

UNIVERSITE DE BOURGOGNE
Ecole doctorale Environnements, Santé, STIC

THÈSE

Pour obtenir le grade de
Docteur de l'Université de Bourgogne
Discipline : Science de la vie

Présentée et soutenue publiquement par

Emilie SIMON

Le 5 septembre 2012

**Participation des facteurs nutritionnels et
environnementaux au vieillissement de la rétine et aux
rétinopathies liées à l'âge**

Directeur de thèse

Catherine CREUZOT-GARCHER

Co-directeur de thèse

Lionel BRETILLON

Mr David HICKS	Directeur de recherche, INSERM, Strasbourg	Rapporteur
Mr Jean-Michel LECERF	Professeur, Institut Pasteur, Lille	Rapporteur
Mr Philippe BRABET	Chargé de recherche, INSERM, Montpellier	Examineur
Mr Lionel BRETILLON	Directeur de recherche, INRA, Dijon	Examineur
Mme Martine CLARET	Pharmacienne, Laboratoire Horus Pharma, St Laurent du Var	Examineur
Mme Catherine CREUZOT-GARCHER	Professeur, Université de Bourgogne, Praticien Hospitalier, CHU, Dijon	Examineur

A ma mère Claudine et mon père Eric

A mes grands-parents Mauricette, Thérèse et Pierre

A mes sœurs Alice et Elodie et mon frère Jérôme

A Jocelyne

A ma belle famille

A Jonathan

A Angéline, Karen, Linda, Lysandre, Claude et Etienne

Au Bad&Co

Remerciements

Les travaux présentés dans ce manuscrit ont été réalisés à l'INRA de Dijon, UMR 1324, au sein de l'équipe Œil, Nutrition et Signalisation.

Je me souviens des mes débuts de thèse... Beaucoup m'ont dit : « tu verras, c'est très dur, tu souhaiteras abandonner 100 fois mais il faudra t'accrocher, tu ne verras plus ta famille, tes amis, ton chéri mais il faudra t'accrocher. L'écriture de la thèse c'est aussi dur qu'un accouchement... ». Pas très rassurant tout ça ! C'est pourquoi, j'ai commencé par redouter la thèse, redouter les déprimés, redouter de ne pas être à la hauteur.

Aujourd'hui, trois ans ont passé et je dois dire que ces années de thèse ont été pour moi une réelle source de bonheur. S'il y a eu quelques expériences infructueuses, je n'ai jamais remis en question mon « désir de thèse ». J'ai beaucoup appris sur moi et ma relation aux autres. J'ai appris à affronter mes peurs, mes angoisses et à surmonter les échecs. Aujourd'hui je sors plus forte et grandie de cette expérience (dans ma tête bien sûr car il y a bien longtemps que je campe à 154 cm !!).

Je tiens à remercier toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ces travaux de thèse et à l'écriture de ce manuscrit.

Merci à David Hicks et Jean-Michel Lecerf d'avoir accepté d'évaluer ces travaux de thèse.

Merci à Philippe Brabet et Martine Claret d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse.

Merci au conseil régional de Bourgogne de m'avoir donné les moyens financiers de réaliser ce projet.

Merci à Mr et Mme Claret, de m'avoir donné les moyens financiers de réaliser ce projet et surtout d'avoir suivi avec attention l'avancement des travaux.

Merci à Corine Dot, Sophie Layé, et Norbert Latruffe d'avoir accepté de faire partie de mon comité de thèse.

Merci à Catherine Creuzot-Garcher et Alain Bron pour leur bonne humeur et leurs conseils avisés sur la rédaction des publications et de ce manuscrit.

Merci à toi, Lionel, de m'avoir donné la chance de réaliser ce projet. Merci de m'avoir guidé, encadré et de m'avoir fait confiance. Saches que si je sors « grandie » de cette expérience, c'est en partie grâce à toi. Pour terminer je n'ai qu'une chose à te dire : « Pronto, tutto bene? dove è paolo? è in cucina! ».

Merci à Elodie d'avoir supporté mes histoires drôles, pas toujours très drôles. D'ailleurs j'en ai une bonne... c'est l'histoire de Toto...

Merci à Niyazi de m'avoir initié à l'électrorétinographie et à l'angiographie. Merci pour ta gentillesse, ta disponibilité, pour ton aide et tes conseils dans la rédaction de ce manuscrit. « A l'amour ... ».

Merci à Bénédicte et Lucy de m'avoir supporté dans mes excès de folie et de débilité.

Merci à Marie-Annick pour tes conseils concernant les techniques d'immunohistochimie.

Merci à Laurent, notre sagittaire préféré, pour ton aide et tes conseils concernant la culture cellulaire. Je dois dire aussi que grâce à toi, plus personne ne lira l'horoscope du sagittaire de la même façon « ne t'inquiète pas Laurent, ça va s'arranger ».

Merci à mon p'tit Stephane, « mister strappman », pour les nombreux profils lipidiques réalisés pour moi et pour tous ces moments partagés à rire et surtout à philosopher sur la vie et l'amour.

Merci aux membres de la PlateForme Lipides Aromes (ou PFSB pour PlateForme SchokoBons), Stéphanie, Nicolas « mister binouz » et Oliver « mister mayo », pour les analyses HPLC-MS réalisées pour moi et pour tous ces délires partagés. Promis je vous apporterai des SchokoBons à vos anniversaires.

Merci aux animaliers, Élise, Laurence, Bruno et Patrick pour leur aide précieuse dans nos expériences *in vivo*.

Merci à mon « p'tit » Bertrand pour ton aide et tes conseils à mon arrivée dans l'équipe, et surtout pour tous ces moments de complicité.

Merci à ma petite Cynthia, rêveuse et romantique, pour ton aide et tes conseils concernant la PCR. Merci pour ta bonne humeur et ton petit (voire gros) grain de folie.

Merci à ma petite Sarah, ma jumelle de date de naissance (et de taille aussi), pour ton sourire et ta gentillesse. Je te souhaite beaucoup de bonheur avec ta petite princesse Eva et ton amoureux Imad.

Merci à Magalie « miss miss » pour ta gentillesse et ta bonne humeur. Ne t'inquiète pas, si tu aimes ce que tu fais, la thèse n'est pas si insurmontable que ça !

A mes trois louloutes Cynthia, Magalie et Sarah, merci d'avoir été mes confidentes. Je vous souhaite de réaliser de très belles thèses avec tout plein d'articles.

Enfin, du plus profond de mon cœur, je remercie chacun d'avoir été là pour moi, de m'avoir écouté et épaulé quand dans ma vie il faisait gris. Merci à tous pour votre bonne humeur et pour tous ces fous rires partagés aux pauses café. Vous allez me manquer...

Je profite de ces remerciements pour annoncer officiellement la succession de la « lecture matinale de l'horoscope ». En effet, Mme Irma étant sur le départ, elle tient à léguer cette tâche à Cynthia, Magalie et Sarah ainsi qu'aux futurs doctorants de l'équipe.

Merci à ma famille, ma belle famille et mes amis d'avoir toujours été là pour moi. De m'avoir encouragé et soutenu jusqu'au bout. Si j'en suis là aujourd'hui c'est sans aucun doute grâce à vous !

Jonathan, comme chacun le sait, la vie de couple est jalonnée de nombreuses épreuves en tout genre et aujourd'hui je peux affirmer que la thèse en est une! Malgré tout, nous avons su dépasser les difficultés et en sortons tous deux grandis et plus complice que jamais. Je t'aime.

Résumé

Le vieillissement est défini par l'ensemble des processus physiologiques qui modifient la structure et les fonctions de l'organisme. Chez l'Homme, le vieillissement de la rétine peut aboutir à des pathologies telles que la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) ou la rétinopathie diabétique (RD). Néanmoins, les mécanismes impliqués dans le passage du vieillissement physiologique vers un état pathologique restent encore mal connus. Il semble qu'une alimentation riche en acides gras polyinsaturés à longue chaîne (AGPI-LC), notamment en oméga-3 comme l'EPA (acide eicosapentaénoïque) et le DHA (acide docosahexaénoïque), soit un facteur potentiellement protecteur vis-à-vis du développement de la DMLA et de l'insulinorésistance, principal facteur de risque de la RD. Cependant, la participation de l'alimentation à la protection contre de la DMLA ou la RD n'est envisagée que dans leurs formes les plus précoces, dans un but plus préventif que curatif. Une meilleure connaissance des mécanismes et des conséquences du vieillissement sur la rétine est ainsi nécessaire. De plus, les mécanismes par lesquels les AGPI-LC oméga-3 sont efficaces restent mal définis.

Afin de mieux comprendre comment une alimentation riche en AGPI-LC oméga-3 peut participer à la prévention du vieillissement de la rétine, nos travaux avaient pour objectifs d'évaluer :

1- l'impact des facteurs endogènes et environnementaux sur la fonction et le vieillissement de la rétine, et 2- l'adaptation de la rétine à un régime riche en AGPI-LC oméga-3.

Dans un premier temps, nous avons cherché à caractériser les effets de conditions nutritionnelles, environnementales ou endogènes génératrices de stress oxydatif et de produits terminaux de glycation dans la rétine, dans un modèle murin de vieillissement de la rétine humaine, la souris ApoB₁₀₀,LDLR^{-/-}. Dans un second temps, nous nous sommes attachés à définir les effets d'un régime plus ou moins enrichi en AGPI-LC oméga-3 sur le profil et le métabolisme lipidique de la rétine chez le rat.

Nos résultats montrent une altération de la fonction rétinienne (évaluée par électrorétinographie) associée à une accumulation de cellules microgliales et/ou macrophages dans la rétine des animaux soumis à un stress oxydatif et à des produits terminaux de glycation. L'insulinorésistance induite par un régime riche en fructose s'accompagne d'un effet similaire sur la fonction rétinienne et d'une modulation de gènes impliqués dans le métabolisme des lipides, l'inflammation et la synthèse de facteurs nucléaires comme LXR α et

PPAR δ . Le suivi des recommandations nutritionnelles susceptibles de prévenir le développement de la DMLA se traduit par une amélioration de l'incorporation des AGPI-LC oméga-3 dans la rétine et par la modulation du gène codant le récepteur aux LDL dans la rétine neurosensorielle, sans que la fonction de la rétine soit modifiée.

En conclusion, nos travaux montrent l'adaptation de la rétine d'une part à des conditions propices au vieillissement de la rétine et l'insulinorésistance, et d'autre part à un régime alimentaire riche en acides gras oméga-3 et pauvre en oméga-6, reconnu comme protecteur du vieillissement de la rétine. Enfin, nos études ouvrent de nouvelles pistes de recherche sur le rôle du métabolisme des lipides dans le vieillissement de la rétine et ses pathologies associées.

Abstract

Aging is defined by all the physiological processes that alter the structure and functions of the body. With advanced age, aging of the human retina can evolve into pathological forms, age-related macular degeneration (AMD) or diabetic retinopathy (DR). The mechanisms involved in the transition from normal aging to a pathologic state are poorly understood. Oxidative stress and advanced glycation end-products are promoting factors for aging of the retina. Meanwhile, epidemiological studies suggest that a diet rich in long-chain omega-3 polyunsaturated fatty acids (LC-PUFA) such as EPA (eicosapentaenoic acid) and DHA (docosahexaenoic acid), potentially protects against the development of AMD and insulin resistance, the main risk factor for DR. However, the mechanisms surrounding the effects of omega-3 LC-PUFA on aging of the retina are largely undefined. Interestingly, the protective effects of omega-3 LC-PUFA were greater when the intake in omega 6 linoleic acid was low. A better understanding of the mechanisms and consequences of aging on the retina on the one hand, and of the effects of omega-3 LC-PUFA on aging of the retina on the other hand, is warranted. Within this context, our research objectives were to assess:

- 1 - the impact of endogen and environmental factors, known to trigger oxidative stress, advanced glycation end-products (AGEs) or insulin resistance, on the function and aging of the retina, and
- 2 - the response of the retina to a omega-3 LC-PUFA-enriched diet.

The effects of nutritional, environmental or endogenous factors generating oxidative stress and AGEs on the retina were tested in a murine model of aging of the human retina: the ApoB₁₀₀,LDLR^{-/-} mouse.

Our results showed an alteration of the retinal function assessed by electroretinography, associated with the accumulation of microglial cells and/or macrophages in the outer retina in animals exposed to oxidative stress and AGEs. Insulin resistance triggered by a fructose-enriched diet had similar effects on retinal function: reduced response of the photoreceptors and loss of rod sensitivity. In addition, the expression of genes coding proteins involved in lipid metabolism, and nuclear factors such as PPAR δ and LXR α was modulated. Following the nutritional guidelines that would prevent the development of AMD improved the incorporation of omega-3 LC-PUFA in the retina and modulated the expression of the LDL-receptor gene in the neurosensory retina without changes in retinal function.

In conclusion, our works reported the adaptative response of the retina to environmental and endogenous factors known to promote aging of the retina. It included the impairment of the retinal function, and the modulation of gene expression. Our data also gave a better understanding of the effects of omega-3 LC-PUFA against aging of the retina. Lastly, our data support and suggest new roles of lipids and lipid metabolism in aging of the retina, and in the development of age-related disorders.

Abréviations

4-HNE	4-HydroxyNonEnal
A2E	Pyridinium bis-rétinoïde
ABCA1	ATP-Binding Cassette, sub-family A, member 1
ABCA4	ATP-Binding Cassette, sub-family A (ABC1), member 4
ABCG1	ATP-Binding Cassette, sub-family G, member 1
ACAT1	Acyl Coenzyme A-cholesterol-AcylTransferase 1
AGPI-LC	Acides Gras Polyinsaturés à Longue Chaîne
ALA	Alpha-Linolenic Acid (acide alpha-linolénique)
ALOX12	Arachidonate 12-LipOXYgenase
ALOX5	Arachidonate 5-LipOXYgenase
ANC	Apports Nutritionnels Conseillés
APOE	Apolipoprotéine E
AREDS	Age-Related Eye Disease Study Research
AVC	Accident Vasculaire Cérébral
CCL2	Chemokine (C-C motif) Ligand 2
CCL5	Chemokine (C-C motif) Ligand 5
CCR2	Chemokine (C-C motif) Receptor 2
CD18 ou Itgb2	Intégrine beta 2
CD36 ou FAT	Faty Acid Translocase
CD68	antigène CD68
CD80	antigène CD80
CD107 ou LAMP1	Lysosomal-Associated Membrane Protein 1
CEL	CarboxyEthylLysine
CEP	2- ω -CarboxyEthyl Pyrrole
CFH	Complement component Factor H
CHP	2- ω -CarboxyHeptyl Pyrrole
CML	CarboxyMéthylLysine
CPP	2- ω -CarboxyPropyl Pyrrole
CRALBP	Cellular RetinALdehyde Binding Protein
CRBP	Cellular Retinol-Binding Protein 1
CX1CR3	Chemokine (C-X-C motif) Receptor 3
DAG	DiAcylGlycérol

DHA	DocosaHexaenoïc Acid (acide docosahexaénoïqie)
DID	Diabète Insulino-Dépendant
DMLA	Dégénérescence Maculaire Liée à l'Age
DNID	Diabète Non Insulino-Dépendant
EPA	EicosaPentaenoïque Acid
EPR	Epithélium Pigmentaire Rétinien
ERO	Espèces Réactives de l'Oxygène
FGF	Fibroblast Growth Factor
GFAP	Glial Fibrillary Acidic Protein
GFAT	L-Glutamine-D-Fructose-6-phosphate AmidoTransferase
GMP	Guanosine MonoPhosphate
GMPc	Guanosine MonoPhosphate Cyclique
HK1	HexoKinase 1
HMGCR	HydroxyMéthylGlutaryl-Coenzyme A Réductase
HMGCS	HydroxyMéthylGlutaryl-Coenzyme A Synthase
HODA	9-Hydroxy-12-Oxo-10-Decenoic Acid
HOHA	4-Hydroxy-7-Oxo-5-Heptenoic Acid
HOOA	5-Hydroxy-8-Oxo-6-Octenoic Acid
HTRA1	HtrA serine peptidase 1
IDL	Intermediate Density Lipoprotein
IGF	Insulin-like Growth Factor
INSEE	Institut National de la Statistique et des Etudes Economiques
INSIG1	INSulin Induced Gene 1
IRBP	Interphotoreceptor Retinoid-Binding Protein
LA	Linoléique Acid (acide linoléique)
LCAT	Lécithine Cholestérol Acyl Transférase
LDL	Low Density Lipoprotein
LDLR	Low Density Lipoprotein Receptor
LPL	LipoProtein Lipase
LRAT	Lecithin-Retinol AcylTransferase
LRP1	Low-density lipoprotein Receptor-related Protein 1
LXR α	Liver X Receptor Alpha
MDA	MalonDiAldéhyde
MTP	Microsomal Triglyceride transfer Protein

NADPH	Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate
NFkB1	Nuclear Factor of Kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1
NFkB2	Nuclear Factor of Kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 2
NOS2	Nitric Oxide Synthase 2
NPD1	Neuroprotectine D1
PA	Potentiel d'Action
PAI-1	Plasminogen Activator Inhibitor 1
PDE	PhosphoDiEstérase
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor
PEDF	Pigment Epithelium-Derived Factor
PKC	Protéine Kinase C
PPAR δ	Peroxisome Proliferator Activator Receptor Delta
PTG	Produits Terminaux de Glycation
RD	Rétinopathie Diabétique
RDH	Retinol DesHydrogenase
RPE65	Retinal Pigment Epithelium-specific protein 65kDa
SOD2	SuperOxide Dismutase 2
SRB1	Scavenger Receptor class B, member 1
SREBP1	Sterol Regulatory Element Binding transcription factor 1
TGF- β	Transforming Growth Factor-beta
TIMP	Tissue Inhibitor of Matrix MetalloPro
UDP-GlcNAc	Uridyl-DiPhosphate-N-Acétylglucosamine
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VLDL	Very Low Density Lipoprotein

Table des matières

Liste des tableaux	15
Liste des figures	16
Introduction	18
Première partie : Contexte bibliographique	21
1. L'œil.....	22
1.1. Structure de l'œil.....	22
1.1.1. La tunique fibreuse.....	22
1.1.2. La tunique uvéale	23
1.1.3. La tunique nerveuse	23
1.1.3.1. La rétine neurale.....	23
1.1.3.1.1. La couche des photorécepteurs	24
1.1.3.1.2. La couche des cellules bipolaires	28
1.1.3.1.3. La couche des cellules ganglionnaires	28
1.1.3.1.4. Les cellules gliales	29
Les astrocytes	29
Les cellules de Müller	29
Les cellules microgliales	30
1.1.3.2. L'épithélium pigmentaire rétinien (EPR).....	30
1.1.4. Les milieux transparents.....	34
1.1.5. La vascularisation de l'œil	34
1.1.5.1. Le réseau vasculaire des tuniques fibreuse et uvéale	35
1.1.5.2. Le réseau vasculaire de la tunique neurale.....	37
1.1.5.3. Les barrières hémato-réiniennes	38
1.2. Physiologie de l'œil	39
1.2.1. La vision : de la phototransduction au potentiel d'action	39
1.2.2. Le cycle visuel.....	41
1.2.3. L'électrorétinographie	43
2. Du vieillissement physiologique de l'œil aux rétinopathies liées à l'âge.....	44
2.1. Le vieillissement.....	44
2.1.1. Les facteurs de vieillissement	45
2.1.1.1. La glycation non enzymatique des protéines	45
2.1.1.2. Le stress oxydatif	46
2.1.1.2.1. L'origine des ERO	46

2.1.1.2.2.	Les systèmes antioxydants	46
2.1.1.2.3.	L'impact des ERO sur la cellule	48
	L'ADN	48
	Les lipides	48
	Les glucides	49
	Les protéines	51
2.1.2.	Le vieillissement physiologique de la rétine	52
2.1.2.1.	Les altérations de la rétine neurale	52
2.1.2.2.	Les altérations de l'EPR	52
2.1.2.3.	Les altérations structurales et biochimiques de la membrane de Bruch	54
2.2.	Les rétinopathies liées à l'âge	55
2.2.1.	La Dégénérescence Maculaire Liée à l'Age (DMLA)	55
2.2.1.1.	La Maculopathie Liée à l'Age (MLA)	56
2.2.1.2.	La DMLA atrophique	57
2.2.1.3.	La DMLA exsudative	58
2.2.2.	La rétinopathie diabétique	59
2.2.2.1.	Le diabète	60
2.2.2.1.1.	Les types de diabète	60
2.2.2.1.2.	Les processus physiologiques à l'origine du diabète de type 2	61
	Régulation de la glycémie en condition physiologique	61
	Régulation de la glycémie et insulino-résistance	63
2.2.2.1.3.	Les modifications biochimiques liées à l'hyperglycémie	65
	La voie des polyols	65
	La voie des hexosamines	65
	Glycation non enzymatique des protéines	66
	Le stress oxydatif	67
2.2.2.2.	Le développement de la rétinopathie diabétique	69
2.2.3.	L'angiogenèse : stade ultime de la DMLA et la RD	70
2.2.3.1.	L'angiogenèse dans la DMLA	70
2.2.3.2.	L'angiogenèse dans la RD	71
2.2.4.	Les facteurs de risque de la DMLA et la RD	72
2.2.4.1.	Les facteurs de risques endogènes	72
2.2.4.2.	Les risques environnementaux	73
2.2.4.2.1.	Le tabagisme	73
2.2.4.2.2.	L'exposition à la lumière	73
2.2.4.2.3.	Les facteurs alimentaires	73
2.2.5.	Les traitements	76
2.2.5.1.	Les procédés physiques	76
2.2.5.2.	Les agents chimiques	76
2.2.6.	La prévention	77

3. Les modèles animaux associés au vieillissement et aux rétinopathies liées à l'âge	85
3.1. L'exposition des animaux aux facteurs de risque environnementaux	85
3.2. Les souris génétiquement modifiées	86
3.3. La souris ApoB₁₀₀, LDLR^{-/-} : modèle animal vieillissement de l'œil Humain.....	86
3.3.1. La construction du modèle ApoB ₁₀₀ ,LDLR ^{-/-}	86
3.3.2. Caractéristiques du modèle ApoB ₁₀₀ ,LDLR ^{-/-}	89
Deuxième partie : Évaluation de l'impact de facteurs endogènes et/ou environnementaux sur le vieillissement rétinien chez la souris ApoB₁₀₀, LDLR^{-/-}	93
Troisième partie : Étude des effets d'un régime pro-diabétique sur le vieillissement rétinien chez la souris ApoB₁₀₀, LDLR^{-/-}	132
Quatrième partie : Etude de l'effet de facteurs nutritionnels, en particulier des apports nutritionnels conseillés pour les acides gras, sur le vieillissement rétinien chez le rat ..	167
Discussion et perspectives.....	180
Bibliographie.....	189
Annexes	209
Article de revue publié dans OCL	210
Article de critique publié dans Expert Review of Ophthalmology	215

Liste des tableaux

Tableau 1 : Lésions observées au cours de la DMLA atrophique.....	57
Tableau 2 : Facteurs de risques endogènes associés à la DMLA et la RD.	72
Tableau 3 : ANC en acides gras pour un adulte consommant 2000 kcal.....	81

Liste des figures

Figure 1 : Anatomie de l'œil.	22
Figure 2 : Organisation cellulaire de la rétine.	24
Figure 3 : Structure des photorécepteurs.	25
Figure 4 : Spectre d'absorption des photorécepteurs.	26
Figure 5 : Structure et localisation de la rhodopsine.	27
Figure 6 : Densité des photorécepteurs dans la rétine.	27
Figure 7 : Divers types de photorécepteurs, cellules bipolaires et cellules ganglionnaires.	28
Figure 8 : Cellules gliales dans la rétine.	30
Figure 9 : Localisation de l'EPR.	31
Figure 10 : Distribution des organites dans les cellules de l'EPR.	31
Figure 11 : Aperçu des différentes fonctions de l'EPR.	32
Figure 12 : Organisation structurale de la membrane de Bruch.	33
Figure 13 : Mise en place des différentes du réseau vasculaire irrigant l'œil.	35
Figure 14 : Vascularisation des tuniques de l'œil.	36
Figure 15 : Organisation du réseau vasculaire chorôïdien.	36
Figure 16 : Organisation du réseau microvasculaire de la rétine.	37
Figure 17 : Vascularisation de la zone maculaire.	38
Figure 18 : Etapes de la phototransduction dans les bâtonnets.	40
Figure 19 : Différents types de réponses des cellules de la rétine.	41
Figure 20 : Le cycle visuel.	43
Figure 21 : Réponse de la rétine suite à un stimulus lumineux.	44
Figure 22 : Formation des produits terminaux de glycation.	45
Figure 23 : PTG présents dans la membrane de Bruch et l'EPR au cours du vieillissement.	45
Figure 24 : Formation des espèces réactives de l'oxygène.	47
Figure 25 : Produits terminaux d'oxydation lipidiques issus des acides gras.	49
Figure 26 : PTG détectés dans l'organisme au cours du vieillissement.	50
Figure 27 : Deux voies de production de PTG.	51
Figure 28 : Formation des granules de lipofuscine.	53
Figure 29 : Dépôts observés au niveau de la membrane de Bruch au cours du vieillissement.	54
Figure 30 : Altérations de la vision au cours de la DMLA.	56
Figure 31 : Photographie du fond d'œil d'un patient atteint de MLA.	57
Figure 32 : Photographie du fond d'œil d'un patient atteint de DMLA atrophique.	58
Figure 33 : Photographie du fond d'œil d'un patient atteint de DMLA exsudative.	58
Figure 34 : Altérations de la vision au cours de la RD.	59
Figure 35 : Régulation de la glycémie en condition physiologique.	62
Figure 36 : Régulation de la glycémie et insulino-résistance.	64
Figure 37 : Effet de l'hyperglycémie sur le métabolisme cellulaire.	68
Figure 38 : Photographie du fond d'œil de patients atteints de RD.	70
Figure 39 : Néovascularisation pathologique dans la DMLA et la RD.	71
Figure 40 : Métabolisme du fructose.	75
Figure 41 : Structure de quelques des acides gras des séries oméga-6 et oméga-3.	79
Figure 42 : Biosynthèse des AGPI-LC de la série des oméga-6 et oméga-3.	80
Figure 43 : Médiateurs pro- et anti-inflammatoire issu des acides gras membranaires.	83
Figure 44 : Construction des souris transgéniques ApoB100 et LDLR ^{-/-}	89
Figure 45 : Esters de cholestérol sur coupe d'œil de souris sauvages et ApoB ₁₀₀ ,LDLR ^{-/-} âgées de 14 mois.	90
Figure 46 : ERG sur des sauvages et ApoB ₁₀₀ ,LDLR ^{-/-} âgées de 14 mois.	90

Figure 47 : Autofluorescence au fond d'œil et vascularisation de la rétine chez les souris ApoB ₁₀₀ ,LDLR ^{-/-} âgées de 14 mois.....	91
Figure 48 : Effets supposés d'un régime enrichi en fructose sur la rétine.	166

Introduction

Le vieillissement est un processus physiologique qui conduit à des modifications de la structure et des fonctions de l'organisme. Résultant des effets conjoints de facteurs génétiques et environnementaux, il touche l'ensemble des organes et peut aboutir au développement de pathologies dites liées à l'âge. Chez l'Homme, la rétine peut être affectée par diverses pathologies liées à l'âge dont la Dégénérescence Maculaire Liée à l'Age (DMLA) ou la Rétinopathie Diabétique (RD), premières causes de cécité dans les pays industrialisés.

Malgré une étiologie et des signes cliniques distincts, ces pathologies présentent des caractéristiques communes tant au niveau des mécanismes moléculaires impliqués que de l'impact qu'elles peuvent avoir sur la vision. En effet, la DMLA est la conséquence de l'accumulation d'anomalies métaboliques survenant avec l'âge tandis que la RD est d'avantage liée aux conséquences de l'exposition chronique de l'organisme à une hyperglycémie. De plus, leur stade le plus sévère se caractérise par une composante néovasculaire pathologique aboutissant le plus souvent à des œdèmes et des hémorragies dans la rétine. Elles présentent également des mécanismes biochimiques communs généralement décrits au cours du vieillissement comme l'émergence d'un stress oxydatif résultant de l'accumulation de biomolécules oxydées par des espèces réactives de l'oxygène et la formation de produits terminaux de glycation.

Avec l'allongement de l'espérance de vie, la prévalence de ces rétinopathies progresse de façon importante depuis ces dernières années. D'après l'Institut National de la Statistique et des Etudes Economiques (INSEE), en 2050 en France, 22,4 millions d'habitants seront âgés de plus de 60 ans, représentant alors 35% de la population totale contre 20% aujourd'hui. Dans ce contexte, le nombre de personnes atteintes de DMLA et de RD devrait donc fortement augmenter dans les années à venir.

Ainsi, de par l'augmentation du nombre de personnes âgées et la perte inévitable d'autonomie des patients atteints, la DMLA et la RD sont devenues, en quelques années, de véritables problèmes de santé publique.

Les thérapies actuellement utilisées dans le traitement de ces rétinopathies restent limitées aux formes néovasculaires. Par ailleurs, les thérapies préventives sont encore préliminaires et balbutiantes. Bien que les déterminants génétiques et les mécanismes cellulaires impliqués

dans le développement de ces pathologies soient très différents, identifier les facteurs de prédisposition et mieux comprendre les mécanismes conjoints à ces deux formes de néovascularisation, permettrait d'élaborer de nouvelles stratégies préventives.

Notre équipe a récemment identifié un modèle murin présentant des accumulations d'esters de cholestérol au niveau de la rétine et une altération de la fonction visuelle, ce qui en fait un modèle particulièrement pertinent pour l'étude du vieillissement de la rétine humaine. La souris ApoB₁₀₀,LDLR^{-/-} est un modèle qui se situerait à la charnière entre le vieillissement physiologique et un état de rétinopathie. En cela, il constitue un modèle de choix pour étudier les effets délétères ou éventuellement protecteurs des facteurs environnementaux ou/et nutritionnels sur le vieillissement rétinien.

Les travaux présentés dans ce manuscrit ont pour but de déterminer dans quelle mesure des facteurs nutritionnels et environnementaux peuvent participer au vieillissement rétinien et aux rétinopathies liées à l'âge. Nous nous sommes penchés plus particulièrement sur la DMLA et la RD qui sont comme nous l'avons cité précédemment les deux premières causes de cécité dans les pays industrialisés.

La première partie de ce manuscrit vise à présenter le vieillissement de l'œil et plus particulièrement de la rétine dans un contexte de vieillissement physiologique puis dans des contextes pathologiques tels que la DMLA et la RD. Nous exposons également les différents facteurs de risque et facteurs préventifs actuellement liés à ces rétinopathies.

Les parties suivantes décrivent les travaux réalisés au cours de ma thèse :

- 1- Dans une première partie nous avons cherché à évaluer les effets de facteurs endogènes et/ou environnementaux sur le vieillissement rétinien de la souris ApoB₁₀₀,LDLR^{-/-}.
- 2- Dans une seconde partie, nous avons étudié les conséquences de l'insulinorésistance sur la rétine par une approche fonctionnelle, clinique et moléculaire chez la souris ApoB₁₀₀,LDLR^{-/-}.

- 3- Dans une troisième partie, nous avons évalué chez le rat l'effet d'un régime respectant les apports nutritionnels recommandés en acides gras, sur le profil lipidique et l'expression génique dans la rétine et le complexe épithélium pigmentaire rétinien/choroïde.

La cinquième partie est consacrée à la discussion générale des résultats, à la conclusion de l'ensemble de ces expériences et aux travaux en perspective

Première partie :
Contexte bibliographique

1. L'œil

1.1. Structure de l'œil

L'œil, organe de la vue, constitue avec l'ouïe, le toucher, l'audition et l'odorat l'un des cinq sens nous permettant d'appréhender le monde et d'évoluer dans notre environnement. Globalement sphérique, l'œil humain mesure 2,5 cm de diamètre et pèse environ 7 grammes. Il se compose de trois tuniques : la tunique fibreuse, la tunique uvéale et la tunique nerveuse ; et de trois milieux transparents : la cavité antérieure, le cristallin et la cavité postérieure (Figure 1).

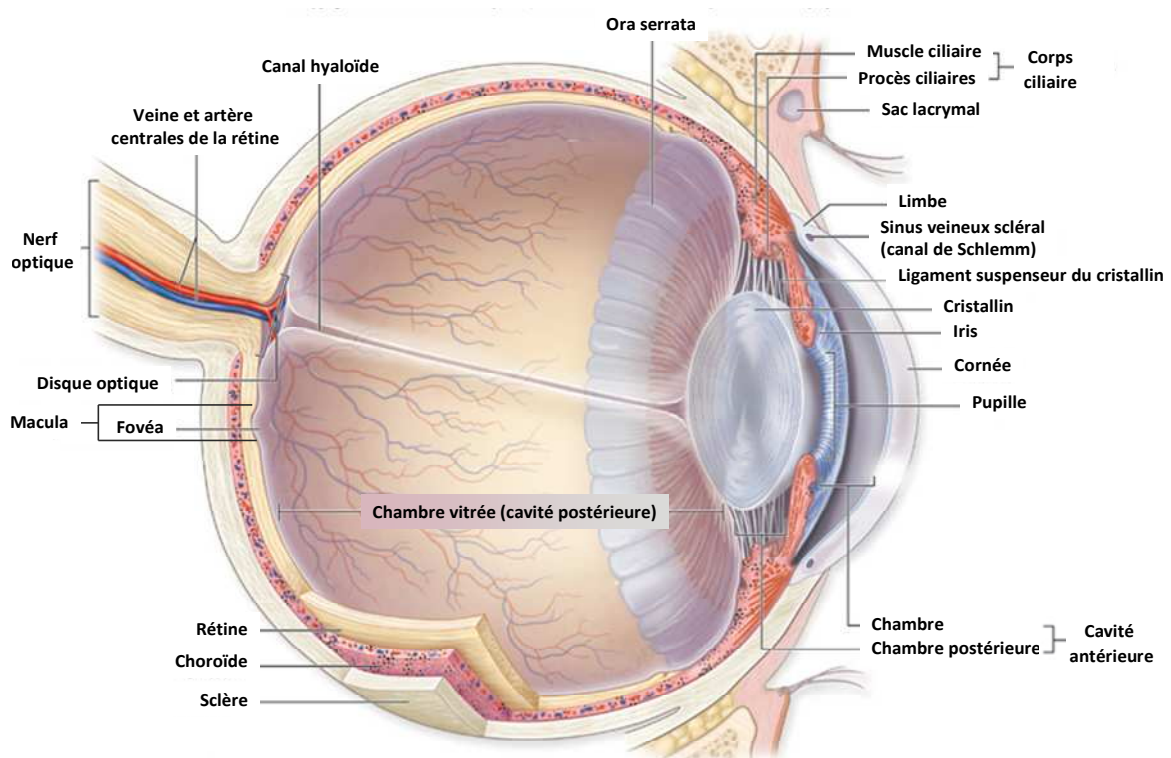


Figure 1 : Anatomie de l'œil.
D'après the McGraw hill Companies, Inc.

1.1.1. La tunique fibreuse

La tunique fibreuse est constituée de la sclère et la cornée (Figure 1).

La cornée est une lame de tissu conjonctif dense, transparente et avasculaire. Épaisse de 0,5 mm environ, elle a un rôle fondamental dans la vision puisqu'elle permet la convergence des rayons lumineux vers la rétine (Nishida 2005).

La sclère entoure les 4/5^{ème} du globe. Constituée de lamelles de fibres de collagène entrecroisées de protéoglycanes, c'est la plus solide et la plus résistante des tuniques de l'œil, ce qui lui confère un rôle protecteur. Le bord postérieur de la sclère est formé par le canal scléral, lieu de passage des vaisseaux centraux de la rétine et du nerf optique, tandis que le bord antérieur de la sclère forme la jonction cornéo-sclérale (ou limbe) dans laquelle vient s'encastrier la cornée (**Rada and Johnson 2005**).

1.1.2. La tunique uvéale

La tunique uvéale est constituée de l'iris, du corps ciliaire et de la choroïde (Figure 1).

L'iris est situé entre la cornée et le cristallin délimitant ainsi la chambre antérieure de la chambre postérieure de l'œil. Il est pigmenté et constitué de muscles dilatateurs et sphinctères organisé en un anneau. Le trou situé en son centre est appelé la pupille. L'iris est innervé par des fibres du système nerveux autonome qui activent ses muscles responsables de la dilatation et de la constriction pupillaire (**Cherwek et al. 2006**).

Le corps ciliaire est un anneau de tissu musculaire et de procès ciliaires. Les muscles permettent le maintien du cristallin et en modifient la forme lors de l'accommodation tandis que les procès ciliaires produisent l'humeur aqueuse.

La choroïde est une couche riche en vaisseaux sanguins et en mélanocytes. Elle est le tissu nourricier de l'œil car elle participe aux apports en oxygène et nutriments nécessaires aux cellules de la rétine. Son organisation est détaillée dans la partie « 1.1.5. La vascularisation de l'œil ».

1.1.3. La tunique nerveuse

La tunique nerveuse se compose de la rétine neurale et de l'épithélium pigmentaire rétinien (EPR) (Figure 2).

1.1.3.1. La rétine neurale

La rétine neurale est la partie de l'œil responsable de la transformation des rayons lumineux en influx nerveux. Epaisse d'environ 0,25 mm, elle est constituée de divers types cellulaires dont les corps cellulaires se répartissent en trois couches distinctes : la couche nucléaire externe (constituée des photorécepteurs), la couche nucléaire interne (constituée de cellules

bipolaires, cellules amacrines et cellules horizontales) et la couche des cellules ganglionnaires (Figure 2). Les cellules établissent des synapses entre elles au niveau de la couche plexiforme externe (synapses entre la couche nucléaire externe et la couche nucléaire interne) et de la couche plexiforme interne (synapses entre la couche nucléaire interne et la couche des cellules ganglionnaires).

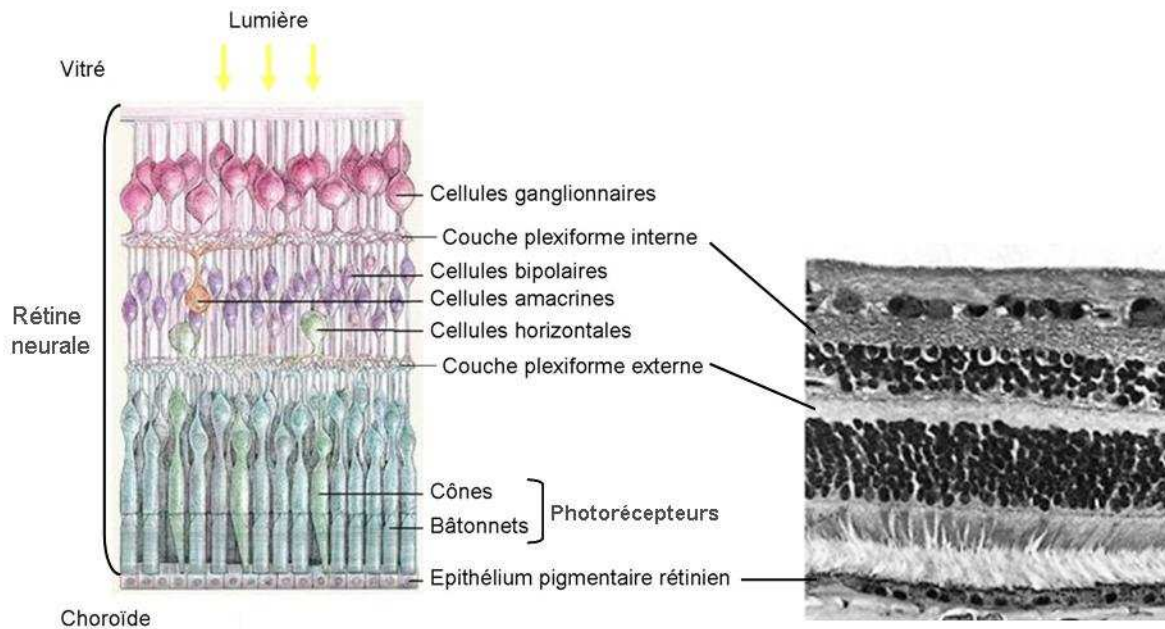


Figure 2 : Organisation cellulaire de la rétine.
Adapté de (Mecklenburg and Schraermeyer 2007).

Chacune de ces couches possède une organisation structurale et une physiologie propre décrites ci-dessous.

1.1.3.1.1. La couche des photorécepteurs

Il existe deux types de photorécepteurs : les bâtonnets et les cônes (Figure 3).

Bien que les cônes et les bâtonnets se distinguent l'un de l'autre par la forme caractéristique de leur segment externe (cylindrique pour les bâtonnets et conique pour les cônes), ils ont néanmoins une structure similaire (Figure 3). Dans le segment interne des photorécepteurs on trouve la machinerie nécessaire au métabolisme cellulaire mais surtout de nombreuses mitochondries indispensables à la production d'adénosine triphosphate (ATP), molécules source d'énergie. Le segment externe quant à lui contient essentiellement des photopigments enchâssés dans des membranes (de disques pour les bâtonnets, ou de replis de la membrane plasmique pour les cônes) (Figure 3). Le segment externe est continuellement renouvelé grâce

à un équilibre entre la phagocytose de son extrémité distale par l'EPR et sa croissance au niveau du cil connecteur (**Anderson *et al.* 1978; Kevany and Palczewski 2011**).

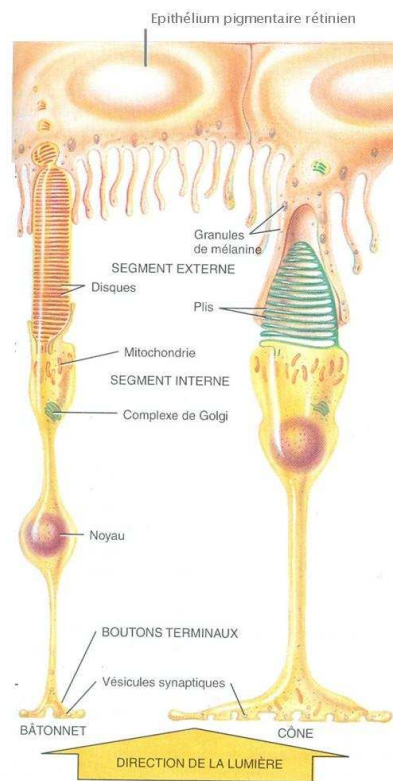


Figure 3 : Structure des photorécepteurs.
D'après (**Tortora and Grabowski 2002**).

Chez l'Homme, la rétine contient en moyenne 92 millions de bâtonnets (**Curcio *et al.* 1990**). La longueur d'un bâtonnet est d'environ 30 μm et le segment externe a un diamètre variant de 1 μm dans la région centrale de la rétine (région fovéale) à 2,5 μm à la périphérie de la rétine. Le segment externe d'un bâtonnet peut contenir un empilement de 700 à 1 100 disques.

Chez l'Homme, la rétine contient en moyenne 4,6 millions de cônes (**Curcio *et al.* 1990**). La longueur d'un cône varie de 80 μm en région fovéale à 22 μm à la périphérie de la rétine. Le segment externe a un diamètre variant de 1,5 μm dans la région fovéale à 6 μm à la périphérie. Les cônes se répartissent en trois grandes familles correspondant respectivement à leur longueur d'onde d'absorption maximale. Ainsi les cônes de type L (long) présentent une capacité maximale d'absorption des photons pour de grandes longueurs d'onde situées vers 560 nm (dans le rouge) ; les cônes M (medium) ont une capacité maximale d'absorption des photons pour des longueurs d'onde situées vers 530 nm (dans le vert) et les cônes S (short)

ont une capacité maximale d'absorption des photons pour de courtes longueurs d'onde situées vers 420 nm (dans le bleu) (Figure 4).

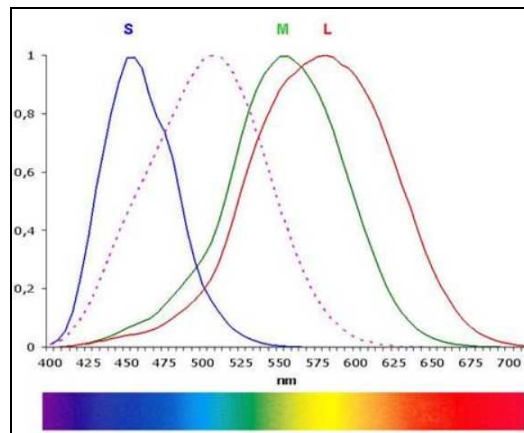


Figure 4 : Spectre d'absorption des photorécepteurs.

Les courbes en trait plein représentent le spectre d'absorption des trois types de cônes tandis que la courbe en pointillé représente le spectre d'absorption des bâtonnets.

D'après (**Bowmaker and Dartnall 1980**).

Comme évoqué précédemment, la rétine neurale est responsable de la transformation du signal lumineux en message nerveux. Ce message nerveux est généré au niveau des photorécepteurs grâce à l'activation des photopigments contenus dans leur segment externe. Il existe quatre photopigments différents composés de façon similaire d'une protéine membranaire appelée opsine dans les cônes (3 types) et rhodopsine dans les bâtonnets, associée à un chromophore : le 11-*cis*-rétinal, dérivé de la vitamine A (Figure 5). Les quatre opsines diffèrent par leur séquence en acides aminés ce qui influence leur absorption de la lumière. Ainsi, les bâtonnets sont sensibles à de faibles intensités lumineuses (vision scotopique) mais ne permettent pas de distinguer les couleurs, tandis que l'activation des cônes nécessite de fortes intensités lumineuses (vision diurne) et permet la vision en couleur.

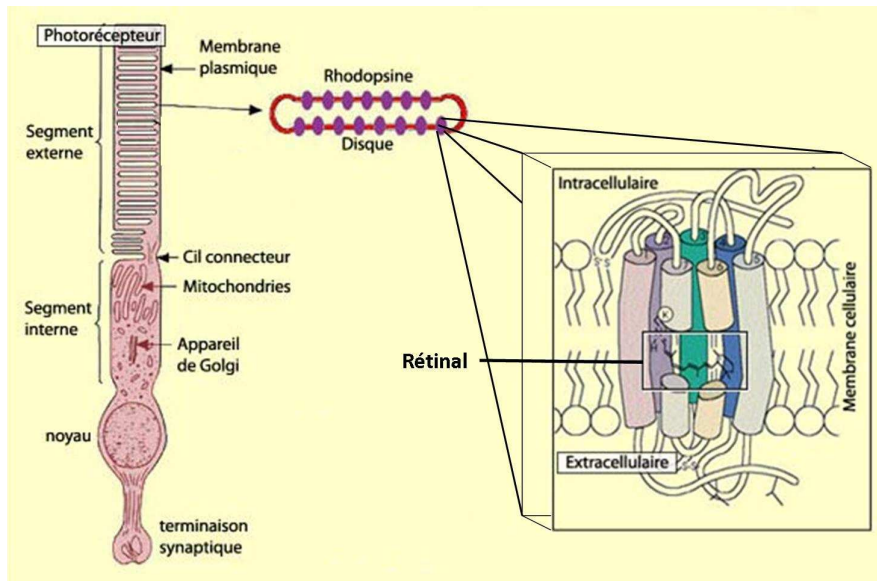


Figure 5 : Structure et localisation de la rhodopsine.
Adapté de (Hargrave 2001).

La répartition des photorécepteurs n'est pas homogène sur toute la rétine (Figure 6). En effet, au centre de la rétine se trouve une région d'environ 3 mm de diamètre caractérisée par une concentration maximale de cônes, la macula lutea. Cette macula lutea contient en son centre une petite dépression appelée fovéa. Exclusivement constituée de cônes, la fovéa est la zone d'acuité visuelle maximale, c'est-à-dire celle qui donne la vision la plus précise des détails et des couleurs en condition diurne.

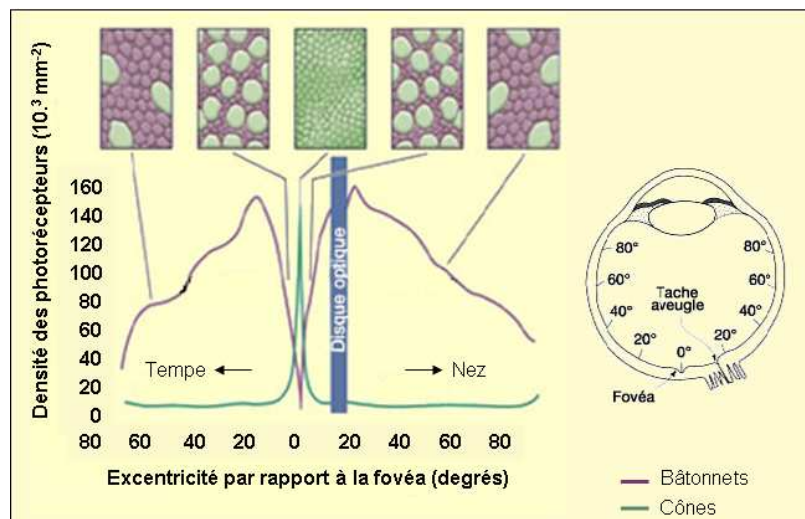


Figure 6 : Densité des photorécepteurs dans la rétine.
Adapté de (Osterberg 1935) et (Curcio *et al.* 1990).

1.1.3.1.2. La couche des cellules bipolaires

Les cellules bipolaires établissent des connections synaptiques avec les photorécepteurs et les cellules ganglionnaires. Le nombre de ces connections synaptiques est variable : d'une au centre de la fovea, jusqu'à des milliers dans la rétine périphérique. Il existe deux types de cellules bipolaires : les cellules bipolaires ON qui établissent des synapses avec les bâtonnets et les trois types de cônes (S, M et L) et les cellules bipolaires OFF qui ne font synapses qu'avec les cônes L et M (Figure 7). La fonction des cellules bipolaires ON et OFF est décrite dans la partie « 1.2.1. La vision : de la phototransduction au potentiel d'action ». Les cellules bipolaires établissent également des connections synaptiques avec les cellules amacrines et horizontales qui participent à la modulation de la réponse de la rétine suite à un stimulus lumineux.

1.1.3.1.3. La couche des cellules ganglionnaires

Chez l'Homme, les cellules ganglionnaires, lieu d'apparition des potentiels d'action, représentent une population d'environ 1 million de cellules. Comme pour les cellules bipolaires il existe des cellules ganglionnaires ON et OFF (Figure 7). La fonction des cellules bipolaires ON et OFF est également décrite dans la partie « 1.2.1. La vision : de la phototransduction au potentiel d'action ».

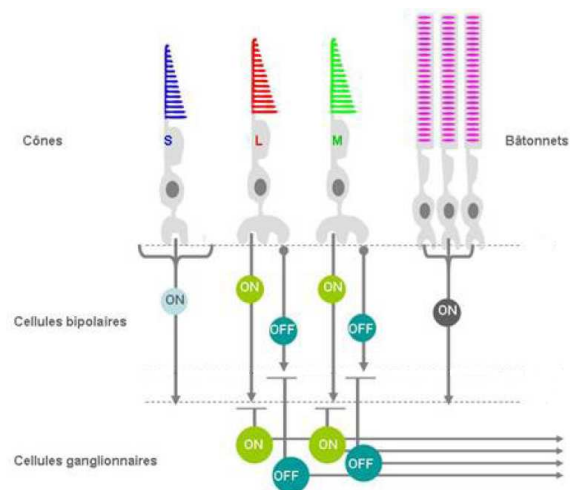


Figure 7 : Divers types de photorécepteurs, cellules bipolaires et cellules ganglionnaires. D'après (Rigaudière 2010).

1.1.3.1.4. Les cellules gliales

La rétine neurale contient également trois types de cellules gliales : les cellules de Müller, les astrocytes et les cellules microgliales. Les cellules de Müller et les astrocytes (appelées cellules macrogliales) participent au maintien de l'homéostasie de la rétine tandis que les cellules microgliales sont des cellules du système immunitaire résidentes de la rétine.

Les astrocytes

Les astrocytes sont principalement présents dans la couche des cellules ganglionnaires (Figure 8). Leurs prolongements, en contact avec les vaisseaux sanguins et les cellules ganglionnaires, forment un réseau essentiel au soutien des structures rétinienne. Les astrocytes ont plusieurs fonctions dans la rétine. Tout d'abord lors du développement, ils forment une matrice cellulaire utilisée comme support à la formation du réseau vasculaire rétinien (**Sandercoe et al. 1999; Provis 2001; Fruttiger 2007**). Ils participent également à la mise en place de la barrière hémato-rétinienne (décrite dans la partie « 1.1.5.3 Les barrières hémato-rétiniennes »). En effet le recouvrement des vaisseaux rétinien par les prolongements des astrocytes limitent les échanges entre le sang et la rétine (**Rungger-Brandle and Leuenberger 2008**). Les astrocytes jouent également un rôle actif dans le métabolisme neuronal. En effet, par leurs contacts au niveau des régions synaptiques, ils agissent sur la dispersion et la recapture des neurotransmetteurs, participant ainsi à la modulation du signal au cours de la vision.

Les cellules de Müller

Les cellules de Müller, environ 10 millions chez l'Homme, s'étendent sur toute l'épaisseur de la rétine (Figure 8) et sont impliquées dans de multiples processus physiologiques. En effet, au cours du développement, les cellules de Müller guident la migration des bâtonnets et participent à la mise en place de connexions synaptiques fonctionnelles (**Sharma and Johnson 2000**). Elles contribuent au maintien du pH et de l'homéostasie ionique de la rétine, au contrôle de l'angiogenèse et à la régulation du flux sanguin rétinien (**Bringmann et al. 2006; Bringmann et al. 2009**). Elles régulent le taux de neurotransmetteurs au niveau des synapses, en particulier de glutamate, et participent au métabolisme du glucose et à la phagocytose des débris cellulaires issus des cellules de la rétine (**Bringmann et al. 2006**). Certaines études ont même montré que les cellules de Müller sont capables de dédifférencier en progéniteurs neuronaux pour se différencier en photorécepteurs (**Fischer and Reh 2003**;

Bernardos et al. 2007; Ramachandran et al. 2011). Enfin, les cellules de Müller contribuent au recyclage des photopigments des cônes (décrit dans la partie « 1.2.2. Le cycle visuel ») (**Muniz et al. 2007; Wang and Kefalov 2011**). Ainsi par leurs multiples fonctions, les cellules de Muller apparaissent indispensables au maintien de la fonction rétinienne.

Les cellules microgliales

Les cellules microgliales sont des cellules du système immunitaire résidentes de la rétine au niveau des couches plexiformes externe et interne de la rétine (Figure 8). Elles ont un rôle essentielle dans la défense immunitaire de la rétine (**Karlstetter et al. 2010**). En effet, en condition physiologique, elles sont de forme ramifiée, étoilée et sondent en permanence leur environnement grâce à leurs multiples prolongements cytoplasmiques. En condition pathologique, elles sont activées, changent de forme (amiboïde), et migrent à travers la rétine vers la région lésée (**Combadiere et al. 2007; Xu et al. 2009; Buschini et al. 2011**).

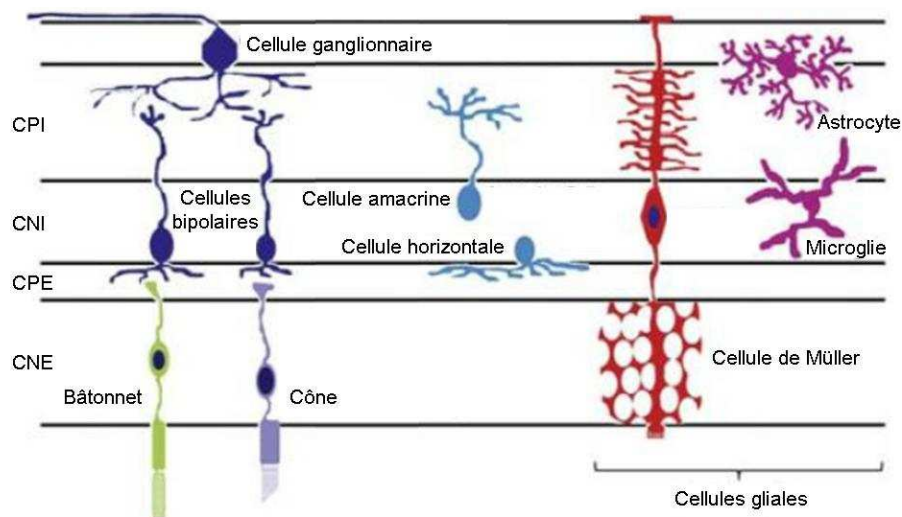


Figure 8 : Cellules gliales dans la rétine.

CPI = Couche Plexiforme Interne, CNI = Couche Nucléaire Interne,
CPE = Couche Plexiforme Externe, CNE = Couche Nucléaire Externe.
Adapté de (**West et al. 2009**).

1.1.3.2. L'épithélium pigmentaire rétinien (EPR)

L'EPR est constitué d'une monocouche de cellules post-mitotiques et pigmentées. Epais de 10 à 20 μm , il est inséré entre la rétine neurale et la choroïde (Figure 9). Comme tout épithélium, les cellules de l'EPR sont liées entre elles par des jonctions serrées (zonulae occludens) participant à l'élaboration d'une barrière entre la rétine et la choroïde : la barrière hémato-rétinienne externe.

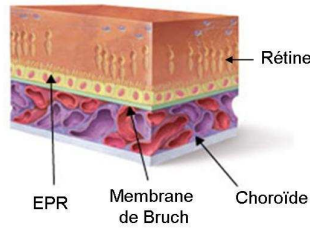


Figure 9 : Localisation de l'EPR.

De par la distribution asymétrique de ses organites et de ses protéines membranaires, l'EPR est polarisé en un domaine apical et un domaine basolatéral (Figure 10). Dans la partie basale se trouve généralement le noyau et les mitochondries tandis que dans la partie apicale se trouvent principalement des mélanosomes et des granules de lipofuscine. Leur membrane apicale forme des microvillosités contenant des mélanosomes et englobe la partie distale des segments externes des photorécepteurs.

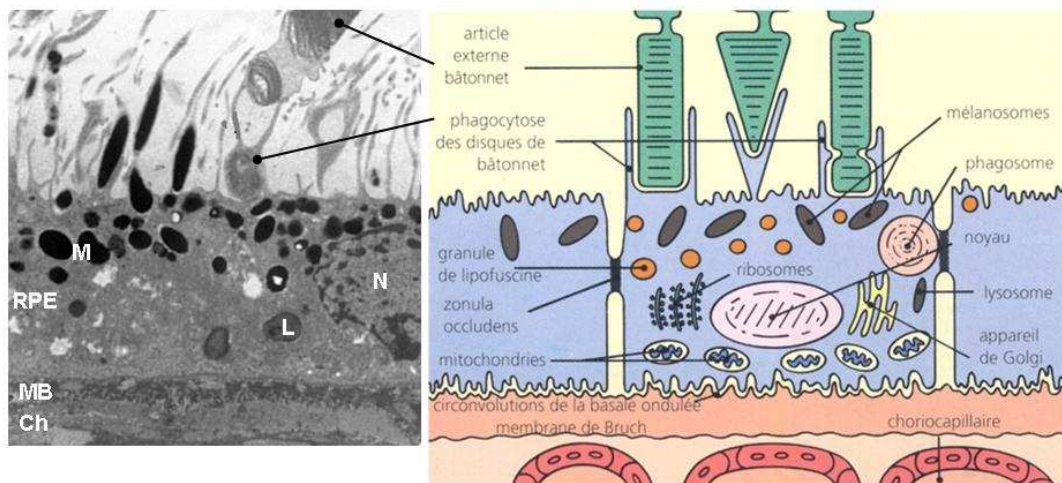


Figure 10 : Distribution des organites dans les cellules de l'EPR.

Ch = Choroïde, L = Lysosome, M = Mélanosome, MB = Membrane de Bruch,
EPR = Epithélium Pigmentaire Rétinien.

Adapté de (Mecklenburg and Schraermeyer 2007) et (Jarrett *et al.* 2008).

L'EPR est un élément essentiel au maintien de l'homéostasie générale de la rétine (**Marmor and Wolfensberger 1998; Strauss 2005**). Il participe à 90% des apports nécessaires à la survie et au fonctionnement des photorécepteurs (Figure 11). En effet, il régule le transport des nutriments et de l'oxygène de la choroïde vers les photorécepteurs et le transport des produits de dégradations métaboliques des photorécepteurs vers la choroïde. Les microvillosités de l'EPR contribuent au maintien de l'alignement des photorécepteurs et à la phagocytose de l'extrémité de leur segment externe (**Young 1976**). L'EPR participe au

recyclage des photopigments des bâtonnets (décrit dans la partie « 1.2.2. Le cycle visuel ») (Muniz *et al.* 2007). La mélanine contenue dans les mélanosomes absorbe la majorité des photons libres et capte les Espèces Réactives de l'Oxygène (ERO) produites par les mitochondries (Sarna 1992; Boulton *et al.* 2001). L'EPR secrète des facteurs nécessaires à l'intégrité structurale et fonctionnelle de la rétine comme le PEDF (Pigment Epithelium-Derived Factor), le FGF (Fibroblast Growth Factor), l'IGF (Insulin-like Growth Factor), le PDGF (Platelet-Derived Growth Factor), les interleukines, les TIMPs (Tissue Inhibitor of Matrix MetalloProtease), la NPD1 (NeuroProtectin D1) ou encore le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) (Tanihara *et al.* 1997; Witmer *et al.* 2003; Bazan 2006).

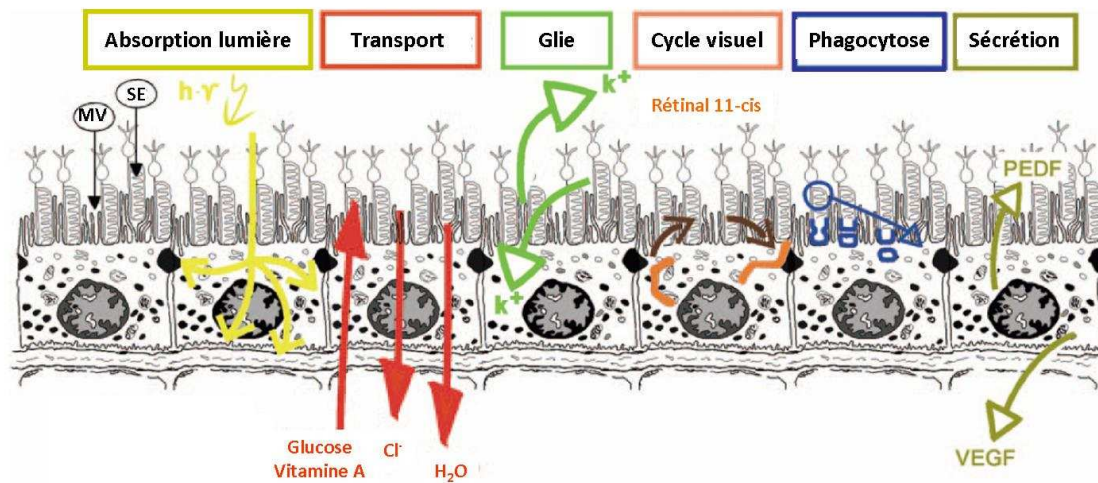


Figure 11 : Aperçu des différentes fonctions de l'EPR.
 MV = MicroVillosités, SE = Segment Externe.
 D'après (Strauss 2005).

L'EPR repose sur un tissu conjonctif appelé membrane de Bruch (Figure 9).

La membrane de Bruch est constituée de 5 couches : la lame basale de l'EPR, une couche de collagène interne, une couche élastique, une couche de collagène externe et la lame basale des choriocapillaires (Figure 12) (Booij *et al.* 2010).

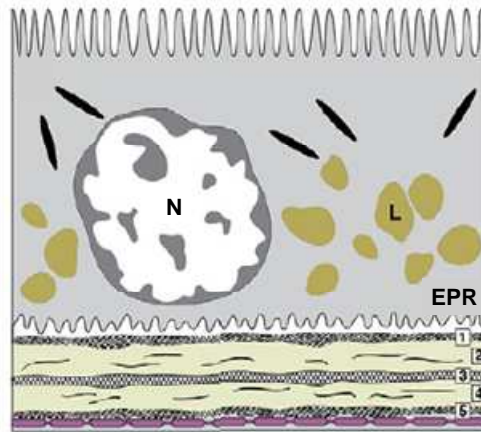


Figure 12 : Organisation structurale de la membrane de Bruch.
 1 = lame basale de l'EPR, 2 = couche de collagène interne, 3 = couche élastique,
 4 = couche de collagène externe, 5 = lame basale de la choriocapillaire.
 D'après (Curcio *et al.* 2009).

Variant de 0,14 à 0,15 μm d'épaisseur, les lames basales de l'EPR et de la choroïde sont composées de collagène de divers types, de laminine, de fibronectine, d'héparane sulfate et de glycosaminoglycanes telles que les chondroïtine et dermatane sulfate (Hewitt *et al.* 1989; Pauleikhoff *et al.* 1992; Chen *et al.* 2003; Aisenbrey *et al.* 2006). Les couches de collagène interne (60 nm) et externe (0,7 μm) sont toutes deux constituées de fibres de collagènes organisées en une structure semblable à une grille aux quelles sont associés des glycosaminoglycanes telles que la chondroïtine sulfate, le dermatane sulfate et l'acide hyaluronique (Hewitt *et al.* 1989) et des facteurs appartenant au système du complément et au processus de coagulation. Enfin, la couche élastique se compose de plusieurs couches de fibres d'élastines superposées de façon linéaire formant une plaque et d'autres molécules telles que du collagène et de la fibronectine. La couche élastique est perforée d'espaces interfibrillaires d'environ 1 μm permettant le passage de molécules. Contrairement aux autres couches, la couche élastique n'a pas le même arrangement sur toute la rétine. En effet, elle est trois à six fois plus mince et deux à cinq fois plus poreuse au niveau de la macula qu'au niveau de la rétine périphérique (Braekevelt 1983). La membrane de Bruch est acellulaire, ses constituant sont donc synthétisés par les cellules de l'EPR et de la choroïde (Chong *et al.* 2005; Van Soest *et al.* 2007).

De par sa situation - entre la choroïde et l'EPR - un grand nombre de biomolécules telles que les nutriments, l'oxygène, les lipides, la vitamine A, les minéraux ou encore les antioxydants diffusent de façon passive à travers la membrane de Bruch. Cette caractéristique lui confère un rôle important dans les échanges entre la rétine et la choroïde et donc indirectement dans fonction et la survie des cellules de la rétine (Booij *et al.* 2010). La diffusion des

biomolécules dépend en premier lieu de leur composition, de leur structure mais également de la pression hydrostatique et de la concentration moléculaire et ionique de part et d'autre de la membrane de Bruch (**Marmor and Wolfensberger 1998**).

1.1.4. Les milieux transparents

Les milieux transparents regroupent l'humeur aqueuse, le cristallin et le corps vitré (Figure 1).

L'humeur aqueuse remplit l'espace entre la cornée et le cristallin. Essentiellement composée d'eau, elle est produite par le corps ciliaire et résorbée au niveau du canal de Schlemm qui se jette dans les veines choroïdiennes. Ainsi l'humeur aqueuse est continuellement renouvelée.

Le cristallin est la lentille de l'œil. De forme biconvexe et transparent, il est constitué à sa face antérieure d'un épithélium synthétisant une abondance de protéines cristallines. Sa partie antérieure est en contact avec l'humeur aqueuse tandis que sa partie postérieure est accolée au corps vitré. Il est maintenu en place par une série de fibres amarrées au corps ciliaire. Sa plasticité lui permet de modifier ses courbures et donc son indice de réfraction lors de l'accommodation (**Bassnett et al. 2011**).

Le corps vitré est une masse gélatineuse et transparente représentant 60 % du volume oculaire chez l'Homme. Composé à 99 % d'eau, il contient également des macromolécules tels que des glycosaminoglycanes (l'acide hyaluronique, les chondroïtine et héparane sulfate) et divers types de collagènes (**Bishop 2000**). Il est contenu dans une enveloppe transparente appelée la hyaloïde et a plusieurs fonctions physiologiques comme le transport de molécules vers le cristallin (**Fatt 1977**), le maintien de la rétine contre les parois de l'œil et la protection de l'œil lors d'un traumatisme mécanique (**Foulds 1987**).

1.1.5. La vascularisation de l'œil

Le système vasculaire de l'œil humain est constitué de deux réseaux irriguant les trois tuniques de l'œil : le réseau vasculaire de la tunique neurale et le réseau vasculaire des tuniques fibreuse et uvéale (**Ducasse A. et al. 2008**).

Bien que différents dans leur structure, les deux réseaux vasculaires de l'œil tous deux natifs de l'artère ophtalmique, elle-même issue de la carotide interne (Figure 13) Dans la cavité

orbitale, l'artère ophtalmique se ramifie en une multitude d'artères secondaires dont certaines - les artères centrales de la rétine et les artères ciliaires - qui sont à l'origine de la formation des deux réseaux vasculaires. En effet, les artères centrales de la rétine donnent naissance au réseau vasculaire de la tunique neurale tandis que les artères ciliaires (antérieures, postérieures courtes et postérieures longues) forment le réseau vasculaire des tuniques fibreuse et uvéale (Figure 14). Le retour veineux est organisé selon le même schéma que la circulation artérielle via les veines centrales de la rétine, les veines ciliaires postérieures et les veines vortiqueuses (Figure 13).

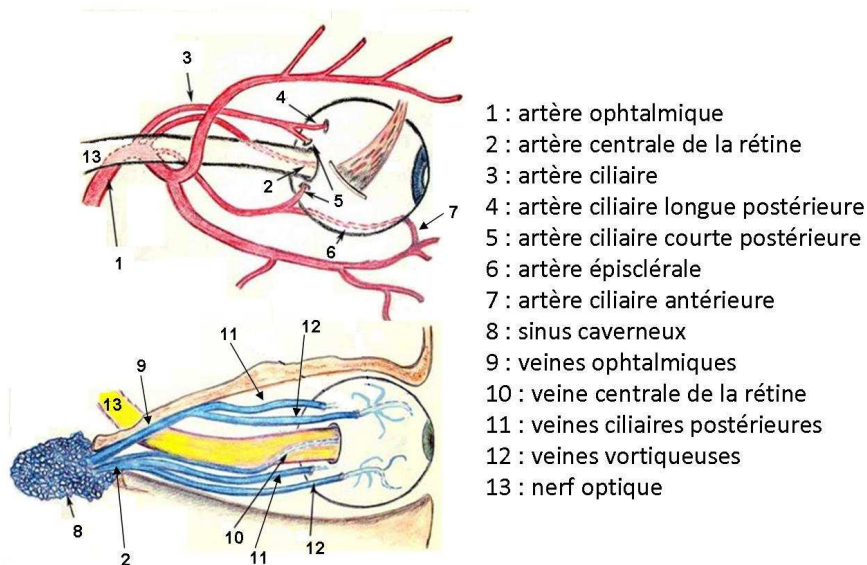


Figure 13 : Mise en place des différentes du réseau vasculaire irrigant l'œil.
 Adapté de (Tortora and Grabowski 2002).

1.1.5.1. Le réseau vasculaire des tuniques fibreuse et uvéale

Comme nous l'avons évoqué précédemment, le réseau vasculaire des tuniques fibreuse et uvéale est issu des artères ciliaires antérieures et postérieures (longues et courtes) (Cerulli *et al.* 2008).

Les artères ciliaires antérieures traversent la sclère 2 ou 3 mm avant la cornée et participent à la formation du grand cercle artériel de l'iris et des réseaux vasculaires conjonctival et épiscléral (Figure 14).

Les artères ciliaires longues postérieures traversent la sclère de part et d'autre du nerf optique et cheminent, sans se ramifier, dans la choroïde jusqu'à la racine de l'iris. Là, elle distribue deux branches dans le plan frontal qui forment, en s'anastomosant aux artères ciliaires antérieurs, le grand cercle artériel de l'iris (Figure 14).

Les artères ciliaires courtes postérieures traversent la sclère en avant des précédentes, au-dessus et au-dessous du nerf optique. Elles participent à la vascularisation du nerf optique et de la choroïde dans laquelle elles forment le réseau vasculaire choroïdien très dense et parfaitement organisé (Figure 14).

