



**HAL**  
open science

# Caractérisation *in vivo* et *in vitro* de l'effet protecteur d'un complément alimentaire sur les cellules rétiniennes.

Khaoula Ramchani

## ► To cite this version:

Khaoula Ramchani. Caractérisation *in vivo* et *in vitro* de l'effet protecteur d'un complément alimentaire sur les cellules rétiniennes.. Médecine humaine et pathologie. Université d'Auvergne - Clermont-Ferrand I, 2016. Français. NNT : 2016CLF1PP01 . tel-01846004

**HAL Id: tel-01846004**

**<https://theses.hal.science/tel-01846004>**

Submitted on 20 Jul 2018

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

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

Université Tunis El Manar

Université d'Auvergne  
Université Blaise Pascal

*ÉCOLE DOCTORALE*  
*DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ*

N° d'ordre :

*Thèse*

Présentée à l'Université d'Auvergne  
pour l'obtention du grade de (Décret du 5 juillet 1984)

**Docteur d'Université**  
**Spécialité : Neurosciences et Nutrition**

Le 23 Mars 2016 par

**Khaoula RAMCHANI BEN OTHMAN**

---

**Caractérisation *in-vivo* et *in-vitro* de l'effet  
protecteur d'un complément alimentaire sur les  
cellules rétinienne**

---

**Président** Mr le Professeur Michel DOLY

**Membres** Mme le Professeur Isabelle RANCHON-COLE  
Mr le Professeur Mohamed AMRI  
Mme le Professeur Olfa MASMOUDI  
Mr le Professeur Niyazi ACAR  
Mr Olivier PERCHE

**Rapporteurs** Mme le Professeur Alicia TORRIGLIA  
Mr le Professeur Ferid LIMAM

Equipe de Biophysique Neurosensorielle, UMR INSERM 1107, Clermont-Ferrand, France  
Laboratoire de Neurophysiologie Fonctionnelle et Pathologies, UR/11ES09, Tunis, Tunisie



Université Tunis El Manar

Université d'Auvergne  
Université Blaise Pascal

*ÉCOLE DOCTORALE*  
*DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ*

N° d'ordre :

*Thèse*

Présentée à l'Université d'Auvergne  
pour l'obtention du grade de (Décret du 5 juillet 1984)

**Docteur d'Université**  
**Spécialité : Neurosciences et Nutrition**

Le 23 Mars 2016 par

**Khaoula RAMCHANI BEN OTHMAN**

---

**Caractérisation *in-vivo* et *in-vitro* de l'effet  
protecteur d'un complément alimentaire sur les  
cellules rétinienne**

---

**Président** Mr le Professeur Michel DOLY

**Membres** Mme le Professeur Isabelle RANCHON-COLE  
Mr le Professeur Mohamed AMRI  
Mme le Professeur Olfa MASMOUDI  
Mr le Professeur Niyazi ACAR  
Mr Olivier PERCHE

**Rapporteurs** Mme le Professeur Alicia TORRIGLIA  
Mr le Professeur Ferid LIMAM

Equipe de Biophysique Neurosensorielle, UMR INSERM 1107, Clermont-Ferrand, France  
Laboratoire de Neurophysiologie Fonctionnelle et Pathologies, UR/11ES09, Tunis, Tunisie



Je dédie ce travail

**A mes chers parents, Fethi et Faten**

*Qui ont cru en moi et m'ont soutenu moralement et financièrement. Leur présence et leurs encouragements sont pour moi les piliers fondateurs de ce que je suis et de ce que je fais.*

**A mon cher époux, Mohamed**

*Pour sa patience, ses sacrifices, son soutien quotidien indéfectible et son enthousiasme contagieux à l'égard de mes travaux comme de la vie en général. Notre couple a grandi en même temps que mon projet scientifique, le premier servant de socle solide à l'épanouissement du second.*

**A mon cher frère, Khaled**

*Pour son affectation fraternelle et son soutien.*

**A mes chers beaux parents, Nouredine et Jamila**

*Pour leur soutien et leurs encouragements tout au long de ma thèse.*

**A Iyèd, Anissa, Olfa et Atef**

**A toute ma famille**



## Remerciements

Cette thèse a été réalisée en cotutelle dans le laboratoire de Biophysique Neurosensorielle UMR Inserm 1107 de l'Université d'Auvergne, à Clermont-Ferrand et le laboratoire de Neurophysiologie fonctionnelle et pathologies UR/11ES09 à l'Université Tunis El Manar, à Tunis.

Il me sera très difficile de remercier tout le monde car c'est grâce à l'aide de nombreuses personnes que j'ai pu mener cette thèse à son terme.

Je voudrais tout d'abord exprimer toute ma reconnaissance à **Monsieur Le Professeur Doly** et **Monsieur Le Professeur Amri** pour m'avoir accueilli au sein de leur équipe ainsi que pour la confiance qu'ils m'ont accordée tout au long de ce travail de thèse.

Je remercie tout particulièrement **Madame Le Professeur Isabelle Ranchon-Cole** pour avoir suivi ce travail durant toutes ces années. Je suis ravie d'avoir travaillé en sa compagnie car outre son appui scientifique, elle a toujours été là pour me soutenir moralement. Je la remercie également pour la confiance qu'elle m'a accordée ainsi que pour la liberté d'action qu'elle m'a laissée dans l'orientation de mon travail. Je la remercie enfin de m'avoir consacré du temps à discuter des résultats, à m'aider dans la rédaction des articles ainsi qu'à relire et corriger ma thèse. Qu'elle trouve ici le gage de ma sincère reconnaissance.

J'exprime ma profonde gratitude et mes plus vifs remerciements à Mesdames **A. Torriglia**, **O. Masmoudi**, Messieurs **F. Limam**, **N. Acar** et **O. Perche**, qui m'ont fait l'honneur d'accepter d'être membres du jury et rapporteurs de ce travail.

Mes remerciements vont également à **David Cia** pour la gentillesse qu'il a manifestée à mon égard durant cette thèse, pour ses connaissances et pour tous les conseils et les discussions que j'ai pu avoir durant les réunions d'équipe ou en dehors.

Je tiens évidemment à remercier **Christine Cercy** et **Nathalie Jacquemot** pour leur aide précieuse et leur disponibilité lors des expérimentations mais surtout, leur sympathie.

Un grand merci aussi à **Sylviane Rousselin** pour son soutien, sa gentillesse (Merci pour la tasse que tu m'as offerte !).

Je remercie également **Jean Marie Gorrard** pour sa gentillesse et sa sympathie (merci d'être passé au labo le week-end pour prendre de mes nouvelles !!). Mais un grand merci pour lui de nous avoir apporté son savoir-faire et de toujours avoir été disponible pour prendre les mesures d'éclaircissement pour mes expérimentations animales.



Merci à **Chervin Hassel** pour sa gentillesse et sa bonne humeur.

Je remercie également toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à ce travail : Je tiens à remercier **Olivier Perche** de m'avoir accueillie au sein de l'équipe "Neurogénétique" INEM - UMR7355 à Orléans, et Rafaëlle Rossignol pour sa bonne humeur et ses connaissances en biologie moléculaire qu'elle a su me transmettre avec plaisir. Je remercie également l'équipe Œil, nutrition et signalisation cellulaire de l'INRA de Dijon et plus particulièrement Mr Niyazi Acar, Olivier Berdeaux et S. Gregoire d'avoir collaboré avec nous pour la réalisation de certains dosages.

Ces remerciements ne peuvent s'achever, sans une pensée à mes amies et sœurs **Ahlem, Sinda M.** Merci d'avoir toujours été là pour moi depuis maintenant plus de 10 ans. Merci pour votre soutien et votre encouragement.

Ainsi, un grand merci également à toutes mes amies et tous mes amis, pour leur sincère amitié et soutien **Belkis Refka, Insaf, Imen, Sarra, Zina, Chaima, Dima, Olfa, Khaled, Salem, Azzam, Elian, Romaric et Sinda G.**

Enfin merci à toutes les personnes que j'ai involontairement oubliées.



# TABLE DES MATIERES

<b>Résumé</b> .....	i
<b>Abstract</b> .....	ii
<b>Production scientifique</b> .....	iii
<b>Liste des abréviations</b> .....	iv
<b>Liste des figures</b> .....	vi
<b>Liste des tableaux</b> .....	viii
<b>Avant-propos</b> .....	1
<b>I. Rétine</b> .....	3
<b>A. Rétine neurale</b> .....	3
1. Structure .....	3
2. Photorécepteurs .....	4
2.1. Structure .....	4
2.2. Répartition des cônes et des bâtonnets .....	5
2.3. Photopigment .....	6
2.4. Phototransduction .....	6
<b>B. Epithélium pigmentaire rétinien</b> .....	7
1. Structure .....	7
2. Fonctions .....	8
2.1. Régénération du photopigment ou cycle visuel .....	8
2.2. Phagocytose/Renouvellement des disques .....	8
2.3. Transport des nutriments .....	9
<b>C. Particularité de la rétine</b> .....	10
1. Lipides .....	10
2. Caroténoïdes .....	11
3. Oligoéléments .....	12
4. Vitamines .....	13
<b>II. Dégénérescence maculaire liée à l'âge</b> .....	13
<b>A. Définition</b> .....	13
<b>B. Différents stades et formes</b> .....	14
1. Mculopathie liée à l'âge (MLA) .....	14
2. Dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) .....	14
1.1. Dégénérescence maculaire liée à l'âge « sèche » ou atrophique .....	14
1.2. Dégénérescence maculaire liée à l'âge « humide » ou néovasculaire ou exsudative .....	15
<b>C. Classification</b> .....	16
<b>D. Epidémiologie</b> .....	16



1.	Prévalence .....	16
2.	Incidence .....	17
E.	Facteurs de risque.....	18
1.	Age .....	18
2.	Génétique .....	18
3.	Facteurs de risque environnementaux .....	20
3.1.	Tabagisme .....	20
3.2.	Exposition à la lumière.....	21
3.3.	Facteurs nutritionnels .....	21
3.3.1.	Vitamines .....	21
3.3.2.	Zinc .....	22
3.3.3.	Caroténoïdes .....	23
3.3.4.	Lipides.....	23
III.	Physiopathogenèse de la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA).....	24
A.	Stress oxydant .....	24
1.	Définition .....	24
2.	Espèces réactives.....	25
2.1.	Espèces réactives de l'oxygène .....	25
2.2.	Espèces réactives de l'azote .....	25
3.	Défenses anti-oxydantes.....	25
3.1.	Système enzymatique .....	26
3.2.	Systèmes non enzymatiques d'origine alimentaire .....	27
3.2.1.	Vitamines .....	27
3.2.2.	Oligoéléments .....	27
3.2.3.	Caroténoïdes .....	28
4.	Conséquences du stress oxydant .....	28
4.1.	Peroxydation lipidique .....	28
4.2.	Oxydation des protéines .....	30
4.3.	Oxydation de l'ADN .....	30
5.	Implication du stress oxydant dans la DMLA.....	30
B.	Inflammation .....	31
1.	Définition .....	31
2.	Cellules de l'inflammation .....	32
2.1.	Cellules de la réponse innée (Figure 29).....	32
2.1.1.	Cellules phagocytaires .....	32
2.1.2.	Cellules Natural Killer .....	33
2.2.	Cellules de la réponse adaptative (Figure 30) .....	33



2.2.1.	Lymphocytes T .....	33
2.2.2.	Lymphocytes B .....	33
3.	Médiateurs moléculaires de l'inflammation.....	34
3.1.	Récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires.....	34
3.2.	Cytokines.....	35
3.2.1.	Cytokines pro-inflammatoires.....	35
3.2.2.	Cytokines anti-inflammatoires (Figure 34).....	36
3.2.3.	Cytokines immunorégulatrices (Figure 35) .....	36
3.2.4.	Chémokines.....	37
3.2.5.	Cytokines agissant comme facteurs de perméabilité Vasculaire .....	38
3.3.	Médiateurs lipidiques .....	38
3.4.	Pigments maculaires : Lutéine/zéaxanthine .....	40
4.	Implications de l'inflammation dans la dégénérescence maculaire liée à l'âge.....	40
C.	Apoptose .....	41
1.	Généralités.....	41
2.	Caractéristiques des cellules apoptotiques .....	42
2.1.	Caractéristiques morphologiques .....	42
2.1.	Caractéristiques biochimiques.....	42
3.	Mécanismes moléculaire .....	43
1.3.	Voies caspase-dépendantes .....	43
1.4.	Voies caspase-indépendantes .....	45
1.5.	Interactions des voies .....	45
4.	Apoptose et DMLA .....	46
IV.	Compléments alimentaires et dégénérescence maculaire liée à l'âge.....	47
A.	Etudes épidémiologiques .....	47
1.	Etude Age-Related Disease Study (AREDS).....	47
1.1.	AREDS I .....	47
1.2.	AREDS II .....	49
2.	Autres Etudes .....	50
B.	Complément alimentaire à visée oculaire.....	50
1.	Introduction .....	50
2.	Le complément alimentaire testé.....	51
2.1.	Définitions .....	51
2.2.	Composition .....	51
2.3.	Résvératrol .....	51
2.4.	Métabolisme des composants.....	53
2.4.1.	Vitamines .....	53



2.4.2. Oligoéléments .....	54
2.4.3. Caroténoïdes .....	54
2.4.4. Lipides.....	55
2.4.5. Résvératrol .....	56
V. Modèle expérimental : phtodégénérescence rétinienne .....	56
1. Types de lésions induites par la lumière .....	57
2. Lésions induites par la lumière chez l'homme.....	57
3. Sensibilité de la rétine .....	59
4. Chromophores rétiniens comme potentiel initiateur des lésions photochimiques ...	59
OBJECTIFS DE LA THESE .....	61
<i>Publication n°1</i> .....	63
<i>Publication n°2</i> .....	66
<b>Résultats non publiés</b> .....	104
<b>Discussion générale</b> .....	111
<b>Conclusions</b> .....	118
<b>Perspectives</b> .....	118
<b>Annexe</b> .....	121
<b>Annexe 1.</b> Composition qualitative et quantitative en dose journalière des principaux compléments alimentaires à visée oculaire préconisés contre la DMLA.....	121
<b>Annexe2.</b> Approches expérimentales .....	122
<b>Références bibliographiques</b> .....	139
.....	



## Résumé

Les compléments alimentaires à visé oculaire qui envahissent le marché, contiennent dans la majorité des cas des oméga-3, des vitamines, des oligoéléments auxquels sont associés d'autres molécules connues pour leurs propriétés anti-inflammatoires et/ou anti-oxydantes. Néanmoins, à notre connaissance il n'existait pas d'étude portant sur les formes finalisées complexes de ces compléments. **Notre projet a donc pour objectif** d'évaluer et de caractériser *in-vivo* et *in-vitro* l'effet protecteur sur les cellules rétinienne d'une supplémentation alimentaire à visé oculaire commercialisée en France et en Tunisie. Ce supplément contient des oméga-3, des caroténoïdes, des vitamines, des oligoéléments et du résvératrol. *In-vivo*, nous avons utilisé un modèle de dégénérescence rétinienne progressive induite par la lumière et *in-vitro* un modèle de mort des cellules d'épithélium pigmentaire rétinien (ARPE-19) induite par le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

Dans **une première étape** nous avons mis en évidence que le complément alimentaire protège la fonction (électrorétinographie, ERG) et la structure (histologie et comptage de cellules apoptotiques) de la rétine contre les lésions induites par la lumière et protège les cellules ARPE-19 contre le stress oxydant induit par le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (MTT). Dans **une deuxième étape**, nous avons montré qu'une semaine de supplémentation entraîne une modification du contenu en acides gras dans le plasma et les rétines *in vivo*, et dans les cellules ARPE-19 *in-vitro*, caractérisée par une augmentation des taux d'EPA et DPA, deux précurseurs de DHA (HPLC). *In-vivo*, ni la quantité (spectromètre) ni la vitesse de régénération de la rhodopsine (ERG) ne sont affectées. Au cours de l'exposition à la lumière, l'expression des cytokines (milliplex) est orientée vers un profil anti-inflammatoire et l'expression génique (qPCR) d'iPLA<sub>2</sub>, PPAR- $\alpha$ , Caspase-12 est maintenue élevée tout au long de l'exposition à la lumière cyclique intense chez les animaux supplémentés.

En conclusion, nous avons émis l'hypothèse que l'accumulation préférentielle des acides gras polyinsaturés à longue chaîne (EPA et DPA) participe à l'effet protecteur du complément alimentaire en permettant 1/ un renouvellement facilité du DHA rétinien et 2/ ainsi le maintien de l'activité d'iPLA<sub>2</sub>. Le DHA libéré des membranes activerait les voies de signalisation anti-inflammatoire et anti-oxydante par l'intermédiaire du récepteur nucléaire PPAR- $\alpha$ .



## Abstract

Dietary supplement for ocular purpose have exploded on the market. In most cases, they contain omega-3, vitamins and trace elements associated with molecules known for their anti-inflammatory and/or anti-oxidant proprieties. However, to our knowledge no studies had evaluated dietary supplements on their finalized complex formulation. In this context, **the aim of our project** was to evaluate and characterize *in-vivo* and *in-vitro* the protective effect on retinal cells of a dietary supplement for ocular purpose marketed in France and Tunisia. This dietary supplement contains omega-3, vitamins, trace elements, carotenoids and resveratrol. Therefore, we have used, an *in-vivo* experimental model of progressive light-induced retinal damage and an *in-vitro* model of hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)-induced retinal pigment cells (ARPE-19) death.

**First**, we have demonstrated that the dietary supplement prevented retinal function (electroretinography, ERG) and structure (histology and detection of apoptotic nuclei) from light-induced retinal damage and protects ARPE-19 cells (MTT) from H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induced oxidative stress. **Second**, we have shown that one-week supplementation induced modifications in retinal (*in-vivo*), plasma (*in-vivo*) and ARPE-19 cells (*in-vitro*) fatty acids contents, characterized by an increase in EPA and DPA contents, the two synthetic precursors of DHA (HPLC). In addition, *in-vivo* neither rhodopsin content (spectrometer) nor response recovery (ERG) were affected. Furthermore, during light-exposure cytokines expression (milliplex) were oriented towards an anti-inflammatory profile and gene expression (qPCR) of iPLA<sub>2</sub>, PPAR- $\alpha$ , Caspase-12 was kept high throughout exposure to intense cyclic light in retina of supplemented animals.

In conclusion, we hypothesized that preferential accumulation of long-chain polyunsaturated fatty acids (EPA and DPA ) is involved in the protective effect of dietary supplement allowing : 1 / facilitated renewal of retinal DHA and 2 / maintaining of iPLA<sub>2</sub> activity. DHA released from membranes activate the anti- inflammatory and antioxidant signaling pathways via the nuclear receptor PPAR-  $\alpha$ .



## Production scientifique

### Publications dans des revues internationales à comité de lecture

*Khaoula Ramchani-Ben Othman*, Christine Cercy, Mohamed Amri, Michel Doly, Isabelle Ranchon-Cole. **Dietary Supplement Enriched in Antioxidants and Omega-3 Protects from Progressive Light-Induced Retinal Degeneration.** (Publié dans le journal : *PLoS One*, édition du 4 juin 2015)

*Khaoula Ramchani-Ben Othman*, David Cia, Niyazi Acar, Nathalie Jacquemot, Christine Cercy, Mohamed Amri, Isabelle Ranchon-Cole. **Effect of Dietary Supplement Enriched in Antioxidants and Omega-3 in ARPE-19 cells.** (En rédaction)

### Communications affichées dans des congrès nationaux et internationaux

*K.Ramchani-Ben Othman*, D.Cia, C. Cercy, N. Jacquemot, M. Amri, M. Doly, I. Ranchon-Cole. Protection mechanism of dietary supplement enriched in antioxidants and omega-3 in progressive light-induced retinal degeneration model. **Association for Ocular Pharmacology and Therapeutics (AOPT), Charleston, Les Etats Unis, 26 Février-01 Mars, 2015.**

*K.Ramchani Ben Othman*, C.Cercy, M.Doly, I.Ranchon-Cole. Dietary supplement enriched in antioxidants and omega-3 protects from progressive light-induced retinal degeneration. **Les journées de l'école doctorale, Université de Clermont Ferrand I, Clermont Ferrand, France: Mai16-17, 2013**

*K.Ramchani Ben Othman*, C.Cercy, M.Doly, I.Ranchon-Cole. Dietary supplement enriched in antioxidants and omega-3 protects from progressive light-induced retinal degeneration. **The 8th international congress Cognition, taste and performance, Dijon, France: Mars19-20, 2013**

I.Ranchon-Cole, *K.Ramchani Ben Otman*, C.Cercy, H.Rebika, M.Doly. Supplement enriched in antioxidants protects the retina from light-induced damage. **European Association for Vision and Eye Research, Nice, France: Oct. 10-13, 2012**

### Article de vulgarisation

L'association d'antioxydants et d'oméga-3 est bénéfique pour la rétine. **Site Inserm-29 Juin 2015**



# **Abréviations**



## Liste des abréviations

### A

**AA** : Acide arachidonique  
**ABCR** : ATP-Binding cassette retina  
**ADN** : Acide DésoxyriboNucléique  
**ADNn** : Acide DésoxyriboNucléique nucléaire  
**ADNmt** : Acide DésoxyriboNucléique mitochondriale  
**AGMI** : Acides Gras MonoInsaturés  
**AGPI** : Acides Gras PolyInsaturés  
**AGPI-LC** : Acides Gras PolyInsaturés à Longue chaîne  
**AGS** : Acide Gras Saturé  
**AJR** : Apport Journalier Recommandé  
**ANC** : Apport Nutritionnel Conseillé  
**ApoE** : Apolipoprotéine E  
**AREDS**: Age Related Disease Study  
**ARNm**: Acide RiboNucléique messenger  
**ATP** : Adénosine TriPhosphate  
**ATPase** : Adénosine TriPhosphatase

### B

**BF3** : Le trifluorure de bore  
**BHT** : Le butyle hydroxytoluène

### C

**CARD** : CAspase Recruitment Domain  
**Ccl-2** : Chemokine ligand 2  
**CEP** : La CarboxyEthylPyrrole  
**CFH** : Le facteur H du complément  
**CLRs** : C like Leptin Receptor (les récepteurs lectine de type C)  
**C/M** : Chloroforme/Méthanol  
**CNE** : Couche Nucléaire Externe  
**CPG** : Chromatographie Phase Gazeuse  
**CRALBP** : Cellular Retinal-Binding Protein  
**CRBP** : Cellular Retinol Binding Protein  
**Cu** : Cuivre

### D

**DAMPs** : Danger Associated Molecular Pattern (les motifs moléculaires associés au danger)  
**DEP** : Décollement de l'Épithélium Pigmentaire  
**DG** : Diacyl glycérol

**DHA** : Docosaheptaenoic acid (l'acide docosaheptaénoïque)  
**DMEM/F12**: Dulbecco's modified Eagle's medium and Ham's F12 medium  
**DMLA** : Dégénérescence Maculaire Liée à l'Age

**DMSO** : Diméthylsulfoxyde  
**DSR** : Décollements Séreux Rétiniens

### E

**ERA** : Espèces Réactives de l'Azote  
**EROs** : Espèces Réactives de l'Oxygène  
**ERG** : Electrorétinogramme

### F

**Fe<sup>2+</sup>** : Fer ferreux  
**FID** : Détecteur à ionisation de flamme  
**F4-NeuroPs** : F4-neuroprostanes

### G

**GDP** : Guanosyldiphosphate  
**GMPC** : Guanosyl MonoPhosphate cyclique  
**GPx** : Glutathion Peroxydase  
**GTP** : GuanosylTriPhosphate  
**GSH** : Glutathione

### H

**HAS** : Haute Autorité de Santé  
**HNE** : 4-hydroxy-2-nonénil  
**4-HNE** : 4-hydroxy-2-hexénil  
**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** : Peroxyde d'hydrogène  
**HO•** : Le radical hydroxyle  
**(HO)-1** : L'hème oxygénase

### I

**IsoPs** : Isoprostanes  
**IFN-γ** : Interferon gamma  
**IκB**: Inhibitor of κB  
**IL** : Interleukine  
**iNos** : Inductible de nitric synthase  
**INSEE** : Institut National de la Statistique et des Études Économiques  
**IP**: Iodure de propidium  
**IRBP**: Interstitial Retinol-Binding Protein

### K

**KDa** : Kilo Dalton

### L

**L•**: Le radical lipidique



**LOO<sup>·</sup>** : Le peroxyde réactif  
**LOOH** : Le hydroperoxyde  
**LRAT** : lecithin Retinol Acyl Transferase  
**Lx** : Lipoxines  
**M**  
**M II** : Métarhodopsine II  
**MaR** : Maresines  
**MCP-1** : Monocyte Chemottractant Protein-1  
**MDA** : Le malondialdéhyde  
**MLA** : Maculopathie Liée à l'Age  
**N**  
**NKT** : Les lymphocytes Natural Killer T  
**NLRs** : NOD Like Receptor (les récepteurs de type NOD)  
**Nm** : Nanomètre  
**NPD1** : Neuroprotectine D1  
**•NO** : Monoxyde d'azote  
**NOS** : Nitric Oxide Synthase  
**NO<sub>2</sub><sup>·</sup>** : Le radical dioxyde d'azote  
**O**  
**O<sub>2</sub><sup>-</sup>** : L'anion superoxyde  
**<sup>1</sup>O<sub>2</sub>** : L'oxygène singulet  
**8-OHdG** : 8-hydroxy-2'-désoxyguanosine  
**OCT** : Ocular Coherence Tomography (tomographie en cohérence optique)  
**OH** : Radical hydroxyle  
**OMS** : Organisation Mondiale de la Santé  
**ONOO<sup>-</sup>** : Anion peroxydinitrite  
**P**  
**PAMPs** : Pathogen Associated Molecular Pattern (les motifs moléculaires associés aux pathogènes)  
**PBS** : Phosphate buffer solution  
**PC** : Phosphatidylcholines  
**PD** : Protectines  
**PDE** : PhosphoDierytErase  
**PEA** : Phosphatidylethanolamine  
**PI** : Phosphatidylinositol  
**PKC** : Protéine kinase C  
**PLA2** : Phospholipase A2  
**PPAR** : Peroxisome proliferator-activated receptors (le Récepteur activé par les proliférateurs de peroxyosomes)

**PPR** : Pattern Recognition Receptor (Les récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires)  
**PPs** : Phytoprostanes  
**PS** : Phosphatidylsérine  
**PYCARD/ASC** : Apoptosis-associated speck-like domain containing a caspase recruitment domain  
**R**  
**RBP** : Retinol Binding Protein (la protéine liant le rétinol)  
**Recov** : Recoverine  
**RD** : Rétinol déshydrogénase  
**RLRs** : RIG Like Receptor (les récepteurs de type RIG)  
**ROOH** : Lipoperoxyde  
**Rv** : Resolvines  
**S**  
**SE** : Segments externes  
**SVF** : Sérum Veau Foetal  
**SOD** : SuperOxyde Dismutase  
**SR-B1** : Scavenger Receptor- B 1 (le récepteur scavenger de classe B de type I)  
**T**  
**T $\alpha$**  : Transducine  
**TGF- $\beta$**  : **Transforming** Growth Factor  $\beta$   
**Th** : Lymphocyte T Helper  
**TLRs** : Toll Like Receptor (les récepteurs de type Toll)  
**TNF** : Tumor Necrosis Factor (le facteur de nécrose tumorale)  
**Tx** : Thromboxane  
**U**  
**UV** : Ultraviolet  
**V**  
**VEGF** : Vascular Endothelial Growth Factor (facteur de croissance de l'endothélium vasculaire)  
**Z**  
**Zn** : Zinc



# Liste des figures et tableaux



## Liste des figures

- Figure 1** Représentation schématique d'un œil humain
- Figure 2** Structure de la rétine
- Figure 3** Représentation schématique des cellules des photorécepteurs en cône et en bâtonnet
- Figure 4** Représentation schématique de l'empilement de saccules (ou disques) des photorécepteurs bâtonnets
- Figure 5** Schéma en coupe de la rétine centrale : la macula et la fovéa.
- Figure 6** Schéma d'une molécule de rhodopsine
- Figure 7** Schéma de la phototransduction
- Figure 8** Schéma de l'inactivation de la métarhodopsine II (MII)
- Figure 9** Représentation schématique de l'épithélium pigmentaire rétinien (EPR)
- Figure 10** Le cycle visuel
- Figure 11** Mécanisme de renouvellement des segments externe des photorécepteurs
- Figure 12** Structure chimique de l'acide gras docosahexanoïque (DHA) et l'acide gras arachidonique (AA)
- Figure 13** Structure chimique du glycérophospholipide
- Figure 14** Structure chimique de la lutéine, la zéaxanthine (caroténoïdes xanthophylles) et du  $\beta$ -carotène.
- Figure 15** Fovéa d'un singe
- Figure 16** Rôle du zinc et cuivre dans la phototransduction et le cycle visuel
- Figure 17** Illustration schématique de la DMLA atrophique
- Figure 18** Aspects de fond d'œil de présence de drüsens
- Figure 19** Simulation des symptômes visuels que peut engendrer une DMLA
- Figure 20** Illustration schématique de la DMLA exsudative
- Figure 21** Aspects de fond d'œil de présence de drüsens
- Figure 22** La tomographie en cohérence optique (OCT)
- Figure 23** Grille d'Amsler
- Figure 24** La régénération de l' $\alpha$ -Tocophérol (Vitamine E) par l'acide ascorbique (Vitamine C)
- Figure 25** Structure chimique des xanthophylles lutéine et zéaxanthine
- Figure 26** Réaction de peroxydation lipidique
- Figure 27** Illustration schématique de formation des produits « primaires » et « secondaires » de la peroxydation lipidique à partir d'une espèce moléculaire de la phosphatidylcholine comportant en sn-2 un acide arachidonique
- Figure 28** Biosynthèse des isoprostanes
- Figure 29** Illustration schématique des cellules de l'immunité innée
- Figure 30** Illustration schématique des cellules de l'immunité adaptative
- Figure 31** Illustration schématique de l'activation inflammasome
- Figure 32** Illustration schématique du rôle de l'interleukine 18 (IL-18) et l'interleukine IL-1 $\beta$
- Figure 33** Illustration schématique du rôle de l'interleukine TNF- $\alpha$  et IL-6.



- Figure 34** Illustration schématique du rôle des cytokines anti-inflammatoires IL-10 et TGF- $\beta$
- Figure 35** Illustration schématique du rôle des cytokines immunorégulatrices IL-12, INF- $\gamma$ , IL-4 et IL-2
- Figure 36** Illustration schématique de la biosynthèse de dérivés d'oxydation d'Acides gras polyinsaturés
- Figure 37** Médiateurs lipidiques
- Figure 38** Synthèse de Neuroprotectine D1
- Figure 39** Caractéristiques morphologiques de l'Apoptose
- Figure 40** Externalisation des phosphatidylsérines
- Figure 41** Fragmentation internucléosomale de l'ADN lors de l'apoptose par une endonucléase
- Figure 42** Voie extrinsèque
- Figure 43** Voie intrinsèque ou voie mitochondriale
- Figure 44** Schéma expérimental de l'étude AREDS I
- Figure 45** Schéma expérimental de l'étude AREDS II
- Figure 46** Illustration schématique de l'absorption des rayonnements électromagnétiques de la lumière visible
- Figure 47** Expression protéique de la rhodopsine
- Figure 48** Production de l'isoprostane 15-F<sub>2t</sub>-IsoP dans la rétine chez des animaux non supplémentés avant (J0) après 1 jour (J1), après 3 jours (J3) et après 7 jours (J7) d'exposition à la lumière cyclique forte.
- Figure 49** Cinétique d'expression des gènes au cours de l'exposition à la lumière cyclique forte chez des animaux supplémentés ou non supplémentés avec le complément alimentaire
- Figure 50** Cinétique d'expression des cytokines pendant et après l'exposition à la lumière cyclique forte chez des animaux supplémentés ou non supplémentés avec le complément alimentaire.
- Figure 51** Réponse électrique de la rétine de rat à une stimulation lumineuse brève (10 ms).
- Figure 52** Chaîne d'acquisition des ERG et schéma de la sphère intégrante
- Figure 53** Représentation schématique d'un œil de rat et coupe histologique de sa rétine après coloration à l'hématoxyline-érythrosine (microscopie optique)
- Figure 54** Principe de la détection des cellules apoptotiques par le kit ApopTag
- Figure 55** Illustration schématique du chromatographe gazeux
- Figure 56** Illustration schématique des particules excitées par les lasers
- Figure 57** Spectres d'excitation et d'émission (d'après Luminex corp)
- Figure 58** Logiciel d'acquisition des données (d'après Luminex corp)
- Figure 59** Classification des nuages de billes selon les fluorescences rouge et infrarouge émises (d'après Luminex corp)



## Liste des tableaux

<b>Tableau 1</b>	Classification de la DMLA
<b>Tableau 2</b>	Espèces réactives de l'Oxygène
<b>Tableau 3</b>	Exemple d'aliments riches en vitamine C et teneur pour 100g d'aliment
<b>Tableau 4</b>	Exemple d'aliments riches en vitamine E et teneur pour 100g d'aliment
<b>Tableau 5</b>	Exemple d'aliments riches en zinc et teneur pour 100 g d'aliment
<b>Tableau 6</b>	Exemple d'aliments riches en cuivre et teneur pour 100g d'aliment
<b>Tableau 7</b>	Exemple d'aliments riches en lutéine et zéaxanthine et teneur pour 100g d'aliment
<b>Tableau 8</b>	Apports journaliers recommandés (AJR), apports nutritionnels conseillés, et dose de l'étude AREDS
<b>Tableau 9</b>	La composition de la supplémentation modifiée de l'étude AREDS I au niveau de la deuxième randomisation dans l'essai AREDS II
<b>Tableau 10</b>	Composition du complément alimentaire



# **Avant propos**



## **Avant-propos**

La dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) est la première cause d'atteinte visuelle irréversible chez les personnes de plus de 50 ans. La DMLA compte pour plus de 50% des cas de cécité centrale, et atteint approximativement une prévalence de 3% de la population générale adulte avec une fréquence augmentant largement avec l'âge. Compte tenu de l'allongement de l'espérance de vie, l'incidence de la DMLA ne cesse de croître et le nombre de patients de DMLA atteindrait dès 2020, 3 millions de personnes (contre 1,5 million aujourd'hui). La perte de vision est due à une altération primaire de l'épithélium pigmentaire rétinien suivi d'une dégénérescence progressive des cellules photoréceptrices à l'origine du signal visuel.

Les facteurs de risque de DMLA sont hétérogènes, incluant principalement le vieillissement et des prédispositions génétiques, auxquels s'associent des facteurs environnementaux, tels que le tabagisme, l'exposition à la lumière et les habitudes alimentaires. Bien que les mécanismes pathogéniques ne soient pas totalement connus, le stress oxydant et l'inflammation ont été associés au développement et/ou à la progression de la DMLA. A l'heure actuelle, aucun traitement n'existe contre la forme sèche de la DMLA et seul, un nombre restreint de patients peut bénéficier des traitements en vue de limiter le développement de la forme humide. Depuis la publication de Seddon en 1994 et la publication du rapport numéro 8 de l'étude clinique interventionnelle « Age Related Eye Disease Study » (AREDS) en 2001, la possibilité d'une prévention des stades précoces de la DMLA ou de son évolution vers des complications par des facteurs nutritionnels est venue au premier plan de l'actualité thérapeutique. Bien que les compléments alimentaires à visée oculaire envahissent le marché, leur efficacité sous leur forme finale n'est jamais évaluée.

Dans ce contexte, il nous est donc apparu important d'étudier et de caractériser l'effet d'un complément alimentaire à visée oculaire commercialisé sous la même forme en France et en Tunisie et prescrit dans la prévention de la DMLA.

Nous avons ainsi évalué l'effet du complément alimentaire d'une part sur la rétine et d'autre part sur des cellules d'épithélium pigmentaire rétinien en culture dans des conditions normales et suite à l'induction d'un stress oxydant. Nous nous sommes particulièrement intéressés à l'impact du complément alimentaire sur la composition lipidique, sur les marqueurs de l'inflammation et sur l'expression de gènes impliqués dans les voies de signalisation de l'inflammation et du stress oxydant.



La première partie de ce manuscrit est une étude bibliographique faisant un état des lieux des connaissances sur 1) la rétine 2) la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA), 3) les mécanismes impliqués dans la physiopathogenèse de la DMLA, 4) la composition des compléments alimentaires à visée oculaire et 5) le modèle de dégénérescence rétinienne induite par la lumière.

Dans la deuxième partie, les résultats sont présentés sous forme de 2 articles et de résultats non publiés.

Une troisième partie est constituée par la discussion générale de l'ensemble des résultats publiés et non publiés et des perspectives à donner à ces travaux.

La quatrième partie regroupe les annexes dans lesquelles les protocoles expérimentaux sont décrits en français ainsi que les publications citées dans le manuscrit.

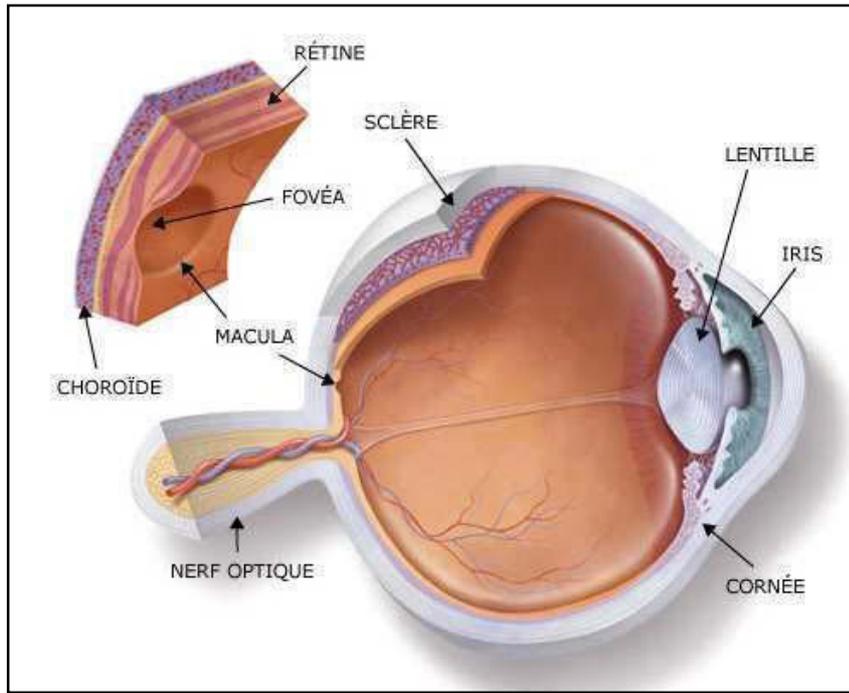


# **1<sup>ère</sup> partie**

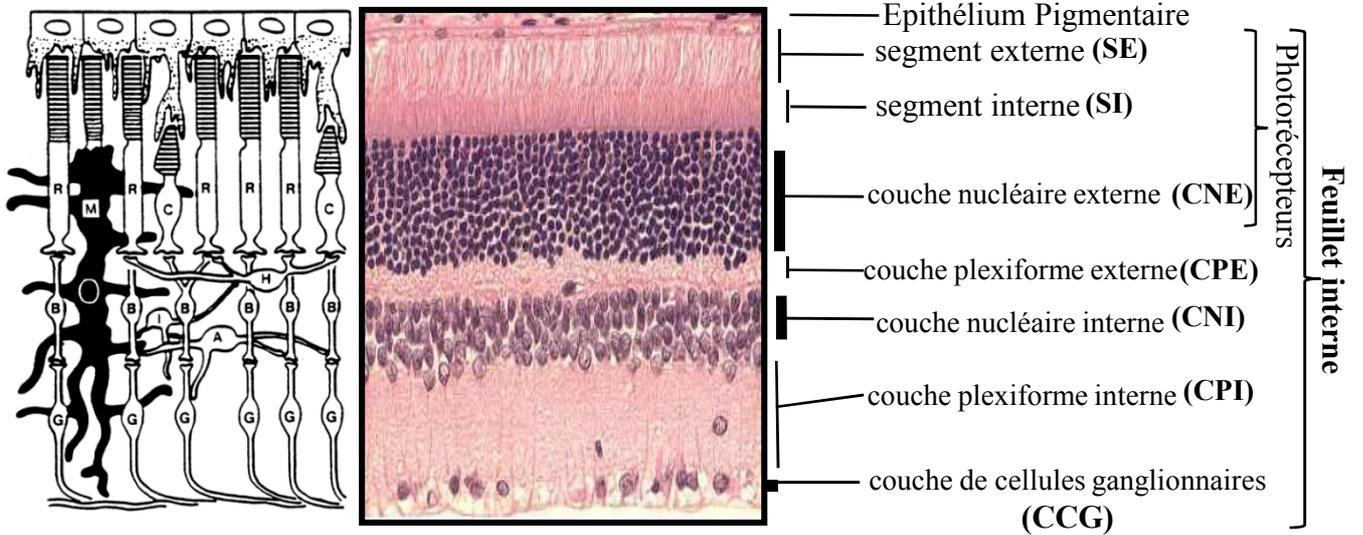
## **Etude bibliographique**







**Figure 1 : Représentation schématique d'un œil humain.**



**Figure 2 : Structure de la rétine.** Gauche: représentation schématique de la rétine. Droite : coupe histologique de rétine de rat après coloration à l'hématoxyline-érythrosine (microscopie optique). **R** : bâtonnet; **C**: cône ; **B** : cellule bipolaire ; **G** : cellule ganglionnaire ; **A** : cellule amacrine ; **H** : cellule horizontale; **I** : cellule interplexiforme.

# I. Rétine

La rétine est le tissu neurosensoriel qui tapisse le fond du globe oculaire (**Figure 1**). Sa face postérieure est accolée à la choroïde, et sa partie antérieure est en contact avec le vitré. Elle a pour fonction d'absorber la lumière et de transformer le message lumineux en un signal électrophysiologique qui sera transmis au système nerveux central via le nerf optique. Elle se subdivise en un feuillet interne la rétine neurale, et un feuillet externe l'épithélium pigmentaire rétinien (EPR) (**Figure 2**).

## A. Rétine neurale

### 1. Structure

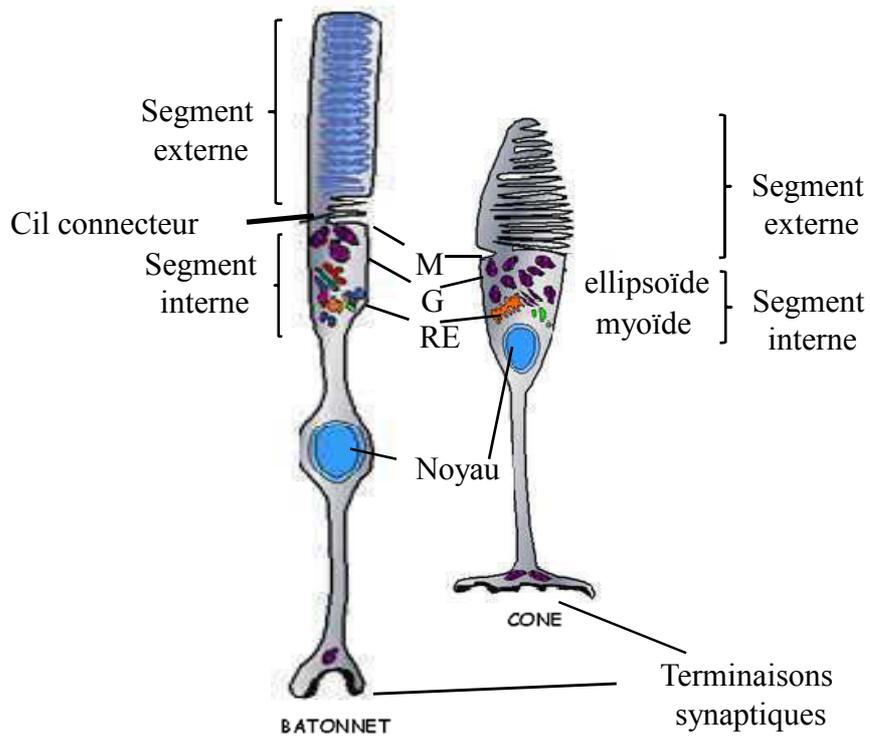
La rétine neurale est le lieu des fonctions de photoréception et de transmission de l'information lumineuse. Sur une coupe histologique, on peut observer que l'organisation rétinienne repose sur la séparation des corps cellulaires et des processus en couches distinctes (**Figure 2**) :

-**La couche des segments externes (SE) et internes (SI)** des photorécepteurs qui contient la partie distale des cellules photoréceptrices. Les photorécepteurs sont responsables de l'absorption de la lumière et de la transformation du signal lumineux en un signal électrophysiologique.

-**La couche nucléaire externe (CNE)** composée des noyaux des photorécepteurs des deux types : bâtonnets et cônes.

-**La couche plexiforme externe (CPE)** formée de connexions synaptiques entre les photorécepteurs, les cellules bipolaires et horizontales. Les cellules bipolaires sont les premiers neurones d'association qui modulent l'information électrophysiologique.

-**La couche nucléaire interne (CNI)** constituée des noyaux de nombreuses cellules (bipolaires, horizontales, amacrines, interplexiformes et les cellules de Müller). Les cellules amacrines, les cellules horizontales, et les cellules interplexiformes participent à la mise en forme de la réponse électrophysiologique initiale générée par les cellules photoréceptrices. Les cellules de Müller sont des cellules gliales qui entourent les photorécepteurs.



**Figure 3 : Représentation schématique des photorécepteurs en cône et en bâtonnet.**  
**RE** : Reticulum endoplasmique, **G** :Appareil de Golgi, **M** : Mitochondries.

-**La couche plexiforme interne (CPI)** formée des connexions synaptiques entre les cellules amacrines, bipolaires et les cellules ganglionnaires. Les cellules ganglionnaires correspondent aux seconds neurones d'association dont l'axone appartient au nerf optique.

-**Les noyaux des cellules ganglionnaires (CCG).**

Quel que soit l'espèce considérée, l'homme, le singe, le chat, le chien, la souris, le rat ou bien encore la grenouille, les photorécepteurs reçoivent leur apport sanguin (70-80% de l'oxygène consommé par la rétine) de la circulation choroïdienne au travers de l'épithélium pigmentaire rétinien, alors que la rétine interne reçoit son apport sanguin de la circulation rétinienne.

## 2. Photorécepteurs

### 2.1. Structure

Les photorécepteurs sont des neurones hautement spécialisés. Il existe deux types de photorécepteurs, les **bâtonnets** et les **cônes (Figure 3)**. Ils présentent tous les deux une morphologie générale similaire. Ils sont constitués d'un segment externe, d'un segment interne, d'un noyau cellulaire et d'une terminaison synaptique.

**Le segment externe** de la cellule est la partie sensible à la lumière, il est rempli de structures lamellaires orientées perpendiculairement à l'axe des photorécepteurs contenant les photopigments.

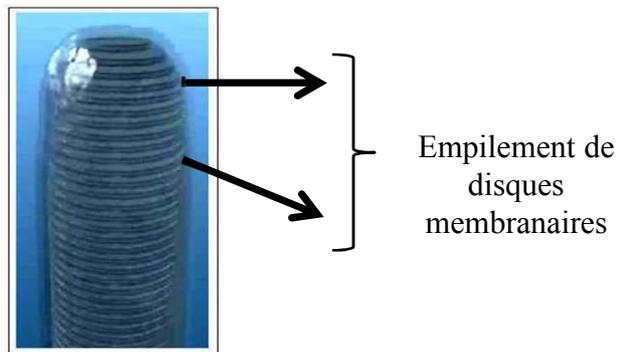
**Le segment interne** contient :

- Des mitochondries dans l'ellipsoïde. Ces mitochondries sont nécessaires pour fournir de l'énergie à ces cellules qui sont métaboliquement très actives. Les photorécepteurs consomment plus d'oxygène par gramme de poids de tissu que toutes les cellules du corps et ont un niveau d'oxygène proche de zéro dans l'obscurité (Wangsa-Wirawan and Linsenmeier 2003).

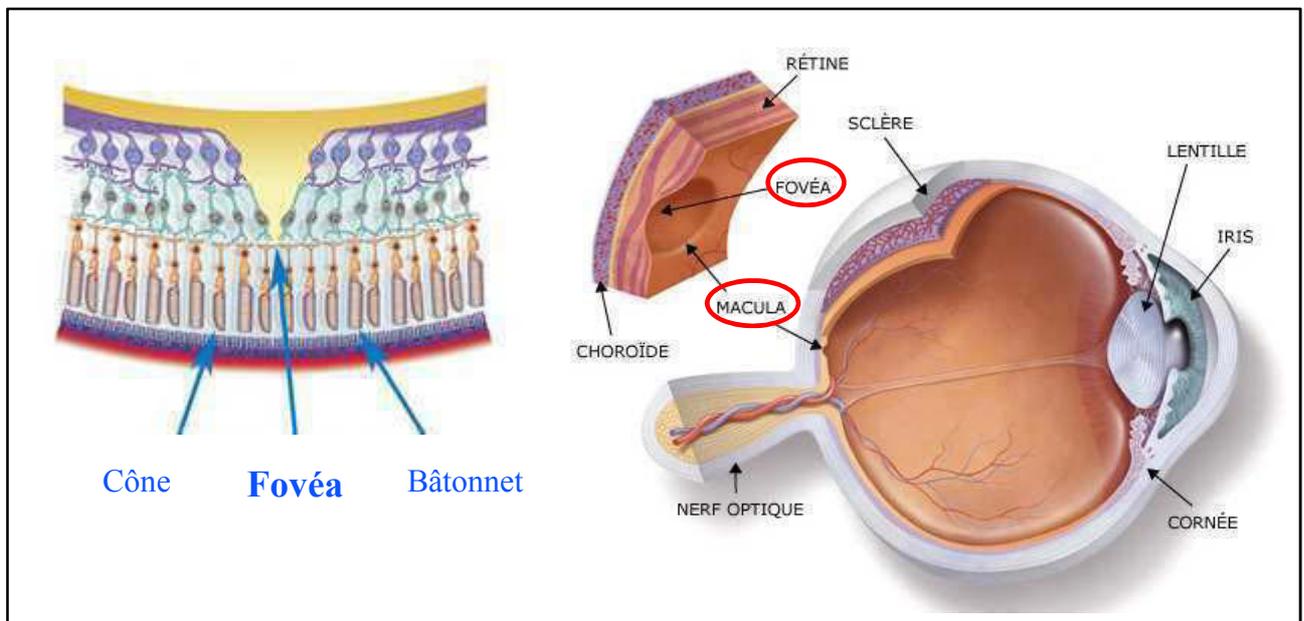
- L'appareil de Golgi et le réticulum endoplasmique dans le myoïde.

**La terminaison synaptique** est une région complexe qui permet à la cellule d'établir des contacts synaptiques avec les cellules horizontales et bipolaires.

Chez l'homme, la couche de photorécepteurs (SE, SI et CNE) a une épaisseur d'environ  $91.1 \pm 7.9 \mu\text{m}$  (Chan, Duker et al. 2006). Elle contient 120 millions de bâtonnets et 6,3 à 6,8



**Figure 4 : Représentation schématique de l'empilement de sacculs (ou disques) des photorécepteurs bâtonnets.** D'après <http://webvision.med.utah.edu/>.



**Figure 5 : Schéma en coupe de la rétine centrale: la macula et la fovéa.**

millions de cônes. Chez le rat, son épaisseur est d'environ 65  $\mu\text{m}$  et on dénombre environ 1 cône pour 100 bâtonnets.

Les bâtonnets ont un segment externe cylindrique et un segment interne fin alors que les cônes ont un segment externe effilé et un segment interne plus épais (**Figure 3**). Dans les cônes, la structure lamellaire consiste en un repli de la membrane plasmique (1000 à 2000 replis) tout le long du segment externe alors que, dans les bâtonnets, il s'agit d'un empilement de saccules (ou disques) (700 à 1000 disques), complètement séparés de la membrane plasmique (**Figure 4**). Chaque disque fait 10 à 15  $\mu\text{m}$  d'épaisseur.

Les **bâtonnets** sont les **récepteurs** à la **lumière de faible intensité** (vision de nuit ou scotopique) et ne distinguent pas les couleurs. Les **cônes** nécessitent une **lumière plus intense** pour fonctionner (vision de jour ou photopique) et permettent la **vision des couleurs**.

Il existe trois types fondamentaux de rétines chez les vertébrés : les rétines diurnes à cônes, les rétines nocturnes à bâtonnets et les rétines mixtes. Ces dernières sont les plus fréquentes. Toutefois, elles comprennent le plus souvent une telle prédominance de cônes ou de bâtonnets qu'il est habituel de les rattacher aux rétines de l'un ou l'autre type.

Pendant de nombreuses années, la rétine de rat a été considérée à bâtonnets mais Cicérone (Cicérone 1976) montre qu'il existe trois types de cônes chez le rat albinos. Plus tard, des études immunohistochimiques ont confirmé la présence de deux types de cônes, dont une majorité (93%) est sensible au vert et une minorité au bleu (Skoog 1985).

## 2.2. Répartition des cônes et des bâtonnets

Chez l'homme, les cônes et les bâtonnets ne sont pas répartis de façon uniforme sur l'ensemble de la rétine. Au centre de la rétine dans l'axe optique, **la macula (Figure 5)** d'environ 2 mm de diamètre, est très riche en cônes. Elle est responsable de la vision fine, et nous permet de lire, écrire, et réaliser toutes les activités manuelles de détail. Au centre de la macula se trouve **la fovéa (Figure 5)**. C'est une petite dépression d'un demi-millimètre de diamètre constituée uniquement de cônes, et dont l'acuité visuelle y est maximale. Cette zone est également largement responsable de l'appréciation des couleurs.

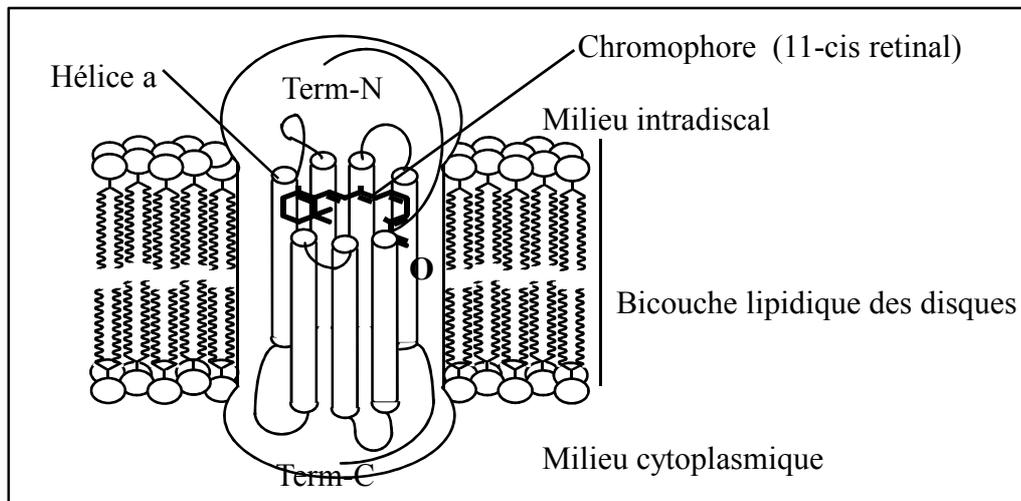


Figure 6 : Schéma d'une molécule de rhodopsine

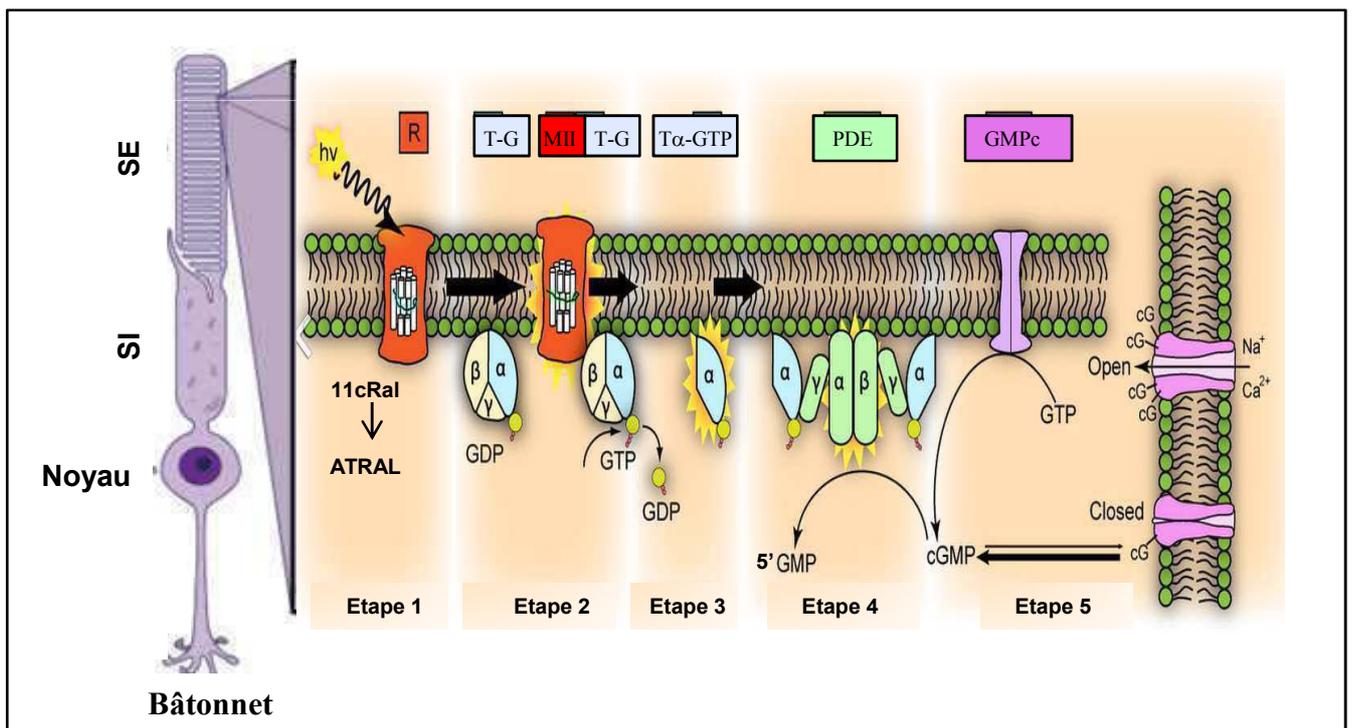


Figure 7 : Schéma de la phototransduction

([https://en.wikipedia.org/wiki/Visual\\_phototransduction](https://en.wikipedia.org/wiki/Visual_phototransduction))

**hv**: photon, **R**: Rhodopsine, **11cRal** : 11 cis -rétinal, **ATRAL**: tout-trans-rétinal, **MII**: MétarhodopsineII, **T-G**: Transducine inactive, **Tα-GTP**: Transducine activée, **PDE**: Phosphodiésterase, **GC**: GMPc.

### 2.3. Photopigment

Le **photopigment** ou **pigment visuel** est la molécule responsable de **l'absorption de la lumière**. Le **pigment visuel** du **bâtonnet** est la molécule de **rhodopsine (Figure 6)**. C'est la protéine majeure des membranes des disques du segment externe (90% des protéines). C'est une glycoprotéine constituée d'une macromolécule protéique de 40 kDa : l'opsine, liée à un groupement chromophore, l'isomère 11-cis du rétinol, dérivé de la vitamine A. L'opsine est une chaîne polypeptidique qui s'enroule sur elle-même pour former 7 hélices  $\alpha$  transmembranaires, reliées entre elles par de courts segments polypeptidiques. L'extrémité N-terminale est intradiscale. L'extrémité C-terminale est en regard du cytoplasme du bâtonnet et contient des domaines d'interactions avec des protéines périphériques telles que la transducine et les phosphodiesterases. Le groupement chromophore, 11-cis rétinol, est fixé par l'intermédiaire d'une base de Schiff protonée au niveau de la dernière hélice  $\alpha$  transmembranaire, avant l'extrémité C-terminale de l'opsine sur l'acide aminé Lysine 296. La liaison du 11-cis rétinol à l'opsine entraîne une délocalisation des électrons  $\pi$  de la chaîne latérale du chromophore. Ceci facilite l'excitation des électrons par des photons de longueur d'onde élevée, responsable du maximum d'absorption de la rhodopsine à 498 nm.

Au niveau des **cônes**, les **photopigments (iodopsine)** sont composés de l'isomère 11-cis du rétinol relié à différentes molécules d'opsine. La spécificité de la molécule d'opsine liée au chromophore, confère au photopigment un maximum d'absorption à  $\approx 450$  nm,  $\approx 520$  nm ou  $\approx 560$  nm responsable de la sensibilité du cône à la lumière bleue (cônes "*Short*"), verte (cônes "*Medium*") ou rouge (cônes "*Long*") (Cicerone 1976; Oprian, Asenjo et al. 1991; Merbs and Nathans 1992).

### 2.4. Phototransduction

Les cellules photoréceptrices rétiniennes sont spécifiquement adaptées pour transformer le signal lumineux en événements électrophysiologiques. Le terme de phototransduction englobe l'ensemble des étapes qui vont de **l'absorption du photon jusqu'à l'initiation de la réponse électrophysiologique (Figure 7)** :

Au niveau des bâtonnets, l'absorption d'un photon ( $h\nu$ ) par la rhodopsine (R) conduit à une isomérisation du chromophore, 11-cis-rétinal (11cRal) en tout-trans-rétinal (ATRAL), qui est suivie par des changements conformationnels dans la protéine opsine conduisant à la formation d'un état biochimiquement actif qui est la métarhodopsine II (MII) (**Etape 1**). MII active une cascade enzymatique : Elle se lie à la protéine Transducine inactive (T- G) (**Etape**

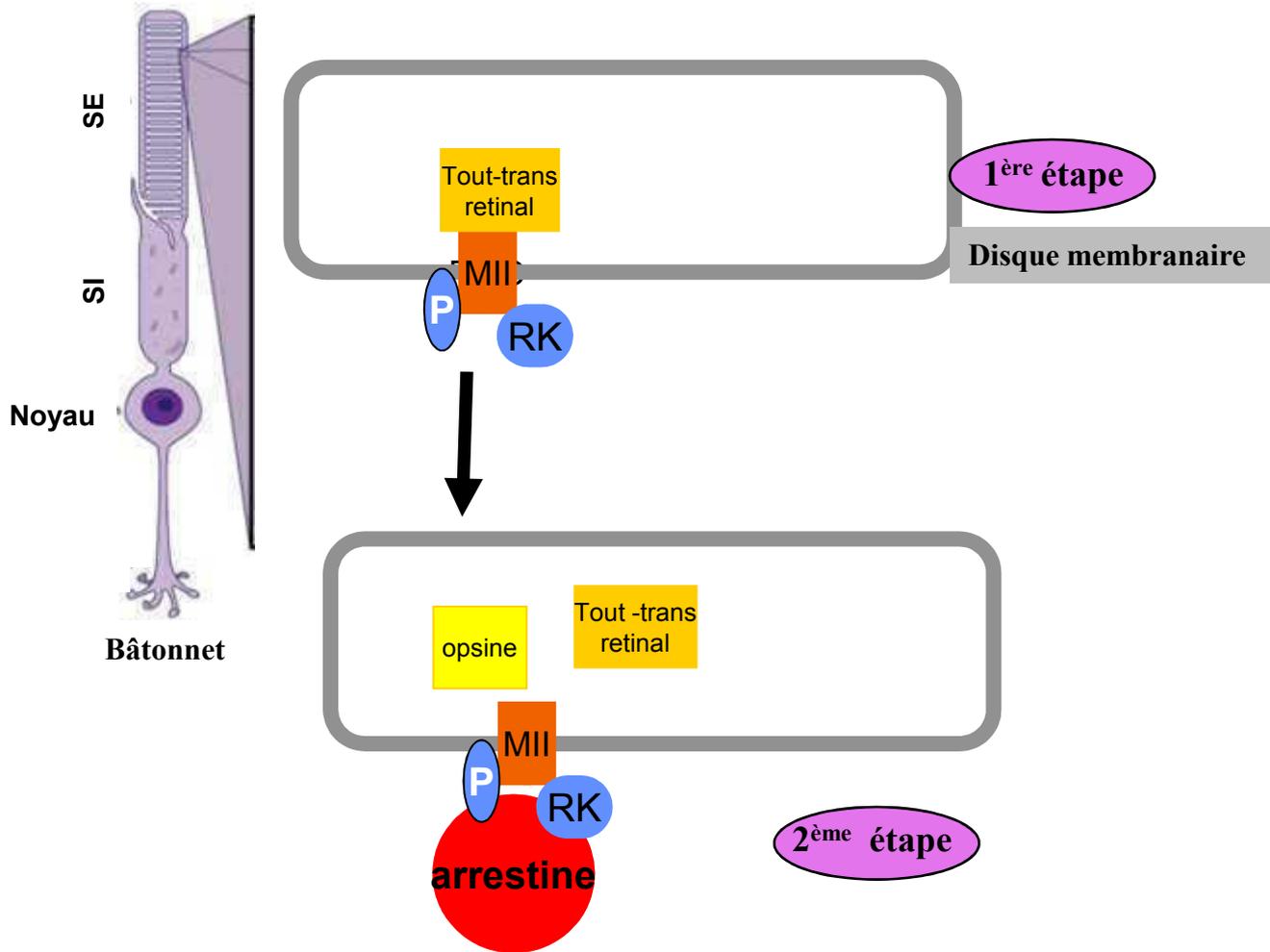


Figure 8 : Schéma de l'inactivation de la métarhodopsineII (MII)  
 P: phosphorylation, RK: rhodopsine kinase

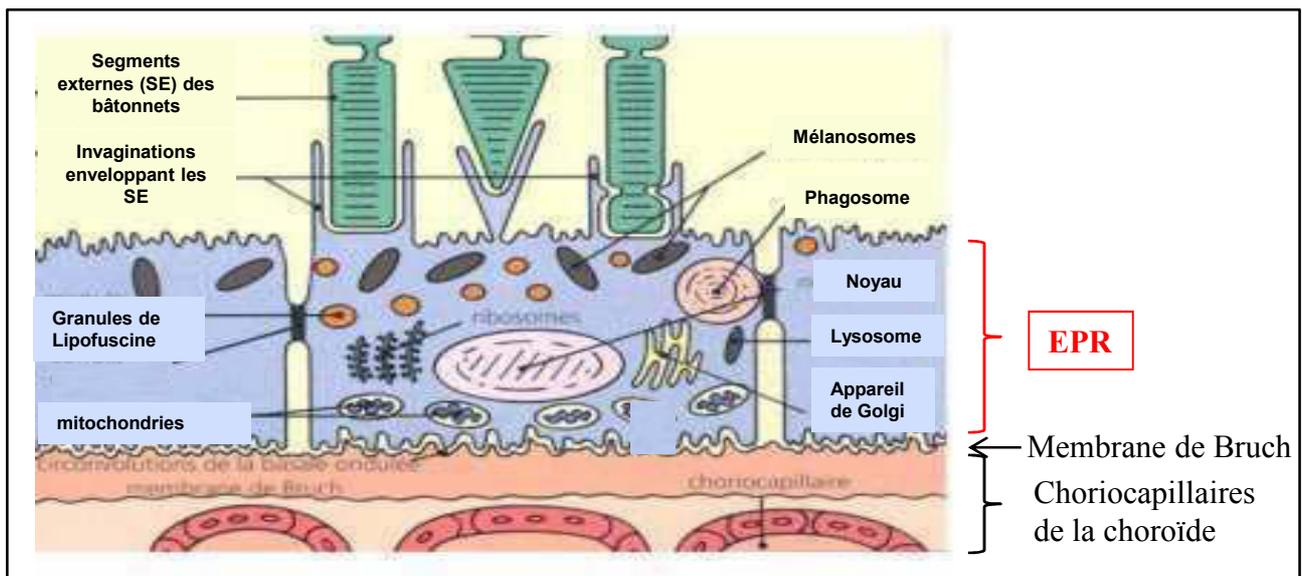


Figure 9 : Représentation schématique de l'épithélium pigmentaire rétinien (EPR)

**2)** et catalyse l'échange du GDP en GTP entraînant une modification de la conformation de la sous unité  $\alpha$  qui se dissocie des sous unités inhibitrices  $\beta\gamma$  (**Etape 3**). La Transducine ainsi activée (T- $\alpha$  GTP) active la phosphodiesterase (PDE) en levant l'inhibition des 2 sous unités  $\gamma$ . PDE  $\alpha\beta$  activée hydrolyse la Guanosine MonoPhosphate cytoplasmique (GMPc) en 5'-GMP. Ceci entraîne une réduction de la concentration cytoplasmique de GMPc (**Etape 4**). En réponse à cette diminution, les molécules GMPc se dissocient des canaux GMPc-dépendants au niveau de la membrane plasmique des segments externes, ce qui résulte en la fermeture des canaux. Les ions  $\text{Na}^+$  et  $\text{Ca}^{2+}$  ne peuvent plus rentrer dans la cellule et s'accumulent à l'extérieur conduisant à une hyperpolarisation de la membrane plasmique des photorécepteurs (**Etape 5**). Le signal lumineux est transformé en un signal électrophysiologique qui se propage de proche en proche jusqu'à la terminaison synaptique où il y a une diminution de la libération de neurotransmetteur (le glutamate).

L'inactivation de la métarhodopsine II (MII) avec la Transducine (T) se fait dans une première étape par une phosphorylation (P) par la rhodopsine kinase (RK) et dans une deuxième étape par la liaison à la protéine cytosolique, l'arrestine (Arr). Finalement, MII est hydrolysée en opsine et tout-trans rétinol (**Figure 8**).

Le schéma de la phototransduction des cônes est similaire à celui des bâtonnets mais avec des isoformes protéiques spécifiques des cônes. Récemment, il a été mis en évidence que les cellules de Müller sont une source secondaire de régénération du photopigment visuel particulièrement pour les photorécepteurs des cônes (Kaylor, Yuan et al. 2013; Kaylor, Cook et al. 2014).

## **B. Épithélium pigmentaire rétinien**

### **1. Structure**

L'épithélium pigmentaire rétinien (EPR) est formé d'une **seule couche de cellules épithéliales hexagonales polarisées** (10 à 20  $\mu\text{m}$  d'épaisseur chez l'homme). Elles sont dites pigmentaires car, à l'exception des sujets albinos, elles contiennent un pigment, la mélanine. Du **côté basal**, l'EPR est en contact avec les **choriocapillaires de la choroïde par l'intermédiaire de la membrane de Bruch**, et du **côté apical**, il forme des **invaginations enveloppant les segments externes des photorécepteurs (Figure 9)**. En général, une cellule épithéliale est en contact avec 30 à 45 segments externes de photorécepteurs (Bonilha 2008).

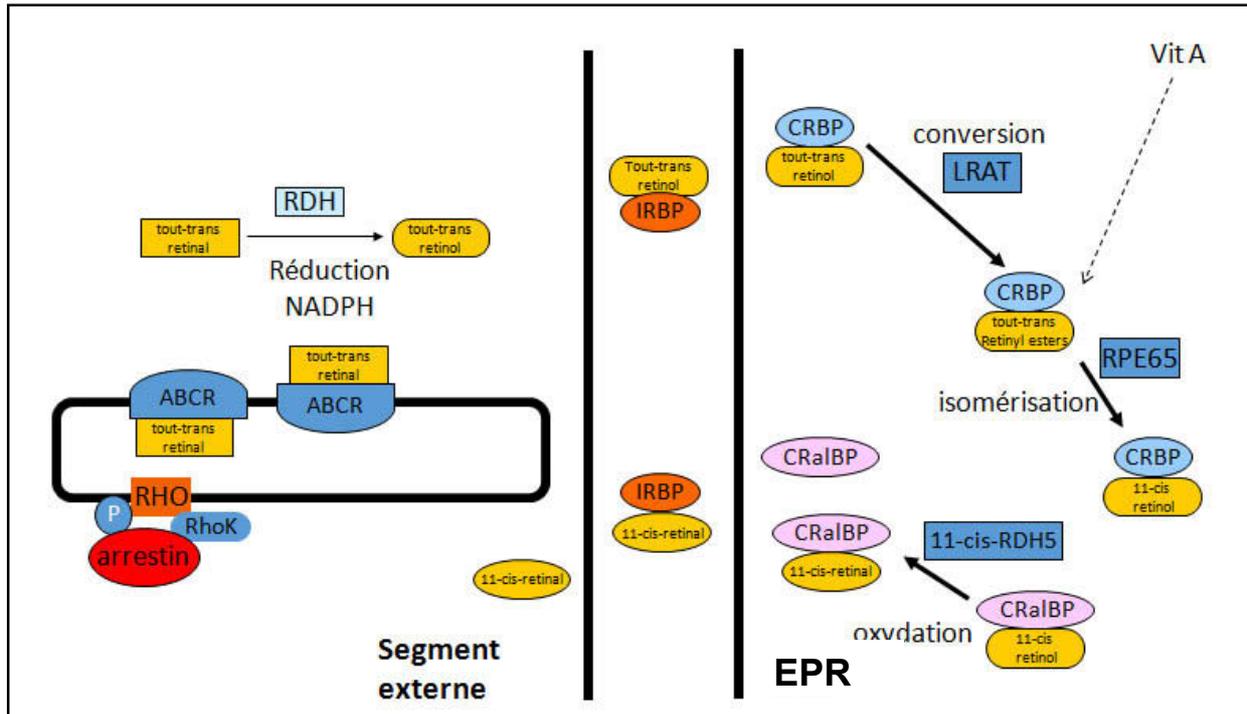


Figure 10 : Le cycle visuel.

