

Ischémie rétinienne et excitotoxicité

Claude Bonne
Agnès Muller
Neville N. Osborne

Diverses rétinopathies et neuropathies optiques résultent de troubles ischémiques aigus ou chroniques qui entraînent une stimulation excessive des récepteurs du glutamate, un neurotransmetteur excitateur. Cela pourrait être le cas dans le glaucome, qui représente l'une des toutes premières causes de cécité dans le monde. La toxicité du glutamate est due à son accumulation extracellulaire et à l'activation des récepteurs postsynaptiques ionotropes de type AMPA/kainate et NMDA. Cette activation produit une surcharge calcique responsable de lésions et de mort cellulaires, notamment *via* la production d'espèces oxygénées réactives telles que l'anion superoxyde, le monoxyde d'azote, le radical hydroxyle et l'anion peroxyde. De nombreux modèles expérimentaux d'ischémie rétinienne ont permis de préciser les mécanismes de l'excitotoxicité dans ce tissu nerveux et d'évoquer de multiples cibles pharmacologiques pour des agents potentiellement neuroprotecteurs.

L'ischémie rétinienne, par la dégénérescence cellulaire qui peut en résulter, est responsable de l'altération de la fonction visuelle dans diverses affections ophtalmiques. Celles-ci comprennent les occlusions artérielles et veineuses, mais aussi une maladie chronique comme le glaucome où un déficit circulatoire oculaire pourrait être un facteur étiopathologique. L'ischémie rétinienne peut être encore la conséquence d'un accident cardiovasculaire entraînant secondairement une réduction des apports de glucose et d'oxygène au tissu rétinien.

Si l'on additionne ces différentes circonstances pathologiques, il est clair que l'ischémie rétinienne est l'une des toutes premières causes de perte de la vision, le glaucome représen-

tant à lui seul la deuxième cause de cécité dans les pays industrialisés après la dégénérescence maculaire liée à l'âge.

Le glaucome est une neuropathie caractérisée par la dégénérescence des cellules ganglionnaires, neurones de la rétine interne dont les axones constituent le nerf optique. Cette dégénérescence est considérée communément comme une conséquence de l'hypertension oculaire mesurée chez la majorité des patients. Cependant, diverses observations, dont l'existence de glaucome chez des patients normotones, suggèrent que d'autres facteurs que la pression oculaire peuvent être incriminés dans la pathogénie de cette maladie. Parmi ces facteurs, des anomalies de l'hémorrhéologie et du flux sanguin au pôle postérieur de l'œil pouvant

ADRESSES

C. Bonne: *professeur*. A. Muller: *maître de conférences*. Laboratoire de physiologie cellulaire, Université Montpellier I, Faculté de pharmacie, 15, avenue Charles-Flahaut, 34060 Montpellier Cedex 2, France. N.N. Osborne: *professeur*. Nuffield laboratory of ophthalmology, University of Oxford, Oxford, Royaume-Uni.

entraîner une ischémie relative chronique, ont été souvent évoquées et bien argumentées [1].

De très nombreuses études consacrées dans les vingt dernières années aux mécanismes des lésions cérébrales post-traumatiques, ischémiques et neurodégénératives ont mis en relief le rôle joué par le glutamate, neurotransmetteur excitateur, et l'activation excessive de ses récepteurs ionotropes. Ce phénomène appelé excitotoxicité, et d'abord observé expérimentalement sur les cellules ganglionnaires de la rétine [2], est aujourd'hui, quarante ans après sa découverte, considéré comme probablement en partie responsable des neuropathies rétiniennes ischémiques.

Excitotoxicité rétinienne

La « théorie excitotoxique » du glaucome a été proposée pour la première fois en 1992 par Dreyer et Lipton (*Harvard Medical School*, Boston, MA, USA) à partir de l'observation selon laquelle la concentration de glutamate était doublée dans l'humeur vitrée de patients glaucomeux par rapport à celle de sujets témoins non atteints de glaucome. Des études ultérieures [3] ont confirmé ces données et montré qu'une telle anomalie est retrouvée chez des singes dont la pression intra-oculaire est augmentée pendant plusieurs mois par obstruction des voies d'écoulement de l'humeur aqueuse. Par ailleurs, le fait que le niveau de glutamate est plus élevé dans le vitré postérieur de ces animaux hypertones suggère que l'acide aminé est d'origine rétinienne.

D'autres travaux, réalisés notamment chez le lapin, confirment que l'élévation chronique de la tension oculaire peut augmenter la concentration extracellulaire de glutamate jusqu'à un niveau potentiellement neurotoxique. Toutefois, dans ces modèles expérimentaux, on ne sait pas encore quels sont les rôles respectifs des *stress* mécanique et hypoxique dans l'accumulation vitréenne du neurotransmetteur excitateur. En effet, la compression du nerf optique du rat induit la dégénérescence des cellules ganglionnaires par un mécanisme impliquant la stimulation des récepteurs du glutamate de type NMDA [4].

Le glutamate tient une place importante parmi les neurotransmetteurs rétiniens. Il est, en particulier, le médiateur libéré par les photorécepteurs et assure aussi la transmission synaptique entre certaines cellules bipolaires et des neurones de la rétine interne parmi lesquels des cellules ganglionnaires.