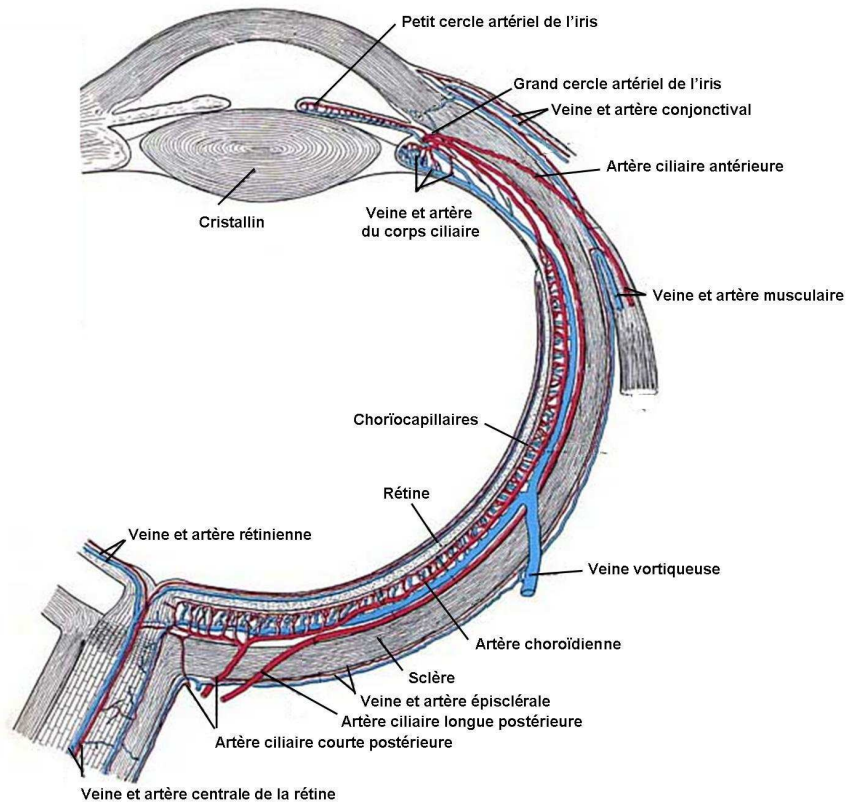


Figure 14 : Vascularisation des tuniques de l'œil.
Adapté de (Leber 1903).

En effet, le diamètre des vaisseaux choroïdiens est hiérarchisé en trois étages, de l'artère choroïdienne principale à la couche choriocapillaire épaisse de 10 à 30 μm et dont la paroi est particulièrement fine (Figure 15). Le drainage veineux de la choroïde s'effectue par les veines ciliaires postérieures et les veines vortiqueuses (Figure 14) (Cerulli *et al.* 2008).

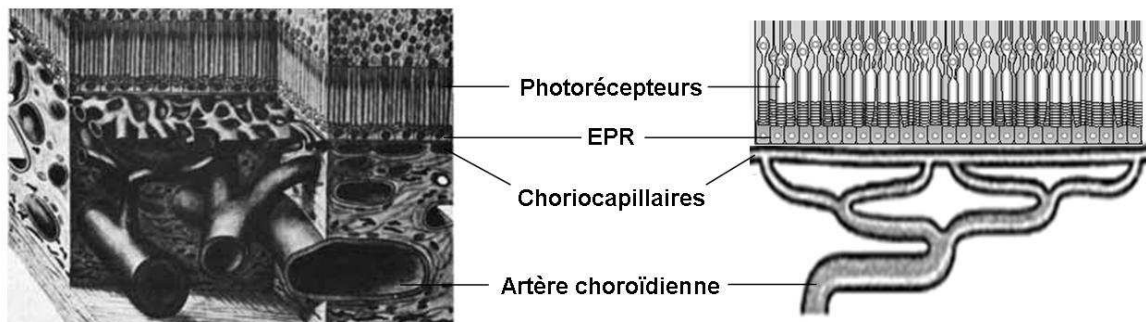


Figure 15 : Organisation du réseau vasculaire choroïdien.
Adapté de (Bargmann 1967).

1.1.5.2. Le réseau vasculaire de la tunique neurale

Le réseau vasculaire de la rétine naît des vaisseaux centraux de la rétine (Figure 14). Ces derniers pénètrent dans la rétine de part et d'autre du nerf optique et se ramifient en un réseau capillaire organisé en trois couches interconnectées (**Pournaras *et al.* 2008**). Le premier niveau de vaisseaux se situe à la surface interne de la rétine dans la couche des cellules ganglionnaires tandis que les deux autres niveaux sont répartis, l'un dans la couche nucléaire interne et l'autre dans la couche plexiforme externe (Figure 16) (**Henkind 1967; Bek and Jensen 1993**). Ainsi la couche des photorécepteurs est totalement avasculaire.

Le réseau veineux suit l'arrangement artériolaire. En effet, les veines rétiniennes suivent les artères rétiniennes puis, dans la rétine interne, les artérioles et les veinules s'anastomosent formant ainsi les capillaires rétiniens (**Pournaras *et al.* 2008**).

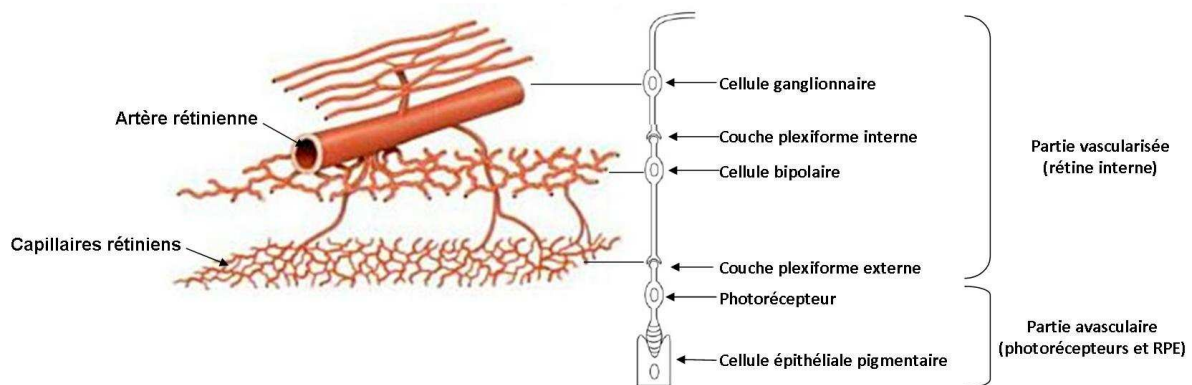


Figure 16 : Organisation du réseau microvasculaire de la rétine.
Adapté de (**Bek and Jensen 1993**).

La fovéa et sa périphérie font exception de cette organisation car le réseau vasculaire de la macula est disposé en une seule couche et la zone fovéolaire est totalement avasculaire (Figure 17). L'approvisionnement de la fovéa en nutriments et en oxygène dépend donc entièrement du réseau vasculaire choroïdien.

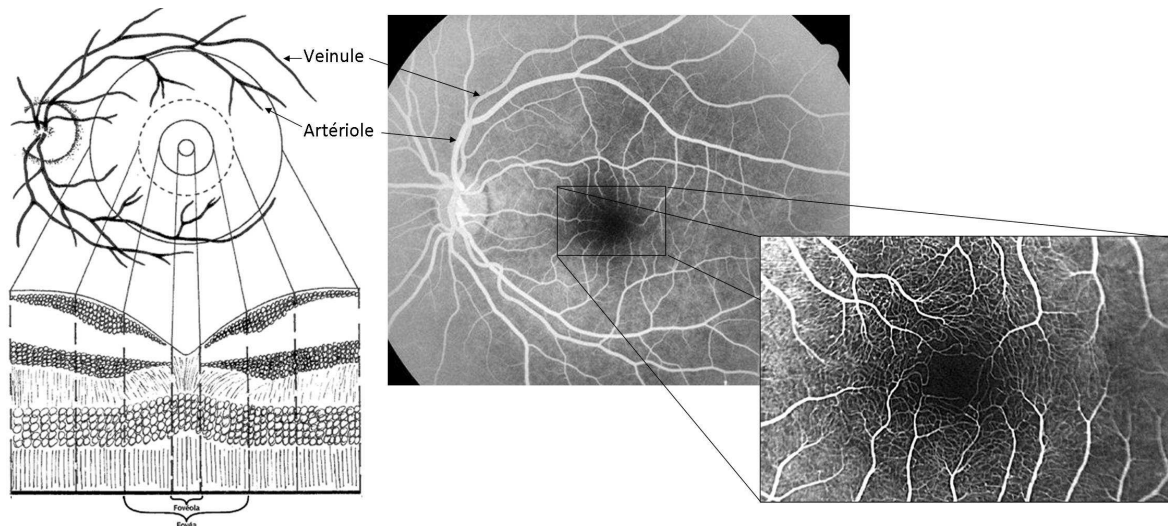


Figure 17 : Vascularisation de la zone maculaire.

Les photographies de droite représentent la vascularisation au fond d'œil après injection de fluorescéine.
Adapté de (Kolb 1995).

Bien que les réseaux vasculaires rétiniens et choroïdiens soient bien dissociés dans l'espace, ils se complètent dans leur fonction. En effet, la rétine puise ses besoins à la fois dans le réseau vasculaire rétinien et dans le réseau vasculaire choroïdien. Le réseau vasculaire rétinien supporte les deux tiers internes de la rétine tandis que le réseau vasculaire choroïdien irrigue le tiers externe de la rétine c'est-à-dire l'EPR et la couche des photorécepteurs qui sont avasculaires.

1.1.5.3. Les barrières hémato-rétiniennes

Les cellules rétinienne sont isolées du système vasculaire par deux barrières hémato-rétiniennes : la barrière hémato-rétinienne interne formée par le réseau vasculaire rétinien et la barrière hémato-rétinienne externe formée par le réseau vasculaire choroïdien (**Rungger-Brandle and Leuenberger 2008**).

La barrière hémato-rétinienne interne est constituée par les cellules endothéliales des vaisseaux rétinien, la lame basale des cellules endothéliales et des cellules musculaires lisses, appelées péricytes, entourant les cellules endothéliales. Le premier lieu de sélectivité de passage des molécules est formé par les jonctions serrées existant entre cellules endothéliales. De plus ces cellules reposent sur une lame basale épaissie limitant ainsi la diffusion passive de grosses molécules. Les péricytes forment une couche discontinue autour du vaisseau et participent à l'élaboration de la matrice extracellulaire. Ils possèdent des propriétés contractiles et exercent un contrôle local sur le flux sanguin (**Chakravarthy and Gardiner**

1999). De par leurs diverses fonctions, les péricytes participent à l'homéostasie de la barrière hémato-rétinienne interne. La paroi des capillaires rétiens est également en contact avec des cellules gliales telles que les astrocytes et les cellules de Müller. Cette gaine gliale joue un rôle de support structural et trophique des cellules vasculaires contribuant ainsi à l'intégrité de l'étanchéité et de la vasomotricité des vaisseaux.

La barrière hémato-rétinienne externe est constituée par les cellules endothéliales des vaisseaux choroïdiens, la membrane de Bruch et l'EPR. Comme pour la barrière hémato-rétinienne interne, les cellules endothéliales sont unies par des jonctions serrées constituant, là aussi, un premier lieu de sélectivité des molécules. Néanmoins les fenestrations qui existent entre les cellules endothéliales augmentent la perméabilité de la barrière hémato-rétinienne externe par rapport à la barrière hémato-rétinienne interne. La membrane de Bruch, fortement chargée négativement en raison de la présence de glycosaminoglycanes et des protéoglycanes, permet une seconde sélection des molécules pouvant atteindre la rétine. Enfin, les cellules de l'épithélium pigmentaire, liées entre elles par des jonctions serrées, sont capables de réguler les échanges entre la rétine et la choroïde constituant un troisième lieu de sélectivité.

1.2. Physiologie de l'œil

1.2.1. La vision : de la phototransduction au potentiel d'action

La fonction visuelle consiste à déduire une représentation tridimensionnelle de l'environnement à partir d'images rétiennes. C'est un mécanisme de phototransduction qui est initié au niveau des photorécepteurs et qui permet la conversion de l'énergie lumineuse en message nerveux (**Fu 1995**).

A l'obscurité, les photorécepteurs sont maintenus en constante dépolarisation grâce à l'ouverture de canaux cationiques sodiques (Na^+) et calciques (Ca^{2+}) dépendants de la concentration intracellulaire en guanosine monophosphate cyclique (GMPc). Ainsi à l'état basal, la différence de potentiel transmembranaire des photorécepteurs est de $-40 \text{ mV} \pm 10 \text{ mV}$ contre $-70 \text{ mV} \pm 10 \text{ mV}$ pour la plupart des cellules de l'organisme. Cet état de dépolarisation permanente des photorécepteurs induit une libération continue de leur neurotransmetteur, le glutamate.

A la lumière, les photons lumineux traversent toute l'épaisseur de la rétine pour induire, au niveau des segments externes des photorécepteurs, l'isomérisation du 11-*cis*-rétinal en tout-*trans*-rétinal, forme la plus stable du rétinal (Figure 18). Dès lors s'ensuit la séparation de

l'opsine dans les cônes ou de la rhodopsine dans les bâtonnets, et du tout-*trans*-rétinal. L'opsine ainsi activée (R*, Figure 18) se lie à transducine (G) tandis que le tout-*trans*-rétinal est transporté vers l'EPR pour être régénéré en 11-*cis*-rétinal dans le cycle visuel (ou cycle des rétinoïdes) décrit dans la partie suivante. La transducine est une protéine appartenant à la famille des protéines G et donc composée des trois sous-unités α , β et γ . Dans sa forme inactive, la sous-unité α de la transducine est liée au guanosine diphosphate (GDP), coenzyme de transfert de groupements phosphate. L'interaction R*/G induit un changement conformationnel de la transducine ce qui provoque le transfert d'un groupement phosphate sur le GDP formant ainsi le guanosine triphosphate (GTP). La sous-unité α liée au GTP se dissocie des sous-unités $\beta\gamma$ pour former la transducine activée (G*). Cette dernière se fixe alors à la phosphodiésterase (PDE) qui hydrolyse le GMPc cytoplasmique en guanosine monophosphate (GMP). La chute du taux de GMPc intracellulaire entraîne la fermeture des canaux cationiques situés au niveau des segments externes. Dans le même temps les canaux de fuite calciques et potassiques situés au niveau des segments internes restent ouverts, ce qui engendre une diminution du potentiel membranaire (hyperpolarisation) et donc une diminution du taux de glutamate libéré par le photorécepteur.

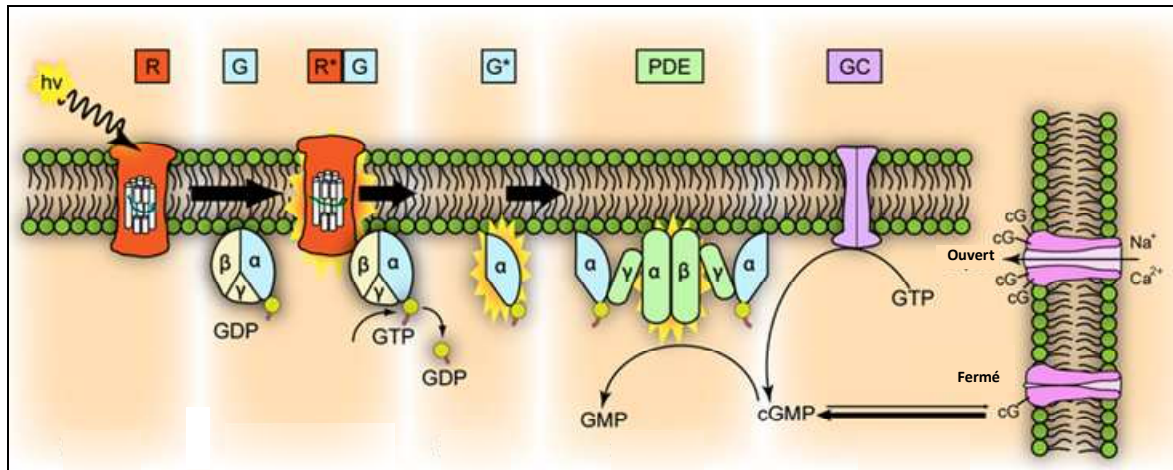


Figure 18 : Etapes de la phototransduction dans les bâtonnets.
D'après (Leskov *et al.* 2000).

La diminution du taux de glutamate synaptique induit des modifications de réponse des cellules bipolaires. En effet, les cellules bipolaires ON (normalement hyperpolarisées à l'obscurité) se dépotarisent et libèrent du glutamate tandis que les cellules bipolaires OFF (normalement dépotarisées à l'obscurité) s'hyperpolarisent et la quantité de glutamate libérée diminue (Figure 19).

La réponse des cellules ganglionnaires est complémentaire de celle des cellules bipolaires. A l'obscurité, les cellules ganglionnaires émettent spontanément des potentiels d'action (PA) à une fréquence aléatoire correspondant à leur rythme de base. La fréquence des PA émis est liée à la réponse des cellules bipolaires sus-jacentes. Ainsi la fréquence d'émission des PA augmente lorsque les cellules bipolaires répondent par une augmentation de libération de glutamate tandis qu'elle diminue lorsque les cellules bipolaires répondent par une diminution de la libération de glutamate (Figure 19).

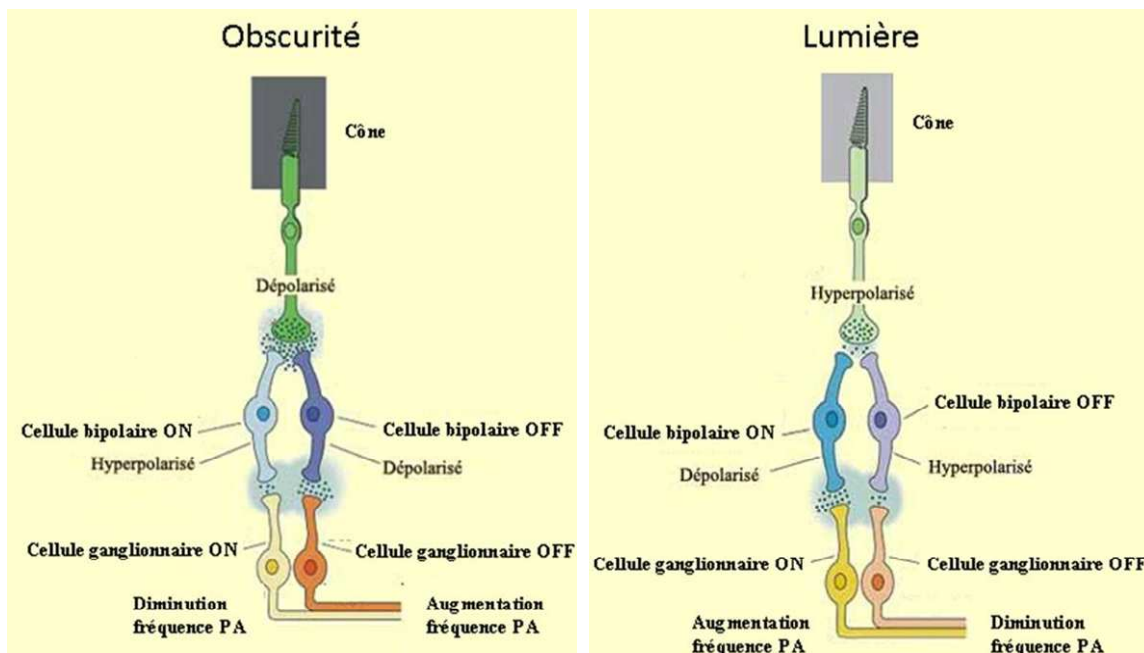


Figure 19 : Différents types de réponses des cellules de la rétine.
Adapté de (Tortora and Grabowski 2002).

Les PA émis par les cellules ganglionnaires se propagent le long de leur axone jusqu'au cortex visuel où il est intégré et interprété.

Les cellules horizontales et amacrines participent quant à elles, à la modulation de la réponse de la rétine en inhibant ou stimulant les cellules auxquelles elles sont liées.

1.2.2. Le cycle visuel

La régénération du 11-*cis*-rétinal au cours du cycle visuel fut initialement décrite par George Wald en 1968 (Wald 1968). Le cycle de régénération du 11-*cis*-rétinal des bâtonnets débute dans ces derniers et se poursuit dans l'EPR tandis que la régénération du 11-*cis*-rétinal des cônes est dépendante des cellules de Müller et de l'EPR (Wang and Kefalov 2011).

Dans le bâtonnet (Figure 20), après séparation de la rhodopsine, le tout-*trans*-rétinal est transloqué de l'espace intra-discal vers le compartiment cytoplasmique grâce au transporteur membranaire ABCA4 (ATP-Binding Cassette, sub-family A, member 4) (Tsybovsky *et al.* 2010). Là, il est réduit en tout-*trans*-rétinol par une Rétinol DesHydrogénase (RDH) (Jang *et al.* 2000; Rattner *et al.* 2000). Le tout-*trans*-rétinol est ensuite libéré dans la matrice interphotorécepteur et transporté dans l'EPR grâce à la protéine IRBP (Interphotoreceptor Retinoid-Binding Protein) (Lai *et al.* 1982; Liou *et al.* 1982). L'entrée du tout-*trans*-rétinol dans l'EPR est favorisée par la fixation de ce dernier à la protéine CRBP1 (Cellular Retinoid-Binding Protein-1) qui a une affinité plus élevée pour le tout-*trans*-rétinol que l'IRBP (Edwards and Adler 1994). Dans l'EPR, la protéine LRAT (Lecithin-Retinol Acyl Transferase) catalyse le transfert d'un acide gras d'un phosphatidylcholine (souvent l'acide palmitique) sur le tout-*trans*-rétinol formant ainsi un tout-*trans*-rétinylester (Ruiz *et al.* 1999; Mondal *et al.* 2000). Les rétinylesters représentent une forme stable de stockage de la vitamine A. Grâce à leur faible hydrosolubilité, ils ne sont pas toxiques et résistent mieux à l'oxydation et à l'isomérisation thermique. Ainsi le rétinylester formé est soit stocké dans un organe spécifique de l'EPR appelé rétinosome (Imanishi *et al.* 2004), soit converti en 11-*cis*-rétinal grâce à la protéine RPE65 (Retinal Pigment Epithelium-specific protein 65kDa). La protéine RPE65 découverte en 1991 par Bavik (Bavik *et al.* 1991) et caractérisée par Hamel en 1993 (Hamel *et al.* 1993), est une protéine associée au réticulum endoplasmique lisse dont le rôle exact fut longtemps mal défini. Certaines équipes de recherche ont montré qu'elle pouvait agir comme une protéine de liaison du tout-*trans*-rétinyl ester permettant le transport de celui-ci de la LRAT vers une isomérohydrolase et donc sa conversion en 11-*cis*-rétinol (Gollapalli *et al.* 2003; Mata *et al.* 2004). D'autres études plus récentes ont montré que cette protéine avait une activité isomérase (Jin *et al.* 2005) ou isomérohydrolase (Moiseyev *et al.* 2005; Redmond *et al.* 2005) participant - ou conduisant directement - à la conversion du tout-*trans*-rétinyl ester en 11-*cis*-rétinol. Le 11-*cis*-rétinol obtenu est alors oxydé en 11-*cis*-rétinal par une RDH et pris en charge par la protéine CRALBP (Cellular RetinAldehyde Binding Protein) (Saari and Crabb 2005). Enfin le 11-*cis*-rétinal est transporté au photorécepteur via l'IRBP dans lequel il régénère le photopigment.

Dans le cône, après séparation de l'opsine, le tout-*trans*-rétinal est réduit en tout-*trans*-rétinol par une RDH, puis transportés grâce à l'IRBP (Jin *et al.* 2009; Parker *et al.* 2009) soit vers l'EPR dans lequel il est recyclé en 11-*cis*-rétinal par la voie classique décrite ci-dessus (Figure 20), soit vers les cellules de Müller dans lesquelles il est directement isomérisé en 11-*cis*-

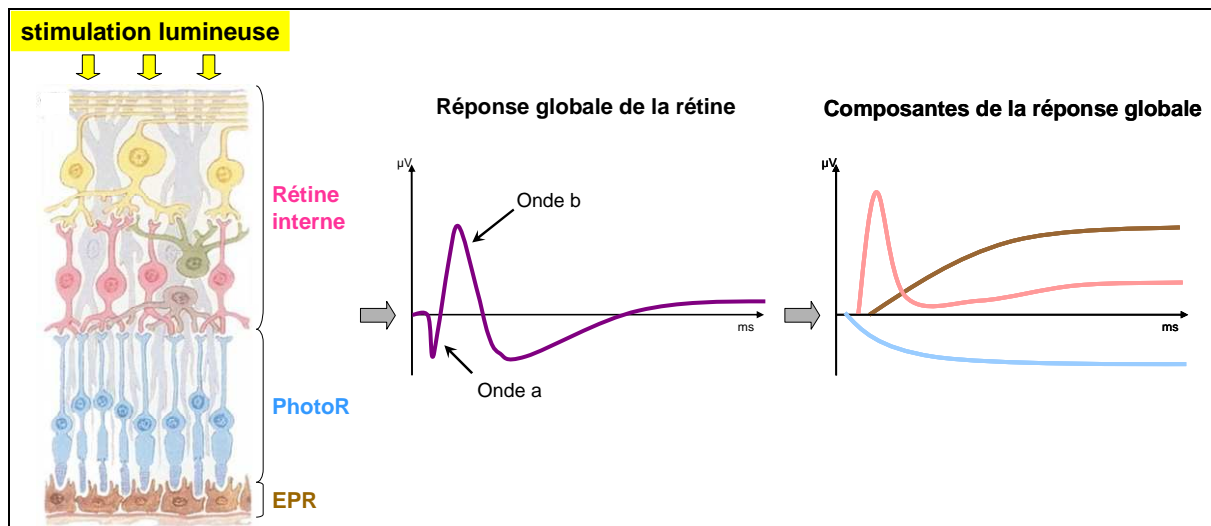


Figure 21 : Réponse de la rétine suite à un stimulus lumineux.
PhotoR = Photorécepteurs.

2. Du vieillissement physiologique de l'œil aux rétinopathies liées à l'âge

2.1. Le vieillissement

Le vieillissement est défini par l'ensemble des processus physiologiques qui modifient la structure et les fonctions de l'organisme. Il résulte des effets conjoints de facteurs génétiques et environnementaux auxquels est soumis l'organisme tout au long de sa vie. Trois facteurs participent au processus de vieillissement : les prédispositions génétiques, le stress oxydatif et la glycation non enzymatique des protéines. Dans cette partie nous ne développerons pas les aspects génétiques du vieillissement. Cependant il est important de savoir que la génétique tient une place importante dans le vieillissement et la longévité de chaque individu. En effet, la longévité de chaque espèce est conditionnée et déterminée par son patrimoine génétique. Certains polymorphismes ou l'apparition de mutations sporadiques peuvent induire une accélération du vieillissement ou augmenter le risque d'apparition de pathologies. En ce qui concerne les pathologies oculaires plusieurs gènes sont suspectés être associés à la DMLA et la RD (décrit dans la partie «Les facteurs de risques »).

2.1.1. Les facteurs de vieillissement

2.1.1.1. La glycation non enzymatique des protéines

Le terme de glycation non enzymatique désigne les modifications post-traductionnelles tardives, provoquées par la fixation spontanée d'oses simples réducteurs ou de leurs dérivés sur les groupements amines des protéines. Cette réaction spontanée et irréversible est tout à fait différente de la glycosylation, réaction enzymatique post-traductionnelle précoce qui participe à la régulation du métabolisme cellulaire. La glycation des protéines aboutit d'abord à la formation d'une base de Schiff (encore réversible) puis à un produit d'Amadori qui conduit irréversiblement à des composés appelés produits terminaux de glycation (PTG en français et AGE en anglais pour « advanced glycation endproducts ») comme la carboxyméthyllysine (CML), la carboxyéthyllysine (CEL) ou encore la pentosidine. Ces composés peuvent aboutir à la formation de structures polycycliques reliant plusieurs chaînes peptidiques entre elles (Figure 22).

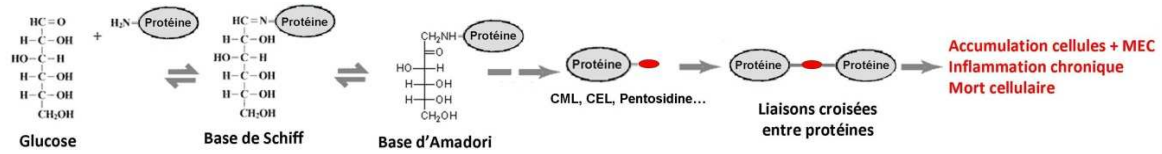


Figure 22 : Formation des produits terminaux de glycation.
CML = CarboxyMéthylLysine, CEL = CarboxyEthylLysine.

La glycation modifie les propriétés physico-chimiques des protéines et les rend parfois plus résistantes à la protéolyse. Elles ont donc tendance à s'accumuler dans les cellules et la matrice extracellulaire. Ces modifications peuvent conduire à l'altération des fonctions physiologiques voire à la mort cellulaire.

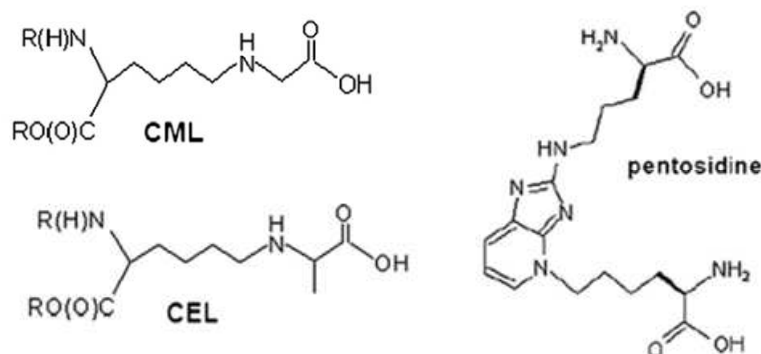


Figure 23 : PTG présents dans la membrane de Bruch et l'EPR au cours du vieillissement.
CML = CarboxyMéthylLysine, CEL = CarboxyEthylLysine.
D'après (Glenn and Stitt 2009).

2.1.1.2. Le stress oxydatif

L'oxygène, molécule essentielle à la vie est pourtant à l'origine de métabolites toxiques pouvant engendrer jusqu'à la mort cellulaire. En 1956, Harman propose la théorie radicalaire du vieillissement selon laquelle les ERO produites par les organismes aérobies induiraient des dommages oxydatifs sur les biomolécules qui, en s'accumulant, seraient responsables du vieillissement (**Harman 1956**). En effet, ces ERO possèdent un ou plusieurs électrons non appariés ce qui les rend très réactifs et leur permet d'oxyder les constituants cellulaires.

2.1.1.2.1. L'origine des ERO

Les mitochondries sont les principaux lieux de production physiologique d'ERO. En effet, au cours de la respiration mitochondriale, un ensemble de complexes protéiques membranaires et de transporteurs d'électrons tels que l'ubiquinone et le cytochrome C catalysent le transfert d'électrons vers l'oxygène. Cependant, environ 2% de l'oxygène est transformé en radical superoxyde (O_2^{\bullet}) (Figure 24). Très instable, il dimute rapidement en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Il peut également réagir avec une molécule de monoxyde d'azote ($^{\bullet}NO$) avec laquelle il forme le peroxy-nitrite ($ONOO^{\bullet}$). Le H_2O_2 quant à lui peut aboutir à la formation de l'anion hydroxyle ($^{\bullet}OH$) très réactif (Figure 24). Les ERO peuvent également être induits par des facteurs d'origine exogène comme les UV, les radiations ionisantes, les polluants ou encore le tabac.

2.1.1.2.2. Les systèmes antioxydants

Physiologiquement, il existe un état d'équilibre entre la production d'ERO et l'action d'enzymes ou de molécules antioxydantes.

Les superoxyde-dismutases catalysent la conversion de l' O_2^{\bullet} en H_2O_2 (**Buettner 2011**) tandis que les peroxydases transforment l' H_2O_2 en H_2O (Figure 24). Les peroxydases utilisent des peroxydes (composés contenant le groupement fonctionnel $ROOR'$) comme accepteurs d'électrons pour catalyser une réaction d'oxydation. Elles sont extrêmement répandues et présentes dans la plupart des organismes vivants. Une multitude de familles de peroxydases existe parmi lesquelles on distingue la super-famille des cyclooxygénases, les catalases, les glutathione peroxydases ou encore les cytochromes C peroxydases (**Koua et al. 2009**).

En ce qui concerne les molécules antioxydantes on peut citer les vitamines C, E et les caroténoïdes. Le caractère hydrophobe de ces molécules leur permet de s'insérer au sein de la

membrane plasmique dans laquelle elles jouent un rôle protecteur en empêchant la propagation de la peroxydation lipidique induite par les ERO.

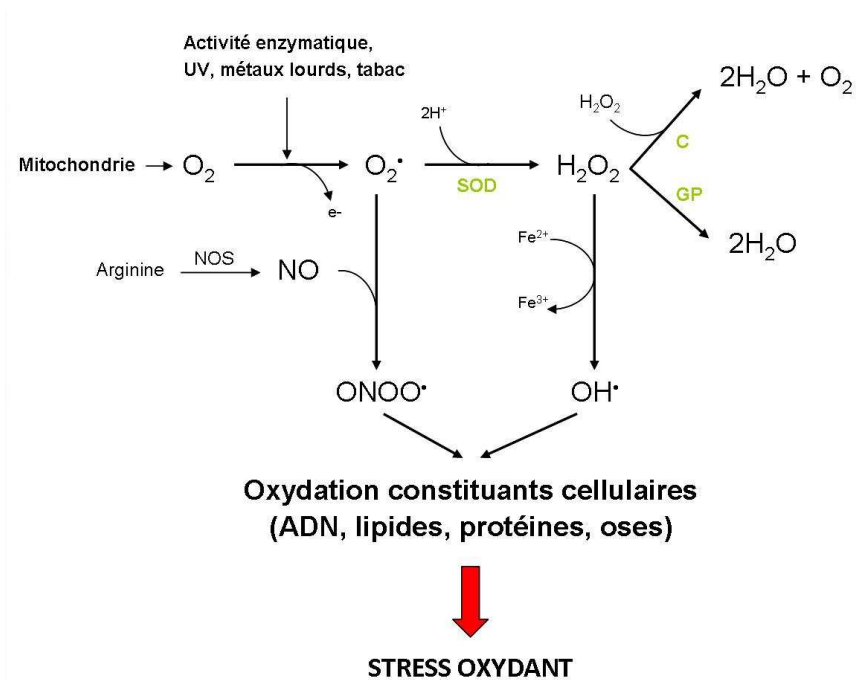


Figure 24 : Formation des espèces réactives de l'oxygène.
SOD = SuperOxyde Dismutase, GP = Glutathion Péroxydase, C = Catalase.

Au cours du vieillissement apparaît une altération de cet équilibre avec d'une part une augmentation de la production de radicaux libres par les mitochondries, et d'autre part une diminution des capacités des systèmes antioxydants. De plus certains facteurs environnementaux (exposition aux UV, tabac, alcool) peuvent augmenter d'avantage ce déséquilibre. Lorsque la cellule ne peut plus faire face à l'accumulation de ces ERO, ces derniers oxydent des constituants cellulaires (protéines, lipides, glucides et ADN) conduisant à des dommages irréversibles. Ce phénomène est appelé stress oxydatif ou stress oxydant. Le stress oxydatif induit alors l'altération des fonctions physiologiques et peut engendrer la mort cellulaire.

2.1.1.2.3. L'impact des ERO sur la cellule

Les ERO peuvent agir sur quatre biomolécules essentielles de la cellule : l'ADN, les protéines, les lipides et les oses.

L'ADN

Les ERO ont une grande affinité de réaction pour certaines bases constitutives de l'ADN (nucléaire et mitochondrial). En effet, les ERO sont capables de convertir le résidu thymine en thymine glycol et en 5-hydroxyméthyluracile, et la guanine en 8-hydroxyguanine et 8-hydroxy-2'-désoxyguanosine (**Liang and Godley 2003**). Ils sont également capables d'oxyder le désoxyribose provoquant alors des coupures simple brin voire double brin. Ces altérations sont normalement éliminées par des enzymes de réparation de l'ADN. Cependant elles peuvent aboutir à l'apparition de mutations en cas de dysfonctionnement des systèmes de réparation ou bien si ces derniers ne peuvent plus faire face à une accumulation trop importante d'altérations. Les mutations naissantes peuvent alors être à l'origine de l'apparition de pathologies.

Les lipides

L'oxydation des acides gras polyinsaturés membranaires par les ERO aboutit à la formation de dérivés appelés lipides peroxydés. Il existe une multitude de lipides peroxydés. Cependant les plus fréquemment rencontrés sont le 4-HNE (4-HydroxyNonEnal), le MDA (MalonDiAldehyde), ou encore les acides hydroxy- ω -oxo-alkénoïques (l'HODA (9-Hydroxy-12-Oxo-10-Decenoic Acid), l'HOOA (5-Hydroxy-8-Oxo-6-Octenoic Acid) et l'HOHA (4-Hydroxy-7-Oxo-5-Heptenoic Acid)) (**Kopitz et al. 2004; Tanito et al. 2005; Tanito et al. 2006; Ethen et al. 2007; Kaemmerer et al. 2007**) (Figure 25). Ces dérivés lipidiques, plus hydrophiles que leurs précurseurs, entraînent des perturbations de la micro-architecture membranaire et altèrent les fonctions des protéines et donc la perméabilité membranaire.

Ces métabolites sont capables de se lier de façon covalente aux résidus cystéine, lysine ou histidine des protéines, formant ainsi des produits terminaux de l'oxydation des lipides. Parmi ces produits terminaux on peut citer les carboxyalkylpyrroles (le CEP (2- ω -CarboxyEthyl Pyrrole), le CHP (2- ω -CarboxyHeptyl Pyrrole) et le CPP (2- ω -CarboxyPropyl Pyrrole)) (**Esterbauer et al. 1991; Gu et al. 2003**) (Figure 25). Ces protéines modifiées, non fonctionnelles et/ou non dégradables ont tendance à s'accumuler dans la cellule et la matrice extracellulaire induisant des dégâts irréversibles.

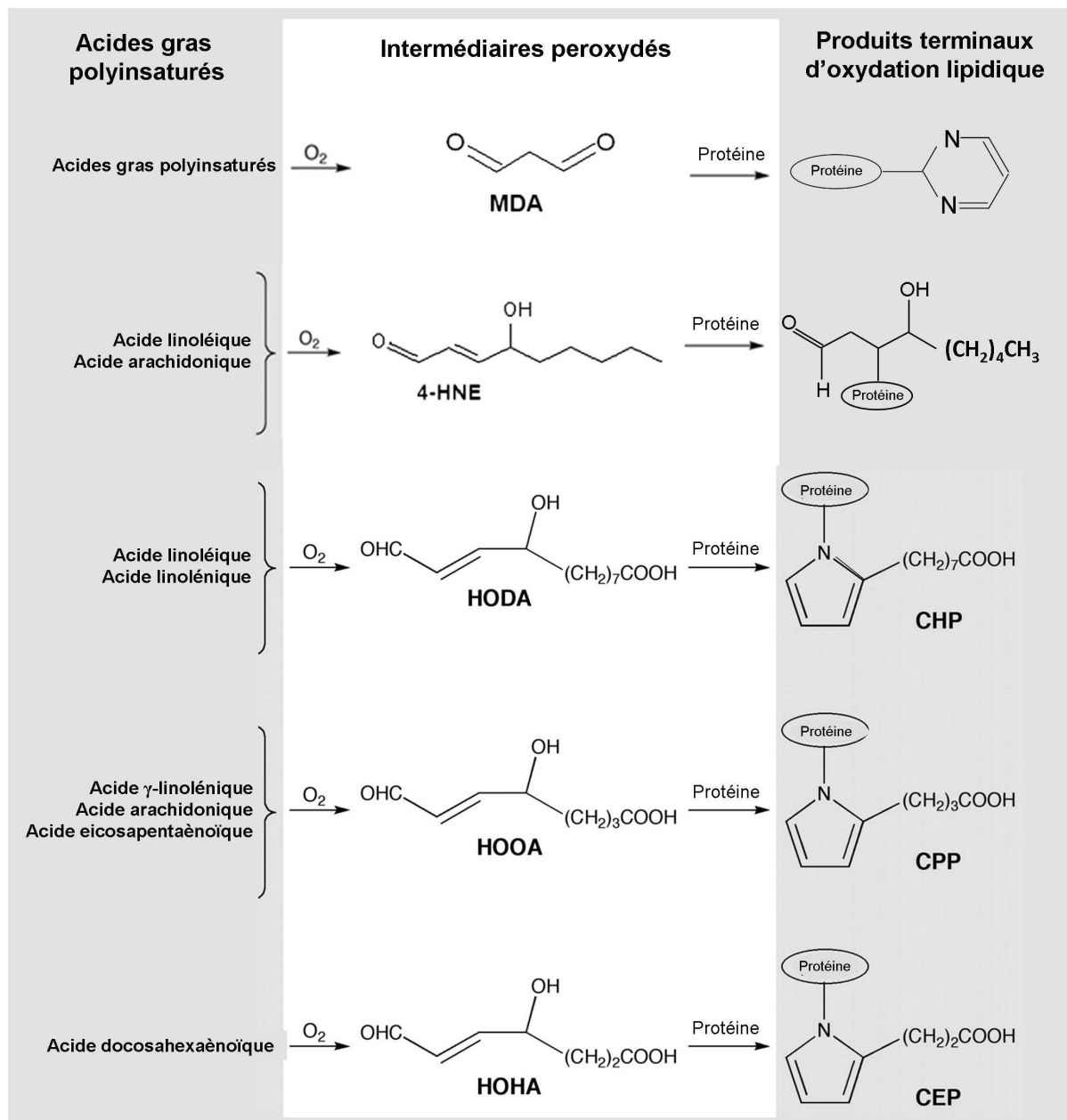


Figure 25 : Produits terminaux d'oxydation lipidiques issus des acides gras.
 4-HNE = 4-HydroxyNonEnal, MDA = MalonDiAldehyde, HODA = 9-Hydroxy-12-Oxo-10-Decenoic Acid,
 HOOA = 5-Hydroxy-8-Oxo-6-Octenoic Acid, HOHA = 4-Hydroxy-7-Oxo-5-Heptenoic Acid, CEP = 2- ω -
 CarboxyEthyl Pyrrole, CHP = 2- ω -CarboxyHeptyl Pyrrole, CPP = 2- ω -CarboxyPropyl Pyrrole.
 Adapté de (Gu *et al.* 2003).

Les glucides

Les ERO peuvent également oxyder les oses entraînant la formation de dérivés appelés produits de glycoxydation. Comme pour les lipides peroxydés, il existe une multitude de produits de glycoxydation. Cependant les plus couramment observés sont les α -hydroxyaldéhydes tel que le glycéraldéhyde et les composés dicarboxylés (le méthylglyoxal,

le glyoxal et le 3-desoxyglucosone) (Figure 26). Ces dérivés sont le plus souvent issus du métabolisme du glucose mais ils peuvent également être issus des bases de Schiff ou des produits d'Amadori formés au cours de la glycation non enzymatique des protéines. Ces produits de glycoxydation (intermédiaires glycoxydés) sont capables de se fixer sur les groupements amines des protéines aboutissant à la formation de PTG.

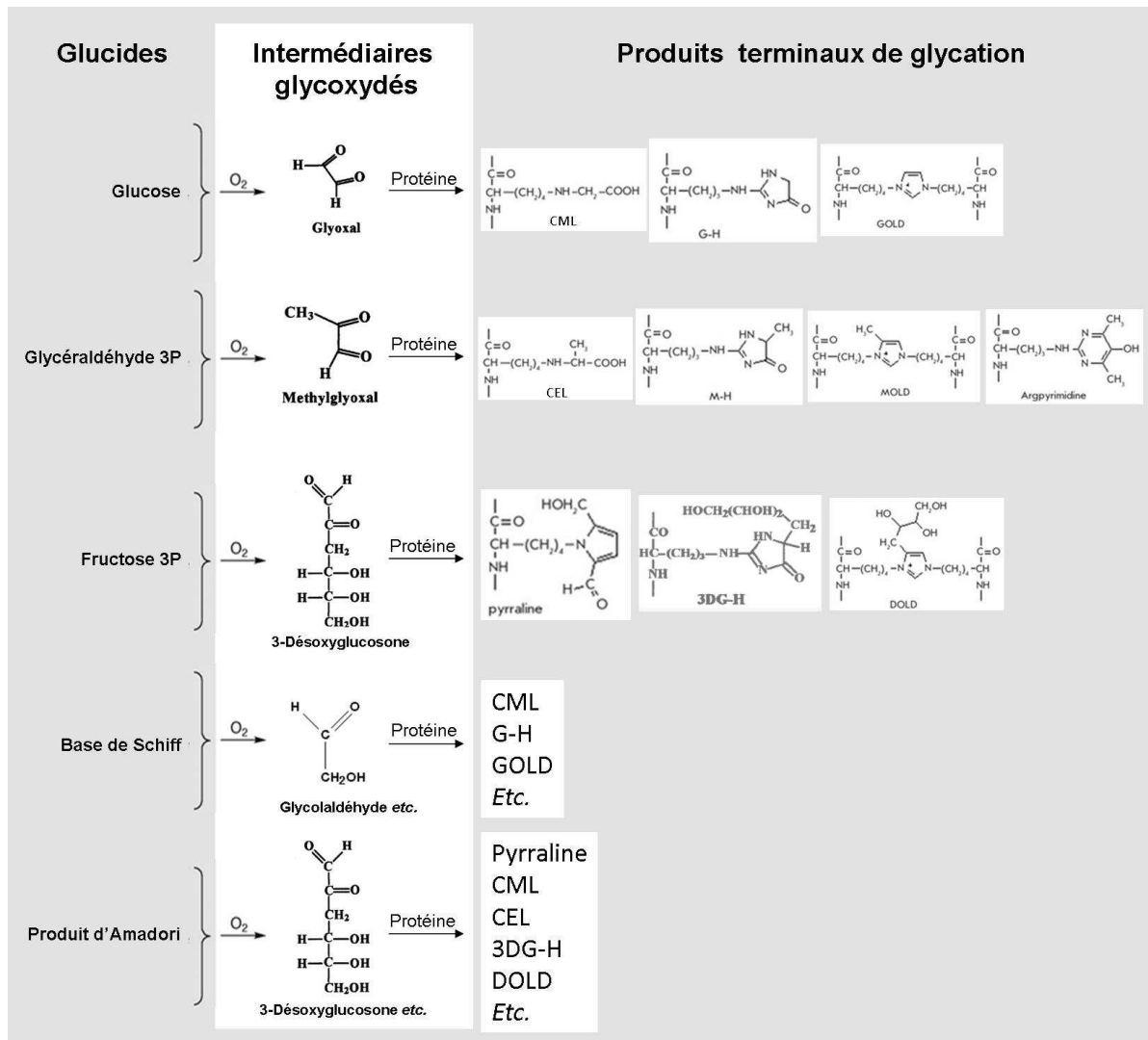


Figure 26 : PTG détectés dans l'organisme au cours du vieillissement.

CEL = CarboxyEthylLysine, CML = CarboxyMethylLysine, G-H = Glyoxal-derived Hydroimidazolone, MG-H = MethylGlyoxal-derived Hydroimidazolone, 3DG-H = 3-DeoxyGlucosone-derived Hydroimidazolone, GOLD = GlyOxal Lysine Dimer, MOLD = MethylglyOxal Lysine Dimer, DOLD = 3-DeOxyglucosone Lysine Dimer.

Adapté de (Meerwaldt *et al.* 2008) et (Monnier 2003).

Ainsi il existe plusieurs voies de formation de PTG. En effet les PTG peuvent être issus de la liaison entre une protéine et 1) un ose réducteur ou 2) un dérivé d'ose oxydé, lui-même produit au cours du stress oxydatif (intermédiaires glycoxydés) (Figure 27).

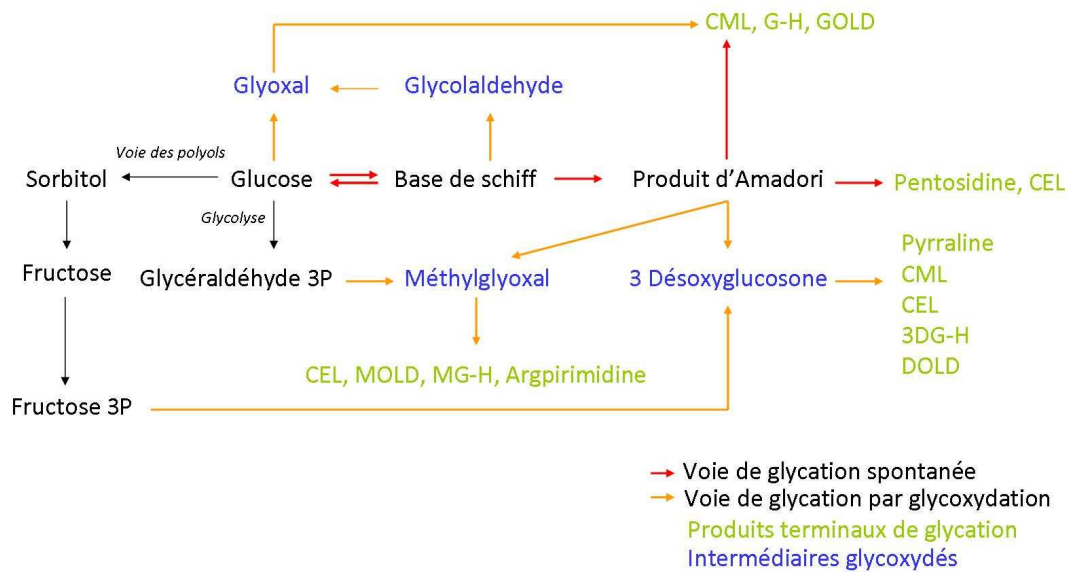


Figure 27 : Deux voies de production de PTG.
 Adapté de (Meerwaldt *et al.* 2008) et (Monnier 2003).

Les protéines

Les protéines les plus sensibles aux attaques des ERO sont surtout celles qui comportent un groupement sulfhydryle (SH). C'est le cas de nombreuses enzymes cellulaires et protéines de transport. Les protéines modifiées par oxydation deviennent beaucoup plus sensibles à l'action des protéases.

De par son exposition permanente au rayonnement UV et sa forte activité métabolique (forte concentration en oxygène) la rétine est particulièrement exposée à la formation d'ERO. En effet, en présence de rayonnements UV, le dioxygène est capable de capter un électron pour donner un radical superoxyde. De plus les photorécepteurs sont métaboliquement très actifs, ils possèdent une grande quantité de mitochondries, sources d'ERO. Les segments externes des photorécepteurs sont essentiellement constitués de replis membranaires avec une proportion d'acides gras polyinsaturés très importante ce qui en fait un lieu privilégié pour l'oxydation lipidique. De nombreuses études ont rapporté la production d'ERO et les dommages cellulaires causés par l'exposition de la rétine à la lumière (Wiegand *et al.* 1983; Kayatz *et al.* 1999; Demontis *et al.* 2002).

2.1.2. Le vieillissement physiologique de la rétine

Tous les organes subissent les effets du temps y compris l'œil. Autour de la rétine, trois structures sont particulièrement touchées par le vieillissement : la rétine neurale, l'EPR et la membrane de Bruch.

2.1.2.1. Les altérations de la rétine neurale

Chez l'Homme, plusieurs études ont montré une diminution de la densité (**Gao and Hollyfield 1992; Curcio *et al.* 1993; Panda-Jonas *et al.* 1995; Song *et al.* 2011**) et une désorganisation (**Marshall *et al.* 1979**) des photorécepteurs avec l'âge. Certaines études ont également montré une diminution des photopigments dans les cônes avec l'âge (**Keunen *et al.* 1987; Elsner *et al.* 2002**).

Chez la souris le vieillissement de la rétine est associé à une diminution de l'aire des arbres dendritiques et axonales, et à une diminution de la densité des cellules de la rétine neurale et des synapses (**Samuel *et al.* 2011**).

2.1.2.2. Les altérations de l'EPR

De nombreuses études décrivent l'accumulation de pigments bruns fluorescents appelés granules de lipofuscine dans l'EPR au cours du vieillissement (**Weiter *et al.* 1986; Kennedy *et al.* 1995; Ben-Shabat *et al.* 2001**). Ces granules sont en fait dérivés de lysosomes ayant perdu leur capacité de dégradation (Figure 28). L'analyse de ces granules montre des agrégats lipido-protéiques non dégradables (**Murdaugh *et al.* 2011**) parmi lesquels se trouve le pyridinium bis-rétinoïde (A2E) dérivé de la vitamine A. On comprend l'abondance et la composition de ces granules lorsqu'on fait le lien avec une des fonctions principales de l'EPR c'est à dire la phagocytose des segments externes des photorécepteurs. En effet, lors de ce processus l'EPR accumule des lipides et des protéines oxydés provenant des membranes des photorécepteurs.

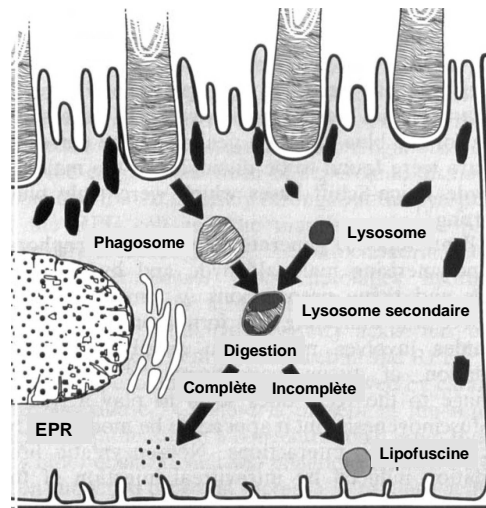


Figure 28 : Formation des granules de lipofuscine.
D'après (Kennedy *et al.* 1995).

En plus d'être soumis à l'accumulation de déchets cellulaires provenant des photorécepteurs, l'EPR est continuellement exposé à la photo-oxydation de ses constituants. En effet, malgré la présence de mélanine dans l'EPR, une partie des photons lumineux n'est pas neutralisée et peut oxyder diverses biomolécules. La photo-oxydation de la vitamine A conduit à la formation du A2E ; et la photo-oxydation du A2E lui-même peut conduire à la formation d'aldéhydes très réactifs (Murdaugh *et al.* 2009), de PTG (Yoon *et al.* 2012), à la production d'ERO (Weiter *et al.* 1986; Gaillard *et al.* 1995; Rozanowska *et al.* 1995; Wassell *et al.* 1999; Wielgus *et al.* 2010), ou encore à sa liaison au glutathion (Yoon *et al.* 2011). En plus de ce phénomène de photo-oxydation, le processus de phagocytose engendre lui aussi la production intrinsèque d'ERO (Tate *et al.* 1995). Ainsi de par sa fonction, l'EPR est particulièrement exposé à la formation d'ERO et donc au stress oxydatif.

Pour faire face à ces ERO, l'EPR possède des défenses efficaces contre les dommages oxydatifs. En effet, il est particulièrement riche en antioxydants tels que la vitamine E, la superoxyde dismutase, la catalase, la glutathion-S-transférase, le glutathion et l'ascorbate (Robison *et al.* 1982; Newsome *et al.* 1990; Beatty *et al.* 2000). Cependant, avec l'âge, l'EPR semble perdre ses capacités antioxydantes (Liles *et al.* 1991; Tate *et al.* 1993) et les biomolécules oxydées ont tendance à s'accumuler dans les cellules.

2.1.2.3. Les altérations structurales et biochimiques de la membrane de Bruch

Comme nous l'avons évoqué précédemment un grand nombre de biomolécules et de déchets produits par l'EPR et la choroïde passent à travers la membrane de Bruch. Au cours du vieillissement, la membrane de Bruch subit diverses modifications fonctionnelles et structurales. Des études ont montré un lien direct entre le vieillissement et l'épaisseur de la membrane de Bruch (**Green and Key 1977; Ramrattan et al. 1994**).

Plusieurs facteurs peuvent être à l'origine de l'épaississement et de l'altération fonctionnelle de la membrane de Bruch. D'une part les PTG tels que la pentosidine, la CML et la CEL (Figure 23) retrouvés niveau de la membrane de Bruch et de l'EPR, favorisent les liaisons entre les fibres de collagène et réduisent la perméabilité de la membrane de Bruch (**Handa et al. 1998; Handa et al. 1999; Schutt et al. 2003; Zhou et al. 2005; Glenn and Stitt 2009**). D'autres travaux ont montré une accumulation d'acides gras, de phospholipides, et d'esters de cholestérol dans la membrane de Bruch au cours du vieillissement (**Sarks 1976; Pauleikhoff et al. 1990; Okubo et al. 1999; Curcio et al. 2001**), augmentant ainsi le caractère hydrophobe de la membrane de Bruch. Ainsi au cours du vieillissement apparaît au niveau de la membrane de Bruch des dépôts amorphes laminaire, linéaires ou globulaires (appelés druses) (Figure 29 comparée à la Figure 12). L'épaississement et les modifications biochimiques de la membrane de Bruch réduisent le passage des métabolites nécessaires à la survie de l'EPR et des photorécepteurs et l'élimination des déchets métaboliques de la rétine et de l'EPR vers la choroïde (**Cankova et al. 2011**).

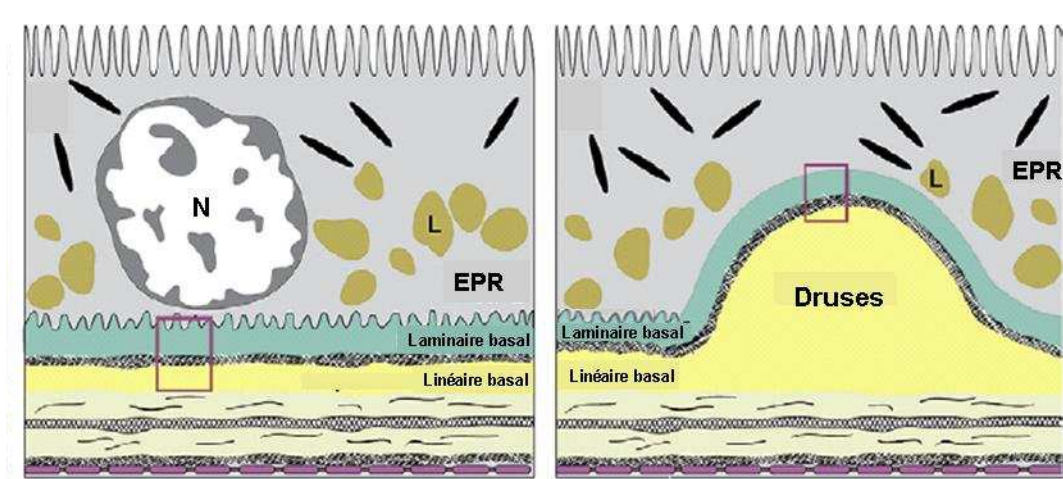


Figure 29 : Dépôts observés au niveau de la membrane de Bruch au cours du vieillissement. D'après (**Curcio et al. 2009**).

2.2. Les rétinopathies liées à l'âge

2.2.1. La Dégénérescence Maculaire Liée à l'Age (DMLA)

Dans les pays industrialisés, la DMLA est la première cause de malvoyance chez les personnes âgées de plus de 65 ans. Caractérisée par une perte progressive de la vision centrale, des détails et des couleurs (Figure 30), elle touche environ 1,5 million de personnes (600 000 MLA, 900 000 DMLA) en France. De nombreuses études montrent que la prévalence et la progression de la Maculopathie Liées à l'Age (MLA) et des DMLA augmentent avec l'âge (**Friedman *et al.* 2004; Owen *et al.* 2012**). En France par exemple, la prévalence globale de la maladie est de 8% après 50 ans. Située aux alentours de 1% avant 55 ans, elle passe progressivement à 25% après 75 ans. Du fait du vieillissement de la population mondiale, la prévalence de la DMLA pourrait considérablement augmenter dans les prochaines décennies.

La DMLA est une pathologie complexe et multifactorielle. Bien que la pathogénie reste encore discutée, les scientifiques d'accordent aujourd'hui sur le fait que le développement de la DMLA implique l'existence d'un terrain génétique « à risque » associé à l'effet de facteurs endogènes et environnementaux. Trois hypothèses se dégagent depuis quelques années :

1) l'hypothèse la plus décrite aujourd'hui implique un dysfonctionnement du métabolisme des cellules de l'EPR. Ce dysfonctionnement serait le résultat de l'exposition chronique de l'EPR aux lésions induites pas les photons et de l'accumulation, dans leur cytoplasme, de lipofuscine et de débris cellulaires issus de la phagocytose de l'extrémité des segments externes des photorécepteurs.

2) la deuxième hypothèse place les mécanismes initiaux de la DMLA au niveau des photorécepteurs dont la densité diminue avec l'âge. Les altérations de l'EPR ne seraient alors que secondaires.

2) enfin la troisième hypothèse met plutôt en avant l'épaississement de la membrane de Bruch lié à l'altération de ses constituants et à l'accumulation de biomolécules (notamment de PTG et de lipides) au cours du vieillissement. Cette hypothèse met également en avant les nombreuses analogies qui existent entre l'athérosclérose et la DMLA (**Malvitte *et al.* 2006**).



Figure 30 : Altérations de la vision au cours de la DMLA.

La photo de gauche représente la vision d'un sujet sain tandis que la photo de droite représente la vision d'un patient atteint de DMLA.

D'après The National Eye Institute, National Institutes of Health (<http://www.nei.nih.gov/photo/sims/index.asp>).

Compte tenu des traitements actuels essentiellement basés sur la régression des néovaisseaux, seuls 10 à 20% des patients peuvent recevoir un traitement adapté. Dans ce contexte, la prévention et le développement de traitements efficaces sont devenus depuis quelques années l'un des enjeux majeurs de santé publique.

La DMLA est une pathologie dont l'évolution est progressive et bien souvent asymptomatique dans les premières années. Les différents stades de développement de la DMLA sont caractérisés par des signes cliniques bien définis.

2.2.1.1. La Maculopathie Liée à l'Age (MLA)

Le stade précoce de la maladie est appelé Maculopathie Lié à l'Age (Figure 31). Ce stade n'est pas ou peu symptomatique. Il est caractérisé par la présence d'altérations de l'EPR (dépigmentation ou hyperpigmentation) et/ou de druses (dépôts amorphes) observables au fond d'œil. Il existe également des dépôts de type laminaires ou linéaires au niveau de la membrane de Bruch cependant ils ne sont pas observables au fond d'œil (**Curcio and Millican 1999; Anderson et al. 2004; Li et al. 2005**) (Tableau 1). Ces dépôts contiennent des débris cellulaires, des lipides, des protéines cellulaires et des composants de la matrice extracellulaire (**Curcio and Millican 1999; Mullins et al. 2000; Crabb et al. 2002; Rudolf et al. 2008**).

Type de lésion	Localisation	Aspect
Dépôt laminaire basal	Entre la membrane cytoplasmique et la lame basale de l'EPR	Fine couche
Druses miliaires (moins de 125µm) (soft drusen)	Entre la lame basale de l'EPR et la couche de collagène interne de la MB	- Rond, - Jaunâtre, - Bords bien délimités
Druses séreux (plus de 125µm) (hard drusen)	Entre la lame basale de l'EPR et la couche de collagène interne de la MB	- Granulaire, - Blanchâtre, - Bords flous souvent confluent
Dépôt linéaire basal	Entre la lame basale de l'EPR et la couche de collagène interne de la MB	Fine couche

Tableau 1 : Lésions observées au cours de la DMLA atrophique.
Adapté de (Curcio and Millican 1999).

Les druses miliaires sont les plus courants et sont considérés comme de simples signes de vieillissement tandis que les druses séreux sont souvent un signe de DMLA. La présence d'une MLA à un ou deux yeux n'entraîne pas systématiquement de DMLA cependant le risque est plus élevé que chez les patients sains.



Figure 31 : Photographie du fond d'œil d'un patient atteint de MLA.
(Source : Service d'ophtalmologie, CHU, Dijon)

La MLA peut évoluer en DMLA atrophique ou exsudative.

2.2.1.2. La DMLA atrophique

La forme atrophique appelée également « sèche » représente 70 à 80 % des patients atteints de DMLA (Figure 32). Elle résulte de l'atrophie progressive des couches de l'EPR et des

photorécepteurs. L'impact sur la vision est inévitable mais la progression de la pathologie est lente.



Figure 32 : Photographie du fond d'œil d'un patient atteint de DMLA atrophique.
(Source : Service d'ophtalmologie, CHU, Dijon)

2.2.1.3. La DMLA exsudative

La forme exsudative appelée également « humide » représente 20 à 30% des patients atteints de DMLA (Figure 33). Contrairement à la DMLA atrophique, son évolution est le plus souvent rapide. Elle se caractérise par l'apparition de néovaisseaux choroïdiens dans la rétine souvent responsables d'œdèmes, d'exsudations intra ou sous rétiniennes ou encore d'hémorragies rétiniennes.



Figure 33 : Photographie du fond d'œil d'un patient atteint de DMLA exsudative.
(Source : Service d'ophtalmologie, CHU, Dijon)

2.2.2. La rétinopathie diabétique

Dans les pays industrialisés, la rétinopathie diabétique est la première cause de cécité avant l'âge de 60 ans. Contrairement à la DMLA, dont le développement est principalement lié aux conséquences du vieillissement, et même si le facteur âge est associé, l'apparition de la RD est principalement liée aux conséquences de l'hyperglycémie chronique développée au cours le diabète. En effet, la RD est une complication microvasculaire secondaire au diabète.

En France, environ 2,9 millions de personnes sont atteintes de diabète dont 800 000 atteintes de RD (soit 30 à 40% des diabétiques) (Delcourt *et al.* 2009). La prévalence de la RD augmente avec la durée du diabète et le niveau d'hyperglycémie chronique. Ainsi le nombre de patients diabétiques atteints de RD augmente avec l'âge. De plus, avec le vieillissement de la population et l'épidémie de diabète annoncée, sa prévalence pourrait fortement augmenter dans les années à venir.

Comme la DMLA, la RD est asymptomatique dans les premiers stades et passe souvent inaperçue jusqu'à l'apparition de troubles visuels sévères liés à la formation de néovaisseaux, d'hémorragies et de décollements de la rétine. (Figure 34).



Figure 34 : Altérations de la vision au cours de la RD.

La photo de gauche représente la vision d'un sujet sain tandis que la photo de droite représente la vision d'un patient atteint de RD.

D'après The National Eye Institute, National Institutes of Health (<http://www.nei.nih.gov/photo/sims/index.asp>).

Avant de développer la pathogénie de la RD, commençons par aborder quelques aspects du diabète.

2.2.2.1. Le diabète

Le diabète est devenu en quelques années un fléau mondial. En effet, selon l'organisation mondiale de la santé le nombre de diabétiques dans le monde a été multiplié par 10, passant de 30 millions en 1970 à 356 millions aujourd'hui (**Danaei et al. 2011**). Le diabète est désormais la 4^{ème} cause de mortalité dans le monde derrière les maladies cardiovasculaires, les cancers et le SIDA.

Le développement du diabète est lié aux conséquences d'anomalies liées à une hormone peptidique sécrétée par les cellules bêta des îlots de Langerhans : l'insuline. Cette hormone est essentielle à la régulation du métabolisme du glucose. En effet, physiologiquement, le glucose sanguin stimule la sécrétion d'insuline, laquelle se fixe sur ses récepteurs membranaires et permet l'entrée du glucose dans les cellules. Ainsi, l'homéostasie du glucose dépend de la balance entre la quantité d'insuline sécrétée et la sensibilité des tissus périphériques à son action. Au cours du diabète, on observe un dysfonctionnement dans le transport du glucose jusqu'aux cellules soit parce que le pancréas ne produit plus suffisamment d'insuline ou bien parce que les cellules de l'organisme sont devenues insensibles à l'insuline. On distingue alors le diabète de type 1 et le diabète de type 2 (**Association Française des Diabétiques 2010**).

2.2.2.1.1. Les types de diabète

Le diabète de type 1 ou insulino-dépendant (DID) représente 10 à 15 % des diabétiques en France. Les personnes atteintes de DID produisent très peu d'insuline (voire pas du tout) suite à la destruction partielle ou complète des cellules bêta du pancréas par leur système immunitaire (**Buyschaert 2006**). Le diabète de type 1 est le plus souvent diagnostiqué chez l'enfant ou le jeune adulte. Les signes caractéristiques de la pathologie se manifestent après destruction de 80 % à 90 % des cellules bêta. Les symptômes apparaissent généralement de façon brutale par une polydipsie (soif importante) et une polyurie (urines abondantes), une polyphagie (appétit anormalement augmenté), un amaigrissement malgré la polyphagie et une hyperglycémie (excès de glucose dans le sang supérieure à 1,26 g de sucre par litre de sang à jeun, ou supérieure à 2 g/l à tout moment de la journée).

Le diabète de type 2 ou non insulino-dépendant (DNID) représente 85 à 90 % des diabétiques. Chez les personnes atteintes de DNID, on observe l'apparition d'un phénomène de résistance aux effets de l'insuline correspondant à la perte de la sensibilité des récepteurs cellulaires à

l'insuline: l'insulinorésistance (**Buysschaert 2006**). Le pancréas continue de sécréter de l'insuline mais celle-ci n'est plus effective et le glucose s'accumule dans la circulation sanguine aboutissant donc à une hyperglycémie et une hyperinsulinémie. L'hyperglycémie chronique aboutit à l'apparition d'une intolérance au glucose et au bout de quelques années le diabète de type 2 est installé.

La RD est aussi présente chez les patients atteints de diabète de type 1 que de type 2. Dans le diabète de type 1, la RD ne survient en général pas avant 7 ans d'évolution. En revanche, après 20 ans d'évolution, 90 à 95 % des diabétiques de type 1 développent une RD, dont 40% une RD proliférante, stade sévère de la pathologie. Dans le diabète de type 2, 20 % des diabétiques présentent une RD dès la découverte de leur diabète. Cependant, le risque à long terme d'une RD proliférante est moins important qu'un œdème maculaire (20% vs 60%).

2.2.2.1.2. Les processus physiologiques à l'origine du diabète de type 2

Afin de comprendre les mécanismes impliqués dans le développement de la RD il me semble essentiel de comprendre en premier lieu ceux impliqués dans le développement du diabète.

Comme nous l'avons évoqué précédemment, l'apparition du phénomène d'insulinorésistance est fortement impliquée dans la pathogénie du diabète (**Buysschaert 2006**). L'insuline a un rôle majeur dans la régulation du métabolisme glucose et de façon générale des substrats énergétiques. Les principales molécules sources d'énergie pour l'organisme sont les oses (principalement le glucose), les triglycérides et les corps cétoniques.

Régulation de la glycémie en condition physiologique

Après un repas, le taux de glucose dans le sang (glycémie) augmente. Le glucose circulant dans les capillaires des îlots de Langerhans stimule la production d'insuline par les cellules bêta. L'insuline ainsi libérée stimule la captation du glucose par les cellules dans lesquelles il peut être stocké - sous forme de glycogène (polymère de glucose) dans le foie et les muscles (glycogénogenèse), et sous forme de triglycérides dans le tissu adipeux (lipogenèse) – ou bien directement utilisé comme source d'énergie par la voie de la glycolyse. Certains tissus comme le cerveau, les globules rouges, la région médullaire du rein, le cristallin et la cornée ne sont pas capables de le stocker et nécessitent donc un apport continu de glucose. Dans le même temps, l'insuline inhibe la production de glucose par le foie (néoglucogenèse). Ainsi, grâce à l'activation de la glycogénogenèse et à l'inhibition de la néoglucogénèse, la glycémie retrouve son niveau de base (normoglycémie).

En cas de jeûne, la glycémie diminue, ce qui active les voies cataboliques permettant à l'organisme de puiser dans ses réserves (Figure 35). Dans un premier temps, le foie et les muscles mobilisent leurs stocks de glycogène en activant la glycogénolyse grâce au glucagon, hormone également synthétisée par le pancréas. Lorsque les réserves de glycogène sont épuisées, l'activation de la lipolyse adipocytaire permet la libération d'acides gras dans le sang. Ces acides gras sont alors directement utilisés par les organes comme source d'énergie ou bien métabolisés sous forme de corps cétoniques par le foie (cétogénèse). Ces derniers sont ensuite sécrétés dans le sang et utilisés comme source énergétique par les organes (notamment par le cœur et les reins). Lorsque que la normoglycémie est rétablie, un rétrocontrôle exercé par ces métabolites induit la sécrétion d'insuline qui freine alors la lipolyse adipocytaire et la cétogénèse.