**RHO** : rhodopsine, **P**: phosphorylation, **RhoK**: rhodopsine kinase, **ABCR** : ATP Binding Cassette Retina, **RDH** : 11-cis rétinol déshydrogénase, **EPR** : épithélium pigmentaire rétinien, **IRBP** : Interstitial retinol Binding Protein, **LRAT** : Lécithine rétinol acyltransférase, **CRalBP** Cellular Retinol Binding Protein, **RPE65** : Retinal Pigment Epithelium-specific protein, **VitA**: Vitamine A

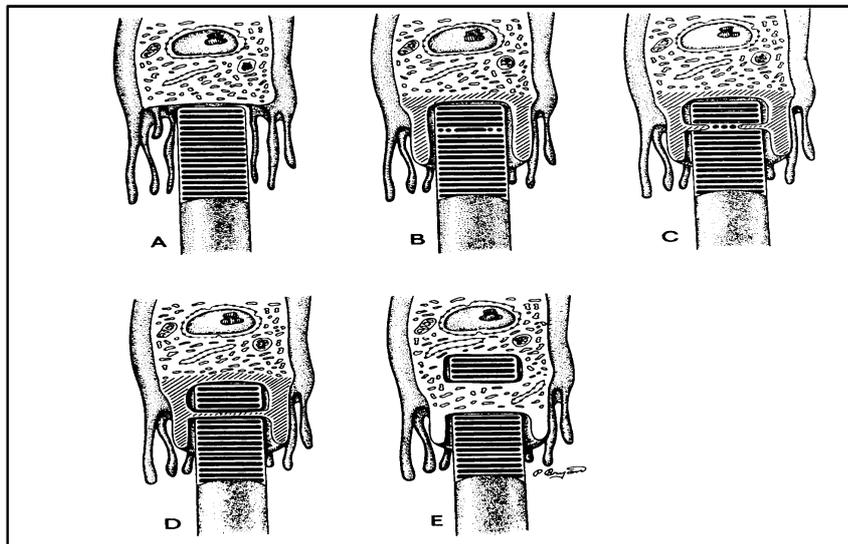


Figure 11 : Mécanisme de renouvellement des segments externe des photorécepteurs

(A) la partie distale des segments externes est entourée par les microvillosités apicales des cellules de l'EPR. (B) (C) après initiation de la phagocytose, les cellules épithéliales (hachuré) clive et sépare le paquet de disques membranaires. (D) la fusion des extrémités conduit à (E) l'individualisation d'un phagosome qui migre dans le cytoplasme de la cellule d'EPR pour fusionner avec des lysosomes (d'après Matsumoto et *al.*, 1987)

Au niveau de l'ora serrata, l'EPR se prolonge au niveau de l'iris, où il constitue sa face postérieure.

Lorsqu'on observe l'EPR en coupe transversale, chaque cellule d'EPR consiste en une partie basale externe non-pigmentée contenant un noyau ovale large et une partie pigmentée antérieure.

## 2. Fonctions

L'EPR joue un rôle essentiel à la fois fonctionnel et métabolique pour la survie des photorécepteurs et de la rétine.

### 2.1. Régénération du photopigment ou cycle visuel

L'EPR intervient dans la régénération du pigment visuel. Son rôle est donc primordial dans le cycle visuel (**Figure 10**). Le tout-trans rétinol est libéré par le transporteur ABCR (*ATP-binding cassette retina*) dans la lumière du disque, réduit par l'enzyme RDH (rétinol déshydrogénase) en tout-trans-rétinol avant d'être externalisé des segments externes et transporté par IRBP (*interphotoreceptor retinoid binding protein*) à l'EPR pour être régénéré. Dans l'EPR, le tout-trans rétinol est pris en charge par une CRBP (*Cellular Retinol Binding Protein*) et il est alors estérifié en tout-trans rétinyl ester par la transférase LRAT (*Lecithin Retinol Acyl Transferase*). Les tout-trans rétinyls esters servent de forme de stockage et peuvent également être synthétisés à partir de la vitamine A. Selon les besoins, les tout-trans rétinyls esters sont hydrolysés en 11-cis rétinol sous l'action de l'enzyme RPE65. Ensuite, le 11-cis rétinol est isomérisé en 11-cis rétinol par les déshydrogénases de rétinol (comme 11-cis-RDH5) ainsi que d'autres oxydoréductases. Enfin, le 11-cis rétinol se lie à une protéine de liaison CRALBP (*cellular retinal binding protein*) puis à IRBP pour être acheminée vers les photorécepteurs où il forme avec l'opsine une nouvelle molécule de rhodopsine (Saari and Bredberg 1982).

### 2.2. Phagocytose/Renouvellement des disques

Les cellules de l'EPR exercent un rôle essentiel dans le maintien de l'intégrité structurale et fonctionnelle de la rétine en phagocytant les segments externes des photorécepteurs. On estime que chaque cellule de l'EPR phagocyte 2000 à 4000 disques membranaires par jour.

Au cours du renouvellement des photorécepteurs (**Figure 11**), la partie distale des segments externes est entourée par les microvillosités apicales des cellules EPR qui clivent et



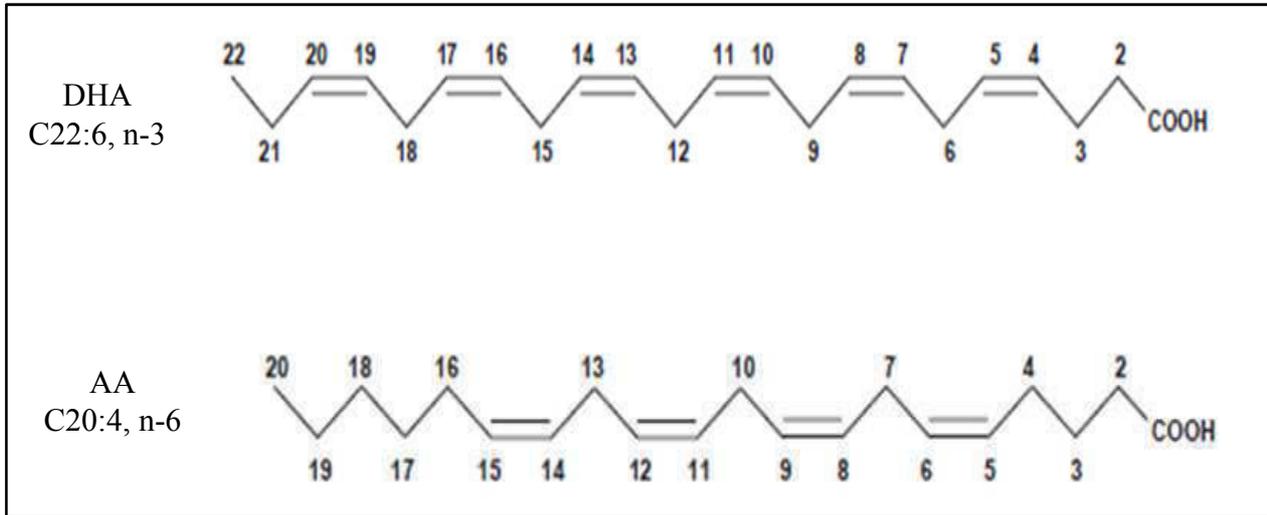
séparent le paquet de disques membranaires. Ensuite, la fusion des invaginations conduit à l'individualisation d'un phagosome. Enfin, le phagosome ainsi formé migre à l'intérieur des cellules de l'EPR et fusionne avec les lysosomes, pour former des phagolysosomes où les disques membranaires phagocytés seront soumis à l'action des enzymes hydrolytiques lysosomiales (Matsumoto, Defoe et al. 1987). Après digestion, certains composants sont réutilisés par l'épithélium ou les photorécepteurs, tandis que les déchets sont excrétés vers la choroïde.

La perte des disques les plus externes (au sommet du photorécepteur) suivie de leur phagocytose et de leur dégradation par l'épithélium pigmentaire est équilibrée par l'assemblage de nouveaux disques à la base du segment externe (Yau and Nakatani 1985). Cet équilibre est bien sûr nécessaire pour le maintien d'une longueur constante des segments externes.

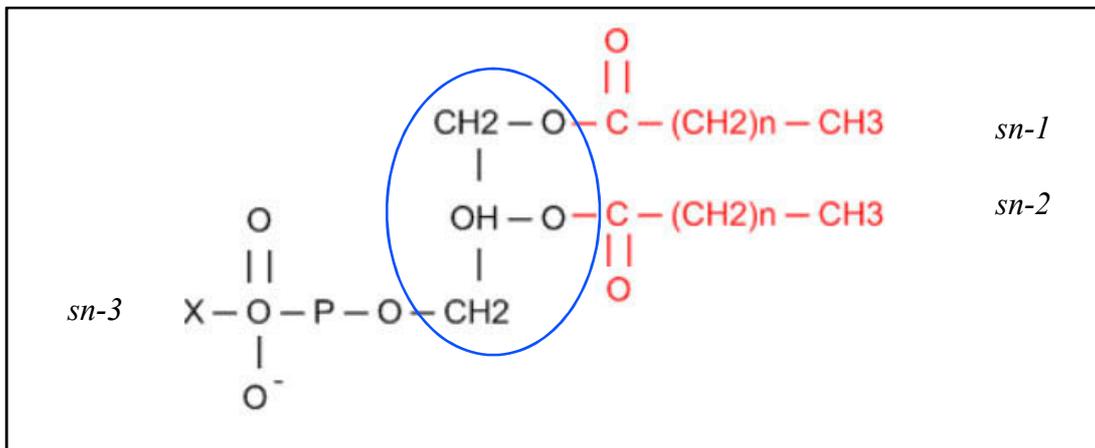
Le renouvellement des disques se produit suivant un cycle circadien (LaVail 1976; Goldman, Teirstein et al. 1980). Dans le bâtonnet, le passage de l'obscurité à la lumière stimule la perte des disques alors que dans le cône la perte se produit lors de la transition lumière/obscurité. Il apparaît donc que l'enchaînement lumière/obscurité est essentiel pour maintenir le métabolisme des photorécepteurs de telle sorte que l'addition de disques à la base des segments externes soit équilibrée avec la perte au sommet (LaVail and Ward 1978; Goldman, Teirstein et al. 1980; Szel and Rohlich 1992). Il faut environ 10 jours pour un renouvellement de la totalité du segment externe (Strauss 2005). La perte des disques et leur renouvellement ne sont pas nécessairement couplés et peuvent être régulés séparément (Schremser and Williams 1995).

### **2.3. Transport des nutriments**

L'EPR se trouvant à l'interface entre la choroïde et la rétine neurale joue un rôle essentiel dans le transport actif ou passif des nutriments de la circulation sanguine au photorécepteur et inversement des déchets des cellules de photorécepteurs vers la circulation sanguine (SanGiovanni and Chew 2005; Kijlstra, Tian et al. 2012).



**Figure 12: Structure chimique de l'acide gras docosahexanoïque (DHA) et l'acide gras arachidonique (AA).** Le nom des acides gras représente le nombre de carbone, le nombre de double liaison suivis par la position de la première double liaison côté groupe méthyle terminal: DHA (22:6 n-3) et AA (20:4 n-6).



**Figure 13: Structure chimique du glycérophospholipide :** Squelette (bleu) de glycerol,  $(\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_n-\text{COOH})$ : molécules d'acide gras qui est une partie hydrophobe, apolaire, insoluble dans l'eau;  $(\text{PO}_4\text{H}_3)$ : acide phosphorique

## C... Particularité de la rétine

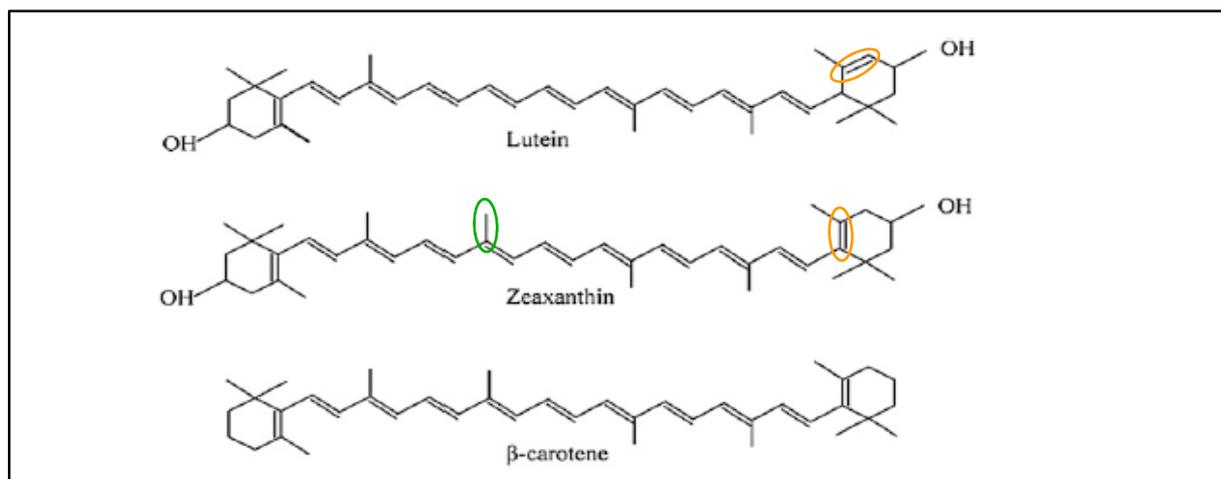
### 1. Lipides

Au niveau de la rétine, l'acide docosahéxanoïque (DHA, C22 :6) (**Figure 12**), un acide gras polyinsaturé (AGPI) appartenant à la famille des oméga-3, est le principal acide gras des lipides membranaires (Fliesler and Anderson 1983). Il est efficacement incorporé au niveau des phospholipides et il est maintenu de manière sélective dans les membranes des disques des photorécepteurs (SanGiovanni and Chew 2005). Le **DHA** représente **30 % des acides gras totaux** de la **rétine** et approximativement 50 à 60 % au niveau des membranes des disques des segments externes des photorécepteurs (Stillwell and Wassall 2003). Le **taux de DHA** dans la rétine est **50 % plus élevé que celui du deuxième tissu le plus concentré en DHA** qui est le cerveau (SanGiovanni and Chew 2005).

La composition des photorécepteurs des segments externes de la rétine est unique puisqu'ils sont constitués de 80 à 90 % de glycérophospholipides et 8 à 10 % de lipides neutres (Daemen 1973; Fliesler and Anderson 1983). Les lipides neutres sont constitués principalement de cholestérol. Les glycérophospholipides sont des molécules polaires, constitués d'un squelette de glycérol sur lequel est greffé en première (*sn-1*) ou en deuxième position (*sn-2*) un acide gras et en troisième position (*sn-3*) un groupe d'acide phosphorique (**Figure 13**). Les glycérophospholipides polyénoïques contiennent des AGPI en *sn-1* ou *sn-2* et dipolyénoïque en *sn-1* et *sn-2*. Les glycérophospholipides de la rétine sont uniques car la plupart sont de nature polyénoïque et la majorité des glycérophospholipides des segments externes sont dipolyénoïque (Choe and Anderson 1990; Wiegand, Koutz et al. 1991). Les glycérophospholipides rétinien incluent les phosphatidylethanolamines (PEA), les phosphatidylsérines (PS), les phosphatidylcholines (PC) qui représentent, respectivement, 40 %, 12%, et 10% des glycérophospholipides totaux des segments externes. Le DHA compose approximativement 20 % des acides gras de PC, et 30 % pour PEA et PS (Fliesler and Anderson 1983).

L'acide arachidonique (AA, 20 :4 n-6) (**Figure 12**), un AGPI de la famille des oméga-6 est trouvé en quantité très élevée au niveau des PC et des PEA (SanGiovanni and Chew 2005).

Les propriétés biophysique et biochimique du DHA affecte la structure et la fonction des photorécepteurs.



**Figure 14 : Structure chimique de la lutéine, la zéaxanthine (caroténoïdes xanthophylles) et du  $\beta$ -carotène.**

La présence du groupe hydroxyle (OH) distingue les xanthophylles (Lutéine et zéaxanthin) des autres caroténoïdes tels que le  $\beta$  carotène. La lutéine et la zéaxanthine diffèrent l'une de l'autre par la position de doubles liaisons dans l'anneau hexenyl (en orange) et par la position du groupement méthyle au niveau de la chaîne carbonée (en vert).

Sur le plan structurel, le DHA joue un rôle important dans le renouvellement des photorécepteurs en tant que constituant des disques des segments externes (Bok and Young 1972). Un déficit en DHA dans les membranes de photorécepteurs pourrait modifier le processus de renouvellement (Young 1967). Le DHA est aussi suggéré comme jouant un rôle dans la différenciation des photorécepteurs (Garelli, Rotstein et al. 2006).

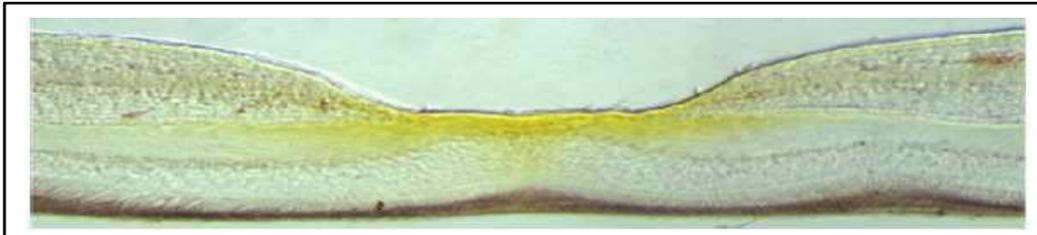
Sur le plan fonctionnel, le DHA joue un rôle au niveau de la phototransduction. Approximativement, 60 molécules de phospholipides entourent la rhodopsine. Le DHA au niveau de ces phospholipides augmente la fluidité membranaire, et facilite ainsi l'activation de la rhodopsine transmembranaire en réponse à un signal lumineux (Litman and Mitchell 1996) et la formation de la métarhodopsine II (Rodriguez de Turco, Deretic et al. 1997). En effet, la structure stéréochimique de DHA avec un nombre élevé en double liaison (6 doubles liaisons) et une longue chaîne carbonée (22 carbones) ne permet pas la condensation des composants hydrophobes des acides gras au niveau de la membrane, contribuant ainsi à une structure membranaire plus fluide et une réponse rapide aux différents stimuli. Récemment, il a été décrit que la fluidité membranaire influence aussi les autres étapes de la phototransduction du complexe métarhodopsine II -Transducine actif (Niu, Mitchell et al. 2001) et l'activation de la phosphodiesterase (PDE) (Mitchell, Niu et al. 2001).

Le DHA joue aussi un rôle dans la régénération de la rhodopsine (le cycle visuel). Une réduction de 80 % des taux de DHA rétiniens chez des rats déficients en oméga- 3 est associée à un taux significativement plus lent de régénération de la rhodopsine de 53 % après un blanchiment de 100% (Bush, Malnoe et al. 1994). En effet, la libération du 11-cis rétinol de la protéine IRBP est facilitée lorsque cette protéine est exposée à une quantité suffisante de DHA dans l'espace sous-rétinien (Chen, Saari et al. 1993; Turner, Zlotkin et al. 2007).

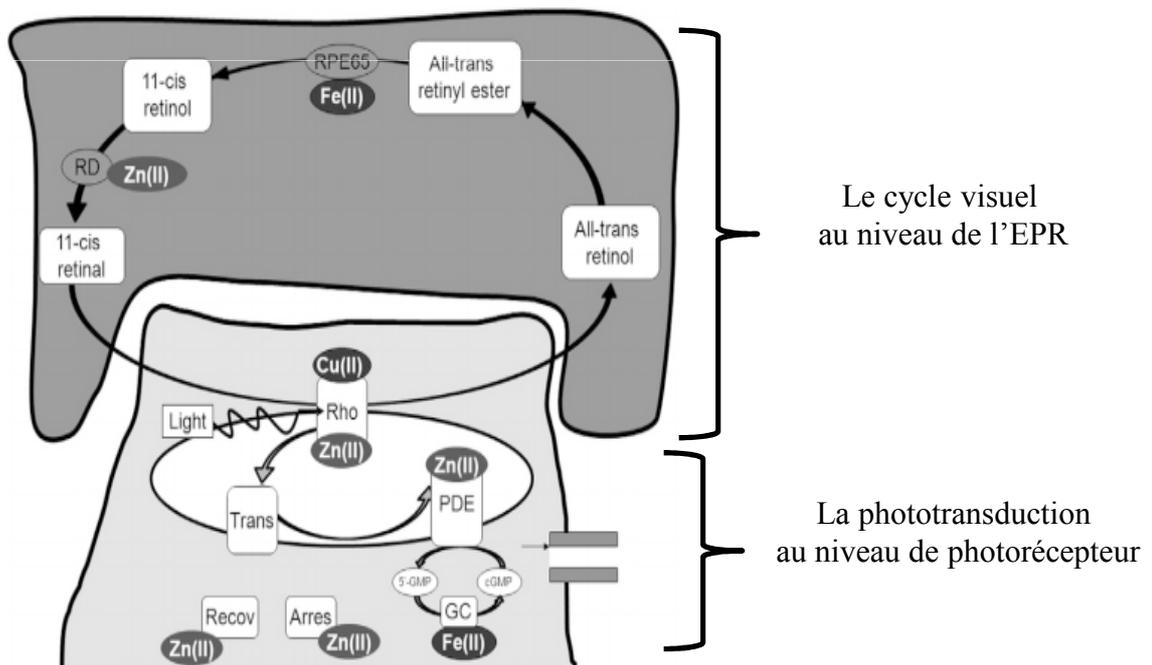
Enfin, les acides gras au niveau des phospholipides sont les premières sources des molécules de signalisation qui modulent la communication intercellulaire et les signaux autocrines à partir des membranes plasmiques. Ce processus influence le contrôle nucléaire d'expression des gènes (Miles and Calder 1998).

## 2. Caroténoïdes

Les caroténoïdes sont des molécules lipidiques qui comportent plus de 600 molécules possédant des propriétés antioxydantes et/ou provitamine A et peut être divisée en deux groupes principaux (**Figure 14**) : 1/ Les caroténoïdes hydrogénés plus souvent appelés carotènes dont le principale représentant est le  $\beta$ -carotène qui peut se convertir efficacement



**Figure 15 : fovéa d'un singe.** Section histologique montrant la distribution des xanthophylles maculaires (lutéine et zéaxanthine) colorés en jaune. (Kijlstra et al., 2012)



**Figure 16: Rôle du zinc et cuivre dans la phototransduction et le cycle visuel.**

en vitamine A et 2/ Les caroténoïdes hydroxylés ou xanthophylles dont la lutéine et la zéaxanthine, qui sont deux isomères du  $\beta$ -carotène mais non précurseurs de la vitamine A.

Au niveau de la **rétine maculaire**, seules la **lutéine et la zéaxanthine** sont présentes à **haute concentration** et sont appelés les **pigments maculaires**. Leur concentration augmente lorsqu'on se rapproche de la dépression fovéale avec un rapport Lutéine/Zéaxanthine augmentant du centre vers la périphérie (**Figure 15**) (van der Veen, Berendschot et al. 2009; Lecerf and Desmettre 2010). Ces deux xanthophylles sont concentrés dans les axones des photorécepteurs liés à la tubuline du cytosquelette dans les segments externes des photorécepteurs et au niveau de l'EPR (Snodderly 1995).

### 3. Oligoéléments

❖ **Zinc** : est l'oligoélément **le plus abondant** au niveau des tissus de **l'œil** et est le deuxième oligoélément le plus abondant dans le corps humain après le fer. Au niveau de la rétine, on le trouve particulièrement au niveau de la couche nucléaire interne, des segments internes des photorécepteurs, des cellules de Müller et de l'EPR (Akagi, Kaneda et al. 2001; Redenti and Chappell 2007; Ugarte and Osborne 2014).

Dans les **segments externes des photorécepteurs**, le **zinc** joue un **rôle** important dans la **phototransduction** à plusieurs niveaux (**Figure 16**) :

1/ il modifie d'une manière dose-dépendante la stabilité et la fonction de la rhodopsine (Ugarte, Osborne et al. 2013) en augmentant sa phosphorylation et par conséquent sa désactivation (Shuster, Martin et al. 1996).

2/ il est nécessaire à la structure et la fonction catalytique de la phosphodiesterase (PDE) (Ugarte, Osborne et al. 2013).

3/ il augmente l'affinité de l'arrestine (Arres) et la recoverine (Recov) pour la rhodopsine après la stimulation lumineuse, et favorise sa désactivation. (Ugarte, Osborne et al. 2013)

Au niveau de l'EPR, le **zinc** joue un **rôle** indispensable dans le **cycle visuel** (**Figure 16**). Le zinc est nécessaire à la fonction de l'enzyme rétinol déshydrogénase (RDH), responsable de la conversion du 11-cis rétinol en 11-cis rétinol. Dans les rétines de rats déficients en zinc, le taux de l'enzyme RDH est diminué et la conversion rétinol-rétinol est réduite (Huber and Gershoff 1975; Yin, Chou et al. 2003).



Ainsi, un déficit en zinc se traduit par une mauvaise adaptation à l'obscurité (Morrison, Russell et al. 1978).

❖ **Cuivre** : est un oligoélément indispensable à l'organisme, souvent associé au zinc (**Figure 16**). Il se trouve en forte concentration au niveau de l'EPR, du segment interne des photorécepteurs mais également dans la couche plexiforme interne et externe.

## 4. Vitamines

❖ **Vitamine E** : Les photorécepteurs et l'EPR sont les tissus oculaires les plus riches en vitamine E (Stephens, Negi et al. 1988). Au niveau des segments externes des photorécepteurs, elle est présente dans un rapport Vit E/phospholipides de l'ordre de 1/1000 (Terrasa, Guajardo et al. 2000). Les rétines de rats déficients en Vitamine E montrent une désorganisation des membranes des segments externes des bâtonnets et une perte des cellules des photorécepteurs (Robison, Kuwabara et al. 1979)

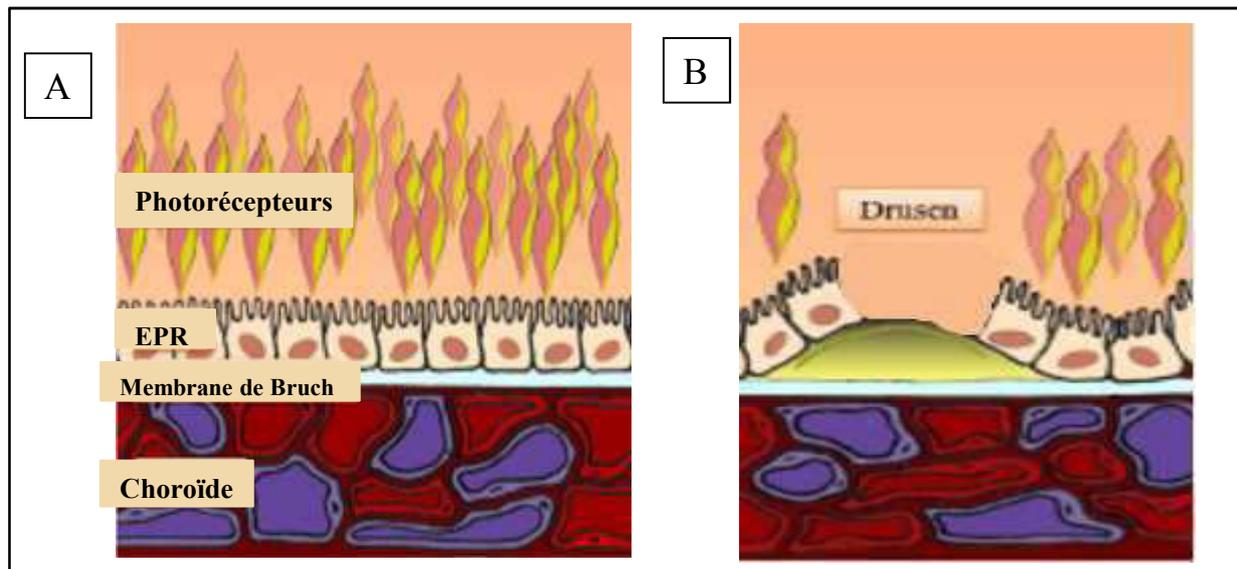
❖ **Vitamine C** : Chez l'homme, la rétine présente une concentration élevée en vitamine C par rapport aux autres organes (Woodford, Tso et al. 1983; Friedman and Zeidel 1999). Récemment, une étude a montré que la vitamine C est essentielle au bon fonctionnement du neurotransmetteur GABA impliqué dans le traitement de l'information visuelle tel que l'augmentation des contrastes (Calero, Vickers et al. 2011).

## II. Dégénérescence maculaire liée à l'âge

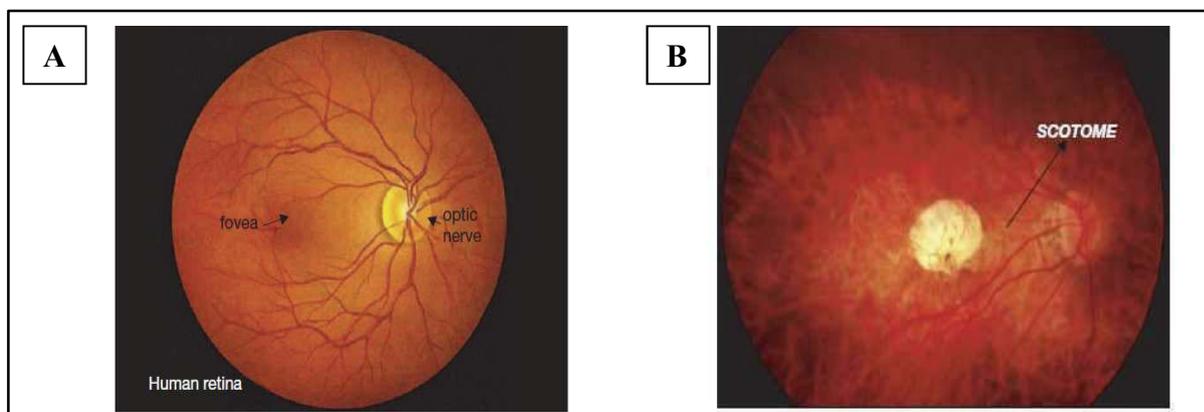
### A. Définition

Selon le rapport de la Société Française d'Ophtalmologie de 1991 (Coscas, 1991), la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) était définie comme correspondant à « des lésions de la rétine maculaire, dégénératives, non inflammatoires, acquises, survenant sur un œil auparavant normal, apparaissant après l'âge de 50 ans, entraînant une altération de la vision centrale ».

Mais les découvertes récentes de l'implication de la génétique et de l'inflammation ont amené à un réajustement de la définition de la DMLA selon laquelle la DMLA est « une affection dégénérative multifactorielle, apparaissant sur un terrain génétiquement pré-déterminé, dont l'expression clinique est fonction de facteurs additionnels et environnementaux, chronique, évolutive et invalidante, qui débute après l'âge de 50 ans ».



**Figure 17 : Illustration schématique de la DMLA atrophique.** (A) Rétine normale (B) DMLA atrophique avec une apparition de drüsen entre l'épithélium pigmentaire rétinien (EPR) et la membrane de Bruch qui conduit à la disparition des cellules de l'EPR et des photorécepteurs (zampatti 2014)



**Figure 18 : Aspects de fond d'œil de présence de drüsen.** (A) Rétine humaine normale (B) Forme atrophique (couasson, 2010).

## **B. Différents stades et formes**

La DMLA représente un ensemble de pathologies qui peuvent être classées selon le stade d'avancement de la maladie et la forme.

### **1. Mculopathie liée à l'âge (MLA)**

La maculopathie liée à l'âge (MLA) est une forme précoce de la DMLA. Elle est caractérisée par :

- L'accumulation des drüsens miliaires (diamètre inférieur à 63 µm) ou séreux (diamètre supérieur à 63 µm) au niveau de la macula. Ces dépôts sont visibles lors de l'examen du fond d'œil mais restent asymptomatiques (Sarks, Van Driel et al. 1980).
- et/ou une altération de la pigmentation de l'EPR à type d'hypopigmentation ou hyperpigmentation. Les hypopigmentations évoluent souvent vers une atrophie plus complète de l'EPR après plusieurs mois ou années, les hyperpigmentations constituent un signe précurseur de néovaisseaux choroïdiens.

La présence d'une MLA à un ou deux yeux constitue un risque de développer une forme dégénérative de la DMLA (Davis, Gangnon et al. 2005; Ferris, Davis et al. 2005).

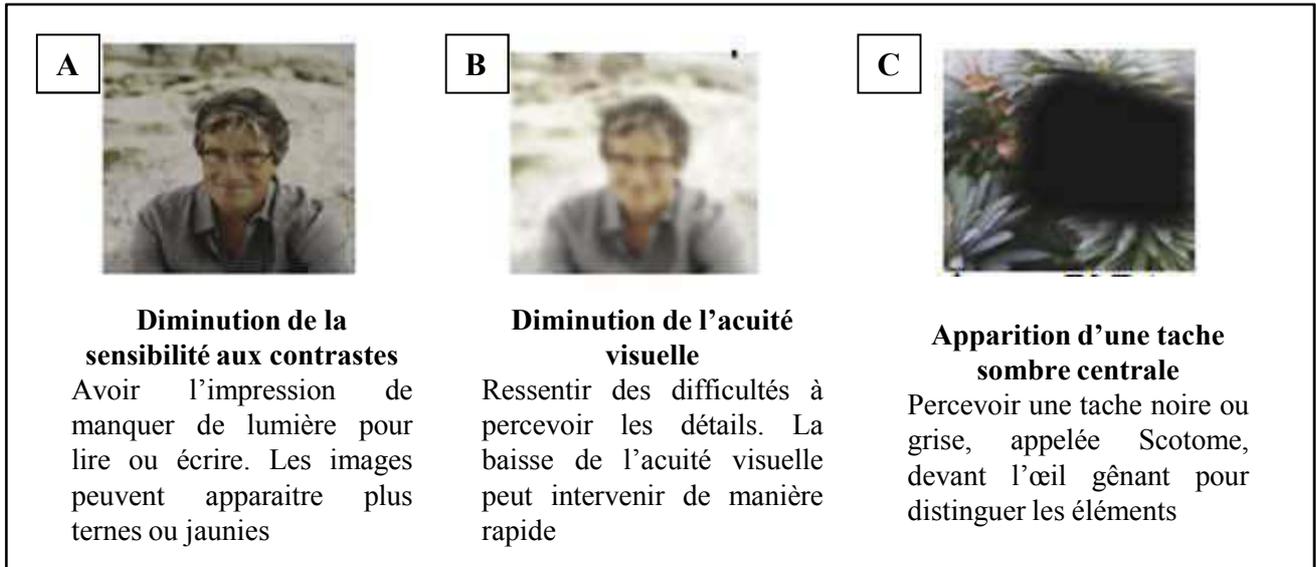
### **2. Dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA)**

Deux formes sont décrites. Alors que la forme atrophique ou sèche de la DMLA a été décrite pour la première fois en 1884-1885 par Nettleship et Haab, et la forme néovasculaire ou exsudative par Pagenstecher et Genth en 1875, ce n'est qu'un siècle plus tard que ces deux formes ont été identifiées comme résultant du même processus pathologique de base (Gass 1973).

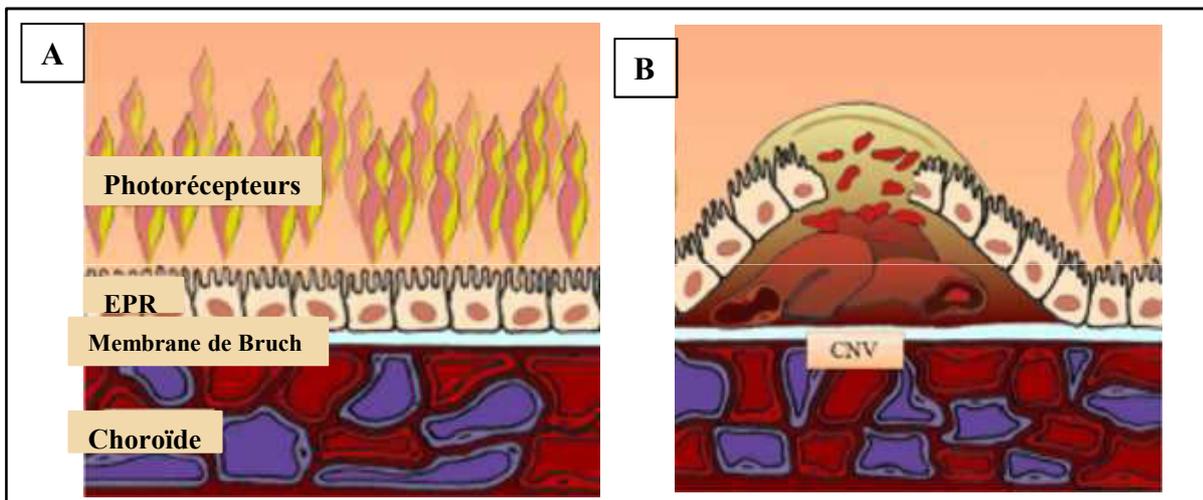
#### **1.1. Dégénérescence maculaire liée à l'âge « sèche » ou atrophique**

##### **α. Caractéristiques**

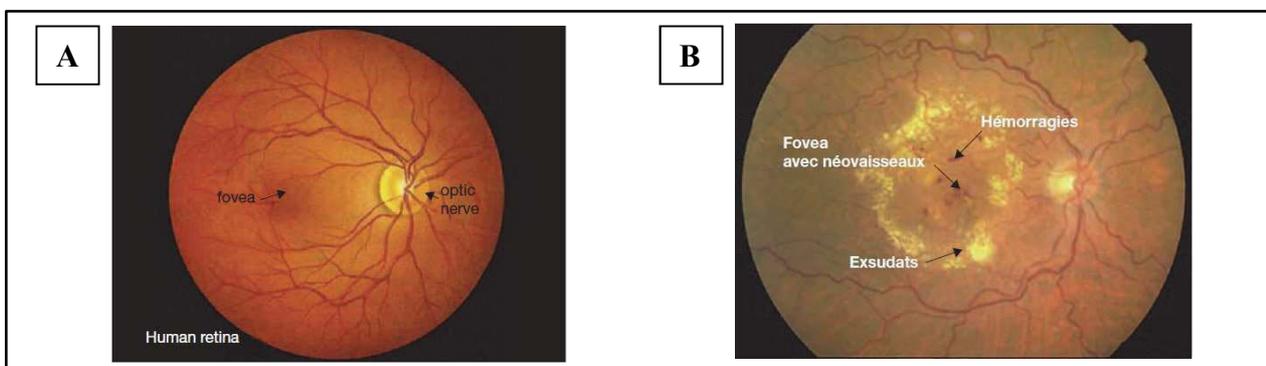
La DMLA sèche se caractérise par une dégénérescence progressive par apoptose (plages d'atrophie) des cellules de l'EPR qui entraîne des altérations secondaires de la choriocapillaire, puis des photorécepteurs (**Figure 17, 18**). Cette forme est habituellement bilatérale et souvent asymétrique. Le processus évolutif est néanmoins lent et progressif. Cette



**Figure 19 : Simulation des symptômes visuels engendrés par une DMLA**



**Figure 20 : Illustration schématique de la DMLA exsudative.** (A) Rétine normale (B) DMLA exsudative se caractérise par la prolifération de néovaisseaux d'origine choroïdienne (CNV) qui traversent la membrane de Bruch et se développent sous l'épithélium pigmentaire (zampatti 2014)



**Figure 21 : Aspects de fond d'œil de présence de drüsen.** (A) Rétine humaine normale (B) Forme atrophique (couasson, 2010).

forme peut s'écouler entre 5 et 10 ans avant que le patient ne perde sa vision centrale (de Jong 2006; Jager, Mieler et al. 2008).

### **β. Signes cliniques**

Les personnes atteintes par cette forme ressentent tout d'abord une baisse des contrastes car les plages d'atrophie se développent autour de la macula. Le principal signe fonctionnel est le besoin d'une lumière forte pour lire (**Figure 19 A**). Puis progressivement les zones d'atrophie s'étendent et envahissent la région centrale, ce qui entraîne une baisse d'acuité visuelle (de 5 à 12%) (**Figure 19 B**). Enfin, lorsque le centre de la macula est atteint, les patients sont habituellement gênés par un scotome (tâche sombre) central (**Figure 19 C**), très handicapant pour la lecture et la vision fine (par exemple, reconnaissance des visages).

La forme sèche de DMLA ne rend pas complètement aveugle. En effet, seule la vision centrale est affectée et la vision périphérique est préservée.

### **γ. Complications**

La forme atrophique peut se compliquer cliniquement d'une néovascularisation choroïdienne avec baisse brutale de l'acuité visuelle (DMLA exsudative ou néovasculaire).

## **1.2. Dégénérescence maculaire liée à l'âge « humide» ou néovasculaire ou exsudative**

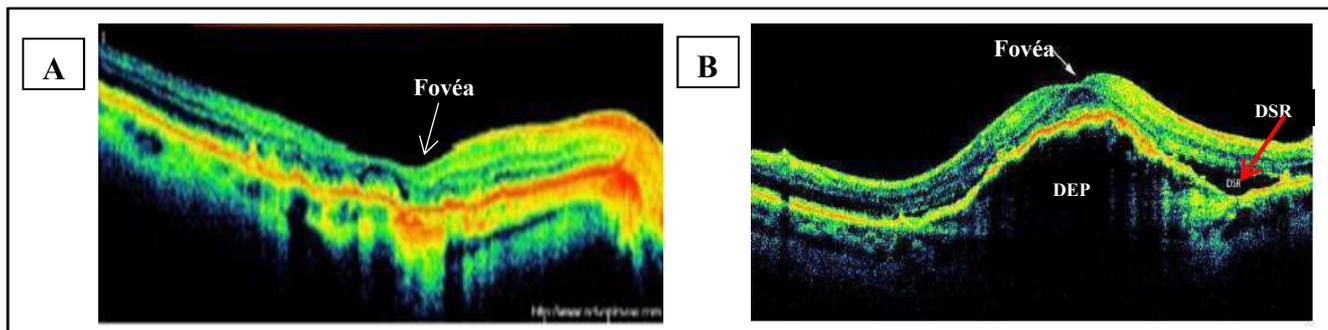
### **α. Caractéristiques**

La forme humide représente un stade plus avancé de la DMLA. Elle est caractérisée par la prolifération de néovaisseaux d'origine choroïdienne. Les vaisseaux traversent la membrane de Bruch et se développent sous l'épithélium pigmentaire (**Figure 20, 21**). En fonction de leur prolifération, on distingue deux cas.

- Les néovaisseaux choroïdiens occultes qui représentent la forme la plus fréquente (60 à 75 % initialement occultes). Ces néovaisseaux se développent sous l'EPR et sont associés à des drüsens séreux (Bressler, Bressler et al. 1988).

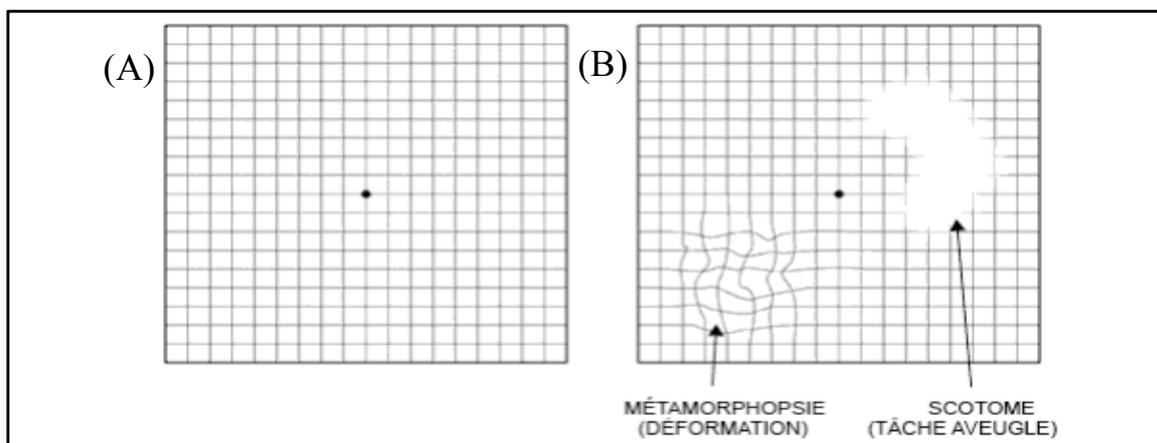
- Les néovaisseaux choroïdiens visibles ou « classic» qui ne constituent qu'une forme particulière ou inhabituelle, en raison de leur faible fréquence (environ 15 %). Mais ces néovaisseaux traversent la membrane de Bruch puis traversent l'EPR et s'étalent sous la rétine neurale (Bressler, Bressler et al. 1988)

Les néovaisseaux immatures sont fragiles et fuient conduisant à des hémorragies sous l'EPR, sous la rétine neurale ou dans la rétine, entraînant des décollements rétiniens (DR), des



**Figure 22 : La tomographie en cohérence optique (OCT) (A) d'un sujet sain et (B) d'un patient atteint de DMLA exsudative avec néovaisseaux occultes.**

**DEP:** décollement de l'épithélium pigmentaire, **DSR:** décollement séreux rétinien.  
L'OCT est une technique d'imagerie non-invasive à haute résolution permettant d'observer les différentes couches rétiniennes



**Figure 23: Grille d'Amsler.** (A) sujet normal ; (B) Sujet atteint de DMLA (Photo Novartis)  
Cette grille est constituée d'un quadrillage comportant un point au milieu servant à fixer le regard. Dans le cas d'une personne atteinte de DMLA, les lignes apparaissent courbées ou ondulées (métamorphopsies) et une partie de la grille est trouble et s'efface (scotome).

**Tableau 1. Classification de la DMLA**

Catégorie/Stade	Signes
<u>Catégorie/stade 1</u> : pas de dégénérescence maculaire liée à l'âge	Aucun ou quelques petits drusen (diamètre inférieur à 63 mm).
<u>Catégorie/stade 2</u> : MLA	Un ou plusieurs des éléments suivants : - multiples petits drusen ; - quelques drusen de diamètre entre 63 et 125 mm ; - anomalies de l'épithélium pigmentaire.
<u>Catégorie/stade 3</u> : DMLA modérée	Un ou plusieurs des éléments suivants : - multiples drusen de diamètre entre 63 et 125 mm et au moins un drusen de diamètre supérieur à 125 mm ; - atrophie géographique excluant la fovéa.
<u>Catégorie/stade 4</u> : DMLA avancée	Atrophie géographique touchant la fovéa et/ou présence d'une DMLA exsudative

décollements de l'épithélium pigmentaire (DEP) (**Figure 22**). Ces anomalies morphologiques aboutissent à une dégénérescence des photorécepteurs et une perte de vision.

### **β. Signes cliniques**

Les patients atteints de DMLA exsudative se plaignent d'une baisse de l'acuité visuelle centrale prédominant dans la vision de près. Cette baisse d'acuité évolue progressivement sur plusieurs semaines et fluctue au cours de la journée ou d'un jour à l'autre. Elle est accompagnée de métamorphopsies et éventuellement de la présence d'un scotome (**Figure 23**) et une altération de la perception des couleurs.

### **γ. Complications**

La forme humide peut évoluer vers la cécité (Buschini, Fea et al. 2015).

## **C...Classification**

Diverses classifications de la DMLA ont été développées (Klein, Davis et al. 1991; Seddon, Sharma et al. 2006). Certaines se sont révélées être utiles pour la recherche et la pratique clinique (Seddon, Sharma et al. 2006). L'Haute Autorité de Santé (HAS) recommande l'utilisation de la classification simplifiée en quatre stades de l'étude Age Related Disease Study (AREDS) pour le diagnostic et le suivi de la DMLA (**Tableau 1**).

## **D...Epidémiologie**

Selon l'Organisation mondiale de la santé (OMS), la DMLA est la quatrième cause mondiale de déficience visuelle et représente 7.1 % des causes de cécité. En 2008, la DMLA se classe derrière la cataracte (responsable de 39.1% des cas de cécité), les défauts de réfraction oculaire non corrigés (responsable de 18.2 % des cas de cécité) et le glaucome (responsable de 10.1% des cas de cécité) et devant la rétinopathie diabétique (responsable de 3.9% des cas de cécité). C'est la première cause de déficience visuelle dans les pays industrialisés après l'âge de 50 ans (Resnikoff, Pascolini et al. 2008).

### **1. Prévalence**

La prévalence est le nombre de cas de maladie dans une population déterminée à une période déterminée.



Durant les 30 dernières années, il y a eu de nombreuses études épidémiologiques de population qui étudiaient la prévalence de la DMLA. Selon, une étude de méta-analyse basée sur une population âgée de 40 ans et plus et issue de 3 continents (Europe, Australie, Amérique), la prévalence de DMLA est de 1.31 % et augmente progressivement avec l'âge : ainsi, elle est d'environ 0,21 % entre 55 et 64 ans, 0,85 % entre 60 et 74 ans, 4.59 % entre 70 et 80 ans, et supérieure à 13.5 % après 85 ans avec un rapport d'environ 2 formes exsudatives pour 1 forme atrophique (Smith, Assink et al. 2001). Des résultats similaires sont aussi observés dans l'étude Eureye qui étudie la prévalence de la DMLA dans une population européenne de 65 ans ou plus, issue de 7 pays différents dont la France (Augood, Vingerling et al. 2006).

En France et en Tunisie, Il y a peu de données sur l'épidémiologie de la DMLA. Selon l'étude POLA, réalisée en 1998, la prévalence globale de la DMLA en France est à 1.87% estimée dans une population de 60 ans et plus et augmente très fortement avec l'âge, atteignant 15 % des patients après 80 ans (Delcourt, Diaz et al. 1998). Comme dans la majorité des études épidémiologiques, il n'y avait pas de différence de prévalence entre hommes et femmes.

En Tunisie, à ma connaissance une seule étude sur une population hospitalière tunisienne âgée de 50 ou plus consultant en ophtalmologie a montré que la prévalence des formes dégénératives de la DMLA est plus élevée que celle de la MLA, avec 9,4 % contre 5,5 %. Contrairement aux autres études, la forme atrophique est la plus fréquente et représente 68.7% de cas. Cette prévalence est plus importante chez les hommes que chez les femmes avec respectivement 21% et 11% (El Matri, Bouraoui et al. 2012).

## **2. Incidence**

L'incidence est le nombre de personnes susceptibles de développer la maladie dans une population donnée pendant une période donnée.

Des différentes études épidémiologiques ont montré que l'incidence de développer une MLA est plus important que celle de développer une DMLA dégénérative (Klein, Klein et al. 2007; Wang, Rochtchina et al. 2007; Arakawa, Yasuda et al. 2011). Toutefois, ils ont également montré que l'âge et les caractéristiques de la MLA (drüsens et pigmentation de l'EPR) sont de forts prédictors de l'évolution de celle-ci vers la DMLA dégénérative (la forme atrophique ou exsudative) (Klein, Klein et al. 2007; Wang, Rochtchina et al. 2007).



En France, l'institut national de la statistique et des études économiques (INSEE) a estimé que le nombre de cas de DMLA va augmenter de 50 % d'ici vingt ans et doubler d'ici trente ans, en atteignant plus d'un million de cas, en raison de la forte augmentation prévue des personnes âgées de plus de 80 ans (INSEE, 2005).

En Tunisie, aucune donnée n'existe sur l'incidence de la DMLA. Néanmoins, compte tenu de l'allongement de l'espérance de vie, qui est passée de 65 ans en 1990 à 75 ans en 2012 (Site internet 1, Statistiques sanitaires OMS, 2014), il est probable que comme dans d'autres pays on observe une augmentation de l'incidence de cette pathologie. acteurs de risque.

## **E...Facteurs de risque**

La DMLA est une maladie multifactorielle, associant des facteurs de risque génétiques et des facteurs de risque environnementaux.

### **1. Age**

Les différentes études épidémiologiques ont uniformément démontré que l'âge est le plus important des facteurs de risque du développement de la DMLA, (Ferris, Fine et al. 1984; Smith, Assink et al. 2001; Augood, Fletcher et al. 2004; Klein, Peto et al. 2004). Les études histopathologiques ont à plusieurs reprises souligné l'importance des modifications liées à l'âge de l'EPR et du complexe membrane de Bruch-choroïde qui sont des structures essentielles à la survie et au maintien des cellules photoréceptrices de la rétine (Sarks 1976; Grindle and Marshall 1978; Bird and Marshall 1986; Ramrattan, van der Schaft et al. 1994).

La diminution des défenses antioxydantes au cours du vieillissement mis en évidence dans les yeux de donneurs âgés (De La Paz, Zhang et al. 1996), participerait au développement et la progression de la DMLA.

### **2. Génétique**

Au moins 20 gènes ont été identifiés comme étant associés à la DMLA (Fritsche, Chen et al. 2013). Ils impliquent différentes fonctions biologiques, dont la régulation du système immunitaire inné, le stress oxydant, la croissance, la perméabilité des vaisseaux sanguins, l'angiogenèse et le métabolisme lipidique (Neale, Fagerness et al. 2010; Yu, Bhangale et al. 2011; Barnett and Handa 2013).



A l'heure actuelle, quatre gènes sont clairement impliqués dans la DMLA : le gène de l'apolipoprotéine E (*ApoE*), Le facteur H du complément (CFH), le gène *LOC387715* et le gène ATP-Binding cassette retina 4 (*ABCA4*).

**Le gène ApoE** (apolipoprotéine E) joue un rôle essentiel dans le métabolisme et le transport des lipides plasmatiques et tissulaires (Nathan, Bellosta et al. 1994). L'ApoE a trois isoformes et sa biosynthèse est contrôlée par un seul locus, avec trois allèles :  $\epsilon 2$ ,  $\epsilon 3$  et  $\epsilon 4$  (Das, McPherson et al. 1985).

L'ApoE est présente dans la rétine, synthétisée au niveau des cellules de Müller (Amaratunga, Abraham et al. 1996). La présence de la protéine ApoE a été mise en évidence au niveau des drüsen sur des coupes histologiques de patients atteints de DMLA (Klaver, Kliffen et al. 1998; Anderson, Ozaki et al. 2001).

Les études épidémiologiques ont conclu qu'un individu porteur de l'allèle  $\epsilon 4$  a moins de risque d'être atteint de drüsen séreux avec une DMLA exsudative qu'un individu non porteur de cet allèle (Klaver, Kliffen et al. 1998; Souied, Benlian et al. 1998; Anderson, Ozaki et al. 2001; Simonelli, Margaglione et al. 2001; Baird, Guida et al. 2004; Bojanowski, Shen et al. 2006; Kaur, Hussain et al. 2006). Alors les individus porteurs des allèles  $\epsilon 2\epsilon 3$  présentent une apparition plus précoce de la maladie, particulièrement pour les formes néovasculaires (Baird, Guida et al. 2004; Zarepari, Reddick et al. 2004).

Plus récemment, un rôle anti-inflammatoire de l'ApoE a été mis en évidence, en particulier l'ApoE4 (Bojanowski, Shen et al. 2006).

**Le facteur H du complément (CFH)** joue un rôle essentiel dans le système du complément. Le complément est un système de défense inné contre l'infection : il recrute les cellules de l'inflammation, lyse et opsonise les pathogènes. Le CFH régule l'activation du complément et assure ainsi une protection des tissus contre une activation inadaptée de ce système. La présence de fractions du complément et du facteur H a été détectée par immunohistochimie post-mortem sur des drüsen de patients atteints de DMLA (Hageman, Anderson et al. 2005).

Des études récentes ont montré qu'un polymorphisme génétique du facteur H du complément est associé à plus de 50 % des DMLA (Hageman, Anderson et al. 2005; Klein, Zeiss et al. 2005; Donoso, Kim et al. 2006). Une mutation du gène du facteur H conduisant à une substitution de la tyrosine par l'histidine au niveau du 402<sup>ème</sup> acide aminé a été retrouvée chez un grand nombre de patients atteints de DMLA (Conley, Thalamuthu et al. 2005;



Hageman, Anderson et al. 2005; Haines, Hauser et al. 2005; Jakobsdottir, Conley et al. 2005; Klein, Zeiss et al. 2005; Souied, Leveziel et al. 2005; Zarepari, Branham et al. 2005; Magnusson, Duan et al. 2006; Schaumberg, Christen et al. 2006; Sepp, Khan et al. 2006). Cette mutation altérerait la fonction du CFH et entraînerait l'activation de la voie alterne du complément au sein des cellules de l'épithélium pigmentaire et de la choroïde. Ceci entraînerait une inflammation chronique responsable de la survenue de la DMLA.

**Le gène ABCA.** Les protéines ABCR sont une famille de protéine transporteur nécessaire au déroulement du cycle visuel. **ABCA4** est un membre de cette famille qui a pour rôle de permettre le transfert rapide, en fin de cascade de transduction, du tout-trans-rétinal libéré de l'opsine depuis le disque du photorécepteur vers le cytoplasme, où il rejoindra l'EPR, siège de son renouvellement. En septembre 1997, Allikmets mettait en évidence des mutations du gène *ABCA4* chez des patients atteints de DMLA de forme atrophique (Allikmets, Shroyer et al. 1997). L'analyse de plusieurs familles dans lesquelles les enfants étaient atteints de maladie de Stargardt et les grands-parents atteints de DMLA a montré que des mutations du gène *ABCA4* peuvent être impliquées à la fois dans la maladie de Stargardt qui est une dégénérescence maculaire juvénile et la DMLA (Shroyer, Lewis et al. 1999; Souied, Ducroq et al. 1999).

**Le gène LOC387715**, également appelé ARMS2 (Age-Related Maculopathy Susceptibility) produit une protéine de 12kDa localisée au niveau de la mitochondrie (Kanda, Chen et al. 2007). Même si la fonction de cette protéine est encore inconnue, une association entre ce gène et la DMLA a été mise en évidence (Jakobsdottir, Conley et al. 2005; Rivera, Fisher et al. 2005).

### **3. Facteurs de risque environnementaux**

#### **3.1. Tabagisme**

Le tabagisme augmente le risque de développer une DMLA. Ainsi, une étude prospective de cohorte a montré que fumer 25 cigarettes ou plus par jour ou être un ancien fumeur augmente le risque d'incidence de DMLA de plus de 2 fois par rapport à une personne qui n'a jamais fumé (Lim, Mitchell et al. 2012) et augmente le risque de progression de la DMLA vers les stades avancés (Cong, Zhou et al. 2008; Lawrenson and Evans 2013).

Selon une revue récente, il existe une relation dose - effet entre le nombre d'années / paquets-années de tabagisme et le risque de développer la DMLA (Velilla, Garcia-Medina et



al. 2013) d'autant plus lorsque les patients sont porteurs du variant Y402H codant pour le gène du facteur H (Schmidt, Hauser et al. 2006; Seddon, George et al. 2006).

Le tabagisme promeut l'ischémie, les micro-infarctions et l'hypoxie (Hammond, Wooten et al. 1996; Buschini, Fea et al. 2015). De plus, certains produits formés dans la fumée de cigarette stimulerait l'angiogenèse (Melkonian, Le et al. 2000).

Le tabagisme augmente le stress oxydant en provoquant la formation des espèces oxygénés réactifs et en diminuant le niveau des antioxydants (Hammond, Wooten et al. 1996; Espinosa-Heidmann, Suner et al. 2006; Seddon, Gensler et al. 2006). En effet, il a été montré qu'une seule cigarette peut provoquer une chute rapide et marquée de la concentration sérique des antioxydants et celle-ci ne retrouvera son niveau initial qu'après soixante minutes (Tsuchiya, Asada et al. 2002). Il a été également suggéré que le tabagisme diminue les taux rétinien d'enzymes antioxydantes et de pigments maculaires (lutéine et zéanxanthine) qui protègent la macula contre les radicaux libres (Beatty, Koh et al. 2000).

### **3.2. Exposition à la lumière**

L'exposition à la lumière bleue apparaît corrélée à la DMLA de forme néovasculaire (Taylor, Munoz et al. 1990). Récemment, le suivi de la cohorte de l'étude de Beaver Dam, a mis en évidence l'association entre le temps passé à l'extérieur pour les loisirs avant l'âge de quarante ans et la survenue de MLA (Cruickshanks, Klein et al. 2001). Bien que la difficulté de quantification de l'exposition lumineuse limite la possibilité de confirmer le rôle de la lumière dans la DMLA (Darzins, Mitchell et al. 1997; Khan, Shahid et al. 2006), l'exposition à la lumière reste un facteur de risque non négligé de la DMLA.

### **3.3. Facteurs nutritionnels**

Bien que les études épidémiologiques observationnelles présentent des résultats parfois contradictoires ou non concluants, elles soulignent l'influence de l'alimentation sur le risque de développer une DMLA ou sur la progression vers des stades avancés.

#### **3.3.1. Vitamines**

❖ **Vitamine C**: Dans une étude à petite échelle, Simonelli et ses collaborateurs ont rapporté que les personnes atteintes de la forme tardive de la DMLA avaient des niveaux de vitamine C inférieurs à ceux des patients atteints de la forme précoce (Simonelli, Zarrilli et al. 2002). L'étude The Eye Diseases Control Study a également signalé que les niveaux



plasmatiques bas en vitamine C étaient liés à un risque élevé de DMLA, mais les concentrations plasmatiques élevées n'étaient pas protecteurs (Seddon, Ajani et al. 1994).

Les données des études épidémiologiques observationnelles sont peu concluantes sur la relation potentielle entre l'apport alimentaire en vitamine C et le risque de développer une DMLA. Alors que l'étude The Eye Diseases Control Study rapporte qu'une consommation élevée en antioxydants et en vitamine C a été associée à un risque plus faible de DMLA, la consommation totale de vitamine C n'a pas été significativement associée à un risque réduit de DMLA (Seddon, Ajani et al. 1994). Ce qui est aussi vrai pour l'étude Beaver Dam Eye (VandenLangenberg et al., 1998) et l'étude Blue Mountains Eye Study (Smith et al., 1999) et d'autres études (West, Vitale et al. 1994; Christen, Ajani et al. 1999; Delcourt, Cristol et al. 1999; Cho, Seddon et al. 2004) dans lesquelles aucun effet bénéfique de la vitamine C statistiquement significatif a été trouvé.

❖ **Vitamine E**: Alors que l'étude cas-témoin « Eye Disease Case-Control Study » menés sur 5 sites aux Etats Unis et sur des personnes âgées entre 55 et 80 ans, n'a pas trouvé de relation significative entre DMLA et vitamine E (Seddon, Ajani et al. 1994), des études réalisées par la suite s'entendent à indiquer que la vitamine E est bénéfique pour les patients atteints de DMLA.

Ainsi, les personnes ayant une consommation faible en vitamine E présentent un risque élevé de développer des drüsens (Beaver Dam Eye Study) (VandenLangenberg, Mares-Perlman et al. 1998) alors que les sujets ayant des concentrations plasmiqes élevées en vitamine E ont un risque réduit de 80 % de survenue d'une DMLA (Etude POLA, (Delcourt, Cristol et al. 1999).

Le taux plasmique de vitamine E apparait donc inversement corrélé à la survenue d'une DMLA (West, Vitale et al. 1994; Mares-Perlman, Brady et al. 1995). La vitamine E pourrait donc être bénéfique pour les patients atteints de DMLA ou présentant un risque de développer une DMLA.

### **3.3.2. Zinc**

Le zinc est un oligoélément qui intervient dans de nombreuses réactions enzymatiques et joue un rôle important dans le métabolisme des protéines, des glucides et des lipides. De plus, le zinc présente des propriétés anti-oxydantes et anti-inflammatoires.



Dans la rétine, il y a une forte concentration en zinc qui diminue avec l'âge d'où le lien fait entre DMLA et zinc. La manifestation oculaire d'une déficience en zinc chez l'homme inclue une mauvaise adaptation au noir.

Alors qu'une étude d'observation prospective n'a pas mis en évidence le lien entre l'apport de zinc sur une longue période de dix ans et la diminution du risque de développer une DMLA (Cho, Stampfer et al. 2001), un faible effet protecteur du zinc contre l'évolution des différents formes précoces de DMLA a été mis en évidence dans l'étude d'observation rétrospective « Beaver Dam Eye Study » (Mares-Perlman, Klein et al. 1996).

Par la suite, il a également été montré que l'effet bénéfique du zinc contre la DMLA peut s'exprimer sur des périodes très longues. En effet, l'analyse des données de l'étude « Beaver Dam Eye Study » réalisée sur 5 ans ne mettait pas en évidence de relation entre l'apport de zinc et le risque de développer la forme précoce de DMLA (Flood, Smith et al. 2002), le suivi sur 10 ans des participants montre que les participants ayant eu un apport en zinc présentent moins de DMLA (Tan, Wang et al. 2008). Ces résultats suggèrent donc un effet protecteur de zinc.

### **3.3.3. Caroténoïdes**

Des études post-mortem des yeux de sujets donneurs ont montré que la quantité de pigment maculaire était plus faible dans les rétines des sujets atteints de DMLA par rapport aux rétines des sujets sains (Bone, Landrum et al. 2001). Le pigment maculaire étant constitué de zéaxanthine et lutéine, des études ont été menées afin d'évaluer la corrélation entre l'apport alimentaire en lutéine et zéaxanthine et la DMLA (Curran-Celentano, Hammond et al. 2001).

La première étude (National Health and Nutrition Examination Survey) publiée en 1988 montre les bénéfices de la consommation des fruits et légumes riche en lutéine et zéaxanthine sur l'apparition DMLA (Goldberg, Flowerdew et al. 1988). Ces résultats ont été confirmés par la suite par d'autres études qui montrent une relation inverse entre apports alimentaires en zéaxanthine et en lutéine et le risque de développer une DMLA (1993; Seddon, Ajani et al. 1994; Mares-Perlman, Fisher et al. 2001; Snellen, Verbeek et al. 2002; Moeller, Parekh et al. 2006; SanGiovanni, Chew et al. 2007). D'après, l'étude Eye Disease Case study Control study group les apports considérés comme protecteurs se situeraient à 6 mg/j (1993).

### **3.3.4. Lipides**

La prévalence de la DMLA est plus faible dans des pays forts consommateurs de poissons qui est une source importante de DHA, tels que le Japon (Maruo, Ikebukuro et al. 1991) et l'Islande (Jonasson and Thordarson 1987; Jonasson, Arnarsson et al. 2003). Cette



observation a suggéré le rôle des AGPI dans l'apparition de la DMLA. Ceci a conduit à des études épidémiologiques prospectives et rétrospectives. De 1994 à 2007, ces études épidémiologiques, reposant sur des questionnaires alimentaires, ont montré une association inverse entre la progression de la DMLA et la consommation de poissons ou d'AGPI à longue chaîne, spécifiquement le DHA. Les apports bénéfiques se situent entre 0,24 à 0,35 g/j, dans la majorité des études, et jusqu' à 1,48 g pour l'étude Blue Mountains Eye study. En ce qui concerne l'acide eicosapentanoïque (EPA), un apport protecteur se situe aux alentours de 0,10 g/j (Chua, Flood et al. 2006) (Seddon, Cote et al. 2003; Chua, Flood et al. 2006; SanGiovanni, Agron et al. 2009).

Une étude (Seddon, George et al. 2006) a montré que le bénéfice lié aux AGPI oméga-3 n'était observé que lorsque l'apport en acide linoléique, précurseur des acides gras oméga-6, est « bas » ( $\leq 11,79$  g/j) ou très bas ( $\leq 5,5$  g/j et  $6,2$  g/j) (Seddon, George et al. 2006). En parallèle, ces études ont mis en évidence une association défavorable entre la DMLA et l'apport en AGPI oméga-6 totaux, en acide arachidonique (Seddon, Cote et al. 2003; Seddon, George et al. 2006) et en acide alpha linoléique (Cho, Stampfer et al. 2001), en lipides totaux (Cho, Stampfer et al. 2001; Seddon, Cote et al. 2003), en acides gras saturés (Mares-Perlman, Brady et al. 1995), en acides gras mono-insaturés (AGMI) (Smith, Mitchell et al. 1999; Seddon, Cote et al. 2003) ou en acides gras trans (Seddon, Cote et al. 2003).

### **III. Physiopathogenèse de la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA)**

#### **A. Stress oxydant**

##### **1. Définition**

Le stress oxydant se définit comme le résultat d'un déséquilibre entre la production de composés pro-oxydants (Espèces réactives de l'oxygène ou de l'azote) et leur élimination par les systèmes de défense antioxydants. Ce déséquilibre peut être dû à une surproduction d'espèces réactives de l'oxygène (EROs) ou de l'azote (ERAs) et/ou la baisse des défenses anti-oxydantes (enzymatique ou non enzymatique) (Sies 1991). Le stress oxydant se manifeste par les altérations structurales et fonctionnelles dues à l'attaque radicalaire des lipides, des protéines et des acides nucléiques.

**Tableau 2. Espèces réactives de l'oxygène (d'après Migdal 2011)**

Espèces Réactives de l'Oxygène		Réaction
Anion superoxyde	$O_2^{\cdot-}$	$O_2 + e^- \longrightarrow O_2^{\cdot-}$
Peroxyde d'hydrogène	$H_2O_2$	$O_2^{\cdot-} + e^- + 2H^+ \longrightarrow H_2O_2$
Radical hydroxyle	$HO\cdot$	$H_2O_2 + Fe^{2+} \longrightarrow HO\cdot + HO^- + Fe^{3+}$ (1) $H_2O_2 + O_2^{\cdot-} \longrightarrow O_2 + HO\cdot + HO^-$ (2) $H_2O_2 + H_2O_2 \longrightarrow 2 H_2O + O_2$ $H_2O_2 + 2 GSH \longrightarrow 2 H_2O + GSSG$

La réaction (1) correspond à la réaction de Fenton, et (2) à la réaction d'Haber Weiss.  
 $O_2$ : oxygène;  $e^-$ : électron;  $H^+$ : ion hydrogène;  $Fe^{2+}$ : ions ferreux;  $Fe^{3+}$ : ions ferriques;  
 GSH: glutathion réduit; GSSG: Glutathion oxydé;

## 2. Espèces réactives

Les espèces réactives se divisent en deux familles : les espèces réactives de l'oxygène (EROs) et les espèces réactives de l'azote (ERNs).

### 2.1. Espèces réactives de l'oxygène

La réduction de l'oxygène en eau nécessite l'apport de 4 électrons qui peuvent s'additionner un par un, successivement sur  $O_2$ , en conduisant aux intermédiaires respectifs, l'anion superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ), le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), le radical hydroxyl ( $\cdot OH$ ) et l'oxygène singulet ( $^1O_2$ ). Ces intermédiaires sont appelés espèces réactives de l'oxygène (EROs) car ils ont une réactivité beaucoup plus importante que l'oxygène qui leur a donné naissance. La réduction de l'oxygène par la NADPH oxydase ou la chaîne de respiration mitochondriale conduit à la production de  $O_2^{\cdot-}$  qui peut se convertir en  $H_2O_2$  et  $^1O_2$  (**Tableau 2**). L' $H_2O_2$  est une molécule de signalisation intra- et intercellulaire (Rahal, Kumar et al. 2014). En présence de quelques métaux, comme le fer ferreux ( $Fe^{2+}$ ),  $H_2O_2$  peut facilement subir une décomposition par les réactions de Fenton et Haber-Weiss en  $\cdot OH$  qui est parmi les molécules les plus toxiques (**Tableau 2**) (Nowak 2013).