Chez le rat et le lapin, les dommages rétiniens provoqués par l'ischémie se manifestent histologiquement par un amincissement de la rétine interne, alors que les photorécepteurs, qui constituent la rétine externe, sont particulièrement résistants à l'ischémie expérimentale. Les neurones qui semblent les plus sensibles sont ceux qui contiennent des récepteurs du glutamate de types NMDA et AMPA/kainate. Cependant, cette susceptibilité peut être modulée par la co-localisation de récepteurs d'autres neurotransmetteurs (GABA, sérotonine, dopamine, adénosine) dont l'activation contrebalance la stimulation excitatrice [5].

L'injection intravitreuse de kainate chez le rat détruit les cellules amacriennes gabaergiques et sérotoninergiques qui, par ailleurs, sont parmi les plus sensibles à l'ischémie [6]. De même, le glutamate entraîne la dégénérescence des cellules ganglionnaires [7], notamment celles de grande taille (voie magnocellulaire), riches en récepteurs de type NMDA [8] et qui dégénèrent préférentiellement dans le glaucome.

L'implication des récepteurs ionotropes du glutamate dans la toxicité de l'ischémie est confirmée par l'effet neuroprotecteur de leurs antagonistes. Ainsi, l'antagoniste NMDA, la dizocilpine (MK 801), protège la rétine du rat contre l'ischémie *in vitro* et *in vivo* [9]. De même, le dextrométhorphan [10], la flupirtine [11] et la kétamine [12] qui protègent la rétine contre les effets de l'ischémie aiguë pourraient agir par antagonisme des récepteurs NMDA.

Les phénomènes excitotoxiques provoqués par l'ischémie cérébrale ou identifiés dans des maladies neurodégénératives peuvent conduire à l'apoptose neuronale, ou mort cellulaire programmée, caractérisée notamment par la fragmentation internucléosomique de l'ADN (*m/s 1995, n° 3, p. 367*). En ce qui concerne la rétine, l'apoptose appa-

raît impliquée, au moins à un certain degré, dans la plupart des modèles de mort neuronale, qu'elle soit induite par ischémie [13, 14], par axotomie [15], par des agressions phototoxiques [16] ou par les agonistes glutamatergiques [17]. Plusieurs études cliniques ont aussi suggéré que les cellules rétiniennes meurent par apoptose dans diverses situations pathologiques liées à l'ischémie, comme les décollements de rétine et la rétinopathie diabétique qui affectent particulièrement les photorécepteurs [18].

Pour ce qui est du glaucome, il semble que la mort des cellules ganglionnaires ne s'accompagne d'aucun signe de nécrose ni d'inflammation [19] et des travaux anatomo-pathologiques suggèrent que la mort de ces cellules est apoptotique: les rétines de patients glaucomeux présentent *post-mortem*, par rapport à celles de sujets témoin, un plus grand nombre de cellules ganglionnaires marquées par la technique TUNEL [20].

Stimulation excessive des récepteurs du glutamate

Le glutamate extracellulaire peut appartenir au *pool* de neurotransmetteur vésiculaire, libéré en quantité excessive par la dépolarisation consécutive à l'ischémie. Il peut aussi provenir du glutamate « métabolique » libéré par lésion membranaire ou par inversion de ses systèmes de transport. De plus, ses systèmes de recapture eux-mêmes peuvent être sensibles à l'ischémie.

Il a été démontré que l'hypoxie *in vitro* entraînait une libération de glutamate par les neurones. Cela est classiquement observé dans l'ischémie cérébrale et rend compte des lésions excitotoxiques. Dans la rétine, bien que des études pharmacologiques montrent que la mort cellulaire après ischémie aiguë est liée à l'activation des récepteurs glutamatergiques, l'accumulation de glutamate dans le compartiment vitréen, comme reflet du compartiment synaptique, est controversée [21, 22]. Nous avons montré que des conditions d'ischémie-reperfusion aiguës, qui provoquent une élévation importante du glutamate extracellulaire

dans le cerveau, mesurée par microdialyse, n'induisent pas une telle augmentation dans la rétine sauf en cas de décollement [22]. Sans connaître les raisons de cette différence, on peut suggérer que, grâce à une organisation et une densité tout à fait particulières, les cellules gliales de Müller dans la rétine pourraient assurer la recapture du glutamate plus efficacement que les astrocytes cérébraux. Le glutamate, neurotransmetteur libéré par différentes cellules rétinienne, est recapté grâce à des systèmes neuronaux et gliaux présents en particulier sur les cellules de Müller. Il existe un transporteur dépendant du Na⁺ dont différents sous-types ont été décrits dans la rétine [23]. Ce symport est sensible au *stress oxydant* [24, 25], à l'acidose [26] ou encore à la présence d'acide arachidonique [27], événements biochimiques qui ont lieu en situation ischémique et provoquent, soit un dysfonctionnement de recapture, soit une libération de glutamate non vésiculaire par inversion du sens du transport membranaire.

Il n'est pas possible à l'heure actuelle de déterminer quel est le premier événement qui déclenche une accumulation de glutamate extracellulaire dans l'ischémie. Ces différents mécanismes peuvent y participer de façon conjointe. Enfin, il faut aussi considérer qu'une lésion cellulaire ischémique ou traumatique entraîne, par altération de membranes, une libération de glutamate « métabolique », qui peut à son tour provoquer la mort des neurones voisins porteurs de récepteurs glutamatergiques.

Le glutamate possède, dans la rétine, des récepteurs ionotropes et métabotropes neuronaux et gliaux. La plupart des récepteurs métabotropes sont exprimés dans la rétine [28] et peuvent participer à l'excitotoxicité par mobilisation calcique (mglu1) ou jouer un rôle neuroprotecteur par inhibition de la libération de glutamate (mglu2 et mglu3). Cependant, l'importance relative de ces rôles opposés n'est pas encore établie dans la rétine ischémique.

