de 1 ml. Trois rats RCS à PN17 ont été injectés IP avec du BSS à titre de contrôle. L'injection de Tfh chez les rats RCS détermine une survie des photorécepteurs, qui a été appréciée, au moyen d'un logiciel d'analyse d'images, à travers la mesure de l'épaisseur de la couche nucléaire externe sur des coupes histologiques en historésine, colorées au bleu de Toluidine (Figure 5).

Forts de ce résultat, nous avons cherché à savoir si la Tf avait aussi la capacité de réduire le taux de fer toxique et de préserver les photorécepteurs de la dégénérescence dans les rétines de souris Rd10. A ces fins, nous avons envisagé deux stratégies différentes. Nous avons généré une souris hybride, possédant la mutation de la βPDE mais exprimant la Tfh et nous avons à nouveau mis en œuvre une stratégie thérapeutique par injection IP de Tfh.

Effet de la Transferrine humaine chez des souris hybrides Rd10/TgTfh

Nous avons généré des souris Rd10/TgTfh, avec la mutation dans le gène de la sous-unité β de la phosphodiesterase et l'expression du transgène Tfh en croisant des souris Rd10 avec des souris transgéniques pour la Tfh.

Dans un premier temps, nous avons mesuré la quantité de Tfh dans la rétine de souris Rd10, Rd10/WT, Rd10/Tfh et TgTfh. Comme attendu, il n'y a aucune expression de Tfh dans la rétine neurale des souris Rd10 et Rd10/WT. La concentration rétinienne en Tfh des souris Rd10/Tfh est similaire à celle des souris TgTfh (Figure 6A). Les souris Rd10/TgTfh âgées de 3 semaines montrent une baisse de la mort des photorécepteurs comparées aux souris Rd10 (Figure 6B-E). L'épaisseur de la couche nucléaire externe est plus élevée chez les souris Rd10/Tfh que chez les souris Rd10/WT ou Rd10 (2,6 fois plus entre 400 et 1200µm au pôle inférieur de la rétine) (Figure 6F).

Effet de l'injection intrapéritonéale de Transferrine humaine chez la souris Rd10

Des souris Rd10, âgées de 5 jours, ont été injectées intrapéritonéalement, tous les jours, jusqu'à 25 et 47 jours après la naissance, avec de la Tfh à 4 doses différentes (6, 12, 24 et 48mg/ml). La concentration rétinienne en Tfh des souris Rd10 injectées avec les doses les plus élevées (24 et 48mg/ml) est similaire à celle des souris Rd10/Tfh ou TgTfh, générées et mentionnées ci-avant (Figure 7A). A PN25, la dégénérescence des photorécepteurs est considérablement réduite à ces deux doses (Figure 7B-E). Chez les souris Rd10 injectées avec 48mg/ml de Tfh, l'épaisseur de la couche nucléaire externe est plus grande (entre 6,3 et 3,7 fois respectivement aux pôles supérieur et inférieur de la rétine) que chez les souris injectées avec du BSS (Figure 7F).

Dans les deux cas, la Tfh est donc présente dans la rétine des souris et préserve de manière dose-dépendante les photorécepteurs cônes et bâtonnets de la mort cellulaire [17].

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Le potentiel thérapeutique de la transferrine pour les maladies dégénératives de la rétine, comme les rétinopathies pigmentaires et la DMLA, nécessitent encore des études fondamentales complémentaires. Nos recherches visent à vérifier le rôle neuroprotecteur de la transferrine dans d'autres modèles animaux de dégénérescence rétinienne, d'origine génétique (rat P23H) ou expérimentalement induite par illumination continue avec de la lumière blanche, verte ou bleue. Nous envisageons également de rechercher si la survie des photorécepteurs s'accompagne d'une préservation de la fonction visuelle, par la réalisation, dans les modèles ci-dessus, d'électrorétinogrammes (ERG) et de tests optocinétiques. Nous projetons enfin de tester d'autres voies d'administration ou d'expression de la transferrine : par instillation, par injection intra-vitréenne de la protéine ou injection dans le muscle ciliaire ou suprachoroïdale d'un plasmide codant la transferrine humaine et électroporation.