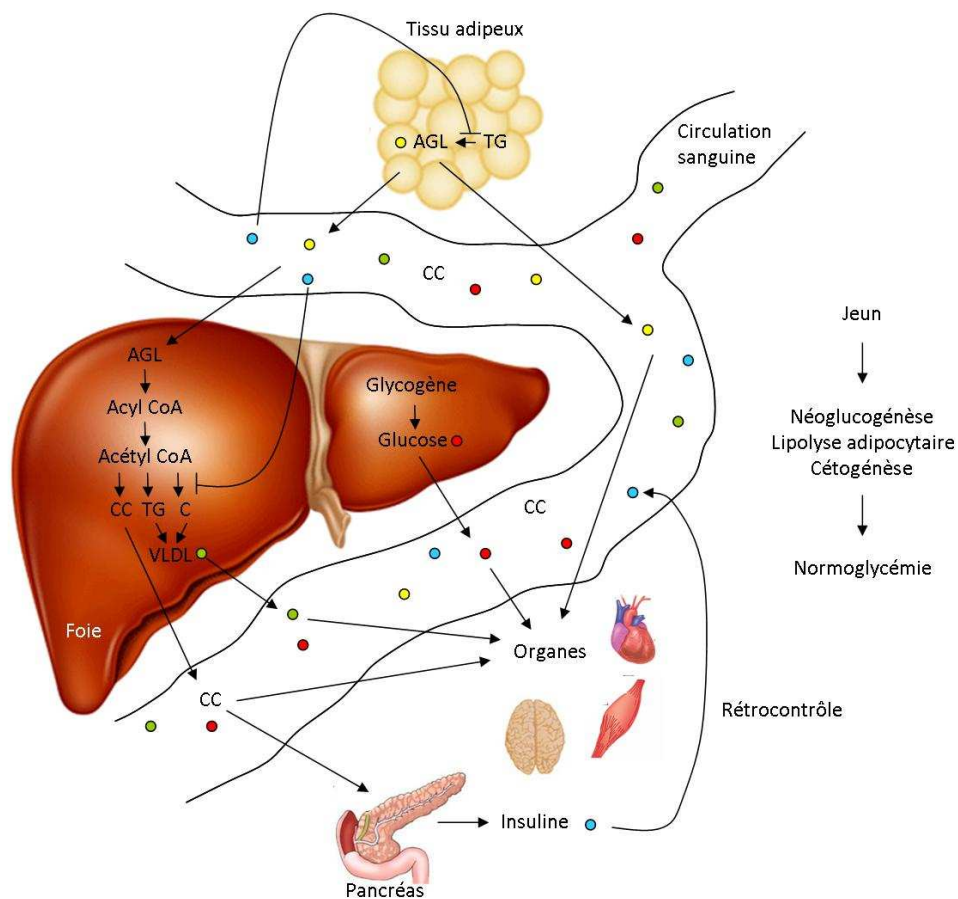


Figure 35 : Régulation de la glycémie en condition physiologique.
 AGL = Acide Gras Libres, C = Cholestérol, CC = Corps Cétoniques, TG = TriGlycérides.

Régulation de la glycémie et insulino-résistance

Lorsque l'organisme développe une insulino-résistance, le glucose présent dans le sang ne parvient plus suffisamment aux cellules. Ainsi, malgré la présence de glucose dans le sang, les voies cataboliques normalement activées en cas de jeûne sont induites (néoglucogénèse, glycogénolyse, lipolyse adipocytaire et céto-génèse) et augmentent les taux de glucose et d'acides gras sanguins. L'apport excessif de glucose au foie, en plus de l'activation de la néoglucogénèse, induit un emballement de la glycolyse et aboutit à la formation en excès de corps cétoniques (hypercéto-génèse) et de métabolites issus des voies secondaires de la glycolyse comme les triglycérides et le cholestérol. De la même façon, l'apport excessif d'acides gras au foie issus de la lipolyse adipocytaire induit une augmentation de la production de triglycérides et de cholestérol (Figure 36). L'activation de ces voies métaboliques aboutit à l'excès de synthèse de lipoprotéines VLDL (Very Low Density Lipoprotein) par le foie et donc à une hypertriglycéridémie et une hypercholestérolémie.

Cependant, les anomalies induites par l'insulino-résistance ne sont pas uniquement d'ordre quantitatif. En effet, les VLDL naissants, plus riches en triglycérides et cholestérol libre, ont une taille augmentée ce qui leur confère une résistance à la lipolyse et diminue leur clairance plasmatique. De la même façon, si le taux de LDL (Low Density Lipoprotein) plasmatique est le plus souvent normal chez les diabétiques, le catabolisme des LDL est généralement ralenti. En effet, ces dernières, plus petites et plus denses, présentent elles aussi une augmentation de leur temps de résidence plasmatique ce qui leur confère un caractère athérogène. De nombreux travaux ont montré que les LDL de petites tailles étaient particulièrement athérogènes et présentaient un risque accru d'accidents vasculaires (**Berneis and Krauss 2002; Maeda *et al.* 2011**). En effet, les LDL petites et denses s'accumulent préférentiellement dans les macrophages, favorisant la formation de cellules spumeuses. Elles présentent une oxydabilité accrue et une plus grande affinité pour les protéoglycanes de l'intima facilitant ainsi leur rétention de la paroi artérielle et donc l'apparition de micro et macroangiopathies. Dans le même temps, la présence de glucose sanguin et l'activation des voies de rétrocontrôle induisent la libération d'insuline par le pancréas. Ainsi le pancréas synthétise de plus en plus d'insuline (hyperinsulinémie) pour compenser l'insulino-résistance. Cependant, l'hyperinsulinémie n'est, elle non plus, pas sans conséquence sur le métabolisme. En effet, elle entraîne l'hyperactivation de la lipase hépatique et de la lécithine cholestérol acyl transférase (LCAT), favorisant ainsi l'augmentation du catabolisme des HDL. C'est donc

l'ensemble du métabolisme des lipoprotéines qui est altéré. L'ensemble des altérations quantitatives et qualitatives du métabolisme des lipoprotéines est appelée dyslipidémie.

Au bout de quelques années d'insulinorésistance, de dyslipidémie et d'exposition chronique au glucose, l'organisme développe un diabète qui peut alors aboutir à diverses complications microvasculaires comme la néphropathie diabétique, la rétinopathie diabétique et/ou les complications macrovasculaires comme l'infarctus du myocarde, les accidents vasculaires cérébraux (AVC) et l'ischémie des membres inférieurs.

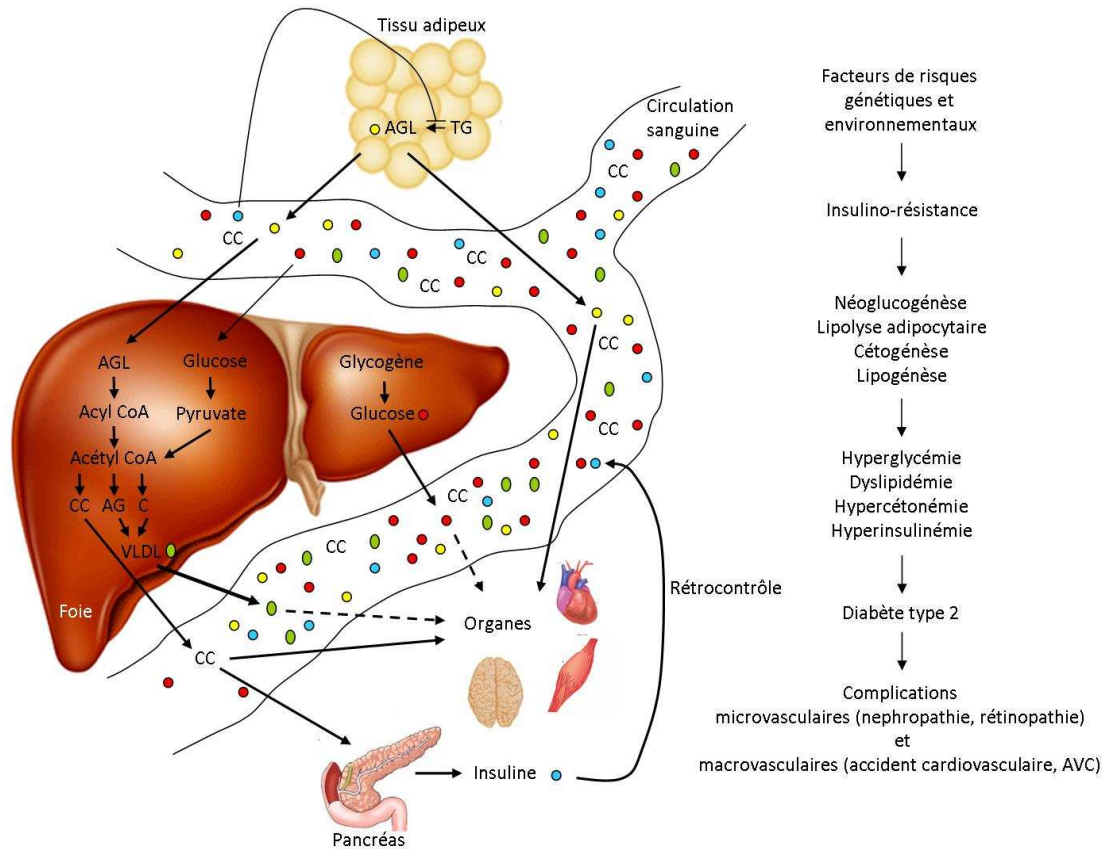


Figure 36 : Régulation de la glycémie et insulinorésistance.

AGL = Acide Gras Libres, C = Cholestérol, CC = Corps Cétoniques, TG = TriGlycérides.

En plus de la dyslipidémie, l'hyperglycémie chronique semble jouer un rôle important dans la pathogénie du diabète et de ses complications. Les principaux mécanismes biochimiques impliqués sont développés ci-dessous.

2.2.2.1.3. Les modifications biochimiques liées à l'hyperglycémie

L'hyperglycémie chronique observée au cours du diabète n'est pas sans conséquence sur l'organisme. En effet, de multiples altérations cellulaires et moléculaires ont été décrites dans des conditions d'hyperglycémie *in vitro* et dans des modèles de diabète chez des rongeurs (Gustavsson *et al.* 2010; Zhong *et al.* 2012).

Les types cellulaires touchés par cette hyperglycémie chronique sont encore mal connus et peu décrits. Cependant il semblerait que les premières cibles soient les cellules endothéliales qui sont directement au contact du glucose sanguin. Par ailleurs, la plupart des anomalies biochimiques liées à l'hyperglycémie chronique les mieux caractérisées aujourd'hui l'ont été dans des cellules endothéliales (Miller *et al.* 2007; Busik *et al.* 2008; Bakker *et al.* 2009).

Quatre types de modifications biochimiques intracellulaires induites par l'hyperglycémie ont été identifiées à ce jour : la voie des polyols, la voie des hexosamines, la voie la protéine kinase C (PKC) et la glycation non enzymatique des protéines.

La voie des polyols

En condition hyperglycémique, l'excès de glucose intracellulaire induit l'activation de la voie des polyols qui est une voie secondaire de métabolisation du glucose (Figure 37). Une partie du glucose est alors métabolisée en sorbitol via l'aldose réductase puis en fructose via la sorbitol déshydrogénase. L'activité de l'aldose réductase étant plus rapide que la sorbitol déshydrogénase et le sorbitol ne pouvant franchir la membrane plasmique, ce dernier s'accumulent dans la cellule et peut aboutir à un stress oxydatif.

La principale conséquence de l'activation de cette voie est la modification du statut redox de la cellule résultant de la baisse du NADPH (cofacteur de l'aldose réductase) au détriment de l'activité d'enzymes antioxydantes comme la glutathion réductase, l'ascorbate réductase ou encore la oxyde nitrique synthétase qui utilisent ce cofacteur (Bravi *et al.* 1997). La diminution de l'activité de ces enzymes participe alors à l'augmentation du stress oxydatif cellulaire.

La voie des hexosamines

Dans des conditions métaboliques normales environ 2 à 3% du glucose entre dans la voie de biosynthèse des hexosamines (Figure 37). Une partie du fructose-6-phosphate produit lors de la glycolyse est convertie en glucosamine-6-phosphate par la L-glutamine-D-fructose-6-phosphate amidotransferase puis métabolisée en uridyl-diphosphate-N-acétylglucosamine. En

condition hyperglycémique, il a été montré que la voie des hexosamines est augmentée dans des cellules endothéliales aortiques bovines et glomérulaires porcines (**Kolm-Litty *et al.* 1998; Du *et al.* 2000**). L'augmentation de la voie des hexosamines a pour effet d'augmenter la synthèse de la protéine prothrombotique PAI-1 (Plasminogen Activator Inhibitor-1) et du TGF- β (Transforming Growth Factor β) qui régulent la prolifération, la différenciation, l'adhérence et la migration cellulaire (**Brownlee 2001; Madonna and De Caterina 2011**).

L'activation de la protéine kinase C

Comme nous l'avons évoqué précédemment l'hyperglycémie chronique entraîne une hyperactivation de la glycolyse et donc une augmentation de la formation des métabolites qui en découle. Parmi ces métabolites le diacylglycérol (DAG) est capable d'activer la PKC qui est impliquée dans plusieurs voies de signalisations et qui aboutit à la synthèse de protéines participant au modelage de la matrice extracellulaire, à la néovascularisation ou encore à l'inflammation (**Brownlee 2001; Madonna and De Caterina 2011**) (Figure 37). Ainsi, l'activation de la PKC semble jouer un rôle majeur dans le développement des complications macro et microvasculaires du diabète comme la RD. Chez des rats diabétiques, il a été montré que la PKC- β est activé dans l'aorte et le cœur, tandis que les isoformes α , β et ϵ sont activés dans la rétine (**Inoguchi *et al.* 1992; Shiba *et al.* 1993**).

Glycation non enzymatique des protéines

L'augmentation des taux de glucose cellulaire et sanguin accroît la formation de PTG et donc amplifie les effets délétères que peuvent avoir ces métabolites. De plus la production de fructose par la voie des polyols peut stimuler davantage la formation de PTG car le fructose est plus réducteur que le glucose (Figure 37).

Dans le sang le glucose est capable de glyquer l'hémoglobine. Par ailleurs, certaines études suggèrent que la glycation des apolipoprotéines pourrait intervenir dans les modifications du métabolisme des lipoprotéines riches en triglycérides (en particulier les VLDL). En effet, la glycation de l'apolipoprotéine-B apparaît susceptible de réduire la liaison des lipoprotéines à leurs récepteurs. La glycation de l'apolipoprotéine-C II, cofacteur de la lipoprotéine lipase, pourrait également être en cause dans la diminution de son activité. Par ailleurs certaines études suggèrent que la perte des péricytes rétiniens serait liée à des produits de glycoxydation (**Reber *et al.* 2002; Kim *et al.* 2010**).

Le stress oxydatif

L'exposition chronique des cellules à de fortes concentrations en glucose accentue encore d'avantage le déséquilibre lié à l'âge entre la production d'ERO et la diminution des défenses antioxydantes. Au cours du diabète, ce déséquilibre est amplifié par l'utilisation du cofacteur NADPH dans la voie des polyols. De plus l'accumulation de sorbitol augmente la production d'ERO. L'hyperactivation de la glycolyse induit une augmentation de l'activité mitochondriale, principale source d'ERO cellulaire, suite à l'entrée de pyruvate dans le cycle de Krebs (Figure 37).

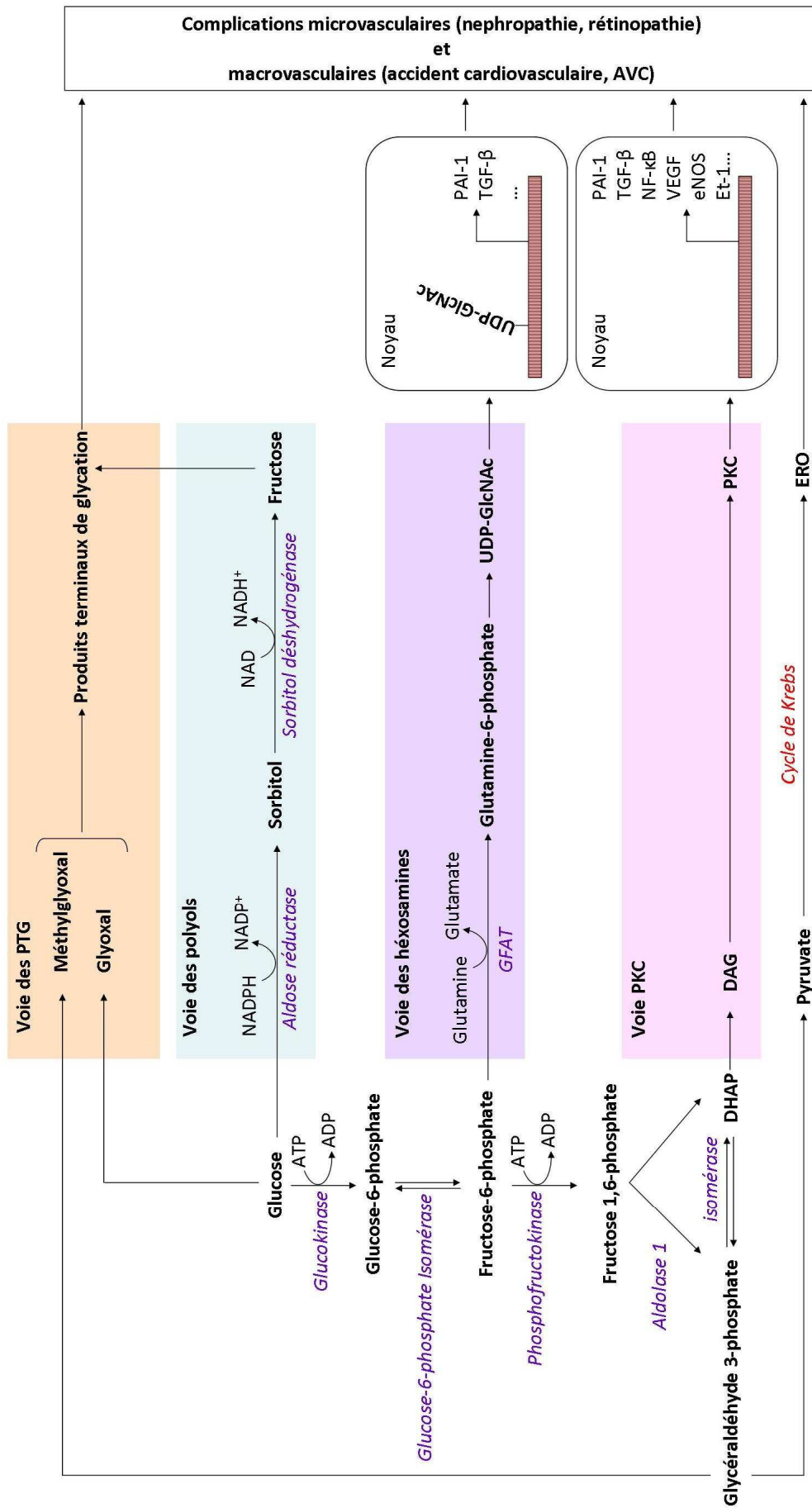


Figure 37 : Effet de l'hyperglycémie sur le métabolisme cellulaire. Adapté de (Madonna and De Caterina 2011).

Ainsi l'ensemble des altérations métaboliques présentées ci-dessus sont susceptibles de participer au développement des complications secondaires telle que la RD.

2.2.2.2. Le développement de la rétinopathie diabétique

Comme développé précédemment, l'hyperglycémie chronique caractéristique du diabète est à l'origine d'altérations dans la structure et la fonction des macro- et microvaisseaux. Les altérations des microvaisseaux sont responsables de la rétinopathie diabétique et la néphropathie diabétique tandis que les lésions macrovasculaires sont responsables d'infarctus du myocarde, d'accidents vasculaires cérébraux et d'ischémie des membres inférieurs. Il est maintenant bien établi que le risque de complications vasculaires est, chez le diabétique, proportionnel au niveau glycémique moyen et à la durée d'exposition à l'hyperglycémie (**Meyer *et al.* 2000; Hodge *et al.* 2004; Sahyoun *et al.* 2008**).

La première anomalie histologique observée aux stades précoces de la RD est la perte des péricytes entourant les vaisseaux rétiniens. En effet, bien qu'il ait été montré *in vitro* que contrairement aux cellules endothéliales, les péricytes sont capables de réguler le transport de glucose face à une hyperglycémie (**Mandarino *et al.* 1994**), il semble que les péricytes soient affectés avant les cellules endothéliales. La perte des péricytes entraîne alors la rupture de la barrière hémato-rétinienne interne et donc l'augmentation de la perméabilité vasculaire. L'infiltration d'eau, de lipoprotéines, d'hématies, de cholestérol, entre autres, dans l'espace périvasculaire participe alors à l'apparition d'œdèmes rétiniens. Dans un deuxième temps, les modifications architecturales de ces vaisseaux provoquent la multiplication des cellules endothéliales aboutissant à l'occlusion progressive des capillaires. L'apparition de zones d'ischémie rétinienne déclenche alors une série de processus visant à augmenter le flux sanguin dans le territoire lésé afin de prévenir la mort tissulaire : l'angiogenèse (décrit dans la partie « 2.2.3. L'angiogenèse : stade ultime de la DMLA et la RD »).

Sur le plan clinique, l'évolution de la RD est progressive. Elle débute par un stade de RD non proliférante minime caractérisé au fond d'œil par de petits micro-anévrysmes (Figure 38). L'évolution passe ensuite par plusieurs stades jusqu'à la RD non proliférante sévère (ischémie rétinienne étendue), puis vers le stade de RD proliférante (prolifération de néovaisseaux dans la rétine). L'évolution de la pathologie s'accompagne de manifestations diverses telles que des œdèmes maculaires dûs à l'hyperperméabilité des vaisseaux, des hémorragies intra-

vitréennes par saignement des néovaisseaux, un décollement de la rétine entraînant souvent une perte brutale et quasi-complète de la vision.



Figure 38 : Photographie du fond d'œil de patients atteints de RD.

La dilatation et l'occlusion des capillaires rétiniens sont donc les premières lésions décelables de la RD. Les phénomènes occlusifs (affectant surtout la rétine périphérique) et œdémateux (prédominant dans la macula) évoluent de façon concomitante.

2.2.3. L'angiogenèse : stade ultime de la DMLA et la RD

Chez l'adulte, l'angiogenèse constitue le mécanisme de formation de néovaisseaux par bourgeonnement à partir de vaisseaux déjà existants. Elle aboutit souvent, dans des circonstances pathologiques, à la formation de vaisseaux de petit calibre, peu fonctionnels et fragiles donc souvent à l'origine d'hémorragies. Ces processus d'angiogenèse sont responsables des formes les plus sévères de la DMLA et la RD.

L'angiogenèse est un processus fortement contrôlé par un équilibre dynamique entre des facteurs activateurs et des facteurs inhibiteurs. Dans l'œil, le VEGF, exprimé par l'EPR, les cellules gliales, les cellules ganglionnaires, les péricytes et cellules endothéliales, semble être le régulateur majeur de l'angiogenèse (**Witmer *et al.* 2003; Adamis and Shima 2005**).

2.2.3.1. L'angiogenèse dans la DMLA

Comme nous l'avons cité précédemment, le VEGF et le PEDF sont synthétisés et sécrétés par l'EPR. Cependant les stimuli permettant d'expliquer les modifications de l'équilibre VEGF/PEDF par l'EPR lors de la DMLA exsudative sont inconnus. Cela pourrait être dû à une diminution des apports en oxygène et métabolites provenant des capillaires choréïdiens

ou bien à une diffusion réduite de ces derniers à travers la membrane de Bruch et la rétine neurale. Dans la DMLA, la néovascularisation s'effectue de la choroïde vers la rétine. Des néovaisseaux provenant des vaisseaux choroïdiens pénètrent la membrane de Bruch dans l'espace sous-rétinien puis dans la rétine (Figure 39). Les taux de VEGF-A dans le vitré sont significativement augmentés chez les patients atteints de DMLA exsudative (**Davuluri et al. 2009**).

2.2.3.2. L'angiogenèse dans la RD

Contrairement à la DMLA, les processus impliqués dans la néovascularisation au cours de la RD débutent dans la rétine et sont un peu mieux décrits (**Paques et al. 1997; Simo et al. 2006; Zhang et al. 2009; Praidou et al. 2010**) (Figure 39). Le VEGF agit à tous les stades de l'angiogenèse. En effet, il augmente la perméabilité vasculaire, favorise la prolifération et la migration des cellules endothéliales ; et mobilise les angioblastes. L'expression du VEGF est régulée par les facteurs sensibles à l'hypoxie et par plusieurs cytokines et facteurs de croissance (TGF- β , interleukine-1, FGF, PDGF et IGF) (**Neufeld et al. 1999**). Chez le primate, des injections répétées de VEGF sont capables de reproduire les anomalies vasculaires observées chez les diabétiques (**Tolentino et al. 1996; Tolentino et al. 2002**). Il a également été montré que le taux de VEGF sanguin est augmenté chez les patients atteints de RD (**Mahdy and Nada 2011**). La surexpression de VEGF observée en cas d'hyperglycémie pourrait être la conséquence directe de l'activation de la PKC ou de l'ischémie rétinienne (**Miller et al. 1997**).

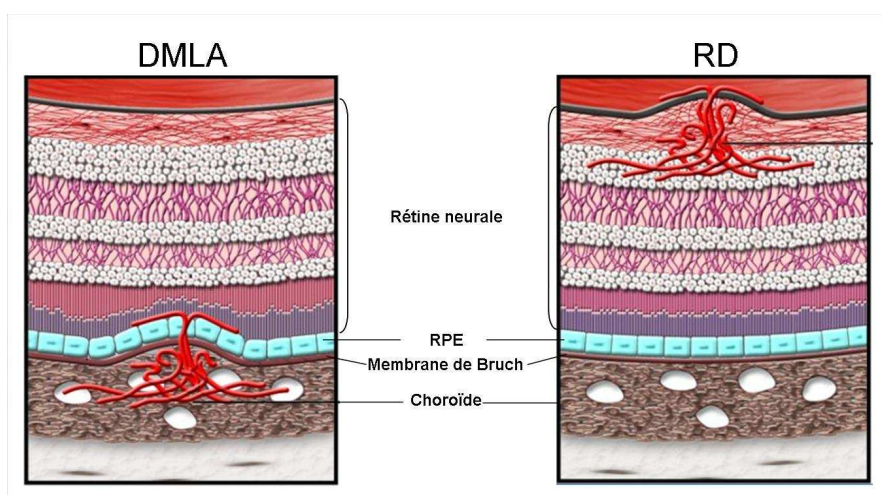


Figure 39 : Néo-vascularisation pathologique dans la DMLA et la RD.

2.2.4. Les facteurs de risque de la DMLA et la RD

2.2.4.1. Les facteurs de risques endogènes

Certains facteurs de risque sont communs à la DMLA et à la RD et de façon générale, les facteurs de risque liés au développement de la rétinopathie diabétique sont les mêmes que ceux liés au diabète. Le tableau suivant présente les principaux facteurs de risque endogènes décrits pour être impliqués dans la DMLA et la RD.

	DMLA	RD
L'âge	La prévalence augmente avec l'âge (Klein et al. 1992; Augood et al. 2004; Friedman et al. 2004; Klein et al. 2007; Butt et al. 2011; Jonasson et al. 2011; Nangia et al. 2011; Piermarocchi et al. 2011; Yang et al. 2011; Cheung et al. 2012; Moon et al. 2012; Owen et al. 2012; Rudnicka et al. 2012)	La prévalence augmente avec l'âge (Kato et al. 2002; Wong et al. 2008; Zhang et al. 2011; Kostev and Rathmann 2012).
L'ethnie	Prévalence plus faible de DMLA dans les populations noires et à peau brune (Frank et al. 2000; Wang et al. 2003; Klein et al. 2006; Bressler et al. 2008; Goold et al. 2010; Klein et al. 2011; Stein et al. 2011; Vanderbeek et al. 2011)	Variable selon les études (Lim et al. 2008; Chiang et al. 2011; Lee et al. 2011; Zhang et al. 2011; Sivaprasad et al. 2012).
Le sexe	Risque augmenté chez les hommes (Kawasaki et al. 2008; Goold et al. 2010; Klein et al. 2010; Yang et al. 2011; Cheung et al. 2012; Moon et al. 2012) ou chez les femmes (Owen et al. 2012; Rudnicka et al. 2012) selon les études.	Variable selon les études (Wong et al. 2008; Hammes et al. 2011; Semeraro et al. 2011; Zhang et al. 2011; Zheng 2011; Kaiser et al. 2012; Kostev and Rathmann 2012).
La couleur de l'iris	Rôle limité (Mitchell et al. 1998; Frank et al. 2000; Nicolas et al. 2003; Tomany et al. 2003; Wang et al. 2003; Pham et al. 2009; Chakravarthy et al. 2010).	-
La durée du diabète	-	Augmentation de la prévalence de la RD avec la durée d'exposition au diabète (Hammes et al. 2011; Semeraro et al. 2011; Zhang et al. 2011; Zheng 2011).
l'obésité	Augmentation du risque de DMLA chez les personnes obèses ayant un indice de masse corporelle élevé (Smith et al. 1998; Age-Related Eye Disease Study Research Group 2000; Schaumberg et al. 2001; Seddon et al. 2003; Chakravarthy et al. 2010; Adams et al. 2011; Sin et al. 2012).	L'obésité est l'un des facteurs de risque majeur de la RD (Imbeault et al. 2011; Lim et al. 2011; Solet et al. 2011; Feng et al. 2012).
L'athérosclérose	Association entre la présence de plaques athéromateuses dans l'artère carotidienne et la DMLA (Klein et al. 2007; Wong et al. 2007; Chakravarthy et al. 2010).	Association entre la présence de plaques athéromateuses et la RD (Klein et al. 2002; Wong et al. 2008; Zheng 2011).
L'hypertension artérielle	Association entre l'hypertension et la DMLA (Age-Related Eye Disease Study Research Group 2000; Hyman et al. 2000; Fraser-Bell et al. 2008; Chakravarthy et al. 2010; Butt et al. 2011).	Association entre l'hypertension et la RD (Wong et al. 2008; Movahed et al. 2010; Semeraro et al. 2011; Zhang et al. 2011; Feng et al. 2012; Kostev and Rathmann 2012).
La dyslipidémie	Controversé. Augmentation du risque de DMLA chez les personnes ayant des taux élevés de HDL-cholestérol et triglycérides dans le sang (Hyman et al. 2000; Seddon et al. 2003; Clemons et al. 2005; Klein et al. 2007; Klein et al. 2010; Butt et al. 2011). Cependant une étude récente ne montre pas d'association (Wang et al. 2012).	Augmentation du risque de RD chez les personnes ayant un taux élevés de cholestérol sanguin (Wong et al. 2008). Cependant une étude récente ne montre pas d'association (Wang et al. 2012).
Les facteurs génétiques	Association entre la DMLA et le polymorphisme génétique des gènes ABCA4, HTRA1, CFH, ARMS2/LOC387715, APOE, Complément C3, CX3CR1 etc. (Seddon et al. 2005; Souied et al. 2005; Klein et al. 2008; Farwick et al. 2009; Reynolds et al. 2009; Seddon et al. 2009; Leveziel et al. 2011; Park et al. 2012; Shahid et al. 2012; Yu et al. 2012).	Association entre la RD et le polymorphisme des gènes Aldose Reductase, NOS, RAGE, HLA, VEGF etc. (Radha et al. 2002; Taverna 2004; Uhlmann et al. 2006; Liew et al. 2009).

Tableau 2 : Facteurs de risques endogènes associés à la DMLA et la RD.

2.2.4.2. Les risques environnementaux

2.2.4.2.1. Le tabagisme

La plupart des études montrent une association positive entre le tabagisme et la MLA, la DMLA et la RD (**Chakravarthy et al. 2007; Cong et al. 2008; Kawasaki et al. 2008; Klein et al. 2010; Cackett et al. 2011; Hammes et al. 2011; Yang et al. 2011; Moon et al. 2012; Raman et al. 2012; Sin et al. 2012**). Plusieurs mécanismes peuvent expliquer cette association. Il est plausible qu'en réduisant le taux d'antioxydants sériques et en favorisant la formation d'ERO, les taux rétinien d'enzymes antioxydantes diminuent également, ce qui engendre un stress oxydatif. Une autre explication pourrait être une altération du flux sanguin choroidien. Il est maintenant bien connu que le tabagisme modifie les propriétés biochimiques des molécules et des cellules du sang et augmente les risques d'accidents cardiovasculaires (**Yanbaeva et al. 2007**).

2.2.4.2.2. L'exposition à la lumière

Les effets délétères de l'exposition lumineuse à long terme sur les photorécepteurs et l'EPR ont été mentionnés dans de nombreuses études expérimentales *in vitro* et *in vivo* (**Wiegand et al. 1983; Kayatz et al. 1999; Demontis et al. 2002**). Il semblerait que l'exposition à la lumière augmente les risques de progression de la DMLA (**Taylor et al. 1990; Cruickshanks et al. 1993; Fletcher et al. 2008**). Cependant les études épidémiologiques corrélant DMLA et exposition à la lumière sont difficiles à établir étant donné la difficulté de mesurer la quantité de lumière reçue par la rétine.

2.2.4.2.3. Les facteurs alimentaires

Depuis ces 50 dernières années, notre alimentation a été bouleversée par de profondes mutations économiques et sociales. La consommation d'aliments transformés, riches en lipides, en sucres rapides à index glycémique élevé et pauvres en fibres, a créé un déséquilibre important entre l'apport calorique et la dépense énergétique aboutissant à l'augmentation du nombre de personnes en surpoids ou obèses.

L'obésité est un des facteurs de risque principal du diabète. En effet, les personnes obèses ont 10 fois plus de risque de développer un diabète et dans 80% des cas, les personnes diabétiques sont en surpoids voire obèses. Depuis quelques années, le fructose est fortement mis en cause dans le développement de l'obésité. En effet, depuis toujours l'homme a consommé du fructose en petites quantités dans les fruits frais. Cependant, depuis 40 ans environ, dans les

pays industrialisés, la plupart du saccharose a été remplacé, par un édulcorant moins onéreux et 1,6 fois plus sucré que le saccharose ou le glucose : le sirop de maïs à haute teneur en fructose. Ainsi la consommation de fructose est passée de 15 à 20 g par jour en 1970 à 85 à 100 g par jour en 2000 (**Basciano *et al.* 2005; Miller and Adeli 2008; Butt *et al.* 2011; Moon *et al.* 2012; Raman *et al.* 2012**). Des données récentes suggèrent une association entre la consommation de fructose, l'obésité et le diabète de type 2 (**Johnson *et al.* 2007; Bray 2008**). Si le fructose est un isomère du glucose, son métabolisme est quelque peu différent. Tout d'abord contrairement au glucose, le fructose ne peut pas être stocké, en cas d'apport important, il est donc directement métabolisé en triglycérides via la voie de la lipogénèse. Ensuite, le fructose a la capacité de contourner l'étape de régulation principale de la glycolyse contrôlée par la phosphofruktokinase (Figure 40). Ainsi, alors que le métabolisme du glucose est régulé négativement par la phosphofruktokinase, le fructose peut entrer de façon continue dans la voie de la glycolyse et conduire à la surproduction de cholestérol et de triglycérides par le foie (hypertriglycéridémie associée en particulier aux VLDL) (Figure 40). De plus, tout comme le glucose, le fructose contribue à la formation d'ERO et de PTG, et à l'activation de PKC et de la voie des hexosamines (Figure 40). Bien que le fructose n'augmente que faiblement la synthèse d'insuline, une exposition chronique semble induire de façon indirecte une résistance à l'insuline suivie d'une hyperinsulinémie (**Tran *et al.* 2009**).

En ce qui concerne la DMLA, l'existence d'un lien avec l'hyperglycémie a récemment été suggéré (**Chiu and Taylor 2011**). Cependant les risques les plus souvent décrits sont liés à la consommation de lipides comme cholestérol et acides gras trans, saturés et insaturés. En effet plusieurs études épidémiologiques ont montré une association entre la consommation de lipides et la prévalence de la DMLA (**Cho *et al.* 2001; Seddon *et al.* 2001; Seddon *et al.* 2003; Age-Related Eye Disease Study Research Group 2007; Delcourt *et al.* 2007; Chong *et al.* 2009; Kishan *et al.* 2011**).

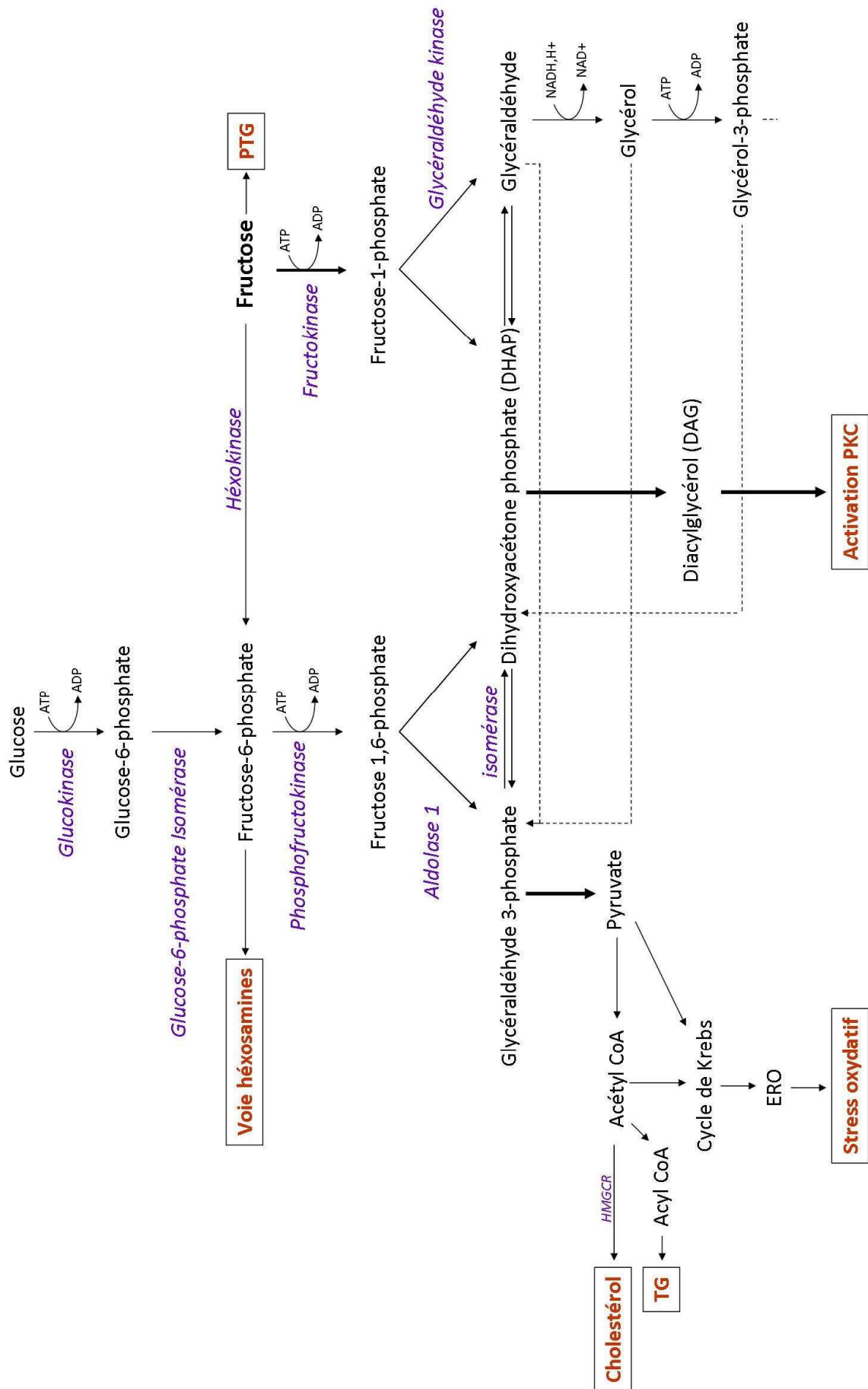


Figure 40 : Métabolisme du fructose.

2.2.5. Les traitements

Des programmes de santé publique et des recommandations de bonnes pratiques cliniques ont été élaborés dans de nombreux pays afin d'améliorer la prise en charge des patients atteints de rétinopathies liées à l'âge. Cependant, seul un examen régulier peut permettre de diagnostiquer précocement et de les traiter.

2.2.5.1. Les procédés physiques

Parmi les procédés physiques utilisés pour limiter la progression de la DMLA, on distingue la photocoagulation et la thérapie photodynamique. La première technique vise à cautériser les néovaisseaux via un laser. Cependant l'effet secondaire majeur est la destruction de la rétine sensorielle au niveau de la zone traitée. La seconde technique a pour objectif de traiter les néovaisseaux sans endommager les tissus adjacents. Elle consiste en l'injection intraveineuse de vertéporfine (Visudyne®), produit photosensibilisant, qui se fixe préférentiellement sur la paroi des néovaisseaux, suivie d'une photo-illumination laser. Cette technique ne possède qu'une efficacité partielle, néanmoins, elle permet de diminuer le risque d'évolution vers la cécité de l'ordre de 20%. La destruction des néovaisseaux n'est souvent que temporaire et justifie la répétition des procédures, parfois tous les trois mois, pendant les deux premières années.

Dans le cas de la RD, la photocoagulation panrétinienne est le traitement le plus utilisé. Contrairement à la photocoagulation effectuée dans le traitement de la DMLA, il s'agit ici de réaliser une coagulation étendue de toute la rétine périphérique. Ainsi cette technique permet la régression des néovaisseaux prérétiniens et/ou prépapillaires dans près de 90% des cas. Le traitement par laser est également indiqué dans l'œdème maculaire s'il existe une baisse d'acuité visuelle significative et prolongée. Dans ce cas, il consiste en une photocoagulation en grille sur la surface de l'œdème et permet au mieux un ralentissement de la baisse de l'acuité visuelle.

La vitrectomie est indiquée dans les cas d'hémorragie intra-vitréenne persistante et/ou de décollement de rétine dans les cas de rétinopathie diabétique proliférante.

2.2.5.2. Les agents chimiques

Les agents chimiques sont essentiellement utilisés dans le cadre du traitement de la DMLA. En effet, le traitement de la DMLA exsudative connaît depuis quelques temps une avancée considérable avec le développement des agents anti-VEGF (**Witmer *et al.* 2003; Shams and**

Ianchulev 2006). Ces agents agissent par inhibition de la néovascularisation et réduction de la perméabilité vasculaire. Les deux agents anti-VEGF les plus utilisés actuellement sont le ranibizumab (Lucentis) et le bévacizumab (Avastin).

Le ranibizumab est un fragment d'anticorps humanisé (dérivé d'un anticorps murin) qui se lie à tous les isoformes du VEGF. De par son efficacité, il est, pour le moment, l'agent thérapeutique le plus couramment utilisé dans le cadre du traitement de la DMLA exsudative. Les deux études de phase III MARINA et ANCHOR ont montré une stabilisation de l'acuité visuelle sur 24 mois chez environ 90% des patients souffrant de DMLA exsudative. Trente pour cent d'entre eux ont même bénéficié d'un gain visuel (**Brown et al. 2006; Rosenfeld et al. 2006; Brown et al. 2011**).

Le bévacizumab est un anticorps complet dérivé du même anticorps murin que le ranibizumab. Enregistré dans le traitement des tumeurs métastatiques coliques, pulmonaires et du sein, il est largement utilisé en injections intravitréennes pour le traitement de la DMLA exsudative. Il existe également le pegaptanib sodium (Macugen), aptamère sélectif contre le VEGF 165, qui est néanmoins très peu utilisé en raison de la supériorité d'efficacité du Lucentis.

Malgré le succès de ces traitements leurs limites sont clairement la nécessité d'injection répétée et le fait que les néovaisseaux ne régressent pas et soient inactivés souvent de façon temporaire. D'autres techniques d'administration (gouttes) et agents thérapeutiques sont actuellement développés comme le VEGF trap (Regeneron), un récepteur de haute affinité pour la VEGF-A, les siRNA anti-VEGF (Bévasiranib, Cand5 et SiRNA27) (**Schlingemann and Witmer 2009**), le PEDF ou encore les inhibiteurs de PDGF. Des modulateurs du cycle visuel (le fenrétinide et le rétinylamine) qui réduisent l'activité métabolique des photorécepteurs et l'accumulation d'A2E et de lipofuscine sont également à l'essai (**Maeda et al. 2009; Mata et al. 2012**).

2.2.6. La prévention

Compte tenu de l'augmentation importante de l'apparition de nouveau cas de DMLA et RD chaque année, il semble essentiel de trouver les moyens de dépister les stades précoces de ces rétinopathies mais également de pouvoir prévenir leur apparition ou leur progression. La prévention de la progression de la DMLA et de la RD consiste également à agir sur les

facteurs de risque dit réversibles comme l'arrêt du tabac, un contrôle du poids et un bon équilibre alimentaire.

Nous ne développerons dans cette partie que les facteurs de prévention impliqués dans la DMLA car la prévention de la rétinopathie diabétique consiste essentiellement à équilibrer la glycémie (injection insuline) et la tension artérielle. Le but étant d'obtenir une hémoglobine glyquée inférieure à 7%, suivant les recommandations de l'Agence Nationale pour le Développement de l'Évaluation Médicale et une tension artérielle inférieure ou égale à 14/8.

Le rétablissement de la balance oméga-6/oméga-3

Les acides gras sont des molécules essentielles à la vie cellulaire puisqu'ils sont des constituants majeurs des triglycérides, des phospholipides membranaires et des esters de cholestérol. Les acides gras polyinsaturés à longue chaîne (AGPI-LC), et notamment les AGPI-LC oméga-3 (ω 3) influencent la fluidité membranaire et participent à la régulation de nombreux processus physiologiques (rétine, système cardiovasculaire, cérébral, hormonal et inflammatoire) (**SanGiovanni and Chew 2005; Uauy and Dangour 2006**).

La rétine est très riche en AGPI-LC. En effet, la bicouche lipidique des segments externes des photorécepteurs est constituée à 50% d'AGPI-LC dont le DHA qui représente environ 50% des phospholipides des bâtonnets. Le DHA joue un rôle fondamental dans les propriétés physico-chimiques des membranes discales des segments externes des photorécepteurs (**Stone et al. 1979; Uauy et al. 2001**). De plus, avec le renouvellement continu des segments externes des photorécepteurs, un apport important en DHA est nécessaire au maintien de l'intégrité de leurs membranes.

L'Homme est capable de synthétiser l'ensemble des acides gras dont il a besoin, à l'exception de l'acide linoléique (LA), précurseur des acides gras oméga-6 (ω 6), et de l'acide α -linoléique (ALA), précurseur des acides gras ω 3 (Figure 41). En effet, contrairement aux végétaux, l'Homme ne possède pas de delta-12 et -15 désaturase. Ainsi, le ALA et le LA sont dits « indispensables » et sont exclusivement apportés par l'alimentation.

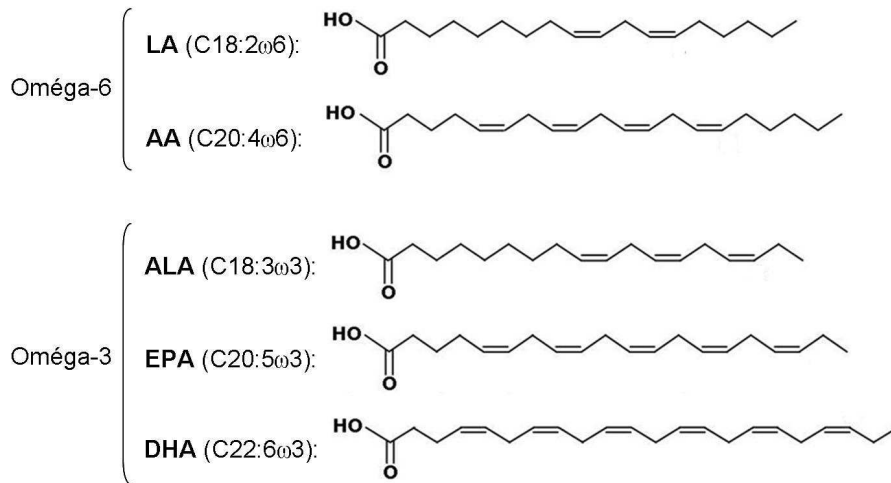


Figure 41 : Structure de quelques des acides gras des séries oméga-6 et oméga-3.
 Les acides gras oméga-3 et oméga-6 sont définis par la position de la première insaturation par rapport à l'extrémité méthyle terminale.

A partir de ces deux précurseurs, une série de réactions enzymatiques, faisant intervenir des désaturases et des élongases, aboutit à la formation d'AGPI-LC. La conversion de ces précurseurs en AGPI-LC passe par les mêmes enzymes (Figure 42). Ainsi, l'excès de l'un des deux précurseurs favorise la formation d'acide gras de sa propre série. Ainsi, de par la compétition qui existe pour les enzymes de conversion, l'excès d' ω 6 nuit à l'exploitation optimale des ω 3 par l'organisme. De plus, même si l'Homme dispose des enzymes nécessaires, il semble que le taux de conversion réel des précurseurs en AGPI-LC de bout de chaîne de biosynthèse soit relativement faible (excepté au cours du développement et chez la femme enceinte). En effet, il a été montré chez l'Homme, que moins de 5% de l'acide alpha-linolénique est faiblement converti en DHA (**Brenna 2002**).

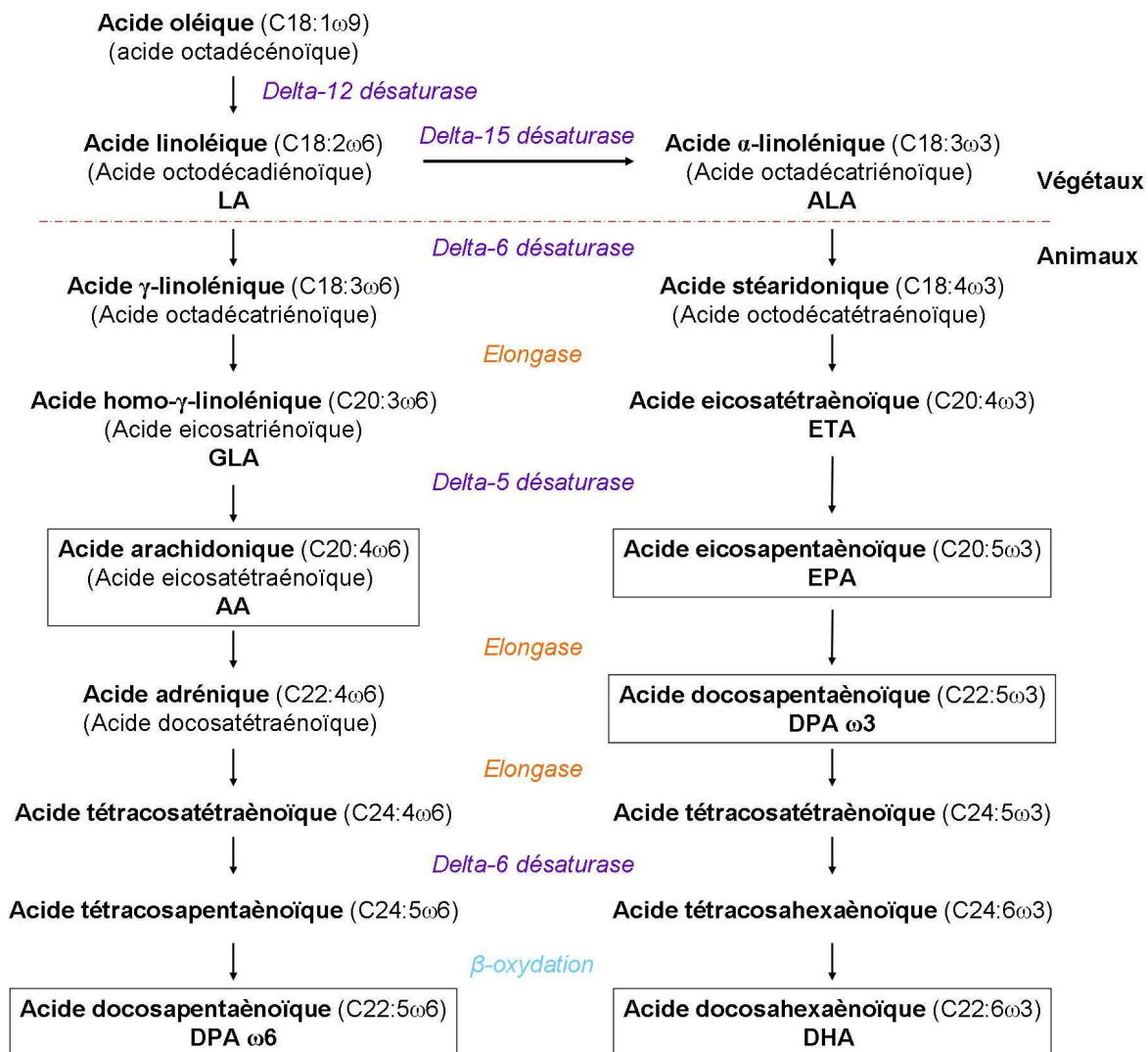


Figure 42 : Biosynthèse des AGPI-LC de la série des oméga-6 et oméga-3.

De ce fait l'apport en AGPI-LC par l'alimentation en plus de l'apport des précurseurs ALA et LA s'avère essentiel au maintien des fonctions physiologiques. Ainsi, depuis quelques années, les lipides et plus particulièrement les acides gras font l'objet de recommandations nutritionnelles par l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (AFSSA). Depuis 2010 l'AFSSA recommande un apport lipidique journalier représentant 35 à 40% de l'apport énergétique (ANSES 2011). Pour le LA l'apport nutritionnel conseillé (ANC) chez un adulte consommant 2000 kcal/jour a été fixé à 4% de l'apport énergétique contre 1% pour l'ALA. Enfin pour le DHA et le EPA, l'ANC a été fixé à 250 mg par jour chacun (Tableau 3).

Cependant, en France, la consommation en lipides préconisées par l'AFSSA est dépassée par 43% des adultes et 34% des enfants. De plus, on estime que le rapport $\omega 6/\omega 3$ dans l'alimentation occidentale est de 10/1 à 30/1, tandis qu'il devrait idéalement se situer à 5/1.

		BESOIN PHYSIOLOGIQUE MINIMAL*	PREVENTION DU RISQUE				ANC 2010	
			Syndrome métabolique-diabète-obésité	Pathologies cardiovasculaires	Cancers : sein et côlon**	Pathologies neuro-psychiatriques		Autres pathologies : DMLA***
Lipides totaux ^a		30 ^e	30-40	35-40 ^c	35-40	35-40 ^d	<40	35-40 ^e
AG indispensables	Acide linoléique C18 :2 n-6	2	2 ^e	5	2 ^e	2 ^e	≤4 ^f	4 ^e
	Acide α-linolénique C18 :3 n-3	0,8	0,8 ^e	1 ^h	0,8 ^e	0,8 ^e	0,8 ^e	1 ^h
	Acide docosahexaénoïque DHA, C22 :6 n-3	250 mg	500 mg	500-750 mg ⁱ	500mg	≥ 200-300 mg	500 mg	250 mg
AG non indispensables	Acide eicosapentaénoïque EPA, C20 :5 n-3	-						-
	Acide laurique (C12:0) + Acide myristique (C14:0) + Acide palmitique (C16:0)	-	-	≤8 ^h	-	-	-	≤8
	Acides Gras Saturés totaux	-	- ^k	≤12	≤12 ^l	-	-	≤12
	Acide oléique C18 :1 n-9	-	-	≤20 ^m	-	-	-	15-20
	Autres AG non indispensables ⁿ	-	-	-	-	-	-	-

Tableau 3 : ANC en acides gras pour un adulte consommant 2000 kcal.

* correspond pour les AG à un apport nécessaire pour éviter tout syndrome de déficit alimentaire en AG indispensables. Ces recommandations assurent un bon fonctionnement de l'ensemble de l'organisme et notamment le développement et le fonctionnement cérébral

** parmi les cancers étudiés, seules les études relatives aux cancers du sein et du côlon permettent d'établir des recommandations.

*** parmi les maladies étudiées, seules les études relatives à la DMLA permettent d'établir des recommandations

«-» absence de données bibliographiques permettant de conclure

a Les valeurs ne s'appliquent que pour un apport énergétique proche de 2000 kcal et une balance énergétique équilibrée

b Un besoin minimum de 30 % paraît souhaitable pour assurer l'apport minimum en AGPI indispensables. De plus, il n'y a aucun bénéfice à descendre en deçà de 30 %

c Pour des apports de moins de 35 %, il n'y a pas de bénéfice établi pour la santé cardiovasculaire

d Les valeurs proposées pour la prévention des risques de maladies cardiovasculaires et de syndrome métabolique peuvent s'appliquer en l'absence de données spécifiques étant donnée la possibilité d'un lien pathogénique

e En l'absence de données spécifiques, le besoin physiologique s'applique

f Sur la base d'études d'observation qui montrent que des apports excessifs en acide linoléique, supérieurs à 2,5 % ou à 5,5 %, selon les études, sont associés à une disparition de l'effet bénéfique des AGPI n-3 LC. La valeur de 4 % a donc été prudemment choisie

g La valeur de l'ANC tient compte du fait qu'un certain nombre de données suggère une limite maximale d'apport en acide linoléique

h Cette donnée est déduite d'études épidémiologiques d'observation et non d'études d'intervention formelles

i Besoins en EPA+DHA pouvant atteindre 750 mg pour les sujets à haut risque cardiovasculaire (prévention secondaire)

j Les données regroupant souvent les effets EPA + DHA, la valeur de 250 mg est donc obtenue par soustraction

k Absences de données cliniques cohérentes

l Données restreintes au cancer du sein

m Sur la base de la conjonction d'études épidémiologiques et de données cliniques suggérant une valeur limite d'apport

n « Autres AG non indispensables » représentent un ensemble d'AG consommés en faible quantité pour lesquels il n'y a pas d'ANC définissable actuellement. Ces AG qui représentent environ 2 % de l'AE comprennent notamment des AGMI (16:1 n-7, 18:1 n-7 ; 22:1 n-9...), des AGPI (18:3 n-6, 20:3 n-6, 20:4 n-6 ; 18:4 n-3, 20:4 n-3, 22:5 n-3...) et des AG *trans* et conjugués (18:2 n-7*t* ; 18:2 n-7 9*c,11t*). En ce qui concerne les AG *trans*, il est rappelé que leur niveau d'apport maximal est limité à 2 % (Afssa, 2005).

D'après (ANSES 2011).

On peut supposer que le rétablissement de la balance alimentaire entre $\omega 6/\omega 3$ puisse avoir des effets sur développement et/ou de la progression de la DMLA. En effet, de nombreuses études ont rapporté que le développement et la progression de la DMLA vers ses formes les plus avancées sont réduits chez les patients dont le régime alimentaire est riche en acides gras $\omega 3$, et particulièrement en poisson (Chua *et al.* 2006; Seddon *et al.* 2006; Delcourt *et al.* 2007; Augood *et al.* 2008; Chong *et al.* 2009; Sangiovanni *et al.* 2009; Tan *et al.* 2009; Swenor *et*

al. 2010; Christen *et al.* 2011). De plus certaines de ces études tendent à prouver que cette réduction est potentialisée par une faible consommation d'acides gras ω_6 , notamment en acide linoléique (Seddon *et al.* 2001; Seddon *et al.* 2003; Age-Related Eye Disease Study Research Group 2007; Chong *et al.* 2008; Tan *et al.* 2009; Sin *et al.* 2012). L'étude épidémiologique Age-Related Eye Disease Study Research (AREDS) regroupant 349 patient atteint de DMLA exsudative et 504 patients sans DMLA a cherché à évaluer, par questionnaire semi-quantitatif, le risque entre la consommation moyenne d' ω_6 , d' ω_3 , de cholestérol, d'acide arachidonique, d'acides gras monoinsaturés et saturés, et la DMLA. L'étude a révélé que la consommation d'acides gras ω_3 confère un risque plus faible de la DMLA exsudative et que cette protection est encore plus importante chez les personnes ayant une faible consommation de LA. Les mécanismes de la neuroprotection induite par les AGPI-LC ω_3 sont encore peu décrits cependant ils peuvent s'expliqués par leur fonction. En effet, sous l'action d'enzymes telles que la lipoxigénase, la cyclooxygénase ou le cytochrome P450, certains AGPI-LC sont convertis en métabolites secondaires regroupés sous le nom d'eicosanoïdes (prostaglandines, prostacyclines, thromboxanes, leucotriènes, lipoxines, résolvines, protacyclines, acides hydroxyeicosatétraenoïques et époxyeicosatriénoïques) lorsqu'ils sont issus d'AGPI-LC à vingt carbones et docosanoïdes (protectines, resolvines, maresines) lorsqu'ils sont issus du DHA. Les eicosanoïdes et les docosanoïdes issus des AGPI-LC ω_3 sont plutôt anti-inflammatoires, anti-apoptotiques tandis que les eicosanoïdes issus des AGPI-LC ω_6 sont d'avantage pro-inflammatoires, pro-apoptotiques et pro-angiogéniques (SanGiovanni and Chew 2005; Schmitz and Ecker 2008).

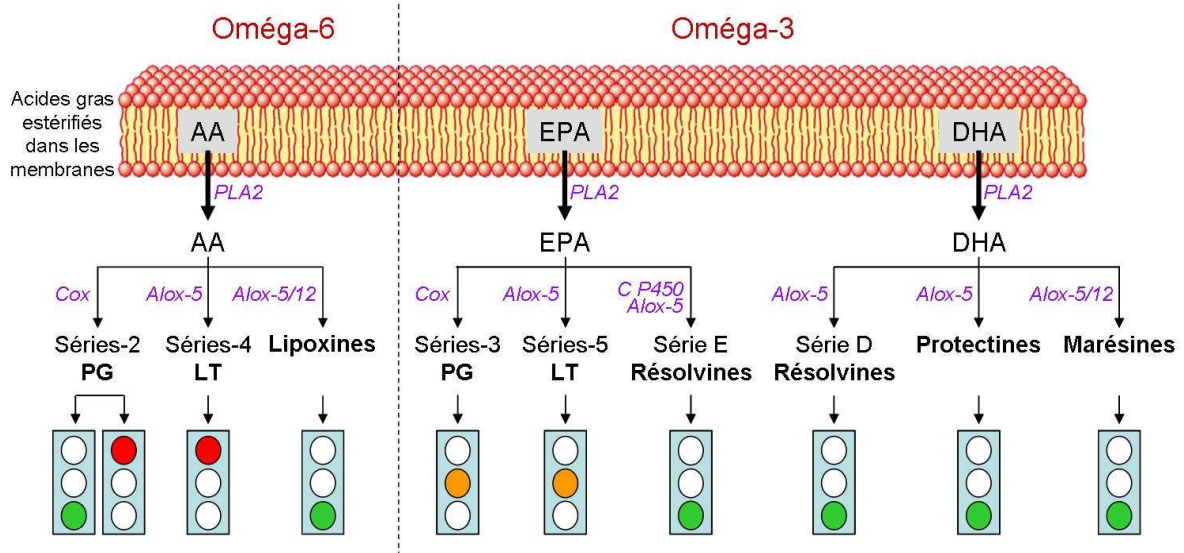


Figure 43 : Médiateurs pro- et anti-inflammatoire issu des acides gras membranaires.
 Rond rouge = pro-inflammatoire, rond orange = moyennement inflammatoire, rond verts = anti-inflammatoire,
 PLA2 = Phospholipase A2, Cox : CycloOXYgénase, Alox : Arachidonique LipOXYgénase,
 CP450 : Cytochrome P450

Une équipe américaine a montré que la neuroprotectine D1 (NPD1), un métabolite du DHA, aurait des effets anti-apoptotiques et anti-inflammatoires *in vitro* (Bazan 2006; Bazan 2008; Halapin and Bazan 2010) et *in vivo* (Qin et al. 2008; Sheets et al. 2010). Cette équipe a proposé plusieurs étapes aboutissant à la formation de la NPD1 et à son effet neuroprotecteur. Le DHA contenu dans les phospholipides membranaires des cellules de l'EPR et dans les photorécepteurs serait dans un premier temps libéré des phospholipides par la phospholipase A2 puis catabolisé en NPD1 par la 15-lipoxygénase. La NPD1 ainsi formée serait redistribuée à la rétine neurale dans laquelle elle inhiberait l'expression de gènes codants pour des facteurs pro-inflammatoires tels que COX-2, IL-1 β , CEX-1 et B94, et des facteurs pro-apoptotiques tels que BAX, BAD, BID, BIK et la caspase-3. Dans un même temps elle activerait la synthèse de protéines anti-apoptotiques telles que BCL-2, BCL-XL, BFL-1/A1 (Bazan 2006).

La lutéine et la zéaxanthine

Parmi les 600 caroténoïdes connus, seuls 34 caroténoïdes et 8 formes dérivées sont retrouvés dans le sérum, dont les plus fréquentes sont le lycopène, le β -carotène, l' α -carotène, la lutéine et la zéaxanthine. Parmi eux, seules la lutéine et la zéaxanthine se retrouvent dans la rétine, se concentrant au niveau de la macula. La lutéine est présente dans l'aire maculaire en concentration 500 fois plus importante que dans tout autre tissu de l'organisme. Au niveau de la fovéa, la concentration en zéaxanthine est le double de la lutéine. Le rapport

zéaxanthine/lutéine décroît puis s'inverse progressivement lorsqu'on s'éloigne de la fovéa. Le pic d'absorption des pigments maculaires est situé autour de 460 nm, ce qui correspond au spectre d'émission de la lumière bleue. Ces molécules arrêtent environ 40% de la lumière bleue avant que celle-ci n'atteigne les photorécepteurs. L'alimentation est la seule source en lutéine et zéaxanthine. On les retrouve principalement dans le jaune d'œuf, les fruits et les végétaux tels que les épinards, les brocolis, le maïs ou bien les kiwis. Plusieurs études ont rapporté un rôle protecteur de la lutéine et la zéaxanthine sur la DMLA. Dans l'étude de l'AREDS, le risque de développer une DMLA est inversement proportionnel aux apports alimentaires en lutéine et zéaxanthine (**Age-Related Eye Disease Study Research Group 2007**). De la même façon l'étude POLA a montré une association positive entre les taux de zéaxanthine plasmatique et une diminution du risque de maculopathie liée à l'âge. En revanche elle montre également une corrélation positive entre le risque de maculopathie liée à l'âge et les taux plasmatiques de lutéine seule ou associée à la zéaxanthine (**Delcourt et al. 2006**). Une étude plus récente a montré une diminution de risque de développer une DMLA (**Flood et al. 2002**). En revanche d'autres études n'ont pas mis en évidence d'association entre caroténoïdes et DMLA (**Sin et al. 2012**). Plus récemment, une méta-analyse a tenté d'évaluer le lien entre la consommation de caroténoïdes et le risque de DMLA. Les résultats suggèrent que la lutéine et la zéaxanthine apportées par l'alimentation ne sont pas significativement associées à un risque réduit de DMLA au stade précoce, en revanche une augmentation de leur apport par supplémentation semble avoir un effet protecteur contre la DMLA (**Ma et al. 2012**).

Antioxydants et zinc

Comme nous l'avons développé dans la « 2.1.1.2.2. Les systèmes antioxydants », les ERO peuvent être neutralisés par des enzymes ou molécules antioxydants. Il semble que le stress oxydatif tient une place importante dans l'apparition et la progression de la DMLA de par l'exposition continue de la rétine à la lumière et sa teneur importante en acides gras polyinsaturés. Il apparaît alors plausible que l'apport alimentaire en antioxydants puisse avoir un impact sur la pathologie. Récemment l'étude Rotterdam a mis en évidence une association entre la consommation de ces molécules antioxydantes et la réduction du risque de DMLA précoce chez des patients génétiquement à risque (**Ho et al. 2011**). Aussi, l'étude AREDS a montré une association significative entre l'apport d'un mélange alimentaire d'antioxydants (vitamine E et bêta-carotène) et de zinc, et la diminution du risque de DMLA exsudative (**Age-**

Related Eye Disease Study Research Group 2001). Le risque à 5 ans d'évoluer vers une DMLA exsudative est diminué de 25% dans les groupes de patients prenant une supplémentation en antioxydants et en zinc. En revanche dans le rapport n°22 de l'AREDS, il n'est pas montré d'association significative avec d'autres antioxydants étudiés (vitamine A, rétinol, β carotène, α carotène, β cryptoxanthine, lycopène, vitamine C, α tocophérol) ; et la consommation seule d'antioxydants n'est pas associée à une diminution du risque de DMLA (**Age-Related Eye Disease Study Research Group 2007**).

3. Les modèles animaux associés au vieillissement et aux rétinopathies liées à l'âge

Il n'est pas évident de développer des modèles animaux qui puissent mimer la totalité de la pathogénèse de la DMLA notamment parce que la région maculaire présente chez l'Homme et le primate n'existe pas chez les rongeurs. Malgré tout, les modèles de souris sauvages et transgéniques restent les plus couramment utilisés.

3.1. L'exposition des animaux aux facteurs de risque environnementaux

De nombreuses études *in vivo* associent des facteurs environnementaux et/ou nutritionnels à la DMLA. La plupart des études expérimentent les effets de facteurs connus pour être à risque comme des régimes plus ou moins riches en lipides ou sucre, l'exposition à la lumière bleue ou à la fumée de cigarette.

En effet, il a été montré que des souris et des lapins soumis à un régime alimentaire riche en cholestérol présentent des dépôts lipidiques au niveau de la membrane de Bruch (**Dithmar et al. 2001; Dasari et al. 2011**). D'autres études montrent que l'exposition de souris ou de rats à la lumière bleue (à une longueur d'onde de 488 nm) induit des altérations de la rétine semblables à ce qu'on observe dans la DMLA chez l'Homme (**Marc et al. 2008; Rutar et al. 2010**). En 2006, Espinosa-Heidmann *et al.* ont montré que l'exposition de souris à la fumée de cigarette associé à un régime riche en lipide induit une augmentation des dépôts laminaires au niveau de la membrane de Bruch (**Espinosa-Heidmann et al. 2006**). En 2008, Fujihara et al. ont montré que l'exposition de souris à la fumée de cigarette 5 fois par semaine durant 6 mois induit la formation de 8-oxo-7,8-dihydro-2,9-désoxyguanosine, un dérivé oxydé de la désoxyguanosine (**Fujihara et al. 2008**). D'autres études associent plusieurs facteurs. En 2002, Cousins *et al.* ont montré une augmentation des dépôts sous l'EPR chez des souris C57BL/6 exposées à un régime hyperlipidique associé à une exposition à la lumière bleue plutôt que soumise un régime hyperlipidique seul (**Cousins et al. 2002**). Ainsi, il semblerait

que certains facteurs induisent des altérations rétinienne semblables à ce qu'on observe au cours du vieillissement et chez des patients atteints de DMLA.

3.2. Les souris génétiquement modifiées

La majorité des modèles murins génétiquement modifiés sont invalidés pour un des gènes déjà connus pour avoir un rôle dans la pathogenèse de la DMLA (**Rakoczy et al. 2006**).

Ainsi les souris vieillissantes invalidées pour les gènes *Cfh*, *Ccl2*, *Ccr2*, *Cx1cr3*, *Sod1* et *Sod2* présentent une multitude d'anomalies observées chez l'Homme au cours de la DMLA atrophique. En effet, ces souris présentent des anomalies biochimiques et structurales de la membrane de Bruch (épaississement, accumulation débris, dépôts similaires à des druses), parfois une désorganisation des segments externes des photorécepteurs (désorganisés entre eux et mal alignés avec les cellules de l'EPR) et des organites dans l'EPR (perte de la polarisation basolatérale), une diminution de la fonction visuelle, une dégénérescence des photorécepteurs et dans certains cas, une néovascularisation (pour les souris *CFH^{-/-}*, *SOD^{-/-}*) (**Ambati et al. 2003; Coffey et al. 2007; Combadiere et al. 2007**). Cependant, d'autres souris génétiquement modifiées présentent ces caractéristiques. En 2000, une étude a montré que les souris invalidées pour le gène ApoE (*ApoE^{-/-}*) développent un phénotype hypercholestérolémique et présentent, au bout de quelques mois, une accumulation de dépôt au niveau de la membrane de Bruch (**Dithmar et al. 2000**). Plus récemment, il a été montré que des souris exprimant l'un des trois allèles du gène ApoE (Apo-E2, Apo-E3 ou Apo-E4) et soumises à un régime hypercholestérolémique présentaient, selon l'allèle exprimé, des anomalies plus ou moins importantes habituellement observées chez des patients atteints de DMLA atrophique (**Malek et al. 2005**). De plus, environ 20% des animaux ont développé une néovascularisation rétinienne.

3.3. La souris ApoB₁₀₀, LDLR^{-/-} : modèle animal vieillissement de l'œil Humain

Cette souris est invalidée pour le gène *Ldlr* et exprime exclusivement l'apolipoprotéine B100 humaine.