Dans la rétine, les gènes codant pour les différents types de récepteurs AMPA/kainate ont aussi été identifiés [29]. Ils peuvent concourir à la cytotoxicité du glutamate par surcharge sodo-calcique et *stress oxydant*, comme nous l'avons montré sur des

cellules en culture [30]; toutefois, les récepteurs de type NMDA semblent être impliqués de façon prépondérante dans la mort des cellules de la rétine interne sensibles à l'ischémie, comme l'atteste l'effet neuroprotecteur de leurs antagonistes.

La stimulation soutenue des récepteurs NMDA, récepteurs-canaux sodo-calciques, entraîne une cascade d'événements biochimiques qui ont été décrits dans les altérations excitotoxiques cérébrales. Comme dans les structures centrales, la surcharge calcique cellulaire joue, dans la rétine, un rôle essentiel [31] par activation d'enzymes dépendantes du calcium, notamment productrices de radicaux libres dérivés de l'oxygène (RLO) [32] (figure 1).

Rôle central des radicaux libres

L'ischémie engendre des radicaux libres

Les RLO peuvent être produits dans les tissus biologiques, principalement par des réactions métaboliques impliquant des oxydases et des oxygénases. L'ischémie expérimentale de la rétine entraîne des altérations morphologiques et électrorétinographiques qui peuvent être prévenues par administration de piègeurs de RLO, stœchiométriques ou enzymatiques, tels que la superoxyde dismutase (SOD) et la catalase.

Dans une étude récente, nous avons montré plus directement, par résonance paramagnétique électronique, la production de RLO dans la rétine au cours d'un épisode d'ischémie aiguë [33]. L'origine des RLO produits dans la rétine ischémique est multiple. Bien que la réduction monovalente de l'oxygène par la chaîne respiratoire mitochondriale puisse être une source d'anion superoxyde (O₂⁻) pendant la phase hypoxique, il semble que la production radicalaire, secondaire à l'activation des récepteurs du glutamate, tant NMDA que AMPA/kainate [30], soit aussi une source importante de RLO. Par ailleurs, l'accumulation de glutamate extracellulaire, qui stimule l'antiport glutamate/cystine des cellules gliales de Müller, peut être aussi responsable d'un *stress oxydant* par déplétion du glutathion dans ces cellules [34].

Cibles et effets des radicaux libres

La production de RLO dans la rétine ischémique provoque un déséquilibre ionique et l'altération de l'électrorétinogramme (ERG). La cible moléculaire responsable de ces effets n'est pas clairement identifiée mais on sait que l'activité Na⁺/K⁺-ATPase est inhibée [35] et qu'une chute d'ATP est observée dans le tissu péri-ischémique sous l'effet des RLO [36].

L'ischémie entraîne aussi des changements dans la distribution des neurotransmetteurs [22, 37]. En ce qui concerne celle du glutamate, diverses études ont montré que le *stress oxydant* freine la recapture gliale du neurotransmetteur par inhibition du transporteur dépendant du Na⁺ [24, 25] et de son métabolisme par la glutamine synthase [38].

Un autre impact qui peut concourir à l'aggravation de l'excitotoxicité par le *stress oxydant* est l'augmentation d'activation des récepteurs ionotropes du glutamate qui se traduit par un flux entrant accru de sodium [39]. Enfin, les RLO peuvent agir en tant que signaux réglant l'expression de diverses protéines qui peuvent, soit induire la mort cellulaire par apoptose, soit, inversement, jouer un rôle protecteur comme c'est le cas par exemple pour la catalase [40] et des protéines de *stress* [41].

Le monoxyde d'azote, un agent double

Un radical particulier, le monoxyde d'azote (NO) est synthétisé par trois isoformes de NO-synthase présentes dans la rétine. Les isoformes neuronale et endothéliale dites constitutives, sont réglées par le taux de calcium cytosolique. Ainsi, l'enzyme neuronale (NOS-I), également présente dans les cellules de Müller, est activée dans les cellules stimulées par le glutamate et apparaît impliquée dans la neurotoxicité ischémique, comme le suggère l'effet neuroprotecteur de ses inhibiteurs.

L'isoforme NOS-II induite par des cytokines en réponse aux stimulus inflammatoires peut être exprimée dans la rétine, dans l'épithélium pigmentaire et dans les cellules de Müller, en réponse à un épisode ischémique et y jouer un rôle cytotoxique (*m/s 1996, n° 5, p. 593*).