REMERCIEMENTS
Deux des auteurs (YC et JCJ) remercient vivement l'Académie Nationale de Médecine de leur avoir décerné en 2009 et 2011, pour ce travail, le Prix Raymonde Destreicher ayant trait à la Médecine des yeux.

BIBLIOGRAPHIE

[1] DENTCHEV T., HAHN P., DUNAIEF J.L. - Strong labeling for iron and the iron-handling proteins ferritin and ferroportin in the photoreceptor layer in age-related macular degeneration. Arch. Ophthalmol. 2005,123, 1745-1746.

[2] ATANASIU V., MANOLESCU B., STOIAN I. - Hepcidin-central regulator of iron metabolism. European Journal of Haematology, 2007, 78, 1-10.

[3] HE X., HAHN P., IACOVELLI J., WONG R., KING C., BHISITKUL R., MASSARO-GIORDANO M., DUNAIEF J.L. - Iron homeostasis and toxicity in retinal degeneration. Progress in Retinal and Eye Research, 2007, 26, 649-673.

[4] AISEN P., ENNS C., WESSLING-RESNICK M. - Chemistry and biology of eukaryotic iron metabolism. Int. J. Biochem. Cell Biology, 2001, 33, 940-959.

[5] MOISEYEV G., CHEN Y., TAKAHASHI Y., WU B.X., MA J.X., REP65 is the isomerohydrolase in the retinoid visual cycle. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2005, 102, 12413-12418.

[6] MOISEYEV G. TAKAHASHI Y., CHEN Y., GENTLEMAN S., REDMOND T.M., CROUCH R.K., MA J.X. - RPE65 is an iron(II)-dependent isomerohydrolase in the retinoid visual cycle. J. Biol. Chem. 2006, 281, 2835-2840.

[7] SCHICHI H. – Microsomal electron transfer system of bovine retinal pigment epithelium. Exp. Eye Res. 1969, 8, 60-68.

[8] THOMPSON K.J., SHOHAM S., CONNOR J.R. Iron and neurodegenerative disorders. Brain. Res. Bull. 2001, 55, 155-164.

[9] PERRY G., SAYRE L.M., ATWOOD C.S., CASTELLANI R.J., CASH A.D., ROTTKAMP C.A., SMITH M.A. The role of iron and copper in the aetiology of neurodegenerative disorders: therapeutic implications. CNS Drugs, 2002, 16, 339-352.

[10] HAHN P., MILAM A.H., DUNAIEF J.L. Maculas affected by Age-related Macular Degeneration contain increased chelatable iron in the retinal pigment epithelium and Bruch's membrane. Arch. Ophthalmol. 2003, 121, 1099-1105.

[11] YEFIMOVA M.G., JEANNY J.C., GUILLONNEAU X., KELLER N., NGUYEN-LEGROS J., SERGEANT C., GUILLOU F., COURTOIS Y. Iron, ferritin, transferrin and transferrin receptor in the adult retina. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2000, 41, 2343-2351.

[12] YEFIMOVA M.G., JEANNY J.C., KELLER N., SERGEANT C., GUILLONNEAU X., BEAUMONT C., COURTOIS Y. Impaired retinal iron homeostasis associated with defective phagocytosis in Royal College of Surgeons rats. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2002, 43, 537-545.

[13] SERGEANT C., GOUGET B., LLABADOR Y., SIMONOFF M., YEFIMOVA M., COURTOIS Y., JEANNY J.C. Iron in hereditary retinal degeneration: PIXE microanalysis: Preliminary results. Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beams interactions with materials and atoms, 1999, 158, 344-348.

[14] SERGEANT C., LLABADOR Y., DEVES G., VESVRES M.H., SIMONOFF M., YEFIMOVA M., COURTOIS Y., JEANNY J.C. Iron and other elements (Cu, Zn, Ca) contents in retina of rats during development and hereditary retinal degeneration. Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beams interactions with materials and atoms, 2001, 181, 533-538.