### 2.2. Espèces réactives de l'azote

Les espèces réactives de l'azote existent sous plusieurs formes : le monoxyde d'azote ( $\cdot NO$ ) et l'anion peroxydinitrite ( $ONOO^{\cdot-}$ ). Le  $\cdot NO$  est une molécule de signalisation cellulaire importante produite à partir de l'arginine et l'oxygène par l'action de la nitric oxide synthase (NOS). Toutefois en réponse à des agents pro-inflammatoires, le  $\cdot NO$  est produit en grandes quantités suite à l'induction d'une isoforme de l'enzyme, la nitric oxide synthase inductible (iNOS). Le  $\cdot NO$  devient alors cytotoxique.  $\cdot NO$  peut également réagir avec l'anion superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ) et produire  $ONOO^{\cdot-}$  qui a un potentiel oxydant supérieur à  $\cdot NO$ .

## 3. Défenses anti-oxydantes

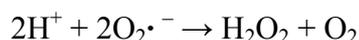
Pour contrebalancer la production d'espèces oxydantes, la rétine possède des systèmes de défense. La défense anti-oxydante de la rétine repose sur deux systèmes distincts : le système enzymatique et le système non enzymatique.



### 3.1. Système enzymatique

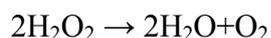
Le système enzymatique est constitué de trois types d'enzymes :

Les *superoxydes dismutases* (SOD), en premier ligne de la défense anti-oxydante ; ce sont des métalloprotéines qui catalysent la dismutation des  $O_2^{\bullet -}$  en  $H_2O_2$  et  $O_2$ , selon la réaction :



Deux types de SOD ont été mis en évidence, une SOD à manganèse dans les mitochondries et une SOD à cuivre et zinc dans le cytosol. Dans la rétine, la SOD est localisée au niveau de l'EPR et des segments internes des photorécepteurs (Couasnon 2010).

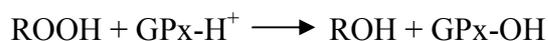
La *catalase* est une hémoprotéine localisée dans les peroxysomes et se trouve dans les segments internes des photorécepteurs et dans l'EPR. Elle catalyse la réaction suivante :



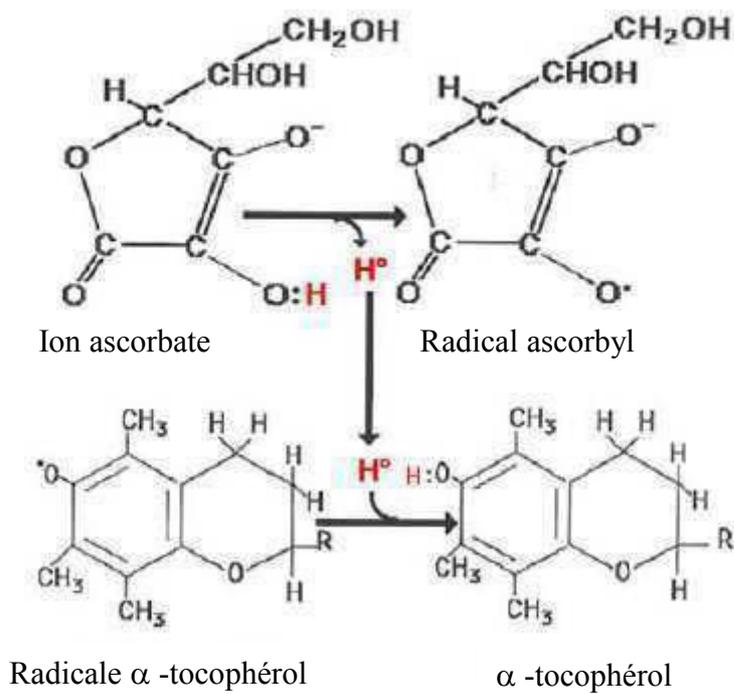
Cette enzyme est une des enzymes anti-oxydantes les plus efficaces. Elle n'est saturable par aucune concentration d' $H_2O_2$  (Lledias, Rangel et al. 1998). Elle possède un turnover plus élevé que les autres enzymes : une molécule de catalase peut convertir 6 millions de molécules de  $H_2O_2$  par minute (Valko, Rhodes et al. 2006).

Les *enzymes du métabolisme glutathion (la glutathion réductase et peroxydase)*

La glutathion peroxydase (**GPx**) est une enzyme clef. Elle nécessite la présence de glutathion réduit (**GSH**) comme donneur d'électron. La GPx catalyse la détoxification d'hydroperoxydes en présence de GSH pour former le disulfure de glutathion (**GSSG**) et le produit de réduction de l'hydroperoxyde :



La GPx est en compétition avec la catalase car elles utilisent le même substrat,  $H_2O_2$ . La GPx est active pour des faibles concentrations d'EROs (Valko, Rhodes et al. 2006).



**Figure 24: La régénération de l'α-Tocophérol (Vitamine E) par l'acide ascorbique (Vitamine C)**

**Tableau 3. Exemple d'aliments riches en vitamine C et teneur pour 100g d'aliment**

Aliments	mg
Poivron	100
Kiwi	80
Fraise	60
Agrume	40-50
Jus d'orange	30-50

**Tableau 4. Exemple d'aliments riches en vitamine E et teneur pour 100g d'aliment**

Aliments	mg
Huiles végétales	30-100
Margarine	10-80
Germes de blé	22

## 3.2. Systèmes non enzymatiques d'origine alimentaire

Dans le système non enzymatique, trois groupes de molécules interviennent : la vitamine C, les oligoéléments, les caroténoïdes

### 3.2.1. Vitamines

❖ **Vitamine C** : Des expérimentations animales ont montré qu'au niveau de la rétine la vitamine C est un puissant anti-oxydant et protège contre la perte de DHA induite par le stress oxydant (Organisciak, Wang et al. 1985) réduisant ainsi les dommages oxydatifs (Sparrow, Vollmer-Snarr et al. 2003).

La vitamine C protège les membranes contre la peroxydation lipidique en régénérant la vitamine E (alpha tocophérol) (**Figure 24**). En effet, en l'absence de la vitamine C, la vitamine E peut, elle-même, devenir un pro-oxydant (Stoyanovsky, Goldman et al. 1995).

La vitamine C n'est pas produite par l'organisme et doit être apportée par l'alimentation (**Tableau 3**).

❖ **Vitamine E** : est un antioxydant important pour le corps humain, elle joue un rôle protecteur crucial des membranes cellulaires. La vitamine E peut transférer son hydrogène phénolique à un radical libre peroxyde d'un acide gras polyinsaturé (AGPI) peroxydé. Elle rompt ainsi la réaction en chaîne radicalaire et prévient la peroxydation des AGPI dans la membrane cellulaire. Au cours de la peroxydation lipidique, les phospholipides de type phosphatidyletanolamine et phosphatidylserine (PS) contenant les taux les plus élevés en DHA sont les plus affectés par ce phénomène. La vitamine E, sous sa forme  $\alpha$ -tocophérol, protégerait les segments externes des photorécepteurs de la peroxydation lipidique d'une manière sélective en protégeant particulièrement les PS (Terrasa, Guajardo et al. 2000).

Ainsi, les niveaux de vitamine E dans la rétine sont augmentés en réponse à un stress oxydatif (Wiegand, Joel et al. 1986). Chez le rat, une déficience alimentaire en vitamine E conduit à une augmentation de l'accumulation de la lipofuscine dans l'EPR (Katz, Stone et al. 1978; Katz, Parker et al. 1982) et de la perte des photorécepteurs (Katz and Eldred 1989).

La vitamine E n'est pas synthétisée par l'organisme et doit être apportée par l'alimentation. Les aliments qui sont riches en vitamine E sont présentés dans le **tableau 4**.

### 3.2.2. Oligoéléments

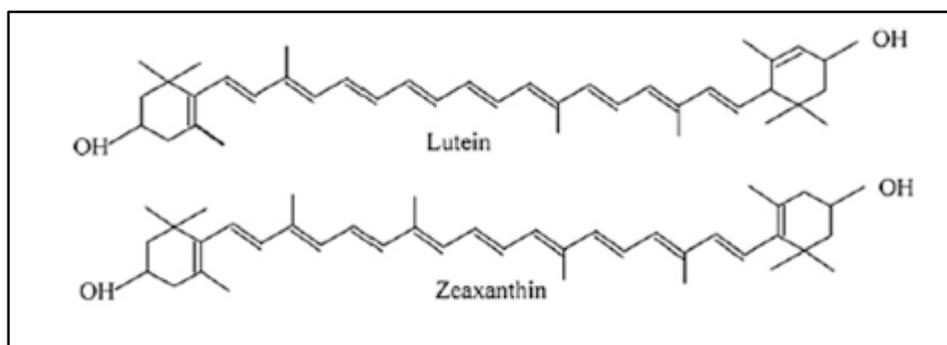
❖ **Zinc** : agit comme un cofacteur pour les enzymes anti-oxydantes comme la (Cu, Zn) SOD (Wills, Ramanujam et al. 2008).

**Tableau 5. Exemple d'aliments riches en zinc et teneur pour 100 g d'aliment**

Aliment	mg
Huitres-coquillages	20-30
Pain complet	5
Foie	4
Viande	4
Jaune d'œuf	4
Légumes secs	2-5

**Tableau 6. Exemple d'aliments riches en cuivre et teneur pour 100g d'aliment**

Aliment	mg
Foie	14,6
Huîtres	4,45
Chocolat noir	3,2
Pommes de Terre	0,8
Noix	0,5
Raisins	0,3
Lentilles	0,25



**Figure 25 : Structure chimique des xanthophylles lutéine et zéaxanthine.**

**Tableau 7. Exemple d'aliments riches en lutéine et zéaxanthine, teneur pour 100g d'aliment**

Aliments riches en $\beta$ -carotène	ug
<b>Lutéine</b>	
Epinard	11938
Laitue	2 635
Brocolis	2 445
<b>Zéaxanthine</b>	
Maïs doux	1800

❖ **Cuivre** : est un piègeur de radicaux libres du fait de sa capacité à accepter et à donner facilement des électrons (Schreier 2005). De plus, il agit comme un co-facteur de l'enzyme anti-oxydante (Cu, Zn SOD) (Wills, Ramanujam et al. 2008).

Le zinc et le cuivre ne sont pas synthétisés par l'organisme et doivent être apportés par l'alimentation. Les **tableaux 5 et 6** présentent les aliments riches en zinc et cuivre.

### 3.2.3. Caroténoïdes

L'activité anti-oxydante de la lutéine et de la zéaxanthine et le rôle protecteur vis-à-vis du stress oxydatif qui en découle, ont été surtout étudiés à partir des années 1990 (Snodderly 1995; Snellen, Verbeek et al. 2002; Gale, Hall et al. 2003). Le rôle antioxydant propre et direct du pigment maculaire s'explique par la structure même de ces deux molécules (**Figure 25**). Ces molécules polyinsaturées et liposolubles sont de très efficaces capteurs d'oxygène singulet, (Woodall, Lee et al. 1997). En plus, la présence des groupements hydroxyles sur les cycles hydrophobes aux extrémités de ces xanthophylles leur permette une meilleure orientation spatiale au niveau de la membrane lipidique et ainsi une meilleure protection contre les espèces réactives oxygénées (Subczynski, Wisniewska et al. 2010).

La lutéine inhibe la peroxydation des phospholipides membranaires des segments externes des photorécepteurs (Sundelin and Nilsson 2001) et bloque l'apoptose des cellules photoréceptrices en présence de paraquat ou de peroxyde d'hydrogène (Chucair, Rotstein et al. 2007).

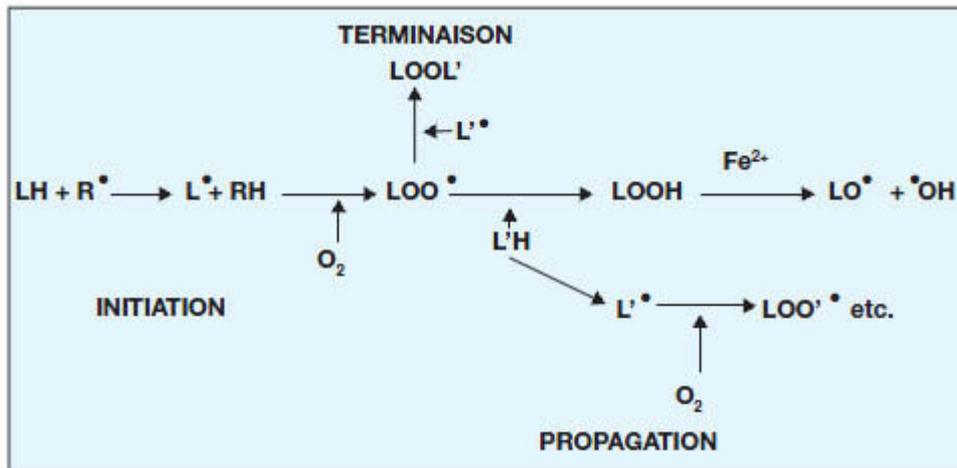
L'origine des xanthophylles est exclusivement alimentaire puisqu'ils ne sont pas synthétisés par l'organisme (**Tableau 7**).

## 4. Conséquences du stress oxydant

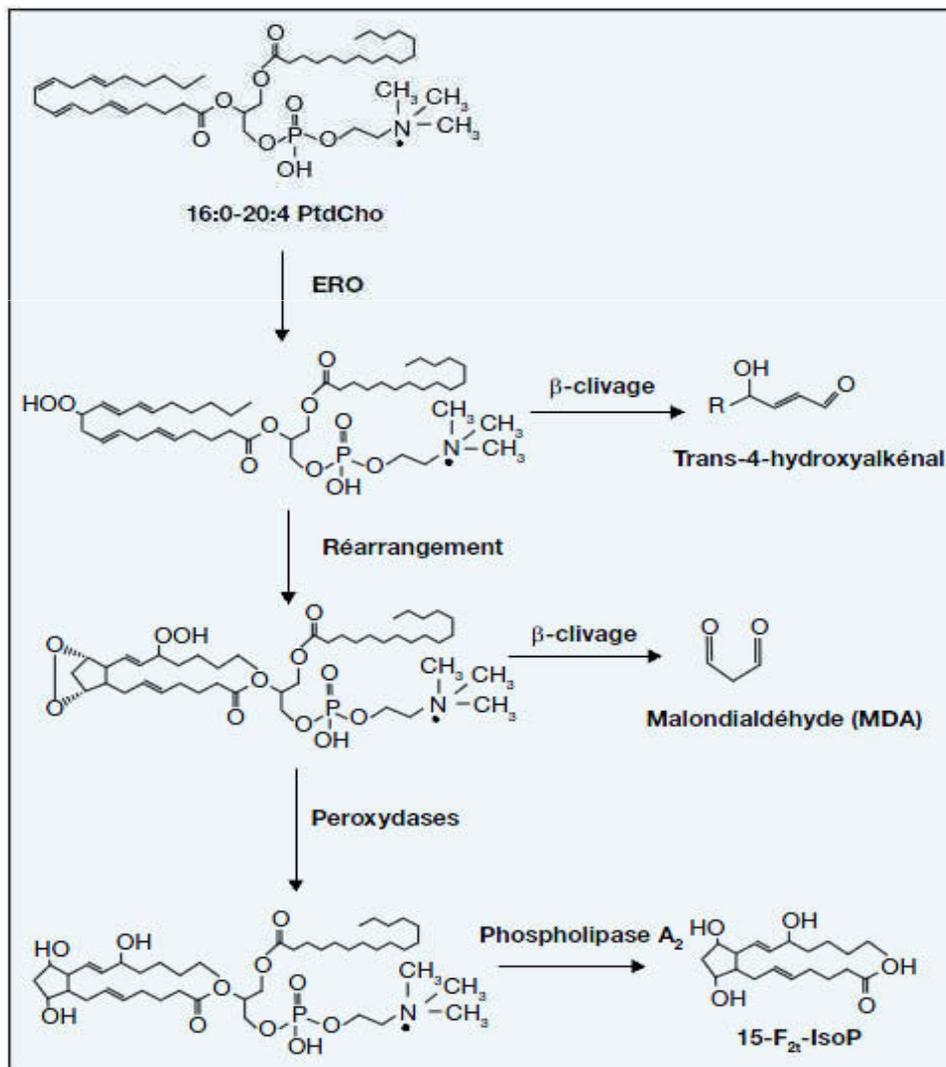
Le stress oxydant se manifeste par des altérations structurales et fonctionnelles dues à l'attaque des lipides, des protéines et des acides nucléiques par les EROs.

### 4.1. Peroxydation lipidique

L'oxydation des lipides polyinsaturés (LH) au niveau de la membrane plasmique, en présence d'oxygène, est un processus de réactions en chaîne, connue sous le nom de peroxydation lipidique, qui se décompose en trois étapes : initiation, propagation et terminaison (**Figure 26**).



**Figure 26 . Réaction de peroxydation lipidique.** R• : radical initiateur (ERO); LH : acide gras polyinsaturé; L• : radical lipidique; LOO• : radical peroxy; LOOH : hydroperoxyde; LO• : radical alkoxy; •OH : radical hydroxyle; O<sub>2</sub> : oxygène; LOOL : produit stable



**Figure 27 : Illustration schématique de formation des produits « primaires » et « secondaires » de la peroxydation lipidique à partir d'une espèce moléculaire de la phosphatidylcholine comportant en *sn-2* un acide arachidonique (d'après Zwart et al.).**

**L'étape d'initiation** consiste à l'abstraction d'un atome d'hydrogène (H) situé sur un carbone placé entre deux doubles liaisons initiée par les radicaux libres (OH, HOO•, LO• et LOO•) conduisant à la formation d'un radical alkyle.

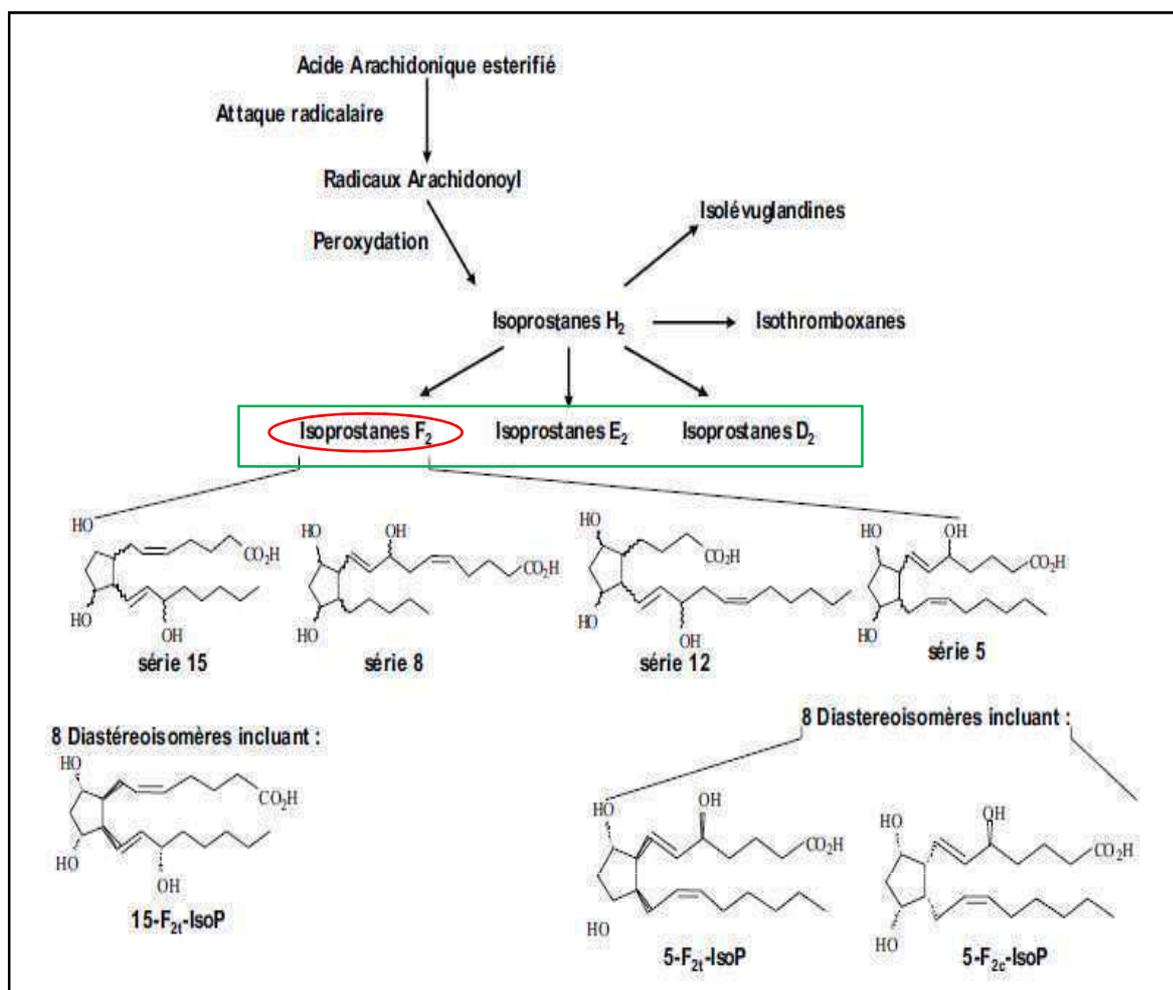
**L'étape de propagation** : Le radical alkyle formé réagit très rapidement avec  $^1\text{O}_2$  pour donner un radical peroxy (LOO•). Ce dernier peut à son tour arracher un hydrogène d'une autre molécule d'acide gras adjacente (L'H) conduisant à la formation d'un hydroperoxyde lipidique (LOOH) et un nouveau radical alkyle, créant ainsi une réaction en chaîne (propagation). Sous l'action des métaux ( $\text{Fe}^{2+}$  ou  $\text{Cu}^+$ ), LOOH formera des radicaux alkoxy (LO•) et hydroxyles (HO•). Il a été calculé que lorsqu'un radical initie la peroxydation, environ 25 molécules d'acides gras sont oxydées dans la phase de propagation et de nombreux isomères d'hydroperoxydes sont formés à cette étape (Barclay 1981). Il est à noter que l'oxydabilité des acides gras augmente avec le nombre de doubles liaisons, l'acide linoléique donne 2 isomères et l'AA donne 6 isomères. Le radical peroxy peut aussi conduire à des peroxydes cycliques.

Enfin, **L'étape de terminaison** consiste à la dimérisation entre deux radicaux peroxy conduisant à la formation de composés stables (LOOL) et de l'oxygène ou la production d'aldéhydes, parmi lesquels on peut citer le dialdéhyde malonique (ou malondialdéhyde ou MDA), le 4-hydroxynonéal (4-HNE), ou les isoprostanes (**Figure 27**).

Les isoprostanes sont des produits spécifiques stables de peroxydation lipidique des AA. Ils sont quantifiables à l'état basal dans le plasma, les urines ou les autres liquides et tissus biologiques. Leur quantification représente actuellement une méthode sensible et spécifique pour évaluer la peroxydation lipidique *in-vivo*. La famille des isoprostanes comprend 64 isoprostanesF2 différents, dont les plus connus 15-F<sub>2t</sub>-IsoP, 5-F<sub>2t</sub>-IsoP et 5-F<sub>2c</sub>-IsoP (**Figure 28**).

Les composés produits par action des radicaux libres sur le DHA sont les neuroprostanes (NeuroPs). Il a été montré que l'oxydation de l'EPA ou de l'acide  $\alpha$ -linoléique conduit respectivement aux F3-isoPs (Nourooz-Zadeh, Halliwell et al. 1997) et Phytprostanes (PPs) (Mueller 1998).

La peroxydation des lipides conduit à des altérations membranaires caractérisées par une diminution de leur fluidité, une inactivation des enzymes membranaires, une oxydation des groupements thiols, une augmentation de la perméabilité membranaire, un gonflement des mitochondries avec inhibition de la chaîne respiratoire et la perte du cytochrome C.



**Figure 28 : Biosynthèse des isoprostanes.** L'attaque radicalaire de l'acide arachidonique conduit à la formation de **trois radicaux arachidonoyl isomères**. Après peroxydation, le radical arachidonoyl **Isoprostanes F<sub>2</sub>** conduit à la formation de quatre régio-isomères isoprostanes F<sub>2</sub> (séries 15, 8, 12 et 5). Chaque régio-isomère comprend huit diastéro-isomères dont les plus connus sont la 15 F<sub>2t</sub>-IsoP, la 5 F<sub>2t</sub>-IsoP et la 5 F<sub>2c</sub>-IsoP (J.-L. Cracowski 2004).

## **4.2. Oxydation des protéines**

Tous les résidus d'acides aminés de protéines sont des cibles potentielles d'oxydation par  $H_2O_2$  ou par  $HO\cdot$  en présence d'ions métalliques. Par exemple, les résidus de tyrosine peuvent être convertis en un dérivé de 3,4 - dihydroxyphenylalanine, qui lui-même peut subir un cycle redox pour générer davantage d'EROs (Sugiura and Ichinose 2011). L'oxydation directe de la plupart des résidus d'acides aminés conduit à l'addition irréversible de groupes carbonyle qui résulte de l'oxydation des résidus d'acides aminés. L'oxydation protéique conduit à une altération plus au moins rapide de la fonction des protéines ce qui aboutit à des dysfonctionnements cellulaires et tissulaires (Negre-Salvayre, Coatrieux et al. 2008).

## **4.3. Oxydation de l'ADN**

Il est bien établi que les EROs peuvent induire un large spectre de modifications de l'ADN nucléaire (ADNn) et mitochondrial (ADNmt). L'oxydation des bases puriques et pyrimidiques conduit à des cassures simples et double-brin fortement impliquées dans le vieillissement et les maladies liées à l'âge (Bohr, Anson et al. 1998; Bohr, Ottersen et al. 2007). L'ERO le plus endommageant pour l'ADN est  $OH\cdot$ . La lésion de l'ADN la plus étudiée est la formation de la 8-hydroxy-2'-désoxyguanosine (8-OHdG), qui est un biomarqueur fiable du stress oxydatif associé au vieillissement et donc aux maladies liées au vieillissement (Bohr, Ottersen et al. 2007). L'ADNmt est plus vulnérable aux dommages oxydatifs que l'ADNn (Ames and Shigenaga 1992; Yang, Weissman et al. 2008). Ceci pourrait être dû à l'emplacement de l'ADNmt à proximité de la chaîne de transport d'électrons qui laisse fuir les EROs et à la présence d'ions métalliques dans la membrane mitochondriale interne qui génèrent le  $OH\cdot$  (Wallace 2009; Wallace 2010). De plus, les mécanismes de réparation de l'ADNmt des dommages oxydatifs tendent à être moins efficaces que ceux de l'ADNn (Yakes and Van Houten 1997). Enfin, les produits de peroxydation lipidique (MDA, 4-HNE) réagissent avec l'ADN pour former divers types d'adduits.

## **5. Implication du stress oxydant dans la DMLA**

Des études cliniques récentes ont montré que les marqueurs du stress oxydatif, tels que le malondialdéhyde (MDA), les protéines carbonylées et la 8-OHdG, sont significativement plus élevés chez des personnes atteintes de DMLA que des personnes saines (Totan, Yagci et al. 2009; Venza, Visalli et al. 2012). En outre, l'augmentation du stress oxydant et la



diminution des capacités anti-oxydantes mesurées au niveau sérique sont plus marquées chez les personnes atteintes de DMLA que des personnes saines (Venza, Visalli et al. 2012).

De plus, dans les yeux post-mortem de sujets atteints de DMLA, il a été mis en évidence la présence des produits d'oxydation des lipides (HNE), d'ADN (8-OHdG) et des protéines au niveau des drüsens et au niveau de la rétine (Crabb, Miyagi et al. 2002; Shen, Dong et al. 2007)

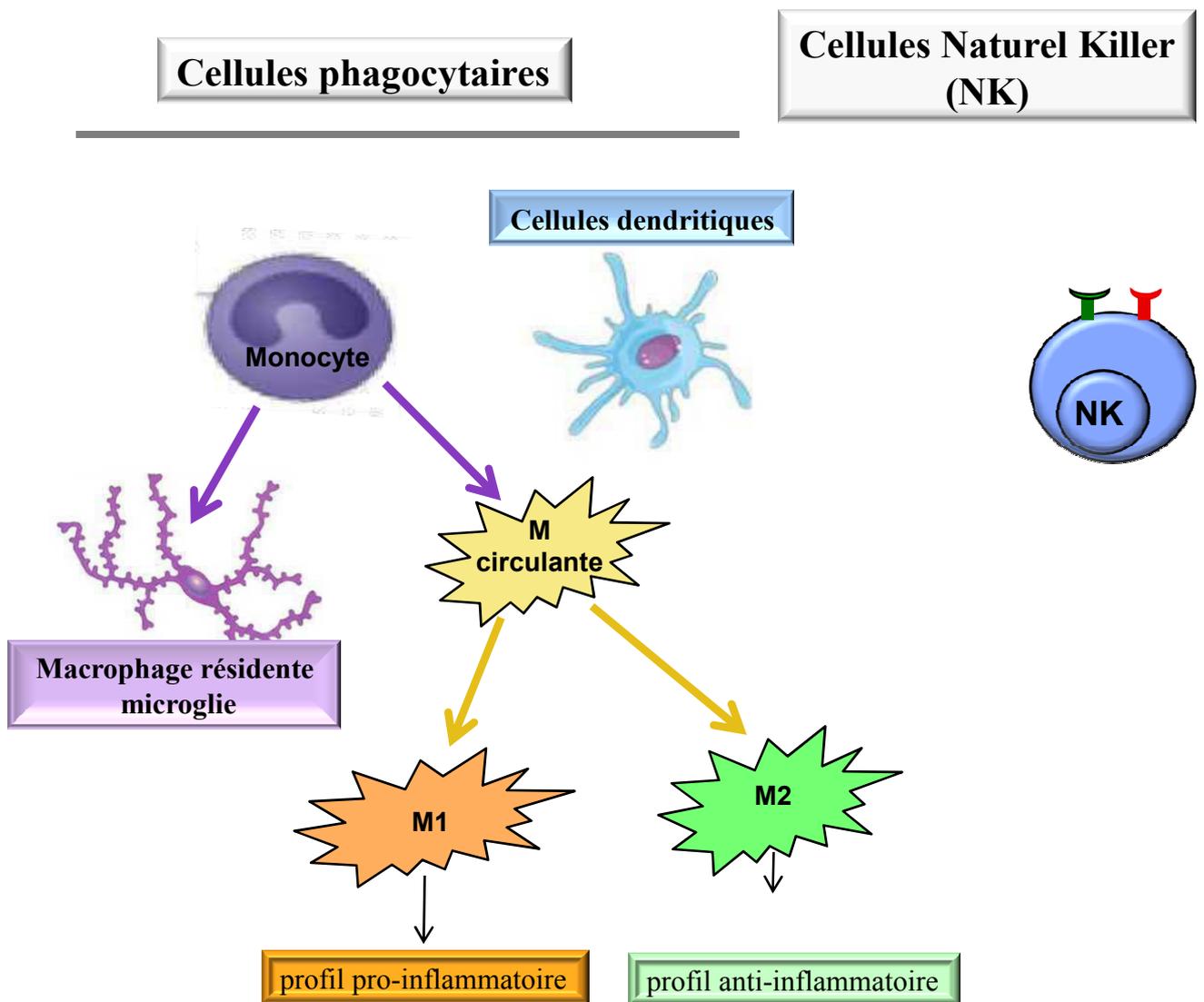
Au cours du vieillissement, la lipofuscine, un pigment cellulaire composé de débris, qui s'accumule au niveau de l'EPR est fortement associée à la DMLA (Boulton 2009). Cette lipofuscine est un générateur puissant des EROs (Gaillard, Atherton et al. 1995; Rozanowska, Jarvis-Evans et al. 1995; Rozanowska, Wessels et al. 1998).

## **B. Inflammation**

### **1. Définition**

L'inflammation est la première réponse biologique engendrée en réponse à des stimuli nocifs tels qu'une infection ou une agression tissulaire. C'est un processus habituellement bénéfique dont le but est de mobiliser le système immunitaire afin d'éliminer l'agent pathogène et réparer les lésions tissulaires. Le système immunitaire peut être divisé en deux branches interconnectées : l'immunité innée, activée en premier lieu par les médiateurs moléculaires de l'inflammation, qui conduit à l'initiation de la cascade inflammatoire et à l'activation de la réponse immunitaire acquise ou adaptative si l'agression persiste.

L'inflammation est tout d'abord une inflammation aiguë qui représente la réponse immédiate à un agent agresseur, de courte durée (quelques jours ou semaines) et d'installation souvent brutale. Mais elle évolue en une inflammation chronique lorsque le pathogène initial persiste dans les tissus ou que l'inflammation aiguë récidive de façon répétée entraînant des destructions tissulaires de moins au moins bien réparées.



**Figure 29: Illustration schématique des cellules de l'immunité innée : Les cellules phagocytaires et les cellules Naturel Killer.** Les monocytes se différencient en macrophages résidentes au niveau d'un tissu (la microglie dans la rétine) et en macrophages circulants. Les macrophages circulants acquièrent des phénotypes fonctionnels spécialisés en fonction des stimuli et deviennent des macrophages M1 à profil pro-inflammatoire ou des macrophages M2 à profil anti-inflammatoire.

**M1:** macrophage M1, **M2:** macrophage M2

## 2. Cellules de l'inflammation

### 2.1. Cellules de la réponse innée (Figure 29)

#### 2.1.1. Cellules phagocytaires

➤ **Monocyte** : est une cellule sanguine immature de la famille des leucocytes, qui provient de la moelle osseuse. Cette cellule se différencie une fois dans les tissus où elle résidera, et sera ainsi à l'origine de macrophage et de cellule dendritique.

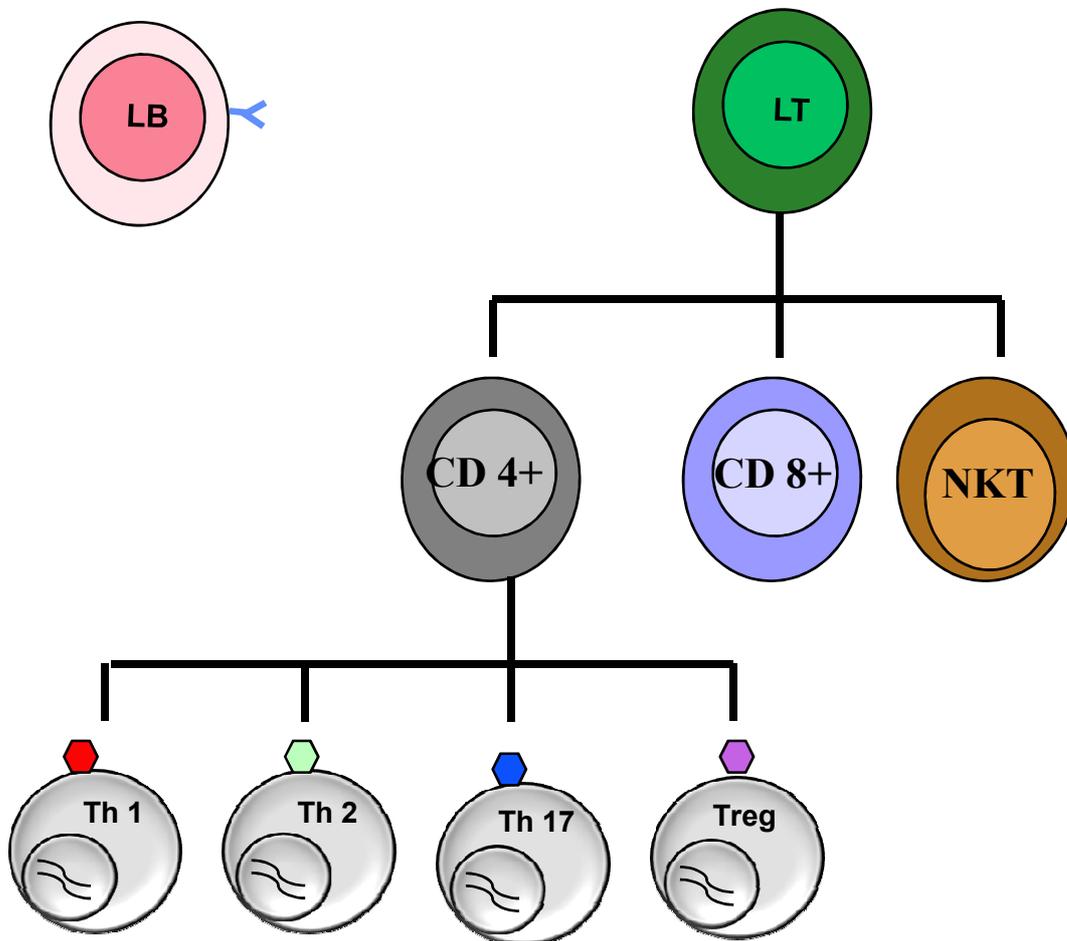
➤ **Macrophages** : sont les cellules effectrices de la réponse immunitaire innée. Ils présentent les récepteurs de type TLR, NLR et le récepteur à IL-1 (IL-1R). Il existe deux types de macrophages : les macrophages résidents dans les tissus et ceux issus de la moelle osseuse circulants dans le sang et qui sont recrutés dans les tissus.

**Les macrophages circulants** sont activés et acquièrent des phénotypes fonctionnels spécialisés en fonction des stimuli. On distingue alors 2 phénotypes :

- Les macrophages M1 (CD68+) qui produisent des cytokines pro-inflammatoires et des espèces réactives de l'oxygène et de l'azote.
- Les macrophages M2 (CD163+) qui produisent des cytokines anti-inflammatoires et pro-angiogéniques.

**Les macrophages résidents** portent chacun une appellation caractéristique suivant le tissu dans lequel il se trouve. Au niveau de la rétine, on trouve **les cellules de microglie** dans la couche plexiforme interne. Ces cellules se trouvent dans la première ligne de défense immunitaire innée (Hanisch and Kettenmann 2007) et secrètent des facteurs anti-inflammatoires (Streit 2002). Toutefois, lorsque l'homéostasie cellulaire est perdue, les microglies deviennent des médiateurs de l'inflammation en produisant des cytokines pro-inflammatoires (Rivest 2009) et favorisent davantage les processus dégénératifs. Cette action délétère de la microglie a été observée dans la dégénérescence des cellules ganglionnaires de la rétine et des photorécepteurs dans les cas de traumatisme ou de lésions induites par la lumière (Li, Eter et al. 2015).

➤ **Cellules dendritiques** : sont des cellules présentatrices d'antigènes qui présentent des expansions cytoplasmiques appelées des **dendrites**. Elles jouent le rôle de **cellules phagocytaires** et de **cellules présentatrices d'antigènes**. Une fois l'antigène phagocyté et présenté à la membrane, la cellule dendritique quitte son lieu de résidence et migre vers les organes lymphoïdes secondaires où elle active la réponse immunitaire adaptative.



**Figure 30: Illustration schématique des cellules de l'immunité adaptative : les lymphocytes B (LB) et les lymphocytes T (LT).**

- Les lymphocytes T se différencient en lymphocytes Natural Killer T (NKT), lymphocytes T cytotoxiques (CD8+) et lymphocytes T helper (CD4+).
- Les lymphocytes CD4+ se différencient en lymphocytes T helper 1 (Th1), lymphocytes T helper (Th2), lymphocytes T helper 17 (Th17) et lymphocytes T régulateur (Treg).

### 2.1.2. Cellules Natural Killer

Les cellules « Natural Killer » (NK) qui signifie cellules tueuses naturelles sont des lymphocytes. Ces cellules NK ont la capacité, apparemment spontanée, de lyser des cellules tumorales ou infectées en l'absence d'immunisation spécifique préalable.

## 2.2. Cellules de la réponse adaptative (Figure 30)

Il existe deux types de lymphocytes : les lymphocytes T et les lymphocytes B qui diffèrent par leur fonction et par les molécules qui sont à leur surface.

### 2.2.1. Lymphocytes T

Les lymphocytes T constituent les principaux acteurs de la réponse immunitaire adaptative. T est l'abréviation de thymus, l'organe dans lequel leur développement s'achève.

Les lymphocytes Natural Killer T (NKT) présentent des marqueurs de lymphocyte T (CD3) et des marqueurs de cellules NK. Ils sont donc un lien entre le système immunitaire inné et le système immunitaire adaptatif. Les NKT sont capables de lyser les cibles et de sécréter des cytokines anti-inflammatoires.

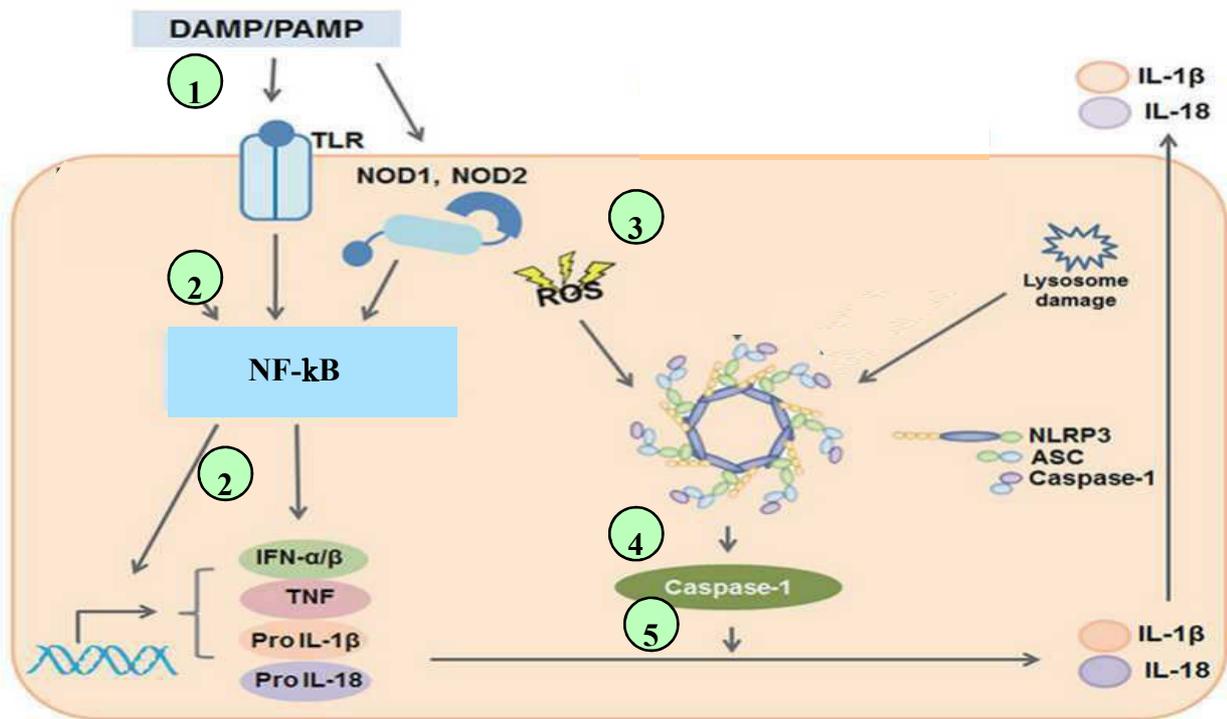
Les lymphocytes T cytotoxiques (CD8+) exercent des fonctions cytotoxiques et éliminent les cellules infectées par des pathogènes intracellulaires. Ils libèrent essentiellement des cytokines pro-inflammatoires.

Les lymphocytes T helper (Th) (CD4+) jouent un rôle majeur dans la régulation de la réponse immunitaire et l'inflammatoire. Les lymphocytes T helper précurseurs ou naïves (Th0, Thp ou Thn) se différencient, selon l'environnement cytokinique en différents types (Leipe and Chang 2015) :

- Les lymphocytes T helper 1 (Th1) qui ont un profil pro-inflammatoire.
- Les lymphocytes T helper 2 (Th2) qui ont un profil anti-inflammatoire.
- Les lymphocytes T helper 17 (Th17) qui ont profil pro-inflammatoire libérant IL-17.
- Les lymphocytes T régulateur (Treg) qui inhibent la réponse auto-immune via l'inhibition des lymphocytes T effecteurs.

### 2.2.2. Lymphocytes B

Le lymphocyte B est responsable de l'**immunité adaptative humorale**, qui vise à produire les anticorps spécifiques de l'agent pathogène. Le lymphocyte B se différenciera : en plasmocytes ou en lymphocyte B mémoire. Les plasmocytes sécrètent les anticorps solubles



**Figure 31: Illustration schématique de l'activation inflammasome.** Les DAMPs et les PAMPs sont reconnus par les récepteurs TLR (1), qui se traduit par la transcription des cytokines pro-IL-1β et pro-IL-18 induite par la voie de signalisation de NF-κB (2). L'activation du récepteur NLRP3 est induite par les espèces réactives de l'oxygène (ROS) (3). L'assemblage du complexe de l'inflammasome NLRP3, y compris la molécule ASC et la pro-caspase-1, conduit à l'activation de la caspase-1 (4). La caspase-1 activée clive les cytokines pro-IL-1β et pro-IL-18 dans leurs formes matures (5).

**DAMP**: motifs moléculaires associés au danger ; **PAMP**: motifs moléculaires associés aux pathogènes , **TLR**: récepteurs de type Toll, **NOD**: récepteurs de type NOD , **IL**, interleukine; **INF**: interféron, **TNF**: tumor necrosis factor, **ASC**:apoptosis-associated speck-like domain containing a caspase recruitment domain CARD, **ROS**: Reactive Oxygen Species (espèce réactive de l'oxygène) (Tae-Hyeong Lee 2014)

qui se fixent sur l'antigène (opsonisation), et facilitent sa phagocytose. Les lymphocytes B **mémoire** qui expriment à leur surface les anticorps spécifique d'un antigène, permettant une réponse plus rapide lors d'une seconde infection.

### 3. Médiateurs moléculaires de l'inflammation

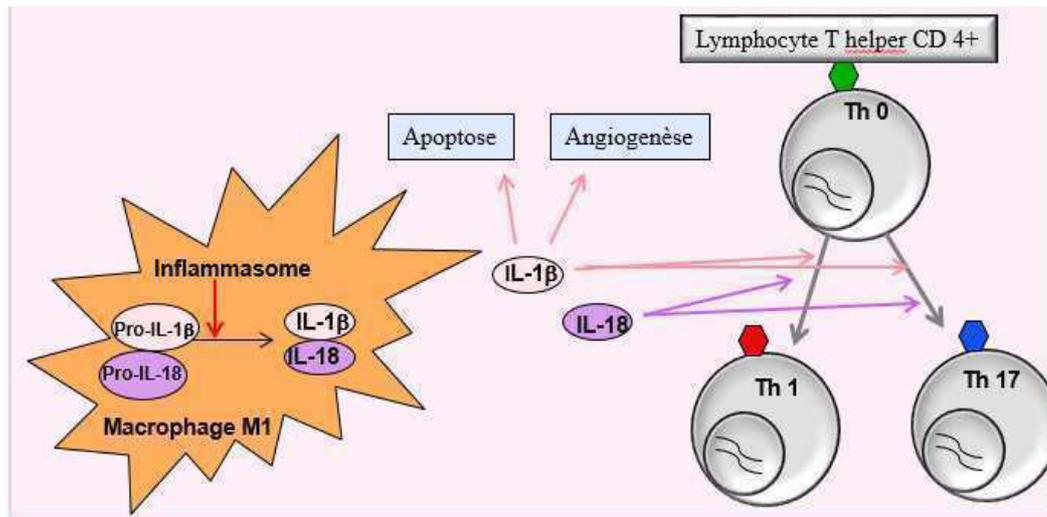
#### 3.1. Récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires

La première étape de la réponse inflammatoire (Turner, Nedjai et al. 2014) est l'activation des récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (Pattern Recognition Receptor, PRRs) suite à leur interaction avec les motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMPs) et/ou les motifs moléculaires associés au danger (DAMPs) tels que les produits de peroxydation lipidique (Turner, Nedjai et al. 2014). Ils existent trois types de récepteurs suivant leur localisation :

-Les PRR solubles, ou PRR sécrétés, sont trouvés dans les fluides corporels. Les protéines du système du complément qui jouent un rôle dans l'activation du système du complément ou la phagocytose appartiennent à ce type de récepteurs.

- Les PRR membranaires, ou PRR d'endocytose : les récepteurs de type Toll (TLRs) et les récepteurs lectine de type C (CLRs). Ces récepteurs se situent à la surface des cellules et jouent un rôle dans l'activation de la réponse inflammatoire, la phagocytose, la présentation antigénique, la translocation de NF- $\kappa$ B au noyau et la sécrétion de cytokines.

-les PRR cytoplasmique, ou PRR de signalisation : les récepteurs de type RIG (RLRs) qui reconnaissent les composants viraux et les récepteurs de type NOD (NLRs) qui reconnaissent les DAMPs et les composants bactériens. Ces récepteurs se trouvent dans le cytoplasme des cellules immunitaires. Un sous-ensemble des récepteurs NLRs est connu sous le nom de NLRP. Ils existent différents types de NLRP en fonction du domaine pyrine amino-terminal : NLRP3, NLRP 4... Ces NLRPs forment avec la protéase caspase-1 et d'une protéine adaptatrice connue sous le nom d'ASC (apoptosis-associated speck-like domain containing a caspase recruitment domain CARD) un complexe multi-protéique sous le nom d'inflammasome. La formation de l'inflammasome est orchestrée par les cellules immunitaires telles que les macrophages, activées par les DAMPs, ou par les EROs (Doyle, Campbell et al. 2012). Dans les cellules stressées, la protéine NLRP se dimérise, recrute la protéine ASC associée à la pro-enzyme caspase-1 conduisant à l'activation de la caspase-1 qui clive par la suite les précurseurs inactifs des cytokines pro-inflammatoires tels que l'interleukine (IL)-1 et IL-18 et formant ainsi IL-1 et IL-18 actives (**Figure 31**).



**Figure 32 : Illustration schématique du rôle de l'interleukine 18 (IL-18) et l'interleukine IL-1β.** Au niveau des macrophages de type M1, les cytokines pro -IL-18 et pro -IL-1β sont clivées sous leurs formes matures sous l'action de l'inflammasome et sont ensuite sécrétées. IL-1β et IL-18 favorisent la polarisation des lymphocytes Th0 naïfs en Th1 et Th 17. IL-1β promeut la neovascularization et l'apoptose des cellules

## 3.2. Cytokines

Les cytokines sont des protéines solubles de faible poids moléculaire produites principalement par les cellules immunitaires (les monocytes, les macrophages, les lymphocytes). Chaque cytokine peut être synthétisée par plusieurs types de cellules. Elles peuvent être classées selon leur activité pro ou anti-inflammatoire. La balance entre cytokines pro-inflammatoires et anti-inflammatoires est la clé de la régulation de l'inflammation.

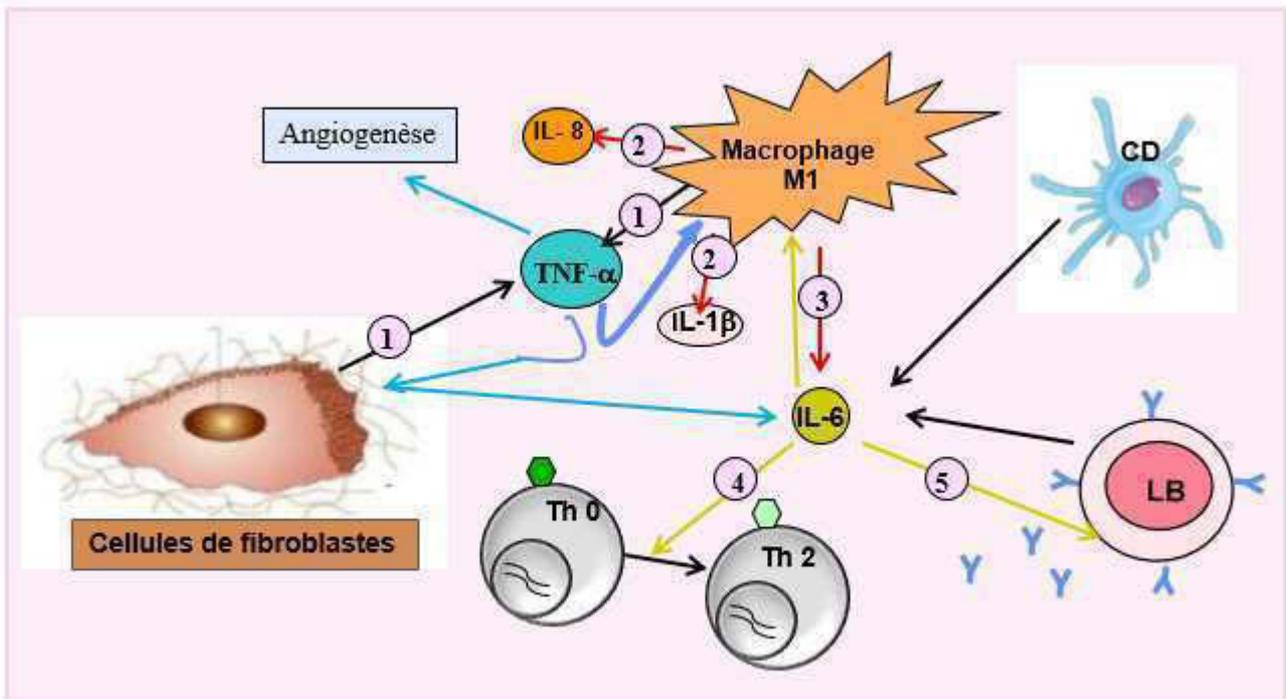
### 3.2.1. Cytokines pro-inflammatoires

Les principales cytokines pro-inflammatoires sont les interleukines de la famille d'IL-1, le TNF- $\alpha$ , l'IL-6. Plus récemment a été identifiée une nouvelle famille de cytokine pro-inflammatoire, IL-17. Elles sont sécrétées en particulier par les cellules phagocytaires et jouent un rôle prépondérant dans l'initiation et le maintien de l'inflammation.

❖ **La famille d'IL-1** est constituée de 3 cytokines : IL-1 $\beta$ , IL-1 $\alpha$  et IL-18. Ces cytokines influencent la polarisation des lymphocytes Th0 naïfs en Th 1 (Dinarello 2009). IL-1 $\beta$  et IL-18 sont activées par clivage par l'inflammasome et sont ensuite sécrétées par les macrophages de type M1 (**Figure 32**). IL-18 semble jouer un double rôle dans la pathogenèse de DMLA : d'une part il est anti-angiogénique (Doyle, Campbell et al. 2012) et d'autre part il favorise l'apoptose des cellules de l'EPR (Tarallo, Hirano et al. 2012). IL-1 $\beta$  promeut la néovascularisation et l'apoptose des cellules (Lavalette, Raoul et al. 2011). IL-1 $\alpha$ , active sous forme de précurseur ou sous forme clivée, est régulée par les calpaïnes et dans certaines conditions par l'inflammasome. Son rôle physiologique est encore mal connu (Dinarello 2009).

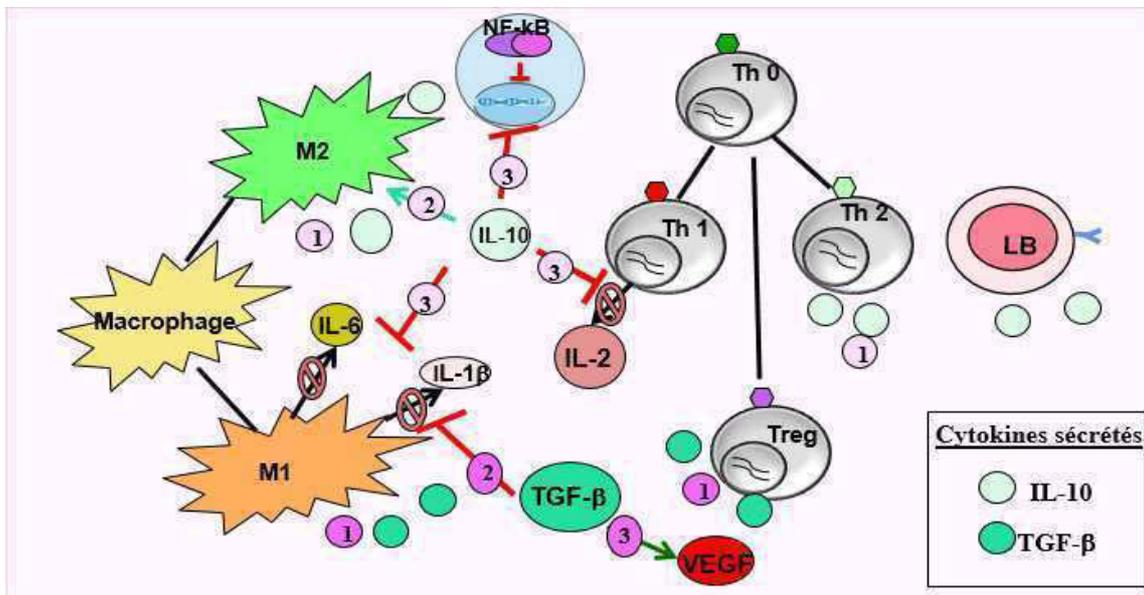
IL-17 est capable de recruter les monocytes, d'activer les macrophages et augmenter leur capacité phagocytaire (Gao, Jiang et al. 2010; Silverpil, Glader et al. 2011) et de promouvoir la néovascularisation (Hasegawa, Sonoda et al. 2013). L'IL-18 et l'IL-1 $\beta$  augmentent sa production par les lymphocytes Th17 (Sutton, Brereton et al. 2006; Sakai, Sugawara et al. 2008).

➤ **IL-6** est impliquée dans la régulation du système immunitaire, de l'hématopoïèse, de l'inflammation (Naka, Nishimoto et al. 2002). Elle est exprimée dans de nombreux types cellulaires tels que les lymphocytes B, les macrophages M1, les cellules dendritiques, les fibroblastes (Kishimoto, Akira et al. 1995). Elle augmente la production d'immunoglobulines (Ig) par les lymphocytes B (Kishimoto 2010), la différenciation des macrophages (Naka,



**Figure 33 : Illustration schématique du rôle de l'interleukine TNF- $\alpha$  et IL-6.**

Les macrophages et les cellules de fibroblastes sécrètent **TNF- $\alpha$**  (1) qui induit la sécrétion d'IL-1  $\beta$  et IL-8 par les macrophages M1 (2). En synergie avec IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  stimule la sécrétion d'IL-6 (3). IL-6 est sécrétée par les macrophages M1, les cellules de fibroblastes, les cellules dendritiques (CD) et les lymphocytes B (LB). IL-6 favorise la différenciation des lymphocytes Th 0 naïfs en Th 2 (4) et augmente la sécrétion des immunoglobulines (Ig) par les LB (5).



**Figure 34 : Illustration schématique du rôle des cytokines anti-inflammatoires IL-10 et TGF- $\beta$**

**IL-10** est sécrété par les macrophages, les lymphocytes Th2 et les lymphocytes B (LB) (1). Il active les macrophages M2 (2) et inhibe la sécrétion d'IL-1  $\beta$ , IL-6 par les macrophages M1 et d'IL-2 par les lymphocytes Th1 et inhibe la translocation du facteur nucléaire NF- $\kappa$ B dans le noyau (3).

**TGF- $\beta$**  est sécrétée par les macrophages M1 et les lymphocytes T régulateurs (Treg) (1). Il inhibe la sécrétion de IL-1  $\beta$  par les macrophages M1 (2) et induit l'expression du facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF) (3).

Nishimoto et al. 2002), l'activation des cellules T et leur différenciation en Th2 (Smith and Maizels 2014) (**Figure 33**).

➤ **Le Facteur de nécrose tumorale (TNF- $\alpha$ )** est secrété principalement par les monocytes/macrophages, les fibroblastes et les cellules endothéliales stimulés. Il exerce des effets pro-inflammatoires en augmentant la production d'IL-1 $\beta$  et d'IL-6 ainsi que la surexpression des molécules d'adhésion, l'activation des macrophages et la stimulation de l'angiogenèse (Locksley, Killeen et al. 2001; Tracey, Klareskog et al. 2008). Le TNF- $\alpha$  agit souvent en synergie avec IL-1 pour induire la production d'IL-6 et IL-8 (Garlanda, Dinarello et al. 2013) (**Figure 33**).

### 3.2.2. Cytokines anti-inflammatoires (Figure 34)

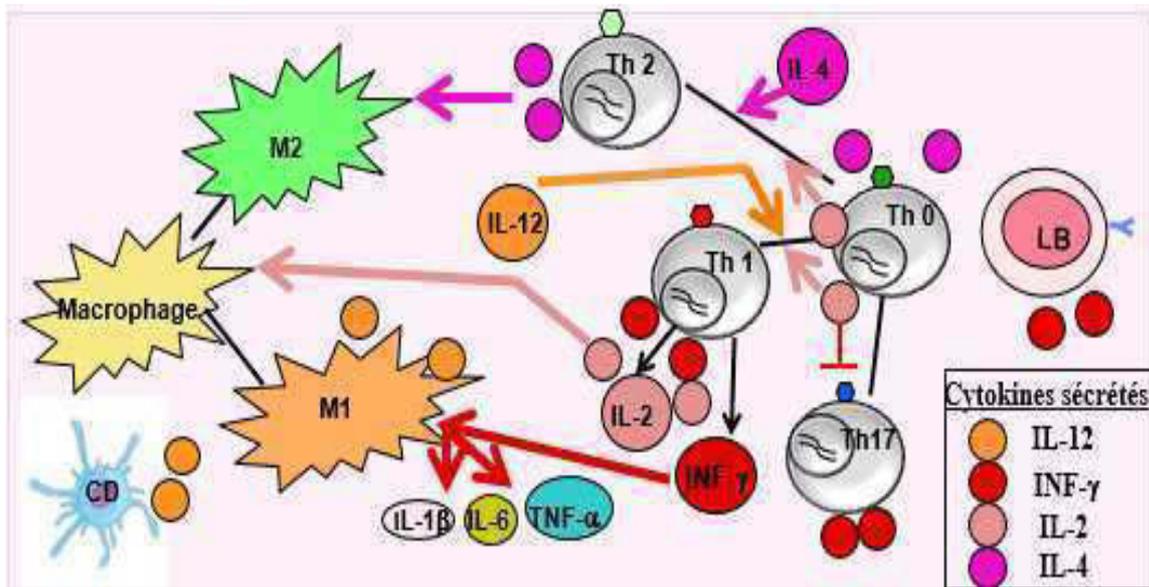
➤ **IL-10** est produite par les lymphocytes Th2 et B, les monocytes et les macrophages de type M2. Elle inhibe fortement la production d'IL-1, d'IL-6 et de TNF- $\alpha$  par les monocytes/ les macrophages et d'IL-2 par les lymphocytes Th1 activés (de Waal Malefyt, Abrams et al. 1991; de Waal Malefyt, Yssel et al. 1993; Moore, de Waal Malefyt et al. 2001). Elle est aussi capable d'activer les macrophages M2 (Ardeljan, Ardeljan et al. 2014), d'inhiber les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II, et inhibe la translocation de NF- $\kappa$ B (Schottelius, Mayo et al. 1999). Il a été mis en évidence, dans un modèle murin, qu'IL-10 supprime la néovascularisation (Matsumura, Kamei et al. 2012).

➤ **Transferring growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ )** est largement secrété par les macrophages, les lymphocytes Treg (Freire-de-Lima, Xiao et al. 2006). Il inhibe la production des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 $\beta$  et le TNF- $\alpha$  par les monocytes/macrophages de type M1 (Karres, Kremer et al. 1996). Le TGF-  $\beta$  induirait l'expression du facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF) qui est une cytokine clé dans la néovascularisation rétinienne (Naginei, Samuel et al. 2003).

### 3.2.3. Cytokines immunorégulatrices (Figure 35)

Ces cytokines interviennent dans la régulation des cytokines inflammatoires.

➤ **IL-12** est une cytokine hétérodimérique produite par les cellules dendritiques et les macrophages de type M1. Elle est constituée de deux sous-unités, p35 et p40. L'assemblage des deux sous-unités forme l'IL-12 p70 seule forme active. L'activité centrale de l'IL-12 est d'induire la prolifération des lymphocytes T CD4 activés et la différenciation des lymphocytes T vers un phénotype Th1 qui produisent principalement l'IFN- $\gamma$  et l'IL-2 permettant un auto-entretien (Gately, Renzetti et al. 1998).



**Figure 35 : Illustration schématique du rôle des cytokines immunorégulatrices IL-12, INF- $\gamma$ , IL-4 et IL-2 . IL-12** est sécrété par les macrophages M1 et les cellules dendritiques (CD) et stimule la différenciation des lymphocytes pro-inflammatoires Th1 et la sécrétion d'IL-2 qui stimule l'activation des macrophages. **INF- $\gamma$**  est sécrété par les lymphocytes Th1 et Th 17 et les lymphocytes B et stimule la polarisation des macrophages de type M1 pro-inflammatoire. **IL-4** sécrété par les lymphocytes et stimule la prolifération des lymphocyte Th2 anti-inflammatoire qui eux même sécrètent **IL-4** pour polariser les macrophages en type M2 anti-inflammatoire.

➤ **Interféron-  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ )** est sécrété par les lymphocytes Th1 et Th17, les cellules NK, les cellules B (Schroder, Hertzog et al. 2004). La production d'IFN- $\gamma$  est régulée par l'IL-12 et l'IL-18 (Chikano, Sawada et al. 2000). L'IFN- $\gamma$  induit la polarisation des macrophages vers le phénotype M1 et l'expression des cytokines pro-inflammatoires IL-6, IL-8, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  (Brown, Wallet et al. 2010), IL-18 (Kim, Im et al. 2000) et des chémokines, telles que CXCL8 (Barker, Sarma et al. 1990). Mais, l'IFN $\gamma$  pourrait aussi jouer un rôle anti-inflammatoire en stimulant l'expression d'antagoniste aux récepteurs IL1R (Muhl and Pfeilschifter 2003).

➤ **IL-4** est principalement produite par les lymphocytes T activés. Elle a une activité immunorégulatrice anti-inflammatoire. En effet, elle assure la différenciation des Th0 en lymphocytes Th2 et la polarisation des macrophages en type M2 (He and Marneros 2014), favorisant ainsi la sécrétion des cytokines anti-inflammatoires l'IL-4, IL-5, IL-10 et IL-13 (Fiorentino, Bond et al. 1989).

➤ **IL-2** est sécrétée par les lymphocytes T CD 4+ qui prolifèrent vers le type Th0. Les Th0 sécrètent alors de l'IL-2 permettant une régulation essentiellement autocrine et ainsi une amplification des signaux (Hoyer, Dooms et al. 2008). IL-2 est sécrétée aussi par les lymphocytes Th1 et permettra l'activation des monocytes et des macrophages (Espinoza-Delgado, Bosco et al. 1995; Bosco, Curiel et al. 2000) et l'inhibition de la différenciation des lymphocytes Th17 (Laurence, Tato et al. 2007).

#### **3.2.4. Chémokines**

Les chémokines sont une classe des cytokines qui exercent un pouvoir chimio-attractif. La chemokine Ligand 2 (CCL2) ou appelé aussi monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) est l'une des chimokines clés dans la régulation de la migration et l'infiltration des monocytes, des microglies, des lymphocytes T et des cellules NK (Deshmane, Kremlev et al. 2009). Le MCP-1 est produit par de nombreux types cellulaires, dont les cellules microgliales, les cellules épithéliales, les cellules endothéliales, les cellules de Müller (Deshmane, Kremlev et al. 2009), bien que, les monocytes et les macrophages soient les principales sources (Yoshimura, Robinson et al. 1989). Au niveau de la rétine, il a été mis en évidence que l'expression de MCP-1 par les cellules de Müller promouvoit l'homéostasie cellulaire à travers le recrutement et l'activation efficaces des cellules phagocytaires dans le site de dégénérescence rétinienne (Joly, Francke et al. 2009).

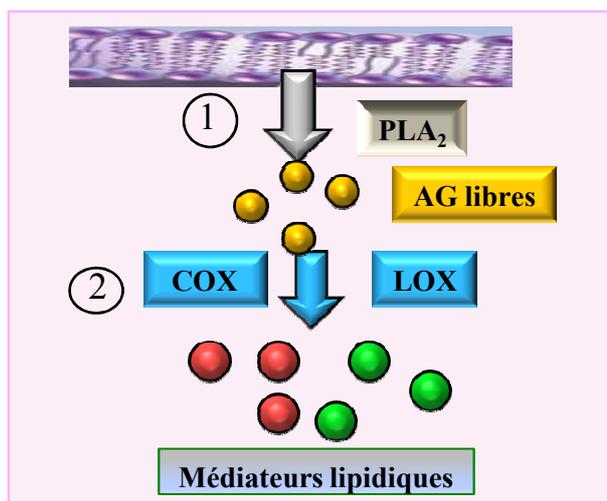


Figure 36 : Illustration schématique de la biosynthèse de dérivés d'oxydation d'Acides gras polyinsaturés.

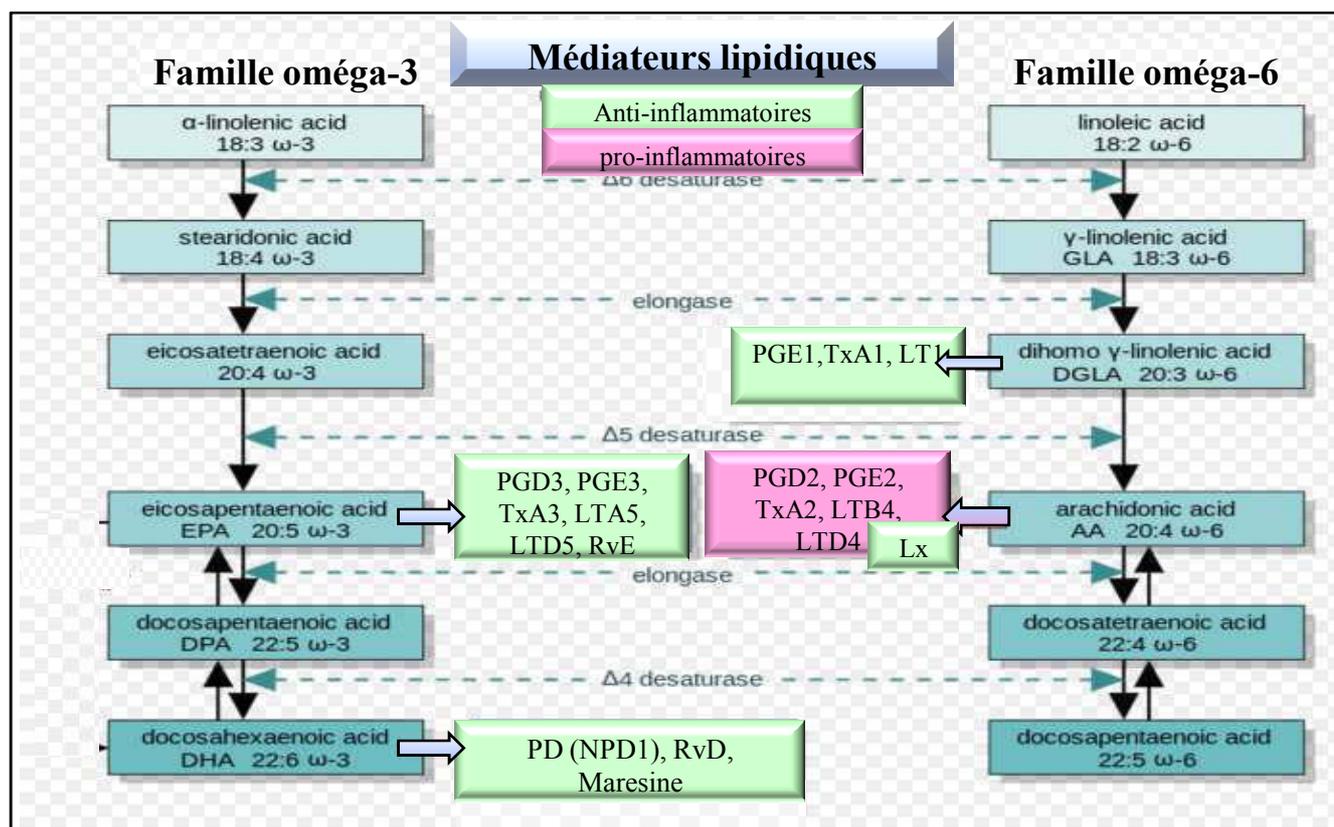


Figure 37: Médiateurs lipidiques. La famille des eicosanoïdes comprend les prostaglandines (PG), les Tromboxanes (Tx), les Leucotriènes (LT). Les eicosanoïdes synthétisés par l'acide arachidonique (AA) jouent un rôle pro-inflammatoire sauf la lipoxine (Lx), alors ceux synthétisés par l'acide eicosapentanoïque (EPA) et l'acide dihomo  $\gamma$ -linoléique sont anti- inflammatoire. EPA peut aussi les médiateurs lipidiques de la famille des résolvines (Rv) de la série E. L'acide docosahexaénoïque (DHA) synthétise des médiateurs lipidiques de la famille résolvine (Rv), protectine (NPD-1) et la maresine

### 3.2.5. Cytokines agissant comme facteurs de perméabilité Vasculaire

La principale cytokine de ce groupe est le facteur de croissance vasculaire endothélial (VEGF) qui augmente la perméabilité cellulaire, la migration des monocytes et des macrophages vers le site de l'inflammation. Dans des conditions d'hypoxie, les macrophages de type M2 (anti-inflammatoire) stimulent la sécrétion du VEGF qui stimule l'angiogenèse.