3.3.1. La construction du modèle ApoB₁₀₀,LDLR^{-/-}

Ce modèle murin a été créé en 1998 par le croisement d'une souris invalidée pour le gène *Ldlr* (*Ldlr^{-/-}*) avec une souris exprimant exclusivement une des deux forme de l'apoprotéine b (*ApoB₁₀₀*) (**Powell-Braxton et al. 1998**).

En 1996, Young et son équipe ont créé une souris transgénique exprimant uniquement une forme du gène *Apob* (Farese et al. 1996). Chez l'Homme et la souris, il existe deux formes d'apolipoprotéine B : l'apolipoprotéine B100 (APOB100) et l'apolipoprotéine B48 (APOB48) ayant 48 % l'homologie avec l'APOB100. Ces deux protéines sont issues du même gène cependant dans un cas le gène complet est transcrit en ARNm et aboutie à la formation de la protéine APOB100 ; et dans l'autre cas l'épissage alternatif engendre la formation d'un codon « stop » et conduit à la formation de la forme APOB48. Ces apolipoprotéines B ont un rôle important dans le métabolisme des lipoprotéines. En effet, chez l'homme, l'APOB48, exprimée par les entérocytes, participe à la formation des chylomicrons tandis que l'APOB100, exprimée par le foie, participe à la synthèse des VLDL. Ainsi l'APOB48 est présente à la surface des chylomicrons tandis que l'APOB100 est exprimée à la surface des VLDL, IDL et LDL. En plus de son rôle dans le maintien de la structure des lipoprotéines, l'APOB100 lie le LDLR (Low Density Lipoprotein Receptor) permettant la capture des LDL par les tissus contrairement à l'APOB48 qui ne possède pas les domaines de liaisons (situés en C-terminal de l'APOB100). Chez la souris les deux formes d'*Apob* sont exprimées dans le foie.

Les souris transgéniques *Apob100* ont été créées par la technique classique de transgénèse ciblée c'est à dire par recombinaison homologue. Le but étant de créer une souris qui exprime seulement la forme 100 du gène *Apob*, la première étape vise à créer un plasmide contenant une partie du gène *Apob* (ici l'exon 26) dans laquelle une base est mutée. La transcription de l'ADN muté en ARNm aboutira à l'apparition d'un codon « non-stop » et donc à la formation de la forme *Apob100*. Le plasmide contient également deux gènes possédant leur propre promoteur, la néomycine phosphotransférase qui confère une résistance aux antibiotiques tels que la néomycine et la généticine (G418) ; et la thymidine kinase du virus de l'herpès qui confère une sensibilité au Gancyclovir.

Le plasmide construit est alors intégré par électroporation dans des cellules souches embryonnaires (CSE) de la lignée AB1 (issue de blastocytes de souris agouties 129S7) (Figure 44). Les CSE dans lesquelles le transgène s'est intégré au génome sont sélectionnées par ajout, dans le milieu de culture, de néomycine et de gancyclovir. Après deux ou trois semaines, si le transgène s'est intégré correctement au génome alors les CSE sont résistantes aux antibiotiques. Elles sont alors injectées dans des blastocytes de souris C57BL/6 (noires) et ces derniers sont implantés l'utérus d'une femelle pseudo-gestante (Figure 44). Les souris chimères obtenues sont ensuite croisées avec des souris C57BL/6 (souris noires). Si les

cellules souches ont contribué au développement de la lignée germinale des souris chimères alors les petits sont agoutis. Le génotype des souris est déterminé par southern blot. Enfin les souris hétérozygotes, contenant un allèle muté pour le gène apob100 sont croisées entre elles pour obtenir des souris homozygotes exprimant exclusivement la forme Apob100.

Les souris exprimant exclusivement l'Apob100 présentent des modifications importantes du métabolisme des lipoprotéines. En effet, contrairement aux souris sauvages, les souris Apob100 présentent une forte concentration plasmatique de LDL riches en cholestérol. Elles présentent des taux de cholestérol et de triglycérides plasmatiques significativement plus élevés que chez les souris sauvages. Elles présentent également des lésions athérosclérotiques plus importantes que chez des souris sauvages lorsqu'elles sont soumises à un régime riche en lipides (**Purcell-Huynh *et al.* 1995**).

La souris invalidée pour le gène *Ldlr* fut créée en 1993 par l'équipe de Joachim Herz (**Ishibashi *et al.* 1993**). Comme pour la souris ApoB100, l'insertion du vecteur est contrôlée par recombinaison homologue. Le but de ces travaux était d'étudier le rôle de LDLR dans le métabolisme des lipides. Chez l'Homme, le récepteur aux LDL est une glycoprotéine ubiquitaire transmembranaire, calcium dépendant, induisant l'endocytose des LDL via la liaison de LDLR à l'APOB100 ou à l'APOE. La vésicule contenant les LDL fusionne avec les pré-lysosomes menant à la dégradation du LDL et donc à la libération des acides gras et du cholestérol dans la cellule. Cet apport entraîne la diminution de l'activité de l'hydroxyméthylglutaryl-Coenzyme A synthase et réductase, enzymes clés de la biosynthèse du cholestérol, et active l'acyl coenzyme A-cholesterol-acyltransférase qui estérifie le cholestérol en vue de son stockage. Dans le même temps, la synthèse de LDLR diminue afin d'éviter l'accumulation de cholestérol. Les souris invalidées pour le gène *Ldlr* présentent une augmentation du taux de LDL et IDL plasmatique. Ces résultats montrent que la voie du LDLR est donc à la fois un mécanisme d'apport et de régulation du cholestérol au sein de la cellule.

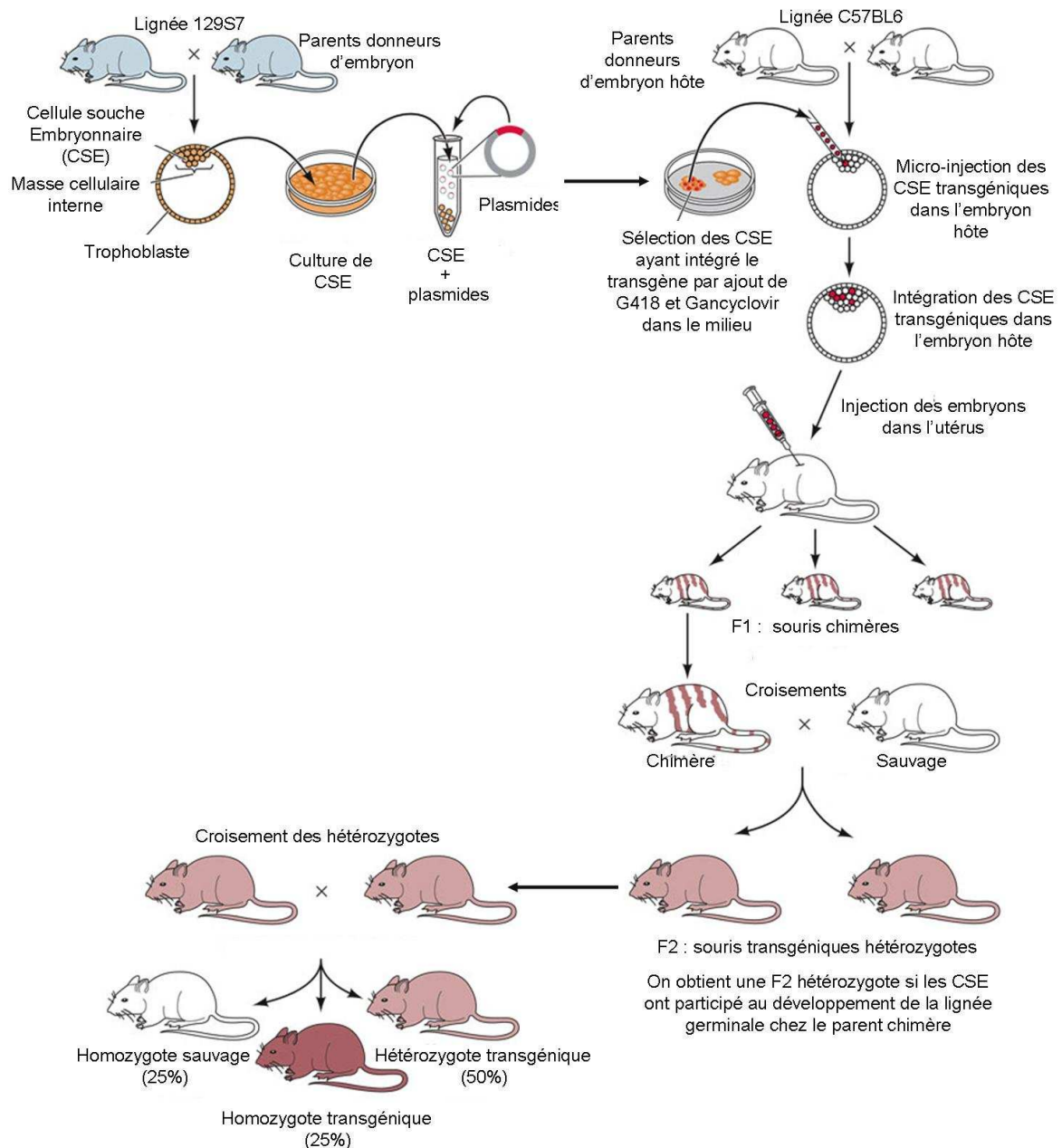


Figure 44 : Construction des souris transgéniques ApoB100 et LDLR^{-/-}.

3.3.2. Caractéristiques du modèle ApoB₁₀₀,LDLR^{-/-}

Récemment, notre équipe a identifié des altérations de la rétine chez les souris ApoB₁₀₀,LDLR^{-/-} vieillissantes. Ces souris présentent des accumulations d'esters de cholestérol au niveau de la rétine (Figure 45), une perte de la fonction visuelle (Figure 46) et des points autofluorescents au fond d'œil (Figure 47) ce qui fait de cette souris un modèle particulièrement pertinent pour l'étude du vieillissement de l'œil humain (**Bretillon et al. 2008**).

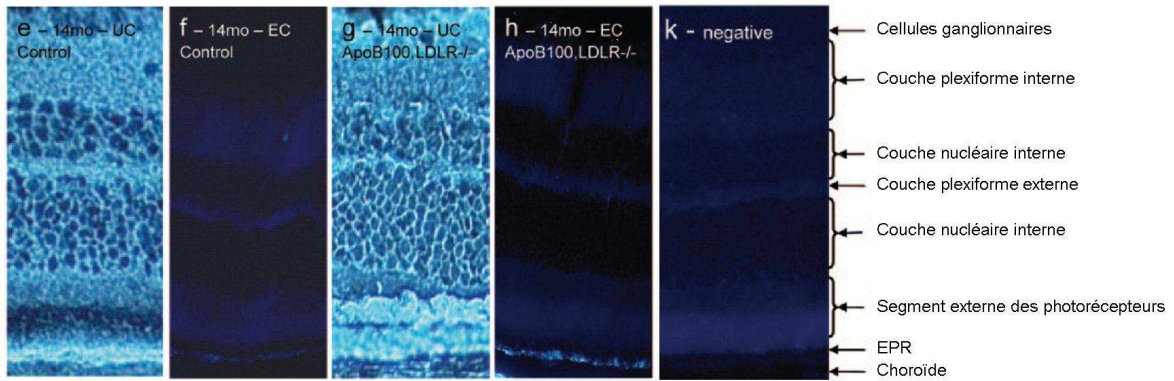


Figure 45 : Esters de cholestérol sur coupe d'œil de souris sauvages et ApoB₁₀₀,LDLR^{-/-} âgées de 14 mois. Le cholestérol libre est détecté chez les souris sauvages (e) et ApoB₁₀₀,LDLR^{-/-} (g). Les esters de cholestérol sont détectés sur les souris sauvages (f), souris apoB₁₀₀, LDLR^{-/-} témoins (h). D'après (Bretillon *et al.* 2008).

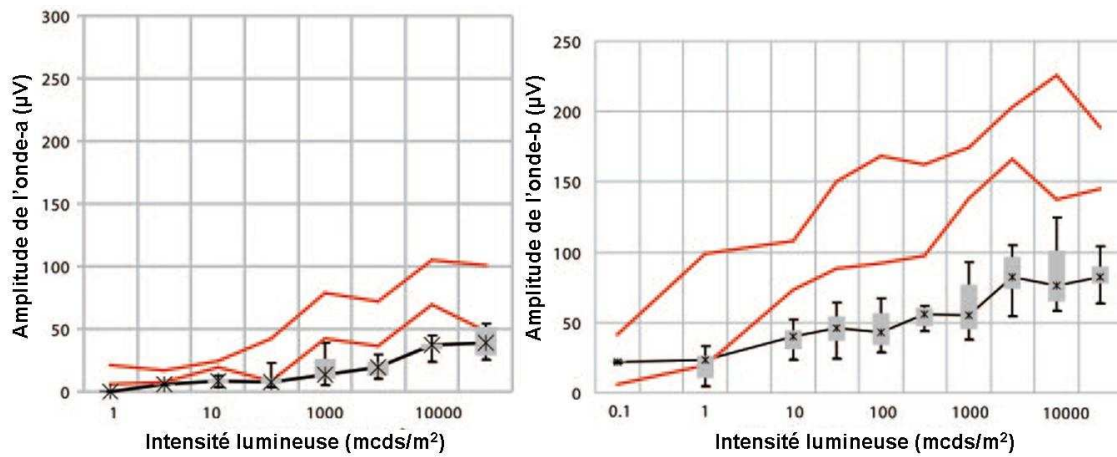


Figure 46 : ERG sur des sauvages et ApoB₁₀₀,LDLR^{-/-} âgées de 14 mois. En gris est représenté le tracé ERG des souris sauvages tandis que le tracé rouge représente l'intervalle de variation à 90% donné par les deux quantiles d'ordre 5% et 95% chez les souris ApoB₁₀₀,LDLR^{-/-}. D'après (Bretillon *et al.* 2008).

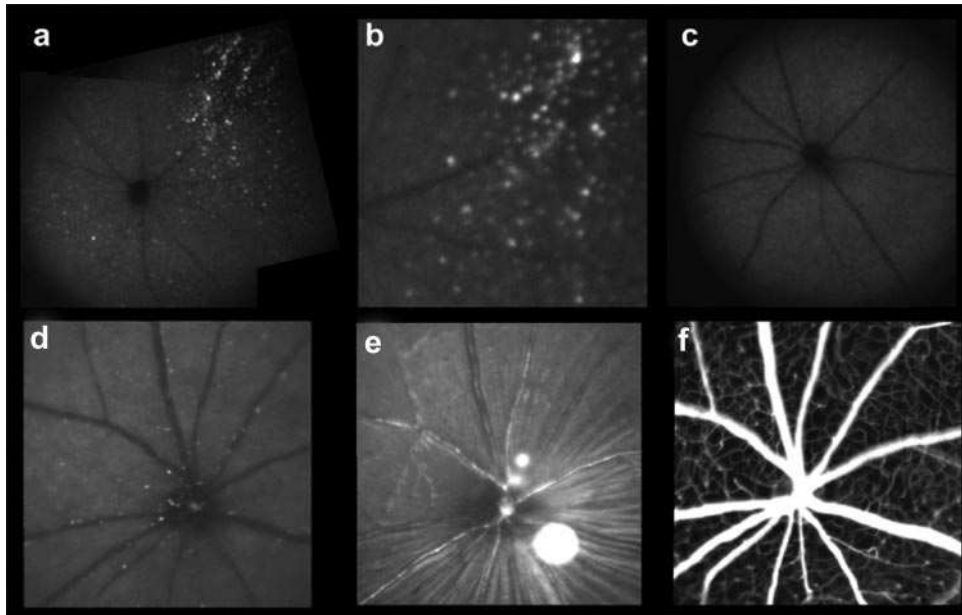


Figure 47 : Autofluorescence au fond d'œil et vascularisation de la rétine chez les souris ApoB₁₀₀,LDLR^{-/-} âgées de 14 mois.

L'autofluorescence au fond d'œil à été évalué chez les souris ApoB₁₀₀,LDLR^{-/-} (a et b) et chez les souris sauvages (c). Les cellules périvasculaires autoflorescentes (d) et la structure vasculaire à 514 nm (e) et après injection de fluorescéine à 488 nm (f) ont été analysées chez les souris ApoB₁₀₀,LDLR^{-/-} de 14 mois.

D'après (Bretillon *et al.* 2008).

Objectifs de la thèse

Comme nous l'avons décrit précédemment le vieillissement est un processus physiologique qui peut conduire au développement de pathologies dites liées à l'âge. Dans ces travaux de thèse, nous nous sommes intéressés à deux pathologies liées à l'âge qui sont les premières causes de cécité dans les pays industrialisés : la DMLA et la RD. Au cours de ces pathologies sont décrits des phénomènes communs comme le stress oxydatif ou la formation de PTG. Bien que de nombreuses études épidémiologiques aient établi un lien entre ces pathologies et des facteurs nutritionnels et environnementaux, le rôle concret de ces facteurs sur le développement de ces rétinopathies reste encore assez flou.

Dans ce contexte nous avons cherché à évaluer l'impact de facteurs nutritionnels et environnementaux sur le vieillissement rétinien de la souris. Nous avons choisi d'exposer des souris sauvages et des souris ApoB₁₀₀,LDLR^{-/-} à des conditions induisant des modifications biochimiques déjà décrit au cours du vieillissement et dans les rétinopathies liées à l'âge à savoir la formation d'ERO et/ou de PTG. Par les divers expériences effectuées, nous avons évalué l'impact de ces facteurs d'une part sur le vieillissement rétinien de façon générale et d'autre part sur le vieillissement rétinien de la souris ApoB₁₀₀,LDLR^{-/-}. En effet, comme nous l'avons évoqué précédemment, la souris ApoB₁₀₀,LDLR^{-/-}, modèle de vieillissement de l'œil humain, se situe à la charnière entre le vieillissement rétinien physiologique et la rétinopathie. Ce modèle est par conséquent pertinent pour définir si les altérations biochimiques induites par ces facteurs peuvent provoquer un état de vieillissement pathologique.

Dans une première expérience, nous avons testé les effets d'une exposition chronique à la lumière (source d'ERO) et d'une injection quotidienne de D-galactose (source de PTG) sur le vieillissement de souris sauvages et de souris ApoB₁₀₀,LDLR^{-/-}. Dans une seconde expérience nous avons testé les effets d'un régime diabétogène, source d'ERO, de PTG et d'une dyslipidémie, sur le vieillissement rétinien de souris sauvages et de souris ApoB₁₀₀,LDLR^{-/-}. Enfin dans une troisième expérience, nous avons abordé les facteurs nutritionnels et particulièrement les acides gras ω3 alimentaires dans une approche préventive du vieillissement rétinien.

Deuxième partie :
Évaluation de l'impact de facteurs
endogènes et/ou environnementaux sur le
vieillissement rétinien chez la souris
ApoB₁₀₀, LDLR^{-/-}

Problématique

Le vieillissement physiologique de la rétine se caractérise par une accumulation de cholestérol et d'esters de cholestérol au niveau de la membrane de Bruch. Ces dépôts s'amplifient avec l'âge et chez les patients atteints de DMLA (**Curcio et al. 2001**). Un facteur environnemental comme l'exposition à la lumière, et/ou un facteur nutritionnel comme un déséquilibre de la balance acides gras $\omega 6/\omega 3$ ou un régime hypercholestérolémique sont suspectés être impliqués dans le développement et/ou la progression de la DMLA (**Taylor et al. 1990; Cruickshanks et al. 1993; Seddon et al. 2003; Age-Related Eye Disease Study Research Group 2007; Delcourt et al. 2007; Chiu and Taylor 2011; Kishan et al. 2011**).

De nombreuses études *in vivo* ont montré que le D-galactose, source de produits terminaux de glycation (PTG), pouvait induire des altérations de la rétine neurale et de la membrane de Bruch semblables à ce qu'on observe au cours du vieillissement et dans la DMLA (**Song et al. 1999; Ho et al. 2003; Ida et al. 2004**). De plus, il est également bien établi *in vivo* et *in vitro* que la lumière, source d'espèces réactives de l'oxygène (ERO), peut engendrer des dommages cellulaires et aboutir à la dégénérescence des photorécepteurs (**Wiegand et al. 1983; Rozanowska et al. 1995; Demontis et al. 2002; Sparrow et al. 2002; Rodriguez and Fliesler 2009; Wielgus et al. 2010**).

Dans ce contexte nous avons cherché à savoir dans quelle mesure des facteurs endogènes et exogènes générant des ERO et des PTG sont susceptibles de :

- 1) participer au vieillissement de la rétine,
- 2) provoquer le basculement d'un vieillissement rétinien physiologique vers un phénotype proche d'une rétinopathie, assimilable à un état de DMLA, dans un contexte génétique promoteur du vieillissement de la rétine (ApoB₁₀₀,LDLR^{-/-}).

Pour répondre à ces questions, des souris sauvages et des souris ApoB₁₀₀,LDLR^{-/-} âgées de 9 mois ont reçu une injection quotidienne de D-galactose (source de PTG) et/ou ont été exposées à la lumière (source d'ERO) durant 2 mois. L'effet de ces facteurs a ensuite été évalué sur la fonction rétinienne, sur l'aspect du fond d'œil et du réseau vasculaire, sur l'organisation cellulaire et l'épaisseur de la rétine et sur l'expression des gènes *Vegf*, *Kdr* et *Flt1* dans la rétine neurale et le complexe EPR-choroïde (EPR-Ch).

Les résultats de ces travaux ont été soumis dans le journal « Investigative & Ophthalmology Visual Science ».

Loss of rod sensitivity, increased fundus autofluorescence and macrophage infiltration in the retina of mice injected with D-galactose and exposed to light

Emilie Simon^{1,2,3}, Bruno Pasquis^{1,2,3}, Niyazi Acar^{1,2,3}, Alain M. Bron^{1,2,3,4} Catherine P. Creuzot-Garcher^{1,2,3,4} and Lionel Bretillon^{1,2,3}

¹ INRA, UMR1324 Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation, Eye and Nutrition Research Group, F-21000 Dijon, France

² CNRS, UMR6265 Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation, Eye and Nutrition Research Group, F-21000 Dijon, France

³ Université de Bourgogne, Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation, Eye and Nutrition Research Group, F-21000 Dijon, France

⁴ Centre Hospitalier Universitaire, Department of Ophthalmology, F-21000 Dijon, France

Author to whom all correspondence and proofs should be sent: Lionel Bretillon, CSGA, Centre INRA, 17 rue Sully, BP86510, F-21065 Dijon cedex, phone: +33(0)380693121, fax: +33(0)380693223, email: lionel.bretillon@dijon.inra.fr

Running title:

Key-words: retina, aging, advanced glycation endproduct, oxidative stress, light, macrophage, microglia, electroretinography,

Purpose: Advanced-glycation endproducts (AGEs) and light exposure are aging factors of the retina, and possibly age-related macular degeneration. The ApoB₁₀₀,LDLR^{-/-} mouse is a model of aging of the human retina, and therefore suitable to characterize the events associated with retinal aging and retinopathies. We ought to evaluate the consequences of AGEs and light exposure on the phenotypic features associated with retinal aging in this mouse strain by comparison with control mouse.

Methods: Nine-month-old male control and ApoB₁₀₀,LDLR^{-/-} mice were either injected daily with saline, exposed to bright light (5500 lux) 3 times a week or injected daily with D-galactose + exposed to light for 8 weeks. Mice were submitted to scotopic single flash and Flicker electroretinography. Mice were examined by scanning laser ophthalmoscope for autofluorescence and angiography. Gene expression of VEGF and VEGF-receptors was quantified by RT-qPCR in retinas and RPE-choroid complexes. Sub-retinal deposits were characterized by labelling for esterified cholesterol, and immunolabelling for CD68, a marker for macrophages/microglia.

Results: AGEs and light exposure increased fundus autofluorescence, which was characterized as esterified cholesterol-rich CD68-positive cells, in both mouse strains. Both conditions of light exposure only and light exposure + D-galactose injections reduced rod sensitivity by 0.3-log units, and diminished b-wave amplitude of the electroretinogram. Neither retinal vasculature nor gene expression of VEGF and VEGF-receptors were modified by the experimental conditions.

Conclusion: Loss of rod sensitivity and macrophage infiltration/microglial activation in the retina are primary events in the aging process similarly in control and ApoB₁₀₀,LDLR^{-/-} mice, while vasculature remained unchanged.

In eye, aging is characterized by structural and biochemical alterations in Bruch's membrane (BrM) and retinal pigment epithelium (RPE)¹⁻³ and can lead to the development of Age-related Macular Degeneration (AMD), the most common cause of visual impairment in western countries. The mechanisms involved in these alterations are still unclear, but may likely result from, at least in part, the combined effects of Reactive Oxygen Species (ROS) and Advanced Glycation Endproducts (AGEs) which accumulate with age. Experimental studies have shown that chronic administration of a low dose of D-galactose (D-Gal) forms AGEs and induces changes that resemble aging⁴⁻⁷ and neurodegeneration in animals⁸, and senescence in neuronal cell cultures.⁹ In the eye, despite D-Gal induced structural changes of RPE-Bruch's membrane-choriocapillaris complex that are related to aging, it was not sufficient to promote AMD.¹⁰ Other experimental studies have reported the effects of light exposure on the production of ROS and subsequent cell damages in the retina.¹¹⁻¹³ In human, despite the difficulty to quantify the amount of light that reaches the retina, epidemiological studies have reported that light exposure increases the risk of AMD progression.¹⁴⁻¹⁶ Light exposure was associated with the recruitment of monocytes/macrophages and activation of microglia in the retina.¹⁷⁻²¹ In some¹⁷⁻²⁰ but not all²¹ studies, subretinal accumulation of monocyte/microglia was associated with photoreceptor degeneration. Meanwhile, there is ample evidence that microglia/macrophages are activated and accumulate subretinally in AMD.^{22,23} Cx3cr1 is a chemokine receptor that is expressed exclusively in retinal microglial cells.²⁴ Cx3cr1 knock-out mice exhibit subretinal accumulation of microglial cells/macrophages that triggers drusen-like deposits.²⁴ Similar pictures have been observed in ccl2 knock-out animals.^{25,26} Ccl2 (CC-cytokine ligand 2), also known as monocyte chemoattractant protein 1 (MCP1), is expressed at low levels in the retina

and RPE of young adult animals, but increases with age and oxidative stress.²² CCL2 was also found to be increased in exudative AMD eyes.²⁷ The exact role of CCL2 and its receptor CCR2 in the resolution of microglia/macrophage activation in AMD, and its neovascular complication has not been fully resolved.²² Thereby, these findings point out the difficulty and highlight the need for a better understanding of the duality of microglia/macrophages in promoting the tissue repair but also in amplifying inflammation and neuronal loss.²⁸

We previously showed that the ApoB₁₀₀,LDLR^{-/-} mouse is a murine model of aging of the human retina. Indeed these mice present the features of aging of the human retina, such as loss of rod and cone sensitivity, deposition of esterified cholesterol (EC) in Bruch's membrane (BrM) and fundus autofluorescence.²⁹ Despite these alterations, the ApoB₁₀₀,LDLR^{-/-} mouse did not show the main signs of AMD. For these reasons we suspect that endogenous and/or environmental pro-aging factors would favor the development of AMD in an aging-favorable background. Therefore, in this study we evaluated whether light exposure only or in combination with D-Gal injections would contribute to amplify the age-related changes in the retina of the ApoB₁₀₀,LDLR^{-/-} mouse, and promote vascular changes.

Methods

Mice

Animals were handled in accordance with the ARVO Statements for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research. French legal and institutional ethics committee review board approvals were obtained. B6129SF2/J wild type (WT) and transgenic ApoB₁₀₀,LDLR^{-/-} mice were purchased from Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME), mated, bred, fed with a standard low-fat diet (128S; Harlan- Teklad, Gannat, France) and maintained under controlled conditions of temperature (22 ± 1°C), hygrometry (55%–60%), and light (lights on 7 AM–7 PM, 18 lux) until the age of 9 months (animal breeding house; INRA, Dijon, France). Mice were given daily a subcutaneous injection of D-galactose (D-Gal) (50 mg/kg, corresponding to 100µL/30g body weight)¹⁰ or saline (100 µL/30 g body weight) for 8 weeks and/or not exposed to light (5500 lux 24 hours a day, 3 times a week) (Table 1).

Table 1: Experimental conditions.

Electroretinography

Scotopic electroretinograms (ERGs) were recorded according to previously described procedures.²⁹ Before ERG recordings, mice were dark-adapted overnight. All further procedures were carried out under dim red light ($\lambda > 650$ nm) at a constant room temperature of 25°C. The animals were anaesthetized with subcutaneous injection of ketamine (50 mg/kg body weight, Imalgène® 1000, Merial, Lyon, France) and xylazine (10 mg/kg body weight, Rompun® 2%, Bayer, Puteau, France) in a saline solution. Their pupils were dilated with 0.5% tropicamide (Ciba Vision Ophthalmics, Blagnac, France). After 10 min, the mice were positioned in a warming plate that maintained body temperature at 37°C and the electrodes were put in place.

The ERGs were recorded via a corneal electrode placed on each eye (thin gold wire with a 3 mm ring end), reference and ground electrodes (silver needle) placed on the forehead and tail, respectively. The mice were placed in a white sphere that mimics a Ganzfeld dome. The retina was stimulated by a photostimulator (model PS33 PLUS, Grass Telefactor, Astro-Med Inc., West Warwick, RI, USA) delivering light flashes to the eye through fiber optics. The response of the retina was amplified and analyzed with a computer-based control and recording unit (Physiotrace, Estaris Monitoring, Lille, France). Band-pass filter width was 1 to 300 Hz and band-pass filter cut-off frequencies were 0.1 and 3,000 Hz. Single-flash recordings were obtained from three different intensity stimulations: 1 Hz stimulation during 30 s at 9 mcd.s/m² and 10 stimulations at 2,500 mcd.s/m² and 28,000 mcd.s/m² with an interstimulus interval of 17 s. Flicker recordings were obtained from 19 different intensity stimulations reaching from 0.01 at 28,000 mcd.s/m² with a frequency at 10 Hz. The amplitudes and latencies were determined for each recording and were measured from the baseline (a-wave) or from the peak of the a-wave (b-wave).

Fundus Photography

In vivo black-and-white images of the fundus were obtained with the Heidelberg Retina Angiograph (HRA) (Heidelberg Engineering GmbH, Heidelberg, Germany), as described elsewhere.³⁰ The HRA is a confocal scanning laser ophthalmoscope (cSLO) using different lasers deflected by a mirror oscillating sinusoidally at a frequency up to 20 Hz. Reflectance images of the fundus were acquired using the infrared diode laser (810 nm), the argon green laser (514 nm) and the argon blue wavelength (488 nm). Variation of laser beam focus allowed visualization of the different layers of the fundus (i.e., retina versus Retinal Pigment Epithelium, RPE).

The size of the square scan field was set to 20°x20° and 10°x10°. Methylcellulose (Humigel®, Virbac, Carros, France) was applied on eyes to ensure good contact with optical lens and to keep the cornea hydrated during the entire procedure.

cSLO Angiography

The Retinal and choroidal vasculature changes were evaluated as described elsewhere after a sub cutaneous injection of 10% fluorescein sodium salt (46960, Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) (100 µL/30 g body weight) and 0.4% monopeak indocyanine green (ICG) (Infracyanine® 25 mg, SERB, Paris, France) (0.5 mL/30 g body weight).³⁰ The Retinal and choroidal vessels began filling approximately 30 s after administration. Although timing varied due to subcutaneous absorption, single pictures, and depth scan movies were taken in an average time of 5 to 10 min after dye administration. Pictures from retinal and choroidal vasculature were recorded with an argon blue laser (488 nm) for excitation during fluorescein angiography and an infrared diode laser (795 nm) for excitation during ICG angiography. Barrier filters at 500 and 810 nm provided the optimal cut-off at the respective peak fluorescence emission values for the two types of angiography. The size of the square scan field was set to 20°x 20° and 10°x10°.

Filipin histochemistry for detecting free cholesterol and esterified cholesterol (EC)

After 2 months, the mice were euthanized, enucleated and entire eyes (n = 3 animals in each group) were embedded within optimum cutting tissue (Tissue-Tek® OCT™, Villeneuve d'Ascq, France). Cholesterol was revealed in eye sections with filipin, a fluorescent probe that specifically binds the 3-hydroxy group of cholesterol, according

to previously described procedures.^{31,32} The filipin stain solution was prepared by dissolving 2.5 mg of solid filipin complex (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) in 1 mL of dimethylformamide and adding the solution to 50 mL of diphosphate buffer saline. Sections for determination of UC (unesterified cholesterol) were hydrated, incubated for 30 min in the filipin solution. Sections for determination of EC were processed as follows: native UC was eliminated by ethanol 70%, and native EC was then hydrolyzed with cholesterol esterase (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France), 1.65 U/mL in 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.4), for 3 h at 37°C. UC newly released by the hydrolysis of EC was stained with filipin, as described above. All sections were incubated 5 min in propidium iodide 0.1 µg/mL. The sections were viewed by epifluorescence microscopy (Excitation: 450-490 nm, barrier filter: 520 nm) (Nikon Eclipse E600 equipped with NIS-BR software, Nikon France, Champigny sur Marne, France).

Gene Expression

After 2 months, the mice (n=6-7 animals per groups) were euthanized and enucleated. The anterior segment of the eyes was removed after a circular section at the limbus. The neuroretina (NR) and retinal pigment epithelium/choroid complex (RPE-Ch) were separated and stored in RNA later[®] solution at -80°C until further mRNA extraction. mRNA from the NR and RPE-Ch were extracted using the RNeasy[®] Kit (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) according to the manufacturer's procedure and quantified using NanoDrop[®] ND-1000 spectrophotometer (Thermo Scientific, Illkirch, France). The expression of *Vegfa*, *Kdr* and *Flt1* was analyzed by TaqMan[®] RT-PCR as described previously.³³ In brief, RT was done with High capacity RNA-to-cDNA Master Mix[®] (Applied Biosystems,

Courtaboeuf, France) in a C1000 Thermal Cycler C1000[®] (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) using the following temperature program: 50 min at 37°C, 15 min at 70°C, and 5 min at 4°C. PCR were performed in 10 µL of PCR mix containing 5 µL of 2x TaqMan Fast Universal Master Mix[®] (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) and 5 µL of amplified cDNA (5 to 50 ng cDNA per reaction). The reaction was performed in custom 96-well FAST plates. PCR amplification was carried out with StepOne™ Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) with the following cycling parameters: 95°C for 20 s, followed by 40 repeats of PCR cycle of 95°C for 20 s, and 60°C for 10 s. Fluorescent signals were measured by the StepOne™ Real-Time PCR Systems, and the raw Ct (cycle threshold) values were exported into DataAssist software (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France). Relative expression was evaluated according to relative quantification ($2^{-\Delta\Delta Ct}$), using *Gadd45a*, *B2m* and *Gusb* genes as references genes and control group as calibrator for normalization.

Immunostaining

The eyes sections were fixed in 4% paraformaldehyde for 10 min, permeabilized in Triton-X 0.1% for 5 min, and incubated during 30 min in a blocking solution containing 3%-bovine serum albumin (BSA) (Sigma-Aldrich, Courtaboeuf, France). Then they were incubated 4 hours at room temperature with rat anti-mouse CD68 antibody at the 1:200 dilution (AbD Serotec, Colmar, France). After washing, eye sections were incubated 2 h at room temperature with donkey anti-rat immunoglobulin antibody conjugated to Alexa-594 (dilution 1:300, Invitrogen, Saint Aubin, France). Cell nuclei were labelled with 4'-6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France). The sections were viewed by

epifluorescence microscopy (Excitation: 450-490 nm, barrier filter: 520 nm for DAPI staining; Excitation: 510-560 nm, barrier filter: 590 nm for CD68 immunolabelling) (Nikon Eclipse E600 equipped with NIS-BR software, Nikon France, Champigny sur Marne, France).

Statistical analysis

Data from ERGs were statistically analyzed by the non-parametric Kruskal Wallis test using the SAS software (SAS Institute, Cary, USA). Differences were considered statistically significant at $p < 0.05$.

Results

Fundus evaluation and angiography

Autofluorescence imaging of the retina by *in vivo* cSLO at 488 nm is a suitable technique that, from at least a qualitative point of view, exemplifies the accumulation of fluorophores inside the retina.³⁰ No autofluorescent dot was observed by cSLO in WT CTR mice at 11 months of age. On the contrary, the fundi of ApoB₁₀₀,LDLR^{-/-} CTR mice showed autofluorescent spots accumulating sub-retinally (Fig. 1), which is in accordance with our previously published study.²⁹ Light and D-Gal+Light conditions triggered the deposition of fundus scattered autofluorescence in WT mice (Fig. 1). Increased fundus autofluorescence was observed in ApoB₁₀₀,LDLR^{-/-} mice submitted to Light and D-Gal+Light conditions compared to the ApoB₁₀₀,LDLR^{-/-} CTR group (Fig. 1).

Of note, neither the pattern of fundus autofluorescence nor the density of the autofluorescent spots appeared different in ApoB₁₀₀,LDLR^{-/-} mice and WT mice. No vascular alterations were observed by fluorescein and ICG angiography in any experimental group.

ERGs

The a-wave amplitude of the single flash scotopic ERG at 2,500 mcd.s/m², which corresponds to pure rod response at this light intensity, was significantly decreased in ApoB₁₀₀,LDLR^{-/-} mice from the Light and D-Gal+Light groups compared to ApoB₁₀₀,LDLR^{-/-} CTR mice (-35.8% and -52.4%, respectively) (Fig. 2). Meanwhile the a-wave latency at 2,500 mcd.s/m² significantly increased in ApoB₁₀₀,LDLR^{-/-} mice from the CTR, Light and D-Gal+Light groups by +22.6%, +14.2% and +24.8%, respectively, compared to WT mice from the corresponding groups. The a-wave

amplitudes and latencies were similar in all three WT groups. The b-wave amplitude at 2,500 mcd.s/m² was significantly decreased in ApoB₁₀₀,LDLR^{-/-} CTR, Light and D-Gal+Light mice by -32.5%, -43.3% and -46.4%, respectively, compared to WT mice from the corresponding groups. The decrease was significantly amplified in WT mice and ApoB₁₀₀,LDLR^{-/-} mice from the D-Gal+Light groups compared to WT CTR and ApoB₁₀₀,LDLR^{-/-} CTR groups (-26.6% in WT mice, -39.9% in ApoB₁₀₀,LDLR^{-/-} mice, respectively). Interestingly, the association of D-Gal injections and Light exposure (D-Gal+Light group) amplified the reduction of the a- and b-wave amplitude of the ERG observed in the Light groups in both strains of mice, although the difference between the Light exposed and D-Gal+Light exposed animals failed to reach significance.

Flicker ERG recordings reveal two peaks: the first peak gives rise to the light intensity value necessary to obtain the maximal response of the rods while the second one corresponds to the maximal response of the cones. The maximal response of the rods was obtained at 20 mcd.s/m² in WT CTR mice, whereas it was observed at 44 mcd.s/m² of flash intensity in ApoB₁₀₀,LDLR^{-/-} CTR mice and all groups of WT and ApoB₁₀₀,LDLR^{-/-} from the Light and D-Gal+Light groups (Fig. 3). This finding suggested that the conditions of Light and D-Gal+Light induced partial loss of rod sensitivity in all animals compared to WT mice from the CTR group. Interestingly, the Light and D-Gal+Light conditions did not impair rod sensitivity in ApoB₁₀₀,LDLR^{-/-} mice. The maximal response of cones was reached at the same flash intensity in all groups, highlighting no effect of the experimental conditions on this parameter.

Identification of the deposits in the NR

We aimed to give further information about the nature of the changes in the retina of the animals submitted to the experimental conditions. For that purpose, we first

performed a histological evaluation of the retina by analyzing the deposition of esterified cholesterol (EC), accounting that EC-rich deposits, at least in BrM, are hallmarks of aging.³⁴ Two types of EC deposits were observed in all animals but WT CTR mice. Small size EC deposits accumulated in ONL (Fig. 4a, c). Larger deposits contained EC (Fig. 4b, c, e, f) and pigment granules (Fig. 4b, c, f). These spherical EC deposits were localized in RPE (Fig. 4d), photoreceptor outer segment (POS) (Fig. 4b, c, e, f) and outer nuclear layer (ONL) (arrows, Fig. 4c) of ApoB₁₀₀,LDLR^{-/-} CTR mice and all animal groups exposed to pro-aging factors. The presence of the large deposits was often associated with reduced outer segment thickness (Fig. 4c, e, f), structural disorders such as folds (asterisk Fig. 4e and f) and possibly breakdown of the RPE (arrows in fig. 4b).

The presence of a nucleus in the spherical EC deposits (Fig. 4b) suggested that those could be cells. We speculated that these cells were from the microglia/monocyte-macrophage lineage. CD68 antigen is predominately expressed in monocytes/macrophages and activated microglia. The labelling with filipin revealed that the CD68⁺ cells were EC-rich, and contained pigment granules (Fig. 5). Small size CD68⁺ cells (Fig.5b) were detected in INL (arrow in Fig. 5c). Interestingly, pigmented (filled arrow in Fig.6a) and non-pigmented (open arrow in Fig. 6a) CD68⁺ cells were found only in the POS layer. The large CD68⁺ cells were localized prominently in POS (Fig. 7). No CD68-positive (CD68⁺) cell was found in WT CTR mice, on the contrary to ApoB₁₀₀,LDLR^{-/-} CTR and all animals exposed to the pro-aging factors.

Gene Expression

The expression of *Vegf* and its receptors *Flt1* and *Kdr* in the neurosensory retina of WT and ApoB₁₀₀,LDLR^{-/-} from the Light+D-Gal groups showed a slight increase compared to the corresponding CTR groups but the differences failed to reach significance (Figure 8). The expression of these genes was not modified in RPE-Ch (data not shown).

Discussion

The ApoB₁₀₀,LDLR^{-/-} mouse is a model of aging of the retina with induction of inflammatory processes

The results of this study confirmed our previous data which suggested that the ApoB₁₀₀,LDLR^{-/-} fed on a standard chow diet was a murine model of aging of the human retina.²⁹ Indeed, in addition to the reduced b-wave amplitude of the single flash ERG, we reported an increase in a-wave latency and loss of rod sensitivity in ApoB₁₀₀,LDLR^{-/-} mice compared to wild type animals. Thanks to 488 nm-imaging of the retina by cSLO and fluorescence microscopy, we are able to suggest that the autofluorescent spots seen by cSLO were the CD68⁺/EC-rich deposits observed in retinal sections.

The spherical CD68⁺-deposits containing EC were observed in ApoB₁₀₀,LDLR^{-/-} mice exclusively in BrM, RPE, and outer retina (POS and ONL). Since CD68 is predominately expressed in monocytes/macrophages and activated microglia, the presence of CD68⁺ cells in the retina suggested an inflammatory process in the retina of ApoB₁₀₀,LDLR^{-/-} mice, as previously reported in mice invalidated for receptors or ligands involved in monocyte/macrophage and/or microglia activation: Ccl2^{-/-}^{25,26}, Ccr2^{-/-}²⁶, and Cx3cr1^{-/-}²⁴, and Ccl2^{-/-},Cx3cr1^{-/-} mice.³⁵ To our knowledge, our work is the first one to report the induction of inflammatory processes in a murine model of aging of the retina, independently from the engineering of the chemokine pathway, or any modification of the dietary or environmental conditions.

Light exposure and advanced glycation end products promote aging of the retina

The exposition of WT and ApoB₁₀₀,LDLR^{-/-} mice to environmental (light) and endogenous (D-gal) pro-aging factors increased the alterations occurring during physiological aging of the eye. Indeed, two months after the exposition to the pro-aging conditions (Light and D-Gal+Light), the mice presented a loss of retinal functionality. Of note, in both strains of mice the combination of D-Gal injection and light exposure impaired the a-wave and b-wave amplitude of the single flash scotopic ERG response in a greater level of magnitude than light exposure only. Meanwhile, the sensitivity of rods to light stimulus was lowered in WT animals submitted to D-Gal injections and D-Gal+Light conditions compared to WT CTR mice, and reached the value observed in the three groups of ApoB₁₀₀,LDLR^{-/-} mice. These findings surmise the usefulness of using both single flash ERG and Flicker ERG as tools to, respectively, quantitatively and qualitatively record the modifications of the retinal functionality. Accordingly, we have been able to suggest the value of rod sensitivity as a marker for retinal aging (ApoB₁₀₀,LDLR^{-/-} vs WT mice data) and for the effects of the pro-aging factors in wild-type animals only. In addition, a- and b-wave amplitudes of the single flash scotopic ERG can be used to quantify the reduction of the response of the neurosensory retina.

CD68 is a marker of active phagocytosis that is expressed in macrophages³⁶ and activated microglia.^{20,37} CD68⁺-EC rich-cells were found in the photoreceptor layer, ONL and INL in ApoB₁₀₀,LDLR^{-/-} CTR mice and all groups exposed to the pro-aging factors. We can therefore demonstrate the presence of activated microglial cells and/or the infiltration of monocytes/macrophages from the bloodstream. At present

time of our knowledge, we cannot distinguish between both cell types. Nevertheless, we suggest that the exposition of the animals to pro-aging conditions activated both cell types. On the one hand, the localization of pigment-free CD68⁺-cells in photoreceptor layer, ONL and INL favours the identification of activated microglia. On the other hand, the presence in RPE and photoreceptor layer of CD68⁺-EC-rich cells that contained also melanin suggested that these cells were macrophages from the bloodstream. These macrophages may have phagocytized damaged RPE cells and part of the EC-rich BrM before entering the neurosensory retina. The role of inflammation has been prominently implicated in aging of the retina and the pathogenesis of AMD.^{38,39} Microglial cells, strictly limited to the INL layer⁴⁰, are the immune cells in the retina. In physiological conditions they display an inactive phenotype but participate in maintaining the retinal homeostasis by releasing neuroprotective and anti-inflammatory factors, such as cytokines, chemokines, neurotrophic factors, and neurotransmitters. Studies showed that under conditions of advanced age and photoreceptor injury, retinal quiescent stellate-shape microglial cells are activated into large ameboid bodies.^{21,41,42} Then, they proliferate and translocate into the outer retina in which they phagocytize cellular debris and secrete pro-inflammatory cytokines and chemokines, as well as neurotoxins.⁴³ Histological analysis of AMD retinas has depicted the presence of activated microglia in the macular lesions.⁴⁴ The hypothesis of the infiltration of monocyte/macrophages in the retina is also supported by the presence of CD68⁺ cells containing melanin in photoreceptor layer and possibly disorder and break-down of the RPE near these cells. We suppose that these cells are involved in the process of tissue repair by engulfing apoptotic RPE cells, photoreceptors, and lipids deposits in BrM. Macrophages have been also histologically demonstrated near AMD lesions,

including in areas of BrM breakdown, RPE atrophy, and choroidal neovascularisation.⁴⁵ Moreover, studies showing increased oxidized lipoprotein levels with age in normal eyes and AMD eyes suggest that macrophages seen in AMD might serve to ingest oxidized low-density lipoprotein that accumulate with age.⁴⁶

Different mechanisms, including the increase of oxidative stress and AGEs formation have been proposed to explain the effects of Light and D-gal.^{5,7,8,47} On the contrary to D-glucose, D-galactose entry in cells is not insulino-dependent and its transport is facilitated by the transporters GLUT1 and GLUT2.⁴⁸ In cell, it is normally metabolized by D-galactokinase and galactose-1-phosphate uridylyltransferase to form glucose-1-phosphate. In over-supply, one part of D-gal is catabolized by alternate pathways to form galactitol.^{49,50} However, galactitol is not degraded and accumulates in cells, leading to osmotic stress, production of ROS, unfolded protein response (UPR), and apoptosis.^{5,49-53} Moreover, the increase of D-gal levels in cells induces a runaway of glycolysis and therefore an increase in by-products such as pyruvate and acetyl-CoA that are not only cholesterol and fatty acid precursors but also enter Krebs cycle, which is a major source of ROS. The photoreceptors particularly rich in mitochondria and long chain polyunsaturated fatty acids, such as the docosahexaenoic acid (DHA), render the retina sensitive to the deleterious effects of light photons. Indeed the oxidation of the polyunsaturated fatty acids by ROS generates lipid peroxides such as malondialdehyde and hydroxyalkenals⁵⁴⁻⁵⁷ and protein adducts.^{58,59} Thus we postulate that the progressive accumulation products from the oxidative stress and non-enzymatic glycation of proteins during the exposition to pro-aging factors may have increased the genesis of these end-products in RPE and subsequent local inflammation.²³

Interestingly, in a genetic context of aging of the retina, the combination of environmental and/or endogenous factors leading to oxidative stress and AGEs promoted inflammation in the retina but was not sufficient for trigger vascular abnormalities that are hallmarks of age-related retinopathies such as neovascularization in AMD. Our results support the role of activated microglia and/or macrophages in aging of the retina. Further works are warranted to evaluate whether impairing microglial activation and macrophage infiltration may amplify the aging processes in the retina and participate to vascular changes.

Acknowledgements

This work was supported by Laboratoires Horus Pharma (Saint Laurent du Var, France) and Conseil Régional de Bourgogne (Dijon, France) for the funding of the PhD thesis of ES and experimental trial.

References

- ¹ Beatty S, Koh H, Phil M, Henson D and Boulton M. The role of oxidative stress in the pathogenesis of age-related macular degeneration. *Surv Ophthalmol* 2000;45:115-134.
- ² Handa JT, Verzijl N, Matsunaga H et al. Increase in the advanced glycation end product pentosidine in Bruch's membrane with age. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999;40:775-779.
- ³ Glenn JV, Mahaffy H, Wu K et al. Advanced glycation end product (AGE) accumulation on Bruch's membrane: links to age-related RPE dysfunction. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009;50:441-451.
- ⁴ Ho SC, Liu JH and Wu RY. Establishment of the mimetic aging effect in mice caused by D-galactose. *Biogerontology* 2003;4:15-18.
- ⁵ Song X, Bao M, Li D and Li YM. Advanced glycation in D-galactose induced mouse aging model. *Mech Ageing Dev* 1999;108:239-251.
- ⁶ Wei H, Li L, Song Q et al. Behavioural study of the D-galactose induced aging model in C57BL/6J mice. *Behav Brain Res* 2005;157:245-251.
- ⁷ Cui X, Wang L, Zuo P et al. D-galactose-caused life shortening in *Drosophila melanogaster* and *Musca domestica* is associated with oxidative stress. *Biogerontology* 2004;5:317-325.
- ⁸ Zhang Q, Li X, Cui X and Zuo P. D-galactose injured neurogenesis in the hippocampus of adult mice. *Neurol Res* 2005;27:552-556.
- ⁹ Cui X, Li W and Zhang B. [Studies on cell senescence induced by D-galactose in cultured neurons and fibroblasts]. *Zhongguo Ying Yong Sheng Li Xue Za Zhi* 1997;13:131-133.

- ¹⁰ Ida H, Ishibashi K, Reiser K, Hjelmeland LM and Handa JT. Ultrastructural aging of the RPE-Bruch's membrane-choriocapillaris complex in the D-galactose-treated mouse. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45:2348-2354.
- ¹¹ Demontis GC, Longoni B and Marchiafava PL. Molecular steps involved in light-induced oxidative damage to retinal rods. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002;43:2421-2427.
- ¹² Kayatz P, Heimann K and Schraermeyer U. Ultrastructural localization of light-induced lipid peroxides in the rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999;40:2314-2321.
- ¹³ Wiegand RD, Giusto NM, Rapp LM and Anderson RE. Evidence for rod outer segment lipid peroxidation following constant illumination of the rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1983;24:1433-1435.
- ¹⁴ Cruickshanks KJ, Klein R and Klein BE. Sunlight and age-related macular degeneration. The Beaver Dam Eye Study. *Arch Ophthalmol* 1993;111:514-518.
- ¹⁵ Taylor HR, Munoz B, West S et al. Visible light and risk of age-related macular degeneration. *Trans Am Ophthalmol Soc* 1990;88:163-173; discussion 173-168.
- ¹⁶ Fletcher AE, Bentham GC, Agnew M et al. Sunlight exposure, antioxidants, and age-related macular degeneration. *Arch Ophthalmol* 2008;126:1396-1403.
- ¹⁷ Rutar M, Natoli R, Kozulin P et al. Analysis of complement expression in light-induced retinal degeneration: synthesis and deposition of C3 by microglia/macrophages is associated with focal photoreceptor degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011;52:5347-5358.
- ¹⁸ Rutar M, Natoli R, Valter K and Provis JM. Early Focal Expression of the Chemokine Ccl2 by Müller Cells during Exposure to Damage-Inducing Bright Continuous Light. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011;52:2379-2388.

- ¹⁹ Rutar M, Provis JM and Valter K. Brief exposure to damaging light causes focal recruitment of macrophages, and long-term destabilization of photoreceptors in the albino rat retina. *Curr Eye Res* 2010;35:631-643.
- ²⁰ Santos AM, Martín-Oliva D, Ferrer-Martín RM et al. Microglial response to light-induced photoreceptor degeneration in the mouse retina. *J Comp Neurol* 2010;518:477-492.
- ²¹ Ng TF and Streilein JW. Light-induced migration of retinal microglia into the subretinal space. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001;42:3301-3310.
- ²² Raoul W, Auvynet C, Camelo S et al. CCL2/CCR2 and CX3CL1/CX3CR1 chemokine axes and their possible involvement in age-related macular degeneration. *J Neuroinflammation* 2010;7:87.
- ²³ Buschini E, Piras A, Nuzzi R and Vercelli A. Age related macular degeneration and drusen: Neuroinflammation in the retina. *Prog Neurobiol* 2011;95:14-25.
- ²⁴ Combadiere C, Feumi C, Raoul W et al. CX3CR1-dependent subretinal microglia cell accumulation is associated with cardinal features of age-related macular degeneration. *J Clin Invest* 2007;117:2920-2928.
- ²⁵ Luhmann UF, Robbie S, Munro PM et al. The drusenlike phenotype in aging Ccl2-knockout mice is caused by an accelerated accumulation of swollen autofluorescent subretinal macrophages. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009;50:5934-5943.
- ²⁶ Chen M, Forrester JV and Xu H. Dysregulation in Retinal Para-Inflammation and Age-Related Retinal Degeneration in CCL2 or CCR2 Deficient Mice. *PLoS ONE* 2011;6:e22818.
- ²⁷ Jonas JB, Tao Y, Neumaier M and Findeisen P. Monocyte chemoattractant protein 1, intercellular adhesion molecule 1, and vascular cell adhesion molecule 1 in exudative age-related macular degeneration. *Arch Ophthalmol* 2010;128:1281-1286.

- ²⁸ Karlstetter M, Ebert S and Langmann T. Microglia in the healthy and degenerating retina: insights from novel mouse models. *Immunobiology* 2010;215:685-691.
- ²⁹ Bretillon L, Acar N, Seeliger MW et al. ApoB100,LDLR-/- mice exhibit reduced electroretinographic response and cholesteryl esters deposits in the retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008;49:1307-1314.
- ³⁰ Seeliger MW, Beck SC, Pereyra-Munoz N et al. In vivo confocal imaging of the retina in animal models using scanning laser ophthalmoscopy. *Vision Res* 2005;45:3512-3519.
- ³¹ Curcio CA, Presley JB, Malek G et al. Esterified and unesterified cholesterol in drusen and basal deposits of eyes with age-related maculopathy. *Exp Eye Res* 2005;81:731-741.
- ³² Dithmar S, Sharara NA, Curcio CA et al. Murine high-fat diet and laser photochemical model of basal deposits in Bruch membrane. *Arch Ophthalmol* 2001;119:1643-1649.
- ³³ Wacharapluesadee S, Sutipanya J, Damrongwatanapokin S et al. Development of a TaqMan real-time RT-PCR assay for the detection of rabies virus. *J Virol Methods* 2008;151:317-320.
- ³⁴ Curcio C, Johnson M, Rudolf M and Huang J. The oil spill in ageing Bruch membrane. *Br J Ophthalmol* 2011;95:1638-1645.
- ³⁵ Tuo J, Bojanowski C, Zhou M et al. Murine ccl2/cx3cr1 deficiency results in retinal lesions mimicking human age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007;48:3827-3836.
- ³⁶ Ramprasad MP, Terpstra V, Kondratenko N, Quehenberger O and Steinberg D. Cell surface expression of mouse macrosialin and human CD68 and their role as

macrophage receptors for oxidized low density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:14833-14838.

³⁷ Santos AM, Calvente R, Tassi M et al. Embryonic and postnatal development of microglial cells in the mouse retina. *J Comp Neurol* 2008;506:224-239.

³⁸ Patel M and Chan CC. Immunopathological aspects of age-related macular degeneration. *Semin Immunopathol* 2008;30:97-110.

³⁹ Rodrigues EB. Inflammation in dry age-related macular degeneration. *Ophthalmologica* 2007;221:143-152.

⁴⁰ Lee JE, Liang KJ, Fariss RN and Wong WT. Ex vivo dynamic imaging of retinal microglia using time-lapse confocal microscopy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008;49:4169-4176.

⁴¹ Xu H, Chen M, Manivannan A, Lois N and Forrester JV. Age-dependent accumulation of lipofuscin in perivascular and subretinal microglia in experimental mice. *Aging Cell* 2008;7:58-68.

⁴² Xu H, Chen M and Forrester JV. Para-inflammation in the aging retina. *Progr Retin Eye Res* 2009;28:348-368.

⁴³ Langmann T. Microglia activation in retinal degeneration. *J Leukoc Biol* 2007;81:1345-1351.

⁴⁴ Gupta N, Brown KE and Milam AH. Activated microglia in human retinitis pigmentosa, late-onset retinal degeneration, and age-related macular degeneration. *Exp Eye Res* 2003;76:463-471.

⁴⁵ Penfold PL, Madigan MC, Gillies MC and Provis JM. Immunological and aetiological aspects of macular degeneration. *Progr Retin Eye Res* 2001;20:385-414.

- ⁴⁶ Suzuki M, Kamei M, Itabe H et al. Oxidized phospholipids in the macula increase with age and in eyes with age-related macular degeneration. *Mol Vis* 2007;13:772-778.
- ⁴⁷ Tian J, Ishibashi K, Ishibashi K et al. Advanced glycation endproduct-induced aging of the retinal pigment epithelium and choroid: a comprehensive transcriptional response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:11846-11851.
- ⁴⁸ Leturque A, Brot-Laroche E and Le Gall M. GLUT2 mutations, translocation, and receptor function in diet sugar managing. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2009;296:E985-992.
- ⁴⁹ Murata M, Ohta N, Sakurai S et al. The role of aldose reductase in sugar cataract formation: aldose reductase plays a key role in lens epithelial cell death (apoptosis). *Chem Biol Interact* 2001;130-132:617-625.
- ⁵⁰ Takamura Y, Kubo E, Tsuzuki S and Akagi Y. Apoptotic cell death in the lens epithelium of rat sugar cataract. *Exp Eye Res* 2003;77:51-57.
- ⁵¹ Mulhern ML, Madson CJ, Danford A et al. The unfolded protein response in lens epithelial cells from galactosemic rat lenses. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006;47:3951-3959.
- ⁵² Monnier VM and Cerami A. Nonenzymatic browning in vivo: possible process for aging of long-lived proteins. *Science* 1981;211:491-493.
- ⁵³ Hsieh HM, Wu WM and Hu ML. Soy isoflavones attenuate oxidative stress and improve parameters related to aging and Alzheimer's disease in C57BL/6J mice treated with D-galactose. *Food Chem Toxicol* 2009;47:625-632.
- ⁵⁴ Ethen CM, Reilly C, Feng X, Olsen TW and Ferrington DA. Age-related macular degeneration and retinal protein modification by 4-hydroxy-2-nonenal. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007;48:3469-3479.

- ⁵⁵ Kaemmerer E, Schutt F, Krohne TU, Holz FG and Kopitz J. Effects of lipid peroxidation-related protein modifications on RPE lysosomal functions and POS phagocytosis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007;48:1342-1347.
- ⁵⁶ Kopitz J, Holz FG, Kaemmerer E and Schutt F. Lipids and lipid peroxidation products in the pathogenesis of age-related macular degeneration. *Biochimie* 2004;86:825-831.
- ⁵⁷ Tanito M, Elliott MH, Kotake Y and Anderson RE. Protein modifications by 4-hydroxynonenal and 4-hydroxyhexenal in light-exposed rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005;46:3859-3868.
- ⁵⁸ Esterbauer H, Schaur RJ and Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med* 1991;11:81-128.
- ⁵⁹ Gu X, Meer SG, Miyagi M et al. Carboxyethylpyrrole protein adducts and autoantibodies, biomarkers for age-related macular degeneration. *J Biol Chem* 2003;278:42027-42035.

Tables

Table 1: Experimental conditions.

	Genotype		Experimental conditions		
	WT	ApoB ₁₀₀ ,LDLR ^{-/-}	D-Gal injection	Saline injection	Light exposure
Group	WT CTR (n=10)	ApoB ₁₀₀ ,LDLR ^{-/-} CTR (n=10)	-	+	-
	WT Light (n=10)	ApoB ₁₀₀ ,LDLR ^{-/-} Light (n=10)	-	+	+
	WT D-Gal+Light (n=10)	ApoB ₁₀₀ ,LDLR ^{-/-} D-Gal+Light (n=10)	+	-	+

Figure legends

Figure 1: Autofluorescence in WT and ApoB₁₀₀, LDLR^{-/-} mice observed by cSLO at 488nm. Bar 250µm

Figure 2: Scotopic single flash ERG response in WT (blue bars) and ApoB₁₀₀,LDLR^{-/-} mice (red bars) at 2500 mcd.s/m². Data are represented as means ± SD. * significantly different from the value in mice from the same strain in control conditions (CTR) at p<0.05. † significantly different from the value in WT mice submitted to the same experimental condition at p<0.05.

Figure 3: 10Hz Flicker ERG response in WT and ApoB₁₀₀, LDLR^{-/-}. Full lines represent the WT mice group whereas the dashed lines represent the ApoB₁₀₀,LDLR^{-/-} mice group.

Figure 4: Filipin staining on eye sections. WT CTR mice presented small EC-rich deposits in ONL (a). ApoB₁₀₀,LDLR^{-/-} and all mice exposed to pro-aging factors present small size and large EC-rich deposits. The small size EC-rich deposits were only found in INL and ONL layer (c, arrows) whereas the large EC-rich deposits were found only in POS. (a, e, f). EC-rich deposits was often associated with reduced outer segment thickness (c, e and f), structural disorders such as folds (e and f, asterisk) and possibly break-down of the RPE (b and e, arrows). Ch, choroid; RPE, retinal pigment epithelium; POS, photoreceptor outer segment; ONL, outer nuclear layer; INL, inner nuclear layer. Bar 20 µm.

Figure 5: The neurosensory retina presented two types of cells positive for both esterified cholesterol (a) and CD68 (b) (c, merge). Small cells were restricted to the internal retina (arrow) whereas the largest cells were found only in POS (arrowhead). GCL, ganglion cell layer; INL, inner nuclear layer; ONL, outer nuclear layer; RPE, retinal pigment epithelium.

Figure 6: The neurosensory retina presented pigmented cells (a, filled arrow in bright field image) or pigment-free cells (a, open arrow) which were both CD68⁺ (b, in red). Nuclei were stained by DAPI in blue (b). Merge image is shown in panel c. INL, inner nuclear layer; ONL, outer nuclear layer; RPE, retinal pigment epithelium; Ch, choroid.

Figure 7: CD68 staining (in red) on eye section. Nuclei were stained by DAPI (in blue).

Figure 8: Heat map representation of *Vegf*, *Flt1* and *Kdr* expression in the neurosensory retina. Relative expression was evaluated according to relative quantification ($2^{-\Delta\Delta Ct}$), using *Gadd45a*, *B2m* and *Gusb* genes as references genes and control group as calibrator for normalization.

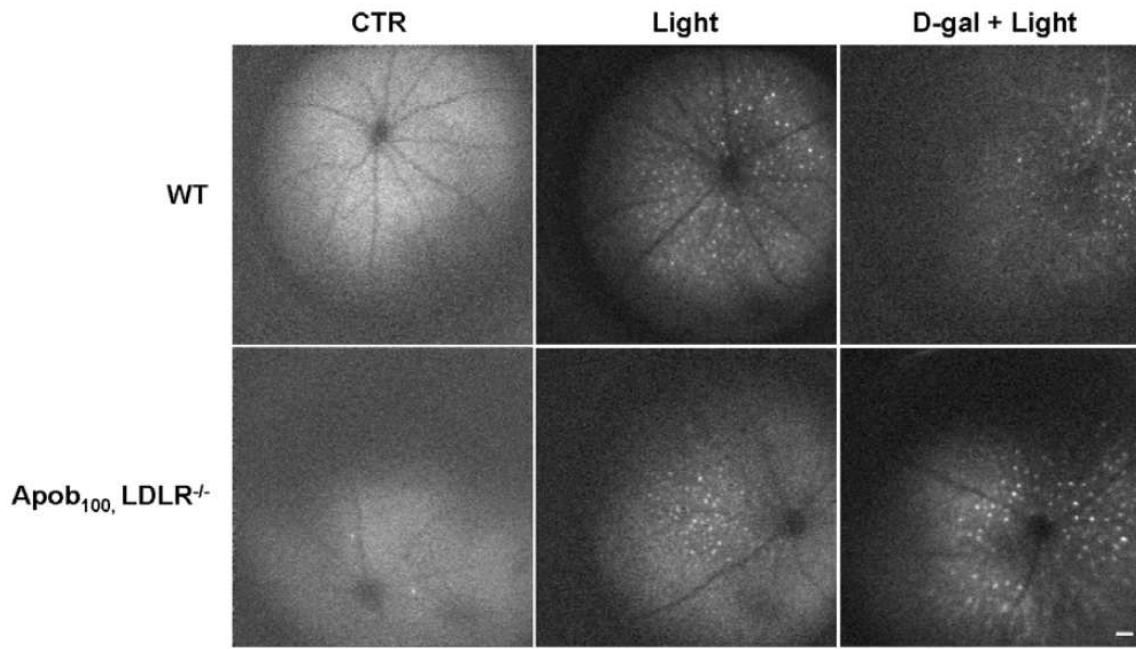


Figure 1.

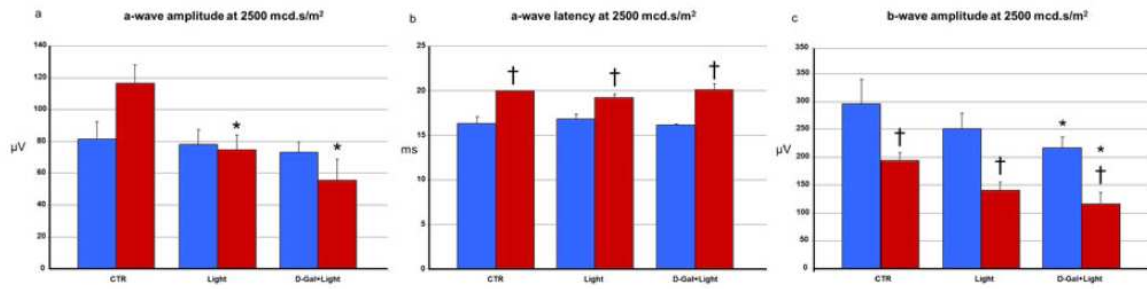


Figure 2.

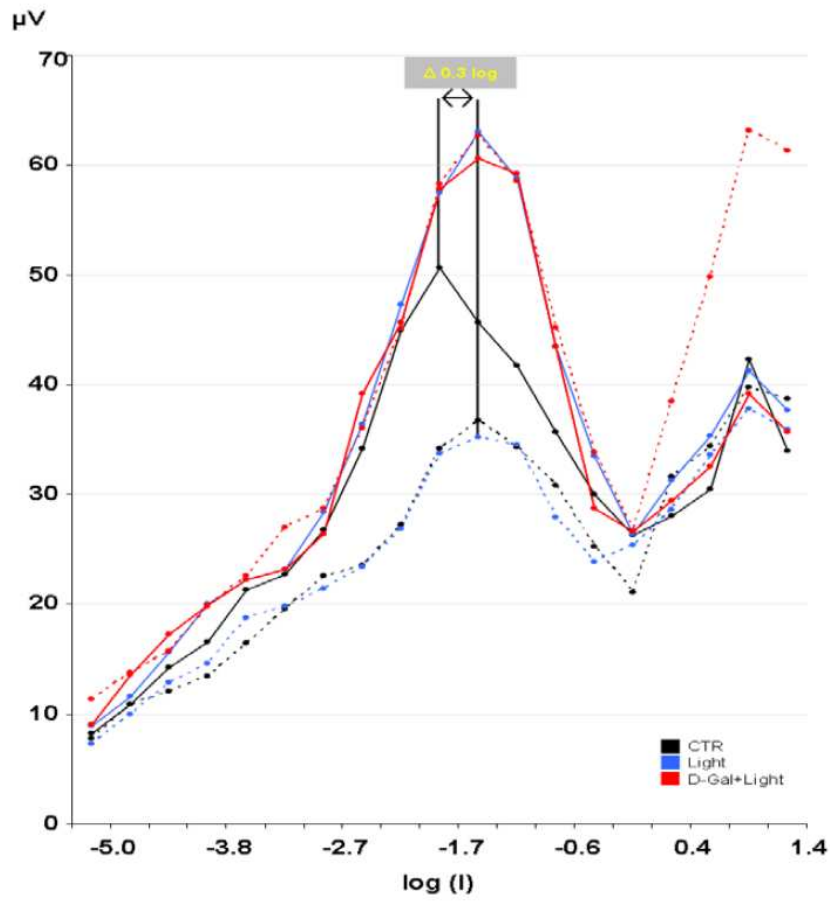


Figure 3.

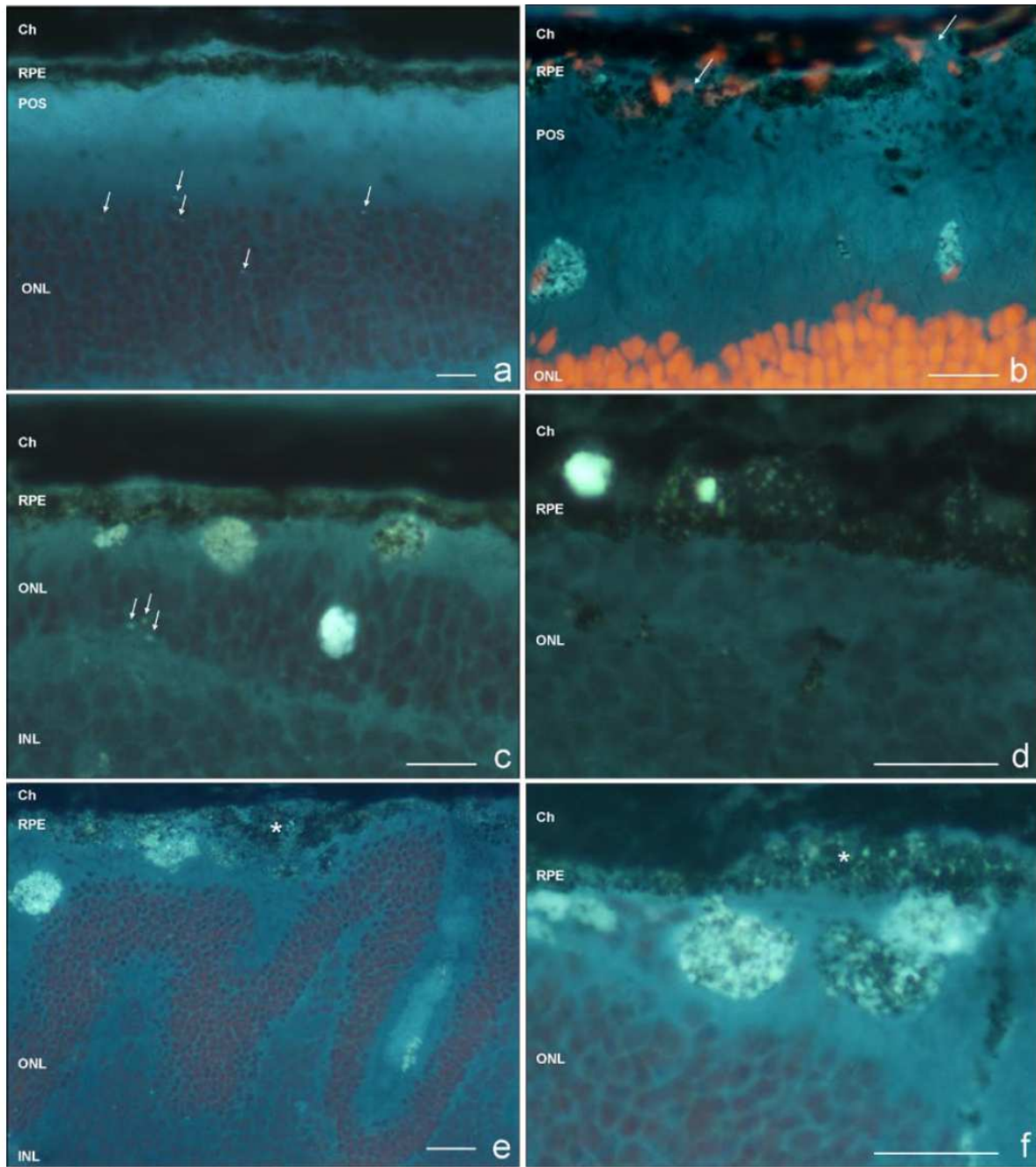


Figure 4.