[15] SERGEANT C., VESVRES M-H., PRAVIKOFF M.S., DEVES G., YEFIMOVA M., JONET L., VALTINK M., COURTOIS Y., JEANNY J.C. Trace metals in human retina during aging period. Metal Ions in Biology and Medicine, 2004, 491-495.

[16] PICARD E., FONTAINE I., JONET L., GUILLOU F., BEHAR-COHEN F., COURTOIS Y., JEANNY J.C. The protective role of transferrin in Müller glial cells after iron-induced toxicity. Molecular Vision, 2008, 14, 928-941.

[17] PICARD E., JONET L., SERGEANT C., BEHAR-COHEN F., COURTOIS Y., JEANNY J.C. Human transferrin expressed in transgenic Rd10 mice or ip injected in Rd10 mice protects retinal photoreceptors degeneration. Molecular Vision, 2010, 16, 2612-2625.

LEGENDES DES FIGURES ET TABLEAU

Figure 1.- Cycle du fer intracellulaire et protéines de son métabolisme (transport, stockage, exportation et régulation).

Figure 2.- Fer et protéines régulatrices dans la rétine externe, en condition physiologique normale.

CGM: cellules gliales de Müller, Cho: choroïde, EPR: épithélium pigmentaire de la rétine, SE et SI: segments externes et internes des photorécepteurs. Autres protéines de régulation : β2M (« Beta 2 microglobuline »), BMP6 (« Bone Morphogenetic Protein 6 »), BMPR (« BMPReceptor »), HJV (Hemojuveline).

Figure 3.- Analyse par PIXE du fer dans la retine d'un rat à PN55. Le champ balayé (abcd) est de 150µm x 150µm. **A** : Distribution bidimensionnelle du fer. Les concentrations en fer, exprimées en coups par pixel, sont croissantes (0-12) et matérialisées par une echelle de couleurs (de blanc à noir). **B** : Représentation tridimensionnelle du fer. De haut en bas (**A**) et de gauche à droite (**B**) les zones délimitées par des pointillés et les pics correspondent aux différentes couches rétiniennes identifiées après coloration. cne: couche nucléaire externe, ri: rétine interne, s: sclère.

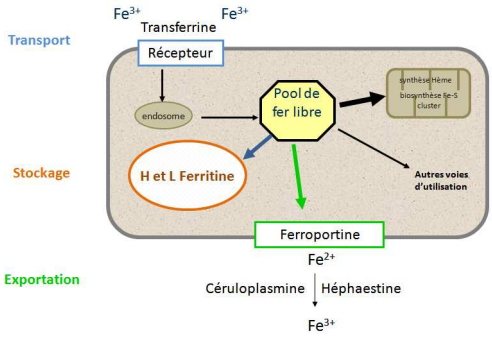
Tableau 1.- Contenus en fer (déterminés par PIXE et exprimés en µg par g de poids sec) des segments internes, externes ou des deux, dans la rétine de rats normaux et RCS, respectivement âgés de 35 et 55 jours. Moyennes +/- écart types.

Figure 4.- Contenus en Potassium (**A**) et en Fer (**B**) (déterminés par PIXE) des segments des photorécepteurs de la rétine de souris Rd10, à 2, 3 et 4 semaines PN. Moyennes +/- écarts types. Résultats statistiques après test de Mann et Whitney : ns différences non significatives, * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$ différences significatives, très significatives, hautement significatives.