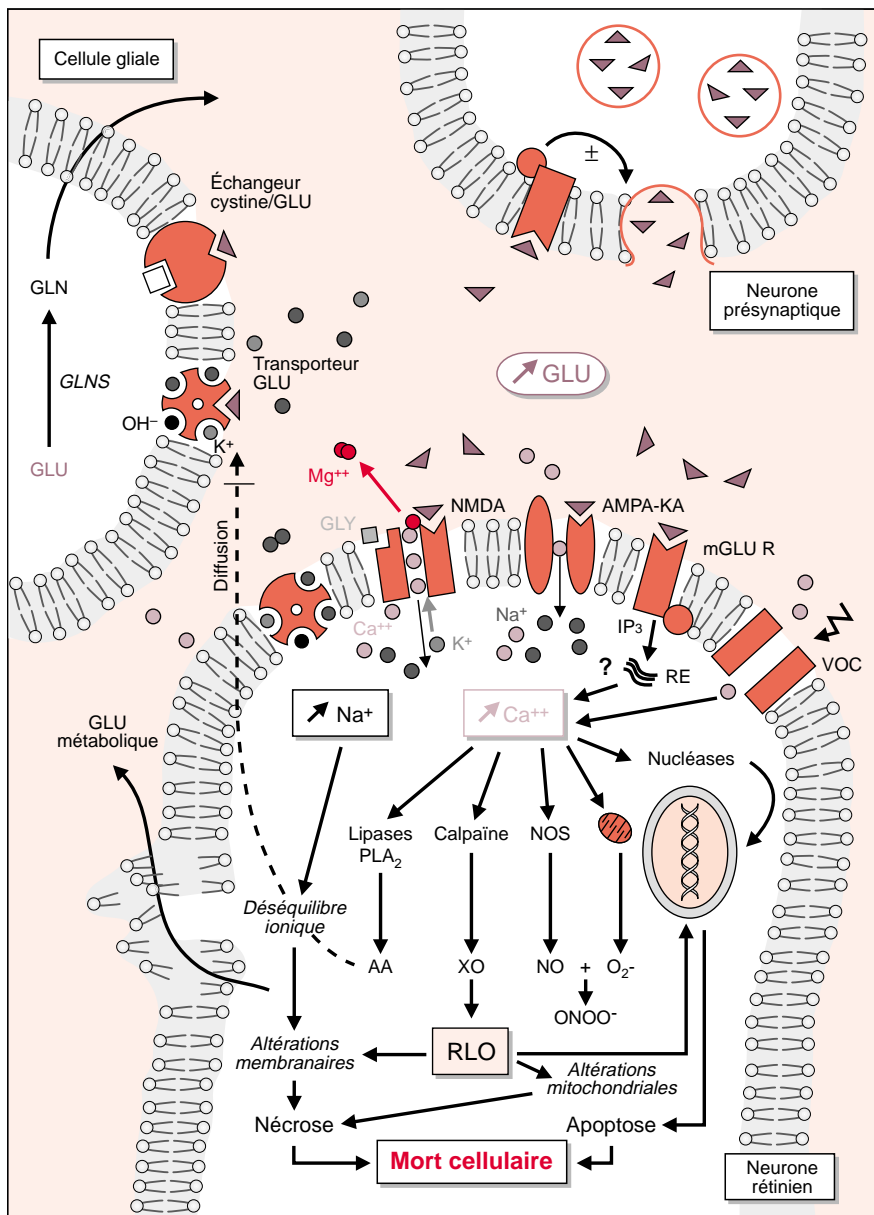


Figure 1. Mécanismes moléculaires de l'excitotoxicité rétinienne. Le récepteur NMDA apparaît impliqué de manière prépondérante dans la toxicité rétinienne de l'ischémie comme l'atteste l'effet protecteur de ses antagonistes. Ce récepteur est un complexe protéique transmembranaire présentant un site de liaison pour le glutamate et formant un canal ionique, surtout perméable au calcium et dans une moindre mesure au sodium. Ce récepteur comporte en outre un grand nombre de sites de liaison pour des facteurs modulateurs agonistes tels que la glycine. Ces récepteurs-canaux sont activés par la liaison du glutamate à son site et par une dépolarisation membranaire concomitante, responsable de l'extrusion des ions Mg^{2+} qui, au repos, les maintiennent imperméables au Ca^{2+} . Les événements biochimiques responsables de la souffrance et de la mort neuronale sont multiples et dépendent surtout de la surcharge calcique intracellulaire due principalement à l'ouverture des récepteurs-canaux. En effet, le calcium active différentes enzymes : (1) des lipases, dont la phospholipase A2 (PLA2) qui mobilise l'acide arachidonique (AA) des phospholipides membranaires. Cet acide gras libre est neurotoxique par son effet inhibiteur de recapture du neurotransmetteur, mais aussi par les radicaux libres produits lors de son métabolisme ; (2) la calpaïne, qui transforme la xanthine déshydrogénase en xanthine oxydase (XO). L'accumulation de métabolites de l'adénosine (xanthine, inosine, hypoxanthine) et la production de radicaux libres dans la rétine ischémée

ou par les neurones soumis à un stress excitotoxique, suggèrent que cette voie métabolique est bien impliquée dans l'excitotoxicité rétinienne ; (3) la synthèse du monoxyde d'azote (NOS), qui produit du NO, neurotoxique lorsqu'il réagit avec l'anion superoxyde (O_2^-) ; (4) des endonucléases qui participent aux processus neurodégénératifs, nécrotique ou apoptotique. La libération d'AA et la production de RLO (radicaux libres dérivés de l'oxygène) ont aussi pour effet d'amplifier l'accumulation extracellulaire de glutamate par inhibition de la recapture du neurotransmetteur et de son catabolisme par la glutamine synthase (GLNS).