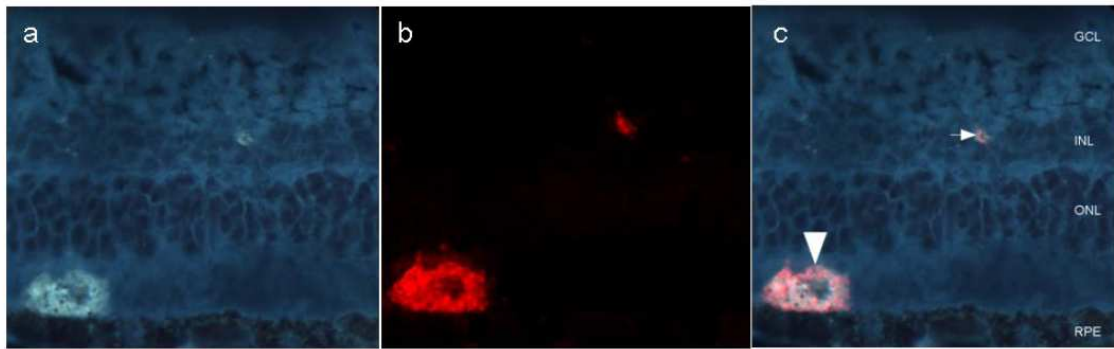


Figure 5.

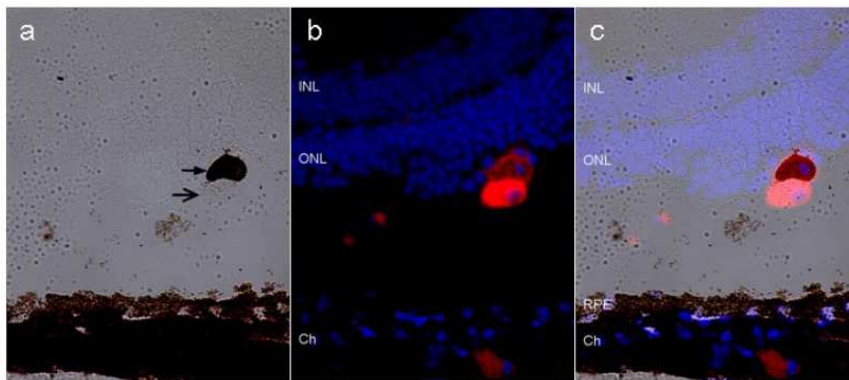


Figure 6.

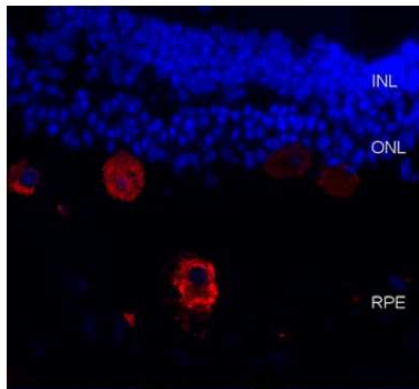


Figure 7.

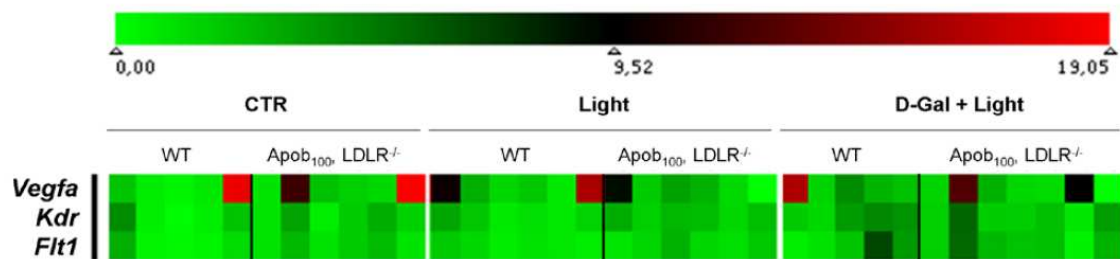


Figure 8.

Résultats et conclusions

Caractérisation du phénotype rétinien de la souris ApoB₁₀₀,LDLR^{-/-}

Tout d'abord, nous avons corroboré les données précédemment présentées par notre équipe sur la souris ApoB₁₀₀,LDLR^{-/-} (**Bretilon et al. 2008**), en rapportant une augmentation des signes de vieillissement de la rétine chez les souris ApoB₁₀₀, LDLR^{-/-} du groupe témoin vieillissantes par rapport aux souris sauvages témoins vieillissantes. En effet, nous avons mis en évidence chez ces souris une diminution de la fonction rétinienne caractérisée par une diminution de la sensibilité de la rétine, une diminution de l'amplitude de la réponse de la rétine interne (onde-b) et une augmentation de la latence de la réponse de photorécepteurs (onde-a) à un stimulus lumineux. Nous avons également mis en évidence des points autofluorescents au fond d'œil et des dépôts d'esters de cholestérol au niveau de la membrane de Bruch. Les immunomarquages CD68 sur coupes d'œil ont révélé la présence de cellules microgliales et/ou macrophages au niveau des segments externes des photorécepteurs. En regroupant les résultats d'analyse de l'autofluorescence de la rétine par ophtalmoscopie confocale à balayage laser (cSLO) et d'immunomarquage CD68, nous pouvons suggérer que les dépôts autofluorescents observés au fond d'œil par cSLO correspondent aux cellules microgliales et/ou macrophages mis en évidence par immunohistochimie. En effet, tout d'abord, les analyses immunohistochimiques montrent que les cellules microgliales et/ou macrophages sont localisés au niveau des segments externes des photorécepteurs, dans un plan focal compatible avec nos observations par cSLO. Ensuite, ces points autofluorescents ne peuvent pas correspondre à des dépôts semblables à des druses puisque que les druses sont classiquement présents dans la membrane de Bruch et que le laser argon utilisé à 488 nm n'est pas capable de traverser la couche des cellules de l'épithélium pigmentaire riches en mélanine. Par ailleurs, si il y avait une activation des cellules microgliales et/ou macrophages *in vivo* alors elles ont certainement phagocyté des débris cellulaires et des cellules apoptotiques (cellules épithéliales pigmentaires et photorécepteurs) contenant probablement des granules de lipofuscine (autoflorescents à 488 nm) accumulées au cours du vieillissement. Ceci expliquerait alors les points autofluorescents observés par cSLO. Enfin, les mesures effectuées sur les dépôts autofluorescents par cSLO et les cellules microgliales et/ou macrophages en immunohistochimie révèlent des diamètres semblables entre 20 et 30 µm. D'autre part, aucun point autofluorescent, ni aucune cellule microgliale et/ou macrophage n'ont été retrouvés chez les souris sauvages témoins. De récentes études ont fait le lien entre

des dépôts autofluorescents observés au fond d'œil et la présence de cellules microgliales ou macrophages dans la rétine chez des souris invalidées pour le gène *Ccl2* ou *Ccr2* (Luhmann *et al.* 2009; Chen *et al.* 2011). De plus, les phénomènes d'inflammation dans la rétine sont relativement bien décrits au cours du vieillissement et dans les rétinopathies liées à l'âge. En effet, de nombreuses études décrivent l'activation du complément (Jha *et al.* 2007), l'activation de cellules microgliales et l'infiltration de macrophages de la choroïde au cours de la DMLA (Penfold *et al.* 2001; Rodrigues 2007; Patel and Chan 2008; Xu *et al.* 2009). Ainsi, ces résultats permettent 1) de confirmer que la souris ApoB₁₀₀,LDLR^{-/-} est un modèle de vieillissement de l'œil humain, à la charnière entre un vieillissement physiologique et la rétinopathie et 2) de caractériser un peu mieux ce modèle murin.

Souris sauvages : témoins vs exposées aux facteurs générateurs de stress oxydatif et de PTG

L'exposition chronique des souris sauvages vieillissantes aux facteurs lumière ou lumière+D-galactose, aboutit à des altérations structurales et fonctionnelles de la rétine semblables à ce qu'on observe chez les souris ApoB₁₀₀,LDLR^{-/-} témoin. En effet, après deux mois, ces souris présentent une perte de sensibilité à la lumière mise en évidence par électrorétinographie (ERG), des dépôts autofluorescents au fond d'œil observés par cSLO et des cellules microgliales et/ou macrophages au niveau des segments externes des photorécepteurs. Malgré une augmentation (non significative) de l'expression de *Vegf* et de ses récepteurs *Kdr* et *Flt1*, aucune modification vasculaire n'a été observée.

Il semble donc que les facteurs auxquels les souris sauvages vieillissantes ont été exposées, induisent une augmentation des signes de vieillissement rétinien, voire déclenchent une réponse inflammatoire propice au développement d'une rétinopathie.

Souris ApoB₁₀₀,LDLR^{-/-} : témoins vs exposées aux facteurs générateurs de stress oxydatif et de PTG

Chez les souris ApoB₁₀₀,LDLR^{-/-} exposées aux facteurs lumière et lumière+D-galactose certaines altérations physiologiques de la rétine sont amplifiées par rapport à ce qu'on observe chez les souris ApoB₁₀₀,LDLR^{-/-} témoin. En effet, pour chaque condition on observe une aggravation de la diminution de la réponse des photorécepteurs (onde-a) suite à une stimulation lumineuse. En revanche, en ce qui concerne la réponse de la rétine interne, l'altération n'est aggravée qu'en condition lumière+D-galactose. Aucune modification de la sensibilité rétinienne n'a été observée par rapport aux souris ApoB₁₀₀,LDLR^{-/-} témoin. Malgré

une augmentation (non significative) de l'expression de *Vegf* et de ses récepteurs *Kdr* et *Flt1*, aucune modification vasculaire n'a été observée. En revanche, les dépôts observés en fond d'œil et les cellules microgliales et/ou macrophages observés chez les souris ApoB₁₀₀,LDLR^{-/-} témoins sont clairement augmentés chez les souris ApoB₁₀₀,LDLR^{-/-} exposées aux facteurs lumière et lumière+D-galactose.

Nous ne pouvons donc pas prétendre que les facteurs auxquels ces souris sont exposées puissent induire un état pathologique sévère (néovascularisation). Néanmoins, il semble qu'ils soient susceptibles d'induire une augmentation de la réponse inflammatoire qui peut être impliquée dans les stades précoces de DMLA. Nous devons toutefois rester vigilants sur ces conclusions car si nous avons observé une nette augmentation du nombre de points autofluorescents et de cellules microgliales et/ou macrophages chez les souris exposées aux facteurs comparé aux souris témoins, les analyses immunohistochimiques et l'observation du fond d'œil au cSLO procurent des résultats d'ordre qualitatifs et non quantitatifs.

Facteurs générateurs de stress oxydatif et de PTG : ApoB₁₀₀,LDLR^{-/-} vs souris sauvages.

Si on compare les deux souches murines en conditions lumière et lumière+D-galactose, on constate que l'aggravation des altérations liés au vieillissement (conditions témoins) constatés chez les souris ApoB₁₀₀,LDLR^{-/-} par rapport aux souris sauvages semblent être atténuées lorsque les deux souches sont exposées aux facteurs générateurs de stress oxydatif et de PTG. En effet, la diminution de la fonction rétinienne n'est pas aggravée chez les souris ApoB₁₀₀,LDLR^{-/-} exposées aux facteurs lumière et lumière+D-galactose par rapport aux souris sauvages dans les mêmes conditions. De plus s'il semble qu'il y ait plus de cellules microgliales chez les souris ApoB₁₀₀,LDLR^{-/-} que chez les souris sauvages par marquage immunochimiques, les examens au fond d'œil ne permettent pas de confirmer cette hypothèse car les points d'autofluorescents peuvent être plus ou moins visibles selon l'angle de réfraction de la lumière. Par ailleurs comme nous l'avons indiqué précédemment, les marquages immunohistochimiques ne donnent qu'une information qualitative et non quantitative.

Il semble donc que les facteurs générant un stress oxydatif et des PTG soient capables d'induire une augmentation des signes de vieillissement de la rétine chez les deux souches de souris. Cependant, contrairement à ce que nous attendions, l'impact de ces facteurs sur le vieillissement rétinien n'est pas fortement aggravé chez la souris ApoB₁₀₀,LDLR^{-/-} comparé aux souris sauvages avec comme effet principal une augmentation de la réponse inflammatoire de la rétine traduit par une augmentation de l'autofluorescence de la rétine et la

présence de cellules microgliales et/ou macrophages au niveau des segments externes de la rétine.

Ainsi, bien que les effets délétères causés par ces facteurs ne semblent pas suffisants pour induire un état pathologique sévère ni chez les souris sauvages, ni chez les souris ApoB₁₀₀,LDLR^{-/-}. Ils induisent néanmoins une augmentation des signes de vieillissement chez les deux souches. En effet, les altérations liés au stress oxydatif et aux PTG sont nettement augmentées chez les souris sauvages qui présentent alors des signes de vieillissement semblables à ceux observés chez les souris ApoB₁₀₀,LDLR^{-/-} témoins. Chez les souris ApoB₁₀₀,LDLR^{-/-} exposées aux facteurs de stress, les signes de vieillissement de la rétine sont aggravés par rapport aux souris ApoB₁₀₀,LDLR^{-/-} témoins. Cependant, l'impact des facteurs de stress est cependant moins flagrant que chez les souris sauvages. En effet, chez les souris ApoB₁₀₀,LDLR^{-/-}, seule la réponse inflammatoire semble être augmentée.

Ces données mettent en évidence 1) le rôle promoteur des facteurs environnementaux générateurs de stress oxydant et de PTG sur le vieillissement rétinien et 2) l'importance prépondérante des facteurs environnementaux par rapport à un facteur génétique (invalidation du gène Ldlr dans un contexte d'expression exclusive de l'ApoB₁₀₀ dans notre cas). En effet, nous avons montré dans un premier temps que les facteurs environnementaux et/ou endogènes peuvent accélérer le vieillissement rétinien. Puis nous avons montré que, dans un contexte génétique de vieillissement de la rétine, l'association de facteurs environnementaux et/ou endogènes générateurs de stress oxydatif et de PTG peut induire une augmentation de l'inflammation dans la rétine mais n'est pas suffisant pour le déclenchement d'une rétinopathie

Troisième partie :
Étude des effets d'un régime pro-diabétique
sur le vieillissement rétinien chez la souris
ApoB₁₀₀, LDLR^{-/-}.

Problématique

Depuis quelques décennies, nos habitudes alimentaires ont accompagné de fortes transformations socioculturelles. Nous consommons plus riche, plus gras, plus sucré et le nombre de personnes diabétiques est en constante augmentation dans les pays industrialisés. La rétinopathie diabétique et la DMLA possèdent des caractéristiques communes tant au niveau de leur impact sur la vision qu'au niveau de leur étiologie. Comme l'ont récemment montré Chiu et Taylor, certaines voies biochimiques, comme le stress oxydatif et la glycation non enzymatique des protéines, induites par une hyperglycémie, sont des mécanismes communs à la DMLA et la RD (**Chiu and Taylor 2011**). De plus, il a été montré chez des rongeurs qu'un régime riche en fructose, permet d'induire une résistance à l'insuline et le syndrome métabolique (**Basciano et al. 2005; Havel 2005; Tran et al. 2009**). Ces modifications phénotypiques se caractérisent par une augmentation de l'hypertension et une lipogénèse aboutissant à une augmentation des taux de VLDL et LDL circulants (dyslipidémie).

Dans ce contexte nous avons cherché à savoir dans quelle mesure les modifications biochimiques (ERO et PTG) et phénotypiques (dyslipidémie) induit par un régime enrichi en fructose sont susceptibles de:

- 1) participer au vieillissement de la rétine et
- 2) provoquer le basculement d'un vieillissement rétinien physiologique vers un phénotype proche d'une rétinopathie, assimilable à un état de rétinopathie diabétique, dans un contexte génétique promoteur du vieillissement rétinien (souris ApoB₁₀₀,LDLR^{-/-}).

Pour répondre à ces questions des souris sauvages et des souris ApoB₁₀₀,LDLR^{-/-} âgées de 14 semaines ont été nourries avec un régime enrichi à 60% de fructose durant 8 mois. L'effet de ce régime a ensuite été évalué sur la fonction rétinienne, sur la structure de la rétine et du réseau vasculaire et sur l'expression génique dans la rétine neurale et le complexe RPE-Ch.

Les résultats de ces travaux ont été soumis dans le journal « Investigative & Ophthalmology Visual Science ».

**Loss of rod sensitivity and gene expression changes in the retina of fructose-fed
insulin-resistant mice**

Emilie Simon^{1,2,3}, Cynthia Fourgeux^{1,2,3}, Bénédicte Buteau^{1,2,3}, Niyazi Acar^{1,2,3}, Alain M. Bron^{1,2,3,4}, Catherine P. Creuzot-Garcher^{1,2,3,4}, Lionel Bretillon^{1,2,3}

¹ INRA, UMR1324 Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation, Eye and Nutrition Research Group, F-21000 Dijon, France

² CNRS, UMR6265 Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation, Eye and Nutrition Research Group, F-21000 Dijon, France

³ Université de Bourgogne, Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation, Eye and Nutrition Research Group, F-21000 Dijon, France

⁴ Department of Ophthalmology, University Hospital, F-21000 Dijon, France

Author to whom all correspondence and proofs should be sent: Lionel Bretillon, CSGA, Centre INRA, 17 rue Sully, BP86510, F-21065 Dijon cedex, phone: +33(0)380693121, fax: +33(0)380693223, email: lionel.bretillon@dijon.inra.fr

Running title: Retinal aging in response to fructose diet

Key-words: retina, aging, diet, fructose, insulin resistance, gene expression, electrophysiology

Grant information: the work was funded in part by Abbott/Fournier/Solvay laboratories (grant 2900000385), Laboratoires Horus Pharma (Saint Laurent du Var, France), INRA and the Regional Council of Burgundy (grants 2900000257, 2900000305 and 2900000362).

Abstract

Purpose

Insulin resistance is one of the biochemical features of the metabolic syndrome that predisposes individuals to diabetes. Our purpose was to characterize the functional and gene expression changes in the retina after long-term feeding of mice with a fructose-enriched diet, used to elicit insulin resistance.

Methods

Control and ApoB₁₀₀,LDLR^{-/-} mice were fed a 60%-fructose diet for 8 months. Single flash and Flicker electroretinograms were recorded. Images of fundus autofluorescence, choroidal and retinal angiography were taken. Expression of various genes coding nuclear receptors, enzymes and lipid transporters was analyzed by RT-qPCR in the neurosensory retina (NR) and choroid plus retinal pigment epithelium (RPE-Ch).

Results

Feeding fructose significantly up-regulated gene expression of *ApoE*, *Abca4*, *Abcg1*, *Srb1*, *Cyp46a1*, *Cyp27a1*, *Lrp1*, *Lcat*, *Hmgcr*, *Insig1*, *Nfkb1*, *Nfkb2*, *Lxra*, *Ppard*, *Bax*, *Gfap*, *Hk1*, *Htra1*, and *Vegf* in the NR from both strains of mice. Fructose feeding significantly reduced a- and b-wave amplitudes of the dark-adapted electroretinogram and rod sensitivity to light stimulus by 0.3 log units in both strains of mice. No clinical signs of retinal vasculature abnormalities were observed in fructose-fed mice. ApoB₁₀₀,LDLR^{-/-} mice, used as a model of aging of the human retina, did not exhibit greater reactivity to fructose feeding than wild-type animals.

Conclusion

Our data demonstrate that, at early stages of insulin resistance and metabolic syndrome, the function of the NR is impaired and gene expression is altered. These data outline several molecular lipid-associated mechanisms that would predispose the retina to the consequences of metabolic syndrome.

Aging is a multifactorial process associated with physiological and neurosensory decline. The retina is the association of the neuroretina (NR) and the retinal pigment epithelium (RPE). The RPE is supported by a basal membrane called Bruch's membrane (BrM), which is in contact with the vascular choroid. Aging of the retina is characterized by the retention of lipids within BrM.¹ It has been postulated that such accumulation of lipid-rich material impairs the exchanges of nutrients from and to the NR², reducing the capacity of the retina to respond to light stimulus.³ In conjunction with the remodeling of the extracellular matrix in BrM, this accumulation may participate in the development of age-related macular degeneration (AMD).⁴ AMD is the leading cause of visual impairment in Western countries.⁵ Its prevalence was recently reported to be 6.5% after 40 years of age in the USA⁶, rising to 30% after 75 years.⁷ After advanced age, which is the prominent risk factor, both genetic and environmental factors participate in AMD.⁸ The influence of metabolic syndrome/diabetes and AMD remains controversial, although weak associations have been noted.⁹ Nevertheless, there is a strong body of evidence – at least experimental – for associating increased oxidative stress, aging and AMD.¹⁰ As recently reviewed, some hyperglycemia-related pathways, including oxidative stress, are common mechanisms to diabetic retinopathy and AMD.¹¹

We previously published that the ApoB₁₀₀,LDLR^{-/-} mouse is a relevant model of aging of the human retina.³ This mouse exhibits fundus autofluorescence, accumulation of lipids in BrM, and reduced response of the retina to light stimulus.³ It can therefore be considered to be at a pre-AMD stage, at the hinge between aging and pathology. Consequently, it is suitable to better characterize the role of environmental factors in amplifying the signs of retinal aging. In rodents, a high-fructose diet (FD) is widely used to induce insulin resistance and metabolic syndrome.^{12,13} The purpose of this study was first to define whether a FD would promote aging of the retina, in terms of fundus autofluorescence and retinal vascularization, in the ApoB₁₀₀,LDLR^{-/-} mouse, by comparison with a control mouse strain. Secondly, we ought to evaluate changes in gene expression in both the NR and the RPE plus choroid complex (RPE-Ch) in these animals.

Methods

Mice

The animals were used in accordance with the ARVO Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research. French legal and institutional ethics committee review board approvals were obtained. Wild-type B6-129SF2/J (WT) and ApoB₁₀₀,LDLR^{-/-} mice, whose retinal phenotype was initially documented by our group³, were fed a standard equilibrated chow diet (Table 1) (128S; Harlan- Teklad, Gannat, France) until the age of 14 weeks and maintained under controlled conditions of temperature (22 ± 1°C), hygrometry (55–60%), and light (lights on 7AM–7PM, 18 lux) (animal breeding house; INRA, Dijon, France). During the following 8 months, one group of each strain was maintained on the standard diet (128S; Harlan-Teklad, Gannat, France) (*n*=8 in WT, *n*=9 in ApoB₁₀₀,LDLR^{-/-}), and one group was fed a 60%-fructose-rich diet (Table 1) (UPAE, Jouy-en-Josas, France) (*n*=8 in WT, *n*=9 in ApoB₁₀₀,LDLR^{-/-}).

Electroretinography

Electroretinography (ERG) was performed according to previously described procedures.^{3,14} Before ERG recordings, mice were dark-adapted overnight. All further procedures were carried out under dim red light ($\lambda > 650$ nm) and at a constant temperature of 25°C. The animals were anesthetized with subcutaneous injection of ketamine (50 mg/kg, Imalgène[®] 1000, Merial, Lyon, France) and xylazine (10 mg/kg, Rompun[®] 2%, Bayer, Puteau, France). Their pupils were dilated with 0.5% tropicamide (Ciba Vision Ophthalmics, Blagnac, France). After 10 min, the mice were positioned on a warming plate that maintained a constant body temperature and the electrodes were put in place. The ERG was recorded via a corneal electrode placed on each eye (thin gold wire with a 3-mm-ring end), and reference and ground electrodes (silver needle) placed on the forehead and tail, respectively. The mice were placed in a white sphere that mimics a Ganzfeld dome. The retina was stimulated by a photostimulator (model PS33 PLUS, Grass Telefactor, Astro-Med Inc., West Warwick, USA) delivering light flashes to the eye through fiber optics. The response of the retina was amplified and analyzed with a computer-based control and recording unit (PhysioTrace,

Estaris Monitoring, Lille, France). The band-pass filter width was 1–300 Hz for single-flash and flicker-stimuli recordings. The band-pass filter cutoff frequencies were 0.1 and 3000 Hz. Single-flash recordings were obtained from three different intensity stimulations: 1 Hz stimulation for 30 s at 9 mcd.s/m² and 10 stimulations at 2500 mcd.s/m² and 28000 mcds/m² with an interstimulus interval of 17 s. Flicker recordings were obtained from 19 different intensity stimulations extending from 0.01 at 28000 mcd.s/m² with a frequency at 10 Hz. The amplitudes and latencies were determined for each recording and were measured from the baseline (a-wave) or from the peak of the a-wave (b-wave).

Fundus Photography

In vivo black-and-white images of the fundus were obtained with Heidelberg Retina Angiograph (HRA) (Heidelberg Engineering GmbH, Heidelberg, Germany), as described elsewhere.¹⁵ The HRA is a confocal scanning laser ophthalmoscope (cSLO) using different lasers deflected by a mirror oscillating sinusoidally at a frequency up to 20 Hz. Reflectance images of the fundus were acquired using the infrared diode laser (795 nm), the argon green laser (514 nm), and the argon blue wavelength (488 nm). Variation of laser beam focus allowed visualization of the different layers of the fundus (i.e., retina versus RPE). The size of the square scan field was set to 20°×20° and 10°×10°. Methylcellulose (Humigel[®], Virbac, Carros, France) was applied on the eyes to ensure good contact with the optical lens and to keep the cornea hydrated during the entire procedure.

cSLO Angiography

Retinal and choroidal vasculature changes were evaluated as described elsewhere¹⁵ after a subcutaneous injection of 10% fluorescein sodium salt (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) (100 µL/30 g body weight) and 0.4% monopeak indocyanine green (ICG) (Infracyanine[®] 25 mg, SERB, Paris, France) (0.5 mL/30 g body weight). Retinal and choroidal vessels began filling approximately 30 s after administration. Although timing varied with subcutaneous absorption, single still pictures and depth scan movies were taken in an average time of 5–10 min after dye administration. Pictures from retinal and choroidal vasculature were recorded with an argon blue laser (488 nm) for excitation during fluorescein

angiography and an infrared diode laser (795 nm) for excitation during ICG angiography. Barrier filters at 500 and 800 nm provided the optimal cutoff at the respective peak fluorescence emission values for the two types of angiography. The size of the square scan field was set to 20°×20° and 10°×10°.

Gene Expression

After 8 months, mice were euthanized and enucleated. The anterior segment of the eye was removed after a circular section at the limbus. The NR and RPE-Ch were separated and stored in RNA later[®] solution (Saint Aubin, France) at -80°C until further mRNA extraction. mRNA from the NR and RPE-Ch were extracted using the RNAqueous[®] Kit (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) according to the manufacturer's procedure and quantified using the NanoDrop[®] ND-1000 spectrophotometer (Thermo Scientific, Illkirch, France). The expression of 56 genes (Table 3) was analyzed by TaqMan[®] RT-PCR. In brief, RT was done with the High-capacity RNA-to-cDNA Master Mix (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) in a C1000 Thermal Cycler C1000 (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) using the following temperature program: 50 min at 37°C, 15 min at 70°C, and 5 min at 4°C. cDNA were stored at -20°C until PCR amplification. PCRs were performed in 10 µL of PCR buffer containing 5 µL of 2x TaqMan[®] Fast Universal Master Mix (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) and 5 µL of amplified cDNA (5–50 ng cDNA per reaction). The reaction was performed in custom 96-well FAST plates. PCR amplification was carried out with StepOne[™] Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) with the following cycling parameters: 95°C for 20 s followed by 40 repeats of the PCR cycle of 95°C for 20 s and 60°C for 10 s. The raw Ct (cycle threshold) values were exported and analyzed into DataAssit software (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) to determine the relative expression of each gene. *Gadd45a*, *B2m* and *Gusb* genes were used as reference genes to normalize the Ct values of the target genes, and control samples were used as reference groups.

Results

A fructose-rich diet reduced retinal function and rod sensitivity

The FD impairs the single-flash scotopic ERG response in both strains of mice. Indeed, the a- and b-wave amplitudes were reduced in mice fed the FD compared to mice fed the control diet. The amplitude of the a-wave was decreased by 33.4% in WT mice fed the FD ($p < 0.01$) and by 55.5% in the ApoB₁₀₀,LDLR^{-/-} mice ($p < 0.001$), compared to mice from the corresponding strain fed the control diet. Similarly, b-wave amplitudes were decreased by 38% in WT mice ($p = 0.03$) and 41% in ApoB₁₀₀,LDLR^{-/-} mice ($p = 0.03$). The FD significantly raised the a-wave latency in WT mice, whereas no modifications were observed in ApoB₁₀₀,LDLR^{-/-} mice (Figure 1).

The fixed-frequency Flicker ERG is a valuable tool to separately evaluate the sensitivity of rod and cone photoreceptors.¹⁶ In both strains of mice fed the FD, the peak of rod sensitivity was switched by 0.3 log units on the right, suggesting a loss of sensitivity. Indeed, the maximal response was reached with a stimulus intensity of 44 mcd.s/m² in mice fed the FD compared to 20 mcd.s/m² in WT mice. No cone sensitivity modifications were observed in WT and ApoB₁₀₀,LDLR^{-/-} fed the FD (Figure 2).

The fructose diet marginally increased fundus autofluorescence and did not affect retinal and choroidal angiography

No abnormalities were observed in retinal and choroidal vessels in ApoB₁₀₀,LDLR^{-/-} and WT mice fed either the control diet or the FD (Figure 3). However, fundus imaging at the 488 nm wavelength clearly illustrated the accumulation of autofluorescent dots and pericytes in the NR of ApoB₁₀₀,LDLR^{-/-} mice fed the control diet (Figure 4), as previously published.³ Although cSLO gives mainly qualitative data, in order to quantitatively illustrate the effect of FD on fundus autofluorescence, we graded the fundus images using the following features: normal fundus, presence of autofluorescent pericytes, and/or presence of punctuated autofluorescent dots. The FD had only a minor raising effect on the accumulation of autofluorescent dots in the fundus of the animals (Figure 4).

Strain differences in gene expression in the NR and RPE-Ch between wild-type and ApoB₁₀₀,LDLR^{-/-} mice fed a standard balanced diet

As expected, LDLR was not expressed in ApoB₁₀₀,LDLR^{-/-} mice, at least at Ct far above the limit to be considered relevant (Ct>40). Figure 5 is heat map representation of individual RQs of gene expression in the NR of wild-type and ApoB₁₀₀,LDLR^{-/-} mice. Figure 6 is the heat map representation of individual RQs of gene expression in RPE-Ch of wild-type and ApoB₁₀₀,LDLR^{-/-} mice. Under a standard diet, gene expression of *Abcg1* (mean RQ=3.8, *p*=0.029), *Htra1* (RQ=3.1, *p*=0.029), and *Nos2* (RQ=2, *p*=0.015) was up-regulated in the NR of ApoB₁₀₀,LDLR^{-/-} mice compared to WT animals. In RPE-Ch, *Abca1*, *Cxcr3*, and *Cd18* genes were up-regulated (RQ=1.6, *p*=0.004; RQ=2.4, *p*=0.046; and RQ=1.6, *p*=0.009, respectively), whereas the expression of *Acat1* and *Hmgcr* genes was down-regulated in ApoB₁₀₀,LDLR^{-/-} mice compared to WT mice (RQ=0.52, *p*=0.007 and RQ=0.57, *p*=0.016, respectively). Up-regulation of *Vegf* gene expression in the NR and *Cd36* in RPE-Ch of ApoB₁₀₀,LDLR^{-/-} mice was close to reaching significance (RQ=1.7, *p*=0.059; and RQ=1.5, *p*=0.055, respectively).

Feeding fructose modified gene expression in the NR and RPE-Ch

Common effects of the FD in both wild-type and ApoB₁₀₀,LDLR^{-/-} mice

In the NR, both strains of mice showed a similar induction of *Apoe* (RQ=2.5, *p*=0.042 in WT and RQ=4.4, *p*=0.0015 in ApoB₁₀₀,LDLR^{-/-}), *Srb1* (RQ=5.6, *p*=0.0015; and RQ=4.5, *p*=0.0019), *Cyp46a1* (RQ=3.7, *p*=0.0009; and RQ=4.5, *p*<0.0001), *Cyp27a1* (RQ=4.1, *p*=0.002; and RQ=3.1, *p*=0.02), *Gfap* (RQ=4.5, *p*=0.0081; and RQ=8.4, *p*=0.007), *Hmgcr* (RQ=2.5, *p*=0.0043; and RQ=1.8, *p*=0.008), *Lrp1* (RQ=4.9, *p*=0.0001; and RQ=2.7, *p*=0.002), *LCAT* (RQ=2.9, *p*=0.011; and RQ=3, *p*=0.012), *Lxra* (RQ=3.7, *p*=0.04; and RQ=5.3, *p*=0.04), *Ppard* (RQ=9.3, *p*=0.01; and RQ=6.1, *p*=0.01), *Bax* (RQ=3.8, *p*=0.0008; and RQ=2.1, *p*=0.016), *Htra1* (RQ=10.5, *p*=0.002; and RQ=3.2, *p*=0.013), *Hk1* (RQ=8.2, *p*=0.0027; and RQ=4.8, *p*=0.012), *Insig1* (RQ=6, *p*=0.0017; and RQ=3.8, *p*=0.005), and *Vegf*

(RQ=5.2, $p=0.0018$; and RQ=2.3, $p=0.0008$) genes; and a similar down-regulation of the *Lpl* (RQ=0.71, $p=0.03$; and RQ=0.58, $p=0.006$) gene in response to the FD (Figure 5). In RPE-Ch, both strains of mice showed similar inhibition of *Sod2* gene expression in response to the FD (RQ=0.6, $p=0.01$; and RQ=0.67, $p=0.01$) (Figure 6).

Specific effects of FD in wild-type mice

In addition to the genes listed above, the FD up-regulated *Ldlr* (RQ=2.7, $p=0.015$), *Abca4* (RQ=5.4, $p=0.02$), *Abcg1* (RQ=22, $p=0.025$), and *Srebp1* (RQ=2.1, $p=0.0029$) in the NR of WT mice (Figure 5). In RPE-Ch, the expression of *Abca1* (RQ=1.5, $p=0.018$), *Nfkb2* (RQ=1.9, $p=0.02$), *Cd18* (RQ=1.9, $p=0.01$), and *Lcat* (RQ=3.5, $p=0.05$) was up-regulated, whereas the expression of *Acat1* (RQ=0.38, $p=0.002$), Clusterin (RQ=0.62, $p=0.007$), *Mtp* (RQ=0.26, $p=0.02$), and *Ccl2* (RQ=0.6, $p=0.006$) was down-regulated (Figure 6).

Specific effects of FD in ApoB₁₀₀,LDLR^{-/-} mice

The FD up-regulated *Abca1* (RQ=0.56, $p=0.044$), *Nfkb1* (RQ=2.6, $p=0.009$), *Nfkb2* (RQ=6.7, $p=0.01$) and down-regulated vimentin in the NR from ApoB₁₀₀,LDLR^{-/-} mice (Figure 5). In RPE-Ch, *Cd36* was up-regulated (RQ=1.8, $p=0.023$) (Figure 6).

Discussion

We previously published data on the retinal phenotype of the ApoB₁₀₀,LDLR^{-/-} mouse. We showed that this mouse exhibits fundus autofluorescence, reduced electroretinographic response, and accumulation of cholesteryl esters within BrM upon age.³ These features make this mouse a relevant model of aging of the human retina since these signs are hallmarks of aging in humans² and are associated with AMD.¹ The present work first provides data on the process of age-related accumulation of cholesterol and cholesteryl esters within the retina, at the level of gene expression. The lack of *Ldlr* expression in ApoB₁₀₀,LDLR^{-/-} mice leads to the abrogation of the recognition of ApoB₁₀₀-rich lipoproteins. Subsequently, the delivery of nutrients, including lipids, to the RPE and NR is likely impaired, leading to reduced functionality of the retina, as exemplified by electroretinographic data.³ We first found that *Abcg1* in the NR, *Abca1* in RPE-Ch, and to a lesser extent *Cd36* genes in the NR, were up-regulated in ApoB₁₀₀,LDLR^{-/-} mice when compared to wild-type animals. We suggest that CD36, ABCG1, and ABCA1 may participate, at the expense of LDLR, in the metabolism of lipids in the retina. ABCG1 is expressed in the NR¹⁷, ABCA1 in RPE-Ch¹⁸, and CD36 in both NR and RPE-Ch.¹⁸ The exact role played by these proteins in the retina remains elusive. Nevertheless, by analogy with their involvement in the export of cholesterol from macrophages^{19,20}, up-regulation of *Abcg1*, *Abca1*, and *Cd36* in the ApoB₁₀₀,LDLR^{-/-} mouse may be considered as an alternate process to govern lipid export, including cholesterol from retinal structures. Down-regulation of *Acat1* and *Hmgcr* in ApoB₁₀₀,LDLR^{-/-} may also participate in the same mechanism of cholesterol homeostasis. Indeed, these enzymes are key regulators for the synthesis of cholesterol and cholesteryl esters. Up-regulation of *Abca1* and correlative down-regulation of *Acat1* in RPE-Ch of ApoB₁₀₀,LDLR^{-/-} mice are consistent with previous data showing enhanced gene expression of ABCA1 in *ACAT1*^{-/-} macrophages.²¹ We suggest that up-regulation of ABCG1, ABCA1, and CD36 and down-regulation of ACAT1 and HMGCR may counterbalance the accumulation of cholesteryl esters in BrM of ApoB₁₀₀,LDLR^{-/-} mice shown *in vivo*.³

Interestingly, we reported significant up-regulation of *Htra1* gene and close to significant up-regulation of *Vegf* gene expression in the NR of ApoB₁₀₀,LDLR^{-/-} mice. These changes in gene expression indicate the relevance of ApoB₁₀₀,LDLR^{-/-} mouse as a pre-AMD model. Indeed, overexpression of HTRA1 in mice has been associated with ultrastructural changes in BrM, similar to those observed in AMD.^{22,23} Increased expression of HTRA1 has also been associated with up-regulation of VEGF expression and choroidal vasculopathy.²²

The primary objective of our study was to characterize and delineate the consequences for the retina of high-fructose feeding in wild-type mice and a pre-AMD mouse model.

High-fructose feeding has been widely used to induce hyperinsulinemia, insulin resistance, lipogenesis, and hypertension in rodents, which initiate metabolic syndrome.^{13,24-26} We first showed that under these dietary conditions, retinal functionality is partially impaired, whereas no vascular changes were observable (Figure 3). Rod sensitivity was lowered (Figure 2), as well as the response of the neurons from the inner retina (Figure 1). The FD had a promoting, although minor, effect on the accumulation of fundus autofluorescence (Figure 4). Our data on gene expression are consistent with the induction and repression of several pathways in connection with the development of insulin resistance, although we have lacked obvious demonstration that our mouse models developed insulin resistance in response to FD. It should nevertheless be mentioned that a FD has been widely used in rodents to induce insulin resistance and metabolic syndrome.^{12,13} The down-regulation of *Sod2* in RPE-Ch of mice fed the FD is consistent with the reduction of the antioxidant defenses and increased oxidative stress in high-fructose feeding conditions.²⁶ In our study, *Hk1* gene is strongly up-regulated in the NR. Hexokinase-1 is mainly localized in the outer mitochondrial membrane where it initiates glycolysis by catalyzing the formation of hexose-6-phosphate. It has been demonstrated that the expression of hexokinase-1 is increased upon hyperglycemia in isolated glomeruli of diabetic animals.²⁷ The relevance of such increased expression may be linked to the neuroprotective property of mitochondrial-bound hexokinase I activity that maintains adequate glutathione levels and prevents neuronal oxidative damage.^{28,29} Our finding therefore highlights the ability of the NR to respond to ambient

glucose concentrations, especially by enhanced glial reactivity as exemplified by GFAP induction.

Acetyl-coA, dihydroxyacetone phosphate, and glyceraldehyde are end-products of glycolysis that, in excess, are further used in lipogenesis.²⁵ Fructose has the ability to by-pass the main regulatory step of glycolysis controlled by phosphofructokinase. Thus, while glucose metabolism is negatively regulated by phosphofructokinase, fructose continuously enters the glycolytic pathway and produces pyruvate, which promotes the synthesis of cholesterol and triglyceride and secretion of VLDL and LDL by the liver. In our study, the increase of *Hmgcr* and *Srebp* gene expression in NR suggests an increase of lipid synthesis, including cholesterol in the FD condition.

Our work has clearly identified PPAR δ and LXR α as the main nuclear receptors whose expression is induced by FD. Several genes mentioned are LXR-target genes and up-regulated by FD: *ApoE*, *Abca1*, *Abcg1*, *Ldlr*, *Srebp*, and *Vegf*. Both the NR and RPE cells express various proteins that participate in cholesterol trafficking: VLDLR, LCAT, LDLR, LPR1, CD36, ABCA1, ABCG1, SRBI, and APOE.^{18,30-34} Our experiment found increased gene expression of these transporters in WT animals: *Ldlr*, *Srb1*, *Lrp1*, *Abca1*, *Abcg1*, and *ApoE*, which may confirm the trend for an enhanced cholesterol efflux in the NR and RPE-Ch in response to elevated cholesterol synthesis.

Among the processes that maintain cholesterol homeostasis, the conversion of cholesterol into more polar metabolites is of peculiar importance. CYP27A1 and CYP46A1 are cytochrome P450 enzymes that are responsible for the synthesis of 27-hydroxycholesterol and 24S-hydroxycholesterol, respectively. Both enzymes are expressed in RPE-Ch and/or NR.³⁵⁻³⁷ The up-regulation of *Cyp27a1* and *Cyp46a1* genes in the NR suggests an increase of cholesterol efflux. 24S-hydroxycholesterol is one of the most potent LXR inducers, at least *in vitro*.³⁸ Recent *in vivo* data have shown that enhanced production of 24S-hydroxycholesterol in the central nervous system is not sufficient to up-regulate LXR-dependent genes: *ApoE*, *Abca1*, *Abcg1*, and *Srebp*.³⁹ Glucose and glucose-6-phosphate are also LXR ligands.⁴⁰ Consequently, we suggest that the aforementioned increase in both *Hk1*

and *Cyp46a1* gene expression may activate LXR gene expression via enhanced synthesis of glucose-6-phosphate and 24S-hydroxycholesterol in the NR. We suspect a similar mechanism to explain the induction of VEGF since the *Vegf* gene is driven, at least in part, by LXR α .⁴¹ VEGF is a key regulator for neovascularization, especially in conjunction with overexpression of HTRA1.²² Although we failed to observe neovascularization in our models, the *Vegf* and *Htra1* genes were up-regulated by FD. We can therefore suggest that FD promotes but is not sufficient for the development of retinal neovascularization.

Interestingly, we noted that the main cholesterol transporters exhibited a different pattern of expression in the NR in WT and ApoB₁₀₀,LDLR^{-/-} mice. Indeed, on the one hand, *Abcg1* and *Ldlr* were specifically up-regulated in the NR of WT mice, whereas *Abcg1* gene expression was not modified in ApoB₁₀₀,LDLR^{-/-} mice. On the other hand, *Abca1* and *Cd36* expression was up-regulated in ApoB₁₀₀,LDLR^{-/-} mice but not in WT mice. These transporters participate in the transport of cholesterol to ApoE-rich lipoproteins. It has been previously postulated that the export of cholesterol from glia to ApoE-rich particles is mainly dependent on ABCG1, and to a lesser extent on ABCA1.⁴² Our data suggest that, under standard conditions – i.e., in WT animals – LDLR and ABCG1 closely interact to promote the export of cholesterol to ApoE-rich particles. While LDLR is lacking – i.e., in ApoB₁₀₀,LDLR^{-/-} mice – CD36 is expressed and interacts with ABCA1.

INSIG1 plays a critical role in diminishing cholesterol concentrations in cells.⁴³ INSIG1 expression is under the control of PPAR δ .⁴⁴ The increased expression of PPAR δ and INSIG1 in our study is consistent with the early adaptive response of cells to metabolic disturbances, as has been reported for INSIG1 in white adipose tissue of animals in the early phases of diet-induced obesity.⁴⁵ PPAR δ and INSIG1 may represent potential targets in the prevention of the consequences of insulin resistance in the retina, including lipogenesis.

In summary, this study provides experimental data that a high-fructose diet modulated the expression of genes associated with cholesterol and lipid trafficking in the neurosensory

retina and RPE-Ch. We identified the synergistic role of ABCG1 and LDLR on the one hand and ABCA1 and CD36 on the other hand in exporting lipids, including cholesterol. PPAR δ and LXR α were identified as the main nuclear receptors in these effects. The absence of vascular abnormalities in the retina suggests that modifications of gene expression occur at the early stages of retinopathy. Our findings demonstrate the importance of maintaining lipid homeostasis to prevent the development of diabetic complications in the retina. Indeed, a recent paper in streptozotocin-induced diabetic rats reported that the LXR-dependent expression of genes involved in lipid metabolism ranked number 4 among genes modified in the diabetic retina.⁴⁶ The retinal aging-prone context raised by the ApoB₁₀₀,LDLR^{-/-} genotype did not amplify the effects of the FD in retinal functionality and gene expression, highlighting the potency of environmental dietary factors to modify function and lipid homeostasis in the retina.

Acknowledgments

The skillful assistance of Bruno Pasquis in taking care to the animals is gratefully acknowledged.

References

- ¹ Curcio CA, Johnson M, Huang JD and Rudolf M. Aging, Age-related Macular Degeneration, and the Response-to-Retention of Apolipoprotein B-Containing Lipoproteins. *Progr. Retin. Eye Res.* 2009;28:393-422.
- ² Curcio CA, Johnson M, Huang JD and Rudolf M. Apolipoprotein B-containing lipoproteins in retinal aging and age-related macular degeneration. *J. Lipid Res.* 2010;51:451-467.
- ³ Bretillon L, Acar N, Seeliger MW et al. ApoB₁₀₀,LDLR^{-/-} Mice Exhibit Reduced Electroretinographic Response and Cholesteryl Esters Deposits in the Retina. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2008;49:1307-1314.
- ⁴ Booij JC, Baas DC, Beisekeeva J, Gorgels TGMF and Bergen AAB. The dynamic nature of Bruch's membrane. *Progr. Retin. Eye Res.* 2010;29:1-18.
- ⁵ Congdon N, O'Colmain B, Klaver CC et al. Causes and prevalence of visual impairment among adults in the United States. *Arch. Ophthalmol.* 2004;122:477-485.
- ⁶ Klein R, Chou C-F, Klein BEK et al. Prevalence of Age-Related Macular Degeneration in the US Population. *Arch. Ophthalmol.* 2011;129:75-80.
- ⁷ Klein R, Klein BE, Knudtson MD et al. Fifteen-year cumulative incidence of age-related macular degeneration: the Beaver Dam Eye Study. *Ophthalmology* 2007;114:253-262.
- ⁸ Coleman HR, Chan CC, Ferris FLr and Chew EY. Age-related macular degeneration. *Lancet* 2008;372:1835-1845.
- ⁹ Chakravarthy U, Wong TY, Fletcher A et al. Clinical risk factors for age-related macular degeneration: a systematic review and meta-analysis. *BMC ophthalmology* 2010;10:31.
- ¹⁰ Ramkumar HL, Zhang J and Chan C-C. Retinal ultrastructure of murine models of dry age-related macular degeneration (AMD). *Progr. Retin. Eye Res.* 2010;29:169-190.
- ¹¹ Chiu CJ and Taylor A. Dietary hyperglycemia, glycemic index and metabolic retinal diseases. *Progr. Retin. Eye Res.* 2011;30:18-53.
- ¹² Tran L, Yuen V and McNeill J. The fructose-fed rat: a review on the mechanisms of fructose-induced insulin resistance and hypertension. *Mol. Cell Biochem.* 2009;

- ¹³ Havel PJ. Dietary Fructose: Implications for Dysregulation of Energy Homeostasis and Lipid/Carbohydrate Metabolism. *Nutr. Rev.* 2005;63:133-157.
- ¹⁴ Jaissle GB, May CA, Reinhard J et al. Evaluation of the rhodopsin knockout mouse as a model of pure cone function. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2001;42:506-513.
- ¹⁵ Seeliger MW, Beck SC, Pereyra-Munoz N et al. In vivo confocal imaging of the retina in animal models using scanning laser ophthalmoscopy. *Vision Res.* 2005;45:3512-3519.
- ¹⁶ Seeliger MW, Grimm C, Stahlberg F et al. New views on RPE65 deficiency: the rod system is the source of vision in a mouse model of Leber congenital amaurosis. *Nat Genet* 2001;29:70-74.
- ¹⁷ Bojanic DD, Tarr PT, Gale GD et al. Differential expression and function of ABCG1 and ABCG4 during development and aging. *J. Lipid Res.* 2010;51:169-181.
- ¹⁸ Tserentsoodol N, Gordiyenko NV, Pascual I et al. Intraretinal lipid transport is dependent on high density lipoprotein-like particles and class B scavenger receptors. *Mol. Vis.* 2006;12:1319-1333.
- ¹⁹ Silverstein RL and Febbraio M. CD36, a scavenger receptor involved in immunity, metabolism, angiogenesis, and behavior. *Sci. Signal.* 2009;2:re3.
- ²⁰ Yvan-Charvet L, Wang N and Tall AR. Role of HDL, ABCA1, and ABCG1 Transporters in Cholesterol Efflux and Immune Responses. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2010;30:139-143.
- ²¹ Dove DE, Su YR, Zhang W et al. ACAT1 Deficiency Disrupts Cholesterol Efflux and Alters Cellular Morphology in Macrophages. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2005;25:128-134.
- ²² Jones A, Kumar S, Zhang N et al. Increased expression of multifunctional serine protease, HTRA1, in retinal pigment epithelium induces polypoidal choroidal vasculopathy in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 2011;108:14578-14583.
- ²³ Vierkotten S, Muether PS and Fauser S. Overexpression of HTRA1 Leads to Ultrastructural Changes in the Elastic Layer of Bruch's Membrane via Cleavage of Extracellular Matrix Components. *PLoS ONE* 2011;6:e22959.

- ²⁴ Dekker MJ, Su Q, Baker C, Rutledge AC and Adeli K. Fructose: a highly lipogenic nutrient implicated in insulin resistance, hepatic steatosis, and the metabolic syndrome. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2010;299:E685-E694.
- ²⁵ Rutledge AC and Adeli K. Fructose and the Metabolic Syndrome: Pathophysiology and Molecular Mechanisms. *Nutr. Rev.* 2007;65:S13-S23.
- ²⁶ Tran L, MacLeod K and McNeill J. Endothelin-1 modulates angiotensin II in the development of hypertension in fructose-fed rats. *Mol. Cell. Biochem.* 2009;325:89-97.
- ²⁷ Henningsen C, Zahner G and Thaiss F. High Glucose Induces Type 1 Hexokinase Gene Expression in Isolated Glomeruli of Diabetic Rats and in Mesangial Cells. *Nephron. Physiol.* 2003;93:67-75.
- ²⁸ Ralf D. Metabolism and functions of glutathione in brain. *Prog. Neurobiol.* 2000;62:649-671.
- ²⁹ da-Silva WS, Gómez-Puyou A, de Gómez-Puyou MT et al. Mitochondrial Bound Hexokinase Activity as a Preventive Antioxidant Defense. *J. Biol. Chem.* 2004;279:39846-39855.
- ³⁰ Hu W, Jiang A, Liang J et al. Expression of VLDLR in the retina and evolution of subretinal neovascularization in the knockout mouse model's retinal angiomatous proliferation. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2008;49:407-415.
- ³¹ Tserentsoodol N, Sztein J, Campos M et al. Uptake of cholesterol by the retina occurs primarily via a low density lipoprotein receptor-mediated process. *Mol. Vis.* 2006;12:1306-1318.
- ³² Gordiyenko N, Campos M, Lee JW et al. RPE cells internalize low-density lipoprotein (LDL) and oxidized LDL (oxLDL) in large quantities in vitro and in vivo. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2004;45:2822-2829.
- ³³ Yamada Y, Tian J, Yang Y et al. Oxidized low density lipoproteins induce a pathologic response by retinal pigmented epithelial cells. *J. Neurochem.* 2008;105:1187-1197.
- ³⁴ Houssier M, Raoul W, Lavalette S et al. CD36 deficiency leads to choroidal involution via COX2 down-regulation in rodents. *PLoS Med.* 2008;5:e39.

- ³⁵ Lee JW, Fuda H, Javitt NB, Strott CA and Rodriguez IR. Expression and localization of sterol 27-hydroxylase (CYP27A1) in monkey retina. *Exp. Eye Res.* 2006;83:465-469.
- ³⁶ Bretillon L, Diczfalusy U, Bjorkhem I et al. Cholesterol-24S-hydroxylase (CYP46A1) is specifically expressed in neurons of the neural retina. *Curr. Eye Res.* 2007;32:361-366.
- ³⁷ Ramirez DM, Andersson S and Russell DW. Neuronal expression and subcellular localization of cholesterol 24-hydroxylase in the mouse brain. *J. Comp. Neurol.* 2008;507:1676-1693.
- ³⁸ Janowski BA, Grogan MJ, Jones SA et al. Structural requirements of ligands for the oxysterol liver X receptors LXR α and LXR β . *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 1999;96:266-271.
- ³⁹ Shafaati M, Olin M, Båvner A et al. Enhanced production of 24S-hydroxycholesterol is not sufficient to drive liver X receptor target genes in vivo. *J. Intern. Med.* 2011;270:377-387.
- ⁴⁰ Mitro N, Mak PA, Vargas L et al. The nuclear receptor LXR is a glucose sensor. *Nature* 2007;445:219-223.
- ⁴¹ Walczak R, Joseph SB, Laffitte BA et al. Transcription of the vascular endothelial growth factor gene in macrophages is regulated by liver X receptors. *J. Biol. Chem.* 2004;279:9905-9911.
- ⁴² Matsuo M, Campenot RB, Vance DE, Ueda K and Vance JE. Involvement of low-density lipoprotein receptor-related protein and ABCG1 in stimulation of axonal extension by apoE-containing lipoproteins. *Biochim. Biophys. Acta* 2011;1811:31-38.
- ⁴³ Dong X-Y and Tang S-Q. Insulin-induced gene: A new regulator in lipid metabolism. *Peptides* 2010;31:2145-2150.
- ⁴⁴ Qin X, Xie X, Fan Y et al. Peroxisome proliferator-activated receptor- δ induces insulin-induced gene-1 and suppresses hepatic lipogenesis in obese diabetic mice. *Hepatology* 2008;48:432-441.
- ⁴⁵ Li J, Yu X, Pan W and Unger RH. Gene expression profile of rat adipose tissue at the onset of high-fat-diet obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002;282:E1334-1341.

⁴⁶ Fort PE, Losiewicz MK, Reiter CEN et al. Differential Roles of Hyperglycemia and Hypoinsulinemia in Diabetes Induced Retinal Cell Death: Evidence for Retinal Insulin Resistance. *PLoS ONE* 2011;6:e26498.

Tables

Table 1: Composition of the experimental diets

	Standard	Fructose-enriched
	In g per kg of diet	
Casein	180	
Cornstarch	460	90
Sucrose	230	0
Fructose	0	600
Cellulose	20	
Mineral mix ^a	50	
Vitamin mix ^b	10	
Fat	50	

^a Composition (g/kg): sucrose, 110.7; CaCO₃, 240; K₂HPO₄, 215; CaHPO₄, 215; MgSO₄·7H₂O, 100; NaCl, 60; MgO, 40; FeSO₄·7H₂O, 8; ZnSO₄·7H₂O, 7; MnSO₄·H₂O, 2; CuSO₄·5H₂O, 1; Na₂SiO₇·3H₂O, 0.5; AlK(SO₄)₂·12H₂O, 0.2; K₂CrO₄, 0.15; NaF, 0.1; NiSO₄·6H₂O, 0.1; H₂BO₃, 0.1; CoSO₄·7H₂O, 0.05; KIO₃, 0.04; (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O, 0.02; LiCl, 0.015; Na₂SeO₃, 0.015; NH₄VO₃, 0.01.

^b Composition (g/kg): sucrose, 549.45; retinyl acetate, 1; cholecalciferol, 0.25; DL- α -tocopheryl acetate, 20; phylloquinone, 0.1; thiamine HCl, 1; riboflavin, 1; nicotinic acid, 5; calcium pantothenate, 2.5; pyridoxine HCl, 1; biotin, 1; folic acid, 0.2; cyanocobalamin, 2.5; choline HCl, 200; DL-methionine, 200; p-aminobenzoic acid, 5; inositol, 10.

Table 2: List of the 56 genes whose expression was evaluated

Reference	Gene name
Mm00432802_m1	Growth arrest and DNA-damage-inducible 45 A (<i>Gadd45a</i>)
Mm00437762_m1	Beta 2 microglobulin (<i>B2m</i>)
Mm00446953_m1	Glucuronidase b (<i>Gusb</i>)
Mm00507463_m1	Acetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1 (<i>Acat1</i>)
Mm00437573_m1	Apolipoprotein E (<i>ApoE</i>)
Mm00545833_m1	Arachidonate 12-lipoxygenase (<i>Alox12</i>)
Mm01250458_m1	Arachidonate 15-lipoxygenase (<i>Alox15</i>)
Mm01182743_m1	Arachidonate 5-lipoxygenase (<i>Alox5</i>)
Mm01350760_m1	ATP-binding cassette, sub-family A, member 1 (<i>Abca1</i>)
Mm00492035_m1	ATP-binding cassette, sub-family A, member 4 (<i>Abca4</i>)
Mm01348250_m1	ATP-binding cassette, sub-family G, member 1 (<i>Abcg1</i>)
Mm00446249_m1	ATP-binding cassette, sub-family G, member 5 (<i>Abcg5</i>)
Mm00445980_m1	ATP-binding cassette, sub-family G, member 8 (<i>Abcg8</i>)
Mm00432050_m1	BCL2-associated X protein (<i>Bax</i>)
Mm00432403_m1	CD36 antigen (<i>Cd36</i>)
Mm03047340_m1	CD68 antigen (<i>Cd68</i>)
Mm00441242_m1	Chemokine (C-C motif) ligand 2 (<i>Ccl2</i>)
Mm00438270_m1	Chemokine (C-C motif) receptor 2 (<i>Ccr2</i>)
Mm01302427_m1	Chemokine (C-C motif) ligand 5 (<i>Ccl5</i>)
Mm01701838_m1	Chemokine (C-X-C motif) ligand 3 (<i>Cxlc3</i>)
Mm00438259_m1	Chemokine (C-X-C motif) receptor 3 (<i>Cxcr3</i>)
Mm00442773_m1	Clusterin (<i>Clust</i>)
Mm01299243_m1	Complement component factor H (<i>Cfh</i>)
Mm00515567_m1	Crystallin AB (<i>Cryab</i>)
Mm00470430_m1	Cytochrome P450, family 27, subfamily a, polypeptide 1 (<i>Cyp27a1</i>)

Mm00487306_m1	Cytochrome P450, family 46, subfamily a, polypeptide 1 (<i>Cyp46a1</i>)
Mm00492097_m1	DNA-damage inducible transcript 3 (<i>Dadd153</i>)
Mm01253033_m1	Glial fibrillary acidic protein (<i>Gfap</i>)
Mm00439344_m1	Hexokinase 1 (<i>Hk1</i>)
Mm00479887_m1	HtrA serine peptidase 1 (<i>Htra1</i>)
Mm01282499_m1	3-Hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A reductase (<i>Hmgcr</i>)
Mm00463389_m1	Insulin induced gene 1 (<i>Insig1</i>)
Mm00516023_m1	Intercellular adhesion molecule 1 (<i>Icam</i>)
Mm00434455_m1	Integrin alpha M (<i>Cd11b</i>)
Mm00434513_m1	Integrin beta 2 (<i>Cd18</i>)
Mm01336189_m1	Interleukin 1b (<i>Il1b</i>)
Mm00446190_m1	Interleukin 6 (<i>Il6190</i>)
Mm00446191_m1	Interleukin 6 (<i>Il6191</i>)
Mm00500505_m1	Lecithin cholesterol acyltransferase (<i>Lcat</i>)
Mm00434770_m1	Lipoprotein lipase (<i>Lpl</i>)
Mm00440169_m1	Low-density lipoprotein receptor (<i>Ldlr</i>)
Mm00464608_m1	Low-density lipoprotein receptor-related protein 1 (<i>Lrp1</i>)
Mm01328171_m1	Low-density lipoprotein receptor-related protein 2 (<i>Lrp2</i>)
Mm00600163_m1	Matrix metalloproteinase 9 (<i>Mmp9</i>)
Mm00435015_m1	Microsomal triglyceride transfer protein (<i>Mtp</i>)
Mm00440485_m1	Nitric oxide synthase 2, inducible (<i>Nos2</i>)
Mm00476361_m1	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1 (<i>Nfkb1</i>)
Mm00479807_m1	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 2 (<i>Nfkb2</i>)
Mm00443451_m1	Nuclear receptor subfamily 1, group H, member 3 (<i>Lxr</i>)
Mm00627559_m1	Peroxisome proliferator activated receptor A (<i>Ppara</i>)

Mm01305433_m1	Peroxisome proliferator activator receptor D (<i>Ppard</i>)
Mm01184322_m1	Peroxisome proliferator activated receptor G (<i>Pparg</i>)
Mm00450234_m1	Scavenger receptor class B, member 1 (<i>Srb1</i>)
Mm00446224_m1	Solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 2 (<i>Glut2</i>)
Mm01138344_m1	Sterol regulatory element binding transcription factor 1 (<i>Srebp1</i>)
Mm00449726_m1	Superoxide dismutase 2, mitochondrial (<i>Sod2</i>)
Mm00443258_m1	Tumor necrosis factor (<i>Tnf</i>)
Mm00437304_m1	Vascular endothelial growth factor A (<i>Vegfa</i>)
Mm01333430_m1	Vimentin (<i>Vim</i>)

Figure legends

Figure 1: Scotopic single-flash ERG responses of mice fed a high-fructose diet. The amplitudes of a- and b-waves were diminished in WT and ApoB₁₀₀,LDLR^{-/-} fed the high-fructose diet and also in ApoB₁₀₀,LDLR^{-/-} fed the standard diet. The a-wave latency was increased only in WT fed the high-fructose diet.

Figure 2: Scotopic 10 Hz flicker ERG responses of mice fed with 60%-rich fructose diet.

Figure 3: Images of the retinal vascular structure in ApoB₁₀₀,LDLR^{-/-} mice after fluorescein dye injection at 488 nm and ICG at 795 nm. No abnormalities were observed in choroidal and retinal vessels in ApoB₁₀₀,LDLR^{-/-} mice and WT mice (images not shown).

Figure 4: Assessment of autofluorescence in the eyes of WT and ApoB₁₀₀,LDLR^{-/-} mice with SLO (488 nm). Autofluorescence dots were found around blood vessels into pericytes (b) and retina (c). Autofluorescence into pericytes and all neurosensory retina surface was observed in ApoB₁₀₀,LDLR^{-/-} mice, unlike WT mice in which we found only a few punctuated autofluorescent dots.

Figure 5: Heat map representation of gene expression in the neurosensory retina of WT and ApoB₁₀₀,LDLR^{-/-} mice fed the standard or high-fructose diet. The WT control group was used as the reference and *Gusb*, *Gadd45a*, and *B2m* were used as the endogenous control genes to calculate the indicated RQ values, as represented on the color scale.

Figure 6: Heat map representation of gene expression in the RPE/Ch complex of WT and ApoB₁₀₀,LDLR^{-/-} mice fed the standard or high-fructose diet. The WT control group was used as the reference and *Gusb*, *Gadd45a*, and *B2m* were used as the endogenous control genes to calculate the indicated RQ values, as represented on the color scale.

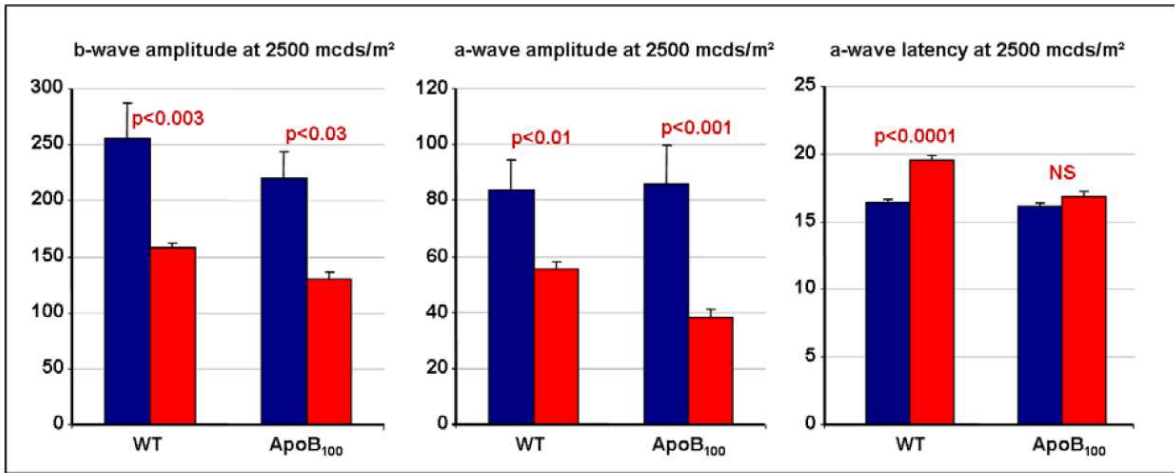


Figure 1

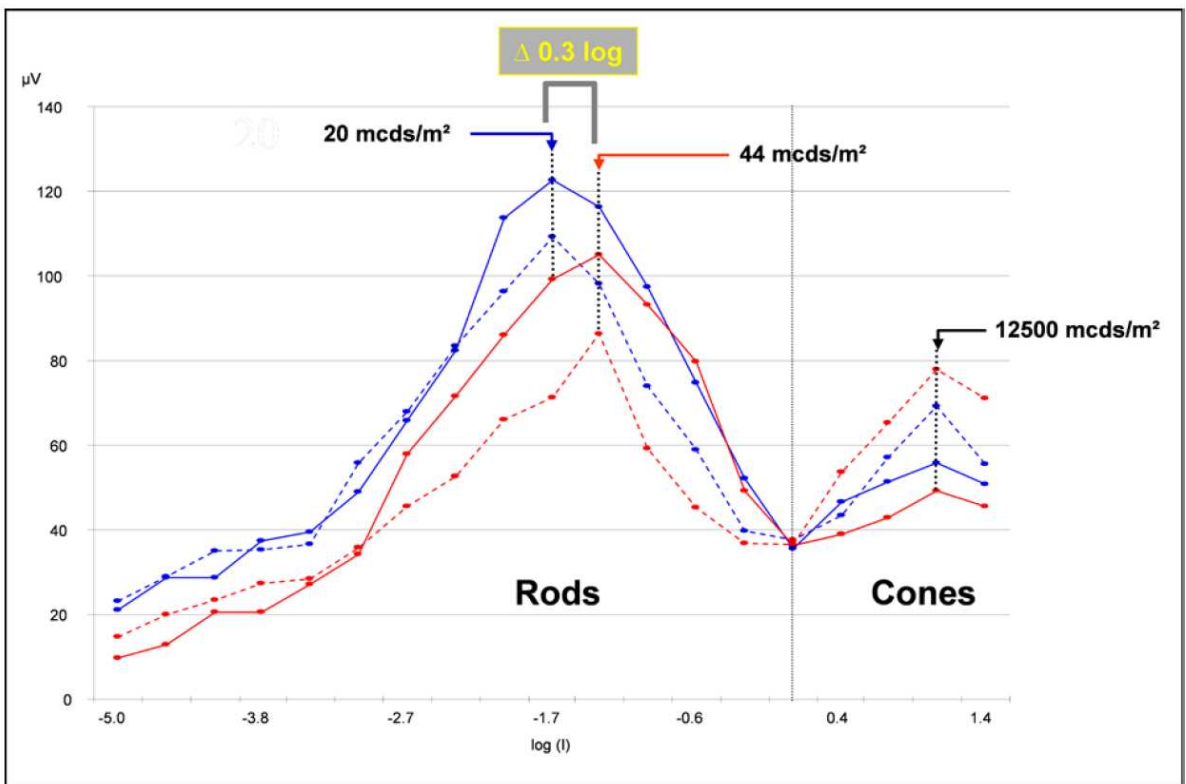


Figure 2

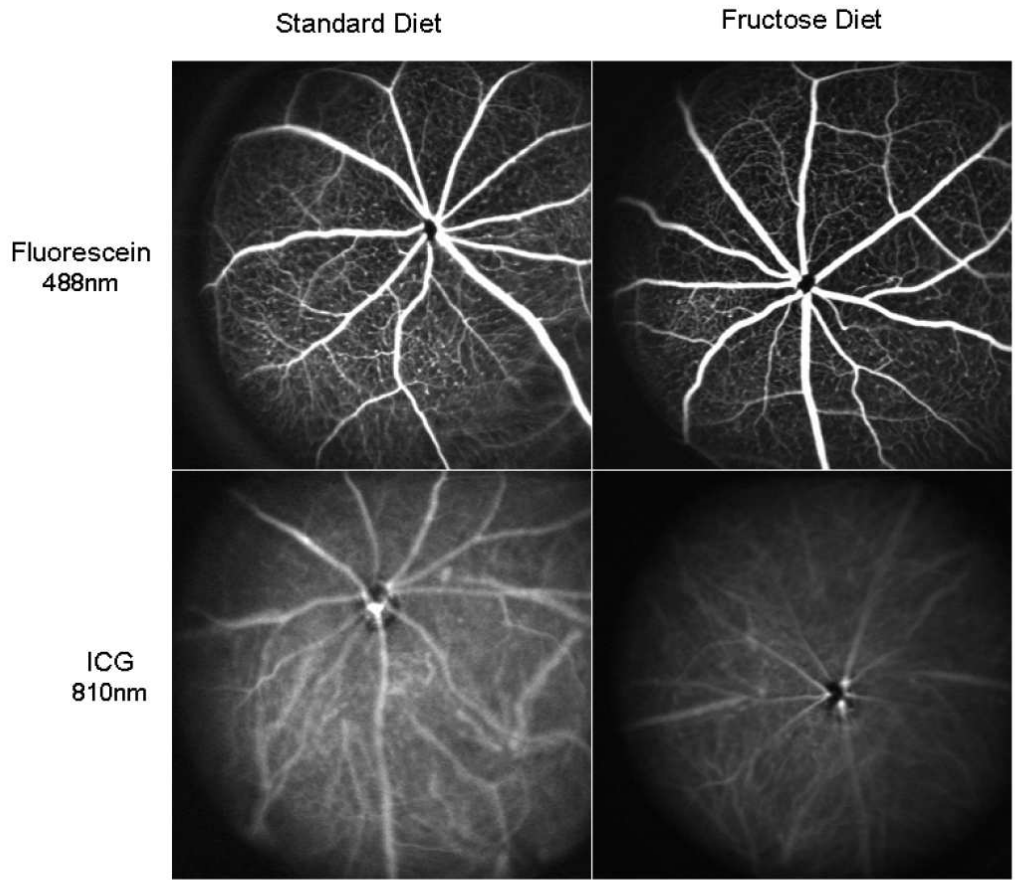


Figure 3

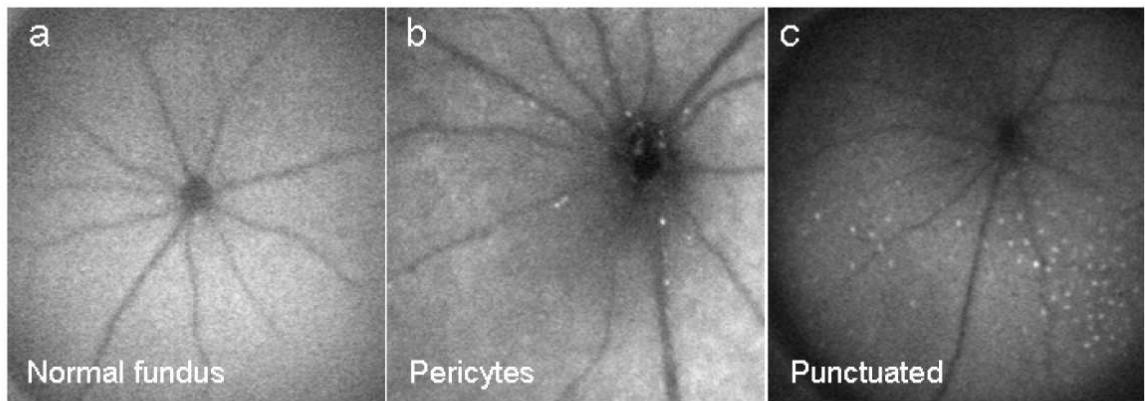


Figure 4

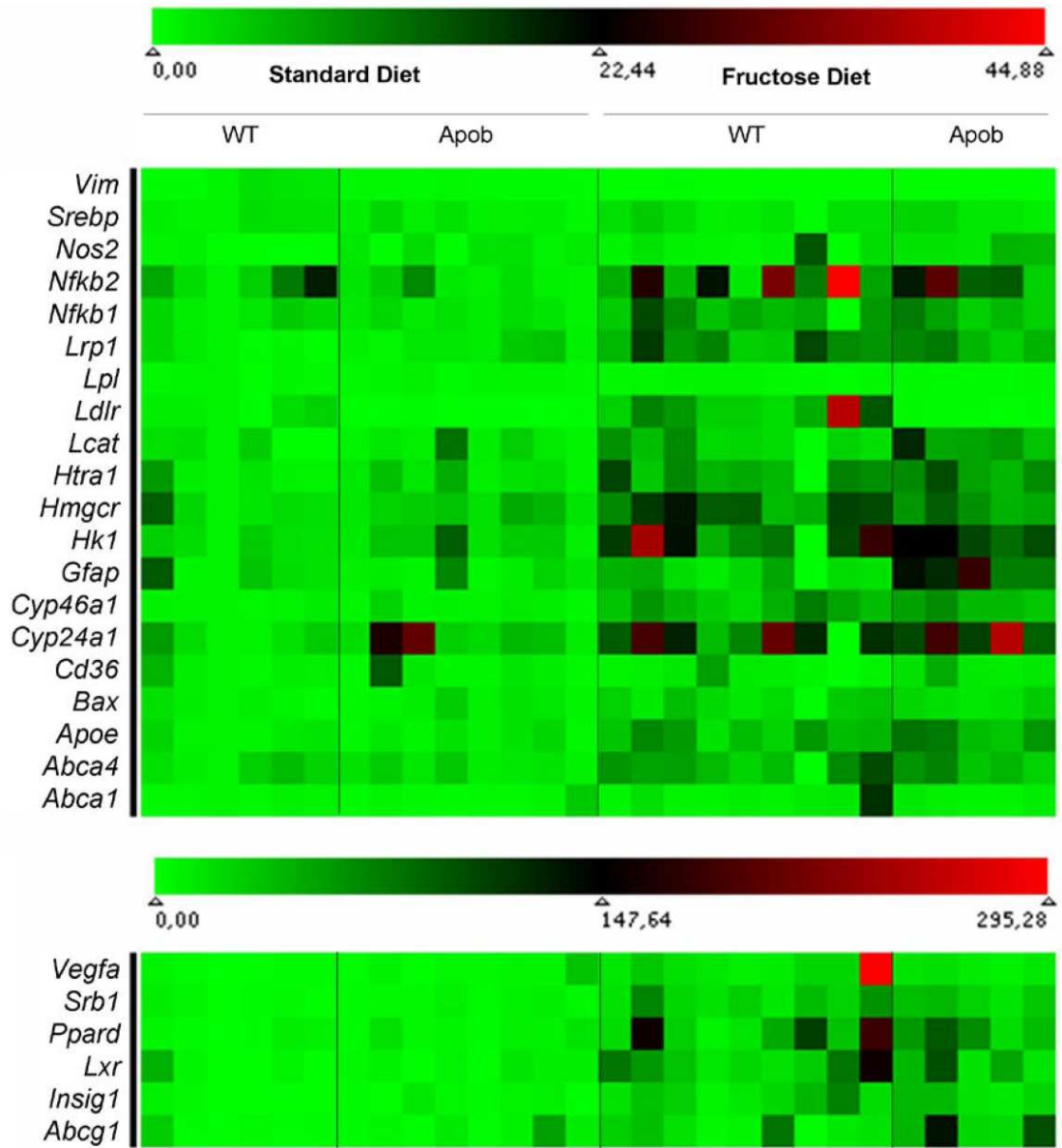


Figure 5

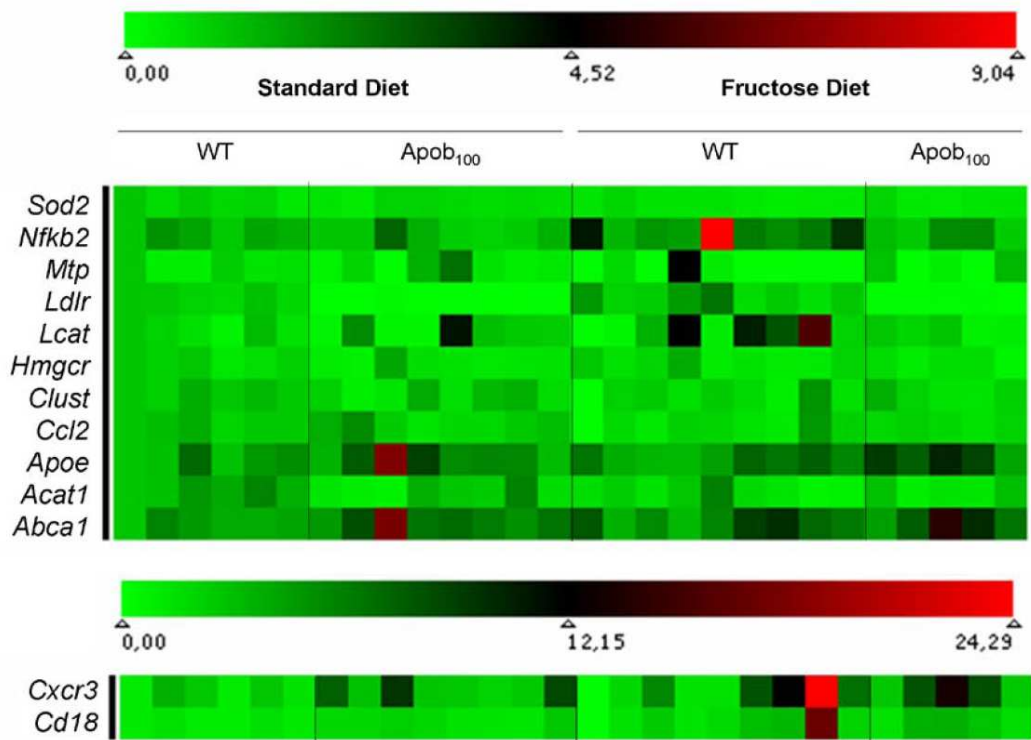


Figure 6

Résultats et conclusion

Régime standard : souris ApoB₁₀₀,LDLR^{-/-} vs souris sauvages

Chez les souris ApoB₁₀₀,LDLR^{-/-} témoins, la fonction rétinienne n'est pas altérée de façon significative comparativement aux les souris sauvages témoins. En revanche elles présentent de façon spontanée, des points autofluorescents au fond d'œil. Ces derniers n'ont pas été caractérisés cependant plusieurs travaux ont montrés une association entre des points autofluorescents au fond d'œil et la présence de cellules microgliales et/ou macrophages dans la rétine. Ainsi ces études suggèrent que les points autofluorescents sont des cellules immunitaires et donc le résultat d'une réponse inflammatoire dans la rétine. De plus, l'augmentation de la synthèse des protéines Cx3cr1 et Cd18 traduite par la surexpression des gènes *Cx3cr1* et *Cd18* dans le complexe EPR-Ch pourrait être un indice supplémentaire de l'infiltration de monocytes/macrophages circulants dans la rétine. En effet, Cx3cr1 est un récepteur membranaire qui se lie à la chimiokine Cx3cl1 impliquée dans le recrutement de cellules immunitaires de la circulation tandis que Cd18 participe à l'adhésion des leucocytes à l'endothélium lors de leur infiltration dans le tissu.