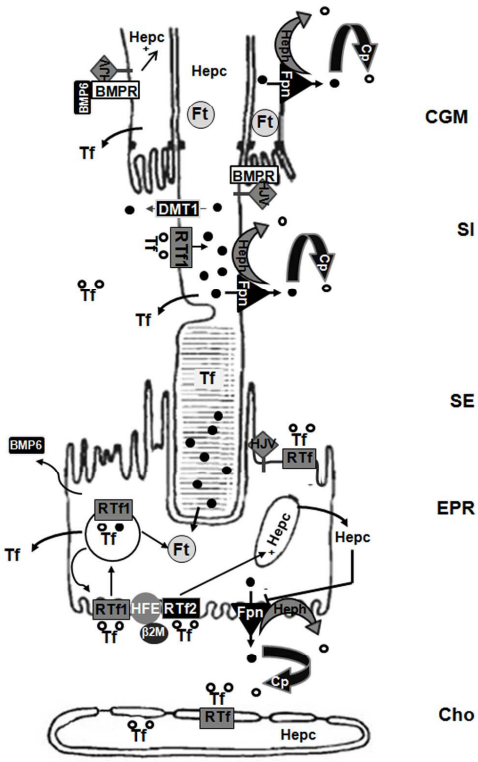
Figure 5.- Mesures de part et d'autre du nerf optique de l'épaisseur de la couche nucléaire externe de la rétine de rats RCS injectés avec Tfh (48mg/ml) ou BSS.

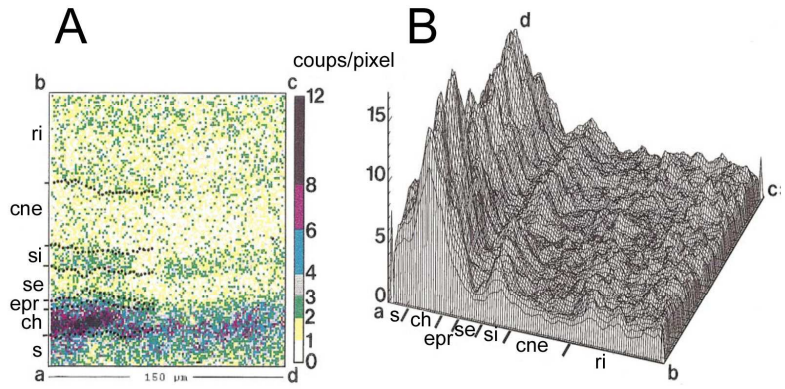
Figure 6.- Souris Rd10 exprimant la transferrine humaine. (**A**) Concentration en Tfh de la rétine de souris Rd10, Rd10/WT, Rd10/Tfh et TgTfh. Histologie après coloration au bleu de Toluidine de la rétine de souris TgTfh (**B**), Rd10 (**C**), Rd10/WT (**D**) et Rd10/Tfh (**E**), et mesures de l'épaisseur de la cne (**F**).

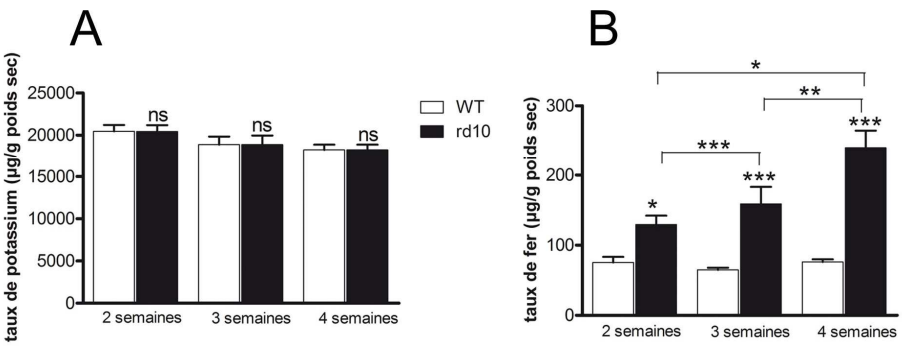
Figure 7.- Souris Rd10 injectées IP avec de la transferrine humaine (6, 12, 24 et 48mg/ml). (**A**) Concentration en Tfh de la rétine de souris Rd10 injectées IP, Rd10/Tfh et TgTfh. Histologie après coloration au bleu de Toluidine de la rétine de souris TgTfh (**B**), Rd10 injectées avec BSS (**C**) et Rd10 injectées avec Tfh 24mg/ml (**D**) et 48mg/ml (**E**), et mesures de l'épaisseur de la cne (**F**).