L'effet toxique du NO, qu'il provienne de l'une ou l'autre des réactions enzymatiques, n'est pas consécutif à l'activation de la guanylyl cyclase, mécanisme responsable de plusieurs de ses effets physiologiques, mais semble dû à la formation de peroxynitrite ($ONOO^-$) et de radical hydroxyle (OH^\bullet), résultant de sa réaction avec O_2^- . Ces entités chimiques très réactives peuvent, selon

l'importance de leur production, entraîner la mort cellulaire par apoptose ou par nécrose. S'il est bien établi que le NO intervient dans l'excitotoxicité, plusieurs données expérimentales montrent qu'en revanche ce médiateur peut aussi protéger les neurones contre la toxicité du glutamate. Cette action neuroprotectrice pourrait dépendre de plusieurs mécanismes. Un pre-

mier mécanisme est lié à l'activation de la guanylyl cyclase et à l'effet du GMPc qui se montre capable de réduire le flux ionique induit par le glutamate dans les neurones rétiens [42]. Un second mécanisme, plus généralement évoqué et démontré dans des cultures de neurones du cortex cérébral, est lié à la modulation des récepteurs NMDA par S-nitrosylation de groupements thiol

Tableau I

TRAITEMENTS NEUROPROTECTEURS ANTI-ISCHÉMIQUES ET ANTI-EXCITOTOXIQUES

Cibles : produits	Modèle expérimental	Espèce	Critère	Références
Récepteurs GLU				
Dizocilpine (MK 801)	HTIO	rat/lapin	histologie	[9] et Osborne, Herrera. <i>Neurosci</i> 1994 ; 59 : 1071
Dextrométhorphane	HTIO	lapin	ERG	[10]
Flupirtine	HTIO	lapin	histologie	[11]
Mémantine	HTIO	lapin	histologie	Osborne, Herrera. <i>Neurosci</i> 1994 ; 59 : 1071
Kétamine	GLU intravitréen	rat	histologie	[7]
	HTIO	lapin	ERG	[12]
NBQX	occlusion vasculaire	rat	histologie	Matini <i>et al. Exp Neurol</i> 1997 ; 146 : 419
CNQX	hypoxie <i>in vitro</i>	rat	histologie	[51]
Radicaux oxygénés				
SOD/catalase	HTIO	lapin	ERG	Vériac <i>et al. Exp Eye Res</i> 1993 ; 56 : 85. Nayak <i>et al. Invest Ophthalmol Vis Sci</i> 1993 ; 34 : 2018
Lazaroïde U74389G	HTIO	lapin	ERG/histologie	[50]
Lazaroïde Tirilazade	HTIO	lapin	ERG	Nayak <i>et al. Invest Ophthalmol Vis Sci</i> 1993 ; 34 : 53611
EGb 761	hypoxie <i>in vitro</i>	rat	histologie	[49]
	HTIO	rat	histologie	Szabo <i>et al. Invest Ophthalmol Vis Sci</i> 1991 ; 32 : 1471
Diméthylthiourée	HTIO	lapin	ERG	[33]
Diosmine/hespéridine	occlusion vasculaire	gerbille	ERG	Delbarre <i>et al. Int J Microcirc Clin Exp</i> 1995 ; 15S : 27
Mélatonine	hypoxie <i>in vitro</i>	rat	histochimie	[51]
Vitamine E	occlusion vasculaire	lapin	biochimie	Augustin <i>et al. Exp Eye Res</i> 1998 ; 66 : 19
Acide lipoïque	occlusion vasculaire	rat	ERG	[52]
Déferoxamine	HTIO/occlusion vasculaire	chat	ERG	Gehlbach, Purple. <i>Invest Ophthalmol Vis Sci</i> 1994 ; 35 : 669
Allopurinol	œil perfusé	chat	ERG	[47]
Ibuprofène	asphyxie	porc	ERG	Chemtob <i>et al. Pediatr Res</i> 1993 ; 33 : 336
Monoxyde d'azote				
L-NMMA, L-NNA	occlusion vasculaire	rat	histologie	Lam, Tso. <i>Res Commun Mol Pathol Pharmac</i> 1996 ; 92 : 329
L-NNA, aminoguanidine	HTIO	rat	histologie	[46]
L-NAME	NMDA <i>in vivo</i> / occlusion	souris	histologie	Vorwerk <i>et al. Invest Ophthalmol Vis Sci</i> 1997 ; 38 : 2038
Canaux calciques				
Flunarizine	HTIO	rat	histologie	[53]
Divers				
Ganglioside GM1	HTIO	rat	histologie	[55]
Bétaxolol	HTIO	rat	ERG	Osborne <i>et al. Brain Res</i> 1997 ; 751 : 113
EHNA	HTIO	rat	ERG	[45]
Génistéine	occlusion vasculaire	rat	histologie	Hayashi <i>et al. Invest Ophthalmol Vis Sci</i> 1997 ; 38 : 1193
Ifenprodil	NMDA/KA <i>in vitro</i>	poulet	histologie	Zeevalk, Nicklas. <i>Brain Res</i> 1990 ; 522 : 135

HTIO : hypertension intra-oculaire ; ERG : électrorétinogramme ; NBQX : 6-nitro-7-sulphamoylbenzo[f]quinoxaline-2,3-dione ; CNQX : 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione ; SOD : superoxyde dismutase ; EGb 761 : extrait de *Gingko biloba* ; L-NMMA : N(G)-monométhyl-L-arginine acétate ; L-NNA : N(G)-nitro-L-arginine ; L-NAME : N(G)-nitro-L-arginine méthyl ester ; EHNA : érythro-9-(2-hydroxyl-3-nonyl)-adénine.

du récepteur NMDA, réaction qui dépendrait de la transformation du NO en NO⁺ en fonction de l'état redox du milieu [43].