Les analyses d'expression génique dans la rétine et le complexe EPR-Ch ont permis de mettre en évidence une augmentation de l'expression des gènes *Abcg1*, *Abca1* notamment impliqués dans le métabolisme lipidique. Ces résultats peuvent s'expliquer par le phénotype dyslipidémique de la souris ApoB₁₀₀,LDLR^{-/-}. En effet nous pouvons penser que ces modifications sont induites pour faire face à l'afflux important de cholestérol et acide gras issus des VLDL et LDL circulants. De plus l'augmentation de l'expression de *Cd36* pourrait être induite pour compense l'absence de LDLR.

Ainsi, ces résultats permettent d'enrichir un peu plus nos connaissances sur le modèle murin ApoB₁₀₀, LDLR^{-/-} et surtout de montrer que la génétique peut influencer sur l'expression génique de la rétine et le complexe EPR-Ch.

Régime enrichi en fructose : souris ApoB₁₀₀,LDLR^{-/-} vs souris sauvages

Chez les souris sauvages et ApoB₁₀₀,LDLR^{-/-} nourries avec un régime enrichi en fructose, nous avons mis en évidence des altérations de la fonction rétinienne. En effet, après 8 mois de régime, l'ensemble des animaux présentent une diminution de la sensibilité de la rétine et une diminution de la réponse des photorécepteurs et de la rétine interne à un stimulus lumineux comparativement aux animaux nourris avec un régime standard. Contrairement à ce qu'on

pouvait attendre ces altérations ne sont pas aggravées chez les souris ApoB₁₀₀,LDLR^{-/-} comparés aux souris sauvages dans les mêmes conditions.

L'ensemble des animaux nourris avec un régime enrichi en fructose présentent également des points autofluorescents au fond d'œil et au niveau des vaisseaux rétiens. Cependant, là encore ces points autofluorescents ne semblent pas être augmentés chez la souris ApoB₁₀₀,LDLR^{-/-} par rapport aux souris sauvages. De la même façon que précédemment, ces points autofluorescents n'ont pas été caractérisés cependant l'association entre les travaux de Chen et Luhmann et la surexpression des gènes *Cx3cr1*, *Cd18*, *Bax*, *Gfap* et *Vegf* dans la rétine, laissent à penser que ces points pourraient être des cellules immunitaires et donc le résultat d'une réponse inflammatoire dans la rétine (Xu *et al.* 2008; Luhmann *et al.* 2009; Chen *et al.* 2011). De plus, la diminution de l'expression du gène *Sod2*, codant pour la superoxyde dismutase, dans le complexe EPR-Ch peut traduire une augmentation d'ERO dans le complexe EPR-Ch et donc probablement une augmentation de la production de biomolécules oxydées propices au stress oxydatif et à l'inflammation. Nous avons également mis en évidence des modifications d'expression génique chez les deux souches murines nourrie avec un régime enrichi en fructose. En effet, l'ensemble des animaux nourris avec un régime enrichi en fructose présentent une augmentation de l'expression de *ApoE*, *Srb1*, *Cyp46a1*, *Cyp27a1*, *Hmgcr*, *Lrp1*, *Lcat*, *Lxra*, *Ppard*, *Htra1*, *Hkl* et *Insig1* ainsi qu'une diminution de l'expression de *Lpl* dans la rétine neurale.

Il existe également des modifications spécifiques à chaque des souches :

- Chez les souris sauvages l'expression des gènes *Ldlr*, *Abca4*, *Abcg1* et *Srebp1* est surexprimées dans la rétine neurale. Dans le complexe RPE-Ch, les gènes *Abca1*, *Nfkb2*, *Cd18* et *Lcat* sont surexprimés tandis que *Acat1*, *Clusterin*, *Mtp* et *Ccl2* sont réprimés.
- Chez la souris ApoB₁₀₀,LDLR^{-/-}, dans la rétine neurale, les gènes *Abca1*, *Nfkb1*, *Nfkb2* sont surexprimés tandis que le gène *Vimentine* est réprimé. Dans le complexe RPE-Ch seul le gène *Cd36* est surexprimé.

Bien que l'expression de *Vegf* soit augmentée de façon significative dans les groupes de souris nourris avec un régime enrichi en fructose, aucune modification vasculaire ne fut observée.

Les résultats de cette étude permettent dans un premier temps de caractériser un peu mieux notre modèle ApoB₁₀₀,LDLR^{-/-}. En effet, nous avons montré que la souris ApoB₁₀₀,LDLR^{-/-} présentent des modifications du métabolisme, en particulier lipidique, dans la rétine et dans le complexe EPR-Ch et développerait une inflammation dans la rétine. Nous avons également

mis en évidence que les facteurs nutritionnels (dans notre cas, un régime enrichi en fructose) peuvent influencer sur le vieillissement rétinien et peuvent être à l'origine de l'induction d'une réponse adaptative de la rétine. Nous n'avons pas mis en évidence de modification vasculaire ni chez les souris sauvages, ni chez les souris ApoB₁₀₀,LDLR^{-/-}. Cependant les résultats rapportés par les examens au fond d'œil et la surexpression des gènes *Cx3cr1*, *Cd18*, *Bax* et *Gfap* dans la rétine suggèrent l'induction d'une réponse inflammatoire chez l'ensemble des animaux soumis au régime enrichi en fructose. Par ailleurs, l'augmentation du métabolisme des lipides peut aisément être expliquée par les effets du fructose qu'ils soient directs dans la rétine ou indirects, via sa métabolisation par le foie. En effet comme nous l'avons décrit précédemment, un régime enrichi en fructose est connu pour induire une augmentation de la production de VLDL par le foie et donc une augmentation des taux de VLDL et de LDL sanguins. Dans la rétine, la métabolisation du fructose peut également induire une augmentation de la production de cholestérol et de triglycérides. Nous pouvons alors suggérer que les modifications du métabolisme lipidique dans la rétine et le complexe EPR-Ch soient induites pour faire face 1) à l'afflux massif de cholestérol et d'acide gras issus des VLDL et LDL circulants, et 2) à l'augmentation de la production de cholestérol et d'acide gras dans la rétine suite à la métabolisation du fructose. La mise en place d'une réponse inflammatoire pourraient être liées à l'accumulation de cholestérol et d'acide gras et/ou à l'accumulation de d'ERO et de PTG dans la rétine. Cependant les résultats ne nous permettent pas de savoir s'il existe un lien de cause à effet entre l'activation des gènes et l'inflammation dans la rétine. Enfin nos résultats, permettent également de montrer que l'association de facteurs nutritionnels diabétogènes et génétiques (phénotype hypercholestérolémique à risque de DMLA) peut induire une augmentation de l'inflammation dans la rétine mais n'est pas nécessairement suffisante pour le déclenchement d'un phénotype pathologique.

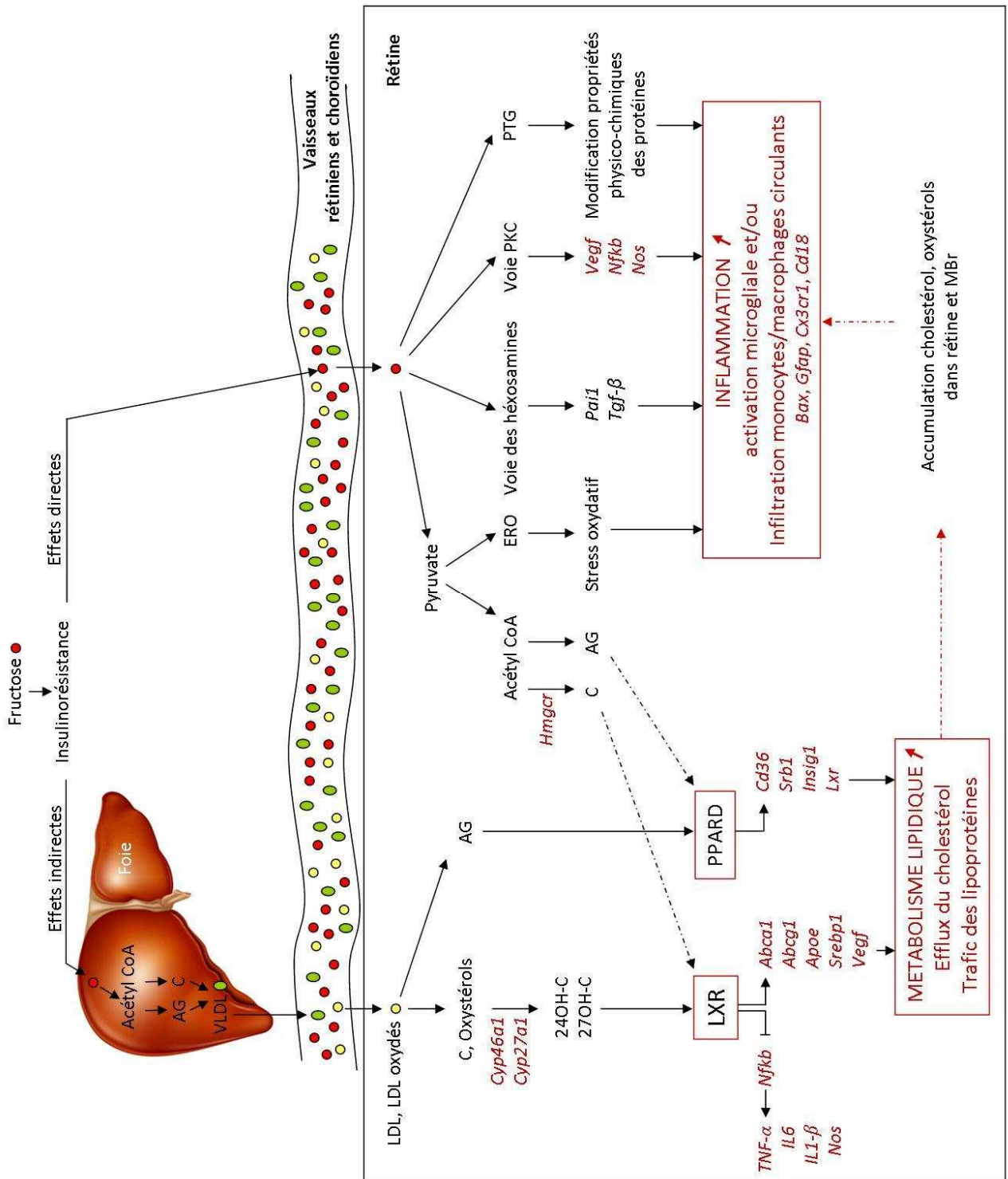


Figure 48 : Effets supposés d'un régime enrichi en fructose sur la rétine.

Quatrième partie :

Etude de l'effet de facteurs nutritionnels, en particulier des apports nutritionnels conseillés pour les acides gras, sur le vieillissement rétinien chez le rat

Problématique

Depuis quelques années, les traitements contre la DMLA ont beaucoup progressé avec l'apparition d'agents anti-VEGF. Cependant ces thérapies ne sont destinées qu'à des patients atteints de DMLA exsudative. Dans ce contexte, les stratégies préventives ont pris une importance non négligeable depuis quelques années. En effet, il semblerait que les acides gras $\omega 3$ notamment le DHA pourraient prévenir l'évolution de la DMLA vers ses formes les plus avancées (Seddon *et al.* 2006; Age-Related Eye Disease Study Research Group 2007; Sangiovanni *et al.* 2009) et l'apparition de l'insulinorésistance (Paniagua *et al.* 2011), facteur de risque principal de la RD. Plusieurs études épidémiologiques tendent à prouver que le développement et la progression de la DMLA est réduite chez les personnes et patients dont le régime alimentaire est riche en acides gras $\omega 3$ et en particulier en poisson. Certaines études ont notamment montré que cette réduction est d'autant plus importante que la consommation d'acides gras $\omega 6$ est limitée (acide linoléique en particulier). Depuis quelques années, les lipides et particulièrement l'EPA et le DHA font l'objet de recommandations nutritionnelles. Sous l'égide de l'agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES), un groupe d'experts a récemment revisité les recommandations nutritionnelles. Dans ce rapport de mai 2011, il est clairement recommandé d'augmenter la consommation en EPA et DHA jusqu'à 500mg par jour, l'apport en chacun des deux devant être de 250mg par jour pour bénéficier de leurs effets potentiellement protecteurs de la DMLA.

Les mécanismes moléculaires responsables de l'effet bénéfique des $\omega 3$ sur la DMLA restent encore méconnus. Cependant il est actuellement suggéré que la NPD1, métabolite du DHA, issu de l'action de la 15-lipoxygénase serait le réel médiateur des propriétés neuroprotectrices attribuées au DHA.

Dans ce contexte nous avons cherché à savoir si 1) la consommation d'acides gras $\omega 3$ permet d'enrichir les tissus et particulièrement la rétine en $\omega 3$ et 2) la diminution de la consommation en acides gras $\omega 6$ et notamment en acide linoléique pouvait potentialiser l'enrichissement des tissus en $\omega 3$. Nous avons également cherché à savoir si les $\omega 3$ peuvent influencer sur la physiologie et le métabolisme général de la rétine dans le but de mieux comprendre le rôle des $\omega 3$. Afin de répondre à ces questions, des rates gestantes et leurs petits jusqu'à 11 semaines après leurs naissance ont été nourris avec un régime plus ou moins enrichi en acides gras $\omega 3$ et $\omega 6$. Le profil en acides gras a été analysé sur divers tissus dont la rétine. Nous avons

également évalué la fonctionnalité rétinienne et l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme lipidique.

Les résultats de ces travaux ont été publiés dans le journal « Experimental Eye Research » et ont servi à l'écriture d'une partie d'une revue publiée dans « OCL » et à la rédaction de la critique d'un article dans « Expert Review of Ophthalmology » (cf annexe).



Decreasing dietary linoleic acid promotes long chain omega-3 fatty acid incorporation into rat retina and modifies gene expression[☆]

Emilie Simon^a, Bertrand Bardet^a, Stéphane Grégoire^a, Niyazi Acar^a, Alain M. Bron^{a,b}, Catherine P. Creuzot-Garcher^{a,b}, Lionel Bretillon^{a,*}

^aEye and Nutrition Research Group, Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation, UMR 1324 INRA, 6265 CNRS, University of Burgundy, Dijon, France

^bDepartment of Ophthalmology, University Hospital, Dijon, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 21 March 2011

Accepted in revised form 26 July 2011

Available online 2 August 2011

Keywords:

lipid
nutrition
retina
retinal pigment epithelium
gene expression

ABSTRACT

Age-related macular degeneration (AMD) may be partially prevented by dietary habits privileging the consumption of ω 3 long chain polyunsaturated fatty acids (ω 3s) while lowering linoleic acid (LA) intake. The present study aimed to document whether following these epidemiological guidelines would enrich the neurosensory retina and RPE with ω 3s and modulate gene expression in the neurosensory retina. Rat progenitors and pups were fed with diets containing low or high LA, and low or high ω 3s. After scotopic single flash and 8-Hz-Flicker electroretinography, rat pups were euthanized at adulthood. The fatty acid profile of the neurosensory retina, RPE, liver, adipose tissue and plasma was analyzed using gas chromatography. Gene expression was analyzed with real-time PCR in the neurosensory retina. Diets rich in ω 3s efficiently improved the incorporation of ω 3s into the organs and tissues. This raising effect was magnified by lowering LA intake. Compared to a diet with high LA and low ω 3s, low LA diets significantly upregulated LDL-receptor gene expression. Similar but not significant upregulation of CD36, ABCA1, ALOX5 and ALOX12 gene expression was observed in rats fed with low LA. No effect was observed on retinal function. Increasing the intake in ω 3s and lowering LA improved the enrichment with ω 3s of the tissues, including the neurosensory retina and RPE, and upregulated genes involved in lipid trafficking in the neurosensory retina. Those results consistently reinforced the beneficial role of ω 3s in the prevention of AMD, especially when the diet contained low levels of LA, as suggested from epidemiological data.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Aging is associated with biological changes in the neurosensory retina and retinal pigment epithelium (RPE), which may contribute to the development of age-related maculopathies (ARM) and age-related macular degeneration (AMD), the leading cause of blindness

after 60 years of age in Western populations (Fine et al., 2000; Klein et al., 1992; Vingerling et al., 1995). Epidemiological studies have reported the benefit of an increased consumption of ω 3 long chain polyunsaturated fatty acids (LC-PUFAs), including docosahexaenoic acid (DHA), and low intake in linoleic acid (LA) from the ω 6 series of PUFAs in the prevention of ARM and AMD (Age-Related Eye Disease Study Research Group, 2007; Sangiovanni et al., 2009; Seddon et al., 2003, 2006, 2001; Tan et al., 2009). In a previous report based on samples from humans, we found that LA in adipose tissue, used as a surrogate for the long-term history of fat intake, was positively associated with LA in the neurosensory retina. On the contrary, no similar association was observed with DHA (Bretillon et al., 2008). The competition between ω 3 and ω 6 PUFAs for both conversion into LC-PUFAs and incorporation into tissues and organs has been known for years (Simopoulos, 2009). A high ratio of LA to α -linolenic acid (ALA), the precursor of DHA, contributes to reduced levels of DHA in the brain (Novak et al., 2008) and retina (Lin et al., 1994). The extreme situation is observed in animals reared for at least one generation under strict ω 3 PUFA deficiency, including ALA and ω 3 LC-PUFAs. LA is the sole dietary PUFA available as a precursor for LC-PUFAs and is

Abbreviations: AA, arachidonic acid; ALA, α -linolenic acid; AMD, age-related macular degeneration; ARM, age-related maculopathy; DHA, docosahexaenoic acid; DPA, docosapentaenoic acid; EPA, eicosapentaenoic acid; ERG, electroretinography; LA, linoleic acid; LC-PUFA(s), long chain polyunsaturated fatty acid(s); RPE, retinal pigment epithelium; RQ, relative quantity.

[☆] Support: Financial support was provided by INRA (Human Nutrition Department, France), Laboratoires Horus Pharma (Saint Laurent du Var, France, grant no. 29000305), and the Regional Council of Burgundy (France) (PhD fellowship for ES, grant no. 29000362).

* Corresponding author. University of Burgundy, Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation, UMR 1324 INRA, 6265 CNRS, Eye and Nutrition Research Group, 17 rue Sully, BP86510, F21065 Dijon cedex, France. Tel.: +33 380693121; fax: +33 380693223.

E-mail address: lionel.bretillon@dijon.inra.fr (L. Bretillon).

converted into the $\omega 6$ analog of DHA – docosapentaenoic acid $\omega 6$ (DPA $\omega 6$) – which to some extent is considered a biomarker for $\omega 3$ PUFA deficiency (Bourre et al., 1989; Neuringer et al., 1986). Meanwhile DHA levels in the retina are lowered (Moriguchi et al., 2004; Neuringer et al., 1986; Salem Jr et al., 2005; Weisinger et al., 1996) and associated with impaired visual function (Bourre et al., 1989; Bush et al., 1994; Jeffrey and Neuringer, 2009; Neuringer et al., 1986; Weisinger et al., 1996). These conditions of dietary $\omega 3$ deficiency are far from nutritional reality in humans. To our knowledge, little is known about the availability of $\omega 3$ LC-PUFAs for the retina under low or high intake of dietary LA, but adequate ALA intake. The consequences of these dietary conditions on gene expression in the retina also remain undefined.

The present study aimed to document whether increasing $\omega 3$ LC-PUFAs and lowering LA intakes, as suggested from epidemiological studies on ARM and AMD (Age-Related Eye Disease Study Research Group, 2007; Sangiovanni et al., 2009; Seddon et al., 2003, 2006, 2001; Tan et al., 2009), would modify the fatty acid profile and gene expression of the retina in the rat.

2. Materials and methods

2.1. Ethical concerns

The animal experiment was conducted in accordance with the ARVO Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research as well as with the French regulations (personal agreement no. 21CAE095 for LB and animal quarters agreement no. A21 231010EA).

2.2. Preparation of the diets

Commercial high-oleic sunflower oil, sunflower oil, palm oil, rapeseed oil and fish oil were mixed in various proportions to prepare the four following lipid blends: low content in LA and high content in $\omega 3$ LC-PUFAs ($LA^- \omega 3^+$), low content in both LA and $\omega 3$ LC-PUFAs ($LA^- \omega 3^-$), high content in both LA and $\omega 3$ LC-PUFAs ($LA^+ \omega 3^+$), and high content in LA and low content in $\omega 3$ LC-PUFAs ($LA^+ \omega 3^-$). The lipid blends were used to prepare rodent diets whose composition is reported in Table 1.

2.3. Animals

The animals were housed in animal quarters under controlled temperature (22 ± 1 °C) and light conditions (12-h light, 12-h dark cycle). Female Long-Evans rats (11 weeks of age, Centre d'élevage Janvier, Le-Genest-Saint-Isle, France) were mated with male rats (11 weeks of age, Centre d'élevage Janvier, Le-Genest-Saint-Isle, France) and fed *ad libitum* until weaning of their litters with either one of the four experimental diets ($n = 6$ females per group). Ten to 13 male rats per group were maintained under the diet fed to their respective mothers until electroretinographic (ERG) evaluation of the retinal function, euthanasia and collection of tissues and organs at 10 weeks of age.

2.4. Electroretinography

The ERGs were obtained according to previously published procedures (Seeliger et al., 2001). Before ERG recordings, the rats ($n = 9–13$ in each group) were dark-adapted for at least 6 h. All further procedures were carried out under dim red light ($\lambda 650$ nm) and at a constant temperature of 25 °C. Anesthesia was induced by intramuscular injection of ketamine (50 mg/kg, Imalgène® 1000, Merial, Lyon, France) and xylazine (10 mg/kg, Rompun® 2%, Bayer, Puteau, France). The pupils were dilated with 0.5% tropicamide (Ciba Vision

Table 1
Composition of the experimental diets (in g/kg diet).

	$LA^+ \omega 3^-$	$LA^+ \omega 3^+$	$LA^- \omega 3^-$	$LA^- \omega 3^+$
Casein				180
Cornstarch				400
Sucrose				60
Maltodextrin				200
Cellulose				50
Mineral mix ^a				50
Vitamin mix ^b				10
Fat including				50
Total saturated fatty acids	8.9	8.9	12.9	14.3
Total monounsaturated fatty acids	16.9	15.0	29.7	25.2
LA (linoleic acid, $\omega 6$)	22.6	19.7	5.5	4.0
ALA (α -linolenic acid, $\omega 3$)	0.80	0.65	0.90	0.65
Total $\omega 3$ LC-PUFAs, including	0.1	4.0	0.1	3.9
EPA (eicosapentaenoic acid)	0	1.0	0	1.0
DPA $\omega 3$ (docosapentaenoic acid $\omega 3$)	0	0.18	0	0.18
DHA (docosahexaenoic acid)	0.10	2.85	0.10	2.70
Total $\omega 6$ LC-PUFAs, including	0	0.82	0	0.85
Arachidonic acid	0	0.50	0	0.53
DPA $\omega 6$ (docosapentaenoic acid $\omega 6$)	0	0.32	0	0.32

^a Composition (g/kg): sucrose, 110.7; CaCO₃, 240; K₂HPO₄, 215; CaHPO₄, 215; MgSO₄·7H₂O, 100; NaCl, 60; MgO, 40; FeSO₄·7H₂O, 8; ZnSO₄·7H₂O, 7; MnSO₄·H₂O, 2; CuSO₄·5H₂O, 1; Na₂SiO₃·3H₂O, 0.5; AlK(SO₄)₂·12H₂O, 0.2; K₂CrO₄, 0.15; NaF, 0.1; NiSO₄·6H₂O, 0.1; H₂BO₃, 0.1; CoSO₄·7H₂O, 0.05; KIO₃, 0.04; (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O, 0.02; LiCl, 0.015; Na₂SeO₃, 0.015; NH₄VO₃, 0.01.

^b Composition (g/kg): sucrose, 549.45; retinyl acetate, 1; cholecalciferol, 0.25; DL- α -tocopheryl acetate, 20; phyloquinone, 0.1; thiamine HCl, 1; riboflavin, 1; nicotinic acid, 5; calcium pantothenate, 2.5; pyridoxine HCl, 1; biotin, 1; folic acid, 0.2; cyanocobalamin, 2.5; choline HCl, 200; DL-methionine, 200; p-aminobenzoic acid, 5; inositol, 10.

Ophthalmics, Blagnac, France). Hydroxymethylcellulose (Humigel®, Virbac, Carros, France) was topically applied on corneas to ensure good electrical contact and to keep the eye hydrated during the entire procedure. After 10 min, rats were positioned in a warming plate that maintained a constant body temperature, and the corneal electrodes were put in place. The ERG was recorded via corneal electrodes (thin gold wire with a 3-mm ring end); reference and ground electrodes (silver needle) were placed on the forehead and tail, respectively. The recording setup featured a Ganzfeld bowl, an amplifier, and a computer-based control and recording unit (RETI port/scan 21, Stasche & Finger GmbH, Roland Consult, Brandenburg, Germany). ERG responses were recorded from both eyes simultaneously after the rats were placed in the Ganzfeld bowl. Band-pass filter cutoff frequencies were 0.1 and 3000 Hz. Responses to strain flashes (flicker) were obtained for a fixed frequency (8 Hz) with a range of intensities (0.0003–10 cd/m² in steps of 0.35 logarithmic units).

2.5. Sample collection

The animals (10–12 per group) were deeply anesthetized with gas (Isoflurane, Centre Spécialités Pharmaceutiques, Cournon d'Auvergne, France), exsanguinated by aortic puncture and euthanized. Plasma was prepared by centrifugation. A piece of retroperitoneal adipose tissue and the liver were collected. Rats were enucleated. The anterior segment of the eye was removed after a circular section at the limbus. The posterior pole was placed on a back-lit table, moistened in saline, and the neurosensory retina was removed with forceps. The RPE was gently scraped from the posterior pole and collected in saline. We assume low contamination of our RPE preparation with choroid since only low amounts of cholesteryl esters were detected (less than 1% of the lipids). Cholesteryl esters have been quantified according to previously described (Bretillon et al., 2008). Since cholesteryl esters are parts of extracellular deposits in Bruch's membrane between RPE and choroid (Curcio et al., 2010), we would have found larger amounts

of cholesteryl esters therein in case of choroid contamination. All samples were stored at -80°C until further fatty acid analysis. One neurosensory retina per animal was collected for fatty acid analysis. The second neurosensory retina was stored in the RNAlater[®] solution at -80°C until further RNA extraction.

2.6. Lipid analyses

Lipids were extracted from plasma, adipose tissue, liver and neurosensory retina according to the Folch method (Folch et al., 1957). Lipids were extracted from plasma and RPE according to Moilanen and Nikkari (Moilanen and Nikkari, 1981). Lipids from adipose tissue, neurosensory retina, RPE, liver, red blood cells and plasma were transmethylated using boron trifluoride in methanol according to Morrison and Smith (Morrison and Smith, 1964). Fatty acid methyl esters were subsequently extracted with hexane and analyzed using gas chromatography on a Hewlett Packard Model 5890 gas chromatograph (Palo Alto, CA, USA) using a CPSIL-88 column (100 m \times 0.25 mm i.d., film thickness 0.20 μm ; Varian, Les Ulis, France) equipped with a flame ionization detector (FID). Hydrogen was used as the carrier gas (inlet pressure, 210 kPa). The oven temperature was held at 60°C for 5 min, increased to 165°C at $15^{\circ}\text{C}/\text{min}$ and held for 1 min, and then to 225°C at $2^{\circ}\text{C}/\text{min}$ and finally held at 225°C for 17 min. The injector and the detector were maintained at 250°C . Fatty acid methyl esters were identified by comparison with commercial and synthetic standards (Sigma–Aldrich, L'Isle d'Abeau, France). The data were processed using the EZChrom Elite software (Agilent Technologies, Massy, France) and reported as a percentage of the total fatty acids, after taking into account the FID coefficients of response of the 36 main fatty acids (from lauric acid to DHA).

2.7. Analyses of gene expression in the neurosensory retina

Total RNA from the neurosensory retina ($n = 6$ in each group) were extracted using a commercial kit following the manufacturer's procedure (RNAqueous, Applied Biosystems, Courtaboeuf, France). cDNA were prepared using oligo-dT as the primer and the High-Capacity RNA-to-cDNA Master Mix from Applied Biosystems. The quality and concentration of the cDNA samples were checked by qPCR analysis of glucuronidase beta (GUSB) expression using TaqMan technology (ABI7900 Fast Real-Time PCR system, Applied Biosystems). The expression of 32 genes, including genes coding for nuclear factors, lipid metabolizing enzymes, and chemokines (Table 2), was analyzed using qPCR with the TaqMan Array Plates FAST Custom (ABI7900 Fast Real-Time PCR system, Applied Biosystems).

2.8. Statistical analyses

The RQ (Relative Quantity) gene expression data were analyzed using Data Assist Software (Applied Biosystems). GUSB was used to normalize the data. Data from the $\text{LA}^{+\omega 3-}$ group were considered as the reference. Data on fatty acid composition were analyzed with the nonparametric Kruskal–Wallis test in SAS (SAS Institute, Cary, NC, USA). Differences were considered significant at $p < 0.05$. The Spearman correlation coefficient was calculated to determine the association between LA, DPA $\omega 6$ and DHA levels in SAS (SAS Institute, Cary, NC, USA).

3. Results

3.1. Fatty acid profile of tissues

Increasing the intake in $\omega 3$ LC-PUFAs in animals fed a low or high amount of LA increased the content of the neurosensory retina in EPA (Fig. 1A), DPA $\omega 3$ (Fig. 1B) and DHA (Fig. 1C). The magnitude

Table 2
List of the 32 genes whose expression was analyzed in the neurosensory retina.

Gene symbol	Name	Reference Sequence
18S – control gene	Ribosomal 18S sub-unit	X_03205
ABCA1	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 1	NM_178092.2
Acadvl	Acyl-Coenzyme A dehydrogenase, very long chain	NM_012891.1
ACAT1	Acetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1	NM_17075.1
Actinb – control gene	Actin beta	NM_031144.2
ALOX12	Arachidonate 12-lipoxygenase	NM_001105798.1
ALOX5	Arachidonate 5-lipoxygenase	NM_12822.1
ALOX5ap	Arachidonate 5-lipoxygenase-activating protein	NM_017260.2
ApoE	Apolipoprotein E	NM_138828.2
CD36	CD36 molecule	NM_031561.2
COX2	Prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase) (COX2)	NM_017232.3
CYP27A1	Cholesterol-27-hydroxylase	NM_178847.2
CYP46A1	Cholesterol-24-hydroxylase	NM_001108723.1
FADS1	Fatty acid delta 5 desaturase	NM_053445.2
FADS2	Fatty acid delta 6 desaturase	NM_031344.2
FADS3	Fatty acid delta 9 desaturase	NM_173137.1
GUSB – control gene	Glucuronidase β	NM_017015.2
HADHb	Hydroxyacyl-Coenzyme A dehydrogenase/3-ketoacyl-Coenzyme A thiolase/enoyl-Coenzyme A hydratase (trifunctional protein), beta sub-unit	NM_133618.1
HMGCR	3-Hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A reductase	NM_013134.2
IL1 β	Interleukin 1 β	NM_031512.2
IL6	Interleukin 6	NM_012589.1
LDLR	Low density lipoprotein receptor	NM_17576.2
LXR- α	Nuclear receptor sub-family 1, group H, member 3 (LXR- α)	NM_031627.2
PLA2	Phospholipase A ₂ , group IVA (cytosolic, calcium-dependent)	NM_133551.2
PPAR- α	Peroxisome proliferator-activated receptor α	NM_013196.1
PPAR- δ	Peroxisome proliferator-activated receptor δ	NM_013142.2
PPAR- γ	Peroxisome proliferator-activated receptor γ	NM_001138839.1
RXR- α	Retinoid X receptor α	NM_012805.2
SREB-f1	Sterol regulatory element binding transcription factor 1	XM_213329.2
SREB-f2	Sterol regulatory element binding transcription factor 2	NM_001033694.1
TxAS1	Thromboxane A synthase 1	NM_012687.1
TNF	Tumor necrosis factor	NM_012675.3

of the increase in EPA and DPA $\omega 3$, but not with DHA, was greater in the groups fed a low level of LA compared to a high level of LA (Figure 1A, 1B and 1C). (See Supplementary Tables for extended composition of the tissues).

Considering the data from the animals of the four experimental groups together, DHA in adipose tissue and plasma were positively correlated with each other ($r_{\text{Spearman}} = 0.77$, $p < 0.0001$, data not shown). The DHA content of the neurosensory retina was positively associated with DHA in plasma ($r_{\text{Spearman}} = 0.32$, $p = 0.03$, data not shown). On the contrary, DHA in the neurosensory retina and adipose tissue were not ($r_{\text{Spearman}} = 0.26$, $p = 0.08$, data not shown), as we previously reported in humans (Bretilon et al., 2008).

The greatest LA content in the neurosensory retina was found in animals fed with high amounts of LA ($\text{LA}^{+\omega 3-}$ and $\text{LA}^{+\omega 3+}$) but remained low with less than 1% of total fatty acids (Fig. 2A and Supplementary Tables). LA in the neurosensory retina was positively associated with LA in adipose tissue and plasma ($r_{\text{Spearman}} = 0.70$ and

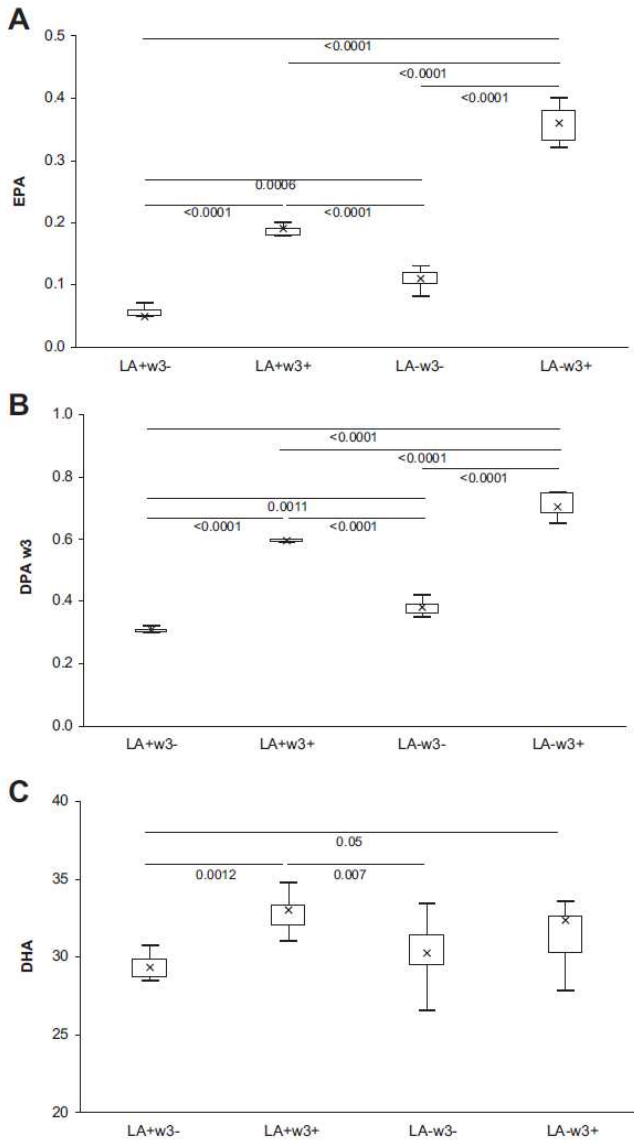


Fig. 1. Levels of eicosapentaenoic acid (EPA) (1A), ω 3 docosapentaenoic acid (DPA ω 3) (1B), and docosahexaenoic acid (DHA) (1C) in the neurosensory retina of animals fed with diets containing high or low amounts of linoleic acid (LA) and ω 3 LC-PUFAs. Data are expressed as the percentage of total fatty acids (median \times , range given by the first and third quartiles).

0.79, respectively, $p < 0.0001$, data not shown), as we previously reported in humans with adipose tissue LA (Bretillon et al., 2008).

Interestingly, the contents of LA and DHA in the neurosensory retina were inversely and significantly associated with each other in the groups of animals with low intake of LA ($r_{\text{Spearman}} = -0.62$ and -0.83 ; $p = 0.02$ and 0.0008 , respectively in the $\text{LA}^- \omega^3^-$, and $\text{LA}^- \omega^3^+$ groups) but not in those fed with a high amount of LA ($r_{\text{Spearman}} = -0.24$ and -0.38 , respectively, in the $\text{LA}^+ \omega^3^-$ and $\text{LA}^+ \omega^3^+$ groups, $p > 0.05$).

Low amounts of DPA ω 6 (less than 1%), a tissue marker of ω 3 PUFAs deficiency (Bourre et al., 1989), were reported in the neurosensory retina of animals fed with high intakes of ω 3 LC-PUFAs, and in animals fed with low LA. The highest DPA ω 6 concentration was found in animals fed with low ω 3 LC-PUFAs and high LA.

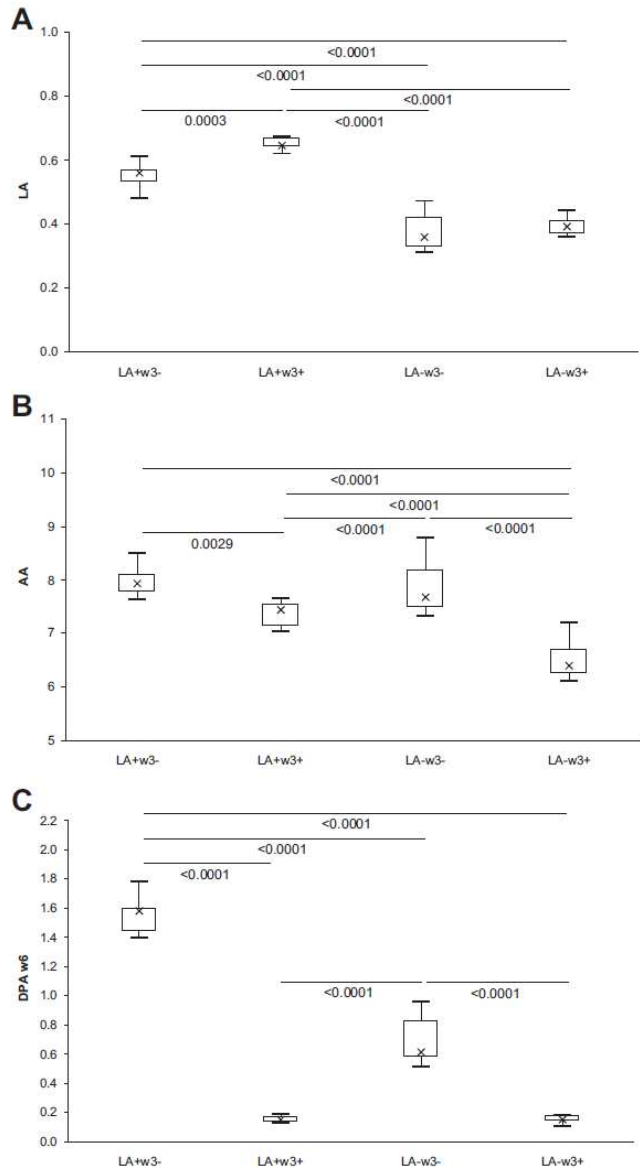


Fig. 2. Levels of linoleic acid (LA) (2A), arachidonic acid (AA) (2B), and docosapentaenoic acid (DPA ω 6) (2C) in the neurosensory retina of animals fed with diets containing high or low amounts of LA and ω 3 LC-PUFAs. Data are expressed as the percentage of total fatty acids (median \times , range given by the first and third quartiles).

Low ω 3 LC-PUFAs intakes were associated with the highest contents in AA (Fig. 2B) and DPA ω 6 (Fig. 2C) in the neurosensory retina. Similar findings were found in plasma and liver (See Supplementary Tables). DPA ω 6 and DHA were positively associated with each other in the neurosensory retina of animals fed with high LA and low ω 3 LC-PUFAs ($\text{LA}^+ \omega^3^-$) ($r_{\text{Spearman}} = 0.72$, $p = 0.03$, data not shown) and in humans ($r_{\text{Spearman}} = 0.33$, $p = 0.04$) (Bretillon et al., 2008).

Feeding ω 3 LC-PUFAs significantly increased the content of the RPE in EPA (Fig. 3A), DPA ω 3 (Fig. 3B), and DHA (Fig. 3C), especially when the diet contained low amounts of LA ($\text{LA}^- \omega^3^+$). Despite supplementing the diet with ω 3 LC-PUFAs, the RPE failed to be enriched with DHA when the diet contained large amounts of LA (Fig. 3C). AA was significantly lowered in the RPE in animals fed with low LA and/or ω 3 LC-PUFAs, compared to animals fed with high LA and low ω 3 LC-PUFAs (Fig. 3D). The ratio of EPA to AA is

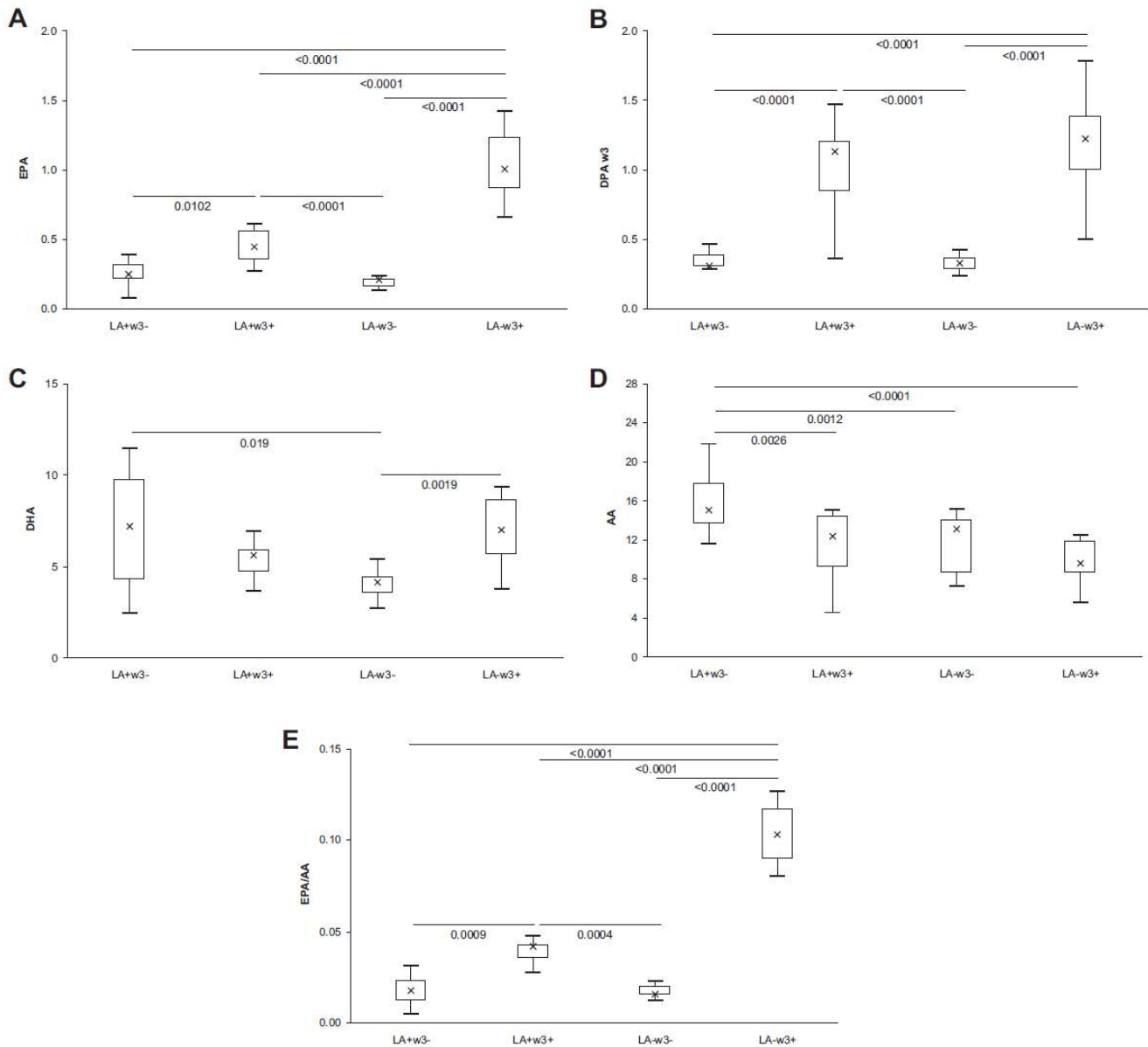


Fig. 3. Levels of EPA (3A), DPA ω3 (3B), DHA (3C), AA (3D), and the ratio of EPA to AA (3E) in the retinal pigment epithelium of animals fed with diets containing high or low amounts of linoleic acid (LA) and ω3 long chain PUFAs. Data are expressed as the percentage of total fatty acids (median ×, range given by the first and third quartiles).

significantly increased in diets high in LA compared to low LA diets. This effect was magnified by high intakes in ω3 LC-PUFAs (Fig. 3E).

3.2. Electroretinographic response

The presence of low or high LA content and ω3 LC-PUFAs in the diet had no effect on the maximal sensitivity to light stimulus of rods, as assessed by 8-Hz ERG. Indeed the maximum response of the rods was observed at 0.03 mcds/m² (log(I) = -4.5) in all four groups of animals (data not shown).

3.3. Gene expression in the neurosensory retina

Expression of various genes (see Table 2) including genes coding for lipid transporters or receptors (LDLR, CD36, ABCA1, apoE), lipid metabolizing enzymes (PLA₂, HMGCoA reductase, ALOX5 and

ALOX12) has been evaluated in the neurosensory retina. As illustrated in Fig. 4, diets low in LA (LA⁻ω3⁻ and LA⁻ω3⁺) upregulated the expression of LDLR, CD36, ABCA1, ALOX12, ALOX5 and PLA₂ genes, compared to a diet containing high LA and low ω3 LC-PUFA amounts (LA⁺ω3⁻). Data were significantly different from the LA⁺ω3⁻ group for LDLR expression only, but failed to reach significance for ABCA1 ($p = 0.07$ and 0.05 for LA⁻ω3⁻ and LA⁻ω3⁺, respectively), CD36, ALOX12, ALOX5 and PLA₂ ($p > 0.05$). None of the other genes whose expression was evaluated were significantly regulated ($p > 0.05$).

4. Discussion

The role of the diet as a modifier of the fatty acid profile of the neurosensory retina has been known for years. The oldest studies have shown that the levels of ω3 LC-PUFAs in the neurosensory

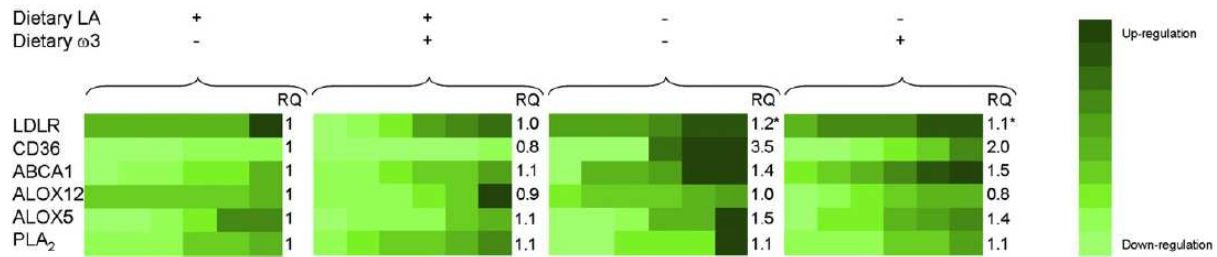


Fig. 4. Heat map representation of the expression of LDLR, CD36, ABCA1, ALOX12, ALOX5 and PLA₂ in the neurosensory retina of rats fed with diets low or high in LA and ω3 LC-PUFAs ($n = 6$ in each group). The LA⁺ω3⁻ group was used as the reference and GUSB as the endogenous control gene to calculate the indicated RQ values. *Significantly different from the value in the LA⁺ω3⁻ group at $p < 0.05$.

retina are tremendously reduced in animals reared under strict ω3 PUFA deficiency, including ALA and ω3 LC-PUFAs (Bush et al., 1991; Connor and Neuringer, 1988; Futterman et al., 1971; Moriguchi et al., 2004; Neuringer et al., 1986, 1984; Salem Jr et al., 2005; Weisinger et al., 1996). This loss can be partially reversed by dietary supplementation with ALA (Anderson et al., 2005) and more efficiently with fish oil rich in ω3 LC-PUFAs containing EPA, DPA ω3 and DHA (Lin et al., 1991). Even in non-deficient animals, dietary ω3 LC-PUFAs are more efficient than ALA in raising ω3 LC-PUFA levels in the neurosensory retina (Diau et al., 2003; Heinemann et al., 2005). The accretion of ω3 LC-PUFAs is improved by a dietary supply of ω3 LC-PUFAs independently of the presence of arachidonic acid, a long chain metabolite of LA, in the diet (Huang et al., 2007). However, the level of ω3 LC-PUFAs in the neurosensory retina is reduced in animals fed with high amounts of LA (Arbuckle et al., 1994). Similarly, a high ratio of LA to ALA in the diet is associated with low levels of ω3 LC-PUFAs in the neurosensory retina (Pawlosky et al., 1997). None of these studies evaluated whether the levels of ω3 LC-PUFAs in the neurosensory retina would be influenced by the presence of low or high quantities of LA and ω3 LC-PUFAs in the diet. This question is of importance given that epidemiological studies favor increasing ω3 LC-PUFAs and lowering LA intakes to prevent the development of ARM and AMD (Age-Related Eye Disease Study Research Group, 2007; Sangiovanni et al., 2009; Seddon et al., 2003, 2006, 2001; Tan et al., 2009). Significant changes of the dietary habits of the general population would be mandatory for reaching such intakes. Pregnant women and infants are the main targets of the dietary policies. For that reason, we have chosen to modify the diet of the pregnant rats and maintain the pups under the same diets in order to ascertain for the long-term effects of modifying the dietary habits. Improving the consumption of ω3 LC-PUFAs and lowering LA intake would necessarily modify the intake of other fatty acids, including saturated and monounsaturated fats. The changes in ω3 LC-PUFAs and LA intakes in our study were counterbalanced by monounsaturated and, to a lesser extent, saturated fatty acid changes. We must acknowledge that such variations may participate to the effects on gene expression. Nevertheless, we may postulate that these effects, if any, would be little compared to those induced by ω3 LC-PUFAs and LA changes. Indeed, LA intake was 5-fold greater in LA-rich diets compared to others, while ω3 LC-PUFAs were not significant in ω3-poor diets (0.1%) but accounted for 4% of the dietary fatty acids in ω3-rich diets (Table 1).

The present study demonstrates that diets rich in ω3 LC-PUFAs efficiently improve the incorporation of ω3 LC-PUFAs in plasma, adipose tissue, liver, neurosensory retina and RPE. The major strength of our study, compared to previous ones, was that we used modest amounts of dietary ω3 LC-PUFAs: total dietary ω3 LC-PUFAs accounted for no more than 4 g per kg of diet. Interestingly, a low dietary intake in LA magnified the raising effect of ω3 LC-PUFA

supplementation on EPA and DPA ω3 incorporation in the neurosensory retina (Fig. 1). Compared to EPA and DPA ω3, the amounts of DHA in the neurosensory retina and RPE are modestly modified by ω3 LC-PUFA-rich diets. This finding is corroborated by our previous findings in humans reporting that adipose tissue DHA, used as a surrogate for circulating and dietary DHA, did not correlate with DHA in the neurosensory retina (Bretillon et al., 2008). The efficacy of the neurosensory retina and RPE in becoming enriched with DHA was unaffected by the presence of low or high LA content in the diet (Figs. 1C and 3C). Modifying LA and ω3 LC-PUFA intake may marginally improve the synthesis of active metabolites from DHA, such as neuroprotectin D1 (Bazan, 2009). On the contrary, a diet low in LA and high in ω3 LC-PUFAs was more efficient in increasing EPA in the neurosensory retina and RPE than the corresponding high LA and high ω3 LC-PUFA diet (Figs. 1A and 3A). EPA is the precursor of cellular mediators such as resolvin E1 in the RPE (Seki et al., 2009). Resolvin E1 exhibits anti-inflammatory (Serhan and Chiang, 2008) and anti-angiogenic properties (Connor et al., 2007) that may participate in preventing the development of AMD. The mechanisms surrounding the protective effect of a diet low in linoleic acid and high in ω3 LC-PUFAs toward the prevention of AMD is largely unknown until now. Based on our data, we suggest that reducing dietary LA and increasing ω3 LC-PUFAs intake would more likely favor the enrichment of the RPE with EPA, and potentially the subsequent formation of active metabolites, compared to DHA which concentration in the RPE is not modified by dietary LA. The effect of the diets on the ratio of EPA to AA in RPE consistently reinforces this hypothesis. Indeed increasing ω3 LC-PUFAs and lowering LA intake increased the EPA/AA ratio in the RPE (Fig. 3E). This ratio can be considered to some extent as an index for the balance between precursors of anti- and pro-inflammatory metabolites. Therefore, reducing LA and privileging the consumption of ω3 LC-PUFAs would ameliorate the potentiality of RPE to secrete active metabolites from EPA, at the expense of those from AA. We must also acknowledge the possibility that part of EPA that accumulates in the tissues may originate from retroconversion of DHA.

Interestingly, we found that DHA was inversely associated with LA in the neurosensory retina, as we previously found in humans (Bretillon et al., 2008). LA in the neurosensory retina can to some extent be associated with its dietary intake, contrary to DHA, with the neurosensory retina amount stemming mainly from endogenous recycling and only slightly from the diet (Bretillon et al., 2008). Since LA is only a minor fatty acid in the neurosensory retina (from 1 to 2.5% of total fatty acids), compared to DHA (from 10 to 20%), we can discredit the hypothesis that dietary LA competes with endogenous DHA for incorporation into the neurosensory retina and thus explain the inverse association between LA and DHA in the neurosensory retina. Although their exact role in the neurosensory retina is unclear, LDLR, ABCA1 and

CD36 have been suggested to participate in lipid recycling therein (Tserentsoodol et al., 2006a,b). Immunoreactivity to LDLR was found in the ganglion cell layer, which includes Müller cell processes, outer plexiform layer, and inner segments of the photoreceptors in the monkey retina (Tserentsoodol et al., 2006a,b). LDLR may be associated with the remodeling of LDL-like particles. Since the inner segments of the photoreceptors are the site of outer segment synthesis and therefore crucial in recycling of DHA, LDLR might also participate to intra-retinal lipid metabolism. Besides its involvement in the remodeling and enrichment of lipoproteins with lipids, CD36 may also participate in other outcomes including the control of angiogenesis (Houssier et al., 2008; Silverstein and Febbraio, 2009). In this study, we found that feeding rats with a high amount of LA downregulated the expression of these genes, compared to diets low in LA (Fig. 4). Therefore, a high LA intake may be associated with a high amount of LA in the neurosensory retina, downregulation of the genes involved in lipid trafficking, including fatty acids and DHA. Under this scheme, the trafficking of DHA may be impaired and lead to reduced levels of DHA in the neurosensory retina. We acknowledge that this effect would marginally alter the functioning of the neurosensory retina, since no differences were reported in the electroretinographic response of the four groups of animals, including rod sensitivity to light. Again, the major strength of our study is that we used ω 3 LC-PUFAs at nutritional doses which we did not expect to modify electroretinographic response.

Comparing the present data to humans, the LA⁺ ω 3⁻ group can be considered the reference. Surveys on the food habits of the French population have reported that LA accounts for 3–4% and ω 3 LC-PUFAs for 0.21–0.22% of total daily energy intake (Astorg et al., 2004; Feart et al., 2007). Our LA⁺ ω 3⁻ diet provided similar amounts of LA to the rats – 5% of total energy intake – and ω 3 LC-PUFAs – 0.02% of total energy intake – which is close to the median and minimum values thus far reported for ω 3 LC-PUFA consumption in human populations (Astorg et al., 2004; Feart et al., 2007). An additional finding would corroborate the use of the LA⁺ ω 3⁻ group as a reference for human intake: DHA and DPA ω 6 were similarly associated with each other in the neurosensory retina of humans and animals from the LA⁺ ω 3⁻ group but not the other experimental groups. The elevated level of DPA ω 6 in animals fed with high LA and low ω 3 LC-PUFA amounts is minimal – 1.5% of DPA ω 6 (Fig. 2C) – and far from ω 3 deficiency (Bourre et al., 1989). Lastly, our diet provided sufficient ALA (0.80 g/kg diet, Table 1).

5. Conclusion

“Increase the amount and variety of seafood consumed by choosing seafood in place of some meat and poultry” is one of the recent dietary guidelines for American (see <http://www.health.gov/dietaryguideline/dga2010>) or French populations (see <http://www.anses.fr/Documents/NUT2006sa0359EN.pdf>). Seafood is the prominent source of ω 3 LC-PUFAs, accounting for more than 60% of the total ω 3 LC-PUFAs (Astorg et al., 2004). Animal meat, poultry, eggs and dairy products participate to more than 50% of the intake in LA (Astorg et al., 2004). Based on epidemiological data (Age-Related Eye Disease Study Research Group, 2007; Sangiovanni et al., 2009; Seddon et al., 2003, 2006, 2001; Tan et al., 2009), this recommendation would prevent from the development of ARM and AMD. Until now, the mechanisms behind these associations remain elusive. ω 3 LC-PUFAs may be converted into biologically active metabolites. Using often supra-nutritional doses of dietary fatty acids, numerous studies have established the competition between ω 3 and ω 6 fatty acids for their incorporation in tissues. Based on our data using nutritional amounts of ω 3 LC-PUFAs, we suggest that promoting the consumption of ω 3 LC-PUFA and lowering low LA intake would

ameliorate the efficacy of ω 3 LC-PUFAs, especially EPA, to incorporate the neurosensory retina and RPE. In addition this effect was associated with upregulation of the genes involved in lipid trafficking in the neurosensory retina.

Acknowledgments

The skillful assistance of Bruno Pasquis for taking care of the animals, Cindie Fournier for analyzing of the lipids, and Linda Northrup (PhD, ELS, English Solutions, Voiron, France) for the English-language editing of the manuscript is gratefully acknowledged.

Appendix. Supplementary material

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.exer.2011.07.016.

References

- Age-Related Eye Disease Study Research Group, 2007. The relationship of dietary lipid intake and age-related macular degeneration in a case-control study: AREDS report No. 20. *Arch. Ophthalmol.* 125, 671–679.
- Anderson, G.J., Neuringer, M., Lin, D.S., Connor, W.E., 2005. Can prenatal N-3 fatty acid deficiency be completely reversed after birth? Effects on retinal and brain biochemistry and visual function in rhesus monkeys. *Pediatr. Res.* 58, 865–872.
- Arbuckle, L.D., MacKinnon, M.J., Innis, S.M., 1994. Formula 18:2(n-6) and 18:3(n-3) content and ratio influence long-chain polyunsaturated fatty acids in the developing piglet liver and central nervous system. *J. Nutr.* 124, 289–298.
- Astorg, P., Arnault, N., Czernichow, S., Noisette, N., Galan, P., Hercberg, S., 2004. Dietary intakes and food sources of n-6 and n-3 PUFA in French adult men and women. *Lipids* 39, 527–535.
- Bazan, N.G., 2009. Neuroprotectin D1-mediated anti-inflammatory and survival signaling in stroke, retinal degenerations, and Alzheimer's disease. *J. Lipid Res.* 50 (Suppl), S400–S405.
- Bourre, J.M., Francois, M., Youyou, A., Dumont, O., Piciotti, M., Pascal, G., Durand, G., 1989. The effects of dietary alpha-linolenic acid on the composition of nerve membranes, enzymatic activity, amplitude of electrophysiological parameters, resistance to poisons and performance of learning tasks in rats. *J. Nutr.* 119, 1880–1892.
- Bretillon, L., Thuret, G., Grégoire, S., Acar, N., Joffre, C., Bron, A., Gain, P., Creuzot-Garher, C., 2008. Lipid and fatty acid profile of the retina, retinal pigment epithelium/choroid, and lacrimal gland, and associations with adipose tissue fatty acids in human subjects. *Exp. Eye Res.* 87, 521–528.
- Bush, R.A., Malnoe, A., Reme, C.E., Williams, T.P., 1994. Dietary deficiency of N-3 fatty acids alters rhodopsin content and function in the rat retina. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 35, 91–100.
- Bush, R.A., Reme, C.E., Malnoe, A., 1991. Light damage in the rat retina: the effect of dietary deprivation of N-3 fatty acids on acute structural alterations. *Exp. Eye Res.* 53, 741–752.
- Connor, K.M., SanGiovanni, J.P., Lofqvist, C., Aderman, C.M., Chen, J., Higuchi, A., Hong, S., Pravda, E.A., Majchrzak, S., Carper, D., Hellstrom, A., Kang, J.X., Chew, E.Y., Salem Jr., N., Serhan, C.N., Smith, L.E., 2007. Increased dietary intake of omega-3-polyunsaturated fatty acids reduces pathological retinal angiogenesis. *Nat. Med.* 13, 868–873.
- Connor, W.E., Neuringer, M., 1988. The effects of n-3 fatty acid deficiency and repletion upon the fatty acid composition and function of the brain and retina. *Prog. Clin. Biol. Res.* 282, 275–294.
- Curcio, C.A., Johnson, M., Huang, J.D., Rudolf, M., 2010. Apolipoprotein B-containing lipoproteins in retinal aging and age-related macular degeneration. *J. Lipid Res.* 51, 451–467.
- Diau, G.Y., Loew, E.R., Wijendran, V., Sarkadi-Nagy, E., Nathanielsz, P.W., Brenna, J.T., 2003. Docosahexaenoic and arachidonic acid influence on preterm baboon retinal composition and function. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 44, 4559–4566.
- Feart, C., Jutand, M.A., Larrieu, S., Letenneur, L., Delcourt, C., Combe, N., Barberger-Gateau, P., 2007. Energy, macronutrient and fatty acid intake of French elderly community dwellers and association with socio-demographic characteristics: data from the bordeaux sample of the three-city study. *Br. J. Nutr.* 98, 1046–1057.
- Fine, S.L., Berger, J.W., Maguire, M.G., Ho, A.C., 2000. Age-related macular degeneration. *N. Engl. J. Med.* 342, 483–492.
- Folch, J., Lees, M., Sloane Stanley, G.H., 1957. Simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226, 497–509.
- Futterman, S., Downer, J.L., Hendrickson, A., 1971. Effect of essential fatty acid deficiency on the fatty acid composition, morphology, and electroretinographic response of the retina. *Invest. Ophthalmol.* 10, 151–156.
- Heinemann, K.M., Waldron, M.K., Bigley, K.E., Lees, G.E., Bauer, J.E., 2005. Long-chain (n-3) polyunsaturated fatty acids are more efficient than alpha-linolenic acid in improving electroretinogram responses of puppies exposed during gestation, lactation, and weaning. *J. Nutr.* 135, 1960–1966.