### 3.3. Médiateurs lipidiques

Les médiateurs lipidiques sont des dérivés d'oxydation des AGPI de la famille oméga-6 ou oméga-3. Leur biosynthèse comporte deux phases (**Figure 36**). La première phase correspond à la libération de l'acide gras (AG) précurseur par la phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) à partir des phospholipides. La PLA<sub>2</sub> est une large famille d'enzymes, avec la phospholipase A<sub>2</sub> calcium indépendante (iPLA<sub>2</sub>) qui libère préférentiellement le DHA, et la phospholipase A<sub>2</sub> cytosolique qui libère préférentiellement AA et EPA (Strokin, Sergeeva et al. 2003; Strokin, Sergeeva et al. 2004). La deuxième phase est la transformation des AG sous forme libre en dérivés oxydés par l'action de la cyclooxygénase (COX) et de la lipooxygénase (LOX). Ces médiateurs lipidiques, essentiels dans l'inflammation, sont des molécules lipophiles autocrines ou paracrines qui sont capables de traverser la membrane plasmique des cellules pour atteindre leur site récepteur. Selon leur fonction, on distingue deux familles de médiateurs lipidiques (**Figure 37**) : les médiateurs lipidiques à profil pro-inflammatoire qui sont les eicosanoïdes et les médiateurs lipidiques à profil anti-inflammatoire et qui jouent un rôle dans la résolution de l'inflammation aiguë ou chronique. Ces dérivés sont les Lipoxines (Lx), les Resolvines (Rv), les Protectines (PD) et les Maresines (MaR).

➤ **Eicosanoïdes** : Le groupe des eicosanoïdes comprend les Leucotriènes (LT) et les Prostanoides qui sont respectivement synthétisés via l'action de la LOX et la COX. Les Prostanoides subissent ensuite l'action d'une enzyme spécifique, la thromboxane synthase, la prostaglandine synthase ou la prostacycline synthase, pour donner respectivement les thromboxanes (Tx), les prostaglandines (PG) ou les prostacyclines (PGI). Ces eicosanoïdes sont synthétisés à partir de l'AA (C<sub>20</sub>:<sub>4</sub>, n-6), l'acide dihomolinoléique (dGLA, C<sub>20</sub>:<sub>3</sub>, n-6) et l'EPA (C<sub>20</sub>:<sub>4</sub>, n-3).

Les PG et les LT, synthétisés à partir de l'AA, jouent un rôle central dans la réponse inflammatoire et sont les eicosanoïdes pro-inflammatoires les plus prédominants. Les PG<sub>2</sub> et la Tx<sub>2</sub> sont impliqués dans la perméabilité vasculaire et le chimiotactisme des cellules immunitaires (Marion-Letellier, Savoye et al. 2015). Les LTB<sub>4</sub> attirent et activent les

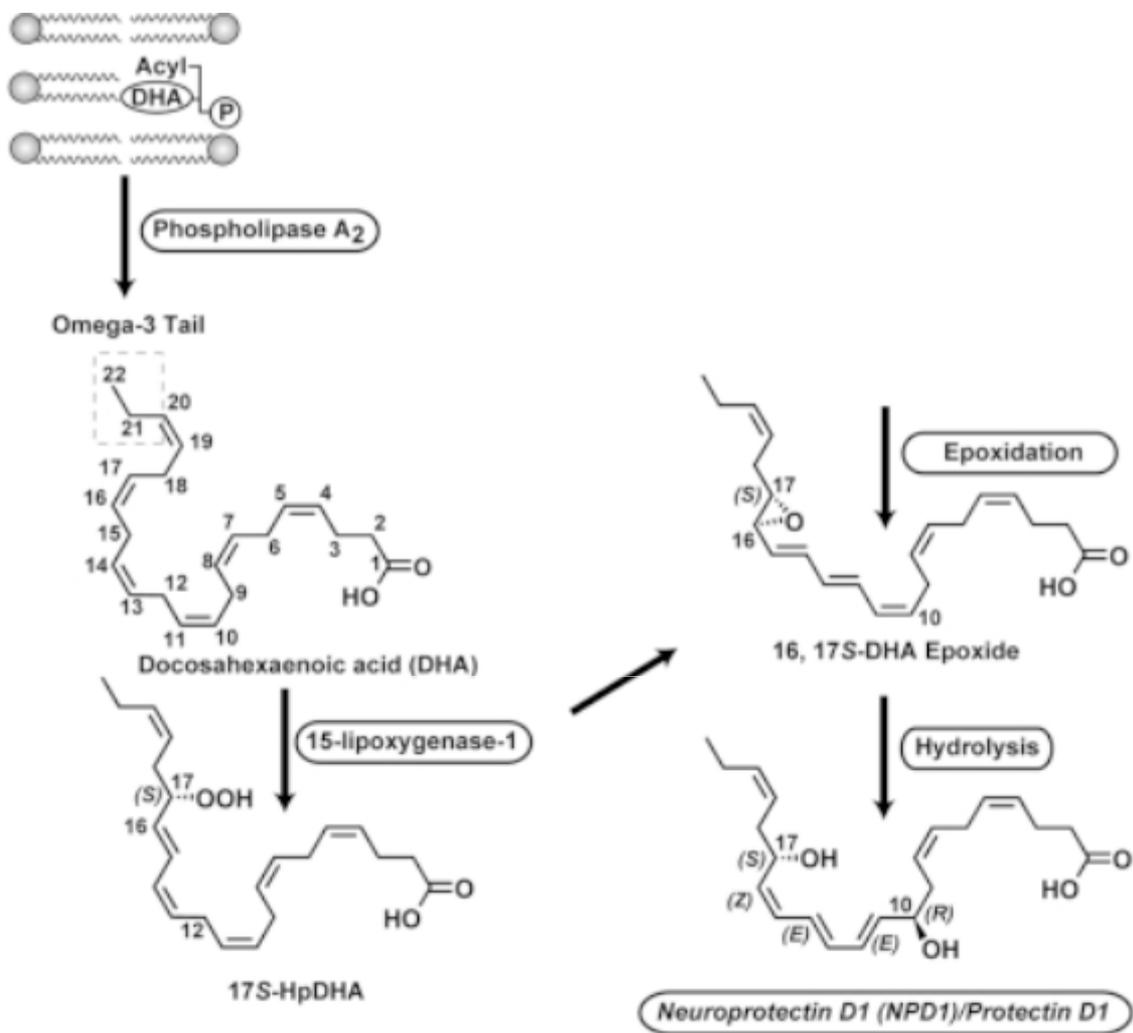


Figure 38: Synthèse de Neuroprotectine D 1

neutrophiles, monocytes, et lymphocytes, alors que LTD4 est un puissant chimio attractif pour les éosinophiles (Marion-Letellier, Savoye et al. 2015).

Récemment, il a été mis en évidence que les prostaglandines PGE2 pourraient jouer aussi un rôle anti-inflammatoire. En effet, PGE2 pourrait stimuler l'expression de l'IL-10, inhiber la libération de l'IL-12 par les macrophages et les cellules dendritiques et induire la polarisation des macrophages vers le phénotype M2 (Calder 2009; Rodriguez, Domingo et al. 2014). De plus, un autre éicosanoïde dérivé de l'AA via la LOX a été mis en évidence et aurait également un effet anti-inflammatoire, la Lipoxine (Lx) (Levy, Clish et al. 2001; Serhan, Jain et al. 2003).

EPA et le dihomolinoléique sont en compétition avec l'AA pour la COX et la LOX. Les PG et LT synthétisés à partir de l'EPA (PG<sub>3</sub>, Tx<sub>3</sub>, LT<sub>3</sub>) et du dihomolinoléique (PG<sub>1</sub>, Tx<sub>1</sub>, LT<sub>1</sub>) sont anti-inflammatoires et résolvent l'inflammation.

➤ **Résolvines** : ils peuvent être synthétisés à partir de l'EPA ou du DHA via l'enzyme 5-LOX et sont donc classés dans la série E-(EPA) ou D- (DHA). Les résolvines jouent un rôle anti-inflammatoire. Par exemple, la RvE1 inhibe l'accumulation des cellules dendritiques dans le site d'inflammation, inhibe la production de cytokines pro-inflammatoires et des chimiokines, et initie la résolution de l'inflammation. La RvD2 réduit la production des cytokines pro-inflammatoires (Serhan and Petasis 2011; Serhan, Chiang et al. 2015).

➤ **Protectine (PD)** : le DHA est le précurseur des protectines (PD). Une protectine spécifique de DHA est la protectine D1 (PD1). Dans le tissu neural, cette protectine D1 est appelée neuroprotectine D1 (NPD1) et elle est synthétisée par l'action de l'enzyme 15-lipoxigénase (15-LOX) (**Figure 38**).

La NPD 1 joue un rôle anti-inflammatoire important au niveau de la rétine (Bazan 2009). Elle inhibe l'activation du facteur de transcription NF-κB et ainsi l'expression des cytokines pro-inflammatoires (Ariel and Serhan 2007; Kaarniranta and Salminen 2009). Au niveau de l'EPR, NPD 1 inhibe l'activation de la transcription de certaines protéines pro-inflammatoires induite par la cytokine IL-1β comme l'enzyme COX-2 qui est l'étape limitante dans la synthèse des prostaglandines (Mukherjee, Marcheselli et al. 2004; Bazan 2009; Calandria and Bazan 2010).

Le rôle anti-inflammatoire de DHA, EPA et leurs dérivés d'oxydation pourrait passer par l'activation des récepteurs d'hormones nucléaires de peroxyosomes (PPAR) qui jouent un rôle anti-inflammatoire (Rosen and Spiegelman 2001; Vanden Heuvel 2012). Les



PPAR- $\alpha$  et PPAR- $\gamma$  activés, interagissent physiquement avec le facteur de transcription NF- $\kappa$ B, inhibent sa translocation et ainsi régulent négativement sa concentration dans le noyau et conduisant à une régulation négative de la transcription des gènes en aval, tels que les gènes codant pour les cytokines pro-inflammatoires (Vanden Berghe, Vermeulen et al. 2003). PPAR- $\alpha$  et PPAR- $\gamma$  régule également négativement l'activation des macrophages (Ricote, Li et al. 1998; Rigamonti, Chinetti-Gbaguidi et al. 2008).

➤ **Maresine** : En 2008, il a été mis en évidence un nouveau médiateur lipidique qui est la Maresine. Bien que la voie de sa biosynthèse soit encore mal connue, il a été suggéré qu'il est synthétisé à partir de DHA et joue un rôle anti-inflammatoire en modulant la polarisation des macrophages vers le phénotype M2 (Dalli, Zhu et al. 2013; Serhan, Chiang et al. 2015).

### **3.4. Pigments maculaires : Lutéine/zéaxanthine**

Il a été montré, dans un modèle d'inflammation *in-vivo*, que la lutéine diminue le taux d'expression des gènes inflammatoires (VEGF, TNF- $\alpha$ , IL-6, MCP-1) en inhibant l'activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B (Jin, Ohgami et al. 2006; Izumi-Nagai, Nagai et al. 2007; Kim, Na et al. 2008; Sasaki, Ozawa et al. 2009). Des effets similaires ont été reportés sur les lignées cellulaires d'EPR (ARPE-19) ou de macrophage (RAW264.7) (Izumi-Nagai, Nagai et al. 2007; Kim, Na et al. 2008; Bian, Gao et al. 2012; Bian, Qin et al. 2012).

## **4. Implications de l'inflammation dans la dégénérescence maculaire liée à l'âge**

L'implication de l'inflammation dans la DMLA a été suggérée suite à des études post-mortem d'yeux de patients atteints de DMLA mettant en évidence des acteurs et médiateurs de l'inflammation au niveau ou près des lésions de la DMLA, en particulier dans les drüsens, la membrane de Bruch, de la choroïde et de la rétine.

### **❖ Immunité innée**

L'immuno-coloration des yeux de donneurs atteints de DMLA néovasculaire a montré la présence de macrophages M1 dans la membrane de Bruch et la choroïde (Ardeljan, Ardeljan et al. 2014). Les cellules d'EPR expriment la protéine chimiotactique des monocytes (CCL2/MCP-1) (Grossniklaus, Ling et al. 2002). Des taux élevés de NLPR3 (inflammasome) ont été trouvés dans les lésions maculaires des patients atteints de DMLA (Tarallo, Hirano et al. 2012; Tseng, Thein et al. 2013). Les protéines du système du complément ont aussi été



prises en évidence au niveau de la membrane de Bruch et de la choroïde des yeux de donneurs atteints de DMLA (Loyet, Deforge et al. 2012).

Les taux élevés de macrophages M2 dans les yeux des personnes âgées saines suggèrent l'établissement d'un environnement réparateur au cours du vieillissement normal. Par contre, dans les yeux des patients atteints de DMLA, et particulièrement de l'atrophie géographique, les macrophages M1 présentent un taux plus élevé et le rapport M1/M2 augmente dans la macula (Cao, Shen et al. 2011). Chez les patients atteints de DMLA néovasculaire, les macrophages M2 libèrent du VEGF (Grossniklaus, Ling et al. 2002) suggérant un statut hypoxique.

#### ❖ Immunité adaptative

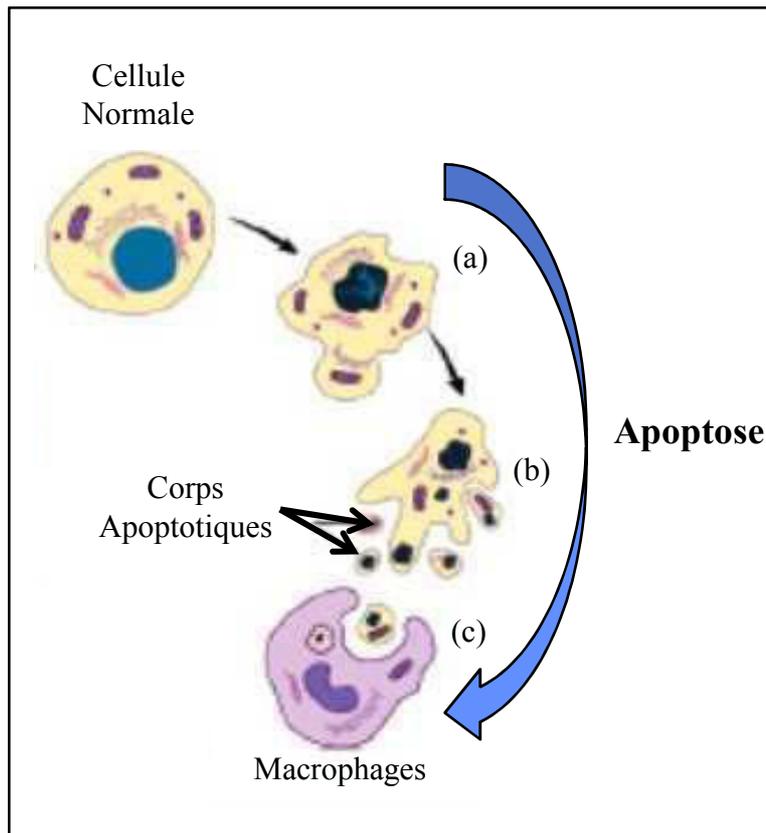
Il y a près de 30 ans, Penfold et ses collègues ont mis en évidence la présence des lymphocytes dans les yeux de patients atteints de DMLA, l'immunité adaptative jouant un rôle dans la dégénérescence des cellules de l'EPR et des photorécepteurs (Penfold, Killingsworth et al. 1984; Penfold, Killingsworth et al. 1985). Ces observations n'ont été confirmées que récemment par des études qui ont mis en évidence la présence des lymphocytes T cytotoxiques CD8<sup>+</sup> et des lymphocytes Th17 dans les yeux des personnes atteintes de DMLA (Ezzat, Hann et al. 2008; Liu, Wei et al. 2011).

## C. Apoptose

### 1. Généralités

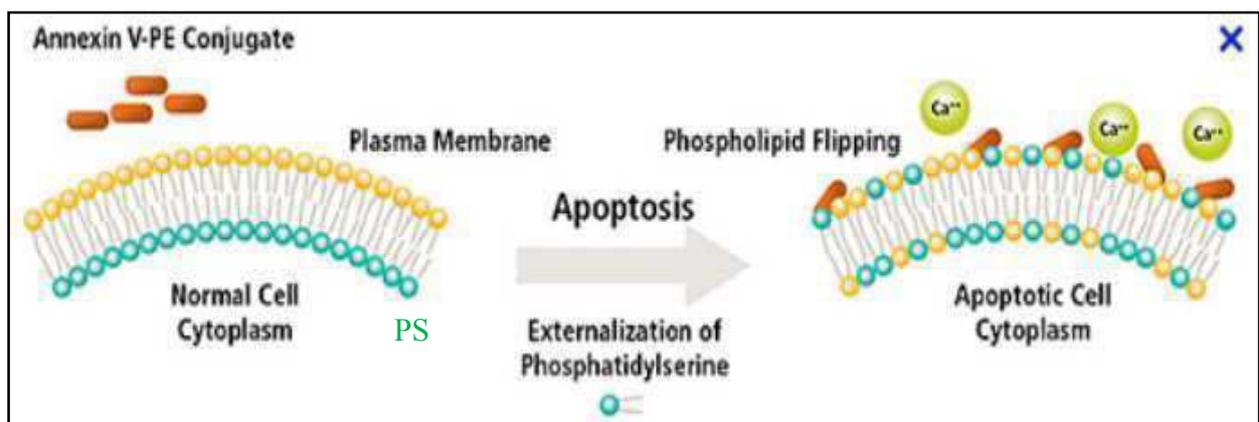
Ce n'est qu'en 1972, que la notion d'apoptose est introduite pour la première fois par Kerr et Wyllie pour désigner une forme de mort cellulaire totalement différente de la nécrose tant sur le plan morphologique que biochimique (Kerr, Wyllie et al. 1972). Le mot "apoptose" provient d'une locution grecque signifiant "chute des feuilles" qui avait déjà été utilisée par Hippocrate de Kos (460-377 av. J.C.) pour décrire la décomposition post-mortem des corps ("chute des os").

L'apoptose est un processus actif au cours duquel la cellule exprime un ensemble de gènes entraînant des modifications morphologiques et biochimiques irréversibles, et aboutissant à la destruction de la cellule.



**Figure 39: Caractéristiques morphologiques de l'Apoptose**

Schéma du processus d'apoptose: (a) condensation ADN, dislocation des organites; (b) bourgeonnement de la membrane plasmique et formation des corps apoptotiques; (c) phagocytose des corps apoptotiques par les macrophages.



**Figure 40: Externalisation des phosphatidylsérines.** Phosphatidylsérines (PS) sont initialement situées sur la face cytoplasmique de la membrane plasmique. Il y a translocation des PS vers le feuillet externe de la membrane (Phospholipid flipping) ce qui permet à l'annexine V (Annexin V-PE conjugate) de se fixer aux PS en présence de calcium  $\text{Ca}^{2+}$ . Cette fixation est un marqueur d'apoptose (figure de [www.bdbiosciences.com](http://www.bdbiosciences.com))

## 2. Caractéristiques des cellules apoptotiques

### 2.1. Caractéristiques morphologiques

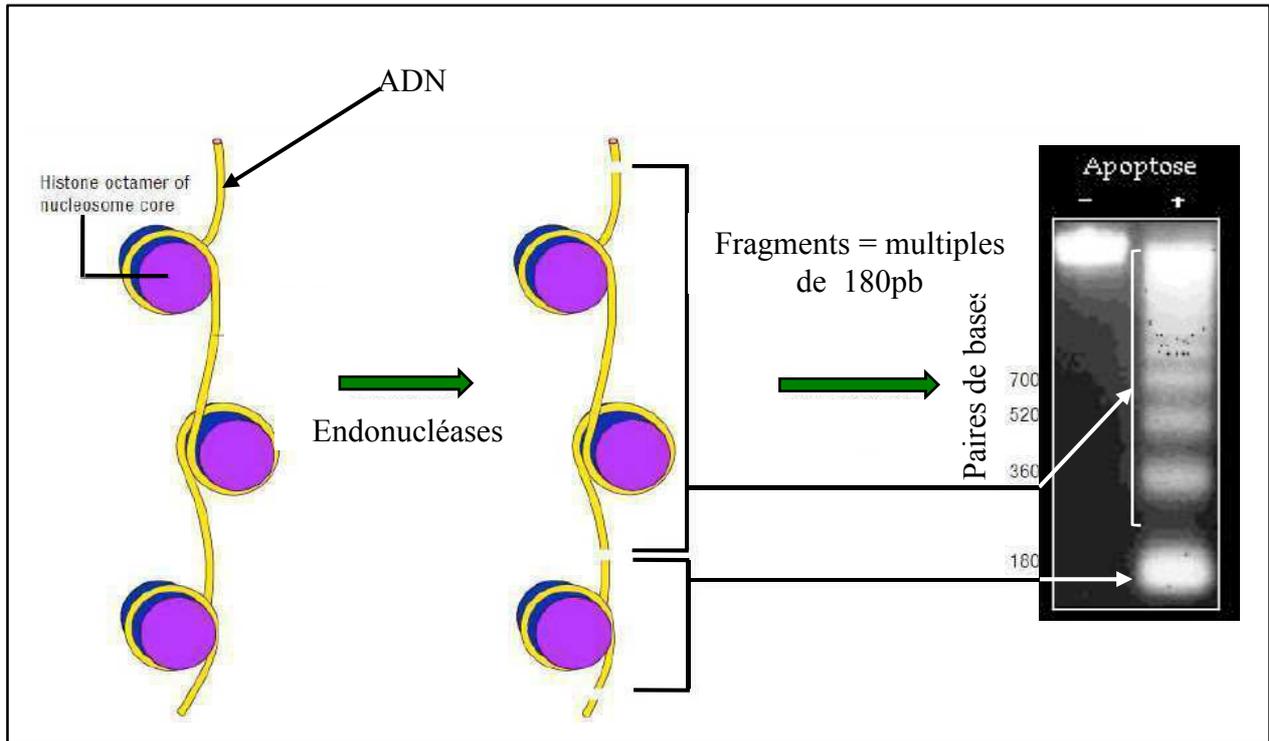
Un des premiers changements est la réduction du volume cellulaire. La cellule se déshydrate et la perte de l'eau intracellulaire conduit à la condensation du cytoplasme (résultant en une modification de la forme et de la taille de la cellule) tout en gardant une intégrité apparente de la membrane plasmique. Cette réduction du volume cellulaire s'accompagne d'une ségrégation de la chromatine à la périphérie de l'enveloppe nucléaire qui est suivie d'une fragmentation de l'ADN en oligonucléosomes, des segments d'ADN multiples de 180 paires de base. La formation d'invaginations des membranes plasmiques et nucléaires donnant un aspect de bourgeon à la surface membranaire périphérique. La désorganisation de l'actine conduit à une rupture des jonctions intercellulaires et la cellule s'isole alors des cellules environnantes. L'évolution des bourgeonnements membranaires entraîne la formation de "corps apoptotiques" qui sont de véritables portions de cellules composées de membrane plasmique englobant du cytoplasme. Les corps apoptotiques sont alors phagocytés par les macrophages ou les cellules voisines, dégradés par les lysosomes, et réduits en résidus non inflammatoires (**Figure 39**).

### 2.1. Caractéristiques biochimiques

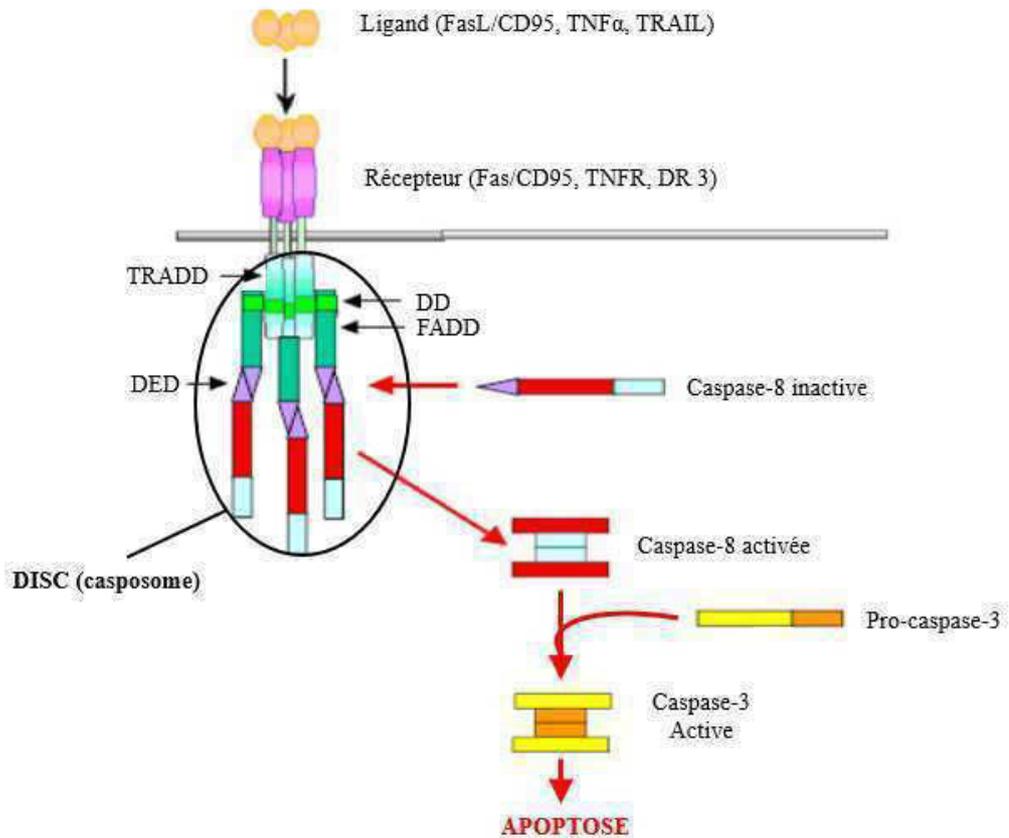
Les changements morphologiques survenant lors de l'apoptose sont accompagnés d'altérations biochimiques spécifiques. Parmi celles-ci, on retrouve une externalisation des phosphatidylsérines membranaires, une atteinte mitochondriale, une activation des caspases et la fragmentation de l'ADN.

Une externalisation des phosphatidylsérines membranaires: Dans des conditions physiologiques, les groupements phosphatidylsérines, phospholipides anioniques, sont présents uniquement dans le feuillet interne de la membrane des cellules. Dans les cellules apoptotiques ces groupements sont déplacés dans le feuillet externe et externalisés à la surface des cellules (Bratton, Fadok et al. 1997). C'est un mécanisme qui apparaît de façon précoce et permet aux cellules apoptotiques d'être reconnues comme cibles des macrophages pour la phagocytose (Fadok, Bratton et al. 2000) (**Figure 40**).

L'atteinte mitochondriale est aussi une caractéristique de l'apoptose. Elle est caractérisée par une chute du potentiel trans-membranaire suite à la formation de mégapores dans la membrane des mitochondries. L'ouverture de ces pores conduit à la libération et à



**Figure 41: Fragmentation internucléosomale de l'ADN lors de l'apoptose :** principe de la fragmentation par une endonucléase (**à gauche**). Profil en « échelle » de l'ADN sur gel d'agarose après électrophorèse (**à droite**).



**Figure 42 : Voie extrinsèque.** D'après Couzinet *et al.*, 2002 et Borner *et al.*, 2003  
 FADD: Fas-associated death domain ; DD: death domain; DED: death effector domain; DISC: death-inducing signalling complex; Fas-L: Fas-Ligand.

l'activation d'éléments pro-apoptotiques comme les protéines de la super-famille Bcl-2 (Petit, Zamzami et al. 1997; Gross, McDonnell et al. 1999).

La fragmentation d'ADN survient lors de la condensation de la chromatine. En effet, une modification des flux calciques dans le cytoplasme de la cellule est responsable de l'activation de nombreuses enzymes, dont des endonucléases (Enari, Sakahira et al. 1998; Counis and Torriglia 2000; Wu, Stanfield et al. 2000). La chromatine est alors clivée en petits fragments doubles brins (Ucker, Obermiller et al. 1992; Wu, Stanfield et al. 2000). En électrophorèse, la migration de l'ADN fragmenté montre un profil en "échelle", avec des bandes de taille équivalente à des multiples de 180 - 200 paires de bases (Wyllie, Kerr et al. 1980) (**Figure 41**).

### 3. Mécanismes moléculaire

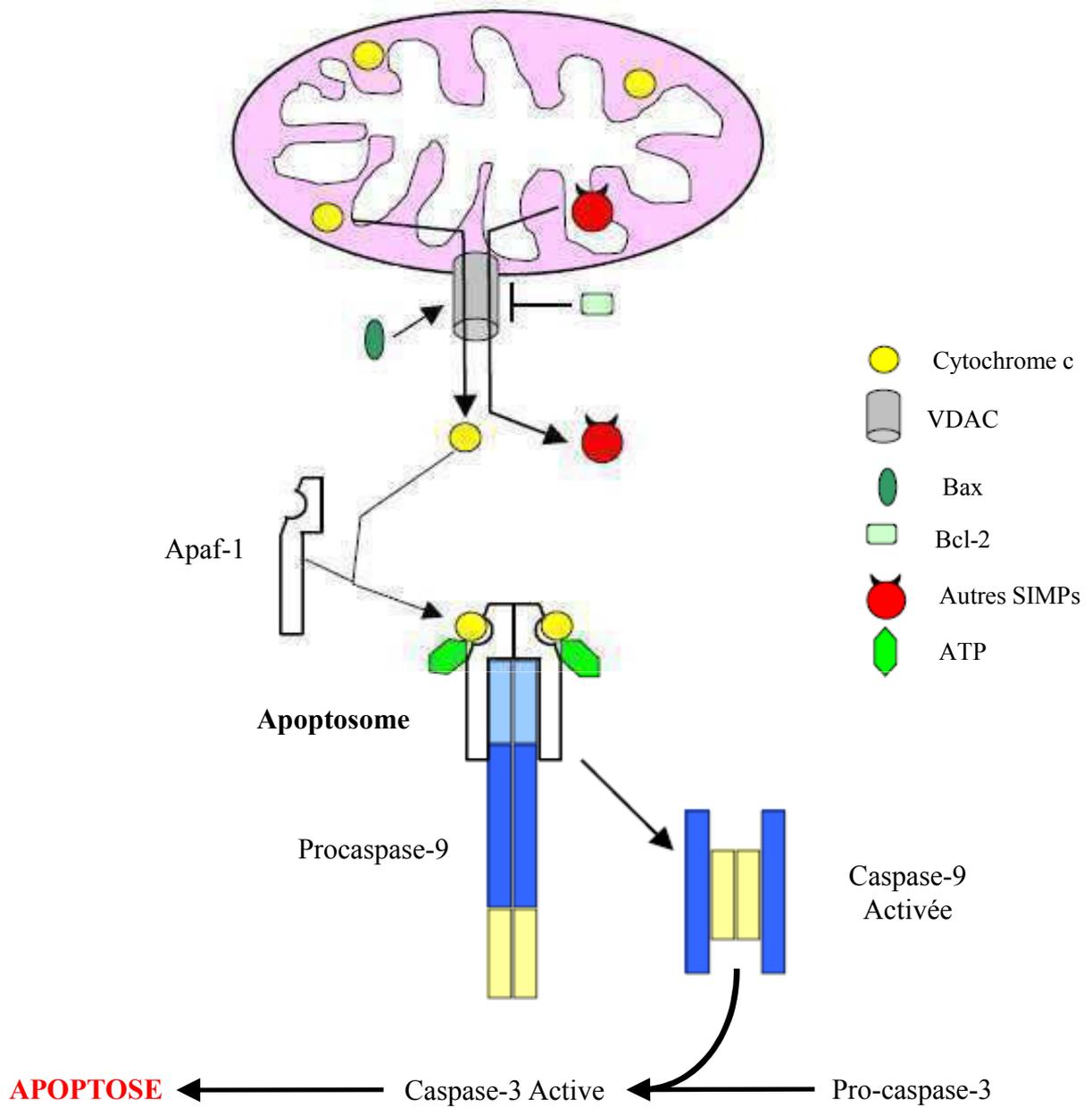
L'apoptose compte trois phases séquentielles : **(1) la phase d'initiation** est induite par de nombreux signaux, physiologiques comme pathologiques, intra comme extracellulaires. Ainsi l'apoptose peut être induite par certains récepteurs membranaires (Fas, TNF-R) suite à la fixation de leurs ligands, par des radiations ionisantes, des agents cytotoxiques, ou des chocs osmotiques... **(2) la phase d'exécution** où les différents signaux de mort sont alors intégrés par la cellule qui, en fonction de son phénotype et de son état physiologique, va orienter sa réponse vers la mort ou la survie. **(3) la phase de dégradation** protéolytique et nucléaire qui se traduit par des modifications morphologiques et biochimiques caractéristiques de l'apoptose. Les phases d'initiation et d'exécution sont réversibles et modulables par des facteurs anti-apoptotiques, alors que la phase de dégradation est irréversible.

En fonction du type d'effecteurs activés lors de l'apoptose, on distingue 2 voies : la voie caspase dépendante, la voie caspase indépendante.

#### 1.3. Voies caspase-dépendantes

En fonction de la caspase initiatrice concernée, les caspases peuvent être activées par la voie extrinsèque et/ou les voies intrinsèques.

➤ **La voie extrinsèque** : déclenchée suite à un signal extracellulaire, (**Figure 42**) est initiée à la surface cellulaire par la liaison d'un ligand sur son récepteur spécifique. Ces récepteurs sont appelés récepteurs de mort DR (Death Receptor) car leur activation déclenche une cascade d'évènements qui entraîne le processus apoptotique. Le domaine DD



**Figure 43 : Voie intrinsèque ou voie mitochondriale.**  
*D'après Couzinet et al., 2002*

du récepteur permet le recrutement séquentiel de plusieurs protéines adaptatrices cytoplasmiques comme TRADD (TNF-R-Receptor Associated Death Domain) ou FADD (Fas-Associated Death Domain). Ces protéines adaptatrices possèdent des domaines effecteurs de mort DED (Death Effector Domain) (comme TRADD) qui reconnaissent et fixent les DED des caspases initiatrices, notamment ceux des pro-caspases-8 et -10. Ces protéines adaptatrices et les caspases forment ainsi le casposome ou le complexe de signalisation de la mort induite, DISC (Death-Inducing Signalling Complex).

Pendant la formation du DISC, la pro-caspase-8 est clivée et convertie en caspase-8 active qui sera libérée du DISC. La caspase-8 active clive et active les caspases effectrices -3, -6 et -7, permettant l'amplification du signal apoptotique et le clivage de nombreux substrats, provoquant ainsi l'apoptose.

➤ **Les voies intrinsèques :**

✓ La voie mitochondriale (Figure 43) est déclenchée suite à un signal de stress intracellulaire tels que l'accumulation des ERO. Cette voie se caractérise par une perméabilisation des membranes mitochondriales qui est à l'origine de la chute du potentiel transmembranaire mitochondrial ( $\psi_m$ ), et de la libération de protéines pro-apoptotiques de l'espace intermembranaire vers le cytosol. Les protéines ainsi libérées sont maintenant regroupées sous le nom générique de SIMP (*Soluble Inter Membrane mitochondrial Proteins*) et possèdent toutes une activité pro-apoptotique. Cette étape de libération est sous le contrôle des protéines de la famille Bcl-2. Par exemple, Bcl-2 peut bloquer la sortie des SIMP alors que Bax facilite leur passage. Parmi les SIMPs on retrouve le cytochrome c, qui une fois libéré dans le cytosol, interagit avec la protéine Apaf-1 (Rodriguez and Lazebnik 1999) et la forme zymogène de la caspase-9, formant ainsi, en présence d'ATP, un complexe multiprotéique appelé apoptosome (Hill, Adrain et al. 2003). Ce complexe multiprotéique est à l'origine du clivage de la caspase-9 et de son activation. Cette dernière activera à son tour d'autres caspases exécutrices comme les caspases-3 ou -7 (Slee, Adrain et al. 1999).

✓ La voie du réticulum endoplasmique régule la synthèse et le repliement des protéines et a un rôle de maintien de l'homéostasie calcique. Il est essentiel à la survie de la cellule et toute perturbation de sa fonction induit l'apoptose. Le réticulum endoplasmique contient des molécules pro-apoptotiques (caspase-12, p28Bap31 et GADD153) (Rao, Hermel et al. 2001) et anti-apoptotiques (GRP78, calreticuline et DAD1) (Liu, Bowes et al. 1997). De plus, des études ont montré que des membres de la famille Bcl-2 (Bcl-XL, Bax, Bak et Bik) seraient



associés au réticulum endoplasmique pour réguler la perméabilité du RE, l'homéostasie calcique et donc la mort cellulaire (Germain and Shore 2003; Scorrano, Oakes et al. 2003).

Un stress au niveau du réticulum endoplasmique conduirait au déclenchement de l'apoptose via la caspase-12. La caspase-12 serait activée par la m-calpaïne (*cytosolic calcium-activated neutral cysteine endopeptidase*), par TRAF2 et par la caspase-7 (Nakagawa and Yuan 2000; Rao, Hermel et al. 2001; Yoneda, Imaizumi et al. 2001). Une augmentation de calcium cytosolique activerait la m-calpaïne, qui à son tour serait responsable du clivage et de l'activation de la procaspase-12 et du membre anti-apoptotique Bcl-XL. La protéine TRAF2 (TNF Receptor-Associated Factor 2) pourrait recruter et activer la caspase-12 (Yoneda, Imaizumi et al. 2001). Rao et al. a également décrit la translocation de la caspase-7 au niveau du réticulum endoplasmique après un stress (Rao, Hermel et al. 2001). Elle pourrait donc activer, par clivage, la caspase-12.

#### **1.4. Voies caspase-indépendantes**

➤ **La Voie des calpaïnes** : les calpaïnes sont des protéases calcium dépendantes. Deux isoformes majeures, la  $\mu$ -calpaïne et la m-calpaïne, ont été différenciées du fait de la concentration micromolaire et millimolaire en  $\text{Ca}^{2+}$  requise pour leur activité (Cong et al., 1989). A l'inverse des caspases, pour lesquelles plusieurs voies d'activation ont été décrites, les calpaïnes sont activées uniquement par l'élévation de la concentration en calcium intracellulaire. Une fois activées, les calpaïnes vont cliver leurs différents substrats et ainsi induire l'apoptose.

➤ **La Voie Mitochondriale Caspase-indépendante** : plusieurs protéines contenues dans l'espace intermembranaire de la mitochondrie peuvent induire l'apoptose directement, sans activation des caspases. C'est le cas de l'AIF et de l'endonucléase G (endo G) qui sont libérés de la mitochondrie puis transloqués dans le noyau induisant la condensation de la chromatine et la fragmentation de l'ADN.

#### **1.5. Interactions des voies**

Toutes les voies apoptotiques décrites précédemment sont présentes dans la cellule peuvent agir indépendamment les unes des autres ou s'interconnecter.

➤ **Interconnexions calpaïnes et caspases**. D'une part, certaines caspases sont des substrats des calpaïnes comme, par exemple, la pro-caspase-3 (McGinnis, Gnegy et al. 1999). Il a aussi été démontré que les calpaïnes clivent les caspases effectrices 3 et 7, la caspase-9 et



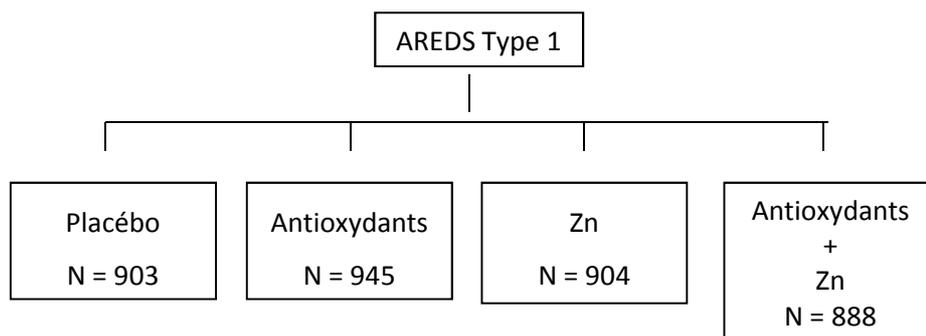
la caspase-12 avec des conséquences variables d'une étude à l'autre, et selon la caspase considérée. Le clivage en position N-terminale de la caspase-3 par les calpaïnes en un polypeptide de 30kDa induit l'activation de la caspase dans un cas, et inhibe son activation dans une autre étude (McGinnis, Gnegy et al. 1999; Blomgren, Zhu et al. 2001). Le clivage en N-terminal de la caspase-9 par les calpaïnes rend la caspase-9 incapable d'activer la caspase-3 (Chua, Guo et al. 2000; Lankiewicz, Marc Luetjens et al. 2000). L'activation de la caspase-7 par les calpaïnes a été démontrée in vivo dans une lignée B, mais aussi in vitro, par clivage de son précurseur. Cette protéolyse active la caspase et conduit les cellules à l'apoptose (Ruiz-Vela, Gonzalez de Buitrago et al. 1999). Pour finir, le clivage de la caspase-12 par les calpaïnes est nécessaire à l'activation de la voie du RE. D'autre part les caspases peuvent réguler l'activité des calpaïnes en agissant sur leur inhibiteur endogène : la calpastatine. Les caspases sont capables de cliver cet inhibiteur in vitro et dans des cellules en culture, levant ainsi l'inhibition des calpaïnes par la calpastatine (Wang, Posmantur et al. 1998; Kato, Nonaka et al. 2000).

➤ **Interconnexion entre les voies caspase-dépendantes membranaire et mitochondriale.** La caspase-8 activée dans la voie caspase-dépendante membranaire est capable de cliver Bid, un membre de la famille Bcl-2 à domaine BH3 (c'est-à-dire pro-apoptotique). Bid clivé (tBid) est transféré du cytoplasme à la mitochondrie où il se lie à Bax induisant l'oligomérisation de ce dernier et la formation de pores dans la membrane mitochondriale et donc l'activation de la voie caspase-dépendante mitochondriale avec la chute du potentiel transmembranaire mitochondrial, la libération du cytochrome c et l'activation de la caspase-9 (Eskes, Desagher et al. 2000).

➤ **Interconnexion entre les voies mitochondriales caspase-indépendante et caspase-dépendante.** La libération de l'AIF, bien qu'étant une voie caspase-indépendante peut conduire à l'activation des caspases. En effet, la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale, qui permet le relargage de l'AIF, est aussi responsable de la libération du cytochrome c et de la procaspase-9 (Susin, Lorenzo et al. 1999).

## 4. Apoptose et DMLA

L'étude post-mortem de rétine de patients atteints de DMLA (Dunaief, Dentchev et al. 2002) a mis en évidence la présence de marqueurs d'apoptose (Abler, Chang et al. 1996) par des techniques histologiques, immunohistochimiques et microscopiques.



**Figure 44: Schéma expérimental de l'étude AREDS I.** Les patients reçoivent une supplémentation soit en antioxydants (Vitamine C + Vitamine E), Zinc (Zn) ou antioxydants et zinc (Antioxydants + Zn)

**Tableau 8. Apports journaliers recommandés (AJR), apports nutritionnels conseillés, et dose de l'étude AREDS I**

	AREDS	AJR	ANC homme	ANC femme
<b>Vitamine C (mg)</b>	500	60	110	110
<b>Vitamine E (mg)</b>	268 (400 IU)	10	12	12
<b><math>\beta</math>-carotène (mg)</b>	15	4,8	2,1	2,1
<b>Zinc (mg)</b>	80	15	1,2	10
<b>Cuivre (mg)</b>	2	2,5	2,0	1,5

## IV. Compléments alimentaires et dégénérescence maculaire liée à l'âge

### A. Etudes épidémiologiques

Le stress oxydatif, l'inflammation et les lésions oxydatives de la rétine, qui sont impliqués dans la pathogénie de la DMLA, ont conduit à la l'hypothèse selon laquelle les vitamines et les micronutriments peuvent, en raison de leurs propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires, être bénéfiques pour les patients atteints de DMLA. Toutefois des données cliniques obtenues à partir d'études randomisées interventionnelles manquaient. Pour combler cette lacune, l'US National Eye Institute a lancé, en 1992, l'étude Age Related Disease Study (AREDS) dont les premiers résultats ont été publiés en 1999. A l'heure actuelle, cette étude reste l'étude de référence dans la mise en place de la composition des compléments alimentaires contre la DMLA.

#### 1. Etude Age-Related Disease Study (AREDS)

Cette étude est la première étude interventionnelle ayant pour objectif de déterminer l'influence de la supplémentation sur le développement et la progression de la DMLA.

##### 1.1. AREDS I

###### *Descriptive*

La première étude (AREDS I) était une grande étude multicentrique randomisée en double aveugle contrôlée par un groupe placebo. Elle a porté sur 3 640 patients âgés de 55 à 80 ans qui ont été suivis sur une période de 6,3 ans (entre 1992 et 1998) à raison d'un examen tous les 6 mois. Les patients ont été classés en quatre groupes selon divers stades de DMLA. L'objectif de l'étude était d'étudier l'effet d'une supplémentation orale à forte dose de vitamines C et E, de  $\beta$ - carotène et de zinc sur la progression de la DMLA.

Les groupes d'antioxydants étudiés étaient les suivants : \*groupe 1 : « Les antioxydants »: vitamine C (500 mg/j), vitamine E (400 UI/j) et bêta-carotène (15 mg/j) ; \*groupe 2 : « zinc » : oxyde de zinc (80 mg/j) et oxyde de cuivre (2 mg/j), \*groupe 3: « antioxydants plus zinc » et \*groupe 4 : « placebo » (**Figure 44, Tableau 8**).



## Résultats

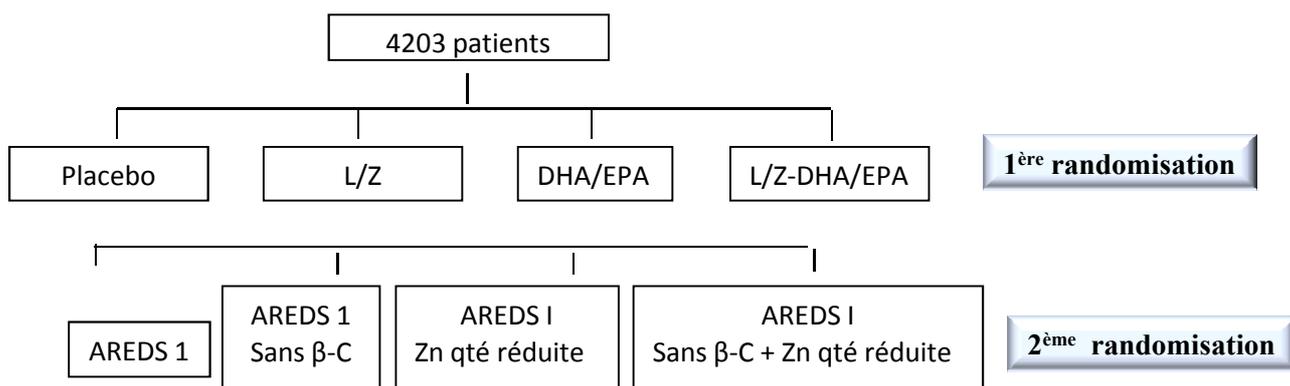
Une supplémentation en antioxydants et zinc conduit à une réduction de 25 % du risque de progression de la DMLA (passage d'un stade 3 vers un stade 4) et une diminution de 19 % du risque de perte d'acuité visuelle. Une supplémentation en vitamines réduit le risque de la progression de la DMLA de 28% (Age-Related Eye Disease Study Research 2001). L'étude AREDS est la première étude à valider l'effet préventif sur l'évolution de la DMLA aux stades 3 et 4 de la maladie pour prévenir l'émergence des formes sévères.

## Limites

Quelques limites à l'étude AREDS ont été soulignées :

-Les doses utilisées dépassent les recommandations quotidiennes (Gaynes 2003; Wilkinson and Fraunfelder 2011). Ces doses soulèvent donc la sécurité d'une supplémentation à long terme. Par exemple, il a été montré que l'administration journalière d'une dose de 50 mg de zinc pendant plusieurs mois provoque une baisse de la ferritine, une baisse de la concentration sanguine de cuivre et une baisse de l'activité de la SOD et serait associé à un risque plus élevé de troubles génito-urinaires.

- En raison de ses propriétés antioxydantes, le  $\beta$ -carotène a été inclus dans des suppléments multivitaminiques de l'étude AREDS I (2001; Stahl 2005; SanGiovanni, Chew et al. 2007). Par la suite, il a été reporté que le risque de développer la DMLA chez les individus avec un apport alimentaire élevé de  $\beta$ -carotène est augmenté (Tan, Wang et al. 2008; Evans and Lawrenson 2012). De plus, plusieurs effets néfastes de la supplémentation en  $\beta$ -carotène ont été décrits, en particulier une augmentation de la probabilité de développer un cancer du poumon chez les fumeurs et les anciens fumeurs. Dans l'étude CARET (bêta-carotène et Retinol Efficacy Trial), la combinaison de 30 mg/jour de  $\beta$ - carotène et de rétinol (vitamine A) a augmenté le risque de cancer du poumon de 28 % après 4 ans (Omenn, Goodman et al. 1996); tandis que dans l'étude ATBC (Alpha-Tocophérol Beta-Carotène), ce risque a été augmenté de 16% après 6 ans avec une supplémentation de 20 mg/j de  $\beta$ - carotène (1994). L'utilisation de  $\beta$ -carotène dans la prévention de la DMLA a été revue en raison des effets secondaires potentiels et de sa faible efficacité relative dans la réduction du risque de DMLA (Evans and Lawrenson 2012).



**Figure 45: Schéma expérimental de l'étude AREDS II.** La première randomisation inclue 4 groupes : placebo ; lutéine/ zéaxanthine (L/Z), acide docosahéxanoïque/acide pentaénoïque (DHA/EPA) ou une combinaison des deux derniers. La deuxième randomisation inclue la supplémentation avec la formule originale d'AREDS 1, la formulation AREDS 1 sans  $\beta$ -carotène (sans  $\beta$ -C), la formulation AREDS 1 avec une quantité plus réduite en zinc (Zn qté réduite) ou la formulation AREDS 1 sans  $\beta$ -carotène 1 avec une quantité plus réduite en zinc (sans  $\beta$ -C, Zn qté réduite).

**Tableau 9. La composition de la supplémentation modifiée de l'étude AREDS I au niveau de la deuxième randomisation dans l'essai AREDS II.** Les fumeurs sont seulement randomisés dans le groupe qui ne contient pas de  $\beta$ -carotène

	AREDS I	AREDS I Sans $\beta$ -C	AREDS I Zn qté réduite	AREDS I Sans $\beta$ -C + Zn qté réduite
<b>Vitamine C (mg)</b>	500	500	500	500
<b>Vitamine E (UI)</b>	400	400	400	400
<b>Béta-carotène (mg)</b>	15	0	15	0
<b>Oxyde de Zinc (mg)</b>	80	80	25	25
<b>Cuivre (mg)</b>	2	2	2	2

## 1.2. AREDS II

### *Descriptive*

Une deuxième étude (AREDS II) a été mise en place pour surmonter les limites de l'étude AREDS I et étudier l'intérêt d'autres nutriments pouvant prévenir ou ralentir la DMLA. C'est une étude randomisée en double aveugle contrôlée par un groupe placebo qui s'est étendue sur cinq ans.

L'étude visait à évaluer des formulations AREDS I modifiées (sans bêta-carotène ou avec des doses de zinc réduite) et l'intérêt de l'association des oméga-3 et des pigments maculaires (Lutéine et zéaxanthine) dans la diminution du risque de DMLA.

Les sujets d'AREDS II présentaient une DMLA plus avancée que ceux de l'étude AREDS I (Group, Chew et al. 2012). La **figure 45** présente le schéma expérimental de l'étude : les patients reçoivent soit un placebo, soit des caroténoïdes (10 mg de lutéine et 2 mg de zéaxanthine par jour), soit des oméga-3 à longues chaînes (650 mg d'EPA et 350 mg de DHA par jour), soit lutéine, zéaxanthine et oméga-3. Au deuxième niveau de randomisation, les patients reçoivent en plus (**Figure 45, Tableau 9**) soit la formule originale AREDS I, soit la formule AREDS I avec un taux réduit de zinc (25 mg contre 80 mg dans AREDS I), soit la formule AREDS I sans bêta-carotène ou soit la formule AREDS I avec un taux réduit de zinc (25 mg) et sans  $\beta$ -carotène. Tous les participants potentiels à l'étude AREDS II ont été interrogés concernant leurs habitudes de consommation de tabac. Pour les participants fumeurs ou anciens fumeurs (arrêt dans l'année), la randomisation avec les formules contenant le  $\beta$ -carotène n'a pas été autorisée.

### *Résultats*

L'étude a conclu que la lutéine/zéaxanthine a permis une réduction de 10 % de la DMLA avancée et une réduction de 26 % du risque de progression vers une DMLA avancée /néovasculaire chez les patients ayant reçu ces caroténoïdes. Les résultats privilégient également des doses de 25 à 80 mg de zinc dans la formulation finale. Alors que omégas-3 n'ont pas montré d'effets protecteurs, le document officiel du National Health Institute stipule que la dose d'acides gras utilisée, la durée du traitement, le rapport DHA/EPA et/ou l'utilisation de la forme ester éthylique des acides gras, connue pour diminuer la biodisponibilité (Yang, Kuksis et al. 1990), n'étaient pas adéquats.



## **2. Autres Etudes**

Bien que les études AREDS I et AREDS II soient de loin les plus grandes études interventionnelles portant sur l'effet de la supplémentation en vitamines et anti-oxydants sur la progression de DMLA, plusieurs études à plus petite échelle ont été réalisées.

Ainsi, l'étude Lutéine Antioxydant Supplementation Trial (LAST), randomisée en double aveugle, a examiné l'effet de la supplémentation en lutéine et antioxydant chez 90 patients atteints de la forme atrophique (sèche) de la DMLA après un suivi sur 12 mois. Les données de cette étude indiquent que, après une période de supplémentation sur 12 mois, la fonction visuelle a été améliorée chez les patients prenant la lutéine seule ou avec d'autres nutriments (Richer, Stiles et al. 2004).

Une autre étude à petite échelle (TOZAL) a évalué l'effet de la supplémentation en Taurine, en acides gras oméga-3, en zinc, en antioxydants et en lutéine sur la DMLA (Cangemi 2007). Cette étude est un essai prospectif, en double aveugle, sur 6 mois et a inclus 73 sujets avec au moins un œil diagnostiqué avec la DMLA sèche. 77 % des patients recevant le supplément nutritionnel montrent une stabilisation ou une amélioration de l'acuité visuelle à 6 mois.

L'étude italienne Carotenoids in Age-related Maculopathy (CARMIS) est une étude multicentrique, prospective, randomisée, 145 patients ont reçu au hasard soit une supplémentation contenant des vitamines, la lutéine, la zéaxanthine et l'astaxanthine ou le placebo. Les auteurs rapportent que les patients traités avec la combinaison anti-oxydant présentaient une stabilisation ou une amélioration significative de l'acuité visuelle (Parisi, Tedeschi et al. 2008).

En conclusion, les différentes études interventionnelles, à grand ou à petit échelle, ont mis en évidence que la supplémentation alimentaire riche en antioxydant, en caroténoïdes (lutéine zéaxanthine) et en acides gras oméga-3 limite la progression de la DMLA atrophique.

## **B...Compléments alimentaire à visée oculaire**

### **1. Introduction**

Sur la base des études interventionnelles, des compléments alimentaires à visé oculaire ont envahi le marché. La quasi-totalité des compléments alimentaires à visé oculaire

**Tableau 10. Composition du complément alimentaire**

Ingrédients	mg/capsule	AJR (mg)	ANC homme (mg)	ANC (mg)	femme
<b>Vitamines</b>					
Vitamine C	90	80	90		75
Vitamine E	15	12	12		12
<b>Oligoéléments</b>					
Zinc	7.5	10	12		10
Cuivre	0.5	1	1,5		
<b>Huile de poisson</b>					
EPA	139	250	250		250
DHA	70	250	250		250
<b>Caroténoïdes</b>					
Lutéine	5	ND*	<6		<6
Zéaxanthine	1	ND*	ND*		ND*
<b>Résvératrol</b>					
Résvératrol	0.5	ND*	ND*		ND*

\*ND : non déterminé. Etant donné que la lutéine et la zéaxanthine ne sont pas considérées jusqu'à présent comme des nutriments indispensables, aucune recommandation d'apport nutritionnel n'a été établie. Les apports mesurés auprès de la population des pays industrialisés seraient de 1 à 2 mg par jour. Cependant, les effets bénéfiques de la lutéine observés vis-à-vis de la DMLA suggèrent un apport optimal de 10 mg de lutéine et 2 mg de zéaxanthine par jour.

commercialisés à l'heure actuelle (Annexe 1) contient de la vitamine C, la vitamine E, du zinc, du cuivre, de la lutéine, de la zéaxanthine, de l'huile de poisson auxquels sont rajoutés d'autres ingrédients comme la vitamine B, la vitamine A, du résvératrol ou de squalène...

Dans le cadre de cette thèse, nous nous focalisons sur un complément alimentaire à visé oculaire actuellement sur le marché en France et en Tunisie. Ce complément alimentaire est couramment prescrit par les ophtalmologues pour les patients atteints de DMLA.

## 2. Le complément alimentaire testé

### 2.1. Définitions

✓ Apports journaliers recommandés (AJR) sont des valeurs moyennes harmonisées au niveau européen pour toute la population. Cette valeur se base sur les besoins d'un adulte d'âge moyen en bonne santé et donc ne tient pas compte du sexe. Les AJR sont des valeurs établies comme référence pour la législation et l'industrie. Si on respecte quotidiennement les AJR de principales vitamines et minéraux, les risques de carence sont faibles.

✓ Les apports nutritionnels conseillés (ANC) pour la population française sont des repères établis à partir des données scientifiques et des habitudes alimentaires dans un objectif de santé publique. Les ANC sont des normes dictées par l'AFSSA (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments) qui permettent de couvrir les besoins de la quasi-totalité (97,5%) de la population. L'ANC tient compte du sexe et de l'âge. Plus on s'éloigne des ANC et plus le risque de carence est important.

### 2.2. Composition

Le complément alimentaire testé contient : des vitamines (la vitamine C, la vitamine E), des oligoéléments (le zinc, le cuivre), de l'huile de poisson, des caroténoïdes (la lutéine, la zéaxanthine) et du résvératrol. **Le tableau 10** présente pour chaque ingrédient la quantité présente dans le complément alimentaire, l'apport journalier recommandé (AJR) et l'apport nutritionnel conseillé (ANC). On peut remarquer que la quantité des ingrédients est égale à l'ANC sauf pour les acides gras dont la quantité est inférieure à l'ANC.

### 2.3. Résvératrol

Le résvératrol est un polyphénol. Les polyphénols sont des molécules principalement produites par les végétaux. Le résvératrol appartient à la famille des stylbènes ce qui signifie qu'il est constitué de deux cycles aromatiques, contenant des groupes hydroxyle, reliés par un



pont de méthylène. Cette structure poly-phénolique confère au résvératrol des propriétés anti-oxydantes. Une première impulsion pour la recherche sur le résvératrol est venue de l'observation d'une faible incidence de maladies cardiovasculaires chez les français connus pour leur consommation élevée en graisses, un phénomène connu sous le terme de « french paradox », et dont la consommation de vin rouge a été suggérée pour contribuer à cette protection en raison de sa forte teneur en résvératrol. En effet, la grande majorité de polyphénol, dont le résvératrol, se trouve dans les pépins et la peau des raisins, les deux étant conservés au cours de la fabrication de vin rouge au contraire des vins blancs. Ainsi, l'effet protecteur contre les maladies cardiovasculaires a été attribué au résvératrol qui est biologiquement le principal polyphénol actif dans le vin rouge et connu pour ses propriétés anti-oxydantes. Il existe d'autres sources alimentaires pour le résvératrol notamment les arachides et les myrtilles.

Par la suite, des études ont montré que le résvératrol présente des propriétés anti-oxydantes, anti-inflammatoires, anti-apoptotiques et anti-angiogéniques.

**Activités anti-oxydantes** : Des études réalisées sur des lignées cellulaires humaines d'EPR (D407, ARPE-19) ont montré que le résvératrol protège les cellules contre la cytotoxicité et le stress induit par le peroxyde d'hydrogène (500  $\mu$ M, 1h) (Pintea, Rugina et al. 2011) ou par l'acroléine (25  $\mu$ M) (Sheu, Liu et al. 2013) qui peut être synthétisé suite à la peroxydation lipidique (Stevens and Maier 2008; Sheu, Liu et al. 2013). Le résvératrol augmente significativement et de manière dose-dépendante l'activité des enzymes anti-oxydantes telles que le superoxyde dismutase, le glutathion peroxydase et la catalase, et améliore le taux de glutathion réduit à la fois dans des conditions basales et au cours du stress oxydatif (Pintea, Rugina et al. 2011). Il augmente l'activation bioénergétique mitochondriale par deux mécanismes : le premier grâce à une augmentation de la capacité maximale de la phosphorylation oxydative et le second en orientant la production d'énergie vers la phosphorylation oxydative aérobie très efficace plutôt que vers la glycolyse anaérobie moins efficace (Sheu, Liu et al. 2013).

**Activités anti-inflammatoires** : Le rôle anti-inflammatoire que le résvératrol joue au niveau de la rétine est dû en premier lieu à ses activités anti-oxydantes et en second lieu à sa capacité d'être un activateur puissant de la SIRT 1. SIRT 1 est une protéine enzymatique histone désacétylase qui joue un rôle dans l'inflammation. SIRT 1 inhibe l'activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B soit par la désacétylation de la sous unité p65 du NF- $\kappa$ B soit en augmentant l'activation de PPAR- $\alpha$  (Kauppinen, Suuronen et al. 2013). Kubota et al., ont



montré, dans un modèle de dégénérescence rétinienne induite par la lumière, que l'activité de SIRT 1 est diminuée au cours de l'exposition à la lumière alors qu'elle est restaurée suite au traitement avec du résvératrol (Kubota, Kurihara et al. 2010). Ces résultats sont en adéquation avec d'autres études qui ont montré que l'administration du résvératrol chez rats, dans un modèle d'uvéites induites par endotoxine, augmente l'activation de SIRT1 et diminue par conséquent l'activation de NF-κB (Kubota, Kurihara et al. 2009).

**Activité anti-apoptotique** : Le résvératrol joue un rôle anti-apoptotique. En effet, Il a été montré qu'*in-vitro* le résvératrol (100 μM) protège les cellules EPR contre la mort cellulaire induite par le stress oxydant (King, Kent et al. 2005; Qin, Lu et al. 2014), inhibe la translocation de la protéine pro apoptotique BAX au niveau de la mitochondrie, réduisant la mort cellulaire (Adamus, Webb et al. 2006). *In-vivo*, une supplémentation en résvératrol chez des souris BLB/c (50 mg/kg) pendant 5 jours protège contre la dégénérescence rétinienne induite par la lumière, suite à l'inhibition de l'activité du facteur de transcription AP-1, responsable de la régulation et de la prolifération cellulaire (Kubota, Kurihara et al. 2010).

**Activité anti-angiogénique** : le résvératrol joue un rôle anti-angiogénique au niveau de la rétine. Un rapport sur trois cas de supplémentation basée sur le résvératrol chez les octogénaires atteints de DMLA a montré un effet de courte durée similaire à celui trouvé avec le traitement anti-VEGF. Cet effet est accompagné par la restauration anatomique incluant de la structure de la rétine et l'amélioration de la fonction de l'EPR (Richer, Stiles et al. 2013). Des études récentes ont montré que le résvératrol inhibe l'expression et la sécrétion de VEGF induites par l'hypoxie dans des cellules humaine d'EPR (Nagineeni, Raju et al. 2014) et dans la lignée cellulaire d'endothéliale immortalisée dérivée de la choroïde rétinienne de singes (Balaiya, Murthy et al. 2013). Il a été montré récemment que l'effet anti-angiogénique du résvératrol passe par l'activation de SIRT1 (Zhang, He et al. 2015).

## **2.4. Métabolisme des composants**

Le complément alimentaire testé est sous forme de gélules et est administré par voie orale. Les différents nutriments vont donc être métabolisés avant d'atteindre le tissu cible, la rétine

### **2.4.1. Vitamines**

❖ Vitamine C : Il a été montré chez le rat, que la vitamine C est principalement transportée à travers la barrière hémato-rétinienne sous forme d'acide déhydroascorbique par



les transporteurs de facilitation de glucose, dont le plus probable est GLUT1, et s'accumule au niveau de la rétine sous forme d'acide ascorbique (Hosoya, Minamizono et al. 2004).

❖ Vitamine E: L'absorption intestinale de la vitamine E est passive, et fait appel aux micelles. Cette absorption est ainsi étroitement associée à l'absorption des acides gras. Une fois absorbée, la vitamine E se lie au niveau du foie aux chylomicrons VLDL et est distribuée aux différents organes.

#### 2.4.2. Oligoéléments

❖ Zinc: Le transport du zinc à travers les membranes tissulaires nécessite une protéine de transport (Wang, Danscher et al. 2003). Récemment dans les rétines de souris, il a été mis en évidence la présence de la protéine de transport au zinc ZnT-3 au niveau des segments internes des photorécepteurs (Redenti and Chappell 2004). Toutefois, les mécanismes du transport du zinc jusqu'à la rétine reste non clairs (Wills, Ramanujam et al. 2008).

❖ Cuivre: 30 % du cuivre est absorbé au niveau du tube digestif. Mais ce taux dépend de la présence de substances alimentaires pouvant modifier son absorption : par exemple les acides aminés augmentent son absorption tandis que le zinc ou les phytates (aliment contenant du phosphore, d'origine végétale) la diminuent. Le cuivre circule dans le sang lié à l'albumine et se rend vers le foie où il se lie à la céruloplasmine. Ce dernier complexe est la forme de transport du cuivre vers les organes cibles. Au niveau de l'EPR, le cuivre est pris en charge par la protéine Ctrl pour être distribué au niveau des photorécepteurs.

#### 2.4.3. Caroténoïdes

La lutéine et la zéaxanthine sont hydrolysées par les enzymes gastro-intestinales tels que la cholestérol estérase, puis incorporées dans les micelles et absorbées par les entérocytes. Une fois absorbées, lutéine et zéaxanthine sont transportées dans le sang par les chylomicrons jusqu'au foie où elles sont stockées ou métabolisées puis transportées par des lipoprotéines et distribuées vers de nombreux tissus via la circulation sanguine (Clevidence and Bieri 1993). Les HDL sont les transporteurs majoritaires de la lutéine (52 %) et de la zéaxanthine (44 %) vers la rétine (Wang, Connor et al. 2007; Wang, Connor et al. 2007; Loane, Nolan et al. 2010; Mutungi, Waters et al. 2010). Les LDL ne transportent que 22 % de la lutéine et zéaxanthine (Wang, Connor et al. 2007).

L'absorption par la rétine des deux xanthophylles implique probablement des mécanismes différents (Loane, Nolan et al. 2008). Une isoforme de la Gluthation S Transférase (GSTP1) a été identifiée comme une protéine spécifique de liaison de la



zéaxanthine dans la macula (Li et al., 2010), et StARD3 (également connu sous le nom MLN64) serait la protéine spécifique de liaison de la lutéine (Li et al., 2011). StARD3 serait localisée dans les segments internes des cônes et l'EPR humain (Rapp, Maple et al. 2000).

La biodisponibilité de la lutéine est dépendante de nombreux facteurs, en particulier la teneur en matière grasse puisqu'elle est lipophile. Ainsi les lipides améliorent son absorption (Roodenburg, Leenen et al. 2000).

La lutéine peut aussi être convertie en méso-zéaxanthine. Ce métabolite ne se trouve pas dans le plasma humain ou le foie, mais est présent seulement dans les tissus oculaires et sa concentration est maximale au centre de la macula suggérant des voies métaboliques spécifiques dans l'œil (Khachik, de Moura et al. 2002).

#### **2.4.4. Lipides**

Durant les premières phases de l'absorption des lipides alimentaires, les acides gras libres sont hydrolysés au niveau des positions *sn-1* et *sn-3* des triglycérides par la lipase pancréatique au sein de l'intestin. Le DHA semble occuper essentiellement la position *sn-2* du 2-monoglycéride résultant. L'EPA peut occuper la *sn-3*, et dans une moindre mesure, la *sn-1* position (Nettleton, 1995). Les AGPI-LC libres et les AGPI-LC - monoacylglycérole sont ensuite estérifiés dans les triglycérides et les phospholipides au niveau des entérocytes de l'épithélium intestinal. Ils sont ensuite intégrés dans les chylomicrons et les lipoprotéines à très faible densité (VLDL), sécrétés dans le système lymphatique, et diffusés à partir du canal thoracique via le sang vers le foie.

L'approvisionnement des photorécepteurs en DHA se déroule de deux manières : une boucle longue ou une boucle courte.

1/ Dans la boucle longue : Le DHA et/ou l'acide alpha linoléique (18:3 n-3) sont transportés à partir du foie sous forme de lipoprotéines et livrés à la rétine via les choriocapillaires puis l'EPR.

2/ Dans la boucle courte : le DHA est recyclé par l'EPR suite à la phagocytose des segments externes.

Le DHA délivré par la boucle longue ou courte est intégré dans les photorécepteurs au niveau des segments internes. Le cil connecteur permet la circulation du DHA vers le segment externe pour servir à la biogenèse des membranes de disques. (Scott and Bazan 1989; Bazan 2006).