Perspectives et neuroprotection

L'excitotoxicité peut être responsable de la mort neuronale dans des circonstances très différentes telles que l'ischémie aiguë par occlusion vasculaire, les décollements de la rétine, la photocoagulation au laser ou bien dans les dégénérescences chroniques liées à un déficit vasculaire comme les hémoglobinopathies, la rétinopathie diabétique ou encore le glaucome. La compréhension des mécanismes cytotoxiques du glutamate permet de proposer des cibles pharmacologiques pour des traitements neuroprotecteurs.

En premier lieu, on peut envisager l'utilisation d'antagonistes des récepteurs NMDA. Des antagonistes compétitifs ont été synthétisés, comme le 2-amino-5-phosphonovalérate dont l'intérêt est surtout analytique, permettant d'explorer la participation des récepteurs NMDA dans tel ou tel modèle de pathologie expérimentale. En revanche, leur relativement faible affinité leur fait préférer des antagonistes non compétitifs et des agents pharmacologiques qui agissent sur les sites modulateurs du récepteur NMDA. Ainsi, la dizocilpine (MK 801) [9] et le dextrométhorphan [10], en se liant à un site intracanalalaire, diminuent le flux entrant calcique et s'avèrent neuroprotecteurs dans plusieurs modèles oculaires d'ischémie et d'excitotoxicité. Ce mécanisme pourrait aussi rendre compte, au moins en partie, des effets neuroprotecteurs d'un antagoniste beaucoup mieux toléré, la mémantine [7, 44], médicament connu de longue date comme anti-parkinsonien.

Le site de liaison de la glycine, acide aminé qui potentialise le glutamate, est aussi proposé comme cible pour des produits potentiellement neuroprotecteurs, de même que les sites de liaison des polyamines et du zinc (*m/s 1991, n° 6, p. 589*). La flupirtine, antalgique non morphinique qui protège la rétine contre l'ischémie aiguë, pourrait agir sur le site redox du récepteur NMDA et réduire ainsi son activation sans la bloquer [11].

Une autre approche dans ce contexte consisterait à freiner la libération présynaptique du glutamate. C'est sans doute au moins partiellement le mécanisme d'action neuroprotecteur du riluzole, produit dont on a démontré l'activité dans le traitement de la sclérose latérale amyotrophique (*m/s 1994, n° 6-7, p. 730*). Cet objectif pourrait être atteint également en stimulant les récepteurs A1 présynaptiques de l'adénosine [45].

Le rôle-clé joué par les enzymes activées par le calcium, dans la cascade métabolique déclenchée par la stimulation excessive des récepteurs NMDA, pourrait offrir d'autres perspectives pharmacologiques; cependant, si les inhibiteurs de NO-synthase, de xanthine oxydase et d'endonucléases sont neuroprotecteurs dans divers modèles expérimentaux d'ischémie rétinienne [46-48], leur utilisation thérapeutique semble improbable en raison de la multiplicité des fonctions physiologiques au sein desquelles ces enzymes sont impliquées. En revanche, l'élimination pharmacologique des RLO qu'elles engendrent, apparaît comme une approche réaliste. Des composés tels que les lazaroides [49, 50], l'EGb-761 [35], la mélatonine [51] et l'acide lipoïque [52] dont les activités anti-oxydante et neuroprotectrice sont prouvées chez l'animal, pourraient avoir un avenir thérapeutique.

Cet arsenal thérapeutique potentiel n'est pas limitatif, la surcharge cytoplasmique en ions calcium, consécutive à l'ischémie, peut aussi être diminuée par des inhibiteurs calciques tels que la flunarizine [53], puisque des canaux calciques dépendants du voltage (VOC) peuvent contribuer à la toxicité du glutamate [54].

D'autres agents neuroprotecteurs tels que les gangliosides [55] et d'autres mécanismes potentiellement actifs contre l'ischémie et l'excitotoxicité ont été proposés (*Tableau 1*).

La faisabilité d'une thérapeutique protectrice par voie locale n'a pas encore été évaluée expérimentalement ni *a fortiori* en clinique. Il n'est pas exclu, cependant, que des concentrations efficaces de produits neuroprotecteurs puissent être atteintes au pôle postérieur de l'œil après administration oculaire topique.

Enfin, outre ces impacts pharmacolo-

giques assez spécifiquement liés à l'activation des récepteurs du glutamate, il convient de considérer les approches neuroprotectrices fondées sur l'utilisation thérapeutique de facteurs de croissance neurotropes ■

Remerciements

Les travaux des auteurs sont soutenus par l'Union Européenne (CHRx CT 94 0435).