- Houssier, M., Raoul, W., Lavalette, S., Keller, N., Guillonnet, X., Baragatti, B., Jonet, L., Jeanny, J.C., Behar-Cohen, F., Coceani, F., Scherman, D., Lachapelle, P., Ong, H., Chemtob, S., Sennlaub, F., 2008. CD36 deficiency leads to choroidal involution via COX2 down-regulation in rodents. *PLoS Med.* 5, e39.
- Huang, M.C., Brenna, J.T., Chao, A.C., Tschanz, C., Diersen-Schade, D.A., Hung, H.C., 2007. Differential tissue dose responses of (n-3) and (n-6) PUFA in neonatal piglets fed docosahexaenoate and arachidonoate. *J. Nutr.* 137, 2049–2055.
- Jeffrey, B.G., Neuringer, M., 2009. Age-related decline in rod phototransduction sensitivity in rhesus monkeys fed an n-3 fatty acid-deficient diet. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 50, 4360–4367.
- Klein, R., Klein, B.E., Linton, K.L., 1992. Prevalence of age-related maculopathy. The Beaver Dam eye study. *Ophthalmology* 99, 933–943.
- Lin, D.S., Anderson, G.J., Connor, W.E., 1991. High levels of the (n-6) fatty acid 4,7,10,13,16-nospace;16-docosapentaenoate in the retinas of rabbits are reduced by feeding dietary fish oil from birth to adult life. *J. Nutr.* 121, 1924–1931.
- Lin, D.S., Anderson, G.J., Connor, W.E., Neuringer, M., 1994. Effect of dietary N-3 fatty acids upon the phospholipid molecular species of the monkey retina. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 35, 794–803.
- Moilanen, T., Nikkari, T., 1981. The effect of storage on the fatty acid composition of human serum. *Clin. Chim. Acta* 114, 111–116.
- Moriguchi, T., Lim, S.-Y., Greiner, R., Lefkowitz, W., Loewke, J., Hoshiba, J., Salem Jr., N., 2004. Effects of an n-3-deficient diet on brain, retina, and liver fatty acyl composition in artificially reared rats. *J. Lipid Res.* 45, 1437–1445.
- Morrison, W.L., Smith, L.M., 1964. Preparation of fatty acids methyl esters and dimethylacetals from lipids with boron fluoride methanol. *J. Lipid Res.* 5, 600–608.
- Neuringer, M., Connor, W.E., Lin, D.S., Barstad, L., Luck, S., 1986. Biochemical and functional effects of prenatal and postnatal omega 3 fatty acid deficiency on retina and brain in rhesus monkeys. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 4021–4025.
- Neuringer, M., Connor, W.E., Van Petten, C., Barstad, L., 1984. Dietary omega-3 fatty acid deficiency and visual loss in infant rhesus monkeys. *J. Clin. Invest.* 73, 272–276.
- Novak, E.M., Dyer, R.A., Innis, S.M., 2008. High dietary [omega]-6 fatty acids contribute to reduced docosahexaenoic acid in the developing brain and inhibit secondary neurite growth. *Brain Res.* 1237, 136–145.
- Pawlosky, R.J., Denkins, Y., Ward, G., Salem Jr., N., 1997. Retinal and brain accretion of long-chain polyunsaturated fatty acids in developing fetuses: the effects of corn oil-based maternal diets. *Am. J. Clin. Nutr.* 65, 465–472.
- Salem Jr., N., Loewke, J., Catalan, J.N., Majchrzak, S., Moriguchi, T., 2005. Incomplete replacement of docosahexaenoic acid by n-6 docosapentaenoic acid in the rat retina after an n-3 fatty acid deficient diet. *Exp. Eye Res.* 81, 655–663.
- Sangiovanni, J.P., Agron, E., Meleth, A.D., Reed, G.F., Sperduto, R.D., Clemons, T.E., Chew, E.Y., 2009. (omega)-3 Long-chain polyunsaturated fatty acid intake and 12-y incidence of neovascular age-related macular degeneration and central geographic atrophy: AREDS report 30, a prospective cohort study from the age-related eye disease study. *Am. J. Clin. Nutr.* 90, 1601–1607.
- Seddon, J.M., Cote, J., Rosner, B., 2003. Progression of age-related macular degeneration: association with dietary fat, transunsaturated fat, nuts, and fish intake. *Arch. Ophthalmol.* 121, 1728–1737.
- Seddon, J.M., George, S., Rosner, B., 2006. Cigarette smoking, fish consumption, omega-3 fatty acid intake, and associations with age-related macular degeneration: the US twin study of age-related macular degeneration. *Arch. Ophthalmol.* 124, 995–1001.
- Seddon, J.M., Rosner, B., Sperduto, R.D., Yannuzzi, L., Haller, J.A., Blair, N.P., Willett, W., 2001. Dietary fat and risk for advanced age-related macular degeneration. *Arch. Ophthalmol.* 119, 1191–1199.
- Seeliger, M.W., Grimm, C., Stahlberg, F., Friedburg, C., Jaissle, G., Zrenner, E., Guo, H., Reme, C.E., Humphries, P., Hofmann, F., Biel, M., Fariss, R.N., Redmond, T.M., Wenzel, A., 2001. New views on RPE65 deficiency: the rod system is the source of vision in a mouse model of Leber congenital amaurosis. *Nat. Genet.* 29, 70–74.
- Seki, H., Tani, Y., Arita, M., 2009. Omega-3 PUFA derived anti-inflammatory lipid mediator resolvins E1. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 89, 126–130.
- Serhan, C.N., Chiang, N., 2008. Endogenous pro-resolving and anti-inflammatory lipid mediators: a new pharmacologic genus. *Br. J. Pharmacol.* 153, S200–S215.
- Silverstein, R.L., Febbraio, M., 2009. CD36, a scavenger receptor involved in immunity, metabolism, angiogenesis, and behavior. *Sci. Signal.* 2, re3.
- Simopoulos, A.P., 2009. Omega-6/omega-3 essential fatty acids: biological effects. *World Rev. Nutr. Diet.* 99, 1–16.
- Tan, J.S.L., Wang, J.J., Flood, V., Mitchell, P., 2009. Dietary fatty acids and the 10-Year incidence of age-related macular degeneration: the Blue Mountains eye study. *Arch. Ophthalmol.* 127, 656–665.
- Tserentsoodol, N., Gordiyenko, N.V., Pascual, I., Lee, J.W., Fliesler, S.J., Rodriguez, I.R., 2006a. Intraretinal lipid transport is dependent on high density lipoprotein-like particles and class B scavenger receptors. *Mol. Vis.* 12, 1319–1333.
- Tserentsoodol, N., Szein, J., Campos, M., Gordiyenko, N.V., Fariss, R.N., Lee, J.W., Fliesler, S.J., Rodriguez, I.R., 2006b. Uptake of cholesterol by the retina occurs primarily via a low density lipoprotein receptor-mediated process. *Mol. Vis.* 12, 1306–1318.
- Vinglerling, J.R., Dielemans, I., Bots, M.L., Hofman, A., Grobbee, D.E., de Jong, P.T., 1995. Age-related macular degeneration is associated with atherosclerosis. The Rotterdam Study. *Am. J. Epidemiol.* 142, 404–409.
- Weisinger, H.S., Vingrys, A.J., Sinclair, A.J., 1996. Effect of dietary n-3 deficiency on the electroretinogram in the guinea pig. *Ann. Nutr. Metab.* 40, 91–98.

Résultats et conclusion

Apport modéré en AGPI-LC ω 3

Les analyses effectuées dans cette étude montrent tout d'abord qu'un régime enrichi de façon modérée en AGPI-LC ω 3 ($LA^+\omega^+$) permet d'améliorer significativement l'incorporation des AGPI-LC ω 3 dans divers tissus tels que le plasma, le tissu adipeux, le foie, la rétine neurale et l'EPR. Comparativement aux animaux nourris avec un régime $LA^+\omega^-$, les rats nourris avec un régime $LA^+\omega^+$ présentent des quantités d'EPA et de DPA ω 3 significativement augmentées dans la rétine neurale et l'EPR. En revanche, les teneurs en DHA ne sont augmentées que dans la rétine neurale. Ainsi l'apport ω 3 lorsqu'il est associé à un apport important de LA ne permet pas d'enrichir l'EPR en DHA. Outre l'enrichissement des tissus en AGPI-LC ω 3, il existe une corrélation positive entre les quantités de DHA retrouvées dans le tissu adipeux et le plasma, et dans la rétine neurale et le plasma. En revanche, comme nous l'avons déjà montré chez l'Homme, les quantités de DHA dans la rétine neurale et dans le tissu adipeux ne sont pas positivement associées (**Bretillon et al. 2008**). Ainsi un apport en ω 3 permet d'augmenter de façon significative la quantité d'AGPI-LC ω 3 dans la rétine et l'EPR.

Apport modéré en AGPI-LC ω 3 associé à une diminution de l'apport en LA

Lorsque les animaux sont nourris avec un régime $LA^-\omega^+$, l'incorporation AGPI-LC ω 3 dans les tissus est amplifiée comparé aux animaux nourris avec un régime $LA^+\omega^+$. Dans la rétine neurale et l'EPR, l'incorporation de DPA ω 3 et particulièrement d'EPA est amplifiée de façon importante dans les groupes d'animaux $LA^-\omega^+$ comparé aux groupes d'animaux $LA^+\omega^+$. De plus dans la rétine neurale, le contenu en LA et DHA est inversement et significativement associée dans les groupes d'animaux nourris avec un régime pauvre en LA et plus ou moins riche en AGPI-LC ω 3 contrairement aux animaux nourris avec un régime riche en LA. Ainsi un apport en ω 3 permet d'augmenter de façon significative la quantité d'AGPI-LC ω 3 dans la rétine et l'EPR et cette incorporation est amplifiée lorsque la quantité de LA dans le régime est réduite.

Malgré ces observations intéressantes de l'effet des acides gras alimentaires sur la composition membranaire de la rétine neurale et l'EPR, aucune modification de la fonctionnalité de la rétine n'a été détectée. Néanmoins, nous avons mis en évidence une augmentation de l'expression des gènes *Ldlr*, *Cd36*, *Abca1*, *Alox12*, *Alox5* et *Pla2* chez les rats nourris avec un régime $LA^-\omega^+$ comparativement aux rats nourris avec un régime pauvre

en AGPI-LC $\omega 3$ et riche en LA⁺ $\omega 3$ ⁻. Cependant seule l'expression du gène *Ldlr* est augmentée de façon significative. Nous ne pouvons pas conclure sur l'effet bénéfique ou nuisible des $\omega 3$ sur la rétine puisqu'aucune altération ou amélioration de la fonctionnalité de la rétine n'ont été détectées. Cependant les souris ApoB₁₀₀,LDLR^{-/-} invalidées pour le gène *Ldlr* développent un vieillissement avancé de la rétine, nous pouvons alors supposer que l'augmentation de l'expression de *Ldlr* suite à un apport augmenté en AGPI-LC $\omega 3$ traduirait un rôle plutôt protecteur vis-à-vis du vieillissement rétinien.

Grâce à cette étude, nous supposons qu'un apport modéré en AGPI-LC $\omega 3$ sur une génération (généiteurs et leur progéniture) engendre des modifications de l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme lipidique et augmente l'incorporation d'AGPI-LC $\omega 3$ dans la rétine neurale et l'EPR.

Du fait que notre modèle était constitué de rates en gestation et de leur descendance, nos données renforcent l'intérêt des recommandations nutritionnelles chez la femme enceinte. Un des intérêts majeurs de notre étude était que nous avons utilisé une supplémentation en $\omega 3$ modérée, que l'on peut considérer comme raisonnée. En effet, nos régimes ne contenaient que 4g d' $\omega 3$ par kilogramme de régime, ce qui représente un apport d'environ 100 mg d' $\omega 3$ par jour par animal, soit 8% des lipides ingérés, lorsque les recommandations nutritionnelles pour la femme enceinte sont de 500 mg par jour.

Contrairement aux autres tissus, dans l'EPR, la quantité de DHA n'est pas augmentée dans un régime riche en LA et $\omega 3$ (LA⁺ $\omega 3$ ⁺). En revanche, on observe une augmentation de l'incorporation de DHA lorsque l'apport modéré en AGPI-LC $\omega 3$ est associé à une diminution de l'apport en LA (LA⁻ $\omega 3$ ⁺). Ces résultats peuvent participer à corroborer les études montrant les effets nuisibles d'un déséquilibre de la balance $\omega 3/\omega 6$ et l'effet bénéfique d'une alimentation riche en $\omega 3$ sur l'insulinorésistance (Muramatsu *et al.*; Poudyal *et al.* 2011) et le développement ou la progression de la DMLA (Cho *et al.* 2001; Seddon *et al.* 2001; Seddon *et al.* 2003; Age-Related Eye Disease Study Research Group 2007; Delcourt *et al.* 2007; Chong *et al.* 2009; Kishan *et al.* 2011). Ainsi, l'enrichissement des membranes en AGPI-LC $\omega 3$ pourrait faciliter et amplifier la mobilisation des acides gras précurseurs des molécules neuroprotectrices suite à l'apparition de processus pro-inflammatoires et/ou pro-apoptotiques dans la rétine. Dans cette étude nous mettons une fois de plus en évidence le rôle crucial que peuvent avoir des facteurs nutritionnels sur la physiologie de la rétine et de l'EPR.

Discussion et perspectives

Depuis ces dernières décennies, l'espérance de vie des populations croît un peu plus chaque année augmentant dans le même temps le nombre de personnes âgées. Dans ce contexte, le vieillissement et les pathologies liées à l'âge font l'objet d'une attention grandissante de la part des autorités et du monde scientifique. Aujourd'hui, la compréhension des mécanismes et des facteurs liés au vieillissement est de plus en plus avancée. Parmi les mécanismes impliqués dans le vieillissement, le stress oxydatif induit par l'accumulation d'ERO et la glycation non enzymatique des protéines sont maintenant bien décrits.

Le vieillissement de l'œil mène à des modifications biochimiques et fonctionnelles de la membrane de Bruch et de l'EPR. En effet, avec l'âge, la membrane de Bruch s'épaissit et sa perméabilité diminue tandis que l'EPR perd ses capacités antioxydantes et se charge en granules de lipofuscine. Le vieillissement de l'œil se caractérise également par l'accumulation de lipides, de PTG et de produits issus de l'action d'ERO au niveau de la membrane de Bruch (cholestérol et esters de cholestérol) et dans la rétine (**Brownlee 1995; Handa et al. 1999; Curcio et al. 2001; Liang and Godley 2003; Suzuki et al. 2007; Glenn and Stitt 2009**). Au cours du vieillissement peuvent apparaître des pathologies dites liées à l'âge telles que la DMLA et la RD. Il est maintenant bien établi que le développement de ces pathologies tient d'une part à des facteurs génétiques et d'autre part à des facteurs nutritionnels et environnementaux considérés comme à risque.

Dans ce contexte, nos travaux avaient pour but d'évaluer dans un premier temps, l'impact de facteurs nutritionnels et environnementaux sur le vieillissement rétinien chez des souris sauvages et des souris transgéniques ApoB₁₀₀,LDLR^{-/-} modèles de vieillissement de la rétine humaine. Dans un second temps nous avons cherché à évaluer l'impact d'un régime enrichi en AGPI-LC ω3 sur la fonction et le métabolisme de la rétine chez le rat.

Caractérisation du modèle ApoB₁₀₀,LDLR^{-/-}

Dans chacune de nos expériences, les souris ApoB₁₀₀,LDLR^{-/-} vieillissantes présentent naturellement une diminution de la fonction de la rétine, des dépôts autofluorescents au fond d'œil et une accumulation d'esters de cholestérol au niveau de la membrane de Bruch confirmant ainsi les résultats précédemment publiés par notre équipe qui montrent que la souris apoB₁₀₀, LDLR^{-/-} se trouve à la charnière entre un vieillissement physiologique et une rétinopathie (**Bretillon et al. 2008**). Nous avons également mis en évidence d'autres caractères phénotypiques jusque là non décrits chez ces souris comme 1) une inflammation de

la rétine qui se traduit par la présence de cellules microgliales et/ou macrophages dans l'espace sub-EPR, et 2) une modification de l'expression génique de la rétine et du complexe EPR-Ch avec l'augmentation de l'expression de gènes impliqués dans l'efflux du cholestérol (*Abcg1* et *Abca1*), dans le trafic des lipoprotéines (*Cd36*), et dans l'infiltration leucocytaire à travers l'endothélium et la migration des cellules microgliales dans la rétine (*Cx3cr1* et *Cd18*). Les souris ApoB₁₀₀,LDLR^{-/-} sont connues pour être un modèle d'athérosclérose (**Farese et al. 1996; Veniant et al. 1998; Heinonen et al. 2007**). Elles sont hypercholestérolémiques et présentent des taux élevés de VLDL et LDL circulants (sources importantes de cholestérol et d'acides gras) par rapport à des souris sauvages. De nombreuses analogies existent entre les mécanismes impliqués dans la genèse des lésions athéromateuses et dans la physiopathologie de la DMLA (**Anderson et al. 2002**). Par exemple, l'implication du cholestérol, de ses dérivés oxydés (les oxystérols) et des LDL oxydés, a largement été démontrée dans les processus athéromateux (**Brown and Jessup 1999**) et dans la formation de druses (**Curcio et al. 2001; Malvitte et al. 2006**). Il existe également des points communs au niveau anatomo-pathologique. En effet, dans l'athérosclérose, les dépôts lipidiques dans l'intima induisent un épaissement et une perte de l'élasticité des parois vasculaires, et sont l'élément déclencheur du recrutement des monocytes circulants et donc de la formation des lésions athéromateuses. De la même façon, dans la DMLA, les dépôts lipido-protéiques (druses) au niveau de la membrane de Bruch renforcent son caractère hydrophobe, ce qui réduit les échanges entre l'EPR et la choroïde. La présence de cellules microgliales et/ou macrophages dans la rétine des souris ApoB₁₀₀,LDLR^{-/-} suggère l'existence d'un processus inflammatoire qui pourrait être semblable à ce que l'on observe lors de la formation de lésions athéromateuses (infiltration de monocytes circulant dans l'intima vasculaire). Par ailleurs, l'augmentation dans le complexe EPR-Ch de l'expression de *Cx3cr1* (récepteur de la chimiokine Cx3cl1 impliquée dans le recrutement de cellules immunitaires de la circulation), et *Cd18* (protéine d'adhésion des leucocytes à l'endothélium) pourrait en partie expliquer l'infiltration de monocytes/macrophages dans la rétine et donc l'inflammation. De par les études montrant une diminution des capacités antioxydantes de l'EPR au cours du vieillissement (**Liles et al. 1991; Tate et al. 1993**) et l'âge des souris ApoB₁₀₀,LDLR^{-/-} dans nos expériences nous pouvons supposer qu'il existe une diminution de l'activité antioxydante dans l'EPR et donc que la présence d'ERO dans la rétine et le complexe EPR-Ch soit à l'origine de l'oxydation de biomolécules pro-inflammatoire issus des lipides (4-HNE, MDA, CEP, CHP, CPP, oxystérols), des oses (glyoxal, méthylglyoxal, 3 désoxyglucosone) et des protéines. Dans

l'EPR. les ERO peuvent également être à l'origine de la formation de LDL oxydés semblables à ceux que l'on observe dans l'intima au cours de la formation de plaque d'athéromes.

En ce qui concerne les modifications de l'expression génique dans la rétine et le complexe EPR-Ch chez les souris ApoB₁₀₀,LDLR^{-/-} témoins nous pouvons suggérer trois hypothèses :

1) l'augmentation de l'expression d'*Abcg1* et *Abca1*, transporteurs impliqués dans l'efflux du cholestérol, et *Cd36*, transporteur des LDL et des LDL oxydés, est liée à l'afflux dans la rétine de monocytes/macrophages connus pour exprimer ces transporteurs (**Chawla et al. 2001**).

2) l'augmentation de l'expression génique d'*Abcg1*, *Abca1* et *Cd32* serait le résultat d'une réponse adaptative de la rétine face à l'afflux important de cholestérol et acides gras issus des VLDL et LDL circulants vers la rétine. En effet, l'augmentation de l'expression d'*Abcg1*, *Abca1* et *Cd36* ne serait donc pas liée aux cellules microgliales et/ou macrophages mais à d'autres types cellulaires tels que les cellules de l'EPR ou bien les cellules de Müller décrites pour exprimer ces transporteurs (**Bojanic et al.; Tserentsoodol et al. 2006; Rodriguez and Larrayoz 2010**). Par ailleurs, la diminution de l'expression d'*Acat1* et *Hmgcr* dans le complexe ERP-Ch traduit une diminution du stockage du cholestérol par les cellules et supporte un peu plus l'hypothèse d'une réponse adaptative de la rétine. On peut également suggérer que l'augmentation de l'expression de *Cd36* soit une compensation à l'absence de Ldlr.

3) Ces modifications seraient le résultat de l'association des deux hypothèses précédentes : une augmentation du métabolisme des lipides en réponse à l'augmentation de l'afflux de LDL dans la rétine et une activation microgliale et/ou infiltration de monocytes/macrophages (semblable à ce qu'on observe dans l'athérosclérose) pour éliminer les déchets dans la membrane de Bruch et la rétine. Dans ce cas, les modifications de l'expression génique seraient dues à la fois à l'activation des cellules microgliales et/ou macrophages et aux cellules internes de la rétine.

Ainsi, l'ensemble de ces résultats permettent de montrer que le phénotype de la souris ApoB₁₀₀,LDLR^{-/-} peut avoir un impact sur la physiologie et le vieillissement de la rétine. De plus si on considère que la souris ApoB₁₀₀,LDLR^{-/-} présente un état de rétinopathie,

alors les résultats apportent une preuve supplémentaire de l'implication de l'inflammatoires dans les stades précoces de DMLA.

Impact des facteurs nutritionnels et environnementaux sur la rétine

Chez l'ensemble des animaux exposés aux facteurs environnementaux et nutritionnels sources d'ERO et de PTG, on constate des modifications physiologiques de la rétine et du complexe EPR-Ch. En effet, les souris exposées à la lumière, au D-galactose ou à un régime enrichi en fructose présentent une altération de la fonction rétinienne qui se traduit par une diminution de la réponse et de la sensibilité de la rétine à un stimulus lumineux. Par analogie avec de récentes publications (**Xu et al. 2008; Luhmann et al. 2009; Chen et al. 2011**) qui rapportent comme dans la première partie de nos travaux, la présence de points autofluorescents au fond d'œil et des cellules révélées positives par immunomarquage anti-CD68 sur coupe d'œil, nous supposons l'induction d'une réponse inflammatoire dans la rétine. Cette hypothèse est supportée par l'augmentation de l'expression des gènes *Cx3cr1* et *Cd18* dans la rétine et le complexe EPR-Ch chez les souris nourries avec un régime enrichi en fructose. De plus, l'augmentation de l'expression des gènes *Bax* et *Gfap* - codant respectivement pour le facteur pro-apoptotique Bax et pour la protéine du cytosquelette GFAP - montre que le stress oxydatif et les PTG générés dans la rétine par le régime enrichi en fructose sont capables d'induire la mort cellulaire et un état de stress rétinien favorables à un état inflammatoire. Par ailleurs, la diminution de l'expression du gène *Sod2*, codant pour la superoxyde dismutase, dans le complexe EPR-Ch peut traduire une augmentation d'ERO dans le complexe EPR-Ch et donc probablement une augmentation de la production de biomolécules oxydées propices au stress oxydatif et à l'inflammation. Les phénomènes d'inflammation dans la rétine sont relativement bien décrits au cours du vieillissement et dans les rétinopathies liées à l'âge. En effet, de nombreuses études décrivent l'activation du complément (**Jha et al. 2007**), l'activation de cellules microgliales et l'infiltration de macrophages de la choroïde au cours de la DMLA (**Penfold et al. 2001; Rodrigues 2007; Patel and Chan 2008; Xu et al. 2009**).

Bien que nous n'ayons pas observé de néovascularisation (stade sévère de la DMLA et de la RD) chez aucun de nos animaux exposés aux facteurs de stress, l'augmentation de l'expression de *Vegf*, l'aggravation des altérations liés à l'âge et de la réponse immunitaire de la rétine laissent à penser que les souris exposées à des facteurs sources d'ERO et de PTG présentent une accélération du vieillissement de la rétine voire un stade précoce de rétinopathie.

Contrairement à ce qu'on pouvait attendre, dans l'ensemble de nos expériences, les altérations observées chez les souris sauvages exposées aux divers facteurs semblent peu amplifiées chez les souris ApoB₁₀₀, LDLR^{-/-} dans les mêmes conditions.

Ainsi, ces résultats apportent une preuve supplémentaire du rôle certain de la génétique dans le processus de vieillissement de la rétine et dans le développement de rétinopathies - puisque la souris ApoB₁₀₀,LDLR^{-/-} présente spontanément des signes de vieillissement avancés de la rétine - et de l'influence avérée des facteurs environnementaux et nutritionnels dans ces processus. Cependant, l'association de facteurs génétiques à des facteurs environnementaux ou nutritionnels ne semble pas forcément suffisante pour déclencher des signes de rétinopathies aux stades sévères.

Un régime enrichi en fructose est décrit pour être une source d'ERO et de PTG mais également d'hyperinsulinémie, d'insulinorésistance, d'hypertension et de lipogénèse (Basciano *et al.* 2005; Havel 2005; Rutledge and Adeli 2007; Tran *et al.* 2009; Dekker *et al.* 2010). Outre les effets sur la fonction et la réponse immunitaire de la rétine, nous avons montré que le régime enrichi en fructose à long terme est susceptible d'impacter sur l'expression génique dans la rétine et le complexe EPR-Ch. En effet, les souris sauvages et ApoB₁₀₀,LDLR^{-/-} nourries durant 8 mois avec un régime enrichi en fructose présentent une augmentation de l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme et l'efflux du cholestérol (*Hmgcr*, *Lcat*, *Cyp27a* et *Cyp46a*, *Insig1*) et dans le trafic des lipoprotéines (*ApoE*, *Srb1*, *Lrp1*). Elles présentent également une augmentation de l'expression de gènes impliqués dans la synthèse de facteurs nucléaires ligand du cholestérol, des oxystérols et des acides gras., et initiateurs de diverses voies de signalisations (*Lxra*, *Pparδ*). Ces modifications géniques peuvent être expliquées par l'effet direct du fructose dans la rétine dans laquelle il est métabolisé en acétyl-coenzyme A, précurseur de la voie de biosynthèse du cholestérol et des triglycérides et par son effet indirect sur le foie dans lequel sa métabolisation aboutit à l'augmentation de la lipogénèse et donc à l'augmentation des taux de VLDL et LDL dans le sang. En effet, les LDL (riches en cholestérol et triglycérides) dans la circulation sanguine arrivent à la rétine par les vaisseaux rétiniens et choroïdiens et sont captés par des transporteurs comme LDLR et CD36. Par conséquent on peut penser qu'une augmentation de taux de LDL dans le sang peut induire, une augmentation de l'afflux de LDL et donc de cholestérol et acides gras dans la rétine (Figure 47).

Ainsi, malgré les effets délétères d'un régime enrichi en fructose sur l'intégrité de la rétine, cette dernière serait capable de fournir une réponse adaptative pour faire face à

l'augmentation de la production et de l'afflux de cholestérol et d'acides gras dans la rétine.

Il existe cependant quelques spécificités de souche. En effet, dans la rétine, les gènes *Ldlr*, *Abcg1*, *Abca4* et *Srebp1* sont surexprimés chez les souris sauvages, et tandis que les gènes *Cd36*, *Abca1*, *Nfkb1*, *Nfkb2* sont surexprimés chez les souris ApoB₁₀₀,LDLR^{-/-}. La surexpression d'*Abcg1* et *Ldlr* chez les souris sauvages vs *Cd36* et *Abca1* chez les souris ApoB₁₀₀,LDLR^{-/-} suggère une association entre LDLR et ABCG1 et entre CD36 et ABCA1. Ces différences montrent donc que face à un même facteur, et comparativement aux souris sauvages, le phénotype de la souris ApoB₁₀₀,LDLR^{-/-} peut influencer la réponse de la rétine et du complexe EPR-Ch.

Dans la dernière expérience, nous avons souhaité évaluer l'effet d'un apport modéré en AGPI-LC ω3 sur la rétine. Pour cela des rates ont été soumises à un régime plus ou moins enrichi en AGPI-LC ω3 et en LA durant leur gestation, et sur leur progéniture jusqu'à 11 semaines. Les analyses chromatographiques nous ont permis de mettre en évidence un enrichissement de la rétine neurale et l'EPR en AGPI-LC ω3, et particulièrement en EPA, lorsque les animaux sont nourris avec un régime enrichi en acides gras ω3. Dans le même temps nous avons montré que la diminution de la quantité d'acide linoléique dans le régime permet de potentialiser l'enrichissement des tissus en AGPI-LC ω3. Cet effet d'enrichissement peut constituer un des mécanismes qui sous-tend les données épidémiologiques qui montrent un effet protecteur des ω3 sur la DMLA plus important lorsque les quantités d'acides linoléique dans le régime sont réduites (**Seddon *et al.* 2001; Age-Related Eye Disease Study Research Group 2007; Chong *et al.* 2008; Tan *et al.* 2009**). Notre travail permet d'apporter des éléments de réponse supplémentaires concernant les mécanismes sous-jacents à l'effet neuroprotecteur des ω3. En effet, nous pouvons supposer que l'enrichissement de la rétine en AGPI-LC ω3 augmente leur disponibilité et donc facilite la formation de métabolites secondaires neuroprotecteurs tels que les prostaglandines, les leukotriènes, les protectines, et les résolvines dans la rétine. D'autre part, l'augmentation de l'expression des gènes *Ldlr*, *Cd36* et *Abca1*, impliqués dans le trafic des lipides et des gènes *Alox12*, *Alox5* et *Pla2*, enzymes participant à la métabolisation des acides gras suggère une amélioration du métabolisme des lipides et une augmentation de la formation de métabolites secondaires des acides gras dans la rétine des animaux nourris avec un régime riche en AGPI-LC ω3 et pauvre en acide linoléique.

Ces travaux mettent en évidence la capacité de la rétine à produire une réponse adaptative à certains facteurs nutritionnels, et apportent une preuve supplémentaire que l'alimentation joue un rôle important dans la structure biochimique et le métabolisme de la rétine, et très certainement dans le processus de vieillissement, voire potentiellement dans le développement de pathologies liées à l'âge.

En conclusion générale, les résultats de ces travaux suggèrent que les facteurs environnementaux et nutritionnels tiennent un rôle non négligeable dans le vieillissement rétinien et sur le métabolisme de la rétine. Certains facteurs sources d'ERO et de PTG sont capables d'augmenter l'apparition de signes de vieillissement de la rétine et d'induire une réponse adaptative de la rétine par la modification de l'expression génique et par le déclenchement de processus inflammatoires qui pourraient être le point de départ de rétinopathies liées à l'âge telles que la DMLA ou la RD. D'autre part ces travaux permettent de confirmer l'importance de l'équilibre de la balance entre acides gras $\omega 3$ et $\omega 6$ et des apports nutritionnels lipidiques recommandés pour les AGPI-LC dans la composition lipidique et le métabolisme de la rétine.

Les perspectives de ce travail pourraient tout d'abord consister à définir de façon précise les lésions occasionnées par ces facteurs nutritionnels et environnementaux en mesurant le stress oxydatif, le taux de VLDL et LDL oxydés sanguin, ou bien en analysant de façon histochimique la présence de PTG au niveau de la rétine et de la membrane de Bruch. Nous pourrions également analyser l'expression génique sur un éventail plus large du génome dans le but de voir si ces facteurs peuvent influencer sur d'autres fonctions cellulaires comme la prolifération ou encore la différenciation cellulaire.

L'exposition aux divers facteurs sur de longues périodes ne nous permet pas de définir une chronologie des événements ni même d'établir un lien de cause à effet entre l'augmentation du métabolisme des lipides, l'accumulation d'esters de cholestérol et l'inflammation dans la rétine. De plus nous ne savons pas si ce processus d'inflammation dans la rétine se développe au cours des premiers jours d'exposition ou bien après plusieurs mois.

Il nous semble également essentiel d'approfondir les analyses sur l'inflammation engendrée par ces facteurs. En effet, de nombreuses questions subsistent quant à l'origine, gliale et/ou circulatoire des cellules immunitaires que l'on retrouve dans la rétine. Les cellules microgliales et les monocytes/macrophages sont issus de la même lignée myéloïde, c'est pourquoi ils présentent la plupart du temps les mêmes marqueurs membranaires et il est

difficile de les distinguer. Il semblerait cependant que certains marqueurs comme CD80, LAMP-1 et la lamine soient spécifiquement exprimés par les cellules microgliales activées tandis que d'autres marqueurs tels que l' α 1-Chymotrypsin, NG2 et RFD7 soient exprimés spécifiquement par les macrophages. Afin de confirmer le lien entre les points autofluorescents observés en fond d'œil et les marquages sur coupe d'œil, des analyses supplémentaires par immunomarquages sur des rétines entières montées à plat (flatmount) permettraient d'une part de mieux distinguer la morphologie des cellules dans leur ensemble et d'autre part de déterminer l'origine des cellules que l'on retrouve au niveau des segments externes des photorécepteurs. La microdissection laser de ces cellules associé à une analyse protéomique et lipidique en HPLC/MS permettrait de mieux caractériser la composition de ces cellules.

Il serait également intéressant de développer un modèle murin qui puisse développer une néovascularisation rétinienne. Pour cela, nous pourrions exposer ces souris à des conditions associant facteurs environnementaux et facteurs nutritionnels. Ainsi ces souris pourraient être exposées à la lumière et/ou à la fumée de cigarette et nourris avec un régime à haute teneur en lipides (ω 6, cholestérol) ou fructose. En effet, nous pouvons supposer qu'en multipliant les facteurs de risques associés à la DMLA et la rétinopathie diabétique, l'accumulation de modifications biochimiques (stress oxydatif, PTG) et métaboliques soient suffisantes pour induire une néovascularisation semblable à ce qu'on observe dans ces rétinopathies.

Enfin pour confirmer l'effet protecteur des ω 3 face à des lésions de la rétine une étude complémentaire pourrait permettre d'évaluer l'effet d'un régime plus ou moins enrichi en ω 3 et ω 6 sur des souris exposées aux différents facteurs nutritionnels et environnementaux augmentant les signes de vieillissement de la rétine. Cependant, les études préliminaires ayant montré qu'un régime enrichi en AGPI-LC induit une augmentation de l'expression de *Ldlr*, on peut se demander si la souris ApoB₁₀₀,LDLR^{-/-} invalidée pour le gène *Ldlr*, serait un bon modèle pour cette étude.

Bibliographie

- Adamis A. P. and Shima D. T. - *The role of vascular endothelial growth factor in ocular health and disease*. - 2005, *Retina*, 25(2): 111-118.
- Adams M. K., Simpson J. A., et al. - *Abdominal Obesity and Age-related Macular Degeneration*. - 2011, *American journal of epidemiology*.
- Age-Related Eye Disease Study Research Group - *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*. - 2000, *Ophthalmology*, 107(12): 2224-2232.
- Age-Related Eye Disease Study Research Group - *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*. - 2001, *Archives of Ophthalmology*, 119(10): 1417-1436.
- Age-Related Eye Disease Study Research Group - *The Relationship of Dietary Carotenoid and Vitamin A, E, and C Intake With Age-Related Macular Degeneration in a Case-Control Study: AREDS Report No. 22*. - 2007, *Archives of Ophthalmology*, 125(9): 1225-1232.
- Age-Related Eye Disease Study Research Group - *The Relationship of Dietary Lipid Intake and Age-Related Macular Degeneration in a Case-Control Study: AREDS Report No. 20*. - 2007, *Archives of Ophthalmology*, 125(5): 671-679.
- Aisenbrey S., Zhang M., et al. - *Retinal pigment epithelial cells synthesize laminins, including laminin 5, and adhere to them through alpha3- and alpha6-containing integrins*. - 2006, *Investigative ophthalmology & visual science*, 47(12): 5537-5544.
- Ambati J., Anand A., et al. - *An animal model of age-related macular degeneration in senescent Ccl-2- or Ccr-2-deficient mice*. - 2003, *Nature medicine*, 9(11): 1390-1397.
- Anderson D. H., Fisher S. K., et al. - *Mammalian cones: disc shedding, phagocytosis, and renewal*. - 1978, *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 17(2): 117-133.
- Anderson D. H., Mullins R. F., et al. - *A role for local inflammation in the formation of drusen in the aging eye*. - 2002, *American Journal of Ophthalmology*, 134(3): 411-431.
- Anderson D. H., Talaga K. C., et al. - *Characterization of beta amyloid assemblies in drusen: the deposits associated with aging and age-related macular degeneration*. - 2004, *Experimental Eye Research*, 78(2): 243-256.
- ANSES - *Actualisation des apports nutritionnels conseillés pour les acides gras*. - 2011.
- Association Française des Diabétiques. - *Qu'est-ce que le diabète ?* - (2010), from <http://www.afd.asso.fr/qu-est-ce-que-le-diabete>.
- Augood C., Chakravarthy U., et al. - *Oily fish consumption, dietary docosahexaenoic acid and eicosapentaenoic acid intakes, and associations with neovascular age-related macular degeneration*. - 2008, *The American journal of clinical nutrition*, 88(2): 398-406.
- Augood C., Fletcher A., et al. - *Methods for a population-based study of the prevalence of and risk factors for age-related maculopathy and macular degeneration in elderly European populations: the EUREYE study*. - 2004, *Ophthalmic epidemiology*, 11(2): 117-129.
- Bakker W., Eringa E. C., et al. - *Endothelial dysfunction and diabetes: roles of hyperglycemia, impaired insulin signaling and obesity*. - 2009, *Cell and tissue research*, 335(1): 165-189.
- Bargmann W. - *Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen, 6th ed.* Stuttgart - 1967.
- Basciano H., Federico L., et al. - *Fructose, insulin resistance, and metabolic dyslipidemia*. - 2005, *Nutrition & metabolism (Lond)*, 2(1): 5.

- Bassnett S., Shi Y., et al. - *Biological glass: structural determinants of eye lens transparency*. - 2011, Philosophical transactions of the Royal Society of London : Biological sciences, 366(1568): 1250-1264.
- Bavik C. O., Eriksson U., et al. - *Identification and partial characterization of a retinal pigment epithelial membrane receptor for plasma retinol-binding protein*. - 1991, J The Journal of biological chemistry, 266(23): 14978-14985.
- Bazan N. G. - *Cell survival matters: docosahexaenoic acid signaling, neuroprotection and photoreceptors*. - 2006, Trends Neuroscience, 29(5): 263-271.
- Bazan N. G. - *Survival signaling in retinal pigment epithelial cells in response to oxidative stress: significance in retinal degenerations*. - 2006, Advances in experimental medicine and biology, 572: 531-540.
- Bazan N. G. - *Neurotrophins induce neuroprotective signaling in the retinal pigment epithelial cell by activating the synthesis of the anti-inflammatory and anti-apoptotic neuroprotectin D1*. - 2008, Advances in experimental medicine and biology, 613: 39-44.
- Beatty S., Koh H., et al. - *The role of oxidative stress in the pathogenesis of age-related macular degeneration*. - 2000, Survey of Ophthalmology, 45(2): 115-134.
- Bek T. and Jensen P. K. - *Three-dimensional structure of human retinal vessels studied by vascular casting*. - 1993, Acta Ophthalmologica (Copenh), 71(4): 506-513.
- Ben-Shabat S., Parish C. A., et al. - *Fluorescent pigments of the retinal pigment epithelium and age-related macular degeneration*. - 2001, Bioorganic & medicinal chemistry letters, 11(12): 1533-1540.
- Bernardos R. L., Barthel L. K., et al. - *Late-stage neuronal progenitors in the retina are radial Muller glia that function as retinal stem cells*. - 2007, Journal of Neuroscience, 27(26): 7028-7040.
- Berneis K. K. and Krauss R. M. - *Metabolic origins and clinical significance of LDL heterogeneity*. - 2002, Journal of Lipid Research, 43(9): 1363-1379.
- Bishop P. N. - *Structural macromolecules and supramolecular organisation of the vitreous gel*. - 2000, Progress in retinal and eye research, 19(3): 323-344.
- Bojanic D. D., Tarr P. T., et al. - *Differential expression and function of ABCG1 and ABCG4 during development and aging*. - Journal of Lipid Research, 51(1): 169-181.
- Booij J. C., Baas D. C., et al. - *The dynamic nature of Bruch's membrane*. - 2010, Progress in Retinal and Eye Research, 29(1): 1-18.
- Boulton M., Rozanowska M., et al. - *Retinal photodamage*. - 2001, Journal of photochemistry and photobiology, 64(2-3): 144-161.
- Bowmaker J. K. and Dartnall H. J. - *Visual pigments of rods and cones in a human retina*. - 1980, The Journal of physiology, 298: 501-511.
- Braekvelt C. R. - *Fine structure of the choriocapillaris, Bruch's membrane and retinal epithelium in the sheep*. - 1983, Anatomy and embryology (Berlin), 166(3): 415-425.
- Bravi M. C., Pietrangeli P., et al. - *Polyol pathway activation and glutathione redox status in non-insulin-dependent diabetic patients*. - 1997, Metabolism, 46(10): 1194-1198.
- Bray G. A. - *Fructose: should we worry?* - 2008, International journal of obesity (London), 32 Suppl 7: S127-131.
- Brenna J. T. - *Efficiency of conversion of alpha-linolenic acid to long chain n-3 fatty acids in man*. - 2002, Current opinion in clinical nutrition and metabolic care, 5(2): 127-132.
- Bressler S. B., Munoz B., et al. - *Racial differences in the prevalence of age-related macular degeneration: the Salisbury Eye Evaluation (SEE) Project*. - 2008, Archive of Ophthalmology, 126(2): 241-245.

- Bretillon L., Acar N., et al. - *ApoB100,LDLR-/- mice exhibit reduced electroretinographic response and cholesteryl esters deposits in the retina.* - 2008, Investigative Ophthalmology & Visual Science, 49(4): 1307-1314.
- Bretillon L., Thuret G., et al. - *Lipid and fatty acid profile of the retina, retinal pigment epithelium/choroid, and the lacrimal gland, and associations with adipose tissue fatty acids in human subjects.* - 2008, Experimental Eye Research, 87(6): 521-528.
- Bringmann A., Pannicke T., et al. - *Role of retinal glial cells in neurotransmitter uptake and metabolism.* - 2009, Neurochemistry international, 54(3-4): 143-160.
- Bringmann A., Pannicke T., et al. - *Muller cells in the healthy and diseased retina.* - 2006, Progress in Retinal and Eye Research, 25(4): 397-424.
- Brown A. J. and Jessup W. - *Oxysterols and atherosclerosis.* - 1999, Atherosclerosis, 142(1): 1-28.
- Brown D. M., Heier J. S., et al. - *Primary endpoint results of a phase II study of vascular endothelial growth factor trap-eye in wet age-related macular degeneration.* - 2011, Ophthalmology, 118(6): 1089-1097.
- Brown D. M., Kaiser P. K., et al. - *Ranibizumab versus verteporfin for neovascular age-related macular degeneration.* - 2006, The New England journal of medicine, 355(14): 1432-1444.
- Brownlee M. - *Advanced protein glycosylation in diabetes and aging.* - 1995, Annual review of medicine, 46: 223-234.
- Brownlee M. - *Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications.* - 2001, Nature, 414(6865): 813-820.
- Buettner G. R. - *Superoxide dismutase in redox biology: the roles of superoxide and hydrogen peroxide.* - 2011, Anti-cancer agents in medicinal chemistry, 11(4): 341-346.
- Buschini E., Piras A., et al. - *Age related macular degeneration and drusen: Neuroinflammation in the retina.* - 2011, Progress in neurobiology.
- Busik J. V., Mohr S., et al. - *Hyperglycemia-induced reactive oxygen species toxicity to endothelial cells is dependent on paracrine mediators.* - 2008, Diabetes, 57(7): 1952-1965.
- Butt A. L., Lee E. T., et al. - *Prevalence and risks factors of age-related macular degeneration in Oklahoma Indians: the Vision Keepers Study.* - 2011, Ophthalmology, 118(7): 1380-1385.
- Buysschaert M. - *Diabétologie Clinique* - 2006.
- Cackett P., Yeo I., et al. - *Relationship of smoking and cardiovascular risk factors with polypoidal choroidal vasculopathy and age-related macular degeneration in Chinese persons.* - 2011, Ophthalmology, 118(5): 846-852.
- Cankova Z., Huang J. D., et al. - *Passage of low-density lipoproteins through Bruch's membrane and choroid.* - 2011, Experimental Eye Research, 93(6): 947-955.
- Cerulli A., Carella E., et al. - *Choroïde : Circulation, Innervation.* - 2008, Pathologies Vasculaires Oculaires Masson E. Paris, Société Française d'Ophtalmologie.
- Chakravarthy U., Augood C., et al. - *Cigarette smoking and age-related macular degeneration in the EUREYE Study.* - 2007, Ophthalmology, 114(6): 1157-1163.
- Chakravarthy U. and Gardiner T. A. - *Endothelium-derived agents in pericyte function/dysfunction.* - 1999, Progress in Retinal and Eye Research, 18(4): 511-527.
- Chakravarthy U., Wong T. Y., et al. - *Clinical risk factors for age-related macular degeneration: a systematic review and meta-analysis.* - 2010, BMC Ophthalmol, 10: 31.
- Chawla A., Boisvert W. A., et al. - *A PPAR gamma-LXR-ABCA1 pathway in macrophages is involved in cholesterol efflux and atherogenesis.* - 2001, Molecular Cell, 7(1): 161-171.

- Chen L., Miyamura N., et al. - *Distribution of the collagen IV isoforms in human Bruch's membrane.* - 2003, The British journal of ophthalmology, 87(2): 212-215.
- Chen M., Forrester J. V., et al. - *Dysregulation in retinal para-inflammation and age-related retinal degeneration in CCL2 or CCR2 deficient mice.* - 2011, PLoS One, 6(8): e22818.
- Cherwek D. H., Grossniklaus H. E., et al. - *Iris.* - (2006), from <http://www.oculist.net/downat0502/prof/ebook/duanes/pages/v7/v7c011.html>.
- Cheung C. M., Tai E. S., et al. - *Prevalence of and risk factors for age-related macular degeneration in a multiethnic Asian cohort.* - 2012, Archives of Ophthalmology, 130(4): 480-486.
- Chiang P. P., Lamoureux E. L., et al. - *Racial differences in the prevalence of diabetes but not diabetic retinopathy in a multi-ethnic Asian population.* - 2011, Investigative Ophthalmology & Visual Science, 52(10): 7586-7592.
- Chiu C. J. and Taylor A. - *Dietary hyperglycemia, glycemic index and metabolic retinal diseases.* - 2011, Progress in Retinal and Eye Research, 30(1): 18-53.
- Cho E., Hung S., et al. - *Prospective study of dietary fat and the risk of age-related macular degeneration.* - 2001, The American Journal of Clinical Nutrition, 73(2): 209-218.
- Chong E. W., Kreis A. J., et al. - *Dietary omega-3 fatty acid and fish intake in the primary prevention of age-related macular degeneration: a systematic review and meta-analysis.* - 2008, Archives of Ophthalmology, 126(6): 826-833.
- Chong E. W., Kreis A. J., et al. - *Dietary omega-3 fatty acid and fish intake in the primary prevention of age-related macular degeneration: a systematic review and meta-analysis.* - 2008, Archives of Ophthalmology, 126(6): 826-833.
- Chong E. W., Robman L. D., et al. - *Fat consumption and its association with age-related macular degeneration.* - 2009, Archives of Ophthalmology, 127(5): 674-680.
- Chong E. W., Robman L. D., et al. - *Fat consumption and its association with age-related macular degeneration.* - 2009, Archives of Ophthalmology, 127(5): 674-680.
- Chong N. H., Keonin J., et al. - *Decreased thickness and integrity of the macular elastic layer of Bruch's membrane correspond to the distribution of lesions associated with age-related macular degeneration.* - 2005, The American journal of pathology, 166(1): 241-251.
- Christen W. G., Schaumberg D. A., et al. - *Dietary omega-3 fatty acid and fish intake and incident age-related macular degeneration in women.* - 2011, Archives of Ophthalmology, 129(7): 921-929.
- Chua B., Flood V., et al. - *Dietary fatty acids and the 5-year incidence of age-related maculopathy.* - 2006, Archives of Ophthalmology, 124(7): 981-986.
- Clemons T. E., Milton R. C., et al. - *Risk factors for the incidence of Advanced Age-Related Macular Degeneration in the Age-Related Eye Disease Study (AREDS) AREDS report no. 19.* - 2005, Ophthalmology, 112(4): 533-539.
- Coffey P. J., Gias C., et al. - *Complement factor H deficiency in aged mice causes retinal abnormalities and visual dysfunction.* - 2007, Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 104(42): 16651-16656.
- Combadiere C., Feumi C., et al. - *CX3CR1-dependent subretinal microglia cell accumulation is associated with cardinal features of age-related macular degeneration.* - 2007, The Journal of Clinical Investigation, 117(10): 2920-2928.
- Cong R., Zhou B., et al. - *Smoking and the risk of age-related macular degeneration: a meta-analysis.* - 2008, Annals of epidemiology, 18(8): 647-656.
- Cousins S. W., Espinosa-Heidmann D. G., et al. - *The role of aging, high fat diet and blue light exposure in an experimental mouse model for basal laminar deposit formation.* - 2002, Experimental Eye Research, 75(5): 543-553.

- Crabb J. W., Miyagi M., et al. - *Drusen proteome analysis: an approach to the etiology of age-related macular degeneration*. - 2002, Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 99(23): 14682-14687.
- Cruickshanks K. J., Klein R., et al. - *Sunlight and age-related macular degeneration. The Beaver Dam Eye Study*. - 1993, Archives of Ophthalmology, 111(4): 514-518.
- Curcio C. A., Johnson M., et al. - *Aging, age-related macular degeneration, and the response-to-retention of apolipoprotein B-containing lipoproteins*. - 2009, Progress in Retinal and Eye Research, 28(6): 393-422.
- Curcio C. A. and Millican C. L. - *Basal linear deposit and large drusen are specific for early age-related maculopathy*. - 1999, Archives of Ophthalmology, 117(3): 329-339.
- Curcio C. A., Millican C. L., et al. - *Aging of the human photoreceptor mosaic: evidence for selective vulnerability of rods in central retina*. - 1993, Investigative Ophthalmology & Visual Science, 34(12): 3278-3296.
- Curcio C. A., Millican C. L., et al. - *Accumulation of cholesterol with age in human Bruch's membrane*. - 2001, Investigative Ophthalmology & Visual Science, 42(1): 265-274.
- Curcio C. A., Sloan K. R., et al. - *Human photoreceptor topography*. - 1990, The Journal of comparative neurology, 292(4): 497-523.
- Danaei G., Finucane M. M., et al. - *National, regional, and global trends in fasting plasma glucose and diabetes prevalence since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 370 country-years and 2.7 million participants*. - 2011, Lancet, 378(9785): 31-40.
- Dasari B., Prasanthi J. R., et al. - *Cholesterol-enriched diet causes age-related macular degeneration-like pathology in rabbit retina*. - 2011, BMC Ophthalmology, 11: 22.
- Davuluri G., Espina V., et al. - *Activated VEGF receptor shed into the vitreous in eyes with wet AMD: a new class of biomarkers in the vitreous with potential for predicting the treatment timing and monitoring response*. - 2009, Archives of Ophthalmology, 127(5): 613-621.
- Dekker M. J., Su Q., et al. - *Fructose: a highly lipogenic nutrient implicated in insulin resistance, hepatic steatosis, and the metabolic syndrome*. - 2010, American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism, 299(5): E685-E694.
- Delcourt C., Carriere I., et al. - *Dietary fat and the risk of age-related maculopathy: the POLANUT study*. - 2007, European journal of clinical nutrition, 61(11): 1341-1344.
- Delcourt C., Carriere I., et al. - *Plasma lutein and zeaxanthin and other carotenoids as modifiable risk factors for age-related maculopathy and cataract: the POLA Study*. - 2006, Investigative Ophthalmology & Visual Science, 47(6): 2329-2335.
- Delcourt C., Massin P., et al. - *Epidemiology of diabetic retinopathy: expected vs reported prevalence of cases in the French population*. - 2009, Diabetes & metabolism, 35(6): 431-438.
- Demontis G. C., Longoni B., et al. - *Molecular steps involved in light-induced oxidative damage to retinal rods*. - 2002, Investigative Ophthalmology & Visual Science, 43(7): 2421-2427.
- Dithmar S., Curcio C. A., et al. - *Ultrastructural changes in Bruch's membrane of apolipoprotein E-deficient mice*. - 2000, Investigative Ophthalmology & Visual Science, 41(8): 2035-2042.
- Dithmar S., Sharara N. A., et al. - *Murine high-fat diet and laser photochemical model of basal deposits in Bruch membrane*. - 2001, Archives of Ophthalmology, 119(11): 1643-1649.
- Du X. L., Edelstein D., et al. - *Hyperglycemia-induced mitochondrial superoxide overproduction activates the hexosamine pathway and induces plasminogen activator*

- inhibitor-1 expression by increasing Sp1 glycosylation.* - 2000, Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 97(22): 12222-12226.
- Ducasse A., Labrousse M., et al. - *Anatomie et Histologie des vaisseaux destinés au globe oculaire.* - 2008, Pathologies Vasculaires Oculaires Masson E. Paris, Société Française d'Ophthalmologie.
- Edwards R. B. and Adler A. J. - *Exchange of retinol between IRBP and CRBP.* - 1994, Experimental eye research, 59(2): 161-170.
- Elsner A. E., Burns S. A., et al. - *Cone photopigment in older subjects: decreased optical density in early age-related macular degeneration.* - 2002, Journal of the Optical Society of America. A, Optics, image science, and vision, 19(1): 215-222.
- Espinosa-Heidmann D. G., Suner I. J., et al. - *Cigarette smoke-related oxidants and the development of sub-RPE deposits in an experimental animal model of dry AMD.* - 2006, Investigative Ophthalmology & Visual Science, 47(2): 729-737.
- Esterbauer H., Schaur R. J., et al. - *Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes.* - 1991, Free radical biology & medicine, 11(1): 81-128.
- Ethen C. M., Reilly C., et al. - *Age-related macular degeneration and retinal protein modification by 4-hydroxy-2-nonenal.* - 2007, Investigative Ophthalmology & Visual Science, 48(8): 3469-3479.
- Farese R. V., Jr., Veniant M. M., et al. - *Phenotypic analysis of mice expressing exclusively apolipoprotein B48 or apolipoprotein B100.* - 1996, Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 93(13): 6393-6398.
- Farwick A., Dasch B., et al. - *Variations in five genes and the severity of age-related macular degeneration: results from the Muenster aging and retina study.* - 2009, Eye.
- Fatt I. - *Hydraulic flow conductivity of the vitreous gel.* - 1977, Investigative ophthalmology & visual science, 16(6): 565-568.
- Feng R. N., Zhao C., et al. - *BMI is strongly associated with hypertension, and waist circumference is strongly associated with type 2 diabetes and dyslipidemia, in northern Chinese adults.* - 2012, Journal of Epidemiology, 22(4): 317-323.
- Fischer A. J. and Reh T. A. - *Potential of Muller glia to become neurogenic retinal progenitor cells.* - 2003, Glia, 43(1): 70-76.
- Fletcher A. E., Bentham G. C., et al. - *Sunlight exposure, antioxidants, and age-related macular degeneration.* - 2008, Archives of Ophthalmology, 126(10): 1396-1403.
- Flood V., Smith W., et al. - *Dietary antioxidant intake and incidence of early age-related maculopathy: the Blue Mountains Eye Study.* - 2002, Ophthalmology, 109(12): 2272-2278.
- Foulds W. S. - *Is your vitreous really necessary? The role of the vitreous in the eye with particular reference to retinal attachment, detachment and the mode of action of vitreous substitutes.* - 1987, Eye (Lond), 1 (Pt 6): 641-664.
- Frank R. N., Puklin J. E., et al. - *Race, iris color, and age-related macular degeneration.* - 2000, Transactions of the American Ophthalmological Society, 98: 109-115; discussion 115-107.
- Fraser-Bell S., Wu J., et al. - *Cardiovascular risk factors and age-related macular degeneration: the Los Angeles Latino Eye Study.* - 2008, American journal of ophthalmology, 145(2): 308-316.
- Friedman D. S., O'Colmain B. J., et al. - *Prevalence of age-related macular degeneration in the United States.* - 2004, Archives of Ophthalmology, 122(4): 564-572.
- Fruttiger M. - *Development of the retinal vasculature.* - 2007, Angiogenesis, 10(2): 77-88.
- Fu Y. - *Phototransduction in Rods and Cones.* - 1995.

- Fujihara M., Nagai N., et al. - *Chronic cigarette smoke causes oxidative damage and apoptosis to retinal pigmented epithelial cells in mice.* - 2008, PLoS One, 3(9): e3119.
- Gaillard E. R., Atherton S. J., et al. - *Photophysical studies on human retinal lipofuscin.* - 1995, Photochemistry and photobiology, 61(5): 448-453.
- Gao H. and Hollyfield J. G. - *Aging of the human retina. Differential loss of neurons and retinal pigment epithelial cells.* - 1992, Investigative ophthalmology & visual science, 33(1): 1-17.
- Glenn J. V. and Stitt A. W. - *The role of advanced glycation end products in retinal ageing and disease.* - 2009, Biochimica et Biophysica Acta, 1790(10): 1109-1116.
- Gollapalli D. R., Maiti P., et al. - *RPE65 operates in the vertebrate visual cycle by stereospecifically binding all-trans-retinyl esters.* - 2003, Biochemistry, 42(40): 11824-11830.
- Goold L. A., Edussuriya K., et al. - *Prevalence and determinants of age-related macular degeneration in central Sri Lanka: the Kandy Eye Study.* - 2010, The British journal of ophthalmology, 94(2): 150-153.
- Granit R. - *The components of the retinal action potential in mammals and their relation to the discharge in the optic nerve.* - 1933, The Journal of physiology, 77(3): 207-239.
- Green W. R. and Key S. N., 3rd - *Senile macular degeneration: a histopathologic study.* - 1977, Transactions of the American Ophthalmological Society, 75: 180-254.
- Gu X., Meer S. G., et al. - *Carboxyethylpyrrole protein adducts and autoantibodies, biomarkers for age-related macular degeneration.* - 2003, The Journal of Biological Chemistry, 278(43): 42027-42035.
- Gustavsson C., Agardh C. D., et al. - *Vascular cellular adhesion molecule-1 (VCAM-1) expression in mice retinal vessels is affected by both hyperglycemia and hyperlipidemia.* - 2010, PLoS One, 5(9): e12699.
- Halapin N. A. and Bazan N. G. - *NPD1 induction of retinal pigment epithelial cell survival involves PI3K/Akt phosphorylation signaling.* - 2010, Neurochemical research, 35(12): 1944-1947.
- Hamel C. P., Tsilou E., et al. - *Molecular cloning and expression of RPE65, a novel retinal pigment epithelium-specific microsomal protein that is post-transcriptionally regulated in vitro.* - 1993, The Journal of biological chemistry, 268(21): 15751-15757.
- Hammes H. P., Kerner W., et al. - *Diabetic retinopathy in type 1 diabetes-a contemporary analysis of 8,784 patients.* - 2011, Diabetologia, 54(8): 1977-1984.
- Handa J. T., Reiser K. M., et al. - *The advanced glycation endproduct pentosidine induces the expression of PDGF-B in human retinal pigment epithelial cells.* - 1998, Experimental Eye Research, 66(4): 411-419.
- Handa J. T., Verzijl N., et al. - *Increase in the advanced glycation end product pentosidine in Bruch's membrane with age.* - 1999, Investigative Ophthalmology & Visual Science, 40(3): 775-779.
- Hargrave P. A. - *Rhodopsin structure, function, and topography the Friedenwald lecture.* - 2001, Investigative Ophthalmology & Visual Science, 42(1): 3-9.
- Harman D. - *Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry.* - 1956, Journal of gerontology, 11(3): 298-300.
- Havel P. J. - *Dietary fructose: implications for dysregulation of energy homeostasis and lipid/carbohydrate metabolism.* - 2005, Nutrition reviews, 63(5): 133-157.
- Heinonen S. E., Leppanen P., et al. - *Increased atherosclerotic lesion calcification in a novel mouse model combining insulin resistance, hyperglycemia, and hypercholesterolemia.* - 2007, Circulation research, 101(10): 1058-1067.
- Henkind P. - *Radial peripapillary capillaries of the retina. I. Anatomy: human and comparative.* - 1967, The British Journal of Ophthalmology, 51(2): 115-123.

- Hewitt A. T., Nakazawa K., et al. - *Analysis of newly synthesized Bruch's membrane proteoglycans*. - 1989, *Investigative ophthalmology & visual science*, 30(3): 478-486.
- Ho L., van Leeuwen R., et al. - *Reducing the genetic risk of age-related macular degeneration with dietary antioxidants, zinc, and omega-3 fatty acids: the Rotterdam study*. - 2011, *Archives of Ophthalmology*, 129(6): 758-766.
- Ho S. C., Liu J. H., et al. - *Establishment of the mimetic aging effect in mice caused by D-galactose*. - 2003, *Biogerontology*, 4(1): 15-18.
- Hodge A. M., English D. R., et al. - *Glycemic index and dietary fiber and the risk of type 2 diabetes*. - 2004, *Diabetes Care*, 27(11): 2701-2706.
- Hyman L., Schachat A. P., et al. - *Hypertension, cardiovascular disease, and age-related macular degeneration. Age-Related Macular Degeneration Risk Factors Study Group*. - 2000, *Archives of Ophthalmology*, 118(3): 351-358.
- Ida H., Ishibashi K., et al. - *Ultrastructural aging of the RPE-Bruch's membrane-choriocapillaris complex in the D-galactose-treated mouse*. - 2004, *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 45(7): 2348-2354.
- Imanishi Y., Batten M. L., et al. - *Noninvasive two-photon imaging reveals retinyl ester storage structures in the eye*. - 2004, *Journal of cell biology*, 164(3): 373-383.
- Imbeault P., Haman F., et al. - *Obesity and type 2 diabetes prevalence in adults from two remote first nations communities in northwestern ontario, Canada*. - 2011, *Journal of obesity*, 2011: 267509.
- Inoguchi T., Battan R., et al. - *Preferential elevation of protein kinase C isoform beta II and diacylglycerol levels in the aorta and heart of diabetic rats: differential reversibility to glycemic control by islet cell transplantation*. - 1992, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 89(22): 11059-11063.
- Ishibashi S., Brown M. S., et al. - *Hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knockout mice and its reversal by adenovirus-mediated gene delivery*. - 1993, *The Journal of clinical investigation*, 92(2): 883-893.
- Jang G. F., McBee J. K., et al. - *Stereoisomeric specificity of the retinoid cycle in the vertebrate retina*. - 2000, *Journal biological chemistry*, 275(36): 28128-28138.
- Jarrett S. G., Lin H., et al. - *Mitochondrial DNA damage and its potential role in retinal degeneration*. - 2008, *Progress in Retinal and Eye Research*, 27(6): 596-607.
- Jha P., Bora P. S., et al. - *The role of complement system in ocular diseases including uveitis and macular degeneration*. - 2007, *Molecular immunology*, 44(16): 3901-3908.
- Jin M., Li S., et al. - *Rpe65 is the retinoid isomerase in bovine retinal pigment epithelium*. - 2005, *Cell*, 122(3): 449-459.
- Jin M., Li S., et al. - *The role of interphotoreceptor retinoid-binding protein on the translocation of visual retinoids and function of cone photoreceptors*. - 2009, *The Journal of neuroscience*, 29(5): 1486-1495.
- Johnson R. J., Segal M. S., et al. - *Potential role of sugar (fructose) in the epidemic of hypertension, obesity and the metabolic syndrome, diabetes, kidney disease, and cardiovascular disease*. - 2007, *The American Journal of Clinical Nutrition*, 86(4): 899-906.
- Jonasson F., Arnarsson A., et al. - *Prevalence of age-related macular degeneration in old persons: Age, Gene/environment Susceptibility Reykjavik Study*. - 2011, *Ophthalmology*, 118(5): 825-830.
- Kaemmerer E., Schutt F., et al. - *Effects of lipid peroxidation-related protein modifications on RPE lysosomal functions and POS phagocytosis*. - 2007, *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 48(3): 1342-1347.
- Kaiser A., Vollenweider P., et al. - *Prevalence, awareness and treatment of type 2 diabetes mellitus in Switzerland: the CoLaus study*. - 2012, *Diabetic medicine*, 29(2): 190-197.

- Karlstetter M., Ebert S., et al. - *Microglia in the healthy and degenerating retina: insights from novel mouse models.* - 2010, *Immunobiology*, 215(9-10): 685-691.
- Kato S., Takemori M., et al. - *Retinopathy in older patients with diabetes mellitus.* - 2002, *Diabetes research and clinical practice*, 58(3): 187-192.
- Kawasaki R., Wang J. J., et al. - *Prevalence of age-related macular degeneration in a Malay population: the Singapore Malay Eye Study.* - 2008, *Ophthalmology*, 115(10): 1735-1741.
- Kawasaki R., Wang J. J., et al. - *Prevalence and risk factors for age-related macular degeneration in an adult Japanese population: the Funagata study.* - 2008, *Ophthalmology*, 115(8): 1376-1381, 1381 e1371-1372.
- Kayatz P., Heimann K., et al. - *Ultrastructural localization of light-induced lipid peroxides in the rat retina.* - 1999, *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 40(10): 2314-2321.
- Kennedy C. J., Rakoczy P. E., et al. - *Lipofuscin of the retinal pigment epithelium: a review.* - 1995, *Eye (Lond)*, 9 (Pt 6): 763-771.
- Keunen J. E., van Norren D., et al. - *Density of foveal cone pigments at older age.* - 1987, *Investigative ophthalmology & visual science*, 28(6): 985-991.
- Kevany B. M. and Palczewski K. - *Phagocytosis of retinal rod and cone photoreceptors.* - 2011, *Physiology (Bethesda)*, 25(1): 8-15.
- Kim J., Kim O. S., et al. - *Cytotoxic role of methylglyoxal in rat retinal pericytes: Involvement of a nuclear factor-kappaB and inducible nitric oxide synthase pathway.* - 2010, *Chemico-biological interactions*, 188(1): 86-93.
- Kishan A. U., Modjtahedi B. S., et al. - *Lipids and age-related macular degeneration.* - 2011, *Survey of Ophthalmology*, 56(3): 195-213.
- Klein R., Chou C. F., et al. - *Prevalence of age-related macular degeneration in the US population.* - 2011, *Archives of Ophthalmology*, 129(1): 75-80.
- Klein R., Cruickshanks K. J., et al. - *The prevalence of age-related macular degeneration and associated risk factors.* - 2010, *Archives of Ophthalmology*, 128(6): 750-758.
- Klein R., Klein B. E., et al. - *Subclinical atherosclerotic cardiovascular disease and early age-related macular degeneration in a multiracial cohort: the Multiethnic Study of Atherosclerosis.* - 2007, *Archives of ophthalmology*, 125(4): 534-543.
- Klein R., Klein B. E., et al. - *Fifteen-year cumulative incidence of age-related macular degeneration: the Beaver Dam Eye Study.* - 2007, *Ophthalmology*, 114(2): 253-262.
- Klein R., Klein B. E., et al. - *Prevalence of age-related macular degeneration in 4 racial/ethnic groups in the multi-ethnic study of atherosclerosis.* - 2006, *Ophthalmology*, 113(3): 373-380.
- Klein R., Klein B. E., et al. - *Prevalence of age-related maculopathy. The Beaver Dam Eye Study.* - 1992, *Ophthalmology*, 99(6): 933-943.
- Klein R., Knudtson M. D., et al. - *Inflammation, complement factor h, and age-related macular degeneration: the Multi-ethnic Study of Atherosclerosis.* - 2008, *Ophthalmology*, 115(10): 1742-1749.
- Klein R., Sharrett A. R., et al. - *The association of atherosclerosis, vascular risk factors, and retinopathy in adults with diabetes : the atherosclerosis risk in communities study.* - 2002, *Ophthalmology*, 109(7): 1225-1234.
- Kolb H. - *Simple Anatomy of the Retina.* - 1995.
- Kolm-Litty V., Sauer U., et al. - *High glucose-induced transforming growth factor beta1 production is mediated by the hexosamine pathway in porcine glomerular mesangial cells.* - 1998, *The Journal of Clinical Investigation*, 101(1): 160-169.
- Kopitz J., Holz F. G., et al. - *Lipids and lipid peroxidation products in the pathogenesis of age-related macular degeneration.* - 2004, *Biochimie*, 86(11): 825-831.

- Kostev K. and Rathmann W. - *Diabetic retinopathy at diagnosis of type 2 diabetes in the UK: a database analysis.* - 2012, Diabetologia.
- Koua D., Cerutti L., et al. - *PeroxiBase: a database with new tools for peroxidase family classification.* - 2009, Nucleic acids research, 37(Database issue): D261-266.
- Lai Y. L., Wiggert B., et al. - *Interphotoreceptor retinol-binding proteins: possible transport vehicles between compartments of the retina.* - 1982, Nature, 298(5877): 848-849.
- Leber T. - *Die Cirkulations- und Ernährungsverhältnisse des Auges.* - 1903, Graefe Saemischer Handbuch der Augenheilkunde Engelmann L. V. v. W. 2.
- Lee J. W., Brancati F. L., et al. - *Trends in the prevalence of type 2 diabetes in Asians versus whites: results from the United States National Health Interview Survey, 1997-2008.* - 2011, Diabetes Care, 34(2): 353-357.
- Leskov I. B., Klenchin V. A., et al. - *The gain of rod phototransduction: reconciliation of biochemical and electrophysiological measurements.* - 2000, Neuron, 27(3): 525-537.
- Leveziel N., Tilleul J., et al. - *Genetic factors associated with age-related macular degeneration.* - 2011, Ophthalmologica, 226(3): 87-102.
- Li C. M., Chung B. H., et al. - *Lipoprotein-like particles and cholesteryl esters in human Bruch's membrane: initial characterization.* - 2005, Investigative Ophthalmology & Visual Science, 46(7): 2576-2586.
- Liang F. Q. and Godley B. F. - *Oxidative stress-induced mitochondrial DNA damage in human retinal pigment epithelial cells: a possible mechanism for RPE aging and age-related macular degeneration.* - 2003, Experimental Eye Research, 76(4): 397-403.
- Liew G., Klein R., et al. - *The role of genetics in susceptibility to diabetic retinopathy.* - 2009, International ophthalmology clinics, 49(2): 35-52.
- Liles M. R., Newsome D. A., et al. - *Antioxidant enzymes in the aging human retinal pigment epithelium.* - 1991, Archives of Ophthalmology, 109(9): 1285-1288.
- Lim A., Stewart J., et al. - *Prevalence and risk factors of diabetic retinopathy in a multi-racial underserved population.* - 2008, Ophthalmic epidemiology, 15(6): 402-409.
- Lim L. S., Tai E. S., et al. - *C-reactive protein, body mass index, and diabetic retinopathy.* - 2011, Investigative Ophthalmology & Visual Science, 51(9): 4458-4463.
- Liou G. I., Bridges C. D., et al. - *Vitamin A transport between retina and pigment epithelium--an interstitial protein carrying endogenous retinol (interstitial retinol-binding protein).* - 1982, Vision research, 22(12): 1457-1467.
- Luhmann U. F., Robbie S., et al. - *The drusenlike phenotype in aging Ccl2-knockout mice is caused by an accelerated accumulation of swollen autofluorescent subretinal macrophages.* - 2009, Investigative Ophthalmology & Visual Science, 50(12): 5934-5943.
- Ma L., Dou H. L., et al. - *Lutein and zeaxanthin intake and the risk of age-related macular degeneration: a systematic review and meta-analysis.* - 2012, The British journal of nutrition, 107(3): 350-359.
- Madonna R. and De Caterina R. - *Cellular and molecular mechanisms of vascular injury in diabetes--part I: pathways of vascular disease in diabetes.* - 2011, Vascular pharmacology, 54(3-6): 68-74.
- Maeda S., Nakanishi S., et al. - *Associations between Small Dense LDL, HDL Subfractions (HDL2, HDL3) and Risk of Atherosclerosis in Japanese-Americans.* - 2011, Journal of atherosclerosis and thrombosis.
- Maeda T., Maeda A., et al. - *Evaluation of potential therapies for a mouse model of human age-related macular degeneration caused by delayed all-trans-retinal clearance.* - 2009, Investigative Ophthalmology & Visual Science, 50(10): 4917-4925.
- Mahdy R. A. and Nada W. M. - *Evaluation of the role of vascular endothelial growth factor in diabetic retinopathy.* - 2011, Ophthalmic research, 45(2): 87-91.