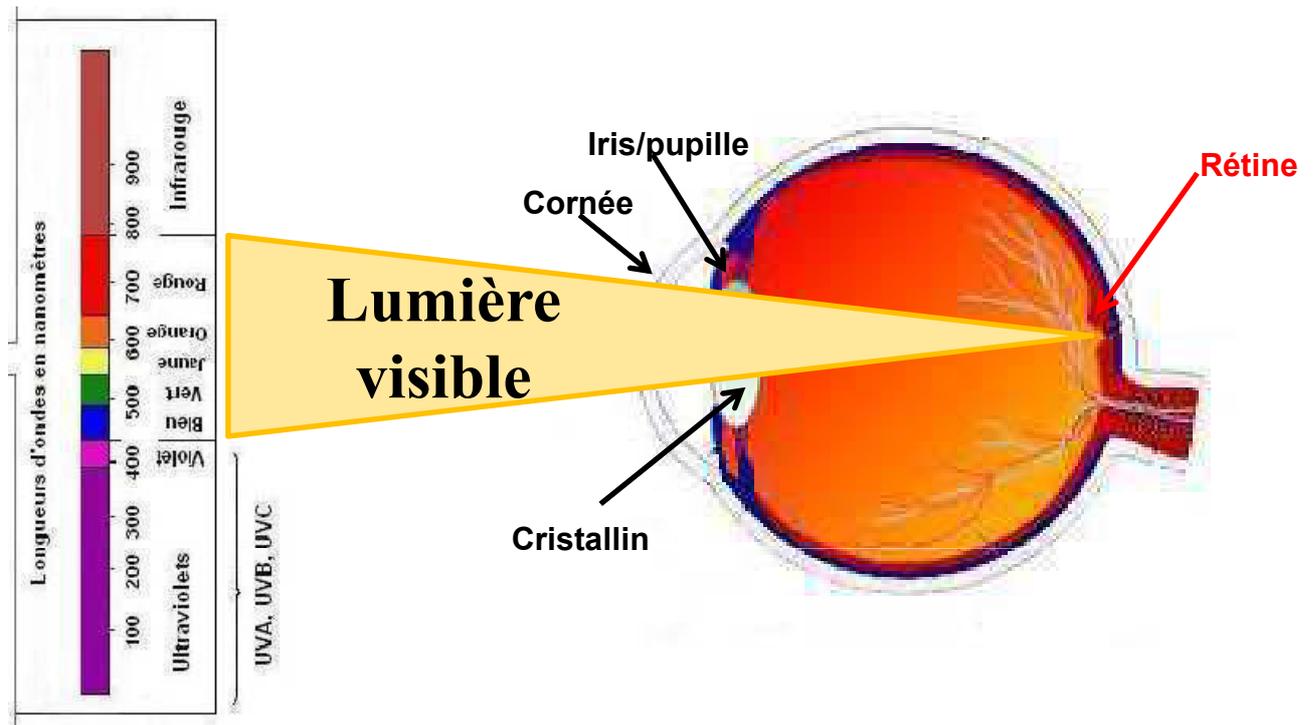


Figure 46 : Illustration schématique de l'absorption des rayonnements électromagnétiques de la lumière visible

#### 2.4.5. Résvératrol

Chez l'homme, 70 % de la quantité de résvératrol alimentaire ingérée (25 mg) est absorbée, avec des pics de concentrations plasmatiques pour le résvératrol et ses métabolites de  $491 \pm 90$  ng/ml (environ 2  $\mu$ M). Cependant, seulement des traces de résvératrol non métabolisé (< 5ng/ml) sont détectées dans le plasma (Walle, Hsieh et al. 2004). En effet, le résvératrol ingéré est absorbé par diffusion au niveau des entérocytes et est rapidement métabolisé par les entérocytes ou le foie en dérivés avant d'être éliminé dans les urines (Meng, Maliakal et al. 2004; Walle, Hsieh et al. 2004). Le résvératrol est métabolisé selon 3 voies métaboliques : 1/la conjugaison de son groupe phénolique en acide glucuronique et 2/ en acide sulfate (Soleas, Yan et al. 2001) et 3/ l'hydrogénation des doubles liaisons aliphatiques probablement par la microflore intestinale (Walle, Hsieh et al. 2004). La conjugaison rapide du résvératrol en acide sulfate semble être l'étape limitante de la biodisponibilité du résvératrol (Walle, Hsieh et al. 2004).

Chez l'animal, un grand nombre d'études sur la biodisponibilité du résvératrol ont été menées. En général, les doses de résvératrol testés sont plus élevées chez les animaux que chez l'homme. Cependant, comme chez l'homme, la biodisponibilité orale du résvératrol chez les animaux semble être faible et le métabolisme implique à la fois la conjugaison en acide glucuronique et acide sulfate.

## V. Modèle expérimental : phtodégénérescence rétinienne

Le modèle de photodégénérescence rétinienne consiste à induire une dégénérescence des cellules rétiniennes par exposition à la lumière. La lumière fait partie du spectre des ondes électromagnétique. La partie qui correspond à la lumière visible pour l'œil s'étend entre 390 nm et 780 nm, on parle du spectre visible ou spectre de la lumière. Ce spectre visible est compris entre deux zones de rayonnement invisibles, les infrarouges (longueur d'ondes supérieure à 750 nm) et les ultraviolets (UV) qui comprend 3 parties les UV A, les UV B et les UV C (longueurs d'onde inférieure à 380 nm) (**Figure 46**). Les rayonnements électromagnétiques qui atteignent la rétine après traversée des différents milieux et tissus oculaires sont compris entre 390 et 1400 nm. Toutefois, chez les jeunes enfants, des UV-B (295-315 nm) et des UV-A (315-390) peuvent atteindre la rétine car les propriétés filtrantes de la cornée et du cristallin ne sont pas optimales avant l'âge de 22 ans.



## 1. Types de lésions induites par la lumière

La lumière visible et infrarouge peuvent induire des lésions tissulaires par l'intermédiaire d'au moins 3 mécanismes : photothermiques, photomécaniques et photochimiques :

Les lésions photothermiques se produisent lorsque l'énergie transférée par la lumière au tissu conduit à une augmentation de température. Cette augmentation de température conduit à la dénaturation de protéines. Ce phénomène est notamment utilisé dans la photocoagulation thermique. Les lésions photomécaniques sont produites pour des expositions intenses pulsées de l'ordre de la nanoseconde comme par exemple les lasers pulsés. Alors que les lésions photochimiques se produisent lorsque la lumière est absorbée par un chromophore et conduit à la formation d'un état excité de la molécule qui ensuite subit elle-même une transformation chimique ou interagit avec d'autres molécules conduisant à des modifications chimiques des deux molécules ou au transfert d'énergie à une autre molécule. Les réactions photochimiques n'entraînent pas d'élévation de la température. Dans certaines lésions photochimiques, le chromophore dans son état excité forme un état excité triplet. Cet état triplet a une durée relativement longue permettant des interactions avec d'autres molécules et la formation de radicaux libres, par transfert d'électron (lésions photochimiques de type I) ou produisant de l'oxygène singulet par transfert de l'énergie d'excitation à une molécule d'oxygène (lésions photochimiques de type II). Les photosensibilisateurs peuvent agir comme catalyseur de l'étendue des lésions où de nombreux radicaux libres et molécules d'oxygène singulet sont générés par une seule molécule de photosensibilisateur qui est en permanence recyclé à son état fondamental. La rétine contient un grand nombre de molécules photosensibilisantes qui peuvent être excitées par la lumière visible/infrarouge atteignant la rétine. Les photorécepteurs et l'épithélium pigmentaire rétinien (EPR) en contact avec la vascularisation choroïdienne sont très oxygénés offrant des conditions potentiellement favorables aux lésions photochimiques médiées par l'oxygène.

## 2. Lésions induites par la lumière chez l'homme

Les lésions photochimiques sont les formes les plus courantes de lésions rétiniennes qui peuvent être causées par la lumière du soleil ou les sources de lumière artificielle dont les instruments ophtalmologiques. Les lésions rétiniennes induites par une exposition au soleil sont connues sous le nom de rétinopathies solaires. De telles rétinopathies ont été rapportées depuis longtemps, suite aux éclipses solaires, et même encore aujourd'hui, chaque nouvelle



éclipse conduit à de nouveaux cas de lésions rétiniennes (Kallmark and Ygge 2005; Stangos, Petropoulos et al. 2007; Topouzis, Koskosas et al. 2007). Le degré des lésions varie d'une perte transitoire de l'acuité visuelle, une perte de la barrière hémato-rétinienne, une modification de la pigmentation au niveau de l'EPR, un gonflement du tissu rétinien, à la mort des cellules photoréceptrices et la perte permanente de vision dans l'aire exposée (Hope-Ross, Mahon et al. 1993; Codenotti, Patelli et al. 2002; Kallmark and Ygge 2005). Des lésions rétiniennes dues à une exposition excessive aux rayonnements solaires ont été documentées dans plusieurs cas (Yannuzzi, Fisher et al. 1987; Green and Robertson 1991; Hope-Ross, Mahon et al. 1993) même pour des expositions très courtes de l'ordre d'une minute (Gladstone and Tasman 1978; Sadun, Sadun et al. 1984; van de Kraats and van Norren 2007). Des rétinopathies induites par des expositions à des sources de lumière artificielle ont également rapportées (Kraushar 1986; Sliney 1997; Michael and Wegener 2004; Komaromy, Acland et al. 2008). Par exemple, chez le singe, l'exposition de la rétine au microscope d'intervention chirurgicale résulte en des modifications sévères de la fovéa : désorganisation des segments externes des photorécepteurs, noyaux pycnotiques, gonflement des terminaisons synaptiques, formation de vacuoles dans l'EPR.

Une exposition chronique à la lumière a été suggérée comme un facteur environnemental contributeur au développement de pathologies rétiniennes. Les lésions induites par des réactions phototoxiques chroniques se produisant dans la rétine sont suggérées comme étant impliquées dans l'étiologie de pathologies rétiniennes dégénératives telle que la dégénérescence maculaire liée à l'âge (Young 1988; Plestina-Borjan and Klinger-Lasic 2007; Vojnikovic, Njiric et al. 2007). En effet, bien que la corrélation entre l'exposition chronique à la lumière et la DMLA ne soit pas toujours significative dans les différentes études épidémiologiques, il est important de garder en mémoire que la détermination de l'exposition rétinienne au soleil lors du recueil d'informations chez les patients reste extrêmement difficile. Aussi en pratique, du fait du potentiel délétère de la lumière du soleil sur la rétine, il est souvent conseillé aux personnes atteintes de DMLA de se protéger les yeux du soleil.

La sensibilité de la rétine à la toxicité induite par la lumière dépend de facteurs génétiques. En effet, il a été mis en évidence chez l'animal que certaines mutations génétiques augmentent la sensibilité de la rétine aux lésions photochimiques telles que chez le rat Royal College Surgeon (Nir, Liu et al. 1999; Organisciak, Li et al. 1999) ou les souris et chiens mutés pour la Rhodopsine ou la RPE 65. Dans le cas de la rhodopsine, les mutations chez



l'homme correspondant aux modèles animaux sont à l'origine de dégénérescence conduisant à une cécité. Il a été suggéré que la lumière environnante peut accélérer la mort des cellules photoréceptrices (Berson 1971; Cremers, Maugeri et al. 2004).

### **3. Sensibilité de la rétine**

Le risque inhérent à la rétine de subir des lésions photooxydative est du à son exposition en continu à la lumière, une concentration élevée en oxygène et la présence d'un nombre important de photosensibilisateurs tels que les dérivés de la vitamine A, la lipofuscine, la mélanine, les flavines et porphyrines. Un des mécanismes d'adaptation de la rétine à une exposition prolongée à la lumière est la diminution de la consommation d'oxygène par les mitochondries des segments internes des photorécepteurs (Linsenmeier 1986; Ahmed, Braun et al. 1993). Ceci augmenterait le risque de lésions photochimiques en laissant plus d'oxygène à disposition pour les interactions avec les photosensibilisateurs photoexcités. De plus, les segments externes des photorécepteurs contiennent des quantités particulièrement élevées d'acides gras polyinsaturés qui sont extrêmement sensible au stress oxydant.

### **4. Chromophores rétinien comme potentiel initiateur des lésions photochimiques**

La première nécessité pour que la lumière exerce ses effets photochimiques est que la lumière soit absorbée. Dans la rétine la lumière incidente est essentiellement absorbée par le photopigment dans les segments externes des photorécepteurs et par la mélanine au niveau de l'EPR. Les lésions rétinien photochimiques sont en partie attribuées aux pigments visuels des bâtonnets et des cônes (Noell, Walker et al. 1966; Gorn and Kuwabara 1967; Kuwabara and Gorn 1968; Sperling, Johnson et al. 1980; Williams and Howell 1983). Ainsi, le degré des lésions rétinien est corrélé au contenu en rhodopsine dans la rétine avant l'exposition à la lumière (Noell and Albrecht 1971; Organisciak and Noell 1977; Noell 1979). Mais aussi, l'inhibition de la régénération de la rhodopsine (Stiles, Moiseyev et al. 2015) ou l'absence de rhodopsine, protège les rétines contre les lésions induites par la lumière (Stiles, Moiseyev et al. 2015).

La vitesse de régénération de la rhodopsine est un facteur important déterminant la sensibilité de la rétine aux lésions photochimiques. Dans des conditions d'exposition à la lumière intense, la rhodopsine est blanchie dès les premières minutes d'exposition (Ham, Mueller et al. 1982). Ralentir sa vitesse de régénération a été montré comme un moyen de réduire les lésions photochimiques (Bush, Malnoe et al. 1994; Wenzel, Reme et al. 2001).



L'inhibition (Mandal, Moiseyev et al. 2011) ou la mutation (Wenzel, Reme et al. 2001) de l'isomérase RPE65 exprimée au niveau des cellules de l'EPR est impliquée dans le cycle visuel augmente la résistance des cellules aux lésions induites par la lumière. Une autre protéine dont le dysfonctionnement inhibe la régénération de la rhodopsine est la « cellular Retinal Binding Protein » (CRBP). Cette protéine est un accepteur de 11-cis-rétinal nouvellement synthétisé et le chaperonne dans les cellules EPR. Les souris porteuses d'un gène non fonctionnel de CRBP présentent une diminution de la régénération de la rhodopsine associée à une résistance contre les lésions induites par la lumière par rapport aux souris sauvages (Saari, Nawrot et al. 2001). La modification de la composition lipidique des membranes des segments externes des photorécepteurs peut également affecter le taux de régénération de la rhodopsine et protège contre la photodégénérescence (Bush, Reme et al. 1991; Bush, Malnoe et al. 1994).



# **Objectifs de la thèse**



# OBJECTIFS DE LA THESE

Des études épidémiologiques observationnelles et interventionnelles ont montré un effet protecteur de la supplémentation en antioxydants, en caroténoïdes et en acide gras de la famille oméga-3, contre le développement et la progression de la DMLA. Ainsi, des compléments alimentaires à visé oculaire ont été développés et sont couramment prescrits chez des personnes atteintes de DMLA. Néanmoins, à notre connaissance il n'existait pas d'étude portant sur les formes finalisées complexes de ces compléments.

Par conséquent, dans le cadre de notre thèse, nous avons étudié l'effet d'un complément alimentaire à visé oculaire commercialisé en France et en Tunisie, sur les cellules rétiniennes. Ce complément contient des vitamines (E et C), des oligoéléments (zinc et cuivre), des caroténoïdes (Lutéine et zéaxanthine) et de l'huile de poisson (notamment de l'EPA et du DHA). Nous avons mené ce projet de recherche selon deux approches complémentaires : *in-vivo* et *in-vitro*.

## ✓ *In-vivo*

Les objectifs de cette approche sont :

→ d'évaluer l'effet protecteur du complément alimentaire **contre la dégénérescence rétinienne** progressive induite par la lumière. Nous avons donc tout d'abord **mis au point le modèle expérimental de dégénérescence rétinienne progressive induite par la lumière (DRPIL)** afin de mimer au mieux les évènements dégénératifs observés au cours du temps chez l'homme. **Une fois les paramètres du modèle définis**, nous avons comparé la fonction et la structure rétiniennes ainsi que le nombre de cellules apoptotiques chez des rats supplémentés et non supplémentés soumis à la DRPIL (Publication N° 1).

→ d'élucider **les mécanismes** impliqués dans cette **protection**.

- Le complément contenant essentiellement de l'huile de poisson enrichie en EPA et DHA, nous avons évalué la composition lipidique chez des animaux supplémentés par rapport à des animaux non supplémentés (Publication N° 1).
- La composition lipidique influençant la fluidité membranaire et donc l'activité des protéines transmembranaires, notamment la rhodopsine,



nous avons évalué la quantité et la vitesse de régénération de la rhodopsine dans les rétines de rats supplémentés par rapport aux non supplémentés (Publication N° 1).

➤ Parmi les mécanismes dégénératifs, le stress oxydant et l'inflammation sont largement impliqués. Les voies de signalisation de ces 2 processus peuvent être modulées par des dérivés des acides gras. Par conséquent nous avons évalué l'expression génique et protéique de régulateurs de l'inflammation et du stress oxydant.

### ✓ *In-vitro*

Les objectifs de cette approche sont :

- ➔ **d'évaluer l'effet** protecteur du complément alimentaire à différentes concentrations **contre la mort des cellules d'épithélium pigmentaire rétinien (ARPE19) induite par le peroxyde d'hydrogène.**
- ➔ d'élucider les mécanismes impliqués dans cette protection
  - comme in-vivo, nous avons évalué la composition lipidique des cellules traitées avec le complément par rapport à celle des cellules non traitées.
  - Nous avons comparé la production d'isoprostanes 15-F<sub>2t</sub>-IsoP, un marqueur de l'oxydation lipidique, entre des cellules traitées et non traitées avec le complément.



## **2<sup>ème</sup> partie**

### **Publications personnelles et résultats non publiés**



***Publication n°1***

**Dietary Supplement Enriched in Antioxidants and Omega-3 Protects from  
Progressive Light-Induced Retinal Degeneration**

Khaoula Ramchani-Ben Othman, Christine Cercy, Mohamed Amri, Michel Doly, Isabelle Ranchon-Cole

**Publication acceptée dans le journal PlosOne (Juin 2015)**



## **Résumé de la publication N°1**

### **Un complément alimentaire enrichi en antioxydants et en oméga-3 protège contre la dégénérescence rétinienne progressive induite par la lumière**

Khaoula Ramchani-Ben Othman, Christine Cercy, Mohamed Amri, Michel Doly,

Isabelle Ranchon-Cole

La dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) est la première cause de handicap visuel chez les personnes de plus de 50 ans. Toutes formes confondues, cette maladie concerne environ 8 % de la population française, mais sa fréquence augmente largement avec l'âge. La perte de vision est due à une dégénérescence progressive des cellules photoréceptrices à l'origine du signal visuel. Bien que les mécanismes physiopathologiques ne soient pas encore totalement élucidés, le stress oxydatif et l'inflammation sont maintenant reconnues comme impliqués à la fois dans l'initiation ou la progression de la DMLA. A l'heure actuelle, aucun traitement n'existe contre la dégénérescence rétinienne, si ce n'est pour certaines formes de dégénérescence maculaire liée à l'âge et reste donc limité à un nombre restreint de patients. Par conséquent, la prévention et/ou le ralentissement de sa progression pourrait passer en partie par une augmentation des systèmes de défense endogène et un équilibre en acides gras polyinsaturés, une des cibles privilégiées du stress oxydatif et médiateur de l'inflammation au moyen de la supplémentation alimentaire. Ainsi, suite aux résultats encourageants des études d'intervention (AREDS I et II) qui ont montré que la supplémentation en oligoéléments, vitamines, caroténoïdes, et en oméga-3, pourrait réduire le risque de développement et/ou la progression de la DMLA, la prescription des compléments alimentaires à visée oculaire chez les patients atteints de DMLA est devenue courante. Néanmoins, la mise en place de ces compléments alimentaires, qui envahissent le marché contenant les composés étudiés dans AREDS et aussi d'autres composés connus pour leur activité antioxydante et/ou anti-inflammatoire tels que les polyphénols, n'est pas bien réglementée. En plus, le mécanisme par lequel ces compléments alimentaires protègent la rétine n'a pas été étudié *in vivo*.

Dans ce contexte, notre étude a donc pour objectif d'évaluer et de caractériser *in-vivo* l'effet protecteur d'une supplémentation alimentaire contre la dégénérescence rétinienne. Le supplément alimentaire utilisé contient des antioxydants (Lutéine, zeaxanthine, vitamine C, Vitamine E), des oligoéléments (zinc, cuivre) et de l'huile de poisson (riche en DHA et EPA).



Le modèle expérimental est le modèle de dégénérescence rétinienne induite progressive par la lumière (PLIRD, progressive light induced retinal degeneration). Des rats albinos sont élevés en lumière cyclique faible (<10 lux). A l'âge de 7-8 semaines, ils sont gavés quotidiennement avec de l'eau ou avec le supplément alimentaire pendant une semaine avant et pendant l'exposition à la lumière cyclique intense (400 lux ; 12 heures de lumière/12 heures d'obscurité, une semaine). En parallèle, des animaux supplémentés et non supplémentés sont maintenus en lumière cyclique faible (20 lux ; 12 heures de lumière/12 heures d'obscurité, une semaine). La fonction rétinienne est explorée par l'électrorétinographie (ERG) à la fin de l'exposition à la lumière (ERG1) et 15 jours plus tard. Les animaux sont ensuite sacrifiés pour l'étude histologique.

Dans une première étape de notre travail, nous avons mis en évidence *in-vivo* qu'une supplémentation par le complément alimentaire n'est pas toxique pour la rétine puisque elle n'a pas d'effet sur la fonction et la structure des rétines des rats supplémentés non exposés. Par contre, le complément alimentaire protège à la fois la structure et la fonction de la rétine contre la dégénérescence induite par la lumière en réduisant l'apoptose des cellules photoréceptrices (diminution du nombre de noyaux apoptotiques).

Afin de caractériser les mécanismes impliqués dans cette neuroprotection, nous avons analysé dans un deuxième temps le contenu lipidique à la fois du plasma et de la rétine (par chromatographie). Nous avons alors mis en évidence que le complément alimentaire modifie rapidement le contenu en acides gras polyinsaturés dans le plasma et dans la rétine. L'augmentation des oméga-3 est associée à une diminution des oméga-6. Dans la rétine, il y a une accumulation d'EPA et DPA sans variation de DHA. Cette augmentation est associée à une diminution significative des acides gras de la famille oméga 6.

En parallèle, nous avons montré que le complément alimentaire ne modifie pas le contenu (spectrophotométrie) ni la régénération (électrorétinographie) du photopigment (Rhodopsine) qui est essentiel à la détection de la lumière et à la genèse du signal visuel et dont les propriétés dépendent de l'environnement lipidique.

Ces résultats montrent que le complément alimentaire protège la rétine des effets cumulés néfastes de la lumière en modifiant la composition en acides gras du tissu rétinien sans modifier la quantité ou la vitesse de régénération du pigment visuel.

Notre hypothèse est que le supplément protège la rétine en facilitant le renouvellement du DHA et ainsi permettant le maintien de l'intégrité membranaire.



RESEARCH ARTICLE

# Dietary Supplement Enriched in Antioxidants and Omega-3 Protects from Progressive Light-Induced Retinal Degeneration

Khaoula Ramchani-Ben Othman<sup>1,2</sup>, Christine Cercy<sup>1</sup>, Mohamed Amri<sup>2</sup>, Michel Doly<sup>1</sup>, Isabelle Ranchon-Cole<sup>1\*</sup>

**1** Université Auvergne, UFR Pharmacie, Laboratoire de Biophysique Neurosensorielle, Inserm UMR 1107, Clermont-Ferrand, France, **2** Department of Biological Sciences, Tunis El Manar University, Laboratory of Functional Neurophysiology and Pathology, UR/11ES09, El Manar 1, Tunis, Tunisia

\* [isabelle.ranchon-cole@udamail.fr](mailto:isabelle.ranchon-cole@udamail.fr)



**OPEN ACCESS**

**Citation:** Ramchani-Ben Othman K, Cercy C, Amri M, Doly M, Ranchon-Cole I (2015) Dietary Supplement Enriched in Antioxidants and Omega-3 Protects from Progressive Light-Induced Retinal Degeneration. PLoS ONE 10(6): e0128395. doi:10.1371/journal.pone.0128395

**Academic Editor:** Rong Wen, University of Miami, UNITED STATES

**Received:** December 24, 2014

**Accepted:** April 27, 2015

**Published:** June 4, 2015

**Copyright:** © 2015 Ramchani-Ben Othman et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All relevant data are within the paper.

**Funding:** The authors have no support or funding to report.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

## Abstract

In the present study, we have evaluated one of the dietary supplements enriched with antioxidants and fish oil used in clinical care for patient with age-related macular degeneration. Rats were orally fed by a gastric canula daily with 0.2 ml of water or dietary supplement until they were sacrificed. After one week of treatment, animals were either sacrificed for lipid analysis in plasma and retina, or used for evaluation of rod-response recovery by electroretinography (ERG) followed by their sacrifice to measure rhodopsin content, or used for progressive light-induced retinal degeneration (PLIRD). For PLIRD, animals were transferred to bright cyclic light for one week. Retinal damage was quantified by ERG, histology and detection of apoptotic nuclei. Animals kept in dim-cyclic-light were processed in parallel. PLIRD induced a thinning of the outer nuclear layer and a reduction of the b-wave amplitude of the ERG in the water group. Retinal structure and function were preserved in supplemented animals. Supplement induced a significant increase in omega-3 fatty acids in plasma by 168% for eicosapentaenoic acid (EPA), 142% for docosapentaenoic acid (DPA) and 19% for docosahexaenoic acid (DHA) and a decrease in the omega-6 fatty acids, DPA by 28%. In the retina, supplement induced significant reduction of linolenic acid by 67% and an increase in EPA and DPA by 80% and 72%, respectively, associated with significant decrease in omega-6 DPA by 42%. Supplement did not affect rhodopsin content or rod-response recovery. The present data indicate that supplement rapidly modified the fatty acid content and induced an accumulation of EPA in the retina without affecting rhodopsin content or recovery. In addition, it protected the retina from oxidative stress induced by light. Therefore, this supplement might be beneficial to slow down progression of certain retinal degeneration.



## Introduction

In patient with early age-related macular degeneration (AMD), supplementation with vitamins and trace elements has become standard in clinical care. This is based to a large degree on the results of the Age-Related Eye Disease Study 1 (AREDS 1), which proved that a food supplement containing vitamin C, vitamin E,  $\beta$ -carotene, and zinc reduces the risk of developing late-stage AMD in high-risk patients by approximately 25% over a period of more than 6 years [1]. However, since the results of AREDS 1 were published, a number of concerns regarding the included components and their dosing have been raised [2–4]. As such, the AREDS 2 was launched, and investigated as part of the primary randomization whether the addition of either lutein/zeaxanthin or omega-3 free fatty acids or a combination of lutein/zeaxanthin and omega-3 free fatty acids exerts an additional effect to the AREDS 1 formulation [5].

Given the high prevalence of AMD in the elderly and the enormous socioeconomic burden of the disease, dietary supplement for ocular purpose have exploded on the market containing the ingredients of the AREDS 1 and AREDS 2 formulations in modified dosing, but also including ginkgo biloba, resveratrol, flavonoids, taurine, aronia extract, or alipoic acid based on their antioxidative properties. In addition, unlike new drugs, dietary supplements are not reviewed and approved by FDA (Food and drug agency, USA) or EMA (European Medicine Agency, Europe) based on their safety and effectiveness. The Food Supplements Directive (FSD) Directive 2002/46/EC, has only established a list of allowable vitamins and minerals, and sets labeling requirements. The Directive calls for the establishment of harmonized minimum and maximum dosage amounts however this has yet to be done. Moreover, substances other than vitamins and minerals are not covered by the directive. Therefore, dietary supplements do not need individual marketing authorization based on evaluation by experts of a record submitted by the industrial who wants to market them. However, mechanism by which complex formulation protects the retina has not been investigated in-vivo.

In this context, the aim of the present study was to test one of these dietary supplements in an in-vivo model of retinal degeneration. In this model, retinal degeneration is caused by progressive light-induced damage (phototoxicity). First, this model in animals has been extensively used to evaluate neuroprotective effects of molecules in retinal degenerations such as AMD because it presents similar mechanism to most of human retinal degeneration such as apoptosis, oxidative stress and inflammation [6,7]. Second, increasing evidence suggest that light-injury to the retina accelerates certain retinal degeneration [8–10] and phototoxicity becomes a serious consideration in the presence of retinal disease [11–14].

In the present study, we have first evaluated the protective effect of the dietary supplement against light-induced retinal degeneration. Second, in order to better understand how it protects the retina, we have investigated the effect of daily supplementation on fatty acid composition of plasma and retina, on rhodopsin content and recovery after bleaching.

## Materials and Methods

### Ethics Statement

The study and all experiments were approved by the “Ethic committee of Auvergne (No. C2EA-02, France) for the use of Animals in Research” (Comité d’Ethique pour l’Experimentation Animale Auvergne). The protocol has not been attributed any license number since experiments have been conducted before 2013 (Décret n°2013–118 du 1<sup>er</sup> février 2013 relatif à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques).



## Animals

Seven weeks old Albino Sprague-Dawley rats, equivalent numbers of male and female, were used in the present study. They were raised in dim-cyclic-light (12 hours dark/12 hours light; < 15 lux), fed *ad libitum* (A04, SAFE, Canada) and had free access to water. Daily observation of the animals has been done during the all experiments; no sign of suffering was noted.

## Treatment

Rats were orally fed daily by using a gastric canula with 0.2 ml of water or dietary supplement. Dietary supplement composition and daily dose (mg/rat/day) are given in [Table 1](#).

## Progressive Light Damage (PLD)

Rats were transferred for one week to bright cyclic light (12 hours dark/12 hours light) set at 400 lux (Photometer S350; United Detection Technologies, Hawthorne, CA). There were two rats per cages and they had free access to food and water.

## Anesthesia

Rats were anesthetized by a mixture of ketamine (Clorketam1000; Vetoquinol, France) and xylazine (Sigma Aldrich; St. Quentin Fallavier, France) at 150 mg/kg and 6 mg/kg, respectively.

## Electroretinography

Animals were dark adapted overnight. Under dim-red-light, they were anesthetized and their pupils dilated with 1 drop of Mydriaticum (Rhône-Mérieux, France). Rats were placed on a temperature-regulated heating pad throughout the recording session. A photostimulator (Type PS 33, Grass, USA) and neutral density filter to attenuate luminance were used to generate ElectroRetinoGram (ERG). Strobe flash ERGs (10  $\mu$ s) were recorded using an Ag/AgCl electrode in contact with the corneal surface. An Ag//AgCl electrode was placed on the tong

**Table 1. Dietary supplement composition.**

Ingredients	mg/rat/day
<i>Vitamins and trace elements</i>	
Vitamin C	30
Vitamin E	5
Zinc (sulfate)	2.5
Copper (sulfate)	0.16
<i>Essentials Fatty Acids</i>	
Fish oil	116
With 70% omega-3	81.16
- EPA	46.33
-DHA	23.16
-DPA	5.83
<i>Extract of Tagetes Erecta</i>	
Lutein	1.66
Zeaxanthin	0.33
<i>Extract of Vitis Vinifera</i>	
Resveratrol	0.16

doi:10.1371/journal.pone.0128395.t001



and a copper reference screen under the animal. Dark-adapted responses were presented within an integrating sphere (Labsphere, France) that mimics a ganzfeld and allow to illuminate uniformly the all retina. Single ERG was recorded for seventeen increasing luminance ( $10 \mu\text{s}$  duration) using flash intensities ranging from  $-3.47$  to  $+0.46 \log(\text{cd.s.m}^{-2})$ . Conversely, the duration of the interstimulus interval is  $30 \text{ s}$  since this interval has been shown to be sufficient for a flash not to alter the next flash response. The signal was amplified (gain 1000, pass band  $0.1\text{--}10000 \text{ Hz}$ ; A-M systems, Inc; Model 3000. AC/DC Differential Amplifier) then averaged and stored in a computer. Intensity—response functions were obtained in a single session.

**ERG analysis.** The leading edge of the a-waves obtained in response to high-intensity stimuli was analyzed with Eq 1, a modified form of the Lamb—Pugh model of rod phototransduction [15–17]:

$$P3 = \{1 - \exp[-iS(t - t_d)^2]\}A_{\max} \quad (1)$$

where P3 represents the massed response of the rod photoreceptors and is analogous to the PIII component of Granit [16]. The amplitude of P3 is expressed as a function of flash energy ( $i$ ) and time ( $t$ ) after flash onset.  $S$  is the gain of phototransduction,  $A_{\max}$  is the maximum response, and  $t_d$  is a brief delay.

The amplitude of the b-wave is calculated from the minimum of the a-wave to the maximum of the b-wave. Intensity—response function of the b-wave amplitude was fitted with the Naka—Rushton equation:

$$B/B_{\max} = I^n / (I^n + K^n) \quad (2)$$

where  $I$  is the stimulus luminance of the flash ( $2.88 \text{ cd.s.m}^{-2}$ );  $B$  is the b-wave amplitude of ERG at  $I$  luminance;  $B_{\max}$  is the asymptotic b-wave amplitude;  $K$  is the half-saturation constant, corresponding to retinal sensitivity; and  $n$  is a dimensionless constant controlling the slope of the function. The latency is the time interval between the stimulation and the peak of the b-wave or the a-wave.

## Rod response recovery

To evaluate the rod response recovery after bleaching, a single test flash of  $2.88 \text{ (cd.s.m}^{-2})$  was presented on dark-adapted retina, and then rats were exposed to a steady light for  $2 \text{ min}$  to bleach the rods. Immediately after bleaching and then every  $10 \text{ min}$  for  $90 \text{ min}$ , a single test flash of  $2.88 \text{ (cd.s.m}^{-2})$  was presented. The a-wave response at the indicated time after bleaching was normalized to the initial dark-adapted response for each rat.

## Histology and Apoptotic cell detection

Eyes were embedded in paraffin, as described previously [9]. Sections ( $5 \mu\text{m}$ ) were cut along the vertical meridian through the optic nerve. Outer nuclear layer (ONL) thickness was measured every  $0.36 \text{ mm}$  from the optic nerve to the inferior and to the superior ora serrata. Area under the curve was integrated with the use of software (Microsoft Origin 6.0; Microcal Software, Northampton, MA). The apoptosis detection kit (Apoptag S7101; Qbiogen, Illkirch, France) was used in accordance with the manufacturer's instructions on  $5 \mu\text{m}$  sections cut along the meridian through the optic nerve. Positive cells were counted under a microscope at  $1.17 \text{ mm}$  and  $2.34 \text{ mm}$  from the optic nerve in the superior and inferior part of the retina on a  $360 \mu\text{m}$  section length.



## Fatty acid composition in plasma and retina

Rats were anesthetized before cervical dislocation. Blood samples were obtained by cardiac puncture, centrifuged at 3000g in EGTA-containing tubes for 10 min at 4°C. The neural retinas were dissected from the eye, as described previously [18]. Two retinas from one animal were homogenized in PBS-1X and centrifuged at 10000g for 10 min at 4°C. Samples were conserved at -80°C until fatty acid extraction.

**Total lipids extraction.** Total lipids were extracted from plasma and retina samples using chloroform/methanol (2:1, v/v) with 0.5% butylated hydroxytoluene (BHT) as an antioxidant [19]. Subsequently, total lipids were separated into non polar lipids or neutral lipids and polar lipids or phospholipids by solid-phase extraction (Sep-Pak, vac 1 cc, 100 mg; Waters, Guyancourt, France) as described by Juaneda P et al. [20]. Briefly, the solid phase extraction cartridges were washed with chloroform (4 ml) to elute neutral lipids followed by 8 ml methanol to elute polar lipids (phospholipids).

**Total lipids analysis.** Total phospholipids from neural retina and plasma were evaporated to dryness under a gentle stream of N<sub>2</sub> to minimize oxidation. Then total phospholipids were dissolved in 200 µl methanol and 100 µl toluene for methylation. Phospholipids fatty acid methyl esters (FAMES) were obtained after trans-esterification with 50 µl of sodium methoxide in methanol (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) followed by acid trans-esterification with 500µl of boron trifluoride in methanol (14%, Sigma-Aldrich). Before analysis, FAMES and dimethylacetals (DMAs, from plasmalogen type) were subsequently extracted with hexane, evaporated, and diluted in 200 µl hexane and stored at -80°C.

**Gas chromatogram analysis.** The profile of total FAMES was established by Gas-liquid chromatography using a gas chromatograph GC Trace (Thermo Fischer Scientific, Courtaboeuf, France), equipped with a fused silica CP-Sil 88 capillary column (100% cyanopropyl-polysiloxane, 100 m, 0.25 mm in inner diameter, 0.20 µm in film thickness; Varian S.A, Les Ulis, France), a programmed temperature vaporisation injector (250°C) and a flame-ionization detector. The sample (1µl) was injected in the splitless mode. The oven temperature programme ran between 70 and 225°C in four separate steps. He gas was used as a carrier, with a constant pressure (264 kPa). The identities of sample methyl esters were determined by comparing their relative retention times with those of external well-known FAME standards (Supelco 37 Component Fatty Acid Methyl Esters Mix and Menhaden Oil; Sigma Aldrich, St Quentin Fallavier, France). Other standard FAME mixtures were obtained from Nu-Chek-Prep (Elysian, MN, USA). The fatty acid profiles were expressed in relative amounts (% total fatty acids). The relative plasmalogen amount is calculated as a ratio of dimethylacetals (DMAs) to methyl esters.

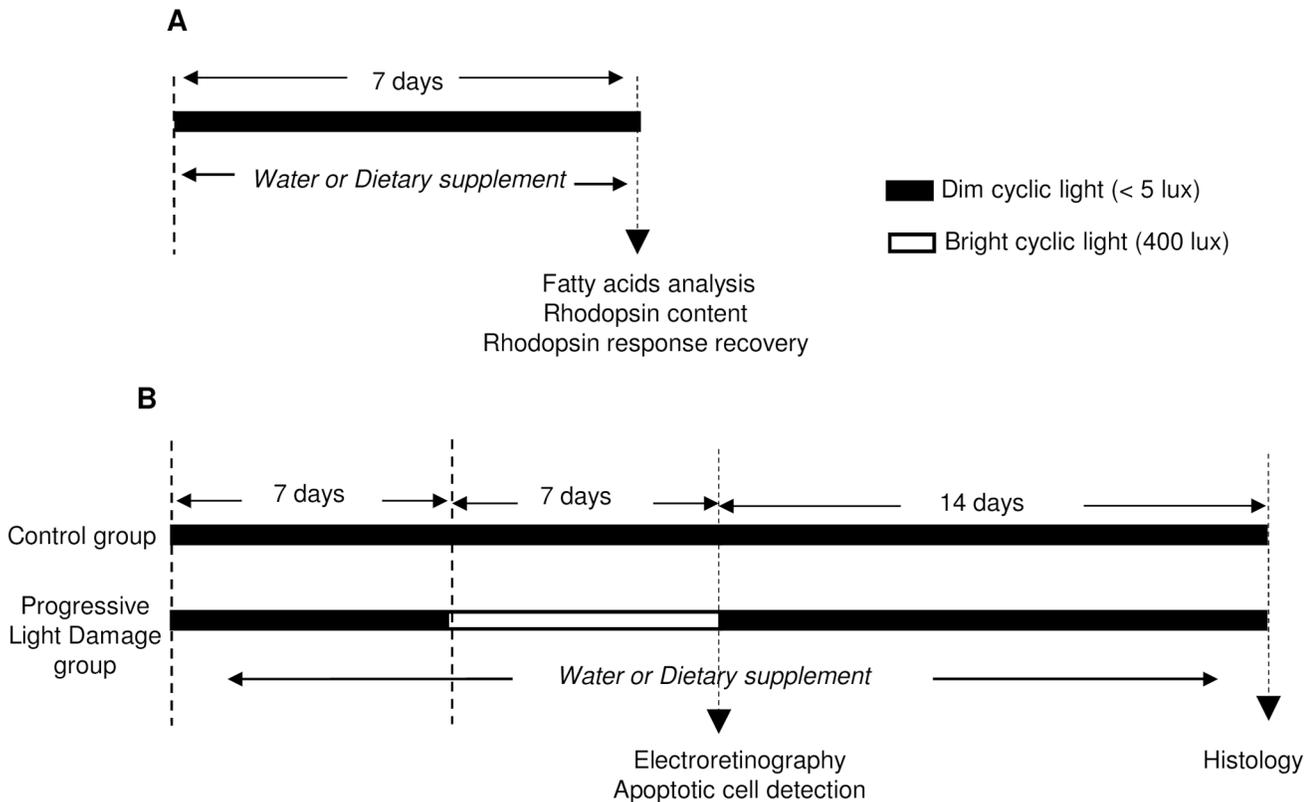
## Rhodopsin Measurement

Under dim red light, each retina was homogenized in 450 µl of buffer containing 10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 2% (w/v) octylglucoside, and 50 mM hydroxylamine. Homogenates were centrifuged at 16,000 x g, and soluble lysates were scanned from 300 to 620 nm in a spectrophotometer (Thermo spectronic Rochester NY USA). Samples were then bleached for 15 minutes and scanned again. The difference spectra at 500 nm between pre- and post-bleached samples were used to determine rhodopsin content using a molar extinction coefficient of 42,000 M<sup>-1</sup> [21]. Data are presented as rhodopsin content per retina.

## Experimental Design

[Fig 1](#) displays the experimental design. In the first set of experiments ([Fig 1A](#)), rats were orally fed daily with 0.2 ml of water or dietary supplement for one week in dim-cyclic-light (12 hours





**Fig 1. Experimental design.** Rats were daily fed using a gastric canula with 0.2 ml of water or dietary supplement until they were sacrificed. **(A)** In the first set of experiments (Fig 1A), after one week of treatment they were sacrificed for fatty acid analysis ( $n = 15$  for water;  $n = 10$  for dietary supplement) or rod-response recovery after bleaching ( $n = 10$  for water;  $n = 11$  for dietary supplement) and rhodopsin content measurement ( $n = 6$  for each group). **(B)** In the second set of experiments (Fig 1B), one group of rats was kept in dim-cyclic-light (control group;  $n = 13$  for water;  $n = 13$  for dietary supplement) and the other one was transferred to bright cyclic light for one week (progressive light damage (PLD) group; 12h light at 400 lux; 12 hours dark;  $n = 14$  for water;  $n = 15$  for dietary supplement). At one day after progressive light damage, 8 animals from each group was used to evaluate retinal function before being sacrificed to quantify apoptotic cells ( $n = 8$  for each of group). The rest of animals ( $n = 6$  water group;  $n = 7$  supplemented group) were returned to dim-cyclic-light for two weeks before being sacrificed for histological analysis.

doi:10.1371/journal.pone.0128395.g001

light < 15 lux; 12 hours dark). Then, 1/ retina and plasma were collected for fatty acids and plasmalogen analysis or 2/ rod-response recovery after bleaching was evaluated by electroretinography before collecting the retina for rhodopsin content measurement.

In the second set of experiments (Fig 1B), rats were treated with 0.2 ml of water or dietary supplement for 4 weeks: daily treatments were started one week before transferring the animals to bright cyclic light (Progressive Light Damage, PLD; 12 hours light at 400 lux; 12 hours dark) and were lasted until animals were sacrificed. At the end of the transfer, ERG was recorded (after one night of dark adaptation). Then, 8 animals per group (water and dietary supplement) were sacrificed for apoptotic nuclei detection and the rest (NLD:  $n = 5$  for water and for dietary supplement; PLD:  $n = 6$  for water and  $n = 7$  for dietary supplement) was returned to dim-cyclic-light for two weeks before being sacrificed for histological analysis. Animals kept in dim-cyclic-light were processed in parallel.

### Statistical Analysis

Analysis of variance (ANOVA) was performed on the electroretinographic and morphometric parameters, apoptotic cell number, fatty acids and plasmalogens composition. If ANOVA was significant, multiple comparisons were made to determine which pairs of mean values were



different. Significant differences between groups were assessed with the post hoc Newman-Keuls test; the significance level was set at  $p = 0.05$ . Significant differences between groups are noted by (\*) or (†); One symbol for  $p < 0.05$ , two symbols for  $p < 0.01$ , three symbols for  $p < 0.001$ , and four symbols for  $p < 0.0001$ .

## Results

### Neuroprotective Effect

Electroretinographic data are presented in Fig 2. Representative ERG obtained in No Light Damage (NLD) or Progressive Light Damage (PLD) animals fed with water or supplement are presented in Fig 2A. From each ERG, the b wave, a-wave amplitude as well as the wave latency was calculated. The b-wave sensitivity curves from animals kept in dim-cyclic-light (NLD; dark symbols; 12 hours light < 15 lux; 12 hours dark) were similar in supplemented and water groups (Fig 2B). There was no significant difference in the maximal b-wave amplitude ( $B_{\max}$ ;  $1018 \pm 128 \mu\text{V}$  and  $1042 \pm 119 \mu\text{V}$ , respectively; Fig 2D) or half-saturation luminance ( $K$ ;  $-2.8 \pm 0.2 \log(\text{cd.s.m}^{-2})$  and  $-2.7 \pm 0.2 \log(\text{cd.s.m}^{-2})$ , respectively; Fig 2E). In addition there was no significant difference in the b-wave latency (Fig 2C). These results show that the daily supplementation enriched with antioxidant and fish oil did not affect retinal function.

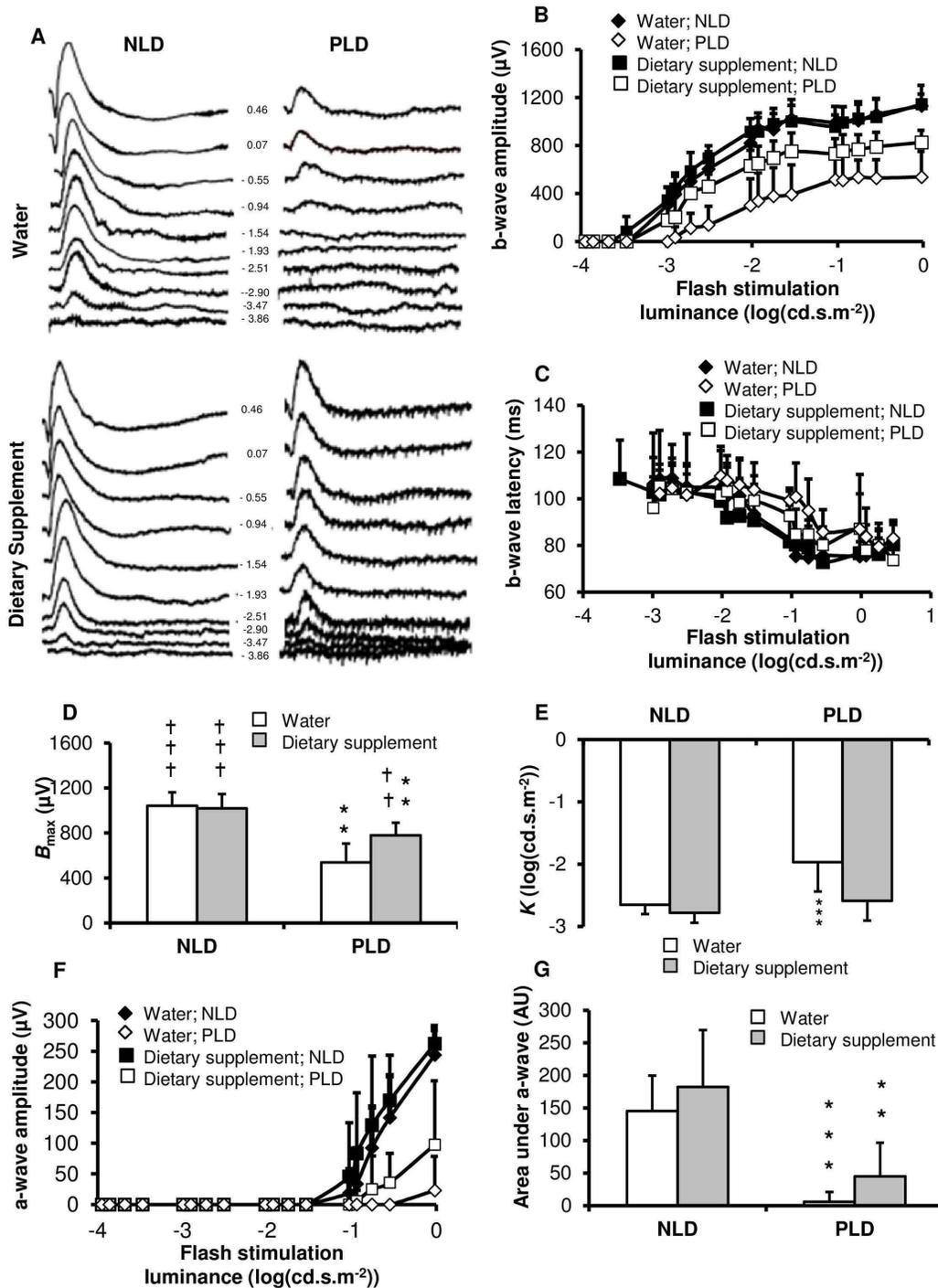
Animals that had been transferred for one week to bright cyclic light (Progressive Light Damage, PLD; 12 hours light at 400 lux; 12 hours dark; open symbols) had a collapse of the b-wave sensitivity curve. This collapse was more important in the water than in the supplemented animals.  $B_{\max}$  was reduced ( $p = 0.0002$ ) to  $538 \pm 169 \mu\text{V}$  with an increase ( $p = 0.002$ ) in  $K$  to  $-2.0 \pm 0.5 \log(\text{cd.s.m}^{-2})$  in the PLD-water group compared to the NLD-water group. In PLD-supplemented group,  $B_{\max}$  ( $780 \pm 112 \mu\text{V}$ ) was lower ( $p = 0.002$ ) than in NLD one but higher ( $p = 0.002$ ) than in the PLD-water group and there was no significant variation in  $K$ .

Light damage induced a significant collapse of the a-wave sensitivity curve with a reduction of the area under the curve to  $6 \pm 14$  arbitrary units in the water group (Fig 2G). Although, the a-wave sensitivity curve of the supplemented group (area =  $45 \pm 52$  arbitrary units) was above the one from the water group, there was no significant difference in the area under the curves.

In order to evaluate the number of photoreceptors in the retina, we have measured the outer nuclear layer (ONL) thickness along the retina in water or supplemented animals that have been transferred or not to the PLD for one week. The ONL thicknesses were plotted as a function of the distance from the optic nerve (Fig 3B). In the NLD animals, the ONL thicknesses were similar between water and supplemented animals. The ONL thickness was  $40 \pm 6 \mu\text{m}$  in the water-group and  $40 \pm 5 \mu\text{m}$  in the supplemented group at 1.17 mm from the optic nerve. Transferring the animals to PLD has induced thinning of the superior part of the retina. The major damage area at 1.17 mm from the optic nerve was reduced ( $p = 0.002$ ) to  $17 \pm 4 \mu\text{m}$  in the PLD-water group (Fig 3B and 3C). PLD-supplemented animals had an ONL thickness preserved. At 1.17 mm from the optic nerve, the ONL was thicker ( $p = 0.0002$ ) in PLD-supplemented animals ( $39 \pm 5 \mu\text{m}$ ) than PLD-water one and was not significantly different from the two NLD group (water and dietary supplement). Therefore, the daily supplementation enriched with antioxidant and fish oil protected retinal structure from progressive light damage.

The ratio of the number of apoptotic nuclei over the number of nuclei in the ONL is presented in Fig 3A. This ratio was lower in PLD-supplemented than in PLD-water retinas whatever the considered area was. At 1.17 mm from the optic nerve in the superior part of the retina, the ratio was reduced ( $p = 0.02$ ) from  $0.14 \pm 0.09$  apoptotic nuclei/nuclei in water group to  $0.04 \pm 0.05$  in the supplemented group. Therefore, the daily supplementation enriched with antioxidant and fish oil reduced photoreceptor cells apoptosis.

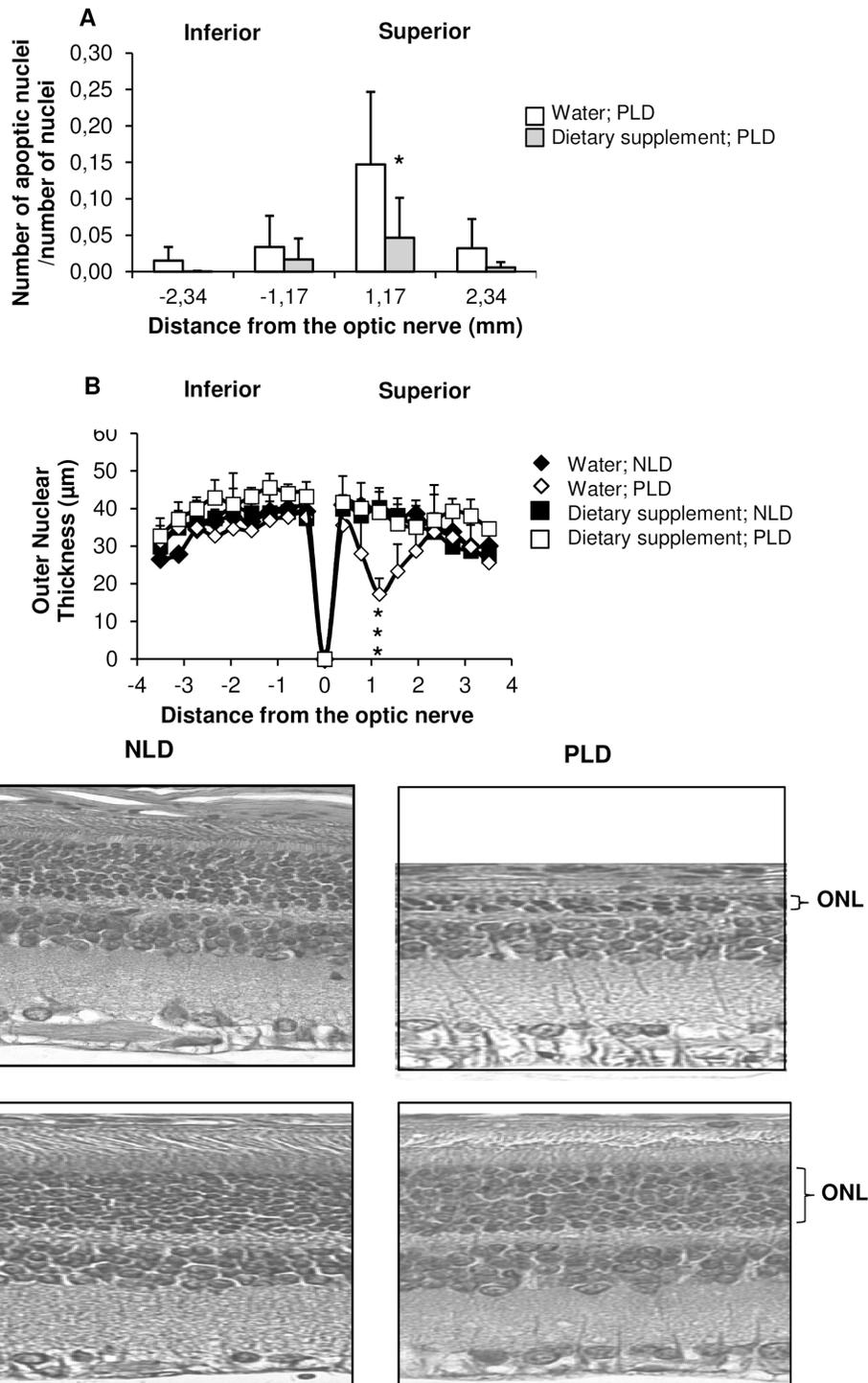




**Fig 2. Electrophysiology.** Rats were daily fed using a gastric canula with 0.2 ml of water or dietary supplement for 2 weeks. After one week of treatment, rats were kept in dim-cyclic-light (No Light Damage, NLD; n = 13 for water and n = 13 for dietary supplement) or transferred for one week to bright cyclic light (Progressive Light Damage, PLD; n = 14 for water and n = 15 dietary supplement). Electrophysiological recordings were recorded at the ends of the two weeks (A) **Representative dark-adapted Electrophysiological Recordings:** the numbers in the central column indicates the Flash stimulation luminance in log (cd.s.m<sup>-2</sup>) used to generate the Electrophysiological Recordings (ERG). (B) **b-wave sensitivity curve:** b-wave amplitude is plotted as a function of flash stimulation luminance. (C) **b-wave latency** is plotted as a function of flash stimulation luminance. The b-wave sensitivity curves are fitted to calculate the derived parameters: (D) **B<sub>max</sub>:** the maximal b-wave amplitude, (E) **K:** the luminance eliciting B<sub>max</sub>/2. (F) **a-wave sensitivity curve:** a-wave amplitude is plotted as a function of flash stimulation luminance. (G) **Area under the a-wave** sensitivity curve. Results are presented as Mean ± SD. (\*) compared to No Light Damage and (†) compared to water-Light Damage. One symbol p < 0.05; Two symbols p < 0.01; three symbols p < 0.001 compared to water group.

doi:10.1371/journal.pone.0128395.g002

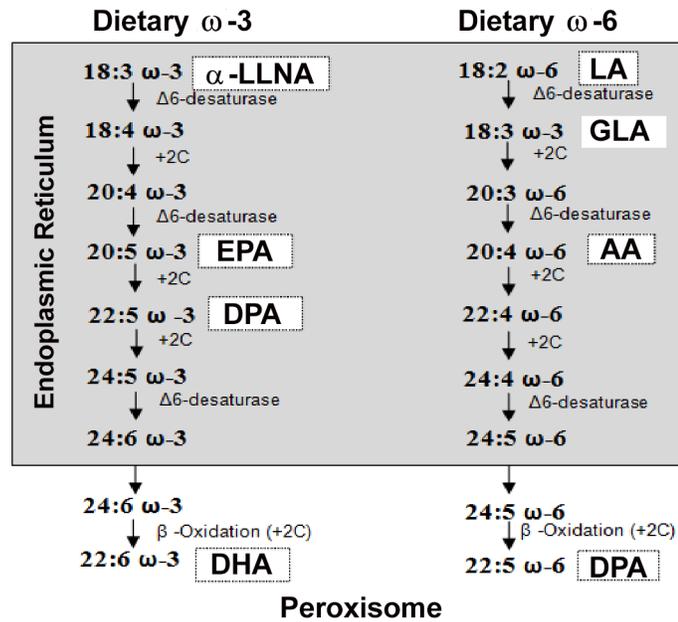




**Fig 3. Histology and apoptotic cell detection.** Rats were fed by using a gastric canula with 0.2 ml of water or dietary supplement for 4 weeks. After one week of treatment, they were kept in dim cyclic light (< 5 lux; No Light Damage, NLD) or transferred for one week to bright cyclic light (Progressive Light Damage, PLD; 12 hours light at 400 lux; 12 hours dark). 8 animals per group (water and dietary supplement) were sacrificed for apoptotic cell detection and the rest (PLD: n = 6 for water and n = 7 for dietary supplement) was returned to dim cyclic light for two weeks before being sacrificed for outer nuclear layer (ONL) thickness measurement. (A) Number of apoptotic nuclei detection: The ratio of the number of apoptotic nuclei over the number of nuclei was calculated at 1.17 and 2.34 mm from the optic nerve in the superior and inferior side of the retina (n = 8 per group). (\*) significance compared to water group. Results are presented as mean ± SD. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ . (B) Outer Nuclear Layer thickness: The ONL thicknesses were measured from the optic nerve to the superior and inferior side of the retina (NLD: n = 5 for water and for dietary supplement; PLD: n = 6 for water and n = 7 for dietary supplement). (\*) significance compared to No Light Damage group. (C) Representative micrographs of the most damaged area in the superior retina.

doi:10.1371/journal.pone.0128395.g003





**Fig 4. Biosynthetic pathways of omega-3 and 6 fatty acids.** Fatty acid notation represents total number of carbons, number of double bonds, and position of the first double bond relative to the methyl terminal of the hydrocarbon chain. For example, 22:6 ω-3 indicates that the fatty acid chain is 22 carbons long with the first of 6 double bonds inserted between the third and fourth carbons from the methyl terminal. α-LLNA = α-linolenic acid, EPA = eicosapentaenoic, DHA = docosahexaenoic acid, LA = linoleic acid, AA = arachidonic acid, DPA = docosapentaenoic acid, GLA = gamma-linolenic acid.

doi:10.1371/journal.pone.0128395.g004

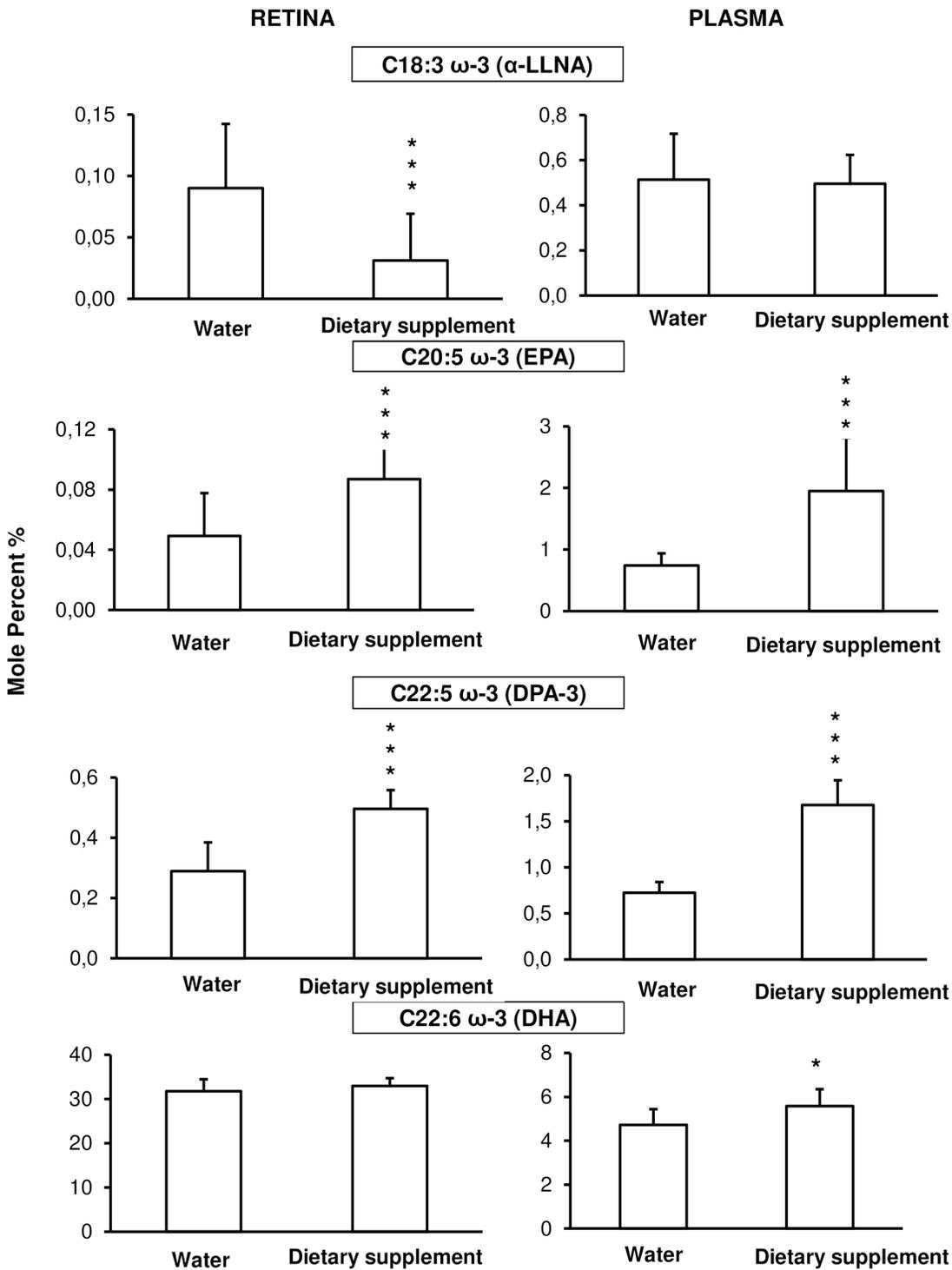
### Fatty acids and plasmalogens

In the retina, phospholipids represent about two-thirds of total lipids in the structure and are characterized by species rich in Polyunsaturated Fatty Acids (PUFAs). The most abundant PUFA is DHA which belongs to the omega-3 family. The reduced level of DHA in plasma and in photoreceptor cells in the retina is a characteristic feature of retinal degenerations such as AMD [22] or Retinis Pigmentosa (RP) [23]. The synthesis of omega-3 fatty acids is in competition with those of omega-6 family. Fig 4 displays biosynthetic pathway of the omega-3 and omega-6 families. Plasmalogens constitute specific phospholipids and are expressed in the retina (in the inner segment of photoreceptors) [24]. Studies have suggested that one of the biological functions of plasmalogens (Pls) is to protect animal cell membranes against oxidative stress [25–27].

In order to determine the effect of daily supplementation (enriched with antioxidant and fish oil) on fatty acids and plasmalogens, we have analyzed plasma and retina by gas chromatography the first week of treatment.

In plasma, the level of omega-3 precursor (α-linolenic acid, α-LLNA, C18:3ω-3, Fig 5) and the omega-6 precursor (linoleic acid, LA, C18:2ω-6, Fig 6) was not significantly different between water and supplemented animals. There was an increase in omega-3 eicosapentaenoic (EPA, C20:5ω-3; *p* = 0.003); docosapentaenoic (DPA-3, C22:5n-3; *p* = 0.0002) and docosahexaenoic (DHA, C22:6ω-3, *p* = 0.035) in plasma from supplemented (1.95 ± 0.9%; 1.7 ± 0.3% and 5.6 ± 0.7%, respectively) compared to water (0.7 ± 0.2%, 0.7 ± 0.3 and 4.7 ± 0.8%, respectively) animals (Fig 5). In the omega-6 fatty acids (Fig 6), gamma-linolenic acid (GLA, C18:3ω-6), dihomo-gamma-linolenic acid (C20:3ω-6) or arachidonic acid (AA, C20:4ω-6) did not vary significantly in plasma from supplemented compared to water animals, but there

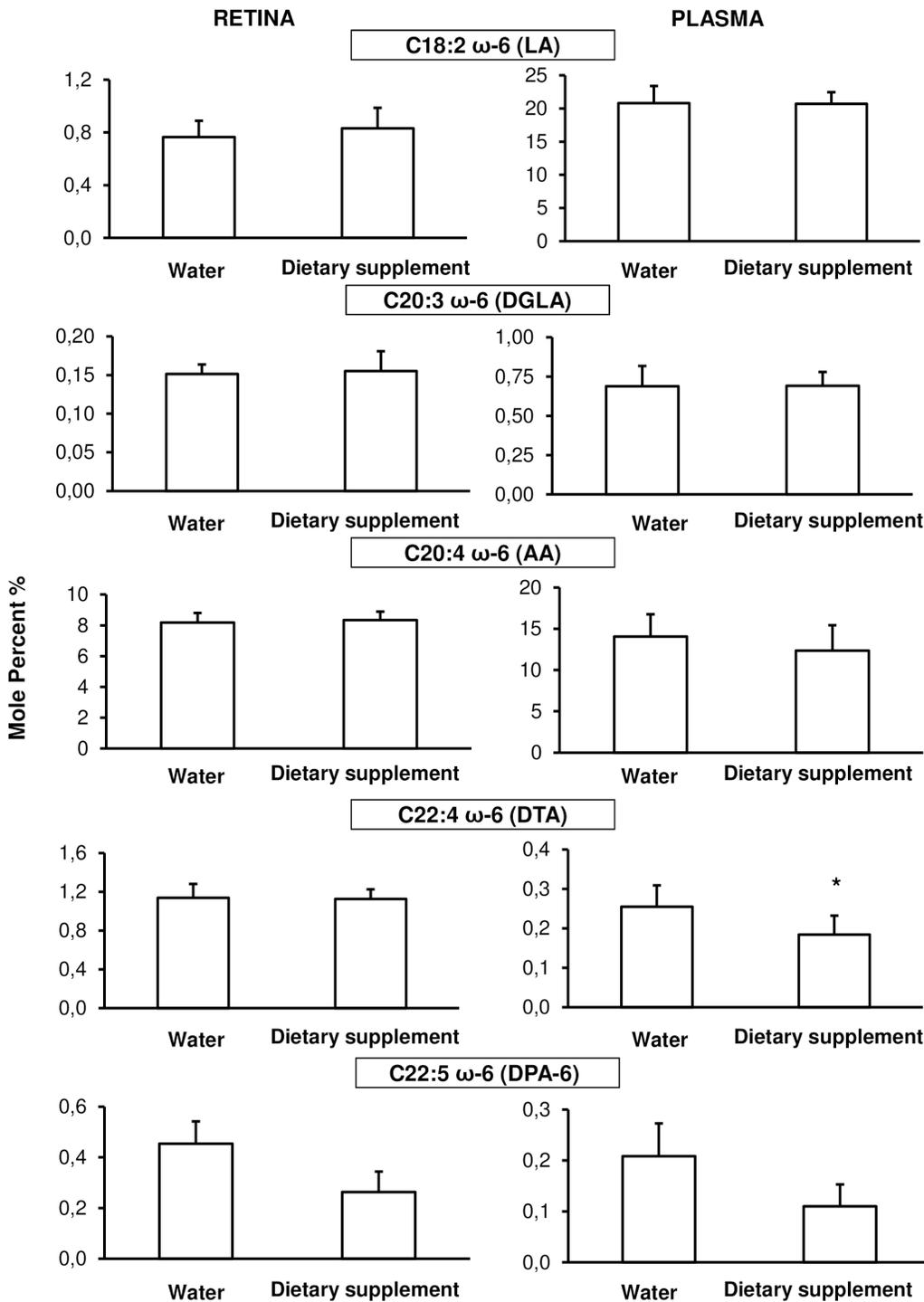




**Fig 5. Omega-3 fatty acid composition in plasma (right column) and retina (left column).** Animals were daily fed by using a gastric canula with 0.2 ml of water (n = 15) or dietary supplement (n = 10) for one week before the fatty acid analysis. Results are presented as percentage ± SD of the total fatty acid. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$  compared to water fed by gavage group.

doi:10.1371/journal.pone.0128395.g005

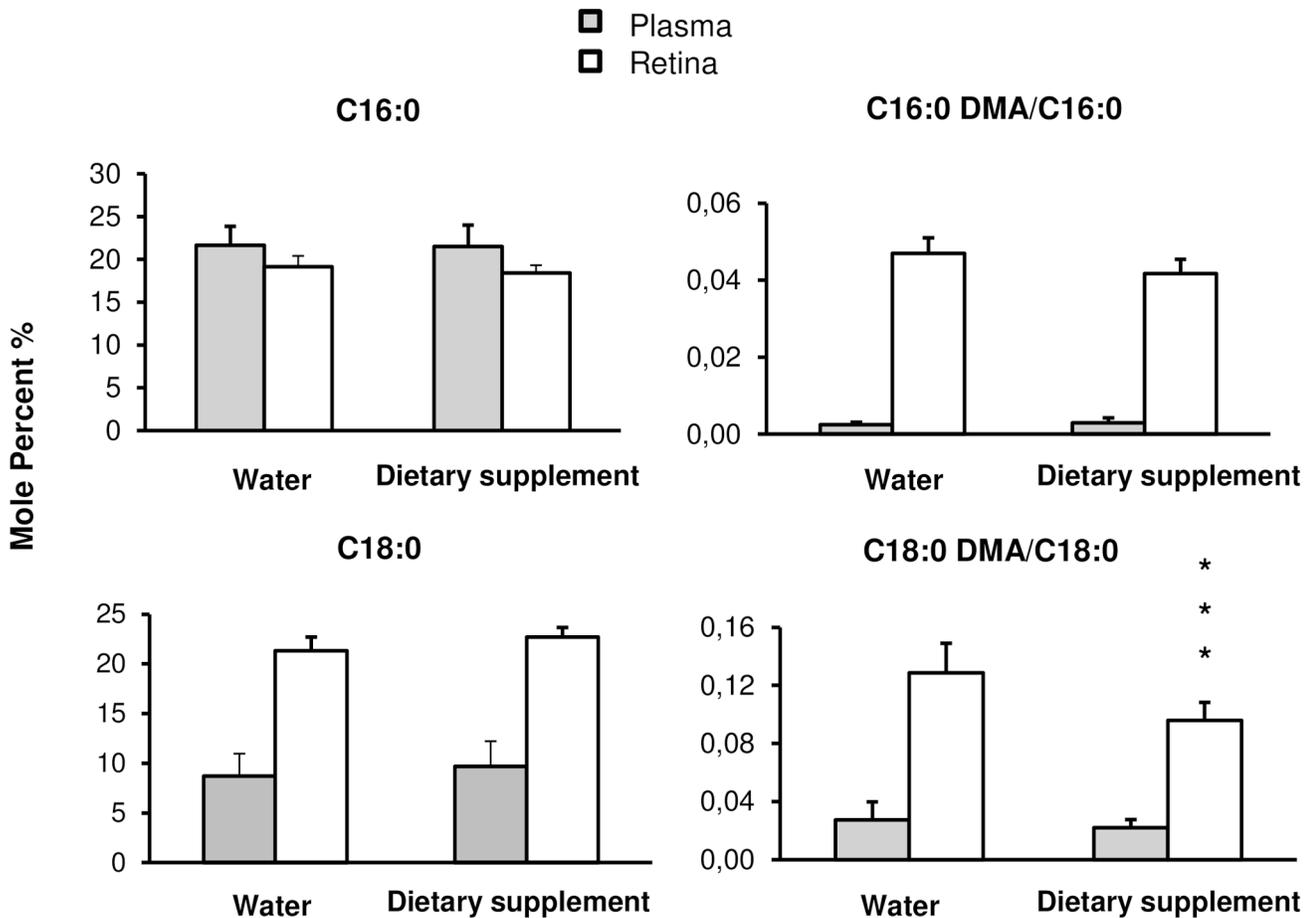




**Fig 6. Omega-6 fatty acid composition in plasma (right column) and retina (left column).** Animals were daily fed by using a gastric canula with 0.2 ml of water (n = 15) or dietary supplement (n = 10) for one week before the fatty acid analysis. Results are presented as percentage ± SD of the total fatty acid. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$  compared to water fed by gavage group.

doi:10.1371/journal.pone.0128395.g006





**Fig 7. Plasmalogens.** Animals were daily fed by using a gastric canula with 0.2 ml of water (n = 15) or dietary supplement (n = 10) for one week before plasmalogens analysis. In Plasmalogen, the aliphatic moieties at the sn-1 position consist of Palmitic Acid (C16:0) or Stearic Acid (C18:0) and Plasmalogen ratio is calculated as C18:0 DMA/C18:0 and C16:0 DMA/ C16:0 in plasma and retina. DMA: dimethyl aldehyde. Results are presented as percentage  $\pm$  SD of the total fatty acid. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$  compared to water fed by gavage group.