RÉFÉRENCES

1. Drance SM. Glaucoma: changing concept. *Eye* 1992; 6: 337-45.
2. Lucas DR, Newhouse JP. The toxic effects of sodium L-glutamate on the innerlayers of the retina. *Arch Ophthalmol* 1957; 58: 193-201.
3. Dreyer EB, Zurakowski D, Schumer RA, Podos SM, Lipton SA. Elevated glutamate levels in the vitreous body of humans and monkeys with glaucoma. *Arch Ophthalmol* 1996; 114: 299-305.
4. Yoles E, Muller S, Schwartz M. NMDA-receptor antagonist protects neurons from degeneration after partial optic nerve crush. *J Neurotrauma* 1997; 14: 665-75.
5. Osborne NN. Neuroprotection to the retina: relevance in glaucoma. In: Drance SM, ed. *Vascular risk factors and neuroprotection in glaucoma*. Amsterdam - New York: Kugler Publications Bv, 1997: 139-55.
6. Osborne NN, McCord RJ, Wood J. The effect of kainate on protein kinase C, GABA, and the uptake of serotonin in the rabbit retina *in vivo*. *Neurochem Res* 1995; 20: 635-41.
7. Vorwerk CK, Lipton SA, Zurakowski D, et al. Chronic low-dose glutamate is toxic to retinal ganglion cells. Toxicity blocked by memantine. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996; 37: 1619-24.
8. Dreyer EB, Pan ZH, Storm S, Lipton SA. Greater sensitivity of larger retinal ganglion cells to NMDA-mediated cell death. *NeuroReport* 1994; 5: 629-31.
9. Lam TT, Siew E, Chu R, Tso MOM. Ameliorative effect of MK801 on retinal ischemia. *J Ocular Pharmacol Ther* 1997; 13: 129-37.
10. Yoon YH, Marmor MF. Dextromethorphan protects retina against ischemic injury *in vivo*. *Arch Ophthalmol* 1989; 107: 409-11.
11. Osborne NN, Schwarz M, Pergande G. Protection of rabbit retina from ischemic injury by flupirtine. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996; 37: 274-80.
12. Tsukahara Y, Blair NP, Spellman Eapen DC, et al. Ketamine suppresses ischemic injury in the rabbit retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1992; 33: 1822-5.
13. Garcia-Valenzuela E, Shareef S, Walsh J, Sharma SC. Programmed cell death of retinal ganglion cells during experimental glaucoma. *Exp Eye Res* 1995; 61: 33-44.
14. Quigley HA, Nickells RW, Kerrigan LA, et al. Retinal ganglion cell death in experimental glaucoma and after axotomy occurs by apoptosis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1995; 36: 774-86.