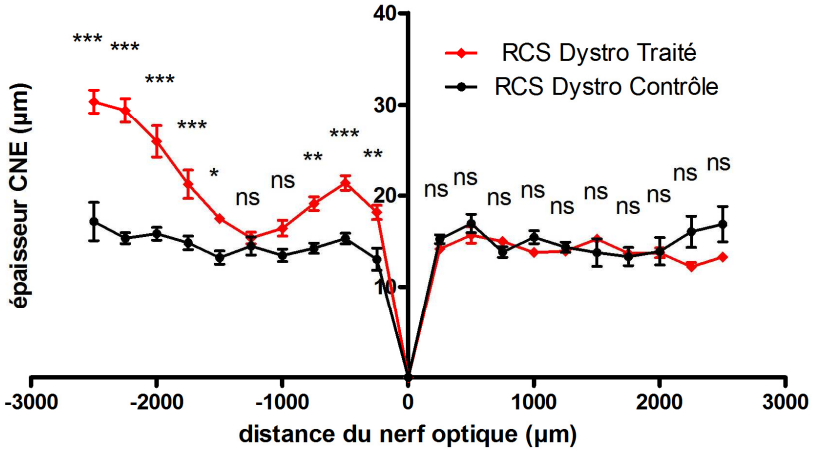


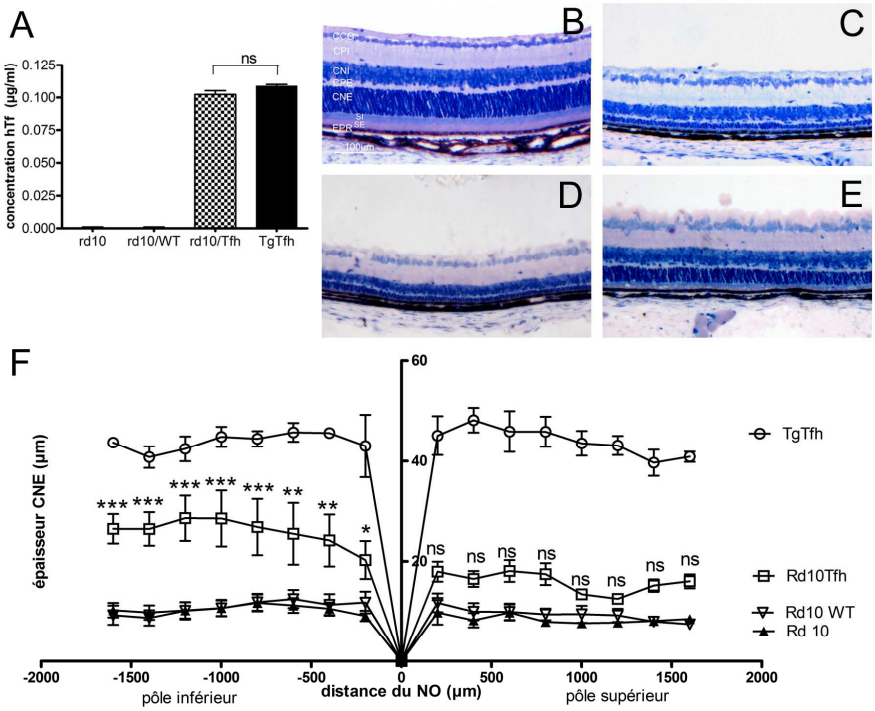
Régulation : "Iron Regulatory Protein 1 et 2" , Hepcidine, HFE, HJV, BMP6