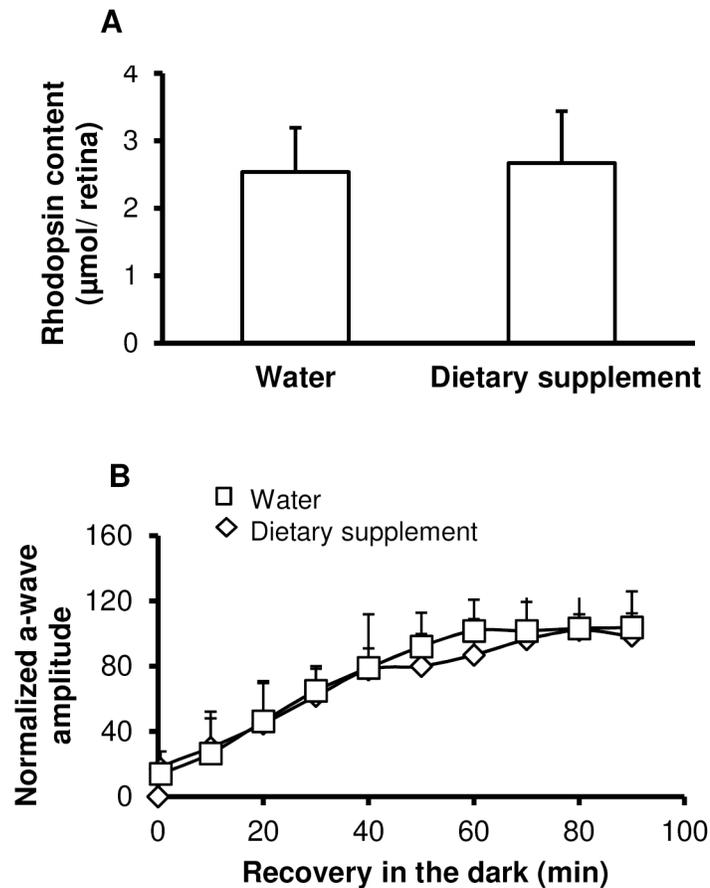
doi:10.1371/journal.pone.0128395.g007

was a decrease in docosatrienoic acid (DTA, C22:4 $\omega$ -6;  $p = 0.012$ ) and in docosapentaenoic acid (DPA-6, C22:5 $\omega$ -6;  $p = 0.003$ ) by 45% and 28% respectively.

In the retina,  $\alpha$ -LLNA was decreased ( $p = 0.004$ ) in supplemented ( $0.03 \pm 0.01\%$ ) compared to water ( $0.09 \pm 0.05\%$ ) animals (Fig 5). The omega-3 EPA and DPA were higher ( $p < 0.005$ ) in supplemented ( $0.09 \pm 0.03\%$  and  $0.50 \pm 0.06\%$ , respectively) than in water ( $0.05 \pm 0.03\%$  and  $0.29 \pm 0.09\%$ , respectively) retinas. There was no significant difference in DHA level. The only omega-6 fatty acid affected by the treatment was DPA which was lower ( $p = 0.012$ ) in supplemented ( $0.26 \pm 0.08\%$ ) than in water retinas ( $0.45 \pm 0.09\%$ ) (Fig 6).

The relative plasmalogens amount was calculated as a ratio of dimethylacetals (DMAs, from plasmalogens type) to methyl esters. Dimethyl aldehyde stearic acid (DMA C18:0), dimethyl aldehyde palmitic acid (DMA C16:0), Stearic acid (C18:0) or palmitic acid (C16:0) was not significantly different between groups in plasma (Fig 7). In retina, there was an increase ( $p = 0.01$ ) in C18:0 from  $21 \pm 1\%$  in water to  $23 \pm 1\%$  in supplemented animals and a reduction ( $p < 0.003$ ) in C18:0 DMA and C16:0 DMA leading to a relative amount of (C18:0 DMA/C18:0) and (C16:0 DMA/C16:0) lower ( $p < 0.009$ ) in supplemented ( $0.042 \pm 0.004\%$





**Fig 8. Rhodopsin content and regeneration.** (A) Rhodopsin content in the retina of rats fed using a gastric canula with 0.2 ml of water (n = 6) or dietary supplement (n = 6) for one week. Results are presented as mean value ± SD µmol of rhodopsin/eye. (B) Rod-response recovery. Electroretinograms were recorded from water (diamond, n = 10) and dietary supplement (square, n = 11) rats. A single test flash of 2.88 (cd.s.m<sup>-2</sup>) was presented on dark-adapted rats. Rats were then exposed to a steady light for 2 min to bleach the rods. Immediately after bleaching and then every 10 min for 90 min, a single test flash of 2.88 (cd.s.m<sup>-2</sup>) was presented. The a-wave responses at the indicated times after bleaching were normalized to the initial dark-adapted response for each rat. The error bars represent ± SD.

doi:10.1371/journal.pone.0128395.g008

and 0.10 ± 0.01%, respectively) than in water (0.047 ± 0.004% and 0.13 ± 0.02%, respectively) retinas.

### Rhodopsin and rod response recovery

Because rhodopsin content or rhodopsin regeneration through the visual cycle can affect retinal sensitivity to light [21], we have measured rhodopsin content (Fig 8A) in the retina and rod-response recovery by electroretinography (Fig 8B) after one week of water or dietary supplementation. Rhodopsin content was not significantly different between water (2.24 ± 0.33 µmoles/retina) and supplemented (2.57 ± 0.22 µmoles/retina) groups and rod-response recovery was not significantly affected by supplementation. These results indicate that the daily supplementation enriched with antioxidant and fish oil did not affect rhodopsin content or regeneration.



## Discussion

Although, light is essential for vision, it can initiate pathological processes within visual cells commonly referred as retinal light damage and it gives rise to oxidative damage, inflammation and apoptotic reactions leading to photoreceptor cell death. Oxidative stress has been implicated in retinal light damage processes and it has been postulated as a risk factor associated with the initiation and/or progression of retinal degeneration in Age-Related Macular Degeneration (AMD) [28] and some form of inherited retinal degeneration [29]. One of the therapeutic strategies to prevent or at least slow down development or progression of retinal degeneration consist of improving retinal antioxidant capacities with dietary supplement. Based on Age-Related Eye Disease study 1 and 2 (AREDS 1 and AREDS 2), several different ocular dietary supplements have been developed and are already on the market without safety and efficacy approval. In the present study, we have investigated one of these dietary supplements, for the first time, in an in-vivo model of light-induced retinal degeneration.

The dietary supplement used in the present work differs from the formulations used in AREDS 1 and AREDS 2. It contains the macular carotenoids lutein and zeaxanthin as used in AREDS 2 but not  $\beta$ -carotene. Evidence has accumulated that lutein/zeaxanthin have potent radical scavenger as well as antioxidative properties and, indeed, secondary analysis of AREDS 2 indicates that supplementation is beneficial in AMD [5,30]. In addition, omega-3 free fatty acids are part of the dietary supplement used in our study, with more eicosapentaenoic acid (EPA) than docosahexaenoic acid (DHA) in contrary to AREDS 2. Omega-3 free fatty acids have a key role in determining the permeability, fluidity, thickness, and lipid phase of photoreceptor membranes. DHA content has been shown to be reduced in outer segment of photoreceptors that are fated to degenerate [31,32] and in blood during retinal degeneration [33–35] leading to the hypothesis that photoreceptor fatty acid content and mainly omega-3 content might be an important factor involved in retinal degeneration. In addition, DHA is the precursor for neuroprotectin D1 which displays a potent neuroprotective bioactivity [36]. For its part, EPA can compete with the production of pro-inflammatory eicosanoids from arachidonic acid (omega-6) by generating anti-inflammatory eicosanoids [37]. The relative dose of zinc in the present supplement was reduced compared to AREDS 1 and even compared to the lower dose tested in AREDS 2. Moreover, the dietary supplement tested, also contained an antioxidant that was not part of the spectrum tested in AREDS 1 and 2, resveratrol. Resveratrol, one of dietary polyphenol found in grapes, nuts and other plants, is known to prevent retinal degeneration related to light damage [38,39]. The first important result obtained in the present study was that the dietary supplement was not toxic over a period of daily gavage of 4 weeks.

Whereas most of studies using light damage were conducted by exposing the animals to short-term illumination (2 hours to 24 hours) with high light intensity (1000–8000 lux) [40–42], in the present study we have used a model consisting in exposing the animals for one week to 400 lux of cyclic light (12 hours light/12 hours dark) leading to progressive light-induced retinal degeneration (PLIRD). Retinal degeneration is characterized by a loss of photoreceptors cells by apoptosis, a transitory alteration of the surviving photoreceptors as shown by the transient increase in the half-saturation luminance ( $K$ ) that finally results in a 48% loss of function. These results were in agreement with others who showed that light damage induced photoreceptor apoptosis [43,44] or that an increase in cyclic light intensity from 15 to 750 lux resulted in substantial decreases in photoreceptor cell densities with alteration of the surviving photoreceptors [45].

In the present study, the dietary supplement tested has prevented retinal structure and function loss from the cumulative damaging effect of light. It is important to mention that the slight reduction in retinal function still observed in the supplemented group after PLIRD was not due



to photoreceptor loss since the thickness of the outer nuclear layer was not affected by PLIRD confirming that the photoreceptors are preserved. This reduction is likely due to an adaptive mechanism to the bright environmental light condition compared to dim-cycling rearing condition. Indeed, it is well known that in bright cyclic light rearing condition the outer segments are shorter and rhodopsin packing is reduced [46]. In order to confirm this hypothesis experiments are on course to evaluate rhodopsin content and rod ultra-structure in supplemented animals exposed to PLIRD compared to the one in dim-cyclic-light.

Thereafter, to better understand the protective mechanism, we have evaluated for the first time, retinal and plasmatic fatty acids and plasmalogens changes induced in-vivo by a complex supplement. Whereas most studies have evaluated fatty acid level after a long period of dietary manipulation (1–3 months) [47,48], we have looked at only after one week. DHA was increased significantly in plasma but in the retina its level was not changed. These findings are in agreement with the fact that DHA handling and trafficking by the retina is specifically orchestrated around a conservation mechanism that ensures adequate levels of DHA for photoreceptors at all times [49]. EPA and docosapentaenoic acid (DPA), the two previous steps in the biosynthetic pathway to DHA, were increased in plasma and retina of supplemented animals. As expected, the increases in omega-3 fatty acids were associated with a lower level of omega-6 fatty acids, omega-6 polyunsaturated fatty acids (PUFAs) biochemically competing with omega-3 PUFAs [37,50,51]. Dietary supplement had no effect on the level of  $\alpha$ -linolenic acid ( $\alpha$ -LLNA), the omega-3 precursor, in plasma. But  $\alpha$ -LLNA was largely reduced in the retina. These data suggest a decrease in  $\alpha$ -LLNA incorporation from the circulation since the blood supplies directly EPA and DHA. This hypothesis is supported by the fact that the tissue accretion is highest when the Long Chain PUFAs are ingested in the preformed state [52]. Therefore, our hypothesis is that the beneficial effect of the dietary supplement used in the present study is in part due to this accumulation of EPA. EPA storage can (1) facilitate DHA supply from neosynthesis in the retina or (2) compete with the production of pro-inflammatory eicosanoids from arachidonic acid (omega-6) by producing less inflammatory or even anti-inflammatory eicosanoids [37]. However, it is important to remember that the other molecules supplied by the dietary supplement used can interact within the retina and/or retinal pigment epithelium in a way to optimize neuroprotection [53,54].

As for other tissues or cell types, retinal phospholipids also consist of particular phospholipids called plasmalogens (Pls), which are likely to be synthesized in the inner segment of photoreceptor cells, and in the retinal pigmented epithelium (RPE) cells [55]. Pls are of particular interest since they have been described as physiological antioxidants. The vinyl ether functionality serves as a sacrificial trap for free radicals and singlet oxygen [56,57]. In addition, Pls containing at their sn-2 position arachidonic or docosahexaenoic acids, are suggested to be reservoirs of PUFAs, which are released upon proper stimulation [58]. Moreover, an increase of Pls has been reported in dominant, recessive, and isolates forms of Retinis pigmentosa patients [59]. To our knowledge, no studies have established the influence of dietary supplement on retinal and plasma Pls. In the present study, Pls level did not vary in plasma, but it decreased in the retina of supplemented animals. These results suggest that a lower level of plasmalogens is beneficial for the retina. This hypothesis is supported by the work of Stadelmann-Ingrand who has demonstrated that fatty aldehydes released from plasmalogens after oxidative stress in cerebral cortex homogenates can generate covalent modifications of endogenous macromolecules such as phosphatidylethanolamine (PE), the very reactive and toxic malondialdehyde (MDA) or 4-hydroxynonenal (4-HNE) and prevent their deleterious effects [60].

Since photobleaching and regeneration of rhodopsin have been identified as essential steps for retinal sensitivity to light damage [61,62] and rhodopsin function might be modulated by membrane composition [63], we have evaluated for the first time the effect of a dietary



supplement on rhodopsin content and function. Fast regeneration of rhodopsin after bleaching increases retinal sensitivity, whereas slowing regeneration promotes photoreceptor's resistance [21]. In the present study, we have shown that although the dietary supplement tested induced changes in retinal fatty acids composition, it did not affect rhodopsin content or rhodopsin regeneration.

## Conclusions

The present study reveals, for the first time, that dietary supplement containing lutein, zeaxanthin, vitamins C, E, Zinc, omega-3 with mainly EPA and resveratrol protects the retina from light-induced retinal degeneration without affecting rhodopsin. This indicates that the present formulation is capable of exerting anti-oxidative properties in the retina in-vivo. Therefore, this dietary supplement presents an excellent potential to be used as a preventive supplement for the progression of certain retinal disease. Experiments are on course to further investigate this neuroprotective mechanism.

## Acknowledgments

We would like to thank Brigitte Laillet for her excellent technical assistance in fatty acid analysis and Nathalie Jacquemot for her help on animal treatments.

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: KRBO IRC MD MA. Performed the experiments: KRBO IRC CC. Analyzed the data: KRBO IRC. Contributed reagents/materials/analysis tools: IRC MD. Wrote the paper: KRBO IRC MD MA.

## References

1. A randomized, placebo-controlled, clinical trial of high-dose supplementation with vitamins C and E, beta carotene, and zinc for age-related macular degeneration and vision loss: AREDS report no. 8. *Arch Ophthalmol* 2001; 119: 1417–1436. PMID: [11594942](#)
2. Chang CW, Chu G, Hinz BJ, Greve MD. Current use of dietary supplementation in patients with age-related macular degeneration. *Can J Ophthalmol* 2003; 38: 27–32. PMID: [12608514](#)
3. Charkoudian LD, Gower EW, Solomon SD, Schachat AP, Bressler NM, Bressler SB. Vitamin usage patterns in the prevention of advanced age-related macular degeneration. *Ophthalmology* 2008; 115: 1032–1038 e1034. PMID: [18096234](#)
4. Pemp B, Polska E, Karl K, Lasta M, Minichmayr A, et al. Effects of antioxidants (AREDS medication) on ocular blood flow and endothelial function in an endotoxin-induced model of oxidative stress in humans. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010; 51: 2–6. doi: [10.1167/iov.09-3888](#) PMID: [19684008](#)
5. Lutein + zeaxanthin and omega-3 fatty acids for age-related macular degeneration: the Age-Related Eye Disease Study 2 (AREDS2) randomized clinical trial. *JAMA* 2013; 309: 2005–2015. doi: [10.1001/jama.2013.4997](#) PMID: [23644932](#)
6. Organisciak DT, Vaughan DK. Retinal light damage: mechanisms and protection. *Prog Retin Eye Res* 2010; 29: 113–134. doi: [10.1016/j.preteyeres.2009.11.004](#) PMID: [19951742](#)
7. Dunaief JL, Dentchev T, Ying GS, Milam AH. The role of apoptosis in age-related macular degeneration. *Arch Ophthalmol* 2002; 120: 1435–1442. PMID: [12427055](#)
8. Cideciyan AV, Jacobson SG, Aleman TS, Gu D, Pearce-Kelling SE, Sumaroka A, et al. In vivo dynamics of retinal injury and repair in the rhodopsin mutant dog model of human retinitis pigmentosa. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 5233–5238. PMID: [15784735](#)
9. Ranchon I, LaVail MM, Kotake Y, Anderson RE. Free radical trap phenyl-N-tert-butyl nitron protects against light damage but does not rescue P23H and S334ter rhodopsin transgenic rats from inherited retinal degeneration. *J Neurosci* 2003; 23: 6050–6057. PMID: [12853423](#)
10. Wang M, Lam TT, Tso MO, Naash MI. Expression of a mutant opsin gene increases the susceptibility of the retina to light damage. *Vis Neurosci* 1997; 14: 55–62. PMID: [9057268](#)



11. Radu RA, Mata NL, Bagla A, Travis GH. Light exposure stimulates formation of A2E oxiranes in a mouse model of Stargardt's macular degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 5928–5933. PMID: [15067110](#)
12. Hunter JJ, Morgan JI, Merigan WH, Sliney DH, Sparrow JR, Williams DR. The susceptibility of the retina to photochemical damage from visible light. *Prog Retin Eye Res* 2012; 31: 28–42. doi: [10.1016/j.preteyeres.2011.11.001](#) PMID: [22085795](#)
13. Travis GH, Golczak M, Moise AR, Palczewski K. Diseases caused by defects in the visual cycle: retinoids as potential therapeutic agents. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2007; 47: 469–512. PMID: [16968212](#)
14. Sui GY, Liu GC, Liu GY, Gao YY, Deng Y, Wang WY et al. Is sunlight exposure a risk factor for age-related macular degeneration? A systematic review and meta-analysis. *Br J Ophthalmol* 2013; 97: 389–394. doi: [10.1136/bjophthalmol-2012-302281](#) PMID: [23143904](#)
15. Lamb TD, Pugh EN Jr. G-protein cascades: gain and kinetics. *Trends Neurosci* 1992; 15: 291–298. PMID: [1384198](#)
16. Granit R. The components of the retinal action potential in mammals and their relation to the discharge in the optic nerve. *J Physiol* 1933; 77: 207–239. PMID: [16994385](#)
17. Lamb TD, Pugh EN Jr. A quantitative account of the activation steps involved in phototransduction in amphibian photoreceptors. *J Physiol* 1992; 449: 719–758. PMID: [1326052](#)
18. Winkler BS. The electroretinogram of the isolated rat retina. *Vision Res* 1972; 12: 1183–1198. PMID: [5043568](#)
19. Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem* 1957; 226: 497–509. PMID: [13428781](#)
20. Juaneda P, Rocquelin G. Rapid and convenient separation of phospholipids and non phosphorus lipids from rat heart using silica cartridges. *Lipids* 1985; 20: 40–41. PMID: [2982073](#)
21. Mandal MN, Moiseyev GP, Elliott MH, Kasus-Jacobi A, Li X, Chen H et al. Alpha-phenyl-N-tert-butyl-nitron (PBN) prevents light-induced degeneration of the retina by inhibiting RPE65 protein isomerohydrolase activity. *J Biol Chem* 2011; 286: 32491–32501. doi: [10.1074/jbc.M111.255877](#) PMID: [21785167](#)
22. Ambati J, Ambati BK, Yoo SH, Ianchulev S, Adamis AP. Age-related macular degeneration: etiology, pathogenesis, and therapeutic strategies. *Surv Ophthalmol* 2003; 48: 257–293. PMID: [12745003](#)
23. Jacobson SG, Cideciyan AV. Treatment possibilities for retinitis pigmentosa. *N Engl J Med* 2010; 363: 1669–1671. doi: [10.1056/NEJMcibr1007685](#) PMID: [20961252](#)
24. Acar N, Gregoire S, Andre A, Juaneda P, Joffre C, Bron AM, et al. Plasmalogens in the retina: in situ hybridization of dihydroxyacetone phosphate acyltransferase (DHAP-AT)—the first enzyme involved in their biosynthesis—and comparative study of retinal and retinal pigment epithelial lipid composition. *Exp Eye Res* 2007; 84: 143–151. PMID: [17081518](#)
25. Morand OH, Zoeller RA, Raetz CR. Disappearance of plasmalogens from membranes of animal cells subjected to photosensitized oxidation. *J Biol Chem* 1988; 263: 11597–11606. PMID: [3403548](#)
26. Morandat S, Bortolato M, Anker G, Doutheau A, Lagarde M, Chauvet JP et al. Plasmalogens protect unsaturated lipids against UV-induced oxidation in monolayer. *Biochim Biophys Acta* 2003; 1616: 137–146. PMID: [14561471](#)
27. Zoeller RA, Morand OH, Raetz CR. A possible role for plasmalogens in protecting animal cells against photosensitized killing. *J Biol Chem* 1988; 263: 11590–11596. PMID: [3403547](#)
28. McCarty CA, Mukesh BN, Fu CL, Mitchell P, Wang JJ, Taylor HR et al. Risk factors for age-related maculopathy: the Visual Impairment Project. *Arch Ophthalmol* 2001; 119: 1455–1462. PMID: [11594944](#)
29. Paskowitz DM, LaVail MM, Duncan JL. Light and inherited retinal degeneration. *Br J Ophthalmol* 2006; 90: 1060–1066. PMID: [16707518](#)
30. Koushan K, Rusovici R, Li W, Ferguson LR, Chalam KV. The role of lutein in eye-related disease. *Nutrients* 2013; 5: 1823–1839. doi: [10.3390/nu5051823](#) PMID: [23698168](#)
31. Anderson RE, Maude MB, Bok D. Low docosahexaenoic acid levels in rod outer segment membranes of mice with rds/peripherin and P216L peripherin mutations. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002; 42: 1715–1720.
32. Bicknell IR, Darrow R, Barsalou L, Fliesler SJ, Organisciak DT. Alterations in retinal rod outer segment fatty acids and light-damage susceptibility in P23H rats. *Mol Vis* 2002; 8: 333–340. PMID: [12355060](#)
33. Converse CA, Hammer HM, Packard CJ, Shepherd J. Plasma lipid abnormalities in retinitis pigmentosa and related conditions. *Trans Ophthalmol Soc U K* 1983; 103 (Pt 5): 508–512. PMID: [6591588](#)



34. Maude MB, Anderson EO, Anderson RE. Polyunsaturated fatty acids are lower in blood lipids of Usher's type I but not Usher's type II. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998; 39: 2164–2166. PMID: [9761296](#)
35. Hoffman DR, DeMar JC, Heird WC, Birch DG, Anderson RE. Impaired synthesis of DHA in patients with X-linked retinitis pigmentosa. *J Lipid Res* 2001; 42: 1395–1401. PMID: [11518758](#)
36. Bazan NG. Neuroprotectin D1-mediated anti-inflammatory and survival signaling in stroke, retinal degenerations, and Alzheimer's disease. *J Lipid Res* 2009; 50 Suppl: S400–405. doi: [10.1194/jlr.R800068-JLR200](#) PMID: [19018037](#)
37. SanGiovanni JP, Chew EY. The role of omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in health and disease of the retina. *Prog Retin Eye Res* 2005; 24: 87–138. PMID: [15555528](#)
38. Kubota S, Kurihara T, Ebinuma M, Kubota M, Yuki K, Sasaki M, et al. Resveratrol prevents light-induced retinal degeneration via suppressing activator protein-1 activation. *Am J Pathol* 2010; 177: 1725–1731. doi: [10.2353/ajpath.2010.100098](#) PMID: [20709795](#)
39. Alex AF, Eter N. [Effect of resveratrol on the fundus oculi. An overview]. *Ophthalmologie* 2013; 110: 321–330. doi: [10.1007/s00347-012-2744-3](#) PMID: [23354354](#)
40. Mo MS, Li HB, Wang BY, Wang SL, Zhu ZL, Yu XR. PI3K/Akt and NF-kappaB activation following intravitreal administration of 17beta-estradiol: neuroprotection of the rat retina from light-induced apoptosis. *Neuroscience* 2013; 228: 1–12. doi: [10.1016/j.neuroscience.2012.10.002](#) PMID: [23069760](#)
41. Tremblay F, Waterhouse J, Nason J, Kalt W. Prophylactic neuroprotection by blueberry-enriched diet in a rat model of light-induced retinopathy. *J Nutr Biochem* 2013; 24: 647–655. doi: [10.1016/j.jnutbio.2012.03.011](#) PMID: [22832077](#)
42. Xie Z, Wu X, Gong Y, Song Y, Qiu Q, Li C. Intraperitoneal injection of Ginkgo biloba extract enhances antioxidation ability of retina and protects photoreceptors after light-induced retinal damage in rats. *Curr Eye Res* 2007; 32: 471–479. PMID: [17514533](#)
43. Ranchon I, Gorrand JM, Cluzel J, Droy-Lefaix MT, Doly M. Functional protection of photoreceptors from light-induced damage by dimethylthiourea and Ginkgo biloba extract. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999; 40: 1191–1199. PMID: [10235553](#)
44. Zhu Y, Valter K, Stone J. Environmental damage to the retina and preconditioning: contrasting effects of light and hyperoxic stress. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010; 51: 4821–4830. doi: [10.1167/iov.09-5050](#) PMID: [20393118](#)
45. Katz ML, Eldred GE. Retinal light damage reduces autofluorescent pigment deposition in the retinal pigment epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1989; 30: 37–43. PMID: [2912913](#)
46. Organisciak DT, Wang HM, Xie A, Reeves DS, Donoso LA. Intense-light mediated changes in rat rod outer segment lipids and proteins. *Prog Clin Biol Res* 1989; 314: 493–512. PMID: [2558385](#)
47. Schnebelen C, Gregoire S, Pasquis B, Joffre C, Creuzot-Garcher CP, Bron AM, et al. Dietary n-3 and n-6 PUFA enhance DHA incorporation in retinal phospholipids without affecting PGE(1) and PGE (2) levels. *Lipids* 2009; 44: 465–470. doi: [10.1007/s11745-009-3289-3](#) PMID: [19242743](#)
48. Schnebelen C, Viau S, Gregoire S, Joffre C, Creuzot-Garcher CP, Bron AM, 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: 216–224. doi: [10.1159/000217726](#) PMID: [19451735](#)
49. Bazan NG, Gordon WC, Rodriguez de Turco EB. Docosahexaenoic acid uptake and metabolism in photoreceptors: retinal conservation by an efficient retinal pigment epithelial cell-mediated recycling process. *Adv Exp Med Biol* 1992; 318: 295–306. PMID: [1386177](#)
50. Cleland LG, James MJ, Neumann MA, D'Angelo M, Gibson RA. Linoleate inhibits EPA incorporation from dietary fish-oil supplements in human subjects. *Am J Clin Nutr* 1992; 55: 395–399. PMID: [1310374](#)
51. Volker D, Fitzgerald P, Major G, Garg M. Efficacy of fish oil concentrate in the treatment of rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2000; 27: 2343–2346. PMID: [11036827](#)
52. Su HM, Bernardo L, Mirmiran M, Ma XH, Corso TN, Nathanielsz PW et al. Bioequivalence of dietary alpha-linolenic and docosahexaenoic acids as sources of docosahexaenoate accretion in brain and associated organs of neonatal baboons. *Pediatr Res* 1999; 45: 87–93. PMID: [9890614](#)
53. Organisciak DT, Wang HM, Li ZY, Tso MO. The protective effect of ascorbate in retinal light damage of rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1985; 26: 1580–1588. PMID: [4055290](#)
54. Bohm F, Edge R, Truscott TG. Interactions of dietary carotenoids with singlet oxygen ( $^1O_2$ ) and free radicals: potential effects for human health. *Acta Biochim Pol* 2012; 59: 27–30. PMID: [22428151](#)
55. Saab S, Mazzocco J, Creuzot-Garcher CP, Bron AM, Bretillon L, Acar N. Plasmalogens in the retina: from occurrence in retinal cell membranes to potential involvement in pathophysiology of retinal diseases. *Biochimie* 2014; 107 Pt A: 58–65. doi: [10.1016/j.biochi.2014.07.023](#) PMID: [25127660](#)



56. Broniec A, Klosinski R, Pawlak A, Wrona-Krol M, Thompson D, Sama T. Interactions of plasmalogens and their diacyl analogs with singlet oxygen in selected model systems. *Free Radic Biol Med* 2011; 50: 892–898. doi: [10.1016/j.freeradbiomed.2011.01.002](https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.01.002) PMID: [21236336](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21236336/)
57. Braverman NE, Moser AB. Functions of plasmalogen lipids in health and disease. *Biochim Biophys Acta* 2012; 1822: 1442–1452. doi: [10.1016/j.bbadis.2012.05.008](https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2012.05.008) PMID: [22627108](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22627108/)
58. Farooqui AA, Yang HC, Horrocks LA. Plasmalogens, phospholipases A2 and signal transduction. *Brain Res Brain Res Rev* 1995; 21: 152–161. PMID: [8866672](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8866672/)
59. Schaefer EJ, Robins SJ, Patton GM, Sandberg MA, Weigel-DiFranco CA, Rosner B et al. Red blood cell membrane phosphatidylethanolamine fatty acid content in various forms of retinitis pigmentosa. *J Lipid Res* 1995; 36: 1427–1433. PMID: [7595066](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7595066/)
60. Stadelmann-Ingrand S, Pontcharraud R, Fauconneau B. Evidence for the reactivity of fatty aldehydes released from oxidized plasmalogens with phosphatidylethanolamine to form Schiff base adducts in rat brain homogenates. *Chem Phys Lipids* 2004; 131: 93–105. PMID: [15210368](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15210368/)
61. Humphries MM, Rancourt D, Farrar GJ, Kenna P, Hazel M, Bush RA et al. Retinopathy induced in mice by targeted disruption of the rhodopsin gene. *Nat Genet* 1997; 15: 216–219. PMID: [9020854](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9020854/)
62. Grimm C, Wenzel A, Hafezi F, Yu S, Redmond TM, Remé CE. Protection of Rpe65-deficient mice identifies rhodopsin as a mediator of light-induced retinal degeneration. *Nat Genet* 2000; 25: 63–66. PMID: [10802658](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10802658/)
63. Mitchell DC, Niu SL, Litman BJ. Quantifying the differential effects of DHA and DPA on the early events in visual signal transduction. *Chem Phys Lipids* 2012; 165: 393–400. doi: [10.1016/j.chemphyslip.2012.02.008](https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2012.02.008) PMID: [22405878](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22405878/)



***Publication n°2***

**L'effet d'un complément alimentaire enrichi en antioxydants et en oméga-3 sur une lignée cellulaire humaine d'épithélium pigmentaire rétinien**

Khaoula Ramchani-Ben Othman, David Cia, Niyazi Acar, Nathalie Jacquemot, Christine Cercy, Olivier Berdeaux, Stéphane Grégoire, Lionel Brétilon, Mohamed Amri, Isabelle Ranchon-Cole.

**Publication soumise dans le journal : Journal of Lipid Research**



## **Résumé de la publication N°2**

### **L'effet d'un complément alimentaire enrichi en antioxydants et en omega-3 sur une lignée cellulaire humaine d'épithélium pigmentaire rétinien**

Nous avons précédemment montré pour la première fois *in-vivo* que le complément alimentaire, enrichi en antioxydants et en huile de poisson, modifie le contenu en acides gras du plasma et de la rétine après 1 semaine de gavage. Au niveau rétinien, il induit une accumulation de l'acide eicosapentanoïque (EPA) et docosapentaénoïque (DPA w-3) sans affecter le contenu ou la régénération de la rhodopsine et surtout il protège la rétine contre les lésions induites par la lumière.

Afin d'aller plus loin dans le mécanisme protecteur impliqué, nous avons évalué l'effet du complément sur les cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien (EPR). En effet, lors des expérimentations *in-vivo* le complément était apporté par voie orale et les nutriments devaient donc transiter par l'EPR avant d'atteindre la rétine. De plus, il est clairement reconnu que l'EPR joue un rôle crucial dans la survie de la rétine et que des altérations de celui-ci sont impliquées dans la DMLA.

Les expériences ont été menées sur une lignée cellulaire humaine ARPE-19 qui conserve de nombreuses propriétés de cellules biologiques et fonctionnelles de l'EPR. Nous avons déterminé l'effet du complément alimentaire sur la composition en acides gras et la production des isoprostanes par HPLC en collaboration avec le laboratoire de « Œil, nutrition et signalisation cellulaire » de Dijon ainsi que la capacité du complément à prévenir la mort cellulaire suite à un stress induit par le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$  à 600  $\mu M$ ) par le test de MTT. Des expérimentations par cytométrie en flux ont également été menées.

La concentration de complément alimentaire utilisée est exprimée en équivalent d'acide docosahexanoïque (eq.DHA). Le DHA est à la concentration de 365 mM dans le complément alimentaire d'origine. La durée d'incubation des cellules avec le complément est de 7 jours à partir de un jour après l'ensemencement. Les concentrations testées vont de 0,35  $\mu M$  à 177  $\mu M$  eq.DHA. La survie cellulaire est évaluée par MTT et cytométrie en flux.

Le complément alimentaire n'a aucun effet sur la survie des cellules entre 0,35 et 88  $\mu M$  eq.DHA mais au-delà de cette concentration il devient toxique.



Le supplément à une concentration comprise entre 5,5  $\mu\text{M}$  et 88  $\mu\text{M}$  *eq.*DHA réduit significativement la mort des cellules ARPE-19 induite par  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Pour la suite des expérimentations, nous avons sélectionné 2 concentrations : la plus faible concentration avec laquelle nous observons un effet protecteur c'est-à-dire 5.5  $\mu\text{M}$  *eq.* DHA, et une concentration inférieure à la concentration de 88  $\mu\text{M}$  *eq.*DHA au-delà de laquelle le supplément devient toxique, c'est à dire la concentration de 44  $\mu\text{M}$  *eq.* DHA.

A ces 2 concentrations, nous avons déterminé **le contenu en acides gras et isoprostanes** dans les cellules après 7 jours d'incubation. Le complément alimentaire induit une modification de la composition lipidique des cellules ARPE-19 avec une augmentation des acides gras oméga-3 (LNA, EPA, DPA, DHA) et une diminution globale des acides gras oméga-6. Les variations sont d'autant plus importantes que la concentration en supplément est élevée. Alors qu'individuellement tous les omega-3 étudiés augmentent il n'en est pas de même pour les omega-6. En effet, on observe une augmentation du précurseur l'acide linoléique (C18 :2n-6) et de l'acide gras suivant l'acide dihomogamma-linoléique (20:3 n-6) alors que l'acide arachidonique (AA, C20 :4 n-6) et l'acide adrénique (C22 : 4 n-6) diminuent. **Ces résultats suggèrent une incorporation des oméga-3 au niveau des cellules ARPE-19 associée à une diminution de la synthèse des acides gras oméga-6 à longue chaîne à partir des précurseurs.**

L'étude de cytométrie en flux met en évidence **une externalisation des phosphatidylsérines (PS)** au niveau des cellules traitées par 44  $\mu\text{M}$  *eq.*DHA. L'externalisation des PS étant un marqueur reconnu de l'induction d'apoptose, nous avons évalué l'état des cellules par un test clonogénique. Ce test a été réalisé sur des cellules traitées à 0, 5,5 et 44  $\mu\text{M}$  *eq.*DHA. Le nombre de clones est similaire entre les cellules préalablement incubées pendant 7 jours avec 5,5  $\mu\text{M}$  et 44  $\mu\text{M}$  *eq.*DHA et les cellules non traitées. Toutefois, la taille des clones est d'autant plus réduite que la concentration de supplément augmente. Par conséquent, bien qu'après une incubation de 7 jours avec 44  $\mu\text{M}$  *eq.*DHA aucune mort cellulaire n'ait été observée, le test clonogénique indique que ces cellules ont une moindre capacité proliférative. Il est à noter qu'à 44  $\mu\text{M}$  *eq.*DHA, le complément protège les cellules contre les effets toxiques du  $\text{H}_2\text{O}_2$ . La question sera alors de déterminer si l'externalisation des PS participe au mécanisme protecteur et se retrouve aussi *in-vivo*.

En parallèle, nous avons observé une augmentation significative de la production de l'isoprostane 15-F<sub>2t</sub>-IsoP au niveau des cellules traitées par 44  $\mu\text{M}$  *eq.*DHA (sans  $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Le 15-F<sub>2t</sub>-IsoP étant produit suite à l'oxydation de l'acide arachidonique, ces résultats sont en



accord avec la diminution d'AA et suggèrent une augmentation du stress oxydant induit par le complément alimentaire.

Notre hypothèse est donc que le complément alimentaire induit une altération de la balance oxydant/antioxydant qui pour les concentrations les plus basses constitue un pré-conditionnement et pour les concentrations élevées est toxique. Le pré-conditionnement en stimulant les systèmes de défense favorise la survie des cellules soumises à un stress ultérieur. Cette hypothèse reste à être confirmée en comparant les marqueurs des systèmes anti-oxydants et pro-oxydants entre des cellules traitées et non traitées.



**Dietary Supplement Enriched in Antioxidants and Omega-3 in human retinal pigment epithelium cells line**

**Running title: Dietary Supplement in retinal pigment epithelium cells**

Khaoula Ramchani-Ben Othman<sup>1,2</sup>, David Cia<sup>1</sup>, Niyazi Acar<sup>3</sup>, Nathalie Jacquemot<sup>1</sup>, Christine Cercy<sup>1</sup>, Olivier Berdeaux<sup>3</sup>, Stéphane Grégoire<sup>3</sup>, Lionel Brétilon<sup>3</sup>, Mohamed Amri<sup>2</sup>, Isabelle Ranchon-Cole<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> University Clermont 1, UFR Pharmacie Laboratoire de Biophysique Neurosensorielle, UMR Inserm 1107, Clermont-Ferrand, F-63001 France <sup>2</sup> University Tunis El Manar, Laboratory of Functional Neurophysiology and Pathology, Research Unit, UR/11ES09, Department of Biological Sciences, Faculty of Science of Tunis, Tunisia <sup>3</sup> INRA, UMR1324 Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation, Dijon, France.

**Correspondence:**

Isabelle RANCHON-COLE

Facultés de Médecine et Pharmacie, Laboratoire de Biophysique Neurosensorielle, INSERM UMR1107. 28, place Henri Dunant - B.P. 38, 63001 Clermont-Ferrand (France)

PHONE (33) 4-73-17-79-80, FAX (33)4-73-17-81-39, Email [isabelle.ranchon-cole@udamail.fr](mailto:isabelle.ranchon-cole@udamail.fr)



## **Abstract**

We previously reported *in-vivo* that a dietary supplement enriched with antioxidants and fish oil modified the fatty-acid content and induced an accumulation of EPA in the retina without affecting rhodopsin. In addition, it protected the retina from oxidative stress induced by light. The objective of the present study was to evaluate the effect of this complex supplement on human retinal pigment epithelium cells line. Incubation of cells for 7 days with the supplement at 0.35  $\mu\text{M}$  up to 88  $\mu\text{M}$  equivalent DHA had no effect on cell survival. At and above 118  $\mu\text{M}$  equivalent DHA it decreased cell viability. The supplement at a concentration between 5.5  $\mu\text{M}$  and 88  $\mu\text{M}$  equivalents DHA significantly reduced cells death induced by  $\text{H}_2\text{O}_2$ -oxidative stress. At 5.5  $\mu\text{M}$  44  $\mu\text{M}$  equivalent DHA, the supplement induced an increase in polyunsaturated fatty-acid with a decrease in n6/n3 ratio. At 44  $\mu\text{M}$  equivalent DHA, the supplement induces phosphatidylserine externalization and an increase of isoprostanes production. Dietary supplement enriched with antioxidants and fish oil can prevent from oxidative stress if they are not used at too high concentration. These results raised up the question of the long-term treatment in human.

**Key words:** Eye, Fish oil, oxidative-stress, apoptosis, phosphatidylserine, plasmalogen, Fatty acids/ oxidation, isoprostanes, ARPE-19 cells.



## Introduction

Age-related macular degeneration (AMD) is the leading cause of blindness and visual impairment after 60 years of age in western populations (Klein, Klein et al. 1992; Friedman, O'Colmain et al. 2004). AMD is characterized by degenerative changes within the macula, which is the central area of the retina responsible for detailed vision and colour perception. The early stage of AMD is associated with an accumulation of small focal deposits called drüsen under the retinal pigment epithelium cells (RPE). As the disease progresses large RPE cell loss in focal areas can occur referred as geographic atrophic which lead to a progressive worsening of central vision. This can be followed by neovascular response arising under the retina disrupting normal retinal anatomy, referred as neovascular AMD (Green, McDonnell et al. 1985; Dorey, Wu et al. 1989; Spraul, Lang et al. 1996; Bhutto and Luty 2012; Lim, Mitchell et al. 2012). Although vascular endothelial growth factor inhibitors injected directly into the vitreous humour of the eye can stabilise vision in neovascular AMD, there is no treatment available for geographic atrophy. In the absence of a cure, research has focused on preventing or slowing the progression of AMD.

Since, several epidemiological studies (observational or interventional) have reported the benefit of an increased consumption of antioxidant and omega-3 long chain polyunsaturated fatty acids (LC-PUFAs), including docosahexaenoic acid (DHA) and eicosapentaenoic acid (EPA), in the prevention of AMD supplementations with vitamins, trace elements, omega-3 fatty acids and other nutrients based on their antioxidant properties have become standard in clinical care. As a consequence, supplement to improve vision have exploded on the market. However, little is known on the mechanism involved in the effect of complex supplements.

Several supplement compounds had been evaluated separately so for the first time, we have previously shown *in-vivo* that a dietary supplement enriched with antioxidants and fish oil, commercialized for clinical care of AMD patients, induces changes in retinal fatty



acids composition without affecting the visual pigment and that it protects retinal structure and function from progressive light-induced retinal degeneration (Ramchani-Ben Othman, Cercy et al. 2015).

In order to go further in the mechanism involved in this complex supplement protection, in the present study we have evaluated for the first time its effect on retinal pigment epithelium cells. Indeed, for in vivo experiment, the supplement was given daily by oral administration. Therefore, to reach the retina, nutrients had to go through RPE cells which are located between the neural retina and choroid, the vascular layer of the eye. RPE is involved in the uptake of nutrients from the choriocapillaris and their transfer to the photoreceptors of neural retina and in the elimination of waste from the photoreceptors. In addition, RPE cells are involved in visual pigment regeneration and photoreceptor outer segment renewal (Strauss 2005). Thus, RPE cells are essential for photoreceptor cells survival. Furthermore, a growing body of clinical and experimental data strongly implicate oxidative-stress-induced RPE cells death (Kaarniranta, Salminen et al. 2009) in AMD pathogenesis (Plafker, O'Mealey et al. 2012).

The experiments have been conducted on ARPE-19 cells, a spontaneously transformed human RPE cells that conserve many biological and functional cell properties (19, 20). We have investigated the supplement-effect on fatty acid composition and isoprostanes production and its capacity to prevent H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cell death and.



## **Materiels and methods**

### **ARPE-19 cells culture**

ARPE-19 cells, which originate from the human RPE, are generously provided by Philippe Brabet (INM, Montpellier). The cells were maintained in a 1:1 mixture of Dulbecco's modified Eagle's medium and Ham's F12 medium (DMEM/F12) supplemented with 10% fetal bovine serum and 1% penicillin-streptomycin. Cells were incubated at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> incubator for use in the subsequent experiments.

### **Dietary supplement treatment**

The dietary supplement composition is given in table 1. In this study, the different concentrations tested are expressed as equivalent of docosahexaenoic acid (eq. DHA). The initial concentration of the supplement is 365 mM eq. DHA.

ARPE-19 cells were transferred into 96-well plates, with  $1 \times 10^3$  cells/cm<sup>2</sup>, and were grown for 24 hours in a serum-containing DMEM/F12 medium. Cells were then pre-treated for one week with increasing concentrations of the dietary supplement at 0.35 μM, 0.7 μM, 1.4 μM, 2.8 μM, 5.5 μM, 11 μM, 22 μM, 44 μM, 88 μM, 118 μM, 147 μM, 177 μM eq. DHA prepared in dimethyl sulfoxide (DMSO, 0.1%). The control group was treated with 0.1 % DMSO in growth media.

### **Peroxide hydrogen (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) induced oxidative stress**

To induce oxidative stress in this study, hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) conditioned media was freshly made by dissolving 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in a serum-free DMEM/F12 medium just before use. The cells pre-treated with dietary supplement were treated for 2 hours with different concentration of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100-1000μM). Control cells were not exposed to either dietary supplement or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

### **Viability cells by MTT assay**

The 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT, Sigma-Aldrich, St Louis, MO) assay was used to determine cell viability (Mosmann 1983). After treatment



with the dietary supplement or exposure to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ARPE-19 cells were rinsed in PBS and incubated with fresh culture medium containing 0.5mg/mL MTT. During this incubation time, mitochondrial dehydrogenases of living cells reduced MTT to purple formazan. After 2 h incubation, the MTT solution was removed, cells were then rinsed in PBS and the insoluble purple formazan product was dissolved with 0.150 mL of 100 % dimethyl sulfoxide (DMSO). After centrifugation at 9800\_rpm for 5 min, the absorbance of the supernatants, which was proportional to the number of living cells, was read at 570nm with a microplate reader. The results are expressed as the percentage of control condition representing 100% viability (cells incubated in 0.1% DMSO- containing medium only = 100% of absorbance).

### **Flow Cytometry**

Induction of cell death was quantified by flow cytometry using Annexin V-fluorescein isothiocyanate (V-FITC) for apoptosis detection and propidium iodide (PI) for necrosis detection. After treatment with the dietary supplement or exposure to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ARPE-19 cells were detached with trypsin-EDTA and were centrifuged at 9800-rpm for 10 min. The pellets were then resuspended in 100 µl of binding buffer and stained with 1 µl of V-FITC solution and 5 µl PI solution for 15 min at room temperature in the dark. Samples were then diluted with 400 µl binding buffer and analyzed with flow cytometry (Cytometer EPICS XL Beckman Coulter, Fullerton, CA) within 30 min. The results are expressed as the percentage of V-FITC or PI-stained dead cells.

### **Clonogenic test (Villalpando Rodriguez and Torriglia 2013)**

ARPE-19 cells were seeded in 24-well plate at the density with  $1 \times 10^3$  cells/cm<sup>2</sup> and treated for one week with 5.5 µM and 44 µM equivalent DHA dietary supplement. At the end of the treatment cells were washed with PBS and trypsinized. For each condition, 10<sup>4</sup> cells were seeded into 6-well plate and grown with complete medium. One week later, medium was removed and cells were carefully washed with PBS, fixed and stained with 2 mL of 6% glutaraldehyde and 5% cresyl violet (v/v). After 30 min, staining solution was removed;



plates were washed with tap water, and dried in normal air at room temperature. In each well, we have counted the colonies with regular shape. Representative pictures of each plate were taken.

### **Fatty acid composition**

ARPE-19 cells treated with dietary supplement were scraped in PBS-1X and centrifuged at 9800-rpm for 5 min at 4°C. Samples were conserved at -80°C until fatty acid extraction.

**Total lipids extraction.** Total lipids were extracted from ARPE-19 cells samples using chloroform/methanol (2:1, v/v) (Folch, Lees et al. 1957). Phospholipids were purified from total lipid extracts using silica cartridges (25610 mm i.d.; Sep-pack, Waters S.A., Framingham, MA, USA) (Juaneda and Rocquelin 1985; Acar, Berdeaux et al. 2009). Then, total phospholipids from ARPE-19 were stored under inert gas until further analyses.

**Fatty acid analysis by gas chromatography.** Total phospholipids from ARPE-19 cells were transmethylated using boron trifluoride in methanol according to Morrison and Smith (Morrison and Smith 1964). The fatty acid methyl esters (FAMES; formed from fatty acids from the sn-1 and sn-2 positions of diacylglycerophospholipids and the sn-2 position of Plasmalogens) and dimethyl acetals (DMAs; formed from aldehyde aliphatic groups from the sn-1 position of Plasmalogens) were subsequently extracted with hexane and analyzed by gas chromatography on a Hewlett Packard Model 5890 gas chromatograph (Palo Alto, CA, USA) using a CPSIL-88 column (100 m60.25 mm i.d., film thickness 0.20 mm; Varian, Les Ulis, France) equipped with a flame ionization detector. 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°C/min and held for 1 min, and then to 225°C at 2°C/min and finally held at 225°C for 17 min. The injector and the detector were maintained at 250°C. FAMES and DMA were identified by comparison with commercial and synthetic standards. The data were processed using the EZChrom Elite software (Agilent Technologies, Massy, France) and reported as a percentage of the total fatty acids.



### **Statistical Analysis**

The results correspond to the means  $\pm$ SEM of three independent experiments and all conditions were done at least in triplicate. Analysis of variance (ANOVA) was performed on MTT assay, flow cytometry analysis and fatty acids composition data. If ANOVA was significant, multiple comparisons were made to determine which pairs of mean values were different. Significant differences between groups were assessed with the post hoc NewmanKeuls test; the significance level was set at  $p = 0.05$ . One symbol for  $p < 0.05$ , two symbols for  $p < 0.01$ , three symbols for  $p < 0.001$ , and four symbols for  $p < 0.0001$ .



## Results

### Dietary supplement effect on ARPE-19 cells viability

In order to evaluate the toxicity of the dietary supplement on ARPE-19 cells, we incubated the cells with increasing concentrations of dietary supplement for one week. Supplement concentrations are expressed as  $\mu\text{M}$  equivalent DHA ( $\mu\text{M}$  eq. DHA). Cell viability was determined using MTT (Figure 1A). Treatment with dietary supplement at 0.35  $\mu\text{M}$ , 0.7  $\mu\text{M}$ , 1.4  $\mu\text{M}$ , 2.8  $\mu\text{M}$ , 5.5  $\mu\text{M}$ , 11  $\mu\text{M}$ , 22 $\mu\text{M}$ , 44  $\mu\text{M}$ , 88  $\mu\text{M}$  eq. DHA had no effect on cells viability compared to untreated cells ( $100.59 \pm 1.28$  %,  $91.97 \pm 5$  %,  $92.97 \pm 2.3$  %,  $96.11 \pm 0.2$  %,  $99.34 \pm 0.91$ %,  $98.32 \pm 7.72$  %,  $107.6 \pm 6.14$  %,  $102.03 \pm 5.17$  % and  $100.03 \pm 5.68$  % of cell viability, respectively). However, a decrease in cell viability by 40 % was observed when the dietary supplement was used at a concentration of 118  $\mu\text{M}$  eq. DHA ( $58.79 \pm 16.41$  % of cell viability), by 54 % at 147  $\mu\text{M}$  eq. DHA ( $46.24 \pm 4.8$  % of cell viability), by 85 % at 177  $\mu\text{M}$  eq. DHA ( $14.67 \pm 16.41$  % of cell viability). Therefore, the dietary supplement is not toxic at a concentration up to 88  $\mu\text{M}$  eq. DHA for 7 days incubation.

### H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress

In order to induce oxidative stress, we have selected hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) for our studies and have performed a series of dose–response assays (200  $\mu\text{M}$ , 400  $\mu\text{M}$ , 600  $\mu\text{M}$ , 800  $\mu\text{M}$ , 1000  $\mu\text{M}$ ) to determine the working concentrations that led to a consistent and high degree of cytotoxicity, which we defined as the level of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> that killed 50% of the AREP-19 cells after a 2-h incubation. Figure 1 B shows that the concentration of 600  $\mu\text{M}$  decreases significantly by 44 % ARPE-19 cells viability.

### Dietary supplement against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress

In order to investigate the protective effect of the dietary supplement on human retinal pigment cells against oxidative stress, cells were untreated or treated with dietary supplement for one week at increasing concentrations before being incubated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 2 h at 600  $\mu\text{M}$ . In untreated cells, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induced a significant decrease in cell viability by 40 % ( $p <$



0.0001; Figure 1B). Dietary supplement increased cell viability by 25 % ( $p < 0.05$ ) at the concentration of 5.5  $\mu\text{M}$  eq. DHA and up to 31 % ( $p < 0.0001$ ) at 88  $\mu\text{M}$  eq. DHA compared to cells treated only with  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Figure 1B). Higher concentration of dietary supplement did not protect and even increased  $\text{H}_2\text{O}_2$ -toxicity at 147 and 177  $\mu\text{M}$  eq. DHA (Figure 1B). According to these data, in the following experiments, we selected two concentrations: the lowest protective concentration of 5.5  $\mu\text{M}$  and the concentration of 44  $\mu\text{M}$  eq. DHA which is below the limit concentration of toxicity.

### **Dietary supplement induced phosphatidylserine externalization**

In order to confirm the protective effect of the dietary supplement against  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induced oxidative stress, we have evaluated cell death by flow cytometry. Cells were untreated or treated with dietary supplement for one week at 5.5 or 44  $\mu\text{M}$  eq. DHA before being incubated with  $\text{H}_2\text{O}_2$  for 2 h at 600  $\mu\text{M}$ . Unfortunately,  $\text{H}_2\text{O}_2$  did not induce any cell death. However, results in cultures pre-treated with the dietary supplement and not exposed could be analysed. Unexpectedly, cells treated with 44  $\mu\text{M}$  eq. DHA showed an increase by 20 % of cells stained with Annexin V-fluorescein isothiocyanate (V-FITC) compared to untreated cells ( $p = 0.008$ ) or to cells treated with 5.5  $\mu\text{M}$  ( $p = 0.006$ ) (Figure 2). These results showed that dietary supplement at 44  $\mu\text{M}$  eq. DHA induced phosphatidylserine (PS) externalization.

### **Test clonogenic**

To confirm the hypothesis that the dietary supplement at 44  $\mu\text{M}$  eq. DHA did not induce cell death as seen by MTT assay, we have evaluated the capacity of the cells to proliferate by clonogenic assay (Figure ??). Whereas the cells pretreated with 5.5  $\mu\text{M}$  Eq-DHA had a similar proliferation to the control cells, the cells pretreated with 44  $\mu\text{M}$  Eq-DHA were less proliferative with clones smaller and altered morphology.

### **Fatty acid composition**



Fatty acid composition (FAMES and DMAs) was evaluated in ARPE cells incubated for one-week of treatment with the dietary supplement at 0  $\mu\text{M}$  (control), 5.5  $\mu\text{M}$  and 44  $\mu\text{M}$  eq. DHA by gas chromatography (Table 2 and 3).

The total saturated fatty acids (SFA) content was reduced by 7% ( $p = 0.003$ ) in 5.5  $\mu\text{M}$  and 11.5 % ( $p = 0.0004$ ) in 44  $\mu\text{M}$  eq. DHA treated cells compared to control (Table 2, Figure 4 A). The changes in SFA level is characterized by a decrease of pentadecanoic acid (C15:0,  $p = 0.04$  at 5.5  $\mu\text{M}$ ,  $p = 0.002$  at 44  $\mu\text{M}$ ), palmitic acid (C16:0,  $p = 0.002$  at 5.5  $\mu\text{M}$ ,  $p = 0.0002$  at 44  $\mu\text{M}$ ) and stearic acid (C18:0,  $p = 0.008$  at 5.5  $\mu\text{M}$ ,  $p = 0.0007$  at 44  $\mu\text{M}$ ).

For the total monounsaturated fatty acids (MUFA) the two concentrations of the dietary supplement had opposite effect (Table2, Figure 4B). At 5.5  $\mu\text{M}$  eq. DHA, the supplement increased significantly total MUFA content by 3% ( $p = 0.003$ ) and specifically palmitoleic acid (C16:1 n-7,  $p = 0.04$ ), oleic acid C18:1 n-9 ( $p = 0.01$ ) and eicosenoic acid (C20:1 n-9,  $p = 0.01$ ), except for erucic acid (C22:1 n-9,  $p = 0.02$ ) which has decreased. Whereas at 44  $\mu\text{M}$  eq. DHA, the supplement decreased total MUFA content by 10.5 % ( $p = 0.0002$ ) with a decrease in cis-7 hexadecenoic acid (C16:1 n-9,  $p = 0.002$ ), C18:1 n-9 ( $p = 0.0003$ ), C22:1 n-9 ( $p = 0.01$ ), nervonic acid (C24:1 n-9,  $p = 0.004$ ), C16:1 n-7 ( $p = 0.002$ ) and cis-vaccenic acid (C18:1 n-7,  $p = 0.001$ ), except for C20:1 n-9 which increased ( $p = 0.0001$ ).

Both concentrations increased omega-3 content by 15 % at 5.5  $\mu\text{M}$  ( $p = 0.004$ ) and by 106 % at 44  $\mu\text{M}$  eq. DHA ( $p = 0.0001$ , Figure 4E). However, the precursor of the omega 3 (LLNA, C18: 3, n-3) and docosapentaenoic acid (DPA, C22: 5, n-3) were not affected by the supplement at 5.5  $\mu\text{M}$  eq. DHA whereas it was increased by 40% and 61% respectively by the concentration 44 $\mu\text{M}$  eq. DHA.

Figure 4D shows that at 5.5  $\mu\text{M}$  and 44  $\mu\text{M}$  eq. DHA, the supplement induced an increase of linoleic acid (LA, C18:2 n-6, by 31%  $p = 0.01$  and by 88%  $p = 0.007$ ; respectively), of dihomo-  $\gamma$ -linoleic acid (DGLA, C20:3 n-6; by 16%  $p = 0.0003$  and 46%,  $p = 0.0001$ ; respectively) and a decrease of docosatetraenoic (C22:4 n-6; by 15.84%  $p = 0.0002$



and 38.86%  $p = 0.0001$ ; respectively). There was no change in arachidonic acid level (AA, C20:4 n-6) at 5.5  $\mu\text{M}$  eq. DHA whereas it decreased by 24 % ( $p = 0.0001$ ) at 44  $\mu\text{M}$  eq. DHA. For the other biosynthetic omega -6 fatty acids products, figure shows similar changes between the two concentrations with an increase of Linoleic acid (LA, C18:2 n-6) and The modification of AA level had a consequence on the amounts of total omega n-6, which was significantly lowered in cells treated with 44  $\mu\text{M}$  equivalent by 5%. Altogether, these changes leads to a global increase in omega-6 at 5.5  $\mu\text{M}$  by 5%  $p = 0.01$  and global decrease by 5% ( $p = 0.007$ ) for 44  $\mu\text{M}$  eq. DHA.

The ratio omega n-6/ omega n-3 decreased with both concentrations compared to control (by 9 % at 5.5  $\mu\text{M}$  eq. DHA) but it was largely lower in cells treated with 44  $\mu\text{M}$  eq. DHA (by 54%) (Figure 4 C).

Plasmalogens (Pls) constitute specific phospholipids. The levels of Pls were determined according to the relative proportions of DMAs. Total DMAs level was differently changed between the two concentrations compared to untreated cells. In fact, it was increased significantly at 5.5  $\mu\text{M}$  eq. DHA by 7% ( $p = 0.01$ ), with an increase of dma 16:0 (by 5%,  $p = 0.03$ ), dma 18:0 (16%,  $p = 0.02$ ) but a decrease of dma 18:1 n-7 (14%,  $p = 0.0002$ ). Whereas, this level was significantly decreased by 9 % ( $p = 0.003$ ) at 44  $\mu\text{M}$  eq. DHA with a decrease of dma 16:0 (by 5%,  $p = 0.04$ ), dma 18:1 n-7 (by 45%,  $p = 0.0001$ ), dma 18:1 n-9 (by 31%,  $p = 0.0002$ ) and an increase of dma 18:0 (by 11%,  $p = 0.01$ ) (Figure 5).

### **Isoprostanes**

Figure 6 shows that at 5.5  $\mu\text{M}$  eq. DHA, the supplement had no effect on 15-F<sub>2t</sub>-IsoP production whereas at 44  $\mu\text{M}$  eq. DHA, it induced a significant increase ( $p = 0.002$ ) to 360 % (97.13  $\text{pg} \pm 25.12$ ) compared to untreated cells by 360 % (21.04  $\text{pg} \pm 5.81$ ).



## Discussion

Ocular complex dietary supplements are routinely recommended in clinics for patients with Age-Related Macular Degeneration (AMD). However, although it is possible to find data on each compound separately or a mix of two or three compounds, it is rare even impossible to find data on any of the total supplements. Since in a previous study we had shown *in-vivo* that a commercialized complex ocular dietary supplement protected the retina from light-induced degeneration (Ramchani-Ben Othman, Cercy et al. 2015), in the present study we have evaluated its effect on ARPE-19 cell and its capacity to protect these cells from H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress. The supplement contains antioxidants used in the AREDS trial (2001), in modified dosing, but also including fish oil and resveratrol based on their antioxidative properties (Table 1). RPE cells are known to play a crucial role in retinal maintenance by transporting selective molecules between the choroidal blood and the neural retina (Strauss 2005) and by clearing old or damage rod outer segment. In addition, protection of RPE is extremely important since they have been shown to degenerate in AMD.

We made used of the ARPE-19 cells lines. They are immortalized human RPE cells arising spontaneously from a primary culture of RPE cells from a male donor. These cells retain many of the characteristics of RPE cells, (Dunn, Aotaki-Keen et al. 1996; Dunn, Marmorstein et al. 1998) and are widespread in RPE research.

First, we performed for the first time a dose-response assay on ARPE-cells with the supplement to determine the concentration that becomes toxic for the cells. The cells were treated daily from one day to 7 days of culture with different concentrations of the supplement. We have choice a 7 days-treatment in order to mimic our previous *in-vivo* study where the supplement was given by gavage for 1 week before the induction of light-stress (oxidative stress). Under our experimental condition, the supplement did not induce any cell death *in-vitro* up to a concentration of 88 µM eq-DHA. However, above this concentration, the toxicity was concentration dependent.



In parallel, we performed a dose-response assay with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> to determine the concentration that induces a significant cell death on ARPE-19 cells cultured for 8 days. In our study, we selected H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, as the stressor inductor because it is widely used in studies with AREP-19 (Weigel, Handa et al. 2002; Kaczara, Sarna et al. 2010) and it is physiologically generated during RPE phagocytosis of photoreceptor outer segments (Miceli, Liles et al. 1994; Tate, Miceli et al. 1995). The concentration of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> that was necessary to kill 40-45 % of the cells was 600 µM. This concentration was similar to the one found to induced 60 % cell death on primary cell cultured for 4 days (Cia, Vergnaud-Gauduchon et al. 2014). However, for a low-density ARPE-19 cells cultured for 3 days, it was found that 200 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> caused a decrease in cell viability by about half (56%) (Wankun, Wenzhen et al. 2011). These results suggest that in our experimental condition ARPE-19 cells are more resistant to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress. This can be explain by the fact that we used ARPE-19 cells after 8 days of culture and the cells are at confluence while for the primary culture the confluence was only 80-85%. It is known that at confluence the cells are more resistant to external attacks (Wada, Gelfman et al. 2001).

In a second step, we performed a dose-response with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on ARPE-19 cells pretreated with different concentration of supplement for 7 days. The supplement significantly reduced cell death as measure by MTT, from a concentration of 5.5 µM to 88 µM eq-DHA. Therefore, in the following experiment we focused on a concentration of 5.5 µM, the first concentration showing a significant protection against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced death and 44 µM to avoid the risk of inducing cell death by being at the limit of the toxic concentration.

To confirm the protection of the supplement at 5.5 µM and 44 µM, we performed cytometry. Unexpectedly, the cells treated with the supplement at 44 µM for 7 days and not subjected to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> presented an increase by 20 % of phosphatidylserine (PS) labelling indicating an increased in PS externalization. This externalization is an early hallmark of apoptosis (Kagan, Fabisiak et al. 2000; Balasubramanian, Mirnikjoo et al. 2007) suggesting



that at 44  $\mu\text{M}$  eq-DHA, the supplement initiated apoptosis. The clonogenic test giving information on the capacity of the cells to proliferate confirmed that although the cells were not dead yet after one week of treatment at 44  $\mu\text{M}$  eq-DHA, they were damaged. These results raised the question of the toxicity of this supplement and even all supplement on a long period since most, if not all, studies on fatty acid, antioxidants or any other compounds used in supplementation are done over a short period and evaluate only an acute toxicity (Wrona, Rozanowska et al. 2004; Dugas, Charbonnier et al. 2010).

The increase in PS on the outer membrane might be explained by the change in fatty acid composition of ARPE-19 cells supplemented. High levels of DHA may lead to general membrane instability resulting in enhanced flip-flop, increasing the likelihood of moving PS to outer leaflet (Sobajima, Tamiya-Koizumi et al. 1986; Yorek, Leeney et al. 1989; Brown and Subbaiah 1994; Calder, Yaqoob et al. 1994; Armstrong, Brzustowicz et al. 2003). This hypothesis is in accordance with the large increase of DHA by more than 65% in 44  $\mu\text{M}$  eq-DHA pretreated cells compared to the slight increase by 10% in 5.5  $\mu\text{M}$  eq-DHA pretreated cells.

However, it is important to notice that although the supplement at 44  $\mu\text{M}$  eq-DHA initiated apoptosis hallmarks it protected the cells from  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induced cell death more significantly than 5.5  $\mu\text{M}$  eq-DHA. This can be explained by the state of the cells before inducing the stress. Indeed, isoprostanes which belongs to a family of prostaglandin-like compounds generated primarily from arachidonic acid (AA) through nonenzymatic and free radical-catalyzed oxidation (Roberts and Milne 2009) only increased in cells treated with 44  $\mu\text{M}$  eq-DHA and this increase was associated to a decrease in the level of AA. This oxidative process could participate to the protective effect by reducing AA availability and in return increasing significantly the ratio EPA:AA at 44  $\mu\text{M}$  eq-DHA by 268% compared to 5.5  $\mu\text{M}$  eq-DHA by 268%. The ratio of n-3 and n-6 PUFAs determines various signalling events to external stimuli. A high n-3/n-6 ratio is important for redox homeostasis in the body. EPA, an



n-3 PUFA, is a potent antioxidant and anti-inflammatory agent and regulates the expression of various cytoprotective antioxidant enzymes (Yin et al., 2007; Brooks et al., 2008). In addition, EPA and AA compete for membrane incorporation leading to changes in membrane n3/n6 ratios, thereby modulating various signalling pathways (McCAPPIN, 1987). In addition, there was also an increase in DHA with the concentration of supplement. DHA can generate neuroprostane such as neuroprotection D1 (NPD1) which elicits neuroprotective activity in brain ischemia-reperfusion, in oxidative-stressed retinal pigment epithelial (RPE) cells, and it promotes neuronal and glial cell survival (Marcheselli, Hong et al. 2003; Mukherjee, Marcheselli et al. 2004). Furthermore, the increase in DHA precursor might participate to the neuroprotective mechanism by facilitating oxidized-DHA replacement (SanGiovanni and Chew 2005).

Plasmalogen are a group of phospholipids with a vinyl ether bond in the sn-1 position, which are supposed to be sensitive markers of oxidative stress (Chow, Sisfontes et al. 1989; Morandat, Bortolato et al. 2003). Whereas the relative lowered level of plasmalogen by 9% in cells pre-treated with the concentration of 44  $\mu$ M eq-DHA suggests an increase in oxidative stress, the increased level by 7% with 5.5  $\mu$ M eq-DHA suggests a reduction in the oxidative stress. Therefore, it appears that the state of the cells before H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress was different depending on the concentration, suggesting two different protective mechanisms thereafter. A high concentration would act like “pre-conditioning” in which a cell or a tissue is protected from a further stress by an earlier stress (Sen, Basu et al. 2011) and lower concentration induced changes in fatty acid composition but no detectable oxidative stress.

Finally, although the dietary supplement tested contains antioxidants (vitamin E, vitamin C, zinc, resveratrol and carotenoids (lutein and zeaxanthin)) beside the fish oil, we believe that the protection is mainly due to the fatty acids. Indeed, it had been shown that vitamin C pre-treatment of ARPE-19 cells *in vitro* reduced transcriptional activation of AP-1, a nuclear transcription factor involved in oxidative stress response but at a concentration of



100 and 200  $\mu\text{M}$  which is higher to the concentration present in the supplement: 105  $\mu\text{M}$  at 44  $\mu\text{M}$  Eq-DHA of supplement and only 13  $\mu\text{M}$  at 5.5  $\mu\text{M}$  Eq-DHA of supplement. Vitamin E acts by both quenching oxy-radicals and recycling the  $\alpha$ -tocopheroxyl radical that results when vitamin E scavenges an oxy-radical (Lien and Hammond 2011).

Resveratrol has to be used between 25  $\mu\text{M}$  and 100  $\mu\text{M}$  to have an antioxidant protective effect against  $\text{H}_2\text{O}_2$  induced cell death (King, Kent et al. 2005; Pintea, Rugina et al. 2011) whereas in the supplement the concentration reaches only 0,45  $\mu\text{M}$  for the 44  $\mu\text{M}$  eq-DHA of supplement.

However, we cannot rule out that the other compounds may confer additional protective effects and attenuate the propagation of oxidative stress (Roig-Perez, Guardiola et al. 2004) (Jain 1985).

In conclusion, we have shown that a complex ocular dietary supplement containing fish oil, antioxidants and resveratrol induced fatty acid composition change in ARPE-19 cells and protected the cells from  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induced oxidative stress at 5.5 and 44  $\mu\text{M}$  Eq-DHA. However, because the highest concentration also induced early apoptotic markers, our study raised the question of the risk of cytotoxicity on a long term period. In addition, the difference in the state of the cells after one week of treatment at a low and a high concentration of supplement suggested that the protective mechanism might be different.



## Figures Legends

**Figure 1. (A) Cytotoxic effects of dietary supplement on ARPE-19 cells.** ARPE-19 cells were incubated with dietary supplement at different concentrations (0.35  $\mu\text{M}$ , 0.7  $\mu\text{M}$ , 1.4  $\mu\text{M}$ , 2.8  $\mu\text{M}$ , 5.5  $\mu\text{M}$ , 11  $\mu\text{M}$ , 22 $\mu\text{M}$ , 44  $\mu\text{M}$ , 88  $\mu\text{M}$ , 118  $\mu\text{M}$ , 147  $\mu\text{M}$ , 177  $\mu\text{M}$  equivalent DHA) for one-week. The cell viability was determined by the MTT assay. The results are expressed as the percentage of control condition (0  $\mu\text{M}$  equivalent DHA; without dietary supplement treatment = 100% of cell viability). Dietary supplement treatment had no significant effect on the ARPE-19 cells viability at concentrations from 0.35  $\mu\text{M}$  to 88  $\mu\text{M}$  equivalent DHA. **(B) Protective effects of dietary supplement against  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induced damage in ARPE-19 cells.** ARPE-19 cells were pre-treated with different concentrations of dietary supplement for one week (grey box) and then exposed to 600  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  for 2 h (dark box). The cell viability was determined by MTT assay. The results are expressed as the percentage of control condition (without dietary supplement treatment (0  $\mu\text{M}$ ) or  $\text{H}_2\text{O}_2$  exposure = 100% of cell viability).  $\text{H}_2\text{O}_2$  has significantly decreased ARPE-19 cells viability; whereas pre-treatment of ARPE-19 cells with 5.5  $\mu\text{M}$  up to 88  $\mu\text{M}$  equivalent DHA dietary supplement significantly reduced  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induced cell death. The data are presented as means  $\pm$  SD (n = 3 independent experiments, each condition at least in triplicate). Significance (\*) compared to untreated cells (grey box, 0  $\mu\text{M}$  equivalent DHA). One symbol p < 0.05; two symbols p < 0.01; three symbols p < 0.001.