- Malek G., Johnson L. V., et al. - *Apolipoprotein E allele-dependent pathogenesis: a model for age-related retinal degeneration*. - 2005, Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 102(33): 11900-11905.
- Malvitte L., Montange T., et al. - *[Analogies between atherosclerosis and age-related maculopathy: expected roles of oxysterols]*. - 2006, Journal français d'Ophtalmologie, 29(5): 570-578.
- Mandarino L. J., Finlayson J., et al. - *High glucose downregulates glucose transport activity in retinal capillary pericytes but not endothelial cells*. - 1994, Investigative Ophthalmology & Visual Science, 35(3): 964-972.
- Marc R. E., Jones B. W., et al. - *Extreme retinal remodeling triggered by light damage: implications for age related macular degeneration*. - 2008, Molecular Vision, 14: 782-806.
- Marmor M. F. and Wolfensberger T. J. - *The retinal pigment epithelium : function and disease* - 1998, New York, Oxford University Press.
- Marshall J., Grindle J., et al. - *Convolution in human rods: an ageing process*. - 1979, The British journal of ophthalmology, 63(3): 181-187.
- Mata N. L., Lichter J. B., et al. - *Investigation of Oral Fenretinide for Treatment of Geographic Atrophy in Age-Related Macular Degeneration*. - 2012, Retina.
- Mata N. L., Moghrabi W. N., et al. - *Rpe65 is a retinyl ester binding protein that presents insoluble substrate to the isomerase in retinal pigment epithelial cells*. - 2004, The Journal of biological chemistry, 279(1): 635-643.
- Mata N. L., Radu R. A., et al. - *Isomerization and oxidation of vitamin a in cone-dominant retinas: a novel pathway for visual-pigment regeneration in daylight*. - 2002, Neuron, 36(1): 69-80.
- Mata N. L., Ruiz A., et al. - *Chicken retinas contain a retinoid isomerase activity that catalyzes the direct conversion of all-trans-retinol to 11-cis-retinol*. - 2005, Biochemistry, 44(35): 11715-11721.
- Mecklenburg L. and Schraermeyer U. - *An overview on the toxic morphological changes in the retinal pigment epithelium after systemic compound administration*. - 2007, Toxicologic pathology, 35(2): 252-267.
- Meerwaldt R., Links T., et al. - *The clinical relevance of assessing advanced glycation endproducts accumulation in diabetes*. - 2008, Cardiovascular diabetology, 7: 29.
- Meyer K. A., Kushi L. H., et al. - *Carbohydrates, dietary fiber, and incident type 2 diabetes in older women*. - 2000, The American Journal of Clinical Nutrition, 71(4): 921-930.
- Miller A. and Adeli K. - *Dietary fructose and the metabolic syndrome*. - 2008, Current opinion in gastroenterology, 24(2): 204-209.
- Miller E. C., Capps B. E., et al. - *Regulation of igf-I signaling in retinal endothelial cells by hyperglycemia*. - 2007, Investigative Ophthalmology & Visual Science, 48(8): 3878-3887.
- Miller J. W., Adamis A. P., et al. - *Vascular endothelial growth factor in ocular neovascularization and proliferative diabetic retinopathy*. - 1997, Diabetes/metabolism reviews, 13(1): 37-50.
- Mitchell P., Smith W., et al. - *Iris color, skin sun sensitivity, and age-related maculopathy. The Blue Mountains Eye Study*. - 1998, Ophthalmology, 105(8): 1359-1363.
- Miyazono S., Shimauchi-Matsukawa Y., et al. - *Highly efficient retinal metabolism in cones*. - 2008, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 105(41): 16051-16056.
- Moiseyev G., Chen Y., et al. - *RPE65 is the isomerohydrolase in the retinoid visual cycle*. - 2005, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 102(35): 12413-12418.

- Mondal M. S., Ruiz A., et al. - *Lecithin retinol acyltransferase contains cysteine residues essential for catalysis*. - 2000, *Biochemistry*, 39(17): 5215-5220.
- Monnier V. M. - *Intervention against the Maillard reaction in vivo*. - 2003, *Archives of biochemistry and biophysics*, 419(1): 1-15.
- Moon B. G., Joe S. G., et al. - *Prevalence and risk factors of early-stage age-related macular degeneration in patients examined at a health promotion center in Korea*. - 2012, *Journal of Korean medical science*, 27(5): 537-541.
- Movahed M. R., Sattur S., et al. - *Independent association between type 2 diabetes mellitus and hypertension over a period of 10 years in a large inpatient population*. - 2010, *Clinical and experimental hypertension* 32(3): 198-201.
- Mullins R. F., Russell S. R., et al. - *Drusen associated with aging and age-related macular degeneration contain proteins common to extracellular deposits associated with atherosclerosis, elastosis, amyloidosis, and dense deposit disease*. - 2000, *FASEB Journal*, 14(7): 835-846.
- Muniz A., Villazana-Espinoza E. T., et al. - *A novel cone visual cycle in the cone-dominated retina*. - 2007, *Experimental Eye Research*, 85(2): 175-184.
- Muramatsu T., Yatsuya H., et al. - *Higher dietary intake of alpha-linolenic acid is associated with lower insulin resistance in middle-aged Japanese*. - *Preventive medicine*, 50(5-6): 272-276.
- Murdaugh L. S., Dillon J., et al. - *Modifications to the basement membrane protein laminin using glycolaldehyde and A2E: a model for aging in Bruch's membrane*. - 2009, *Experimental eye research*, 89(2): 187-192.
- Murdaugh L. S., Mandal S., et al. - *Compositional studies of human RPE lipofuscin: mechanisms of molecular modifications*. - 2011, *Journal of Mass Spectrometry* 46(1): 90-95.
- Nangia V., Jonas J. B., et al. - *Prevalence of age-related macular degeneration in rural central India: the Central India Eye and Medical Study*. - 2011, *Retina*, 31(6): 1179-1185.
- Neufeld G., Cohen T., et al. - *Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors*. - 1999, *FASEB Journal*, 13(1): 9-22.
- Newsome D. A., Dobard E. P., et al. - *Human retinal pigment epithelium contains two distinct species of superoxide dismutase*. - 1990, *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 31(12): 2508-2513.
- Nicolas C. M., Robman L. D., et al. - *Iris colour, ethnic origin and progression of age-related macular degeneration*. - 2003, *Clinical & experimental ophthalmology*, 31(6): 465-469.
- Nishida T. - *Cornea*. - 2005, *Cornea Elsevier Mosby* 1: 3-26.
- Okubo A., Rosa R. H., Jr., et al. - *The relationships of age changes in retinal pigment epithelium and Bruch's membrane*. - 1999, *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 40(2): 443-449.
- Osterberg G. - *Topography of the layer of rods and cones in the human retina*. - 1935, *Acta Ophthalmologica supplement*, 1(1-103).
- Owen C. G., Jarrar Z., et al. - *The estimated prevalence and incidence of late stage age related macular degeneration in the UK*. - 2012, *The British Journal of Ophthalmology*.
- Panda-Jonas S., Jonas J. B., et al. - *Retinal photoreceptor density decreases with age*. - 1995, *Ophthalmology*, 102(12): 1853-1859.
- Paniagua J. A., Perez-Martinez P., et al. - *A low-fat high-carbohydrate diet supplemented with long-chain n-3 PUFA reduces the risk of the metabolic syndrome*. - 2011, *Atherosclerosis*, 218(2): 443-450.

- Paques M., Massin P., et al. - *Growth factors and diabetic retinopathy*. - 1997, *Diabetes & metabolism*, 23(2): 125-130.
- Park J. H., Lee S., et al. - *Copy number variation of age-related macular degeneration relevant genes in the Korean population*. - 2012, *PLoS One*, 7(2): e31243.
- Parker R. O., Fan J., et al. - *Normal cone function requires the interphotoreceptor retinoid binding protein*. - 2009, *The Journal of neuroscience*, 29(14): 4616-4621.
- Patel M. and Chan C. C. - *Immunopathological aspects of age-related macular degeneration*. - 2008, *Seminars in immunopathology*, 30(2): 97-110.
- Pauleikhoff D., Harper C. A., et al. - *Aging changes in Bruch's membrane. A histochemical and morphologic study*. - 1990, *Ophthalmology*, 97(2): 171-178.
- Pauleikhoff D., Zuels S., et al. - *Correlation between biochemical composition and fluorescein binding of deposits in Bruch's membrane*. - 1992, *Ophthalmology*, 99(10): 1548-1553.
- Penfold P. L., Madigan M. C., et al. - *Immunological and aetiological aspects of macular degeneration*. - 2001, *Progress in Retinal and Eye Research*, 20(3): 385-414.
- Pham T. Q., Rochtchina E., et al. - *Sunlight-related factors and the 10-year incidence of age-related maculopathy*. - 2009, *Ophthalmic epidemiology*, 16(2): 136-141.
- Piermarocchi S., Segato T., et al. - *The prevalence of age-related macular degeneration in Italy (PAMDI) study: report 1*. - 2011, *Ophthalmic epidemiology*, 18(3): 129-136.
- Poudyal H., Panchal S. K., et al. - *Omega-3 fatty acids and metabolic syndrome: effects and emerging mechanisms of action*. - 2011, *Progress in lipid research*, 50(4): 372-387.
- Pournaras C., Bek T., et al. - *Circulation Rétinienne*. - 2008, *Pathologies Vasculaires Oculaires Masson E. Paris, Société Française d'Ophtalmologie*.
- Powell-Braxton L., Veniant M., et al. - *A mouse model of human familial hypercholesterolemia: markedly elevated low density lipoprotein cholesterol levels and severe atherosclerosis on a low-fat chow diet*. - 1998, *Nature medicine*, 4(8): 934-938.
- Praidou A., Androudi S., et al. - *Angiogenic growth factors and their inhibitors in diabetic retinopathy*. - 2010, *Current diabetes reviews*, 6(5): 304-312.
- Provis J. M. - *Development of the primate retinal vasculature*. - 2001, *Progress in Retinal and Eye Research*, 20(6): 799-821.
- Purcell-Huynh D. A., Farese R. V., Jr., et al. - *Transgenic mice expressing high levels of human apolipoprotein B develop severe atherosclerotic lesions in response to a high-fat diet*. - 1995, *The Journal of Clinical Investigation*, 95(5): 2246-2257.
- Qin Q., Patil K. A., et al. - *Neuroprotectin D1 inhibits retinal ganglion cell death following axotomy*. - 2008, *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids*, 79(6): 201-207.
- Rada J. A. and Johnson J. M. - *Sclera*. - 2005, *Cornea Elsevier Mosby* 1: 27-35.
- Radha V., Rema M., et al. - *Genes and diabetic retinopathy*. - 2002, *Indian journal of ophthalmology*, 50(1): 5-11.
- Rakoczy E., Yu M. J., et al. - *Mouse models of age-related macular degeneration*. - 2006, *Experimental Eye Research*, 82(5): 741-752.
- Ramachandran R., Fausett B. V., et al. - *Ascl1a regulates Muller glia dedifferentiation and retinal regeneration through a Lin-28-dependent, let-7 microRNA signalling pathway*. - 2011, *Nature cell biology*, 12(11): 1101-1107.
- Raman R., Biswas S., et al. - *Association of macular pigment optical density with risk factors for wet age-related macular degeneration in the Indian population*. - 2012, *Eye (Lond)*, 26(7): 950-957.

- Ramrattan R. S., van der Schaft T. L., et al. - *Morphometric analysis of Bruch's membrane, the choriocapillaris, and the choroid in aging*. - 1994, Investigative Ophthalmology & Visual Science, 35(6): 2857-2864.
- Rattner A., Smallwood P. M., et al. - *Identification and characterization of all-trans-retinol dehydrogenase from photoreceptor outer segments, the visual cycle enzyme that reduces all-trans-retinal to all-trans-retinol*. - 2000, The Journal of biological chemistry, 275(15): 11034-11043.
- Reber F., Kasper M., et al. - *Alteration of the intracellular pH and apoptosis induction in a retinal cell line by the AGE-inducing agent glyoxal*. - 2002, Graefes archive for clinical and experimental ophthalmology 240(12): 1022-1032.
- Redmond T. M., Poliakov E., et al. - *Mutation of key residues of RPE65 abolishes its enzymatic role as isomerohydrolase in the visual cycle*. - 2005, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 102(38): 13658-13663.
- Reynolds R., Hartnett M. E., et al. - *Plasma complement components and activation fragments: associations with age-related macular degeneration genotypes and phenotypes*. - 2009, Investigative ophthalmology & visual science, 50(12): 5818-5827.
- Rigaudière F. - *Oeil et Physiologie de la Vision*. - 2010, III-La physiologie rétinienne, III-1La rétine : Organisation Schématique.
- Robison W. G., Kuwabara T., et al. - *The roles of vitamin E and unsaturated fatty acids in the visual process*. - 1982, Retina, 2(4): 263-281.
- Rodrigues E. B. - *Inflammation in dry age-related macular degeneration*. - 2007, Ophthalmologica, 221(3): 143-152.
- Rodriguez I. R. and Fliesler S. J. - *Photodamage generates 7-keto- and 7-hydroxycholesterol in the rat retina via a free radical-mediated mechanism*. - 2009, Photochemistry and photobiology, 85(5): 1116-1125.
- Rodriguez I. R. and Larrayoz I. M. - *Cholesterol oxidation in the retina: implications of 7KCh formation in chronic inflammation and age-related macular degeneration*. - 2010, Journal of Lipid Research, 51(10): 2847-2862.
- Rosenfeld P. J., Brown D. M., et al. - *Ranibizumab for neovascular age-related macular degeneration*. - 2006, The New England journal of medicine, 355(14): 1419-1431.
- Roanowska M., Jarvis-Evans J., et al. - *Blue light-induced reactivity of retinal age pigment. In vitro generation of oxygen-reactive species*. - 1995, The Journal of Biological Chemistry, 270(32): 18825-18830.
- Rudnicka A. R., Jarrar Z., et al. - *Age and gender variations in age-related macular degeneration prevalence in populations of European ancestry: a meta-analysis*. - 2012, Ophthalmology, 119(3): 571-580.
- Rudolf M., Malek G., et al. - *Sub-retinal drusenoid deposits in human retina: organization and composition*. - 2008, Experimental eye research, 87(5): 402-408.
- Ruiz A., Winston A., et al. - *Molecular and biochemical characterization of lecithin retinol acyltransferase*. - 1999, The Journal of biological chemistry, 274(6): 3834-3841.
- Rungger-Brandl E. and Leuenberger M. P. - *Barrières Hémato-Oculaires*. - 2008, Pathologie Vasculaires Oculaires Masson E. Paris, Société Française d'Ophtalmologie.
- Rutar M., Provis J. M., et al. - *Brief exposure to damaging light causes focal recruitment of macrophages, and long-term destabilization of photoreceptors in the albino rat retina*. - 2010, Current eye research, 35(7): 631-643.
- Rutledge A. C. and Adeli K. - *Fructose and the Metabolic Syndrome: Pathophysiology and Molecular Mechanisms*. - 2007, Nutr. Rev., 65: S13-S23.
- Saari J. C. and Crabb J. W. - *Focus on molecules: cellular retinaldehyde-binding protein (CRALBP)*. - 2005, Experimental eye research, 81(3): 245-246.

- Sahyoun N. R., Anderson A. L., et al. - *Dietary glycemic index and glycemic load and the risk of type 2 diabetes in older adults.* - 2008, *Am J Clin Nutr*, 87(1): 126-131.
- Samuel M. A., Zhang Y., et al. - *Age-related alterations in neurons of the mouse retina.* - 2011, *The Journal of neuroscience*, 31(44): 16033-16044.
- Sandercoe T. M., Madigan M. C., et al. - *Astrocyte proliferation during development of the human retinal vasculature.* - 1999, *Experimental eye research*, 69(5): 511-523.
- Sangiovanni J. P., Agron E., et al. - *{omega}-3 Long-chain polyunsaturated fatty acid intake and 12-y incidence of neovascular age-related macular degeneration and central geographic atrophy: AREDS report 30, a prospective cohort study from the Age-Related Eye Disease Study.* - 2009, *The American Journal of Clinical Nutrition*, 90(6): 1601-1607.
- SanGiovanni J. P. and Chew E. Y. - *The role of omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in health and disease of the retina.* - 2005, *Progress in Retinal and Eye Research*, 24(1): 87-138.
- Sarks S. H. - *Ageing and degeneration in the macular region: a clinico-pathological study.* - 1976, *The British Journal of Ophthalmology*, 60(5): 324-341.
- Sarna T. - *Properties and function of the ocular melanin--a photobiophysical view.* - 1992, *Journal of photochemistry and photobiology*, 12(3): 215-258.
- Schaumberg D. A., Christen W. G., et al. - *Body mass index and the incidence of visually significant age-related maculopathy in men.* - 2001, *Archives of ophthalmology*, 119(9): 1259-1265.
- Schlingemann R. O. and Witmer A. N. - *Treatment of retinal diseases with VEGF antagonists.* - 2009, *Prog Brain Res*, 175: 253-267.
- Schmitz G. and Ecker J. - *The opposing effects of n-3 and n-6 fatty acids.* - 2008, *Prog Lipid Res*, 47(2): 147-155.
- Schutt F., Bergmann M., et al. - *Proteins modified by malondialdehyde, 4-hydroxynonenal, or advanced glycation end products in lipofuscin of human retinal pigment epithelium.* - 2003, *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 44(8): 3663-3668.
- Seddon J. M., Cote J., et al. - *Progression of age-related macular degeneration: association with body mass index, waist circumference, and waist-hip ratio.* - 2003, *Archives of Ophthalmology*, 121(6): 785-792.
- Seddon J. M., Cote J., et al. - *The US twin study of age-related macular degeneration: relative roles of genetic and environmental influences.* - 2005, *Archives of Ophthalmology*, 123(3): 321-327.
- Seddon J. M., Cote J., et al. - *Progression of age-related macular degeneration: association with dietary fat, transunsaturated fat, nuts, and fish intake.* - 2003, *Arch Ophthalmol*, 121(12): 1728-1737.
- Seddon J. M., Cote J., et al. - *Progression of age-related macular degeneration: association with dietary fat, transunsaturated fat, nuts, and fish intake.* - 2003, *Archives of Ophthalmology*, 121(12): 1728-1737.
- Seddon J. M., George S., et al. - *Cigarette smoking, fish consumption, omega-3 fatty acid intake, and associations with age-related macular degeneration: the US Twin Study of Age-Related Macular Degeneration.* - 2006, *Archives of Ophthalmology*, 124(7): 995-1001.
- Seddon J. M., Reynolds R., et al. - *Prediction model for prevalence and incidence of advanced age-related macular degeneration based on genetic, demographic, and environmental variables.* - 2009, *Investigative ophthalmology & visual science*, 50(5): 2044-2053.
- Seddon J. M., Rosner B., et al. - *Dietary fat and risk for advanced age-related macular degeneration.* - 2001, *Archives of Ophthalmology*, 119(8): 1191-1199.

- Semeraro F., Parrinello G., et al. - *Predicting the risk of diabetic retinopathy in type 2 diabetic patients.* - 2011, J Diabetes Complications, 25(5): 292-297.
- Shahid H., Khan J. C., et al. - *Age-related macular degeneration: the importance of family history as a risk factor.* - 2012, The British journal of ophthalmology, 96(3): 427-431.
- Shams N. and Ianchulev T. - *Role of vascular endothelial growth factor in ocular angiogenesis.* - 2006, Ophthalmology clinics of North America, 19(3): 335-344.
- Sharma R. K. and Johnson D. A. - *Molecular signals for development of neuronal circuitry in the retina.* - 2000, Neurochemical research, 25(9-10): 1257-1263.
- Sheets K. G., Zhou Y., et al. - *Neuroprotectin D1 attenuates laser-induced choroidal neovascularization in mouse.* - 2010, Molecular Vision, 16: 320-329.
- Shiba T., Inoguchi T., et al. - *Correlation of diacylglycerol level and protein kinase C activity in rat retina to retinal circulation.* - 1993, Am J Physiol, 265(5 Pt 1): E783-793.
- Simo R., Carrasco E., et al. - *Angiogenic and antiangiogenic factors in proliferative diabetic retinopathy.* - 2006, Current diabetes reviews, 2(1): 71-98.
- Sin H. P., Liu D. T., et al. - *Lifestyle modification, nutritional and vitamins supplements for age-related macular degeneration.* - 2012, Acta ophthalmologica.
- Sivaprasad S., Gupta B., et al. - *Prevalence of diabetic retinopathy in various ethnic groups: a worldwide perspective.* - 2012, Survey of ophthalmology, 57(4): 347-370.
- Smith W., Mitchell P., et al. - *Plasma fibrinogen levels, other cardiovascular risk factors, and age-related maculopathy: the Blue Mountains Eye Study.* - 1998, Archives of ophthalmology, 116(5): 583-587.
- Solet J. L., Baroux N., et al. - *Prevalence of type 2 diabetes and other cardiovascular risk factors in Mayotte in 2008: the MAYDIA study.* - 2011, Diabetes & metabolism, 37(3): 201-207.
- Song H., Chui T. Y., et al. - *Variation of cone photoreceptor packing density with retinal eccentricity and age.* - 2011, Invest Ophthalmol Vis Sci, 52(10): 7376-7384.
- Song X., Bao M., et al. - *Advanced glycation in D-galactose induced mouse aging model.* - 1999, Mechanisms of ageing and development, 108(3): 239-251.
- Souied E. H., Leveziel N., et al. - *Y402H complement factor H polymorphism associated with exudative age-related macular degeneration in the French population.* - 2005, Molecular vision, 11: 1135-1140.
- Sparrow J. R., Zhou J., et al. - *Involvement of oxidative mechanisms in blue-light-induced damage to A2E-laden RPE.* - 2002, Investigative Ophthalmology & Visual Science, 43(4): 1222-1227.
- Stein J. D., Vanderbeek B. L., et al. - *Rates of nonexudative and exudative age-related macular degeneration among Asian American ethnic groups.* - 2011, Investigative Ophthalmology & Visual Science, 52(9): 6842-6848.
- Stone W. L., Farnsworth C. C., et al. - *A reinvestigation of the fatty acid content of bovine, rat and frog retinal rod outer segments.* - 1979, Experimental Eye Research, 28(4): 387-397.
- Strauss O. - *The retinal pigment epithelium in visual function.* - 2005, Physiological reviews, 85(3): 845-881.
- Suzuki M., Kamei M., et al. - *Oxidized phospholipids in the macula increase with age and in eyes with age-related macular degeneration.* - 2007, Molecular Vision, 13: 772-778.
- Swenor B. K., Bressler S., et al. - *The impact of fish and shellfish consumption on age-related macular degeneration.* - 2010, Ophthalmology, 117(12): 2395-2401.
- Tan J. S., Wang J. J., et al. - *Dietary fatty acids and the 10-year incidence of age-related macular degeneration: the Blue Mountains Eye Study.* - 2009, Arch Ophthalmol, 127(5): 656-665.

- Tan J. S., Wang J. J., et al. - *Dietary fatty acids and the 10-year incidence of age-related macular degeneration: the Blue Mountains Eye Study*. - 2009, *Archives of Ophthalmology*, 127(5): 656-665.
- Tanihara H., Inatani M., et al. - *Growth factors and their receptors in the retina and pigment epithelium*. - 1997, *Progress in Retinal and Eye Research*, 16(2): 271-301.
- Tanito M., Elliott M. H., et al. - *Protein modifications by 4-hydroxynonenal and 4-hydroxyhexenal in light-exposed rat retina*. - 2005, *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 46(10): 3859-3868.
- Tanito M., Haniu H., et al. - *Identification of 4-hydroxynonenal-modified retinal proteins induced by photooxidative stress prior to retinal degeneration*. - 2006, *Free radical biology & medicine*, 41(12): 1847-1859.
- Tate D. J., Jr., Miceli M. V., et al. - *Phagocytosis and H₂O₂ induce catalase and metallothionein gene expression in human retinal pigment epithelial cells*. - 1995, *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 36(7): 1271-1279.
- Tate D. J., Jr., Newsome D. A., et al. - *Metallothionein shows an age-related decrease in human macular retinal pigment epithelium*. - 1993, *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 34(7): 2348-2351.
- Taverna M. J. - *[Genetics of diabetic complications: retinopathy]*. - 2004, *Annales d'endocrinologie*, 65(1 Suppl): S17-25.
- Taylor H. R., Munoz B., et al. - *Visible light and risk of age-related macular degeneration*. - 1990, *Transactions of the American Ophthalmological Society*, 88: 163-173; discussion 173-168.
- Tolentino M. J., McLeod D. S., et al. - *Pathologic features of vascular endothelial growth factor-induced retinopathy in the nonhuman primate*. - 2002, *American Journal of Ophthalmology*, 133(3): 373-385.
- Tolentino M. J., Miller J. W., et al. - *Intravitreal injections of vascular endothelial growth factor produce retinal ischemia and microangiopathy in an adult primate*. - 1996, *Ophthalmology*, 103(11): 1820-1828.
- Tomany S. C., Klein R., et al. - *The relationship between iris color, hair color, and skin sun sensitivity and the 10-year incidence of age-related maculopathy: the Beaver Dam Eye Study*. - 2003, *Ophthalmology*, 110(8): 1526-1533.
- Tortora G. J. and Grabowski S. R. - *Principe d'anatomie et de physiologie* - 2002.
- Tran L., MacLeod K., et al. - *Endothelin-1 modulates angiotensin II in the development of hypertension in fructose-fed rats*. - 2009, *Mol. Cell. Biochem.*, 325(1): 89-97.
- Tran L. T., Yuen V. G., et al. - *The fructose-fed rat: a review on the mechanisms of fructose-induced insulin resistance and hypertension*. - 2009, *Molecular and cellular biochemistry*, 332(1-2): 145-159.
- Tserentsoodol N., Gordiyenko N. V., et al. - *Intraretinal lipid transport is dependent on high density lipoprotein-like particles and class B scavenger receptors*. - 2006, *Molecular Vision*, 12: 1319-1333.
- Tsybovsky Y., Molday R. S., et al. - *The ATP-binding cassette transporter ABCA4: structural and functional properties and role in retinal disease*. - 2010, *Adv Exp Med Biol*, 703: 105-125.
- Uauy R. and Dangour A. D. - *Nutrition in brain development and aging: role of essential fatty acids*. - 2006, *Nutrition reviews*, 64(5 Pt 2): S24-33; discussion S72-91.
- Uauy R., Hoffman D. R., et al. - *Essential fatty acids in visual and brain development*. - 2001, *Lipids*, 36(9): 885-895.
- Uhlmann K., Kovacs P., et al. - *Genetics of diabetic retinopathy*. - 2006, *Experimental and clinical endocrinology & diabetes* 114(6): 275-294.

- Van Soest S. S., de Wit G. M., et al. - *Comparison of human retinal pigment epithelium gene expression in macula and periphery highlights potential topographic differences in Bruch's membrane.* - 2007, *Molecular vision*, 13: 1608-1617.
- Vanderbeek B. L., Zacks D. N., et al. - *Racial differences in age-related macular degeneration rates in the United States: a longitudinal analysis of a managed care network.* - 2011, *American Journal of Ophthalmology*, 152(2): 273-282 e273.
- Veniant M. M., Zlot C. H., et al. - *Lipoprotein clearance mechanisms in LDL receptor-deficient "Apo-B48-only" and "Apo-B100-only" mice.* - 1998, *The Journal of Clinical Investigation*, 102(8): 1559-1568.
- Wald G. - *The molecular basis of visual excitation.* - 1968, *Nature*, 219(5156): 800-807.
- Wang J. J., Jakobsen K., et al. - *Five-year incidence of age-related maculopathy in relation to iris, skin or hair colour, and skin sun sensitivity: the Blue Mountains Eye Study.* - 2003, *Clin Experiment Ophthalmol*, 31(4): 317-321.
- Wang J. S. and Kefalov V. J. - *The cone-specific visual cycle.* - 2011, *Progress in retinal and eye research*, 30(2): 115-128.
- Wang S., Xu L., et al. - *Dyslipidemia and eye diseases in the adult Chinese population: the Beijing eye study.* - 2012, *PLoS One*, 7(3): e26871.
- Wassell J., Davies S., et al. - *The photoreactivity of the retinal age pigment lipofuscin.* - 1999, *The Journal of Biological Chemistry*, 274(34): 23828-23832.
- Weiter J. J., Delori F. C., et al. - *Retinal pigment epithelial lipofuscin and melanin and choroidal melanin in human eyes.* - 1986, *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 27(2): 145-152.
- West E. L., Pearson R. A., et al. - *Cell transplantation strategies for retinal repair.* - 2009, *Progress in brain research*, 175: 3-21.
- Wiegand R. D., Giusto N. M., et al. - *Evidence for rod outer segment lipid peroxidation following constant illumination of the rat retina.* - 1983, *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 24(10): 1433-1435.
- Wielgus A. R., Collier R. J., et al. - *Blue light induced A2E oxidation in rat eyes--experimental animal model of dry AMD.* - 2010, *Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology*, 9(11): 1505-1512.
- Witmer A. N., Vrensen G. F., et al. - *Vascular endothelial growth factors and angiogenesis in eye disease.* - 2003, *Progress in Retinal and Eye Research*, 22(1): 1-29.
- Wong T. Y., Cheung N., et al. - *Prevalence and risk factors for diabetic retinopathy: the Singapore Malay Eye Study.* - 2008, *Ophthalmology*, 115(11): 1869-1875.
- Wong T. Y., Tikellis G., et al. - *Age-related macular degeneration and risk of coronary heart disease: the Atherosclerosis Risk in Communities Study.* - 2007, *Ophthalmology*, 114(1): 86-91.
- Xu H., Chen M., et al. - *Para-inflammation in the aging retina.* - 2009, *Progress in Retinal and Eye Research*, 28(5): 348-368.
- Xu H., Chen M., et al. - *Age-dependent accumulation of lipofuscin in perivascular and subretinal microglia in experimental mice.* - 2008, *Aging Cell*, 7(1): 58-68.
- Yanbaeva D. G., Dentener M. A., et al. - *Systemic effects of smoking.* - 2007, *Chest*, 131(5): 1557-1566.
- Yang K., Liang Y. B., et al. - *Prevalence of age-related macular degeneration in a rural Chinese population: the Handan Eye Study.* - 2011, *Ophthalmology*, 118(7): 1395-1401.
- Yoon K. D., Yamamoto K., et al. - *A novel source of methylglyoxal and glyoxal in retina: implications for age-related macular degeneration.* - 2012, *PLoS One*, 7(7): e41309.

- Yoon K. D., Yamamoto K., et al. - *Photo-products of retinal pigment epithelial bisretinoids react with cellular thiols.* - 2011, *Mol Vis*, 17: 1839-1849.
- Young R. W. - *Visual cells and the concept of renewal.* - 1976, *Investigative Ophthalmology & Visual Science.*, 15(9): 700-725.
- Yu Y., Reynolds R., et al. - *Prospective assessment of genetic effects on progression to different stages of age-related macular degeneration using multistate Markov models.* - 2012, *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 53(3): 1548-1556.
- Zhang X., Bao S., et al. - *Vascular endothelial growth factor-A: a multifunctional molecular player in diabetic retinopathy.* - 2009, *Int J Biochem Cell Biol*, 41(12): 2368-2371.
- Zhang X., Saaddine J. B., et al. - *Prevalence of diabetic retinopathy in the United States, 2005-2008.* - 2011, *The Journal of the American Medical Association*, 304(6): 649-656.
- Zheng W. - *Factor analysis of diabetic retinopathy in Chinese patients.* - 2011, *Diabetes research and clinical practice*, 92(2): 244-252.
- Zhong Y., Li J., et al. - *Activation of endoplasmic reticulum stress by hyperglycemia is essential for muller cell-derived inflammatory cytokine production in diabetes.* - 2012, *Diabetes*, 61(2): 492-504.
- Zhou J., Cai B., et al. - *Mechanisms for the induction of HNE- MDA- and AGE-adducts, RAGE and VEGF in retinal pigment epithelial cells.* - 2005, *Experimental Eye Research*, 80(4): 567-580.

Annexes

Needs in omega 3 and ocular pathologies

Lionel BRETILLON¹
Emilie SIMON¹
Niyazi ACAR¹
Olivier BERDEAUX²
Alain BRON^{1,3}
Catherine CREUZOT-GARCHER^{1,3}

¹ Eye, Nutrition & Signalling Research Group,
Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation,
UMR 1324 Inra,
6265 CNRS,
Université de Bourgogne,
Centre Inra,
17 rue Sully,
BP 86510,
21065 Dijon cedex,
France

<Lionel.bretillon@dijon.inra.fr>
² ChemoSens Platform,
Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation,
UMR 1324 Inra,
6265 CNRS,
Université de Bourgogne,
Dijon,
France

³ Department of Ophthalmology,
University hospital,
Dijon,
France

The past decades have been characterized by the improvement of life expectancy and changes of the living including dietary habits of the Western populations. Meanwhile, the development of pathologies has emerged. Eye diseases remain the second most prevalent ones

Abstract: Life expectancy at birth has regularly increased decade after decade, especially since the beginning of the 20th century: 15 years have been gained over the past 50 years. Changes in living and dietary habits during this time period have been associated with the development of various pathologies which represent a growing socio-economic burden. Among age-related disorders, ocular diseases are the second most prevalent ones after 65 years. Age-related Macular Degeneration (AMD) is the leading cause of visual impairment after the age of 50 years. Age is the prominent risk factor for AMD and is accompanied with both endogenous (including genetics) and environmental factors, such as smoking habits and dietary factors (diet rich in cholesterol and saturated fatty acids). AMD is characterized by the loss of cells at the most central area of the retina, called macula. The neural retina is a highly structured neurosensory tissue that is responsible for the transduction pathway. The transduction pathway is initiated in photoreceptors where the light stimulus is coded into an electrical signal. This signal is transmitted to neighbored neurons and transferred to the brain via the optic nerve. The retinal pigment epithelium (RPE) is the cellular and metabolic interface between the neural retina and choriocapillaris through Bruch's membrane. The close association between RPE and photoreceptors is one of the factors that promote the efficacy of RPE to, in the one hand, provide nutrients and oxygen to photoreceptors and, in the other hand, eliminate the metabolic debris originating from shedding of the outer segments. Epidemiological data suggest that dietary habits privileging the consumption of omega-3 long chain polyunsaturated fatty acids participate to prevent from the development of AMD (Sangiovanni et al., 2009). The mechanisms underlying the effects of omega-3 fatty acids remain unclear until now. The purpose of the present paper is to give a review on the role, metabolism and effects of omega 3 fatty acids in the retina.

Key words: lipid, omega 3, retina, nutrition, aging, prevention

after the age of 65 years in Western countries. Accounting to the demographic forecasts, patients with eye diseases are expected to represent a sensitive and growing socio-economic burden. Aging remains one of the most influencing factors associated with the development of retinal pathologies. Age-related Macular Degeneration (AMD) is the leading cause of visual impairment of the aged developed populations. Environmental factors, including dietary habits, are also of some concerns in the development of AMD. Aging of the retina is characterized by specific clinical, functional and morphological features, including lipid deposition. Lipids are quantitatively important components

of the retina but their roles are not fully defined. Lipids may both promote and prevent aging of the retina. The purpose of this review is to highlight the roles and benefits of lipids and dietary fatty acids in aging and age-related diseases.

Lipids are structural components of the retina

The term "retina" encompasses both the neural retina and the retinal pigment epithelium (RPE). The retina covers the internal part of the ocular globe at its posterior pole (figure 1).

The neural retina is a neurosensory tissue which primary function is to convert light photons into an electrical signal. This function is called the transduction pathway. The neurosensory retina contains photosensitive cells (rods and cones), neurons and glial cells. Various types of neurons are present in the neurosensory retina: bipolar cells, ganglion cells, amacrine cells, horizontal cells (*figure 1*). The architecture of the neurosensory retina is reverse to the way light enters. Cones and rods are located at the most external side of the neurosensory retina, at the vicinity of the RPE. The coding function of the retina is dependent not only to photoreceptors but also to neurons, glial cells and RPE which amplify the signal. Rods represent the prominent population of photoreceptors compared to cones, even in most diurnal animal species (Masland, 2001). The structural organization of photoreceptors and neurons in the retina is unique. The signal emerges from rods and cones independently, is transmitted to bipolar cells, converges to ganglion cells, and is transferred to the brain via the optic nerve. On the contrary to the cone pathway which involves a one-to-one association of cone-bipolar cell-ganglion cell, the rod system is much more convergent since the signal from many rods is pooled to generate a signal

in one ganglion cells. About 100 millions of cones and rods and 1 million of ganglion cells are present in the retina. This relationship between photoreceptors, bipolar cells and ganglion cells maximizes the response to light, especially in rods. The ability of photoreceptors to convert light photons into an electrical signal is due to the presence of a photopigment (opsin in cones, rhodopsin in rods) in their outer segments. The outer segment of a photoreceptor consists in a stack of disk membranes (*figure 2*) that are synthesized in the proximal portion of the outer segment (close to inner segment, B-panel in *figure 2*), and shed at its apical side by the RPE (C-panel in *figure 2*). RPE forms villi that entrap the outer segments of the photoreceptors, and thereby improves the capacity of the RPE to eliminate the debris, and provide the neuroretina with nutrients.

Rhodopsin is a G-protein coupled receptor which is present in the outer segments. Absorption of photons by rhodopsin yields conformational movements of rhodopsin that result in activation of the G-protein and biological response. The lipid environment of rhodopsin is a key effector of these changes (Brown *et al.*, 2010). The neurosensory retina is composed of 90% phospholipids and 10% cholesterol (Bretillon *et al.*,

2008; Fliesler and Bretillon, 2010). Docosahexaenoic acid (DHA) is a long chain polyunsaturated fatty acid (LC-PUFA) from the omega 3 series. It is present at high levels in the neurosensory retina: about 15% in the whole human retina (Bretillon *et al.*, 2008), and accounts for 50% of the fatty acids in the outer segments of photoreceptors (Fliesler and Anderson, 1983). DHA improves the kinetics of the photocycle by creating specific inter-molecular associations with rhodopsin. The highly unsaturated chemical structure of DHA with six double bonds confers enhanced fluidity to DHA-rich membranes which ameliorates their biophysical parameters. On the contrary, saturated fatty acid had opposite effects (Litman and Mitchell, 1996); cholesterol stabilizes rhodopsin and impairs rhodopsin activation (Grossfield *et al.*, 2006). Electroretinography is a suitable method to monitor the capacity of the retina to respond to light stimulus. The retina of animals reared under a diet deficient in omega 3 fatty acids is depleted in DHA, and shows a reduced electroretinographic response (Neuringer *et al.*, 1986). In addition to DHA, very LC-PUFA with 32 or 34 atoms of carbon are found in the human retina (Berdeaux *et al.*, 2010). Their function remains uncertain but their deficiency is associated with a specific retinal phenotype including impaired electroretinographic response, increased accumulation of a toxic vitamin A derivative and degeneration of photoreceptor cells in the central retina (Agbaga *et al.*, 2008; Karan *et al.*, 2005). These features are associated with mutations in the gene coding ELOVL4 (elongation of very long chain fatty acids 4) and with the dominantly inherited juvenile macular degeneration called Stargardt-like macular dystrophy (STGD3) in humans (Karan *et al.*, 2005). The interested reader should refer to the review from Berdeaux in the present issue of the journal.

Where do fatty acids in the retina come from?

The capacity of the retina to get enriched in DHA from dietary sources is relatively low. Bazan reported two decades ago that DHA is recycled with high efficiency in the outer segments and is also provided by circulating sources (Bazan, 1989). But the relative contribution of exogenous sources and recycling to retinal DHA remains poorly

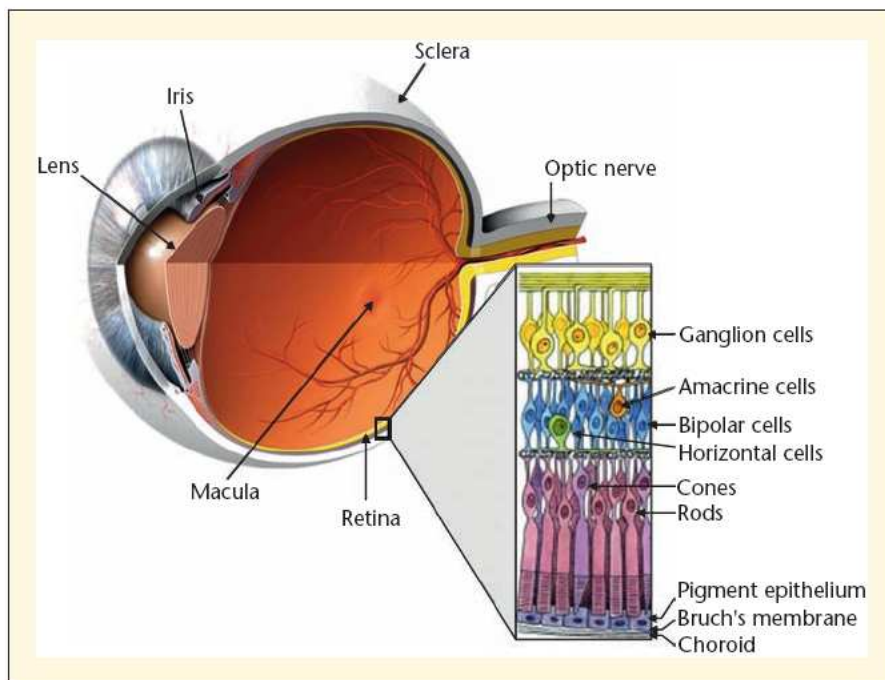


Figure 1. Structure of the human eye and organization of the retina

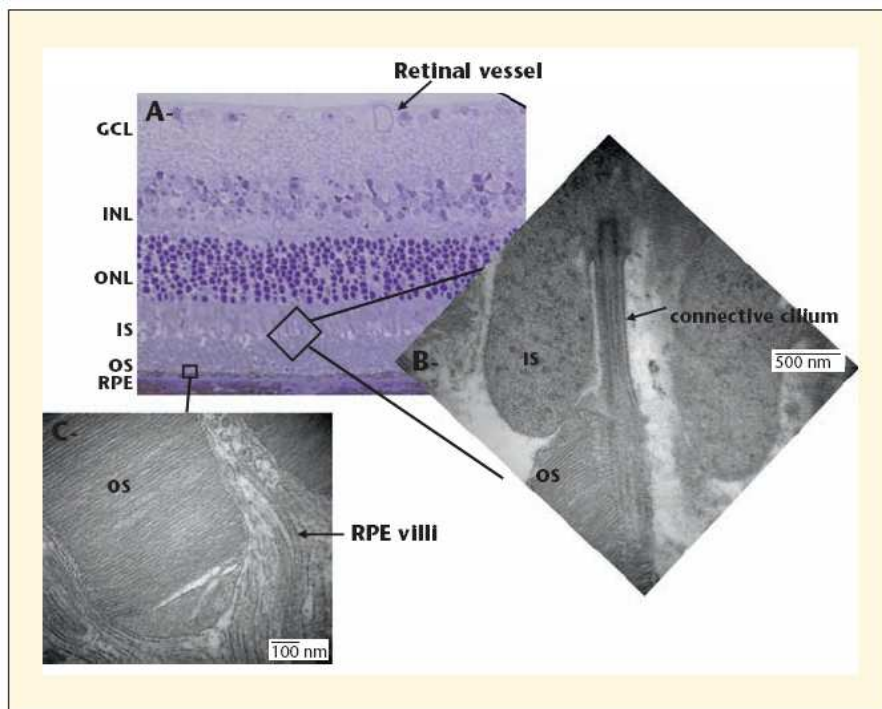


Figure 2. Morphological structure of the whole (A-panel) and outer retina (B- and C- panels)

defined. Recently, we have analyzed retinal and adipose tissue samples from human donors. The fatty acid profile of adipose tissue was considered as a surrogate for long term history intake in dietary fatty acids of the subjects. Linoleic acid is exclusively of dietary origin. Its content in the neurosensory retina was strongly and positively associated with its adipose tissue level. On the contrary, no similar association was observed with DHA levels (Bretillon *et al.*, 2008). Therefore, we suggest that only a small portion, at best, of retinal DHA may be derived from dietary DHA. The efficacy of dietary supplementation with DHA to enhance the accumulation of DHA in the neurosensory retina remains unknown in humans. Data in laboratory animals favour a positive although relatively minor effect. Indeed, using long term supplementations with omega 3 LC-PUFA (19.2% of the dietary fatty acids), DHA concentration increases in the retina only by less than 10%, compared to a control diet devoid of omega 3 LC-PUFA (Schnebelen *et al.*, 2009; Schnebelen *et al.*, 2009).

Circulating fatty acids are found esterified with a glycerol backbone in triglycerides and phospholipids, and linked to cholesterol in cholesteryl esters. Triglycerides are the major lipid components of chylomicrons and VLDL which are

produced and remodelled in the early hours after meal by enterocytes and liver, respectively. Cholesteryl esters represent the prominent lipid class in LDL. It has been shown with labelled molecules that LDL can reach the RPE and deliver their content therein (Tserentsoodol *et al.*, 2006). We found in human samples that the fatty acid moiety in cholesteryl esters is in close association with the fatty acid profile of the neurosensory retina (Bretillon *et al.*, 2008), suggesting that cholesteryl esters can be carriers of circulating fatty acids, including DHA, to the neurosensory retina.

Influence of dietary lipids in retinal aging age-related retinal diseases

Fatty acids and Age-related Macular Degeneration (AMD)

Aging, and to a greater extent Age-related Macular Degeneration (AMD), is associated with the accumulation of extracellular lipid particles at the basement of RPE, within Bruch's membrane (Curcio *et al.*, 2009) (see figure 1 for location of Bruch's membrane). These lipid particles take part of complex deposits called drusen which accumu-

lation is a clinical sign of maculopathy: the early stage of AMD. The composition of drusen has not been fully determined, but include lipofuscin, fibrillar and non-fibrillar amyloid, cholesterol, glycoproteins, vitronectin, inhibitors and activators of the extracellular matrix, complement factor H, complement component C3, and zinc. This accumulation of debris creates a lipid wall which participates to the age-associated thickening of Bruch's membrane and to the increase in hydraulic resistance. Such accumulation of lipid-rich particles within Bruch's membrane may reduce the fluxes of nutrients to the retina, and may be involved in the partial loss of retinal functionality in a relevant rodent model of aging of the human retina: the transgenic mouse expressing the human apolipoprotein B₁₀₀ and lacking LDL-receptor (Bretillon *et al.*, 2008).

AMD targets a specific area of the retina: the macula (figure 1). Visual field of AMD patients is characterized by the loss of central vision. AMD patients therefore poorly discriminate colors and details. Aging, genetic and environmental factors participate to the development of AMD, advanced age being the prominent one. High fat intake, and especially saturated fatty acids and cholesterol, has been associated with higher risk for AMD (Age-Related Eye Disease Study Research Group, 2007). Advanced stages of AMD are of two types: wet or dry AMD. Wet AMD, also called neovascular AMD, affects about 40% of the population with late AMD. It is characterized by choroidal neovascularization, whereas the primary clinical characteristic of dry AMD is the appearance of RPE atrophy, also called geographic atrophy. The clinical management of patients with neovascular AMD is of peculiar interest given the incidence of choroidal neovascularisation, and potentially intraretinal haemorrhages. Drug therapies and laser treatments are so far gold standards for clinical ophthalmologists in AMD patients. Preventive approaches would also be pertinent in patients with maculopathy.

AREDS (Age-Related Eye Disease Study) is a multicenter study funded by the National Institutes of Health in the USA. This natural history study and phase III clinical trial was designed to assess the clinical course, prognosis, risk factors, and nutrient-based prevention and treatment of AMD. More than 4700

participants were initially enrolled from November 1992 to January 1998. The 5-years follow-up was completed in April 2001, and continued until December 2005 to evaluate the 4-years clinical course and progression of AMD for participants previously enrolled in the trial. Numerous reports have been published so far on this trial. The last one reveals that participants who have the highest omega 3 LC-PUFA intake (0.11% of total energy intake) were 30% less likely to develop geographic atrophy and neovascular AMD than lower consumers (0.01% of total energy intake) (Sangiovanni *et al.*, 2009). The Blue Mountains Eye Study in Australia has reported similar association: one serving of fish per week was associated with reduced risk of early AMD by 30%, primarily in subjects with less than the median linoleic acid consumption (Tan *et al.*, 2009). The US Twin Study of AMD was derived from the National Academy of Sciences–National Research Council World War II Veteran Twin Registry. This registry is the largest population-based twin registry in the US and includes information for 15924 white male twin pairs born between 1917 and 1927 who served in the US armed forces. The large size of this population gave the unique opportunity to evaluate the role of genetic and environmental risk factors for age-related diseases including AMD. Data from 681 twins report that two or more servings of fish per week reduced the risk of AMD by 2-fold. This reduction in risk was seen primarily among subjects with low levels of linoleic acid intake (Seddon *et al.*, 2006).

The mechanisms behind this protection are poorly defined. We recently questioned whether following the epidemiological-based guidelines (increase omega 3 LC-PUFAs and reduce linoleic acid intake) would enhance the enrichment of the neurosensory retina and RPE with omega 3 LC-PUFAs, and modulate gene expression in the neurosensory retina (Simon *et al.*, 2011). Diets rich in omega 3 LC-PUFAs efficiently improve the incorporation of omega 3 LC-PUFAs in the tissues. This raising effect was magnified by lowering linoleic acid intake. Reducing linoleic acid intake up-regulated the expression of genes coding for transporters of lipids and enzymes involved in lipid metabolism (LDL-receptor, CD36, ABCA1, ALOX5 and ALOX12). LDLR, ABCA1 and CD36 have been suggested

to participate to lipid recycling in the neurosensory retina (Tserentsoodol *et al.*, 2006; Tserentsoodol *et al.*, 2006). ALOX5 and ALOX12 are lipoxygenase enzymes that catalyze the hydroxylation of PUFAs. DHA may be converted into such biologically active metabolites in the RPE (Bazan *et al.*, 2010). Neuroprotectin D1 is a stereospecific derivative of DHA, produced after the release of DHA from phospholipids and hydroxylation by 15-lipoxygenase. NPD1 is a cell mediator which activates pro-survival repair signalling. NPD1 exhibits anti-inflammatory properties, induces anti-apoptotic proteins and inhibits pro-apoptotic proteins. Thus, NPD1 triggers activation of signalling pathway that promotes cell survival. NPD1 would be of peculiar importance in the response of RPE cells to oxidative stress during photoreceptor outer segment phagocytosis and in the course of AMD (Bazan *et al.*, 2010).

Fatty acids and glaucoma

Glaucoma is the second leading cause of blindness worldwide. More than 60 millions of glaucoma patients are expected in 2020 in the world (Quigley, 2011). Glaucoma is a progressive optic neuropathy which is characterized by the loss of retinal ganglion cells (*figure 1*). Various risk factors have been associated with glaucoma, such as high intraocular pressure, age, familial history, ethnicity, gene polymorphisms, and myopia (Quigley, 2005). Epidemiological data reported that major fats and lipids were not associated with glaucoma (Kang *et al.*, 2004). But higher ratio of omega 3 to omega 6 LC-PUFA was positively associated with a greater risk of glaucoma (+50%), especially in subjects with elevated intra-ocular pressure (Kang *et al.*, 2004). Animal data showed that omega 3 LC-PUFA deficiency impaired the electroretinographic response of retinal ganglion cells (Nguyen *et al.*, 2008), and increased intra-ocular pressure (Nguyen *et al.*, 2007). Recently, we published that not only dietary omega 3 LC-PUFA, but also the combination of omega 3 LC-PUFA and omega 6 fatty acids, modulate the stress of the retina to elevated intra-ocular pressure in early hours (Schnebelen *et al.*, 2011) and at long term (Schnebelen *et al.*, 2009). Interestingly, we found that glaucoma patients had erythrocytes with reduced levels of DHA-rich phospholipids and

plasmalogens. The differences were associated with the severity of glaucoma (Acar *et al.*, 2009).

Conclusion

Lipids represent the most energetic nutrients. In Western and developed populations, more than one third of the daily energy intake comes from lipids. Dietary recommendations for fatty acid intake to the French population have recently been re-evaluated. Omega 3-long chain polyunsaturated fatty acids (EPA and DHA) are now included not only in order to fulfil the physiological needs but also in order to prevent from age-related disorders, including AMD. Oxidative stress and inflammation are with certainty the most influencing mechanisms in the aging processes. In addition to their role as fuels, lipids are also metabolic substrates and cellular effectors that intervene in those various cellular mechanisms.

REFERENCES

- Acar N, Berdeaux O, Juaneda P, *et al.* Red blood cell plasmalogens and docosahexaenoic acid are independently reduced in primary open-angle glaucoma. *Exp Eye Res* 2009; 89: 840-53.
- Agbaga MP, Brush RS, Mandal MNA, Henry K, Elliott MH, Anderson RE. Role of Stargardt-3 macular dystrophy protein (ELOVL4) in the biosynthesis of very long chain fatty acids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105: 12843-8.
- Age-Related Eye Disease Study Research Group. The Relationship of Dietary Lipid Intake and Age-Related Macular Degeneration in a Case-Control Study: AREDS Report No. 20. *Arch Ophthalmol* 2007; 125: 671-9.
- Bazan N. Inherited retinal degeneration. In: M. LaVail, R. Anderson, and J. Hollyfield (Eds), *Inherited and environmentally induced retinal degenerations*. Elsevier: New York, 1989.
- Bazan NG, Calandria JM, Serhan CN. Rescue and repair during photoreceptor cell renewal mediated by docosahexaenoic acid-derived neuroprotectin D1. *J Lipid Res* 2010; 51: 2018-31.
- Berdeaux O, Juaneda P, Martine L, Cabaret S, Bretilon L, Acar N. Identification and quantification of phosphatidylcholines containing very long chain polyunsaturated fatty acid (VLC-PUFA) in bovine and human retina by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 2010; 1217: 7738-48.
- Bretilon L, Acar N, Seeliger MW, *et al.* ApoB₁₀₀/LDLR^{-/-} mice exhibit reduced elec-

- troretinographic response and cholesteryl esters deposits in the retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008; 49: 1307-14.
- Bretillon L, Thuret G, Grégoire S, et al. Lipid and fatty acid profile of the retina, retinal pigment epithelium/choroid, and lacrimal gland, and associations with adipose tissue fatty acids in human subjects. *Exp Eye Res* 2008; 87: 521-8.
- Brown MF, Salgado GFJ, Struts AV. Retinal dynamics during light activation of rhodopsin revealed by solid-state NMR spectroscopy. *Biochim Biophys Acta* 2010; 1798: 177-93.
- Curcio CA, Johnson M, Huang JD, Rudolf M. Aging, Age-related Macular Degeneration, and the Response-to-Retention of Apolipoprotein B-Containing Lipoproteins. *Progr Retin Eye Res* 2009; 28: 393-422.
- Fliesler SJ, Anderson RE. Chemistry and metabolism of lipids in the vertebrate retina. *Prog Lipid Res* 1983; 22: 79-131.
- Fliesler SJ, Bretillon L. The ins and outs of cholesterol in the vertebrate retina. *J Lipid Res* 2010; 51: 3399-413.
- Grossfield A, Feller SE, Pitman MC. A role for direct interactions in the modulation of rhodopsin by {omega}-3 polyunsaturated lipids. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 4888-4893.
- Kang JH, Pasquale LR, Willett WC, et al. Dietary fat consumption and primary open-angle glaucoma. *Am J Clin Nutr* 2004; 79: 755-64.
- Karan G, Lillo C, Yang Z, et al. Lipofuscin accumulation, abnormal electrophysiology, and photoreceptor degeneration in mutant ELOVL4 transgenic mice: a model for macular degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 4164-9.
- Litman BJ, Mitchell DC. A role for phospholipid polyunsaturation in modulating membrane protein function. *Lipids* 1996; 31 (Suppl. 31): S193-7.
- Masland RH. The fundamental plan of the retina. *Nat Neurosci* 2001; 4: 877-86.
- Neuringer M, Connor WE, Lin DS, Barstad L, Luck S. Biochemical and functional effects of prenatal and postnatal omega 3 fatty acid deficiency on retina and brain in rhesus monkeys. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986; 83: 4021-5.
- Nguyen CT, Vingrys AJ, Bui BV. Dietary omega-3 fatty acids and ganglion cell function. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008; 49: 3586-94.
- Nguyen CTO, Bui BV, Sinclair AJ, Vingrys AJ. Dietary Omega 3 Fatty Acids Decrease Intraocular Pressure with Age by Increasing Aqueous Outflow. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007; 48: 756-62.
- Quigley HA. Glaucoma: macrocosm to microcosm the Friedenwald lecture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005; 46: 2663-70.
- Quigley HA. Glaucoma. *The Lancet* 2011; 377: 1367-77.
- Sangiovanni JP, Agron E, Meleth AD, et al. {omega}-3 Long-chain polyunsaturated fatty acid intake and 12-y incidence of neovascular age-related macular degeneration and central geographic atrophy: AREDS report 30, a prospective cohort study from the Age-Related Eye Disease Study. *Am J Clin Nutr* 2009; 90: 1601-7.
- Schnebelen C, Fourgeux C, Pasquis B, et al. Dietary polyunsaturated fatty acids reduce retinal stress induced by an elevation of intraocular pressure in rats. *Nutrition Research* 2011; 31: 286-95.
- Schnebelen C, Grégoire S, Pasquis P, et al. Dietary n-3 and n-6 PUFA enhances DHA incorporation in retinal phospholipids without affecting PGE1 and PGE2 levels. *Lipids* 2009; 44: 465-70.
- Schnebelen C, Pasquis B, Salinas-Navarro M, et al. A dietary combination of omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids is more efficient than single supplementations in the prevention of retinal damage induced by elevation of intraocular pressure in rats. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2009; 247: 1191-203.
- Schnebelen C, Viau S, Grégoire S, et al. Nutrition for the eye: different susceptibility of the retina and the lacrimal gland to dietary omega-6 and omega-3 polyunsaturated fatty acid incorporation. *Ophthalmic Res* 2009; 41: 216-24.
- Seddon JM, George S, Rosner B. Cigarette smoking, fish consumption, omega-3 fatty acid intake, and associations with age-related macular degeneration: the US Twin Study of Age-Related Macular Degeneration. *Arch Ophthalmol* 2006; 124: 995-1001.
- Simon E, Bardet B, Gregoire S, et al. Decreasing dietary linoleic acid promotes long chain omega-3 fatty acid incorporation into rat retina and modifies gene expression. *Exp Eye Res* 2011; doi:10.1016/j.exer.2011.07.016.
- Tan JSL, Wang JJ, Flood V, Mitchell P. Dietary fatty acids and the 10-year incidence of age-related macular degeneration: the blue mountains eye study. *Arch Ophthalmol* 2009; 127: 656-65.
- Tserentsoodol N, Gordiyenko NV, Pascual I, Lee JW, Fliesler SJ, Rodriguez IR. Intraretinal lipid transport is dependent on high density lipoprotein-like particles and class B scavenger receptors. *Mol Vis* 2006; 12: 1319-33.
- Tserentsoodol N, Sztain J, Campos M, et al. Uptake of cholesterol by the retina occurs primarily via a low density lipoprotein receptor-mediated process. *Mol Vis* 2006; 12: 1306-18.

For reprint orders, please contact reprints@expert-reviews.com

EXPERT
REVIEWS

Serum omega-3 fatty acids are not associated with age-related macular degeneration

Expert Rev. Ophthalmol. 7(1), 21–23 (2012)

Lionel Bretillon^{*1},
Emilie Simon¹,
Niyazi Acar¹,
Olivier Berdeaux²,
Elodie Masson¹,
Alain Bron^{1,3}
and Catherine
Creuzot-Garcher^{1,3}

¹Eye and Nutrition Research Group,
Centre des Sciences du Goût et de
l'Alimentation, UMR1324 INRA,
6265 CNRS, Université de Bourgogne,
Dijon, France

²ChemoSens Plat-form, Centre des
Sciences du Goût et de l'Alimentation,
UMR1324 INRA, 6265 CNRS,
Université de Bourgogne, Dijon, France

³Department of Ophthalmology,
University Hospital, Dijon, France

*Author for correspondence:
Tel.: +33 380693121
Fax: +33 380693223
lionel.bretillon@dijon.inra.fr

Evaluation of: Kabasawa S, Mori K, Horie-Inoue K *et al.* Associations of cigarette smoking but not serum fatty acids with age-related macular degeneration in a Japanese population. *Ophthalmology* 118(6), 1082–1088 (2011).

Age-related macular degeneration (AMD) is the leading cause of visual impairment in the elderly in developed countries. Risk factors for AMD are classified into endogenous nonmodifiable factors, including genetics and environmental factors such as smoking and dietary habits. Both epidemiological and experimental studies suggest that dietary omega-3 long-chain fatty acids would participate to prevent from the development of AMD. The mechanisms behind this association have been poorly defined until now. Kabasawa and coworkers recently published that Japanese AMD patients did not exhibit a different serum fatty acid profile compared with Japanese controls, although the circulating levels of omega-3 fatty acids were doubled in Japanese subjects when compared with subjects in the USA – a consequence of Japanese dietary habits privileging fish consumption.

KEYWORDS: age-related macular degeneration • lipid • nutrition • smoking

In this article, we would like to emphasize the data reported by Kabasawa and coworkers about the lack of association between serum omega-3 fatty acids and age-related macular degeneration (AMD) in a Japanese population [1]. AMD is the leading cause of visual impairment in the elderly in developed countries. AMD primarily affects the photoreceptors, retinal pigment epithelium (RPE) and Bruch's membrane. Its prevalence was estimated to be 6.5% after the age of 40 years in the USA [2] and 4.1% in Japan [3]. Advanced age is the main risk factor for AMD. The 15-year cumulative incidences of early and late AMD increase dramatically with advancing age, reaching 25% between 65 and 74 years of age in the US population from the Beaver Dam Eye Study [4]. Early stages of AMD are also called maculopathies. The clinical signs of early AMD are thickening and abnormal architecture of Bruch's membrane, accumulation of lipofuscin in the RPE, and formation of drusen beneath the RPE in Bruch's membrane. Drusen are parts of extracellular lesions. Drusen are complex deposits composed of lipids,

apolipoproteins, complement factor H, amyloid, and so on [5]. AMD shows two different presentations at advanced stages of the disease. Geographic atrophy, or dry AMD, is characterized by areas of RPE loss which is secondarily responsible for the death of photoreceptors, and visual loss. Exudative, or wet, AMD is defined by the development of choroidal neovascularization at high risk of retinal hemorrhage [6]. AMD is a multifactorial disease: both endogenous and environmental factors participate in its development. Candidate gene studies and genome-wide analysis study approaches have led to the identification of susceptible genes and loci. Variants of several genes involved in the complement pathway, including complement factor H, have been associated with AMD [7]. Significant associations have also been reported with variants in the *ARMS2/HTRA1* locus on chromosome 10 [8] and lipoprotein lipase type C on chromosome 15 [9]. Among environmental factors, smoking remains the most important modifiable promoting factor for AMD [10]. Epidemiological studies have highlighted the

association between fat consumption and AMD risk and evolution, especially under low intake in linoleic acid [11]. A meta-analysis published in 2008 reported that the consumption of fish at least twice a week and foods rich in long-chain omega-3 polyunsaturated fatty acids (LC-PUFAs) reduced the risk of early and late AMD [12]. Fish and seafood are the prominent dietary sources of omega-3 LC-PUFAs in Japan [13]. In France, 60% of omega-3 LC-PUFA intake is provided by fish and seafood, and 25% by animal products [14]. The serum fatty acid profile in omega-3 LC-PUFAs reflects the dietary habits in fish consumption [15]. As an example, Japanese individuals living in Japan show greater circulating levels of omega-3 LC-PUFAs than Japanese individuals living in the USA and white Americans [13]. Eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA) are the main omega-3 LC-PUFAs found in foods. The mechanisms behind the association between omega-3 LC-PUFAs and AMD are poorly defined, but it has been suggested that EPA and DHA may be converted into active metabolites, especially in the RPE. Those active products, such as neuroprotectin D1, may prevent angiogenesis, neurodegeneration and inflammation in the course of AMD [16].

The paper under evaluation by Kabasawa *et al.* explores whether AMD patients exhibit differences in serum fatty acid profile compared with disease-free subjects [1].

Summary of methods & results

This case-control study was carried out in Japan in 143 controls and 279 AMD patients. Among AMD patients, 166 showed a typical neovascular form, 82 had polypoidal choroidal vasculopathy, and 31 had non-neovascular AMD. All subjects were Japanese-Asian natives. The diagnosis of AMD was based on a clinical ophthalmologic examination and fundus evaluation. Fatty acid profiles were analyzed in sera from 142 cases and 122 controls. Age, gender and smoking habits were considered as confounding factors in the statistical analyses.

AMD patients were 3 years older than controls (71.2 ± 8.7 vs 68.1 ± 10.0 years). Male prevalence was higher in AMD patients than in controls (male:female ratio of 3 in AMD compared with 1 in controls). The proportion of smokers and hypertensive subjects was higher in the AMD group (74.9 and 46.2%, respectively) than in the control group (40.1 and 30.1%, respectively). Cigarette smoking was identified as a significant risk factor for AMD, with multivariate-adjusted odds ratios of 4.06 with all forms of AMD (95% CI: 2.22–7.43; $p = 10^{-5}$), 4.59 with typical neovascular AMD (95% CI: 2.29–9.18; $p = 10^{-4}$) and 4.87 with polypoidal choroidal vasculopathy (95% CI: 1.96–12.1; $p = 10^{-3}$).

The main finding of this study is that the serum fatty acid profile was similar in both AMD patients and control subjects, except for EPA concentration, which was significantly higher in the AMD group than in the control group ($2.04 \pm 1.06\%$ compared to $1.63 \pm 0.90\%$, respectively).

Expert commentary

Observational studies strongly suggest that dietary omega-3 LC-PUFAs protect individuals from the development of

AMD [17]. Nevertheless, the mechanisms behind this association are poorly understood. EPA and DHA are the two major omega-3 LC-PUFAs in the diet. DHA is the prominent LC-PUFA in the neurosensory retina, where it accounts for approximately 16% of the total fatty acids in humans [18] and 30–50% in rodents [19,20]. We recently published that adipose tissue DHA, used as a surrogate for a long-term history of fat intake, poorly correlates with DHA in the neurosensory retina in humans [18]. Epidemiological data clearly highlighted that the prevention of AMD by dietary omega-3 LC-PUFAs is primarily observed in patients with low linoleic acid intake [10,11]. In a recent study we reported that, following these requirements, a diet high in omega-3 LC-PUFAs and low in linoleic acid improved the enrichment of the retina and retinal pigment epithelium in omega-3 LC-PUFAs, and upregulated the expression of lipid-associated genes in the retina [21]. The accretion of the retinal tissues in omega-3 LC-PUFAs was magnified by low linoleic acid intake. This was peculiarly true with EPA, whose content in the retina was multiplied by a factor of approximately 4 when a diet contained low linoleic acid and was rich in omega-3 LC-PUFAs compared with a diet high in linoleic acid and low in omega-3 LC-PUFAs [21]. Although differences between Japanese and populations from Western countries cannot be restricted to differences in lipid dietary intakes only, one would expect a greater omega-3 LC-PUFA content in the retina of Japanese subjects compared with Western populations. The paper by Sugano and Hirahara in 2000 clearly illustrates differences in circulating omega-3 LC-PUFAs between Japan and the USA [13]. The lack of differences in the serum fatty acid composition reported by Kabasawa and coworkers between AMD patients and control subjects in Japan [1] does not discredit the potential of omega-3 LC-PUFAs in the prevention of AMD. Merely, it highlights that AMD is a complex multifactorial disease in which dietary omega-3 LC-PUFAs are only participants in the prevention process. Nevertheless, this article clearly pointed out that circulating omega-3 LC-PUFAs cannot be considered as markers of AMD risk.

Five-year view

Accounting for aging of the population and the prevalence of AMD, patients with AMD are expected to represent a growing burden for developed countries within the next few decades. Identifying risk factors for AMD is of crucial importance for the clinical management of patients at high risk. Progress in genetics has identified risk loci and genes [6,9]. Preventing the development of the disease at its early stages facilitates the clinical management of at-risk patients by ophthalmologists. Reducing cigarette smoking also participates in lowering the development of AMD, and such recommendations are already in use in clinics. Some evidence comes from observational studies that dietary omega-3 LC-PUFAs participate to prevent from the development and evolution of AMD [17]. Until now, we have lacked clear demonstration from randomized clinical trials that supplementing subjects or AMD patients with diets rich in omega-3 LC-PUFAs will lower the risk or development of AMD. AREDS 2 is a multicenter, randomized

trial designed to assess the efficacy of oral supplementation with omega-3 LC-PUFAs and/or carotenoids (lutein and zeaxanthin) on the progression towards advanced stages of AMD. The study will enrol approximately 4000 AMD participants presenting with either bilateral large drusen or large drusen in one eye and advanced AMD in the other eye. The patients will be followed for 5–6 years. The scientific and medical community is looking forward to the key data that will be provided by this study.

Financial & competing interests disclosure

The authors have no relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript. This includes employment, consultancies, honoraria, stock ownership or options, expert testimony, grants or patents received or pending, or royalties.

No writing assistance was utilized in the production of this manuscript.

Key issues

- Age-related macular degeneration (AMD) is the leading cause of visual impairment in developed countries.
- Dietary omega-3 fatty acids have been associated with a reduced risk of AMD in population-based studies.
- The serum fatty acid profile in omega-3 fatty acids was not associated with AMD in the Japanese population, despite the consumption in omega-3-rich fish and a high proportion of omega-3 fatty acids in serum.

References

- Kabasawa S, Mori K, Horie-Inoue K *et al.* Associations of cigarette smoking but not serum fatty acids with age-related macular degeneration in a Japanese population. *Ophthalmology* 118(6), 1082–1088 (2011).
- Klein R, Chou C-F, Klein BEK, Zhang X, Meuer SM, Saaddine JB. Prevalence of age-related macular degeneration in the US population. *Arch. Ophthalmol.* 129(1), 75–80 (2011).
- Kawasaki R, Wang JJ, Ji GJ *et al.* Prevalence and risk factors for age-related macular degeneration in an adult Japanese population: the Funagata study. *Ophthalmology* 115(8), 1376–1381 (2008).
- Klein R, Klein BE, Knudtson MD, Meuer SM, Swift M, Gangnon RE. Fifteen-year cumulative incidence of age-related macular degeneration: the Beaver Dam Eye Study. *Ophthalmology* 114(2), 253–262 (2007).
- Curcio CA, Johnson M, Huang JD, Rudolf M. Apolipoprotein B-containing lipoproteins in retinal aging and age-related macular degeneration. *J. Lipid Res.* 51(3), 451–467 (2010).
- Ding X, Patel M, Chan CC. Molecular pathology of age-related macular degeneration. *Progr. Retin. Eye Res.* 28, 1–18 (2009).
- Anderson DH, Radeke MJ, Gallo NB *et al.* The pivotal role of the complement system in aging and age-related macular degeneration: hypothesis re-visited. *Progr. Retin. Eye Res.* 29(2), 95–112 (2010).
- Yang Z, Camp NJ, Sun H *et al.* A variant of the *HTRA1* gene increases susceptibility to age-related macular degeneration. *Science* 314(5801), 992–993 (2006).
- Neale BM, Fagerness J, Reynolds R *et al.* Genome-wide association study of advanced age-related macular degeneration identifies a role of the hepatic lipase gene (*LIPC*). *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 107(16), 7395–7400 (2010).
- Seddon JM, George S, Rosner B. Cigarette smoking, fish consumption, omega-3 fatty acid intake, and associations with age-related macular degeneration: the US twin study of age-related macular degeneration. *Arch. Ophthalmol.* 124(7), 995–1001 (2006).
- Tan JSL, Wang JJ, Flood V, Mitchell P. Dietary fatty acids and the 10-year incidence of age-related macular degeneration: the Blue Mountains Eye study. *Arch. Ophthalmol.* 127(5), 656–665 (2009).
- Chong EWT, Kreis AJ, Wong TY, Simpson JA, Guymer RH. Dietary omega-3 fatty acid and fish intake in the primary prevention of age-related macular degeneration: a systematic review and meta-analysis. *Arch. Ophthalmol.* 126(6), 826–833 (2008).
- Sugano M, Hirahara F. Polyunsaturated fatty acids in the food chain in Japan. *Am. J. Clin. Nutr.* 71(1), 189S–196S (2000).
- Astorg P, Arnault N, Czernichow S, Noiset N, Galan P, Hercberg S. Dietary intakes and food sources of n-6 and n-3 PUFA in French adult men and women. *Lipids* 39(6), 527–535 (2004).
- Augood C, Chakravarthy U, Young I *et al.* Oily fish consumption, dietary docosahexaenoic acid and eicosapentaenoic acid intakes, and associations with neovascular age-related macular degeneration. *Am. J. Clin. Nutr.* 88(2), 398–406 (2008).
- Bazan NG, Calandria JM, Serhan CN. Rescue and repair during photoreceptor cell renewal mediated by docosahexaenoic acid-derived neuroprotectin D1. *J. Lipid Res.* 51(8), 2018–2031 (2010).
- Chong EW, Wong TY, Kreis AJ, Simpson JA, Guymer RH. Dietary antioxidants and primary prevention of age related macular degeneration: systematic review and meta-analysis. *BMJ* 335(7623), 755 (2007).
- Bretillon L, Thuret G, Grégoire S *et al.* Lipid and fatty acid profile of the retina, retinal pigment epithelium/choroid, and lacrimal gland, and associations with adipose tissue fatty acids in human subjects. *Exp. Eye Res.* 87, 521–528 (2008).
- Bretillon L, Acar N, Seeliger MW *et al.* ApoB100, LDLR^{-/-} mice exhibit reduced electroretinographic response and cholesteryl esters deposits in the retina. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 49(4), 1307–1314 (2008).
- Schnebelen C, Viau S, Grégoire S *et al.* Nutrition for the eye: different susceptibility of the retina and the lacrimal gland to dietary omega-6 and omega-3 polyunsaturated fatty acid incorporation. *Ophthalmic Res.* 41(4), 216–224 (2009).
- Simon E, Bardet B, Grégoire S *et al.* Decreasing dietary linoleic acid promotes long chain omega-3 fatty acid incorporation into rat retina and modifies gene expression. *Exp. Eye Res.* 93(5), 628–635 (2011).