RÉFÉRENCES

15. Berkelaar M, Clarke DB, Wang YC, Bray GM, Aguayo AJ. Axotomy results in delayed death and apoptosis of retinal ganglion cells in adult rats. *J Neurosci* 1994; 14: 4368-74.
16. Hafezi F, Marti A, Munz K, Remé CE. Light-induced apoptosis: differential timing in the retina and pigment epithelium. *Exp Eye Res* 1997; 64: 963-70.
17. Dreyer EB, Zhang D, Lipton SA. Transcriptional or translational inhibition blocks low dose NMDA-mediated cell death. *NeuroReport* 1995; 6: 942-4.
18. Xu GZ, Li WW, Tso MO. Apoptosis in human retinal degenerations. *Trans Am Ophthalmol Soc* 1996; 94: 411-30.
19. Neufeld AH, Hernandez MR, Gonzalez M, Geller A. Cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in the human optic nerve head. *Exp Eye Res* 1997; 65: 739-45.
20. Kerrigan LA, Zack DJ, Quigley HA, Smith SD, Pease ME. TUNEL-positive ganglion cells in human primary-angle glaucoma. *Arch Ophthalmol* 1995; 115: 1031-5.
21. Louzada P Jr, Dias JJ, Santos WF, et al. Glutamate release in experimental ischaemia of the retina: an approach using microdialysis. *J Neurochem* 1992; 59: 358-63.
22. Muller A, Villain M, Bonne C. The release of amino acids from ischemic retina. *Exp Eye Res* 1997; 64: 291-3.
23. Rauen T, Rothstein JD, Wassle H. Differential expression of three glutamate transporter subtypes in the rat retina. *Cell Tissue Res* 1996; 286: 325-36.
24. Agostinho P, Duarte CB, Oliveira CR. Impairment of excitatory amino acid transporter activity by oxidative stress conditions in retinal cells: effect of antioxidants. *FASEB J* 1997; 11: 154-63.
25. Muller A, Maurin L, Bonne C. Free radicals and glutamate uptake in the retina. *Gen Pharmacol* 1998; 30: 315-8.
26. Swanson RA, Farrell K, Simon RP. Acidosis causes failure of astrocyte glutamate uptake during hypoxia. *J Cereb Blood Flow Met* 1995; 15: 417-24.
27. Volterra A, Trotti D, Racagni G. Glutamate uptake is inhibited by arachidonic acid and oxygen radicals via two distinct and additive mechanisms. *Mol Pharmacol* 1994; 46: 986-92.
28. Hartveit E, Brandstatter JH, Enz R, Wassle H. Expression of the mRNA of seven metabotropic glutamate receptors (mGluR1 to 7) in the rat retina. An *in situ* hybridization study on tissue sections and isolated cells. *Eur J Neurosci* 1995; 7: 1472-83.
29. Hamassaki-Britto DE, Hermans-Borgmeyer I, Heinemann S, Hughes TE. Expression of glutamate receptor genes in the mammalian retina: the localisation of GlutamateR1 through GlutamateR7 mRNAs. *J Neurosci* 1993; 13: 1888-98.
30. Dutrait N, Culcasi M, Cazeville C, et al. Calcium-dependent free radical generation in cultured retinal neurons injured by kainate. *Neurosci Lett* 1995; 198: 13-6.
31. Ferreira IL, Duarte CB, Carvalho AP. Ca²⁺ influx through glutamate receptor-associated channels in retina cells correlates with neuronal cell death. *Eur J Pharmacol* 1996; 302: 153-62.
32. Bonne C, Muller A, Villain M. Free radicals in retinal ischemia. *Gen Pharmacol* 1998; 30: 275-80.
33. Muller A, Pietri S, Villain M, et al. Free radicals in rabbit retina under ocular hyperpressure and functional consequences. *Exp Eye Res* 1997; 64: 637-43.
34. Kato S, Ishita S, Sugawara K, Mawatari K. Cystine/glutamate antiporter expression in retinal Muller glial cells: DL-alpha-amino adipate toxicity. *Neuroscience* 1993; 57: 473-82.
35. Szabo ME, Droy-Lefaix MT, Doly M. Modification of reperfusion-induced ionic imbalance by free radical scavengers in spontaneously hypertensive rat retina. *Free Radical Bio Med* 1992; 13: 609-20.
36. Véric S, Tissicé G, Bonne C. Alterations of energetic metabolite levels by free radicals during optic nerve ischemia. *Curr Eye Res* 1992; 11: 275-8.
37. Perlman JI, McCole SM, Pulluru P, et al. Disturbances in the distribution of neurotransmitters in the rat retina after ischemia. *Curr Eye Res* 1996; 15: 589-96.
38. Grosche J, Härtig H, Reichenbach A. Expression of glial fibrillary acidic protein (GFAP), glutamine synthetase (GS), and Bcl-2 protooncogene protein by Müller (glial) cells in retinal light damage of rats. *Neurosci Lett* 1995; 185: 119-22.
39. Agostinho P, Duarte CB, Oliveira CR. Activity of ionotropic glutamate receptors in retinal cells: effect of ascorbate/Fe²⁺-induced oxidative stress. *J Neurochem* 1996; 67: 1153-63.
40. Zhang H, Agardh CD, Agardh E. Increased catalase levels and hypoxanthine-enhanced nitro-blue tetrazolium staining in rat retina after ischemia followed by recirculation. *Curr Eye Res* 1995; 14: 47-54.
41. Caprioli J, Kitano S, Morgan JE. Hyperthermia and hypoxia increase tolerance of retinal ganglion cells to anoxia and excitotoxicity. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996; 37: 2376-81.
42. McMahon DG, Ponomareva LV. Nitric oxide and cGMP modulate retinal glutamate receptors. *J Neurophysiol* 1996; 76: 2307-15.
43. Lipton SA, Choi YB, Pan ZH, et al. A redox-based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso-compounds. *Nature* 1993; 364: 626-32.
44. Chen HSV, Pellegrini JW, Aggarwal SK, et al. Open channel block of N-methyl-D-aspartate (NMDA) responses by memantine: therapeutic advantage against NMDA receptor-mediated neurotoxicity. *J Neurosci* 1992; 12: 4427-36.
45. Larsen AK, Osborne NN. Involvement of adenosine in retinal ischemia. Studies on the rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996; 37: 2603-11.
46. Geyer O, Almog J, Lupu-Meir M, Lazar M, Oron Y. Nitric oxide synthase inhibitors protect rat retina against ischemic injury. *FEBS Lett* 1995; 374: 399-402.
47. Peachey NS, Green DJ, Ripps H. Ocular ischemia and the effects of allopurinol on functional recovery in the retina of the arterially perfused cat eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1993; 34: 58-65.
48. Lam TT, Fu J, Hrynewycz M, Tso MO. The effect of aurointricarboxylic acid, an endonuclease inhibitor, on ischemia/reperfusion damage in rat retina. *J Ocular Pharmacol Ther* 1995; 11: 253-9.
49. Levin LA, Clarck JA, Johns LK. Effect of lipid peroxidation inhibition on retinal ganglion cell death. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996; 37: 2744-9.
50. Muller A, Villain M, Favreau B, et al. Differential effect of ischemia/reperfusion on pigmented and albino rabbit retina. *J Ocular Pharmacol Ther* 1996; 12: 337-42.
51. Cazeville C, Osborne NN. Retinal neurons containing kainate receptors are influenced by exogenous kainate and ischaemia while neurons lacking these receptors are not. Melatonin counteracts the effects of ischaemia and kainate. *Brain Res* 1997; 755: 91-100.
52. Block F, Schwarz M. The b-wave of the electroretinogram as an index of retinal ischemia. *Gen Pharmacol* 1998; 30: 281-7.
53. Takahashi K, Lamm TT, Edward DP, Buchi ER, Tso MOM. Protective effects of flunarizine on ischemic injury in the rat retina. *Arch Ophthalmol* 1992; 110: 862-70.
54. Sucher NJ, Lipton SA, Dreyer EB. Molecular basis of glutamate toxicity in retinal ganglion cells. *Vision Res* 1997; 37: 3483-93.
55. Weber M, Mohand-Said S, Hicks D, Dreyfus H, Sahel JA. Monosialoganglioside GM1 reduces ischemia/reperfusion-induced injury in the rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996; 37: 267-73.

Summary

Retinal ischemia and excitotoxicity

Chronic ischaemia may be a cause for some retinopathies and optic neuropathies. In ischaemia an overactivation of ionotropic glutamate receptors initiates a process of neuronal destruction; this may occur in glaucoma causing death to ganglion cells and resulting in blindness. Glutamate is a major excitatory transmitter which accumulates in the extracellular space in ischaemia to cause excessive stimulation of glutamate AMPA/KA and NMDA receptors. This produces a large rise in calcium within the cytoplasm to trigger a cascade of events which ultimately leads to cell death. Reactive oxygen species, including superoxide anion, nitric oxide, hydroxyl radical and peroxynitrite, all play major roles in the death process. Several experimental models have been used to characterise the cascade of events leading to retinal cell death by excitotoxicity or ischaemia and to show how defined pharmacological agents may act as neuroprotective agents. Such studies should lead to the development of drugs suitable for the prevention of neuronal destruction as in glaucoma.

TIRÉS À PART

C. Bonne.