**Figure 2.** Dietary supplement effect on in ARPE-19 cells. ARPE-19 cells were pre-treated with two concentrations of dietary supplement (5.5  $\mu\text{M}$  and 44  $\mu\text{M}$  equivalent DHA) for one week. Thereafter, cells were collected and stained with Annexin V-FITC (Flow cytometry). The results are expressed as the percentage of Annexin V-FITC-stained cells. The data are presented as means  $\pm$  SD (n = 3 independent experiments). The level of cells stained with Annexin V-fluorescein isothiocyanate (V-FITC) were 20 % higher in cultures treated with the concentration 44  $\mu\text{M}$  equivalent DHA compared to untreated cells and cells treated with 5.5



$\mu\text{M}$ . Significance compared (\*) to untreated cells (white box) and to (†) cells treated with dietary supplement at 5.5  $\mu\text{M}$  equivalent DHA (grey box). One symbol  $p < 0.05$ ; two symbols  $p < 0.01$ ; three symbols  $p < 0.001$ .

### Figure 3. Clonogenic test

**Figure 4. Dietary supplement effect on fatty acids methyl esters composition in ARPE-19 cells.** ARPE-19 cells were treated with two concentrations of dietary supplement (5.5  $\mu\text{M}$  and 44  $\mu\text{M}$  equivalent DHA) for one week. Thereafter, fatty acid methyl esters (FAMES) composition was analysed by gas chromatography. The results are expressed as the percentage of total fatty acids (FAMES + DMAs). The data are presented as means  $\pm$  SD. **(A) Saturated fatty acids (SFA).** The level of total SFA, C15:0, C16:0 and C18:0 fatty acids were increased significantly in ARPE-19 cells treated with dietary supplement at 5.5 and 44  $\mu\text{M}$  equivalent DHA compared to untreated cells. **(B) Monounsaturated fatty acid (MUFA).** The level of MUFA was significantly increased in cells treated with 5.5  $\mu\text{M}$  equivalent DHA with a significant change in C16:1 n-7, C18:1 n-9, C20:1 n-9 and C22:1 n-9 fatty acids level. Whereas, this level was significantly decreased in cells treated with 44  $\mu\text{M}$  equivalent DHA with a significant change in C16:1 n-7, C18:1 n-7, C16:1 n-9, C18:1 n-9, C20:1 n-9 and C22:1 n-9 and C24:1 n-9 fatty acids level. **(C) Polyunsaturated fatty acids (PUFA).** The level of total polyunsaturated fatty acids and total n-3 fatty acids family were significantly increased in treated cells (5.5  $\mu\text{M}$  and 44  $\mu\text{M}$  equivalent DHA) compared to untreated cells (0  $\mu\text{M}$  equivalent DHA). The level of total n-6 fatty acids family was increased in cells treated with 5.5  $\mu\text{M}$  whereas it was decreased at 44 $\mu\text{M}$  equivalent DHA. The ratio n-6/n-3 was decreased with both concentrations. **(D) N-6 fatty acids family.** The level of linolenic acid (LA) and dihomo-  $\gamma$ -linoleic acid (DGLA) increased significantly in cells treated with both concentrations of dietary supplement compared to untreated cells (white box). Arachidonic acid (AA) was decreased significantly only in cells treated with the concentration 44 $\mu\text{M}$  equivalent DHA compared to untreated cells (white box) and 5.5  $\mu\text{M}$  equivalent DHA. **(E) N-**



**3 fatty acids family.** Compared to untreated cells (white box), treating cells with 5.5  $\mu\text{M}$  has increased the level of eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA). Whereas, the concentration 44  $\mu\text{M}$  equivalent DHA has increased all the n-3 fatty acids compounds:  $\alpha$ -Linoleic acid ( $\alpha$ -LLNA), EPA, docosapentaenoic acid (DPA), DHA. Significance compared (\*) to untreated cells (white box) and to (†) cells treated with dietary supplement at 5.5  $\mu\text{M}$  equivalent DHA (grey box). One symbol  $p < 0.05$ ; two symbols  $p < 0.01$ ; three symbols  $p < 0.001$ .

**Figure 5. Dietary supplement effect on dimethyl acetals level in ARPE-19 cells.** ARPE-19 cells were treated with two concentrations of dietary supplement (5.5  $\mu\text{M}$  and 44  $\mu\text{M}$  equivalent DHA) for one week. Thereafter, dimethyl acetals (DMAs) level was analysed by gas chromatography. DMAs; formed from aldehyde aliphatic groups from the sn-1 position of Plasmalogens (a class of phospholipids). The results are expressed as the percentage of total fatty acids (FAMES + DMAs). The data are presented as means  $\pm$  SD. Compared to untreated cells (white box), the level of total DMAs was increased significantly in cells treated with 5.5  $\mu\text{M}$  and decreased with 44  $\mu\text{M}$  equivalent DHA. The concentration 5.5  $\mu\text{M}$  have induced an increase in dma 16: 0 and dma 18:1 n-7 level but an increase in dma 18:1 n-9. While 44  $\mu\text{M}$  equivalent DHA have induced an decrease in dma 16: 0, dma 18:1 n-7 and dma 18:1 n-9 and an increase in dma 18:0. Significance compared (\*) to untreated cells (white box) and to (†) cells treated with dietary supplement at 5.5  $\mu\text{M}$  equivalent DHA (grey box). One symbol  $p < 0.05$ ; two symbols  $p < 0.01$ ; three symbols  $p < 0.001$ .

**Figure 6. Dietary supplement effect on isoprostanes production in ARPE-19 cells.** ARPE-19 cells were treated with two concentrations of dietary supplement (5.5  $\mu\text{M}$  and 44  $\mu\text{M}$  equivalent DHA) for one week. Thereafter, 15-F<sub>2t</sub>-IsoP (isoprostanes) level was analysed by gas chromatography. The results are expressed in pg of 15-F<sub>2t</sub>-IsoP in five pooled well. The data are presented as means  $\pm$  SD. Compared to untreated cells, dietary supplement at 44  $\mu\text{M}$



equivalent DHA has induced isoprostanes production. Significance compared (\*) to untreated cells (white box). One symbol  $p < 0.05$ ; two symbols  $p < 0.01$ ; three symbols  $p < 0.001$ .



**Table 1. Dietary supplement****composition.**

<b>Ingredients</b>	<b>mg/ml</b>
<i>Vitamins and trace elements</i>	
Vitamin C	150
Vitamin E	25
Zinc (sulfate)	12.5
Copper (sulfate)	0.83
<i>Essentials fatty acids</i>	
Fish oil	580
With 70% omega-3	405.83
-EPA	231.66
-DHA	115.83
-DPA	14.56
<i>Extract of Tagetes Erecta</i>	
Lutein	8.33
Zeaxanthin	1.66
<i>Extract of Vitis Vinifera</i>	
Resveratrol	0.83



**Table 2. Fatty acid composition of ARPE-19 cells treated for one week with a dietary supplement enriched in antioxidants and fish oil.**

<b>Dietary supplement (<math>\mu</math>M equivalent DHA)</b>			
	<b>0 (control)</b>	<b>5.5</b>	<b>44</b>
<b>Fatty acids (%)</b>	Means $\pm$ SD	Means $\pm$ SD	Means $\pm$ SD
<b>SFA</b>	42.77 $\pm$ 1.73	39.76 $\pm$ 0.33	37.83 $\pm$ 0.5
C14:0	0.79 $\pm$ 0.13	0.73 $\pm$ 0.17	0.56 $\pm$ 0.06
C15:0	0.38 $\pm$ 0.02	0.32 $\pm$ 0.03	0.26 $\pm$ 0.01
C16:0	21.33 $\pm$ 1.26	19.90 $\pm$ 0.67	18.31 $\pm$ 0.49
C17:0	0.58 $\pm$ 0.16	0.47 $\pm$ 0.33	0.53 $\pm$ 0.34
C18:0	18.61 $\pm$ 0.53	17.34 $\pm$ 0.72	17.09 $\pm$ 0.21
C20:0	0.58 $\pm$ 0.03	0.50 $\pm$ 0.06	0.57 $\pm$ 0.04
C22:0	0.51 $\pm$ 0.03	0.5 $\pm$ 0.03	0.53 $\pm$ 0.03
<b>MUFA</b>	27.25 $\pm$ 0.46	28.16 $\pm$ 0.26	24.38 $\pm$ 0.18
C18:1t	0.89 $\pm$ 0.13	0.83 $\pm$ 0.07	0.89 $\pm$ 0.21
C16:1 n-7	1.48 $\pm$ 0.06	1.57 $\pm$ 0.07	1.22 $\pm$ 0.02
C18:1 n-7	3.84 $\pm$ 0.13	3.8 $\pm$ 0.09	3.11 $\pm$ 0.03
C16:1 n-9	1.67 $\pm$ 0.2	1.82 $\pm$ 0.1	1.27 $\pm$ 0.04
C18:1 n-9	18.49 $\pm$ 0.49	19.27 $\pm$ 0.3	16.88 $\pm$ 0.27
C20:1 n-9	0.28 $\pm$ 0.02	0.33 $\pm$ 0.02	0.51 $\pm$ 0.03
C22:1 n-9	0.36 $\pm$ 0.05	0.29 $\pm$ 0.03	0.26 $\pm$ 0.02
C24:1 n-9	0.27 $\pm$ 0.02	0.26 $\pm$ 0.02	0.23 $\pm$ 0.00
<b>PUFA</b>	23.58 $\pm$ 1.11	25.25 $\pm$ 0.39	31.94 $\pm$ 0.68
<b>N - 3</b>	8.85 $\pm$ 0.19	10.19 $\pm$ 0.2	18.32 $\pm$ 0.81
C18:3 n-3	0.33 $\pm$ 0.03	0.3 $\pm$ 0.02	0.46 $\pm$ 0.03
C20:5 n-3	2.82 $\pm$ 0.09	3.73 $\pm$ 0.13	8.51 $\pm$ 0.39
C22:5 n-3	2.08 $\pm$ 0.06	2.15 $\pm$ 0.1	3.35 $\pm$ 0.17
C22:6 n-3	3.64 $\pm$ 0.08	4.02 $\pm$ 0.15	6.01 $\pm$ 0.31
<b>N - 6</b>	14.09 $\pm$ 0.43	14.81 $\pm$ 0.22	13.3 $\pm$ 0.29
C18:2 n-6	1.84 $\pm$ 0.22	2.41 $\pm$ 0.06	3.46 $\pm$ 0.09
C20:3 n-6	0.95 $\pm$ 0.03	1.11 $\pm$ 0.03	1.39 $\pm$ 0.04
C20:4 n-6	10.3 $\pm$ 0.32	10.45 $\pm$ 0.21	7.83 $\pm$ 0.31
C22:4 n-6	1.01 $\pm$ 0.03	0.85 $\pm$ 0.04	0.62 $\pm$ 0.02
<b>N - 6/ N - 3 ratio</b>	1.59 $\pm$ 0.02	1.45 $\pm$ 0.02	0.73 $\pm$ 0.04
<b>C20:3 n-9</b>	0.27 $\pm$ 0.05	0.24 $\pm$ 0.02	0.32 $\pm$ 0.29



**Table 3. Dimethyl acid in ARPE-19 cells treated for one week with a dietary supplement enriched in antioxidants and fish oil.**

	Dietary supplement ( $\mu$ M equivalent DHA)		
	<b>0 (control)</b>	<b>5.5</b>	<b>44</b>
	<b>Means <math>\pm</math> SD</b>	<b>Means <math>\pm</math> SD</b>	<b>Means <math>\pm</math> SD</b>
<b>Total DMAs</b>	6.40 $\pm$ 0.22	6.83 $\pm$ 0.03	5.85 $\pm$ 0.25
<b>Dma 16:0</b>	1.87 $\pm$ 0.05	1.98 $\pm$ 0.06	1.77 $\pm$ 0.07
<b>Dma 18:0</b>	2.57 $\pm$ 0.13	2.99 $\pm$ 0.05	2.85 $\pm$ 0.15
<b>Dma 18:1 n-7</b>	0.77 $\pm$ 0.03	0.66 $\pm$ 0.02	0.42 $\pm$ 0.02
<b>Dma 18:1 n-9</b>	1.19 $\pm$ 0.03	1.22 $\pm$ 0.01	0.82 $\pm$ 0.02



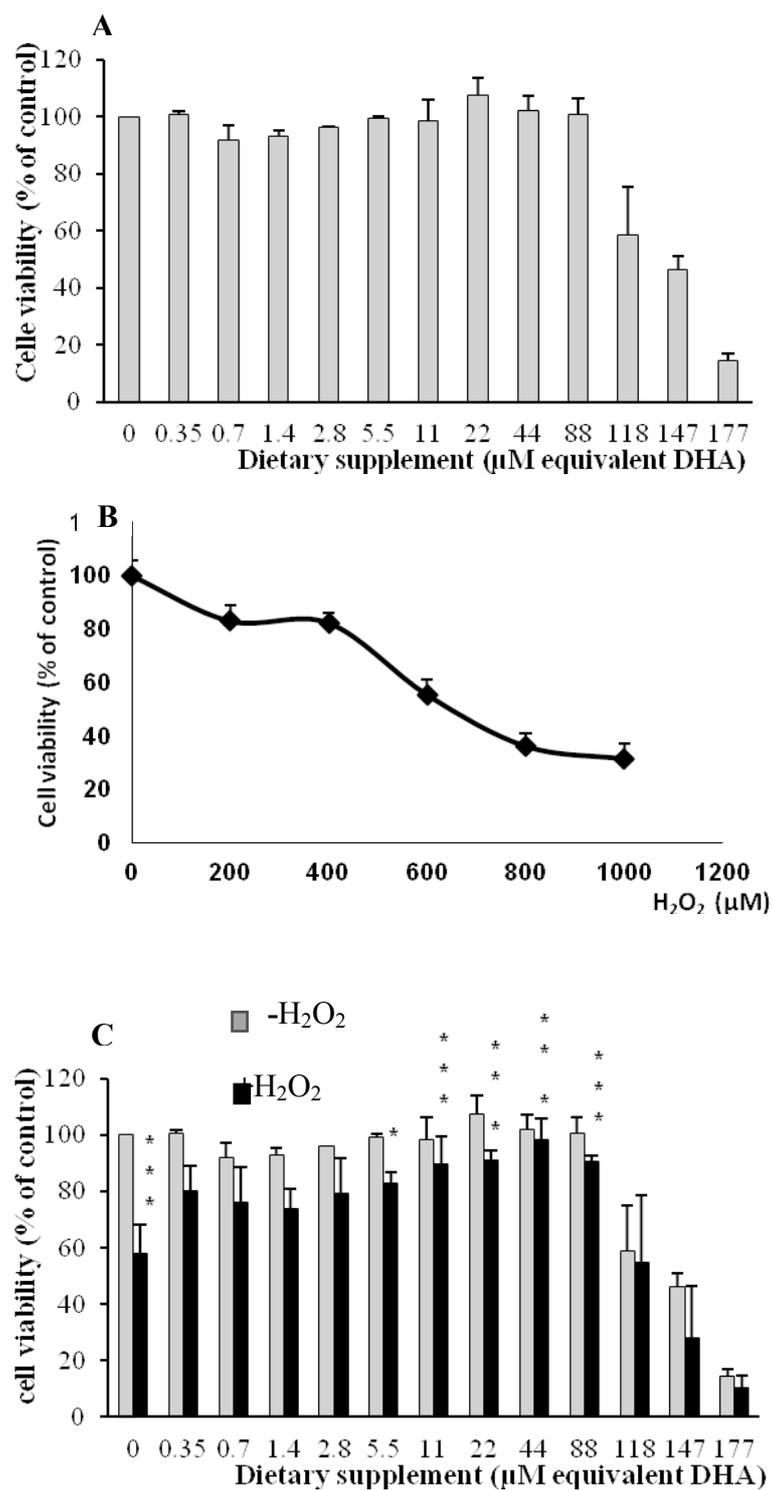


Figure 1.



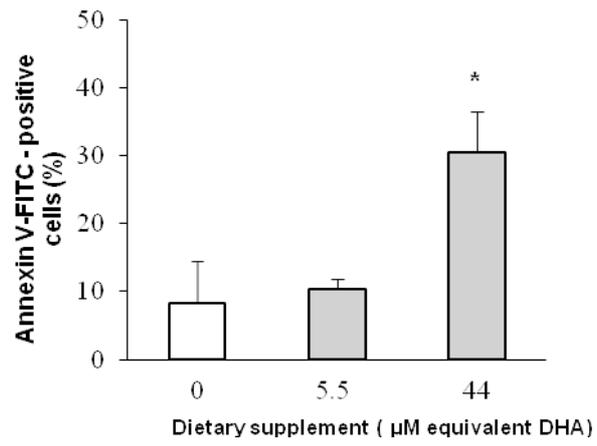


Figure 2.



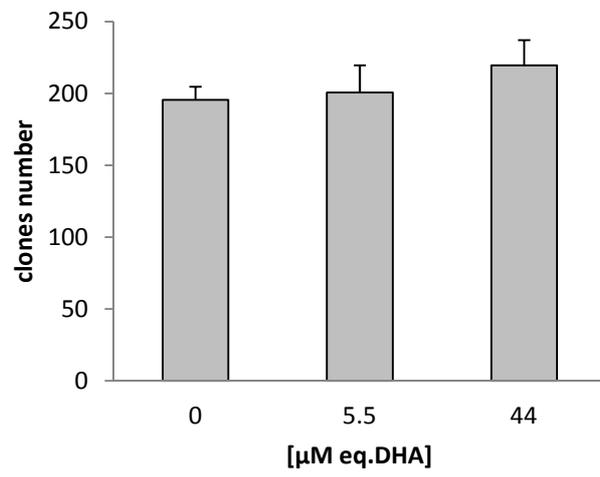


Figure 3.



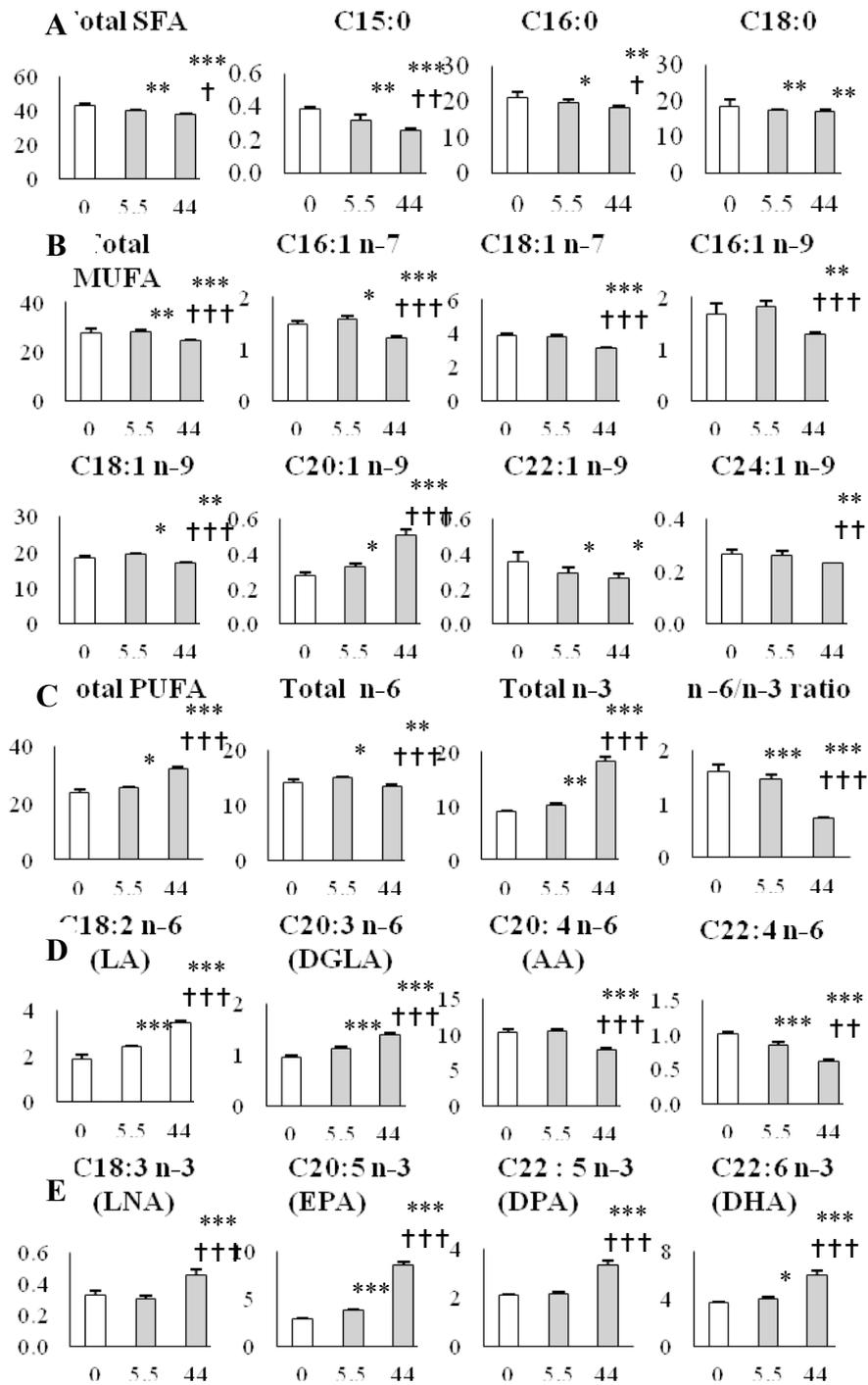


Figure 4.

Dietary supplement (μM equivalent)



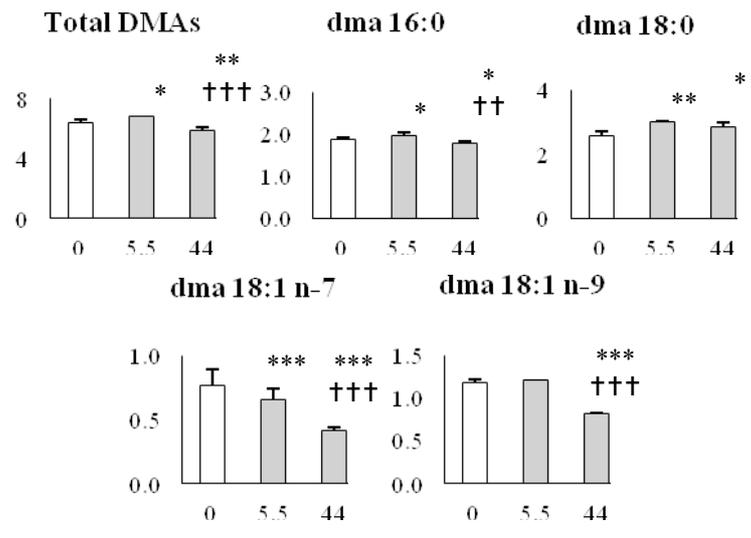


Figure 5.



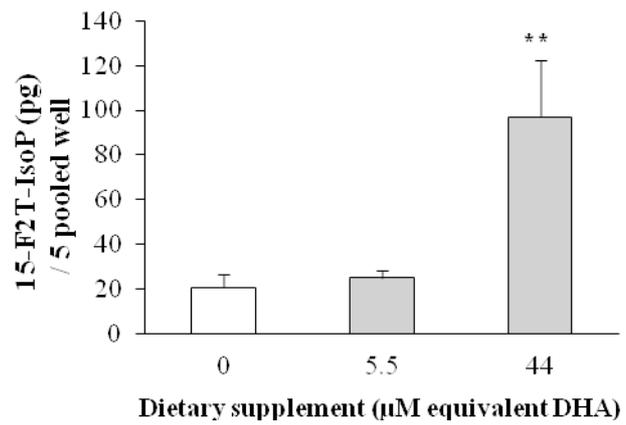


Figure 6.



## References

1. Friedman, D.S., et al., Prevalence of age-related macular degeneration in the United States. *Arch Ophthalmol*, 2004. **122**(4): p. 564-72.
2. Klein, R., B.E. Klein, and K.L. Linton, Prevalence of age-related maculopathy. The Beaver Dam Eye Study. *Ophthalmology*, 1992. **99**(6): p. 933-43.
3. Lim, L.S., et al., Age-related macular degeneration. *Lancet*, 2012. **379**(9827): p. 1728-38.
4. Spraul, C.W., G.E. Lang, and H.E. Grossniklaus, Morphometric analysis of the choroid, Bruch's membrane, and retinal pigment epithelium in eyes with age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1996. **37**(13): p. 2724-35.
5. Green, W.R., P.J. McDonnell, and J.H. Yeo, Pathologic features of senile macular degeneration. *Ophthalmology*, 1985. **92**(5): p. 615-27.
6. Dorey, C.K., et al., Cell loss in the aging retina. Relationship to lipofuscin accumulation and macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1989. **30**(8): p. 1691-9.
7. Bhutto, I. and G. Luty, Understanding age-related macular degeneration (AMD): relationships between the photoreceptor/retinal pigment epithelium/Bruch's membrane/choriocapillaris complex. *Mol Aspects Med*, 2012. **33**(4): p. 295-317.
8. Ramchani-Ben Othman, K., et al., Dietary supplement enriched in antioxidants and omega-3 protects from progressive light-induced retinal degeneration. *PLoS One*, 2015. **10**(6): p. e0128395.
9. Strauss, O., The retinal pigment epithelium in visual function. *Physiol Rev*, 2005. **85**(3): p. 845-81.
10. Kaarniranta, K., et al., Heat shock proteins as gatekeepers of proteolytic pathways- Implications for age-related macular degeneration (AMD). *Ageing Res Rev*, 2009. **8**(2): p. 128-39.
11. Plafker, S.M., G.B. O'Mealey, and L.I. Szweda, Mechanisms for countering oxidative stress and damage in retinal pigment epithelium. *Int Rev Cell Mol Biol*, 2012. **298**: p. 135-77.
12. Mosmann, T., Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, 1983. **65**(1-2): p. 55-63.



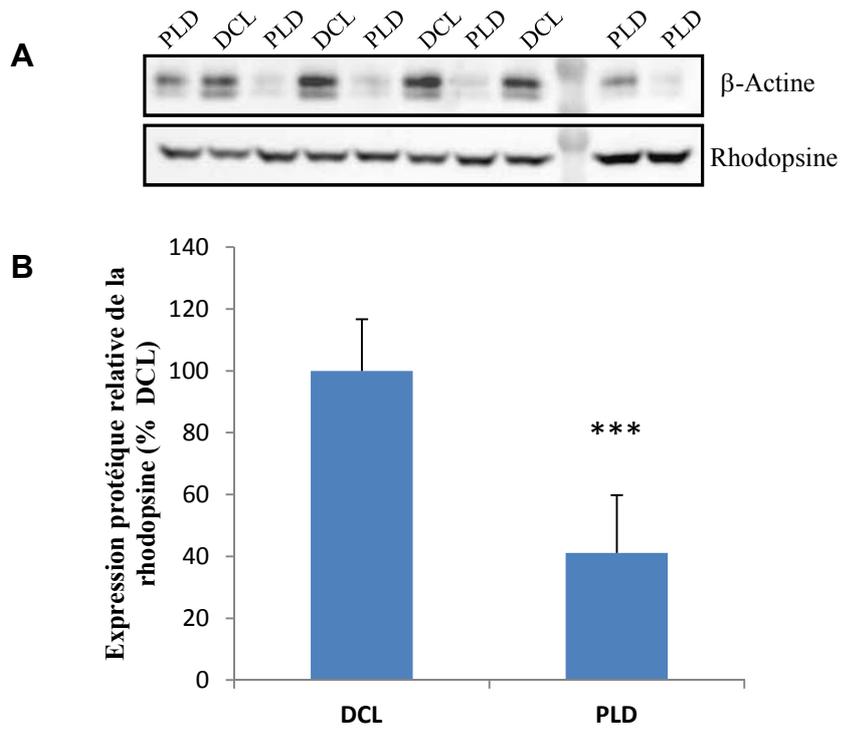
13. Villalpando Rodriguez, G.E. and A. Torriglia, Calpain 1 induce lysosomal permeabilization by cleavage of lysosomal associated membrane protein 2. *Biochim Biophys Acta*, 2013. **1833**(10): p. 2244-53.
14. Folch, J., M. Lees, and G.H. Sloane Stanley, A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem*, 1957. **226**(1): p. 497-509.
15. Acar, N., et al., Red blood cell plasmalogens and docosahexaenoic acid are independently reduced in primary open-angle glaucoma. *Exp Eye Res*, 2009. **89**(6): p. 840-53.
16. Juaneda, P. and G. Rocquelin, Rapid and convenient separation of phospholipids and non phosphorus lipids from rat heart using silica cartridges. *Lipids*, 1985. **20**(1): p. 40-1.
17. Morrison, W.R. and L.M. Smith, Preparation of Fatty Acid Methyl Esters and Dimethylacetals from Lipids with Boron Fluoride--Methanol. *J Lipid Res*, 1964. **5**: p. 600-8.
18. A randomized, placebo-controlled, clinical trial of high-dose supplementation with vitamins C and E, beta carotene, and zinc for age-related macular degeneration and vision loss: AREDS report no. 8. *Arch Ophthalmol*, 2001. **119**(10): p. 1417-36.
19. Dunn, K.C., et al., Use of the ARPE-19 cell line as a model of RPE polarity: basolateral secretion of FGF5. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1998. **39**(13): p. 2744-9.
20. Dunn, K.C., et al., ARPE-19, a human retinal pigment epithelial cell line with differentiated properties. *Exp Eye Res*, 1996. **62**(2): p. 155-69.
21. Kaczara, P., T. Sarna, and J.M. Burke, Dynamics of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> availability to ARPE-19 cultures in models of oxidative stress. *Free Radic Biol Med*, 2010. **48**(8): p. 1064-70.
22. Weigel, A.L., J.T. Handa, and L.M. Hjelmeland, Microarray analysis of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-, HNE-, or tBH-treated ARPE-19 cells. *Free Radic Biol Med*, 2002. **33**(10): p. 1419-32.
23. Miceli, M.V., M.R. Liles, and D.A. Newsome, Evaluation of oxidative processes in human pigment epithelial cells associated with retinal outer segment phagocytosis. *Exp Cell Res*, 1994. **214**(1): p. 242-9.
24. Tate, D.J., Jr., M.V. Miceli, and D.A. Newsome, Phagocytosis and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induce catalase and metallothionein gene expression in human retinal pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1995. **36**(7): p. 1271-9.
25. Cia, D., et al., Epigallocatechin gallate (EGCG) prevents H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress in primary rat retinal pigment epithelial cells. *Curr Eye Res*, 2014. **39**(9): p. 944-52.



26. Wankun, X., et al., Protective effect of paeoniflorin against oxidative stress in human retinal pigment epithelium in vitro. *Mol Vis*, 2011. **17**: p. 3512-22.
27. Wada, M., et al., Density-dependent expression of FGF-2 in response to oxidative stress in RPE cells in vitro. *Curr Eye Res*, 2001. **23**(3): p. 226-31.
28. Kagan, V.E., et al., Oxidative signaling pathway for externalization of plasma membrane phosphatidylserine during apoptosis. *FEBS Lett*, 2000. **477**(1-2): p. 1-7.
29. Balasubramanian, K., B. Mirnikjoo, and A.J. Schroit, Regulated externalization of phosphatidylserine at the cell surface: implications for apoptosis. *J Biol Chem*, 2007. **282**(25): p. 18357-64.
30. Dugas, B., et al., Effects of oxysterols on cell viability, inflammatory cytokines, VEGF, and reactive oxygen species production on human retinal cells: cytoprotective effects and prevention of VEGF secretion by resveratrol. *Eur J Nutr*, 2010. **49**(7): p. 435-46.
31. Wrona, M., M. Rozanowska, and T. Sarna, Zeaxanthin in combination with ascorbic acid or alpha-tocopherol protects ARPE-19 cells against photosensitized peroxidation of lipids. *Free Radic Biol Med*, 2004. **36**(9): p. 1094-101.
32. Brown, E.R. and P.V. Subbaiah, Differential effects of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid on human skin fibroblasts. *Lipids*, 1994. **29**(12): p. 825-9.
33. Calder, P.C., et al., Incorporation of fatty acids by concanavalin A-stimulated lymphocytes and the effect on fatty acid composition and membrane fluidity. *Biochem J*, 1994. **300** ( Pt 2): p. 509-18.
34. Sobajima, T., et al., Effects of fatty acid modification of ascites tumor cells on pulmonary metastasis in rat. *Jpn J Cancer Res*, 1986. **77**(7): p. 657-63.
35. Yorek, M., et al., Effect of fatty acid composition on insulin and IGF-I binding in retinoblastoma cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1989. **30**(10): p. 2087-92.
36. Armstrong, V.T., et al., Rapid flip-flop in polyunsaturated (docosahexaenoate) phospholipid membranes. *Arch Biochem Biophys*, 2003. **414**(1): p. 74-82.
37. Roberts, L.J., 2nd and G.L. Milne, Isoprostanes. *J Lipid Res*, 2009. **50** Suppl: p. S219-23.
38. Marcheselli, V.L., et al., Novel docosanoids inhibit brain ischemia-reperfusion-mediated leukocyte infiltration and pro-inflammatory gene expression. *J Biol Chem*, 2003. **278**(44): p. 43807-17.



39. Mukherjee, P.K., et al., Neuroprotectin D1: a docosahexaenoic acid-derived docosatriene protects human retinal pigment epithelial cells from oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. **101**(22): p. 8491-6.
40. Chow, S.C., et al., Suppression of growth in a leukemic T cell line by n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids. *Lipids*, 1989. **24**(8): p. 700-4.
41. Morandat, S., et al., Plasmalogens protect unsaturated lipids against UV-induced oxidation in monolayer. *Biochim Biophys Acta*, 2003. **1616**(2): p. 137-46.
42. Lien, E.L. and B.R. Hammond, Nutritional influences on visual development and function. *Prog Retin Eye Res*, 2011. **30**(3): p. 188-203.
43. King, R.E., K.D. Kent, and J.A. Bomser, Resveratrol reduces oxidation and proliferation of human retinal pigment epithelial cells via extracellular signal-regulated kinase inhibition. *Chem Biol Interact*, 2005. **151**(2): p. 143-9.
44. Pintea, A., et al., Antioxidant effect of trans-resveratrol in cultured human retinal pigment epithelial cells. *J Ocul Pharmacol Ther*, 2011. **27**(4): p. 315-21.
45. Roig-Perez, S., et al., Lipid peroxidation induced by DHA enrichment modifies paracellular permeability in Caco-2 cells: protective role of taurine. *J Lipid Res*, 2004. **45**(8): p. 1418-28.
46. Jain, S.K., In vivo externalization of phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine in the membrane bilayer and hypercoagulability by the lipid peroxidation of erythrocytes in rats. *J Clin Invest*, 1985. **76**(1): p. 281-6.



**Figure 47** : Expression protéique de la rhodopsine **A)** Western Blot **B)** Analyse densitométrique normalisée à la  $\beta$ -Actine. **DCL**: Dim Cyclic Light (lumière cyclique faible), **PLD**: Progressive Light Damage (lumière). \*\*\*  $p < 0,001$  t-test

## Résultats non publiés

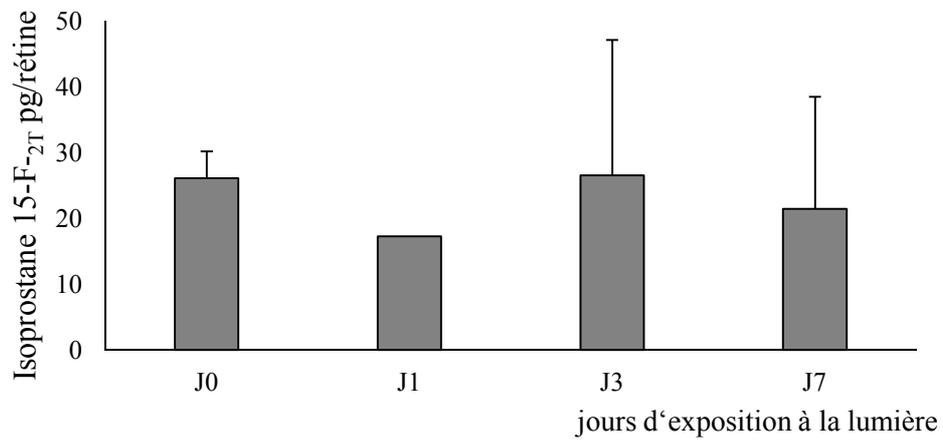
### Phénomène d'adaptation aux conditions de lumière forte

Dans le premier article, bien que nous ayons montré que le complément alimentaire protège la rétine contre la mort cellulaire induite par la lumière, nous avons observé une légère réduction de l'amplitude de l'onde a de l'électrorétinogramme chez les animaux exposés-supplémentés. L'onde a est le reflet de la réponse des cellules photoréceptrices à une stimulation lumineuse. Son amplitude est liée au nombre de photorécepteurs et à la quantité de rhodopsine présente dans la rétine. Les études structurales de la rétine ne mettant pas en évidence de réduction significative du nombre de photorécepteurs puisque l'épaisseur de la couche nucléaire externe est préservée, nous avons alors émis l'hypothèse d'un mécanisme d'adaptation aux conditions de lumière environnementale forte qui se traduirait par une diminution du contenu en rhodopsine. En effet, lorsque des animaux sont élevés en lumière cyclique forte, les segments externes des photorécepteurs sont plus courts et le contenu en rhodopsine dans les rétines est réduit par rapport à des animaux élevés en lumière cycliques faible. Ce phénomène a été appelé « photostasis » (Penn and Williams 1986).

Afin de confirmer cette hypothèse nous avons évalué le contenu en rhodopsine par western blot, dans les rétines des animaux supplémentés exposés à la lumière cyclique forte ou maintenus en lumière cyclique faible.

Des animaux sont élevés en lumière cyclique faible (12h jour <10 lux ; 12h noir). A l'âge de 7-8 semaines, ils sont supplémentés quotidiennement à raison de 0,2 ml de supplément par jour. Sept jours après le début de la supplémentation, ils sont transférés en lumière cyclique forte (12h de jour 400 lux ; 12h de noir) ou maintenus en lumière cyclique faible. Sept jours plus tard ils sont sacrifiés et les rétines prélevés pour l'analyse par western blot.

La rhodopsine est détectée à un poids moléculaire de 39-40 kDa. L'intensité des bandes observées sur le Western Blot (Figure 47 A) montre clairement une diminution de la quantité de rhodopsine détectée dans les rétines des animaux supplémentés-exposés par rapport à celles des animaux supplémentés non exposés. L'analyse densitométrique (Figure 47 B) rapportée à la protéine de référence b-actine confirme ces observations. La rhodopsine est réduite de 60 % chez les animaux exposés par rapport aux animaux non-exposés.



**Figure 48** : Production de l'isoprostane 15-F<sub>2t</sub>-IsoP dans la rétine chez des animaux non supplémentés avant (**J0**) après 1 jour (**J1**), après 3 jours (**J3**) et après 7 jours (**J7**) d'exposition à la lumière cyclique forte. Les résultats sont exprimés en pg/rétine ± SD.

Ces résultats confirment donc que la réduction de l'amplitude de l'onde a de l'ERG est lié à un phénomène d'adaptation au condition de lumière intense caractérisé par une réduction du contenu en rhodopsine dans les rétines après une semaine d'exposition à la lumière forte.

### **Taux d'isoprostanes dans les rétines**

Afin d'évaluer la peroxydation lipidique, nous avons évalué la production des isoprostanes dans les rétines. Les isoprostanes sont formés par un mécanisme radicalaire non enzymatique de l'acide arachidonique. L'isoprostane 15-F<sub>2t</sub>-IsoP est chimiquement stable et produit en quantité très abondante en situation clinique de stress oxydant.

Dans une première étape, nous avons étudié la cinétique de production de l'isoprostane 15-F<sub>2t</sub>-IsoP au cours de l'exposition à la lumière cyclique forte chez des animaux non supplémentés afin de déterminer les temps pertinents pour étudier dans un deuxième temps l'effet de la supplémentation.

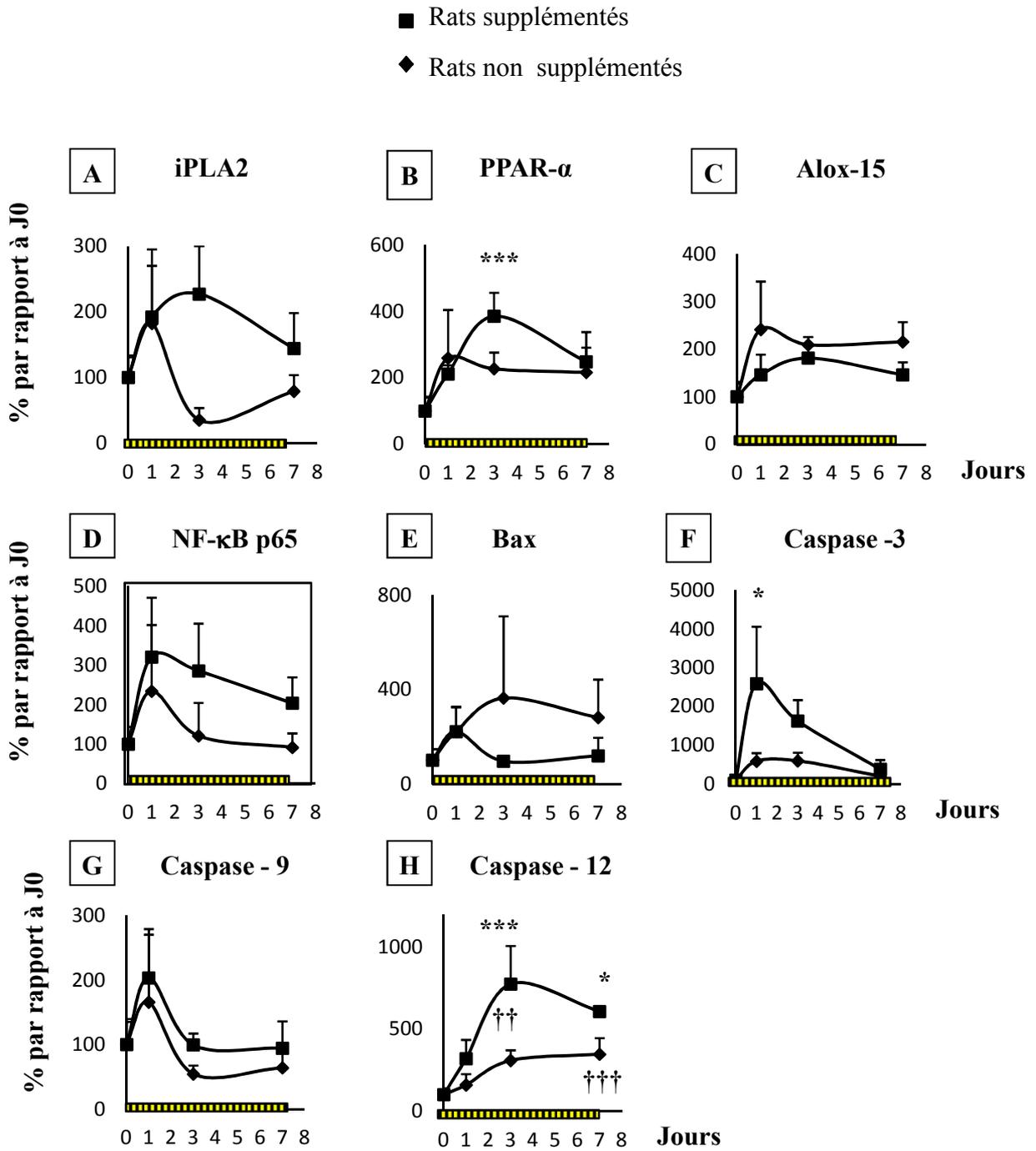
Les animaux sont élevés en lumière cyclique faible (<10 lux). A l'âge de 7-8 semaines ils sont exposés à la lumière cyclique intense (400 lux ; 12 heures de lumière, 12 heures d'obscurité). Un jour (J1), trois jours (J3) ou une semaine (J7) après le début de l'exposition les rétines sont prélevées. Des animaux maintenus en lumière cyclique faible sont sacrifiés dans le noir (J0). Le dosage de l'isoprostane 15-F<sub>2t</sub>-IsoP est réalisé par HPLC.

Chez les animaux maintenus en lumière cyclique faible, le taux de l'isoprostane 15-F<sub>2t</sub>-IsoP est de 26 ± 4 pg/rétine. Pour les animaux exposés à la lumière cyclique forte, la variabilité importante entre les échantillons d'un même groupe ne permet pas d'exploiter les résultats (Figure 48). Par conséquent de nouveaux dosages seront réalisés.

### **Variation de l'expression génique**

La supplémentation conduit à une modification de la composition lipidique de la rétine avec une augmentation du taux d'EPA et de DPA dans la rétine. Nous avons alors émis l'hypothèse que le complément facilite le renouvellement du DHA et permet ainsi le maintien de l'intégrité membranaire et favorise les propriétés anti-apoptotiques et anti-inflammatoires.

Afin de vérifier notre hypothèse, nous avons étudié l'expression par qPCR de gènes impliqués en aval du DHA dans la signalisation cellulaire : le gène de la phospholipase A2 calcium indépendante (iPLA2) connue pour libérer le DHA des membranes, le gène de la lipoxigénase 15-LOX impliquée dans la synthèse de neuroprotectine à partir du DHA, le récepteur nucléaire PPAR- $\alpha$  dont le DHA est un ligand, le gène de la protéine Bax pro-



**Figure 49:** Cinétique d'expression des gènes au cours de l'exposition à la lumière cyclique forte chez des animaux supplémentés (■) ou non supplémentés (◆) avec le complément alimentaire (A) iPLA2, (B) PPAR- $\alpha$ , (C) Alox-15 (D) NF- $\kappa$ B p65, (E) Bax, (F) Caspase-3, (G) Caspase-9, (H) Caspase-12

apoptotique, le gène de la sous unité p65 du facteur de transcription NFκB impliquée dans la régulation de l'apoptose et de l'inflammation, le gène de la caspase-3 effectrice de l'apoptose, le gène de la caspase-9 impliquée dans la voie mitochondriale de l'apoptose, le gène de la caspase-12 impliquée dans la voie du réticulum endoplasmique.

Des animaux recevant de l'eau ou du complément alimentaire sont exposés à la lumière cyclique forte et sont sacrifiés à un jour (J1), 3 jours (J3) ou une semaine (J7) après le début de l'exposition. En parallèle, des animaux recevant de l'eau ou du complément alimentaire sont maintenus en lumière cyclique faible et sacrifiés à l'obscurité (J0).

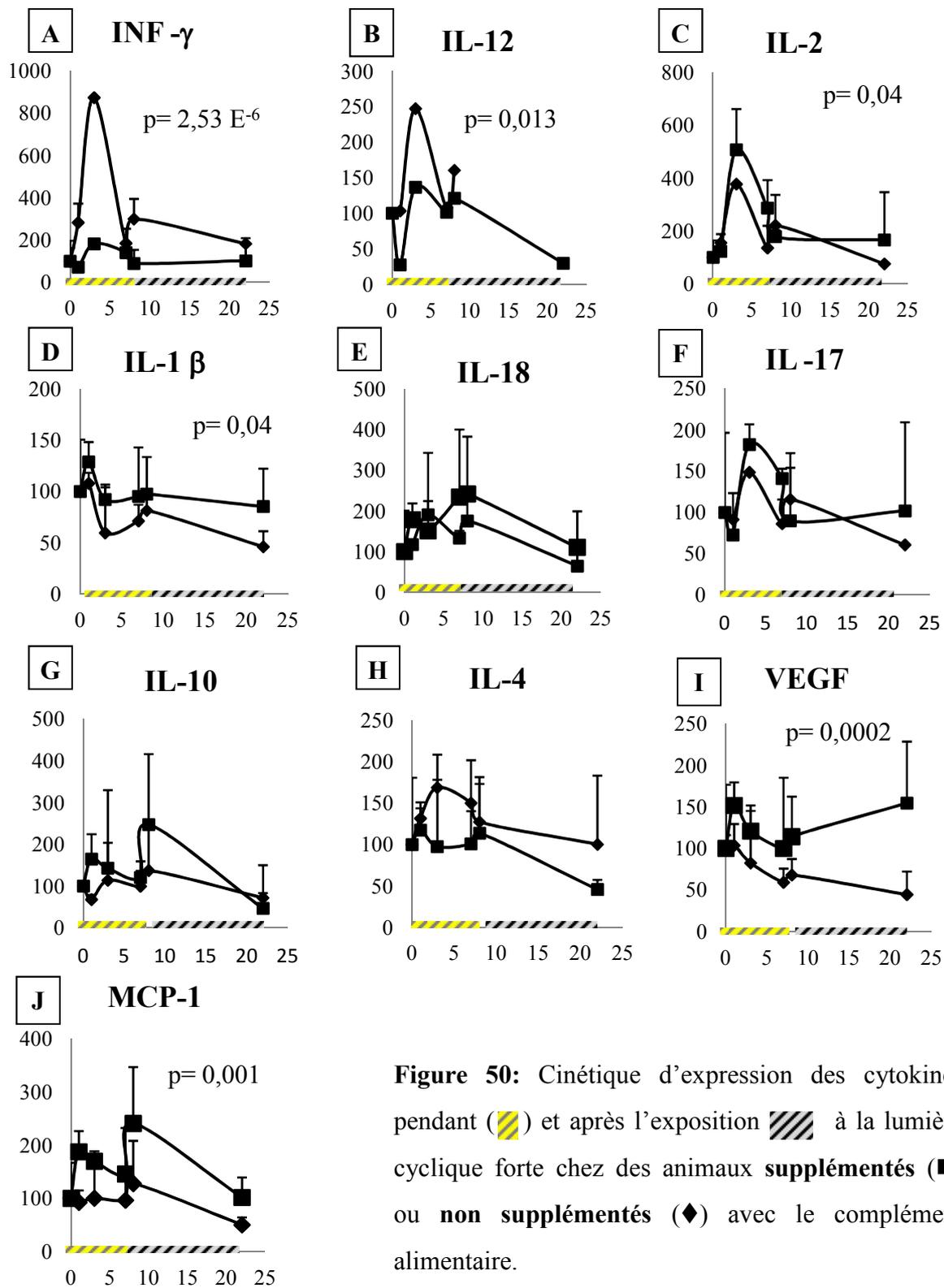
Sur les 8 gènes étudiés, aucune variation significative n'a été observée entre les animaux recevant de l'eau ou du complément alimentaire et sacrifiés à l'obscurité. Ces résultats montrent que le complément alimentaire n'a pas d'effet sur l'expression basale de ces gènes.

En revanche, la lumière entraîne une augmentation de la transcription de l'ensemble des gènes étudiés que les animaux reçoivent de l'eau ou du complément alimentaire. Toutefois pour les gènes *iPLA2*, *PPAR-α*, *caspase-12* et *caspase-3*, l'augmentation est significativement plus importante chez les animaux ayant reçus le complément.

En effet, la lumière entraîne une augmentation du taux d'ARNm d'***iPLA2*** à J1 similaire chez les animaux recevant de l'eau ou du complément. Mais, alors que ce taux diminue chez les rats recevant de l'eau, il est maintenu élevé sur toute la durée de l'exposition chez les animaux recevant du complément alimentaire (Figure 49A). Pour ***PPAR-α***, le taux des transcrits à J3 est significativement supérieur ( $p = 0.0002$ ) chez les animaux recevant le complément alimentaire (285 %) par rapport aux animaux recevant l'eau (126 %) (Figure 49B). Pour la ***caspase-12*** et ***caspase-3***, l'exposition à la lumière cyclique forte entraîne une augmentation progressive du taux de transcrits chez les animaux recevant l'eau et ceux recevant le complément alimentaire. Ce taux de transcrits est toujours significativement ( $p = 0.01$ ) plus élevé dans le groupe recevant le complément alimentaire (Figure 49H et G).

Par conséquent, il apparaît que la lumière stimule la transcription des gènes (*iPLA2*, 15-LOX, Bax, la sous unité p65 (active) de NF-κB, *caspase-9*, *caspase-12* et *PPAR-α*) et le complément alimentaire permet de maintenir l'augmentation de transcription des gènes *iPLA2*, *PPAR-α*, *caspase-12* et *caspase-3*.

Au vue de ces résultats, nous pouvons émettre l'hypothèse que le renouvellement facilité du DHA suite au stockage d'EPA et de DPA dans la rétine permet de maintenir un



**Figure 50:** Cinétique d'expression des cytokines pendant (▨) et après l'exposition (▩) à la lumière cyclique forte chez des animaux **supplémentés** (■) ou **non supplémentés** (◆) avec le complément alimentaire.

taux de substrat pour iPLA2 et donc de stimuler sa transcription, traduction et activité. Le DHA libéré des membranaires activerait PPAR- $\alpha$  qui d'un côté inhiberait la translocation de NF $\kappa$ B au noyau et de l'autre activerait la transcription des gènes des enzymes antioxydantes. L'augmentation de la transcription de la caspase-12 suggère une activation de la voie du réticulum endoplasmique suggérant que le RE pourrait participer à l'effet protecteur du complément.

### **Etude de l'expression protéique des cytokines**

PPAR- $\alpha$  étant connu pour inhiber la translocation du facteur nucléaire NF- $\kappa$ B dans le noyau et ainsi l'expression des cytokines pro-inflammatoires (Vanden Berghe, Vermeulen et al. 2003), nous avons émis l'hypothèse que l'effet protecteur du complément alimentaire est lié à la modulation de l'expression des cytokines.

Nous nous sommes intéressés à l'étude de 10 cytokines avec des cytokines pro-inflammatoires (INF- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-18, IL-2, IL-12, IL-17), des cytokines anti-inflammatoires (IL-4, IL-10), le facteur d'angiogenèse (VEGF) et la chémokine (MCP-1).

Des animaux recevant de l'eau ou du complément alimentaire sont exposés à la lumière cyclique forte et sont sacrifiés à un jour (J1), 3 jours (J3) ou une semaine (J7) après le début de l'exposition et un jour (J8) et quatorze (J21) après la fin de l'exposition. En parallèle, des animaux recevant de l'eau ou du complément alimentaire sont maintenus en lumière cyclique faible et sacrifiés à l'obscurité (J0).

Sur les 10 cytokines étudiées, aucune variation significative n'a été observée entre les animaux recevant de l'eau ou du complément alimentaire et sacrifiés à l'obscurité. Ces résultats montrent que le complément alimentaire n'a pas d'effet sur l'expression basale de ces gènes.

La lumière entraîne des variations des taux de cytokines chez les animaux recevant de l'eau et du complément alimentaire. Toutefois, seules 5 cytokines (INF- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, VEGF, MCP-1) varie significativement entre les animaux supplémentés et non supplémentés exposés à la lumière.

La lumière entraîne des variations des taux des cytokines, chez les animaux recevant de l'eau ou du complément alimentaire. Toutefois, seules 6 cytokines (INF- $\gamma$ , IL-12, IL-2, IL-1 $\beta$ , VEGF, MCP-1) varient significativement chez les animaux supplémentés ou non supplémentés et une cytokine (IL-4) présente tendance.



➤ **INF- $\gamma$ , IL-12** (Figure 50 A et B)

**Pendant l'exposition** : chez les animaux recevant de l'eau, la lumière entraîne une augmentation significative des cytokines INF- $\gamma$ , IL-12 à J1 (+184 % et + 3% ; respectivement) et à J3 (+ 772 % et + 147 % ; respectivement) puis leur expression diminue à la fin de l'exposition (J7) mais reste supérieur au taux basal (+ 84 % et + 7 % ; respectivement). Chez les animaux recevant du complément alimentaire, leur expression diminue à J1 (- 30 % et - 70 %, respectivement), puis elle augmente à J3 (+ 82 % et + 36 %, respectivement) mais reste inférieure aux taux observés chez les animaux recevant de l'eau et enfin à J7 le taux d'INF- $\gamma$  diminue et celui d'IL-12 retourne au niveau basal.

**Après la fin de l'exposition**, le taux d'INF- $\gamma$  reste augmenté uniquement chez les rats recevant de l'eau. Concernant IL-12, son taux n'était pas détectable dans les échantillons après exposition.

*Conclusion* : Les taux plus élevés d'IL-12 et d'INF- $\gamma$  chez les animaux non supplémentés suggèrent une réponse pro-inflammatoire. En effet, IL-12 favorise la différenciation des lymphocytes T vers un phénotype Th1 qui sécrète INF- $\gamma$  qui son tour entretient la sécrétion d'IL-12.

➤ **IL-2** (Figure 50 C)

**Pendant l'exposition la lumière**, l'expression d'IL-2 est tout d'abord fortement augmentée chez les animaux non supplémentés et supplémentés (à J3 respectivement, + 377 %, + 400 %). Puis les taux diminuent à la fin de l'exposition. Les taux d'IL-2 sont significativement plus supérieurs dans le groupe recevant du complément alimentaire par rapport au groupe non supplémentés ( $p = 0.004$ ).

**Après la fin de l'exposition**, alors que chez les rats supplémentés avec le complément alimentaire son taux continue à diminuer mais reste toujours élevé que le niveau basal, chez les rats recevant de l'eau, IL-2 augmente à J8 de +120 % avant de diminuer en dessous du niveau basal (- 25 %).

*Conclusion* : IL-2 sécrété par les lymphocytes Th1 active les monocytes et les macrophages et inhibe les Th17, suggère une activation des lymphocytes Th1 au début de l'exposition à la lumière.



➤ **IL-1 $\beta$**  (Figure 50 D)

L'exposition la lumière entraîne une augmentation significative ( $p = 0.04$ ) d'IL-1 $\beta$  chez les deux groupes d'animaux à J1, ensuite son taux revient au niveau basal pour les rats recevant du complément alimentaire et diminue en dessous du niveau basal chez les animaux recevant de l'eau.

*Conclusion* : IL-1 $\beta$  étant secrété par les macrophages M1, nos résultats suggèrent une activation des macrophages M1 au début de l'exposition à la lumière.

➤ **MCP-1** (Figure 50 J)

**Au cours de l'exposition à la lumière**, le taux de MCP-1 ne varie pas chez les animaux non supplémentés alors qu'il est fortement augmenté chez les animaux supplémentés.

**Après la fin de l'exposition**, le taux de MCP-1 augmente dans les deux groupes mais de façon beaucoup plus importante dans le groupe supplémenté que dans le groupe non supplémenté. Deux semaines après la fin de l'exposition à la lumière (J21), le taux de MCP-1 diminue pour atteindre une valeur inférieure au niveau basal chez les animaux non supplémentés et un niveau basal chez les animaux supplémentés.

*Conclusion* : le MPC-1 recrute les macrophages au site de l'inflammation, nos résultats suggèrent que la supplémentation favorise un recrutement de macrophages dans le tissu rétinien.

➤ **VEGF** (Figure 50 I)

L'expression du VEGF diminue chez les animaux non supplémentés au cours et après l'exposition à la lumière cyclique forte alors que chez les animaux supplémentés le taux de VEGF reste supérieur au niveau basal quel que soit le temps considéré.

*Conclusion* : VEGF facilite l'approvisionnement des tissus rétiniens en oxygène et en nutriments, nos résultats suggèrent donc que la supplémentation favorise l'approvisionnement du tissu rétinien dès le début de l'exposition à la lumière.

➤ **IL-4** (Figure 50 H)

**L'exposition à la lumière** entraîne une augmentation du taux d'IL-4 chez les deux groupes d'animaux supplémentés et non supplémentés à J1 (+ 31 % et 17 %, respectivement). Son taux reste augmenté chez les animaux supplémentés alors que chez les animaux non supplémentés il retourne au niveau basal.



**A un jour après la fin de l'exposition (J8)**, le taux d'IL-4 est augmenté de nouveau chez les rats supplémentés (+ 13 %) mais reste inférieur aux taux observés chez les animaux supplémentés (+ 27 %). Deux semaines après la fin de l'exposition à la lumière (J21), le taux de MCP-1 diminue pour atteindre une valeur inférieure au niveau basal chez les animaux non supplémentés et un niveau basal chez les animaux supplémentés.

*Conclusion* : IL-4 favorise la différenciation des lymphocytes Th0 vers les lymphocytes Th2 et la polarisation des macrophages vers le phénotype M2 anti-inflammatoire, nos résultats suggèrent donc que la supplémentation favorise une réponse anti-inflammatoire.



## **3<sup>ème</sup> partie**

# **Discussion Générale, Conclusions, et Perspectives**



## Discussion générale

La dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) est la première cause de handicap visuel chez les personnes de plus de 50 ans. La perte de vision est due à une dégénérescence progressive des photorécepteurs à l'origine du signal visuel. Cette dégénérescence est secondaire à une altération de l'épithélium pigmentaire rétinien. Dans les DMLA, on distingue 2 formes : la forme sèche caractérisée par l'apparition de drusen entre l'épithélium pigmentaire rétinien et la membrane de Bruch, et la forme humide caractérisée par l'apparition de néovaisseaux, plus sévère. A l'heure actuelle, certains patients atteints de la forme humide peuvent bénéficier des traitements anti-VEGF qui limitent la néovascularisation et ralentissent voire stabilisent la dégénérescence, mais aucun traitement n'existe contre la forme sèche (Danis, Lavine et al. 2015). La forme sèche représentant une forme précoce de la DMLA, elle apparaît comme une cible privilégiée des traitements préventifs qui permettraient de limiter l'évolution vers la forme avancée plus handicapante.

Bien que les mécanismes physiopathologiques ne soient pas encore totalement élucidés, le stress oxydatif et l'inflammation sont maintenant reconnus comme impliqués à la fois dans l'initiation et la progression de la DMLA (Hollyfield 2010). Ainsi, des études épidémiologiques d'intervention et d'observation ont montré que la supplémentation par des composés ayant des propriétés anti-oxydantes et/ou anti-inflammatoires tels que les vitamines, les oligoéléments, les caroténoïdes et les acides gras de la famille oméga-3 peuvent réduire le risque de développement et/ou la progression de la DMLA (Age-Related Eye Disease Study Research 2001; Cho, Stampfer et al. 2001; Cangemi 2007). Ces observations ont conduit à une explosion des compléments alimentaires à visé oculaire sur le marché et leur prescription pour des patients atteints de DMLA est devenue une pratique courante. La composition de ces compléments alimentaires à visée oculaire découle de l'étude AREDS mais n'ai jamais en parfaite adéquation avec celle-ci : généralement d'autres composés ayant des propriétés anti-oxydantes ou anti-inflammatoires sont rajoutés ou/et les quantités des composés sont modifiées par rapport à la formulation d'AREDS. Contrairement à de nouveaux médicaments, la sécurité et l'efficacité des compléments alimentaires ne sont pas examinées et approuvées par la FDA (Food and agence du médicament, USA) ou l'EMA (European Medicine Agence Europe). Ainsi, l'autorisation de mise sur le marché des compléments alimentaires n'est pas soumise à l'évaluation par des experts. La principale législation de l'Union Européenne dans ce domaine est la directive 2002/46/CE (site internet 2). Cette directive n'est relative qu'aux compléments alimentaires contenant des vitamines et des minéraux et appelle à fixer des



dosages minimum et maximum mais à ce jour rien n'a encore été fait. Pour les substances telles que les acides gras, la sécurité d'utilisation n'est couverte par aucune législation ou réglementation. Bien que des études expérimentales s'intéressent à l'effet des différents ingrédients contenus dans les compléments, elles ne les évaluent que séparément ou en combinaison d'un nombre limité d'ingrédients. Aucune étude *in-vivo* ou *in-vitro* n'a étudié l'effet sur la rétine de formulation commercialisée.

Dans ce contexte, nous avons évalué sur la rétine *in-vivo* et sur les cellules ARPE19 d'épithélium pigmentaire rétinien *in-vitro* l'effet d'un complément alimentaire à visé oculaire commercialisé sous la même forme en France et en Tunisie. Ce complément alimentaire se présente sous forme de capsule de 0,6 mL contenant de l'huile de poisson, riche en EPA et DHA, des vitamines C et E, des oligoéléments (zinc et cuivre), des caroténoïdes (lutéine et zéaxanthine) et du résvératrol. Il est généralement prescrit à raison d'une à deux capsule(s) par jour sur du long terme (plusieurs mois) voire ad vitam aeternam.

Afin d'évaluer l'effet du complément dans les conditions physiologiques normales, des animaux ont été supplémentés et des cellules ARPE-19 traitées, pendant 7 jours sans induction de stress. Les résultats montrent que le taux de précurseur des oméga-3, l'acide linoléique (LNA), circulant n'est pas affecté par l'apport des formes plus avancées telles que l'EPA, le DPA et le DHA, même si ces dernières s'accumulent (respectivement + 167 %, + 131 % et + 18 %). Dans les cellules épithéliales *in-vitro* l'accumulation d'EPA (+ 32 % à 5  $\mu$ M et + 200 % pour 44  $\mu$ M) et DPA (+ 4 % à 5  $\mu$ M et + 61% pour 44  $\mu$ M) est associée à une augmentation de LNA. A l'inverse, au niveau de la rétine *in-vivo*, le taux de précurseur est réduit de 69 % par rapport à celui des rétines d'animaux non supplémentés et il est associée à une accumulation d'EPA de + 100 % et de DPA de + 75 %. Ces résultats sont en accord avec les travaux de Chen et al., (Chen and Anderson 1993) qui ont montré une augmentation sélective au niveau de la rétine neurale des AGPI avec des chaînes carbonées supérieures à 20 carbones. Néanmoins, alors que la supplémentation conduit à une augmentation du DHA circulant et du DHA dans les cellules de l'EPR (*in-vitro*), au niveau de la rétine *in-vivo* ce taux reste constant. En effet, il a été mis en évidence que le DHA rétinien est spécifiquement orchestré autour d'un mécanisme de conservation qui assure des niveaux adéquats de DHA en particulier pour les photorécepteurs (Bazan, Gordon et al. 1992).

Notre hypothèse est donc que la rétine n'incorpore pas les précurseurs oméga-3 mais stocke les AGPI sous forme d'EPA et de DPA, les intermédiaires de synthèse du DHA. Ce



stockage permet alors un renouvellement rapide du DHA. Les cellules rétiniennes peuvent synthétiser le DHA à partir de DPA puisqu'elles expriment l'enzyme  $\Delta 6$  désaturase qui introduit la dernière double liaison dans la voie de biosynthèse du DHA (Wang and Anderson 1993; Rotstein, Pennacchiotti et al. 1996). De plus, il a été montré que l'accumulation et la récupération du DHA dans les lipides rétiniens est rapide quand l'EPA est utilisé comme précurseur plutôt que LNA (Bazan, Careaga et al. 1982). Il a également été mis en évidence que l'inhibition de l'enzyme  $\Delta 5/\Delta 6$  désaturases, en empêchant la synthèse de DHA à partir de l'EPA, bloque totalement l'effet protecteur de l'EPA (Simon, Agnolazza et al. 2015). Bien que le taux de DHA dans la rétine reste constant, l'augmentation du renouvellement de celui-ci en présence du complément alimentaire est corroborée par la diminution de son homologue structurale (DPA, n-6) car tous les deux sont en compétition pour l'enzyme de synthèse  $\Delta 6$  désaturase (Cleland, James et al. 1992; SanGiovanni and Chew 2005). Par conséquent, l'accumulation d'EPA et DPA et le renouvellement facilité de DHA au niveau rétinien participerait à l'effet protecteur du supplément.

Afin d'évaluer cet effet protecteur du complément alimentaire sur la rétine, nous avons utilisé un modèle expérimental *in-vivo* de Dégénérescence Rétinienne Progressive induite par la Lumière (DRPIL) et un modèle *in-vitro* d'induction du stress oxydant par le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ). Le modèle de DRPIL consiste à exposer des animaux à une lumière cyclique intense (Bright-cyclic light, BCL) par rapport aux conditions lumineuses d'élevage (400 lux contre < à 10 lux pour l'élevage). L'exposition à la lumière n'induit pas une dégénérescence rétinienne sur une courte durée mais ce sont les effets néfastes cumulés de la lumière qui provoquent la mort des cellules photoréceptrices. Nous avons montré qu'après une semaine d'exposition en BCL, 1/ l'épaisseur de la couche nucléaire externe est réduite avec un maximum de dégénérescence dans la partie supérieure de la rétine, 2/ la fonction rétinienne est réduite de 50 % et 3/ les cellules photoréceptrices meurent par apoptose. Nous retrouvons ici des caractéristiques similaires à celles observées dans les modèles drastiques de dégénérescence rétinienne (Ranchon, Gorrard et al. 1999; Zhu, Valter et al. 2010). Le modèle *in-vitro* consiste à incuber une lignée de cellules humaines d'épithélium pigmentaire rétinien, les cellules ARPE-19, après 7 jours de culture avec  $H_2O_2$  à 600  $\mu M$  pendant 2 heures. Le  $H_2O_2$  induit une mort cellulaire de 44 % des cellules. Les cellules meurent par apoptose (Cia, Vergnaud-Gauduchon et al. 2014).

Le complément alimentaire protège *in-vivo* la structure et la fonction de la rétine contre la DRPIL en réduisant l'apoptose des cellules photoréceptrices (diminution du nombre de



noyaux apoptotiques) (Ramchani-Ben Othman, Cercy et al. 2015) et *in-vitro* protège les cellules ARPE-19 contre la mort cellulaire induite par le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. **Nous avons alors étudié les mécanismes moléculaires impliqués dans l'effet neuroprotecteur du supplément en comparant différents paramètres entre des animaux supplémentés et non supplémentés.** Nous avons montré que la lumière entraîne une augmentation de l'expression génique de la phospholipase A2 calcium indépendante (iPLA<sub>2</sub>) chez les animaux non supplémentés et supplémentés. Si on émet l'hypothèse que l'expression des ARNm est corrélée à l'expression protéique, elle-même corrélée à l'activité, alors ces résultats suggèrent que la lumière induit une augmentation de l'activité d'iPLA<sub>2</sub>. L'enzyme iPLA<sub>2</sub> hydrolyse spécifiquement le DHA concentré à la deuxième position *sn-2* des phospholipides membranaires (Strokin, Sergeeva et al. 2003; Rapoport 2008). Ainsi, le DHA est libéré des membranes. Une partie du DHA libérée sera utilisée par la 15-LOX dont l'expression génique est augmentée par la lumière intense et aboutira à la synthèse des docosanoïdes tels que la neuroprotectine D1 (NPD1). Une autre partie se lie au récepteur nucléaire PPAR- $\alpha$  dont l'expression génique est également stimulée par l'exposition à la lumière intense et qui est impliquée dans la modulation de l'inflammation (Calder 2007; Calder 2012) et du stress oxydant (Moran, Ding et al. 2014; Moran and Ma 2015). Le reste du DHA est pris en charge par l'acétyl CoA synthétase et orienté vers la voie  $\beta$ -oxydative ou re-estérifié en position *sn-2* au niveau des phospholipides. Alors que chez les animaux non supplémentés, l'expression génique d'iPLA<sub>2</sub> induite par l'exposition à la lumière intense est temporaire chez les animaux supplémentés cette expression est maintenue tout au long de l'exposition. Ces résultats associés aux données de la littérature suggèrent un appauvrissement du substrat (le DHA) de l'enzyme iPLA<sub>2</sub> chez les animaux non supplémentés mais pas chez les animaux supplémentés. En effet, il a été mis en évidence une diminution des taux de DHA suite à l'oxydation induite par la lumière (Wiegand, Giusto et al. 1983). Chez les animaux supplémentés, cette diminution serait contrecarrée par le renouvellement rapide de DHA à partir des stocks EPA/DPA dans les tissus rétiens, permettant ainsi de maintenir le taux du substrat pour iPLA<sub>2</sub> et donc les voies de signalisation en aval. Le DHA activera PPAR- $\alpha$  dont l'expression génique est fortement augmentée tout au long de l'exposition à la lumière chez les animaux supplémentés. PPAR-  $\alpha$  jouerait alors un rôle dans l'effet protecteur du supplément :

- en stimulant l'expression d'IL-4, il favorise la polarisation des lymphocytes T vers les lymphocytes T helper de type 2 (Th2) anti-inflammatoire (Attakpa, Hichami et al. 2009). Les Th2 participeraient à l'augmentation du taux d'IL-4



(Mosser 2003; Wang, Liang et al. 2014) observée tout au long de l'exposition à la lumière, orientant la polarisation des macrophages vers le type M2 anti-inflammatoire (Attakpa, Hichami et al. 2009).