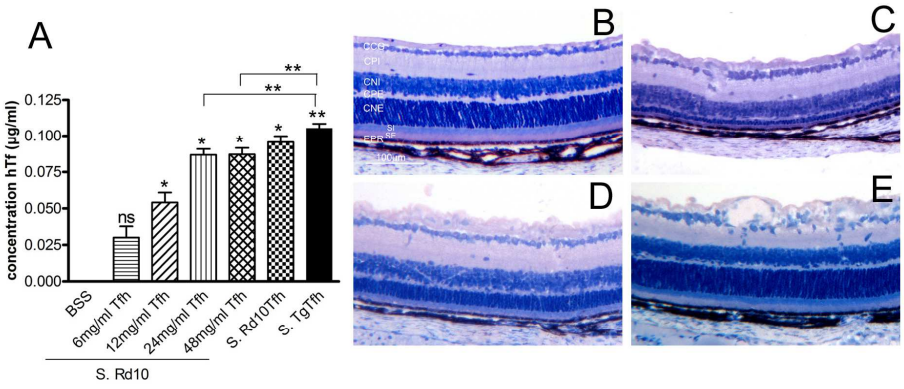


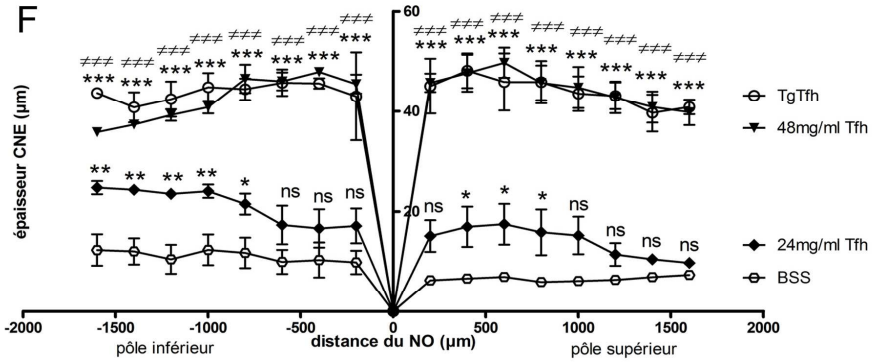

A
B
coups/pixel
12
8
6
4
3
2
1
0
b
c
ri
cne
si
se
epr
ch
s
a
d
150 µm
15
10
5
0
d
c
a
s
ch
epr
se
si
cne
ri
b


A
B
taux de potassium (µg/g poids sec)
25000
20000
15000
10000
5000
0
ns
ns
ns
2 semaines
3 semaines
4 semaines
WT
rd10
taux de fer (µg/g poids sec)
300
200
100
0
*
**
***
***
***
2 semaines
3 semaines
4 semaines


RCS Dystro Traité
RCS Dystro Contrôle
épaisseur CNE (µm)
distance du nerf optique (µm)
40
30
20
10
-3000
-2000
-1000
0
1000
2000
3000
*** *** *** *** * ns ns ** *** ** ns ns ns ns ns ns ns ns ns


A
ns
concentration hTf (µg/ml)
0.125
0.100
0.075
0.050
0.025
0.000
rd10
rd10/WT
rd10/Tfh
TgTfh
B
C
D
E
CPI
CNI
CNE
100µm
F
épaisseur CNE (µm)
60
40
20
***
**
*
ns
TgTfh
Rd10Tfh
Rd10 WT
Rd 10
-2000
-1500
-1000
-500
0
500
1000
1500
2000
pôle inférieur
distance du NO (µm)
pôle supérieur


A
concentration hTf (µg/ml)
0.125
0.100
0.075
0.050
0.025
0.000
ns
BSS
6mg/ml Tfh
12mg/ml Tfh
24mg/ml Tfh
48mg/ml Tfh
S. Rd10Tfh
S. TgTfh
S. Rd10
B
C
D
E
CPI
CNI
CNE
CNE
SI
CER
100µm


F
épaisseur CNE (µm)
60
40
20
TgTfh
48mg/ml Tfh
24mg/ml Tfh
BSS
-2000
-1500
-1000
-500
0
500
1000
1500
2000
pôle inférieur
distance du NO (µm)
pôle supérieur