- En activant le réticulum endoplasmique (Pyper, Viswakarma et al. 2010; Chan, Sun et al. 2013) ce qui se traduit par une augmentation de l'expression de la caspase-12 tout au long de l'exposition à la lumière intense. La caspase-12 aura une double action : d'une part, elle induit l'apoptose (Szegezdi, Fitzgerald et al. 2003) et d'autre part elle inhibe l'activation d'IL-1 $\beta$  et donc de l'inflammasome (Saleh, Mathison et al. 2006). L'activation de l'apoptose au cours de l'exposition est supportée par l'augmentation de la caspase-3 effectrice. L'expression de ces 2 caspases est beaucoup plus importante chez les animaux supplémentés que non supplémentés ce qui amène à penser que l'apoptose participe au mécanisme protecteur. En effet, l'apoptose est caractérisée par le maintien de l'intégrité membranaire ce qui permet d'éviter la dispersion des « toxines » (Peng, Martin et al. 2007; Green and Llambi 2015) dans l'environnement et donc de limiter l'étendue des lésions. En parallèle, l'inhibition de l'inflammasome limiterait la différenciation des lymphocytes T vers la forme Th1 pro-inflammatoire (Gris, Ye et al. 2010; Chen, Wang et al. 2011).

La polarisation des acteurs de l'inflammation, les lymphocytes T et les macrophages, vers un profil pro- ou anti-inflammatoire est orchestrée par l'expression de cytokines spécifiques. Par conséquent, afin d'évaluer la balance pro/anti inflammatoire, nous avons dosé ces différentes cytokines dans les rétines. La production des cytokines pro-inflammatoires et anti-inflammatoires permet de définir 4 phases d'expression :

- Une phase de dualité pro/anti-inflammatoire initiée par le stress lumineux : ainsi, au début de l'exposition, l'augmentation d'INF- $\gamma$  et IL-1 $\beta$  suggèrent une orientation de la polarisation des macrophages vers le phénotype M1 pro-inflammatoire (Kofler and Wiley 2011) alors que l'augmentation d'IL-4, suggère une polarisation vers le phénotype M2 anti-inflammatoire (Mosser 2003; Wang, Liang et al. 2014), chez les animaux supplémentés comme non supplémentés.
- Une phase préférentiellement pro-inflammatoire pour les animaux non supplémentés et anti-inflammatoire pour les animaux supplémentés : à la fin de l'exposition à la lumière chez les animaux non supplémentés, l'orientation de la polarisation des macrophages vers



les macrophages de type M1 pro-inflammatoire est supportée par l'augmentation des taux de cytokines INF- $\gamma$  et IL-12 alors que IL-4 retrouve un niveau basal. De plus, cette polarisation vers M1 semble être autoentretenu. En effet, l'augmentation d'IL-12 promeut la réponse des lymphocytes Th1 (Gordon and Taylor 2005). Ces Th1 en sécrétant d'IL-2 stimulent la croissance des monocytes et macrophages, et en sécrétant INF- $\gamma$  entretiennent la polarisation des macrophages vers le phénotype M1. A l'inverse, pour les animaux supplémentés, l'augmentation d'IL-4 (+ 50%) suggère la polarisation des macrophages vers le phénotype M2 anti-inflammatoire. Bien que le taux d'INF- $\gamma$  soit inférieur à celui des animaux non supplémentés, il reste supérieur au niveau basal suggérant la présence des macrophages de type M1 « à bas bruit ».

- Une phase de dualité pro/anti-inflammatoire initiée par le changement de conditions lumineuses : au début de la phase post-exposition à la lumière intense, chez les animaux non supplémentés, l'augmentation de l'INF- $\gamma$ , IL-12 et d'IL-4 suggèrent la polarisation des macrophages vers les phénotypes M1 et M2 en parallèle comme lors du début d'exposition. Il apparaît donc ici que le changement des conditions lumineuses module la réponse inflammatoire. Cette dualité pro/anti inflammatoire apparaît aussi chez les animaux supplémentés mais du fait des taux d'IL-4 plus important et d'INF $\gamma$  moins important, la réponse anti-inflammatoire semble privilégiée.

- Une phase préférentiellement pro-inflammatoire pour les animaux non supplémentés et anti-inflammatoire pour les animaux supplémentés : à 14 jours après la fin de l'exposition à la lumière intense, les taux de cytokines diminuent à des niveaux basaux sauf INF- $\gamma$  chez les animaux non supplémentés et VEGF chez les animaux supplémentés. Par conséquent, chez les animaux non supplémentés les macrophages de phénotype M1 pro-inflammatoire sont toujours présents alors que chez les animaux supplémentés ils paraissent avoir disparu.

Chez les animaux supplémentés, l'expression du facteur angiogénique, VEGF reste élevée 14 jours après la fin de l'exposition mais est également augmentée tout au long de l'exposition à la lumière. Le VEGF est généralement sécrété par les macrophages de type M2 dans les tissus endommagés ou enflammés manquant d'oxygène (hypoxie) et de nutriments (Bosco, Puppo et al. 2006; Fang, Hughes et al. 2009; Martinez, Helming et al. 2009; Imtiyaz and Simon 2010). L'hypoxie induite par une exposition à la lumière a été mise en évidence



par Tanito et al., qui montrent une perte progressive de la circulation choroïdienne sans perte totale de la vascularisation choroïdienne (Tanito, Kaidzu et al. 2007).

La supplémentation en stimulant la production de VEGF dès le début de l'exposition, réduit le phénomène d'hypoxie et favorise l'approvisionnement continu de la rétine en oxygène et nutriments, nécessaires à la survie cellulaire. La supplémentation permettrait ainsi une meilleure résistance pendant l'exposition et favoriserait la récupération en post-exposition.

Le recrutement des macrophages dans le site de l'inflammation est assuré par les chémokines. Il a été mis en évidence l'expression de MCP-1 par les cellules de Müller qui promeut l'homéostasie cellulaire à travers le recrutement et l'activation efficaces des cellules phagocytaires dans le site de dégénérescence rétinienne (Joly, Francke et al. 2009). Au niveau de la rétine, il a été mis en évidence dans un modèle drastique de dégénérescence rétinienne induite par la lumière que la réduction de l'expression de MCP-1 réduit le recrutement des macrophages au niveau de la rétine et la mort des photorécepteurs (Rutar, Natoli et al. 2012). Toutefois, deux études *in-vivo* récentes réalisées au niveau du cerveau montrent que la chémokine MCP-1 favorise la récupération des cellules en modifiant la polarité des macrophages vers le phénotype M2 (Kwon, Shin et al. 2015; Matsubara, Matsushita et al. 2015). Dans notre étude, l'augmentation du taux de MCP-1 pendant l'exposition à la lumière et un jour après la fin de l'exposition uniquement chez les rats supplémentés participerait à l'effet protecteur en recrutant les macrophages de type M2.

Au niveau de l'EPR, nous avons montré *in vitro* que la supplémentation avec des concentrations comprises entre 5,5  $\mu$ M et 44  $\mu$ M éq.DHA de complément alimentaire protège les cellules contre un stress induit par le peroxyde d'hydrogène. Toutefois, nous avons également observé qu'à 44  $\mu$ M éq.DHA, le complément induit 1/ une externalisation des phosphatidylsérines qui est un marqueur de l'apoptose, alors qu'il n'induit pas de mort cellulaire et 2/ une augmentation des isoprostanes qui sont des marqueurs du stress oxydant. Notre hypothèse est donc que le complément alimentaire induit une altération de la balance oxydant/antioxydant qui pour les concentrations les plus basses constitue un pré-conditionnement qui stimule les systèmes de défense et favorise la survie des cellules lors d'un stress ultérieur (Sen, Basu et al. 2011) mais qui devient toxique pour les concentrations trop élevées.



## Conclusions

Le complément alimentaire étudié contient de l'huile de poisson enrichie en EPA et DHA, des vitamines (C et E), des oligoéléments (zinc et cuivre), des caroténoïdes (lutéine et zéaxanthine) et du résvératrol. Ce complément donné protège la fonction et la structure dans un modèle expérimental *in-vivo* de dégénérescence rétinienne progressive induite par la lumière et dans un modèle *in-vitro* de mort des cellules d'épithélium pigmentaire rétinien induite par le peroxyde d'hydrogène. Il est toutefois été soulevé *in-vitro* la question de son éventuelle toxicité lors d'une utilisation à forte dose et à une durée plus longue.

L'augmentation des taux d'EPA et DPA, deux précurseurs du DHA, suite à la supplémentation participerait au mécanisme protecteur en favorisant le renouvellement continu du DHA dans les conditions de stress. Le DHA ainsi disponible activerait des voies de signalisation anti-inflammatoires, anti-oxydantes et de résistance aux agressions par l'intermédiaire du récepteur nucléaire PPAR- $\alpha$ .

## Perspectives

### Mécanismes protecteurs du complément alimentaire

#### ✓ Voies de signalisation

Nous avons émis l'hypothèse que l'expression protéique et/ou l'activité est corrélée à l'expression génique. Par conséquent afin de confirmer nos hypothèses nous devons évaluer l'expression protéique et l'activité des protéines. Nous nous focaliserons en particulier sur les gènes dont l'expression était différente entre les animaux supplémentés et non supplémentés, c'est-à-dire iPLA<sub>2</sub>, PPAR- $\alpha$ , Caspase-12.

Le protocole expérimental sera identique à celui utilisé pour l'expression génique. Des animaux supplémentés ou non seront exposés à la lumière et leurs rétines seront prélevées à différents temps pendant et après l'exposition à la lumière. L'expression protéique sera évaluée par Western Blot et l'activité enzymatique sera évaluée par l'utilisation de kits (ELISA Kit for Phospholipase A2, Calcium Independent (iPLA2), Ref SEA411Ra, USCN, France ; Arachidonate 15-Lipoxygenase (ALOX15) ELISA Kits, ABIN1559391, Caspase-12 Fluorometric Assay Kit, Biovision).



✓ Inflammation

*Cytokines* : Dans le cadre de cette thèse, l'étude des cytokines n'a été réalisée que sur un nombre limité d'échantillons (n=3). Par conséquent, des expérimentations identiques à celles déjà menées seront réalisées afin de **confirmer les résultats**.

*Macrophages* : Les cytokines influencent la modulation de la réponse inflammatoire en agissant sur la polarisation des cellules macrophages et lymphocytaires. Dans le cadre de cette thèse, nous avons émis l'hypothèse de la polarisation des macrophages vers le phénotype M2 anti-inflammatoire chez les animaux supplémentés et vers le phénotype M1 pro-inflammatoire chez les animaux supplémentés, à partir de la variation des taux de cytokines. Aussi, afin de confirmer notre hypothèse, il serait intéressant d'étudier la présence des macrophages d'une façon directe par marquage *in-situ* des récepteurs spécifiques.

Des animaux supplémentés ou non seront exposés à la lumière et les rétines seront prélevées à différents temps pendant (J1, J3, J7) et après l'exposition à la lumière (+J1, +J7 et +J14). Les macrophages seront détectés par leurs marqueurs spécifiques par immunohistochimie.

✓ Oxydation

Le complément alimentaire induit l'augmentation de l'expression de PPAR- $\alpha$  qui joue aussi un rôle antioxydant en augmentant l'expression des enzymes anti-oxydantes comme la SOD et la catalase. Nous déterminerons donc la **cinétique d'activité de ces enzymes anti-oxydantes** chez des animaux supplémentés ou non supplémentés pendant (à J1, J3 et J7) et après l'exposition à la lumière (+J1, +J7 et +J14). (Superoxide Dismutase Activity Colorimetric Assay Kit (ab65354), Catalase Specific Activity Assay Kit (ab118184)).

**Complément alimentaire et épithélium pigmentaire rétinien**

✓ Composition lipidique et phosphatidylsérines

*In-vitro*, nous avons mis en évidence que le complément alimentaire entraîne une modification de la composition lipidique et une externalisation des phosphatidylsérines. Nous allons donc évaluer *in-vivo*, l'effet du complément alimentaire sur la composition lipidique des cellules d'épithélium pigmentaire. En parallèle, nous évaluerons l'externalisation des phosphatidylsérines *in-vivo* au niveau d'EPR en utilisant des marquages immunofluorescent



annexin-V, phalloïdine et DAPI associés à la microscopie confocale. Les animaux seront supplémentés et non supplémentés pendant 7 jours avant d'être sacrifiés pour l'étude immunohistologique.

✓ Molécules sécrétées par EPR

Pour mieux comprendre l'implication de l'EPR dans la survie de la rétine, il serait intéressant d'étudier les molécules libérées par l'EPR traité ou non traité lors de l'induction d'un stress.

Pour cela, les cellules ARPE-19 seront cultivées dans des inserts sur des membranes coatées au collagène afin de permettre une meilleure polarisation. Elles seront non traitées ou traitées pendant une semaine avec différentes concentrations de complément avant d'être soumises à un stress induit par le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Ensuite, la libération de DHA, de neuroprostanes et des cytokines sera évaluée dans les 2 compartiments et dans les cellules.

**Complément alimentaire et autres modèles de dégénérescence rétinienne**

Le complément alimentaire protège la structure et la fonction rétinienne contre les lésions induites par la lumière, en augmentant la résistance des cellules au stress oxydant et à l'inflammation, deux mécanismes connus comme étant impliqués dans d'autres maladies dégénératives de la rétine. Par conséquent, nous envisageons d'évaluer le complément alimentaire dans des modèles de dégénérescence rétinienne héréditaire, et en particulier les rats transgéniques P23H et S334Ter. En effet, ces animaux sont porteurs de mutation sur le gène de la rhodopsine. Plus de 150 mutations sur le gène de la rhodopsine ont été identifiées à l'origine de rétinopathie pigmentaire (RP). Les mutations sur la rhodopsine représentent à elle seule 20-30 % des cas de RP autosomique dominante chez l'homme. De plus, l'intérêt d'utiliser ces 2 souches est que l'une (les rats P23H) est plus sensible à la lumière que l'autre (rats S334Ter).

Les animaux seront supplémentés ou non supplémentés. La dégénérescence rétinienne sera évaluée par 2 techniques complémentaires, l'électrorétinographie pour l'étude de la fonction et l'histologie pour l'étude de la structure. Nous y associerons la détermination de la composition lipidique puis dans un deuxième temps nous pourrions évaluer les marqueurs de l'inflammation et de l'oxydation.



## **4<sup>ème</sup> partie**

## **Annexes**



## Annexe

**Annexe 1.** Composition qualitative et quantitative en dose journalière des principaux compléments alimentaires à visée oculaire préconisés contre la DMLA

Complément alimentaire	Composition									
	Vitamines (mg)			Oligoéléments (mg)				Caroténoïdes (mg)	Oméga-3 (mg)	Autres (mg)
	B	C	E	Zn	Cu	Se	Cr			
<b>PRESERVISION</b>		180	30	15				L : 10, Z : 2	HP DHA : 360	
<b>TRIOPTEC</b>	B6 : 2 B12 : 1	120	10	15	2	50 µg		L : 10	HP DHA : 250 EPA : 50	Squalène : 20 CoQ : 20
<b>SUVEAL</b>		120	30	15			25 µg	L : 10 Z : 2	HP : 430 Dont DHA : 215	
<b>DUALRETINAL</b>		150	30	15	0,5	25 µg		L : 5 Z : 1	HP : 280 Dont DHA : 130	

**Zn** : zinc, **Cu** : cuivre, **Se** : sélénium, **Cr** : chrome, **L** : lutéine, **Z** : zéaxanthine, **HP** : huile de poisson



## **Annexe2.** Approches expérimentales

### **I. Modèles animaux**

#### ***A. Les Animaux***

Les expérimentations sont réalisées sur des rats albinos Wistar, avec pour chaque expérimentation un sexe ratio de 50:50. Les animaux sont élevés en lumière cyclique faible (<10 lux ; 12 heures de lumière/12 heures d'obscurité) (Photomètre S 350, United detector Technology, USA) et sont libres dans les cages où ils disposent de nourriture et d'eau à volonté.

#### ***B. Modèle de Photodégénérescence progressive***

Les rats albinos Wistar âgés de 8 semaines sont placés dans une cage et exposés à la lumière de deux tubes fluorescents placés sur la face supérieure de la cage. La lumière fluorescente utilisée fournit un éclairage de 400 lux dans le plan de la pupille du rat. Cette valeur est une moyenne de quatre mesures effectuées dans quatre directions différentes (Photomètre S 350, United detector Technology, USA). La température dans la salle est maintenue à  $25 \pm 1$  °C. Les animaux sont libres dans les cages où ils disposent de nourriture et d'eau à volonté. La durée d'exposition est de 7 jours.

### **II. Anesthésie**

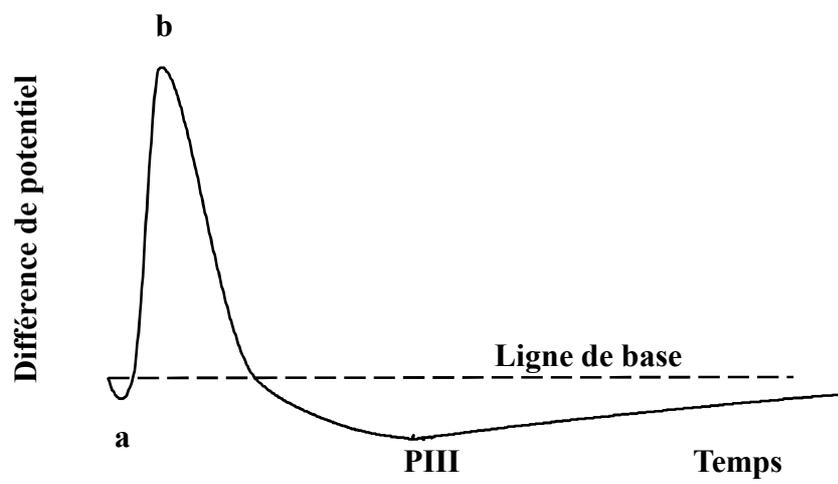
Les rats sont anesthésiés par injection intramusculaire d'un mélange de kétamine (Imalgène®) à raison de 150 mg/kg et de Xylazine® à 6 mg/kg.

### **III. Traitements**

Le complément alimentaire étudié contient des oligoéléments, des vitamines et de l'huile de poisson. Ce complément est fourni par le laboratoire Théa. Les rats âgés de 8 semaines reçoivent par gavage un tiers de la quantité du complément alimentaire et ceci quotidiennement pendant 10 jours.

### **IV. Electrophysiologie**

L'électrorétinographie est une technique permettant d'enregistrer la réponse électrophysiologique spécifique de la rétine en réponse à une stimulation lumineuse. Cette réponse est nommée électrorétinogramme (ERG). L'ERG est le reflet direct de la fonction rétinienne.

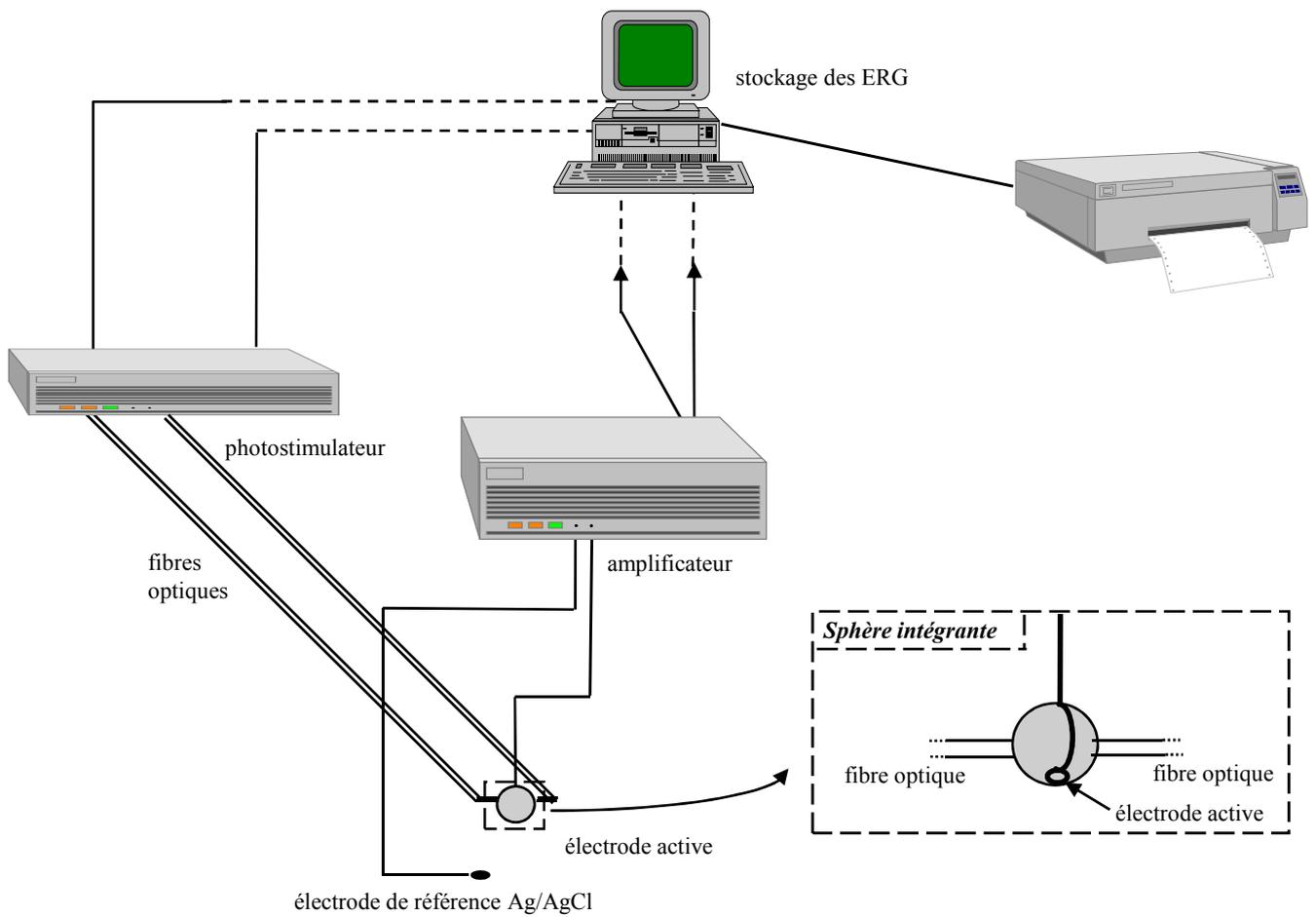


**Figure 51** : Réponse électrique de la rétine de rat à une stimulation lumineuse brève (10 ms).

### *A. Principe*

L'ERG est un signal global et complexe. Toutes les catégories de cellules de la rétine participent à sa genèse : les cellules photoréceptrices, les neurones transrétiniens, les cellules de Müller et les cellules de l'épithélium pigmentaire. Toutefois, les réponses électriques des neurones de la rétine interne sont variables et aléatoires ce qui fait que leur sommation ne participe pratiquement pas à l'ERG. En d'autres termes, on ne retrouve pas dans l'ERG une onde caractéristique d'un type de neurone. Par contre, ces cellules sont responsables de dépolarisations ou d'hyperpolarisations des cellules de Muller en faisant varier la concentration extracellulaire en ions  $K^+$ . Les composantes majeures de l'ERG qui sont celles sur lesquelles reposent la plupart des interprétations en exploration clinique, sont donc essentiellement générées par les cellules photoréceptrices les cellules de Muller et l'EPR.

L'ERG est caractérisé par plusieurs ondes (Doly 1994). L'**onde a** est le premier signal électrophysiologique généré par la rétine photostimulée. L'onde a est une onde négative et est le reflet direct de l'hyperpolarisation des segments externes des cellules photoréceptrices en réponse à la lumière. En effet, l'excitation des photorécepteurs par la lumière déclenche la cascade enzymatique qui conduit à la fermeture des canaux ioniques et donc à la chute de la perméabilité membranaire des segments externes aux ions  $Na^+$ . Dans ces conditions, les ions  $Na^+$  s'accumulent dans l'espace extracellulaire le long de la cellule provoquant une hyperpolarisation de la membrane plasmique des segments externes des photorécepteurs. Le courant ainsi créé correspond à une réduction du courant d'obscurité et varie avec le stimulus lumineux. Au niveau global de la rétine, cette première traduction électrique de la détection de photons conditionne l'apparition d'un pôle positif au niveau distal (segments externes des photorécepteurs) (Figure 51). L'amplitude de l'onde a et sa durée sont conditionnées par l'apparition de l'onde b. C'est la raison pour laquelle l'onde a n'apparaît que pour des intensités de stimulation suffisantes. Dans le cas contraire, elle est complètement masquée par l'onde b. L'onde a est très résistante aux altérations métaboliques de la rétine et c'est la dernière onde à disparaître, en fin de survie, sur organe isolé. Elle est également dénommée PIII rapide car elle correspond au tout début du processus PIII décrit par Granit (Granit, 1933). L'**onde b** (Figure 51) peut être générée aussi bien par le système des cônes que celui des bâtonnets. Bien que l'origine cellulaire de l'onde b et son mécanisme de genèse ne soient pas encore totalement compris, il est généralement accepté que cette composante de l'ERG est générée en grande partie par les cellules de Müller. La source de l'augmentation de  $K^+$  extracellulaire distale est la dépolarisation des cellules bipolaires qui libèrent le  $K^+$  suite à une



**Figure 52 :** Chaîne d'acquisition des ERG et schéma de la sphère intégrante.

stimulation lumineuse (Dick et Miller, 1985). Le courant de retour circulant dans l'espace extracellulaire à partir de la rétine proximale vers la rétine distale génère un potentiel transrétinien positif : l'onde b. L'onde b est la réponse gliale (des cellules de Müller) reflétant l'activité des cellules bipolaires dépolarisantes. L'onde b est donc le reflet de la transmission du signal des cellules photoreceptrices aux cellules bipolaires. Cette onde est très sensible à la qualité du métabolisme rétinien. L'**onde c** est la somme de deux composantes de latence et de durée similaires : une composante cornéenne négative générée par la rétine neurale et une composante positive générée par l'épithélium pigmentaire. L'amplitude de l'onde c reflète essentiellement la différence d'amplitude entre les deux composantes et si ces deux composantes sont égales, l'onde c est absente. L'onde c est absente chez certains animaux tels que le chien, le singe et le rat albinos élevés en lumière cyclique (Organisciak et al., 1991 ; Weidner, 1976).

Il existe d'autres ondes telles que l'**onde d**, caractéristique de l'ERG photopique, ou l'**onde e** qui apparaît après l'arrêt de la stimulation lumineuse. Les ondes d et e n'apparaissent pas distinctement dans un tracé standard et c'est la raison pour laquelle elles ne sont pas utilisées pour caractériser l'ERG.

Dans cette étude, l'ERG est recueilli sur animal entier, *in-vivo*. Cette technique est non invasive et permet le suivi sur un même animal pendant plusieurs semaines.

## ***B. Matériels***

Le matériel utilisé est constitué d'un système de stimulation lumineuse et d'un système de recueil (Figure 52).

### **1. Stimulation lumineuse**

Le stimulus lumineux est généré par un photostimulateur Type PS 33 (Grass, USA). Le flash lumineux, acheminé par une fibre optique à une sphère intégrante (Labsphère, North Sutton) éclaire de manière uniforme, la totalité de la rétine de l'animal.

### **2. Recueil du signal**

Le recueil d'un ERG nécessite deux électrodes : une électrode de mesure et une électrode de référence. L'**électrode de mesure** est constituée d'un fil d'argent (AgCl) en forme d'anneau et est fixée à la sphère intégrante. L'**électrode de référence** est une pastille de 4 mm de diamètre également en argent/chlorure d'argent, maintenue sur la langue de l'animal. Une électrode de terre, sous forme de grille de cuivre reliée à la terre, est par ailleurs placée sous l'animal. Les trois électrodes sont reliées à un amplificateur différentiel (Model



1700, AM Systems, Paris). Le gain est réglé sur 1000 et la bande passante de 0,1 à 1 kHz (la bande passante pour l'enregistrement d'un ERG doit englober les fréquences comprises entre 0,3 et 300 Hz) (Marmor et Zrenner, 1993). Le signal ainsi amplifié, est envoyé vers un système informatique permettant de convertir le signal analogique ERG en valeurs numériques

### ***C. Protocole***

#### **1. Préparation de l'animal**

Avant tout recueil d'un ERG, l'animal est adapté une nuit à l'obscurité. Sa mise en place se fait en lumière rouge inactinique ( $> 650$  nm). Le rat est anesthésié, puis positionné dans une boîte de contention. Les pupilles sont dilatées par une goutte de Tropicamide<sup>®</sup> (Novartis Pharma). L'électrode de référence est placée sur la langue et maintenue ainsi par la gueule fermée du rat. L'œil est exorbité et l'électrode active, est posée sur la cornée. Une fois le dispositif mis en place, la lumière rouge est éteinte.

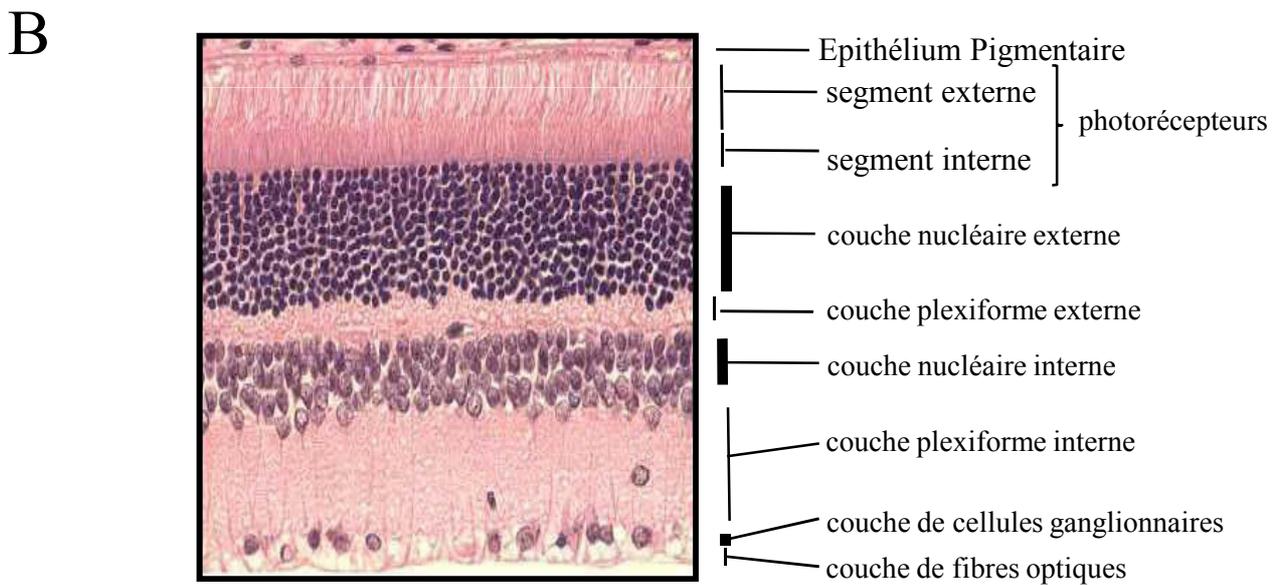
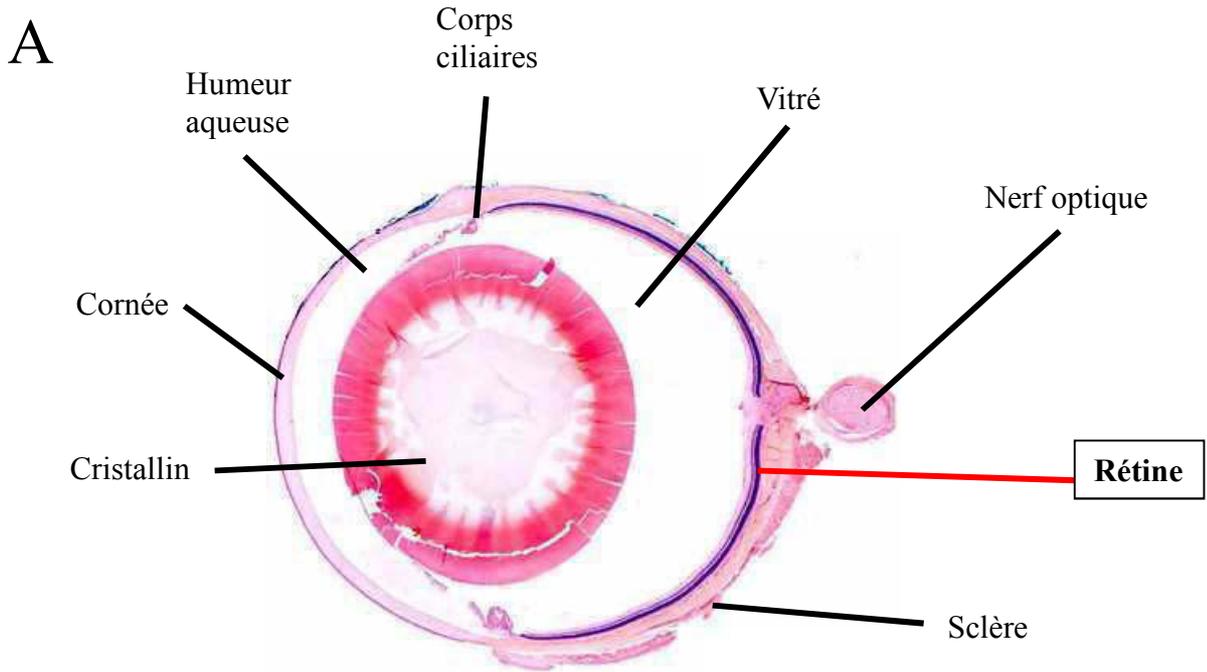
#### **2. Stimulation et enregistrement**

Le déclenchement du flash est piloté par un ordinateur se trouvant dans la pièce voisine de celle où est installé l'animal. L'intensité des flashes est modulée par des filtres neutres de densité variable placés entre la source et la fibre. L'ERG est enregistré pour 11 flashes (10  $\mu$ s) d'intensité croissante commençant en dessous du seuil de réponse. L'intervalle entre deux flashes est de 30s.

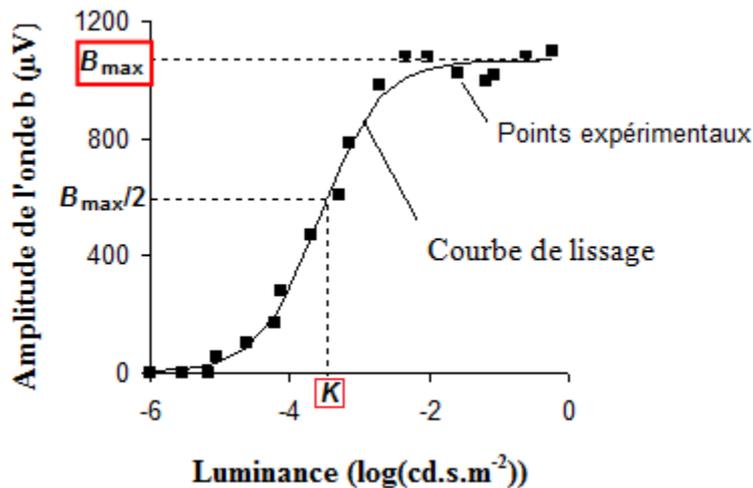
### ***D. Exploitation des ERGs***

Le graphique de la variation de l'amplitude de l'onde b en fonction de la luminance de la sphère intégrante est appelé **courbe de sensibilité rétinienne**. Les données expérimentales de l'amplitude de l'onde b sont lissées à l'aide du logiciel Origin 6 (Microcal Software, USA) selon une fonction analytique. L'intérêt d'une telle fonction est que, d'une part, elle représente bien les données expérimentales et, d'autre part, les trois paramètres ont une signification fonctionnelle simple (Ranchon et al., 1998).  $B_{\max}$  est l'amplitude de saturation.  $K$  est la luminance qui induit l'amplitude  $B_{\max}/2$ , et  $n$  représente la pente de la courbe dans sa partie ascendante.

L'amplitude de l'onde a a été étudiée de la même façon que l'amplitude de l'onde b.



**Figure 53** : Représentation schématique d'un œil de rat (A) et coupe histologique de sa rétine après coloration à l'hématoxyline-érythrosine (microscopie optique) (B).



### Taux de régénération de la rhodopsine

Pour évaluer la vitesse de régénération de la rhodopsine on a étudié l'onde a. L'animal qui est adapté à l'obscurité ne reçoit qu'un seul flash de 2,88 (cd.sm<sup>-2</sup>) puis il est exposé à une lumière fixe pendant 2 min afin de blanchir les photorécepteurs. Immédiatement après le blanchiment et toutes les 10 min pendant 90 minutes, un seul flash de 2,88 (cd.s.m<sup>-2</sup>) a été présenté. La réponse de l'onde a après le blanchiment est normalisée par rapport à la réponse initiale adaptée à l'obscurité pour chaque rat.

### V. Histologie

L'étude morphologique a probablement été la technique la plus utilisée pour étudier les atteintes rétiniennes. Elle est basée sur la répartition anatomique en couches des cellules dans la rétine (Figure 53). Elle permet de localiser les lésions rétiniennes.

#### A. Prélèvement des yeux et fixation

Les animaux sont anesthésiés, puis décérébrés. L'œil est exorbité et son pôle supérieur est marqué à l'aide d'un marqueur tissulaire de couleur afin de conserver le repérage de l'orientation au cours des différentes étapes. Il est ensuite excisé après section du nerf optique et nettoyé des tissus musculaires et conjonctifs. L'œil est alors placé dans du fixateur (20% d'isopropanol ; 2% d'acide trichloracétique ; 4% de paraformaldéhyde ; 2% de chlorure de zinc) pendant une nuit à 4°C.

#### B. Inclusion en paraffine

Les échantillons sont déshydratés par des bains successifs d'alcool (30 min alcool 70%, 1 heure alcool 95%, 30 min alcool 95%, 2 x 1 heure alcool 100%), de xylène (2 x 1 heure) et



de paraffine maintenue liquide dans une étuve à 54°C (2 x 30 min) avant d'être inclus dans la paraffine (bloc) en prenant soin de l'orientation.

### **C. Coupes**

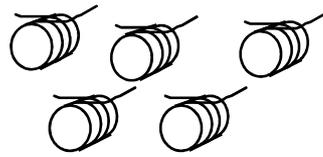
A partir des blocs, des coupes transversales de 5 µm passant par le pôle supérieur, le nerf optique et le pôle inférieur, sont effectuées et étalées sur des lames silanisées (5 min acétone 100%, 5 min silane 1%, 5 min acétone 100%). Les lames blanches ainsi obtenues sont séchées à l'étuve à 37 °C pendant 24 heures. Elles peuvent alors être conservées à température ambiante.

### **D. Coloration**

Afin d'améliorer l'adhésion lames-coupes, les lames blanches sont placées 30 min dans une étuve à 54°C. La paraffine est ensuite dissoute dans des bains de xylène 100% (3x15 min). Les échantillons sont alors rehydratés (5 min alcool 100%, 5 min alcool 95%, 5 min alcool 70 %, 2 – 5 min eau courante). Les coupes peuvent alors être colorées : 1 min dans l'hématoxyline pour colorer les noyaux, 2 – 5 min dans l'eau courante pour rincer, 30 sec dans le carbonate de lithium saturé dans l'eau, afin de permettre la fixation de l'hématoxyline, 2 – 5 min dans l'eau courante pour rincer, 1 min dans l'érythrosine (4g/L d'eau distillée), pour colorer les autres structures, 2 – 5 min dans l'eau courante pour rincer, 30 s dans l'alcool 100% pour déshydrater avant un bain dans le safran de 5-10 s (solution à 1% dans de l'alcool absolu) pour fixer l'érythrosine. Les lames sont enfin rincées (30 s alcool 70%, 2x30s alcool 100% et 2x30s xylène 100%). Une lamelle est collée sur la coupe grâce à une résine synthétique (Mounting Medium, Surgipath, Bretton, UK) et la lame est séchée à température ambiante.

### **E. Observation**

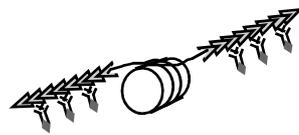
Les mesures de l'épaisseur de la couche nucléaire externe (CNE) de la rétine sont réalisées sous microscopes tous les 0,36 mm à partir du nerf optique jusqu'à l'ora serata supérieure et jusqu'à l'ora serata inférieure. La CNE étant constituée des noyaux des cellules photoréceptrices, la mesure de son épaisseur est une évaluation du nombre de cellules photoréceptrices présentent dans la rétine.



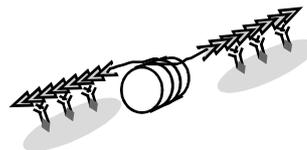
Fragmentation de l'ADN



Fixation des nucléotides-digoxigénine



Liaison des anticorps Antidigoxigénine marqués à la peroxydase



Coloration avec le substrat chromogénique

**Figure 54:** Principe de la détection des cellules apoptotiques par le kit ApopTag®.

## **VI. Détection des cellules Apoptotiques**

### **A. Principe**

L'apoptose aboutit à une fragmentation de l'ADN entraînant la libération d'une multitude d'extrémités 3'-OH qui sont les cibles du marquage du Kit ApopTag utilisé (Abcys, France). La "Terminal deoxynucleotidyl Transférase" (TdT) catalyse l'addition des résidus nucléotidiques marqués à la digoxigénine aux extrémités 3'OH de l'ADN. L'utilisation d'un anticorps anti-digoxigénine conjugué à la peroxydase, permet de localiser ces résidus. En effet, par addition d'un substrat chromogène, la 3,3 diaminobenzidine (DAB), et en présence de peroxyde d'hydrogène, la peroxydase donne une coloration marron (Figure 54).

### **B. Préparation des coupes en paraffine**

Les protocoles de prélèvement des globes, d'inclusion dans la paraffine, et de coupe afin d'obtenir des lames blanches sont identiques à ceux décrits pour l'histologie. Par contre, la fixation de l'échantillon est différente. L'œil prélevé est placé dans du paraformaldéhyde 4% (dans du PBS1X) pendant quatre heures à 4°C, puis dans l'alcool 70% pendant toute une nuit.

### **C. Marquage des noyaux apoptotiques**

Les lames blanches sont déparaffinées dans des bains de xylène et d'alcool. Les cellules sont perméabilisées par un traitement à la protéinase K (20 µg/ml) pendant 15 minutes à température ambiante afin de rendre le noyau accessible. Les peroxydases endogènes sont inhibées par le peroxyde d'hydrogène (3 %). Après équilibration du milieu pendant 10 secondes (Tampon d'équilibration du Kit; 10 µl/coupe), l'enzyme TdT (10µl/coupe) est déposée sur les coupes. La réaction est stoppée (Tampon Stop du kit). L'anticorps anti-digoxigénine marqué à la peroxydase (10µl/coupe) est ajouté. Après lavage, afin de supprimer l'anticorps en excès non fixé, la DAB est ajouté pendant quelques minutes. La réaction est stoppée dans l'eau.

Après montage des lames, le comptage des noyaux apoptotiques (marqués en marron-noir) se fait sous microscope. Dans le modèle de photodégénérescence le nombre de noyaux apoptotiques est compté sur une section de rétine de 0,25 mm, centrée à 1,2 mm du nerf optique dans le pôle supérieur.



## **VII. Biochimie**

### **A. Prélèvement des rétines**

Après anesthésie les rats sont décérébrés. Une pince est placée sous l'œil, la cornée est incisée, et par pression, la rétine est extraite. Elle est alors placée dans un tube eppendorf® et congelée dans l'azote liquide puis conservée à -80°C.

### **B. Dosage protéique**

Les deux rétines d'un rat sont broyées au potter® dans 200 µl dans du PBS 1X contenant un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Complete EDTA free, Roche). L'homogénat est ensuite centrifugé (10 000g) pendant 20 min. Un aliquot est dilué au dixième puis au vingtième dans du NaCl 0,9% (volume final de 50 µl) et incubé 30 minute à 37°C avec 0,95 ml de solution A (BCA Reactif A, Pierce) et 50 ml de la solution B (BCA réactif B, Pierce). Une gamme étalon est réalisée en parallèle à partir d'une solution d'albumine à 1 mg/ml. Après incubation, la lecture de la densité optique (DO) est effectuée à 582 nm. Les échantillons sont aliquotés à raison de 20 µl puis stockés à -80°C.

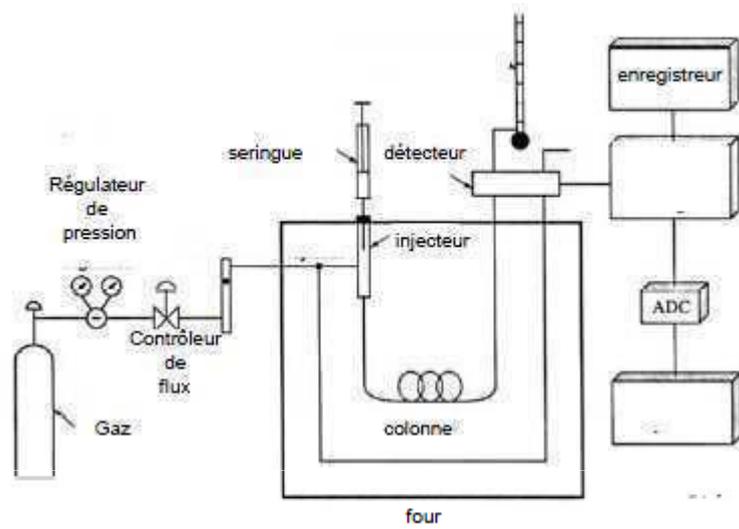
### **C. Détermination du profil en acides gras dans la rétine et le plasma par chromatographie en phase gazeuse**

Dans notre étude, on a utilisé la chromatographie en phase gazeuse (CPG) afin de déterminer le profil en acides gras in vivo dans la rétine et le plasma des animaux supplémentés ou non avec le complément alimentaire et in vitro dans les cellules d'épithélium pigmentaire rétinien ARPE-19.

#### **1. Principe**

La première étape consiste à extraire les lipides totaux par un mélange chloroforme/méthanol (C/M) (2/1 V/V) contenant du butyle hydroxytoluène (BHT) selon la méthode de Folch et coll. Le méthanol permet la coupure des liaisons lipides-protéines et le chloroforme extrait les lipides. Le BHT est ajouté afin de prévenir l'oxydation des lipides et leur dégradation en cours de l'expérience. Les lipides sont lavés avec une solution de Chlorure de Sodium à raison de 0,2 fois le volume de C/M total.

La deuxième étape s'agit d'une transestérification des lipides par action du méthanol en présence d'un catalyseur, le trifluorure de bore (BF<sub>3</sub>), et sous l'action de la chaleur qui aboutit à la formation d'esters méthyliques.



**Figure 55.** Illustration schématique du chromatographe gazeux

Enfin, les dérivés d'acides gras sous forme d'esters méthyliques sont analysés par chromatographie phase gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme (CPG-FID).

## **2. Matériels**

L'appareil comprend schématiquement 5 parties (Figure 55) : une source de gaz, une chambre d'injection, un four, une colonne et un détecteur couplé à un enregistreur

L'hélium a été utilisé comme gaz vecteur, avec une pression constante (264 kPa) et un flux de 30 ml / min. Un injecteur à température programmée en mode diviseur a été utilisé. La colonne utilisée est une colonne capillaire constituée d'un support poreux artificiels en verre de silice (CP-Sil 88) et d'une phase stationnaire liquide apolaire 100% cyanopropyl-polysiloxane. Elle est de 100 m de longueur, 0,25 mm de diamètre et 0,20  $\mu\text{m}$  d'épaisseur (Varian SA, Les Ulis, France).

Un échantillon standard contenant un mélange de 36 acides gras en quantités connues est injecté régulièrement en CPG-FID pour vérifier l'efficacité de 1- la séparation des acides gras par la colonne chromatographique, 2- définir le temps de rétention de chacun des AG et 3- la réponse du détecteur FID et appliquer le cas échéant un coefficient de correction. Cette injection est réalisée avant toute série d'analyse d'échantillons et à la fin de chacune de ces séries.

## **3. Protocole**

### **3.1. Rétine**

#### **$\alpha$ . Extraction des lipides totaux**

Les deux rétines d'un même rat ont été broyées avec 3 ml de C/M dans un potter parfaitement propre (faire des allers-retours 4 à 5 fois). Le broyat a été ensuite transvasé dans un tube de 30 ml. Le pilulier et le potter ont été rincés avec les 7 ml restant qui ont été ensuite ajoutés aux 3ml de broyat. Le potter est nettoyé au C/M entre chaque échantillon broyé. Puis dans le tube de 30 ml, 2 ml de NaCl (0,73%) a été rajouté. Les échantillons ont été homogénéisés au vortex pendant 1min, centrifugés à 3000trs/min pendant 3min. Enfin, à l'aide d'une pipette Pasteur la phase inférieure (Chloroforme) contenant les lipides totaux a été récupérée dans un pilulier et a été évaporée à sec sous azote.

#### **$\beta$ . Méthylation des lipides par le BF<sub>3</sub>/Méthanol à chaud**

Les lipides ont été repris dans 300  $\mu\text{l}$  de toluène et 200  $\mu\text{l}$  de méthanol anhydre. Puis 50  $\mu\text{l}$  de méthanolate de sodium (25%) et 700  $\mu\text{l}$  de BF<sub>3</sub> /méthanol à 14% sous courant d'azote



ont été ajoutés. Le mélange a été laissé 24h à 95°C et ensuite a été laissé refroidir à température ambiante. La réaction a été stoppée en rajoutant 5 ml d'une solution saturée de NaHCO<sub>3</sub>. Après addition de 5 ml d'hexane, les échantillons ont été vortexés, centrifugés 3 minutes à 3000 tours/min à 4°C. La phase supérieure hexanique contenant les esters méthyliques a été prélevée et séchée sous azote puis pesée à poids constant. Les esters méthyliques sont ensuite dilués avec de l'hexane en fonction de la quantité de lipides de départ et ont été stockés à -20°C.

### **γ. Analyse**

L'échantillon à analyser a été introduit par l'injecteur qui provoque sa volatilisation instantanée. Il est alors transporté à travers la colonne par le gaz vecteur (la phase mobile). La colonne est composée d'un support inerte imprégné d'un liquide non volatil stationnaire (phase stationnaire) qui a une affinité différente pour les différents acides gras permettant ainsi leur séparation. Le détecteur FID placé à la sortie de la colonne détecte les acides gras au fur et à mesure de leur élution.

L'identité des esters méthyliques d'acides gras dans les échantillons est établie en comparant leur temps de rétention relatif à ceux des esters méthyliques d'acides gras standards. L'aire sous la courbe de chaque acide gras identifié est calculée et est exprimé en pourcentage relatif.

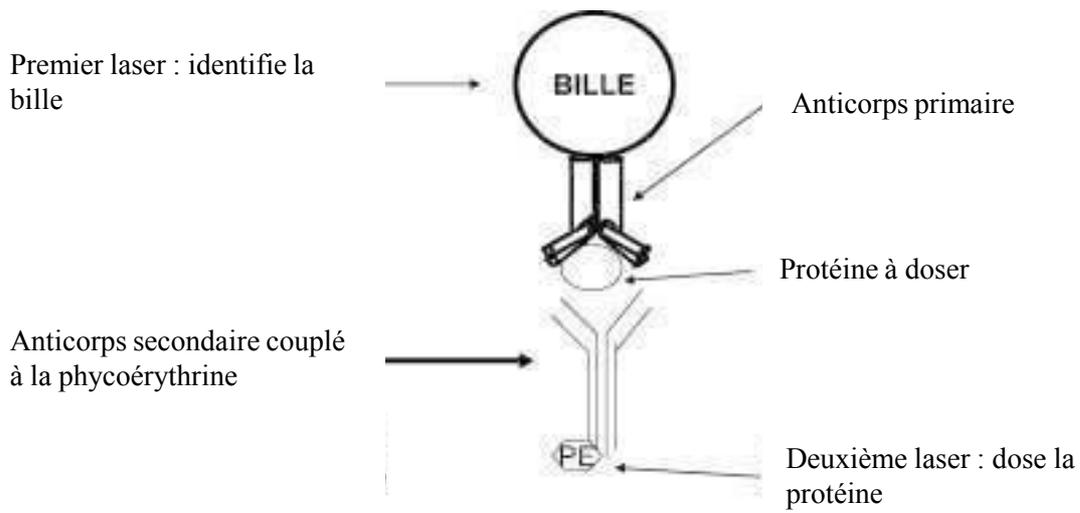
## **2.1. Plasma**

Le protocole d'extraction des lipides totaux et de méthylation des acides gras sont identiques à ceux utilisés pour les rétines. A la fin de la méthylation, les échantillons sont passés sur une colonne Chromadond Florisil conditionnés avec 5ml d'hexane. Ils sont élués avec 5 ml d'un mélange d'hexane et d'éther éthylique (95/5 - v/v). Après évaporation sous azote au bain-marie à 45°C, les résidus sont repris par 200 µl d'héptane et 1 µl est injecté dans le chromatographe gaz.

### **1. Mesure de la quantité de la Rhodopsine**

La mesure de la quantité de la rhodopsine dans la rétine des rats supplémentés ou non par le complément alimentaire a été réalisée par spectrophotométrie.

Les rats anesthésiés sont décérébrés à l'obscurité. La rétine prélevée est alors placée dans un tube eppendorf<sup>®</sup> enveloppé par un papier aluminium, congelée dans l'azote liquide puis conservée à -80°C.



•Figure 56. Illustration schématique des particules excitées par les lasers

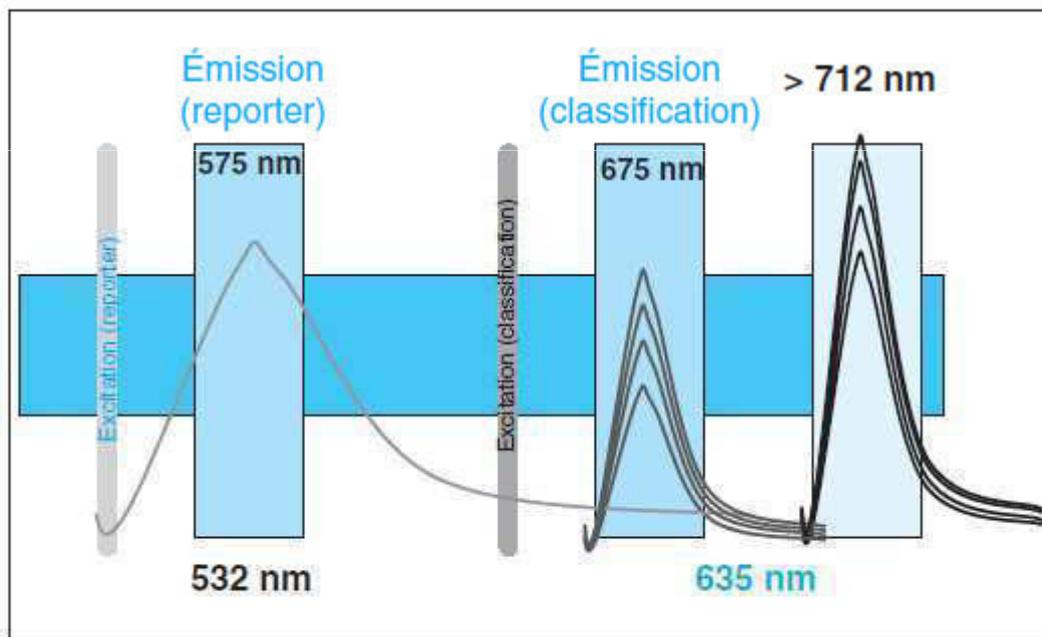


Figure 57. Spectres d'excitation et d'émission (d'après Luminex corp).

Sous la lumière rouge inactinique, une rétine d'un rat est broyée au potter® dans 450 µl de solution d'homogénéisation contenant 10 mM TrisHCl (pH 7,4), NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, 2 % (p / v) octylglucoside, et 50 mM d'hydroxylamine. Les homogénats ont été centrifugés à 16 000 g. Le surnageant récupéré a été scanné entre 300 à 620 nm dans un spectrophotomètre (Thermo SPECTRONIC Rochester NY USA). Les échantillons ont été puis blanchis pendant 15 minutes et à nouveau scannés dans le spectrophotomètre. La différence entre les spectres d'absorption à 500 nm entre les échantillons pré- et post- blanchis a été utilisée pour déterminer le contenu en rhodopsine en utilisant un coefficient d'extinction molaire de 42 000 M<sup>-1</sup>. Les données sont présentées en tant que teneur en rhodopsine par une rétine.

## **2. Dosage des cytokines par Luminex**

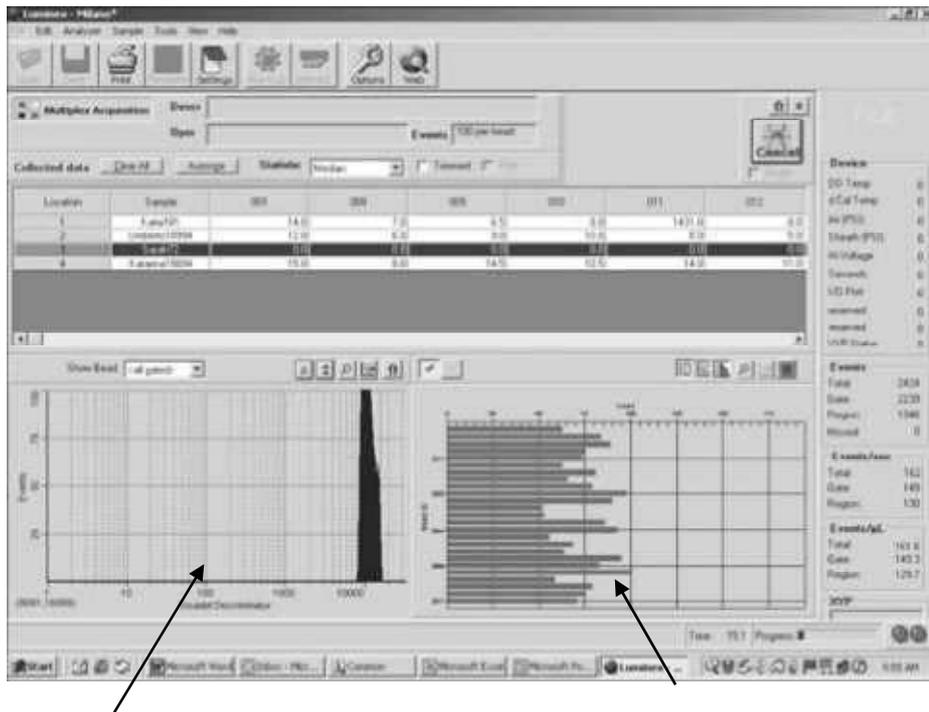
### **2.1. Principe et description du système**

La technologie Luminex100 microsphere system® (Luminex Corporation, Austin, USA) est une nouvelle technologie, qui allie les compétences de la technique de cytométrie en flux à deux lasers (Luminex100 Analyzer™, Luminex Corporation, Austin, USA) et une utilisation de microsphères ou microbilles en polystyrène. Il s'agit d'un système multianalytique puissant puisque jusqu'à 100 microbilles différentes peuvent être incluses dans un même puits de la plaque d'analyse, ce qui laisse augurer de grandes capacités d'analyses.

*Les microsphères :* Il s'agit de billes de polystyrène de 5,6 µm de diamètre. Lors de leur fabrication, deux fluorochromes sont incorporés à l'intérieur des billes. Pour chaque bille, il existe un ratio précis de la quantité des deux fluorochromes incorporés. Les billes, mélangées au début de l'analyse, sont entraînées dans la veine liquide, séparées et identifiées pendant la phase d'acquisition des données. À la sortie de la veine liquide, les billes excitées par le laser rouge à 633 nm vont réémettre une fluorescence rouge (675 nm) et infrarouge (> 712 nm) (Figure 56 et Figure 57). Chaque bille réémet d'une façon différente et sera identifiée par les intensités des deux fluorescences rouge et infrarouge enregistrées par un capteur à la sortie du flux.

Chaque bille a ainsi son propre code couleur d'identification, et plusieurs billes différentes (jusqu'à 100 actuellement) peuvent être mélangées dans un seul tube ce qui multiplie considérablement les possibilités d'analyses.

*Le cytomètre :* Il comporte un laser rouge à diode (633 nm) et un laser vert (532 nm), des photo-diodes pour détecter la fluorescence des deux fluorochromes enfermées dans les



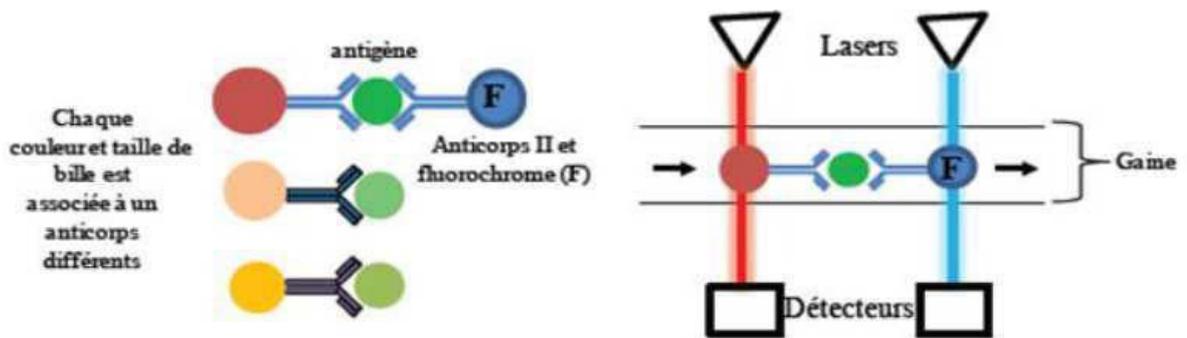
Pic d'acquisition des données

Comptage des billes lors de l'acquisition

**Figure 58.** Logiciel d'acquisition des données (d'après Luminex corp).

microsphères, un photomultiplicateur pour détecter la fluorescence émise par la phycoérythrine.

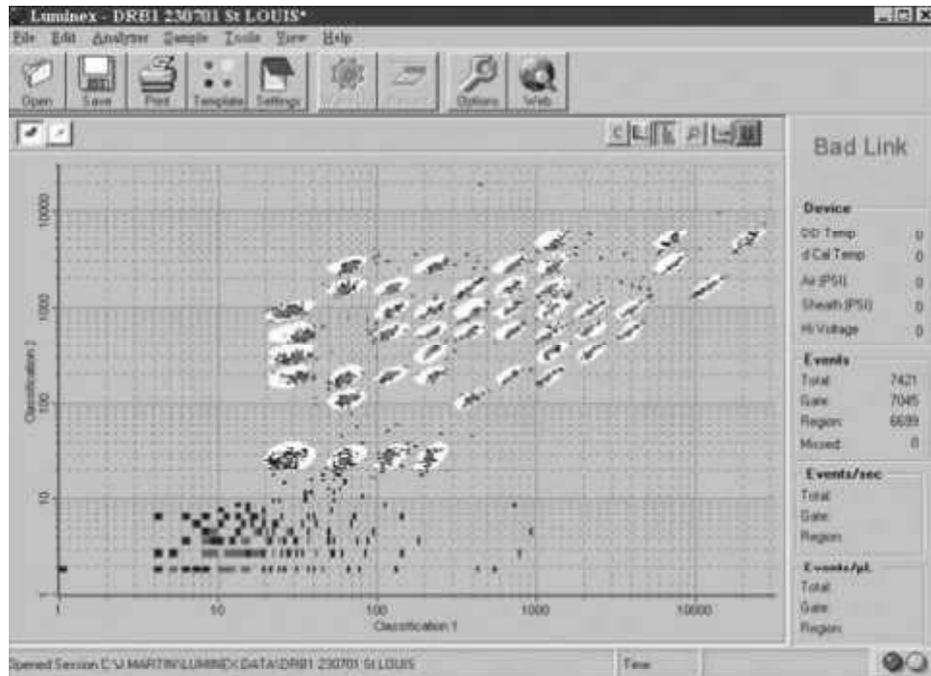
- Le laser rouge excite les molécules à l'intérieur des microsphères à 635 nm et permet ainsi leur identification par une double classification d'après l'intensité des signaux émis à deux longueurs d'ondes : classification 1 et 2.



- Le laser vert, qui excite le fluorochrome qui est couplé à une molécule reporter. Cette molécule reporter (Antiimmunoglobuline ou produit d'amplification) permet de détecter l'interaction antigène-anticorps ou sonde-amplicon se produisant à la surface de la bille, après addition d'un conjugué marqué avec un fluorochrome émettant dans le vert. Généralement, il s'agit de la phycoérythrine qui, excitée à 532 nm, réémet à 575 nm. La fluorescence émise témoigne alors de la réaction en surface, et détermine la positivité de la réaction en fonction d'un seuil de fluorescence propre à chaque bille. La fluorescence émise par le fluorochrome reporter est détectée par un photomultiplicateur à la sortie de la veine liquide.

*Le lecteur de microplaques :* Le cytomètre est équipé d'un lecteur de microplaques 96 puits (type Elisa) piloté par un ordinateur. Une aiguille descend dans chaque puits, aspire le mélange réactionnel dans la veine liquide.

*Le logiciel d'acquisition des données transmises par le Luminex :* Celui-ci permet de suivre les microsphères (Figure 58). La fonction *doublet-discriminator* liée au laser rouge permet d'éliminer les doublets de microsphères. Ce fenêtrage (*gate*) est défini par le fabricant et fourni avec le lot de microsphères utilisées. De plus, chaque catégorie de microsphères est suivie en temps réel : un minimum de 100 billes par catégorie est recherché pour valider la réaction. L'acquisition des données s'arrête dès que la dernière catégorie de billes lues par le laser atteint 100 billes.



**Figure 59.** Classification des nuages de billes selon les fluorescences rouge et infrarouge émises (d'après Luminex corp).

*La classification des microsphères* : Les nuages de microsphères correspondent aux différentes catégories. Leur positionnement correspond à leur code couleur (Figure 59). Lors de l'acquisition, il est possible de suivre leur apparition mais ce masque étant pré-établi pour chaque lot de microsphères, il n'est pas modifiable par l'utilisateur. Un mauvais positionnement des microsphères par rapport au masque peut être observé en cas de défaut de marquage interne des microsphères ou de mauvais réglage de l'appareil (rôle de la température).

## **2.2. Protocole**

### **2.2.1. Prélèvements des rétines**

Après anesthésie les rats sont décérébrés. Une pince est placée sous l'œil, la cornée est incisée, et par pression, la rétine est extraite. Elle est alors placée dans un tube eppendorf<sup>®</sup> et congelée dans l'azote liquide puis conservée à -80°C.

### **2.2.2. Extraction des protéines**

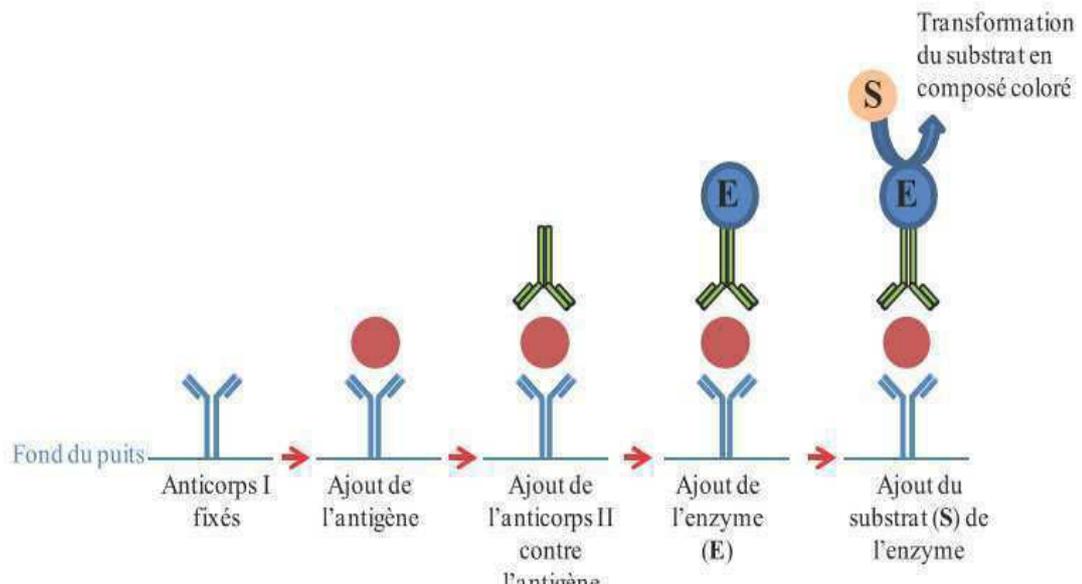
Les deux rétines d'un rat sont broyées au potter<sup>®</sup> dans 200 de PBS contenant un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Complete EDTA free, Roche). Ensuite, l'homogénat est ensuite centrifugé (10 000g) pendant 20 min et le surnageant est ensuite conservée à -80°C.

### **2.2.3. Mesure de la quantité de cytokines dans les rétines**

Le dosage des cytokines (IL-1  $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IL-17, IL-18, MCP-1, TNF- $\alpha$ , IFN-gamma, VEGF) dans les rétines des rats a été effectué à l'aide du *milliplex map kit* (Millipore, réf. RECYTMAG-65K), selon les instructions du fabricant. Les incubations ont été réalisées à température ambiante et sous agitation, sauf contre-indication. Les solutions contenant les billes fluorescentes couplées aux anticorps pour les différentes cytokines ont été vortexées 2 minutes chacune, puis mélangées (60  $\mu$ L de chaque solution) et à nouveau vortexées. La solution standard de cytokine/chémokine fourni par le fournisseur est reconstituée avec 250  $\mu$ L d'eau déionisée et vortexée 10 secondes. La gamme étalon a été préparée à partir ce standard fourni dans le kit par dilutions successives au 1/4. La plaque 96 puits possédant des filtres au fond des puits, a été hydratée avec 200 $\mu$ L de la solution de lavage sous agitation pendant 10 minutes. La solution de lavage a été retirée par aspiration à travers les filtres, l'excès a été retiré à l'aide d'un papier absorbant, avant le dépôt (selon le plan de plaque) de 25 $\mu$ L de chaque point de gamme (solution de dosage pour le blanc, puis la gamme en ordre croissant de concentration), 25  $\mu$ L des contrôles qualité, 25  $\mu$ L de solution de dosage dans les puits d'échantillons. Afin d'avoir un même volume dans chacun des puits,



25 $\mu$ L de solution de PBS ont été ajoutés dans les puits de blanc, de gamme et de contrôle et 25 $\mu$ L de la solution de lavage dans les puits des échantillons. Le mélange de billes préalablement préparé a été vortexé pour procéder au dépôt de 25 $\mu$ L dans tous les puits. Le dispositif a été mis à incuber 2 heures à température ambiante. Ensuite, la totalité des puits a été lavée avec la solution de lavage (2x200 $\mu$ L/puits) et traitée avec les anticorps de détection couplés à la biotine (25 $\mu$ l, 60 minutes) puis à la streptavidine-phycoerythrine (25 $\mu$ L, 30 minutes) sans lavages intermédiaires. Les puits ont été vidés et lavés avec la solution de lavage (2x200 $\mu$ L/puits). Enfin, les billes ont été reprises dans le liquide de gaine (125 $\mu$ L/puits, 5 minutes) avant la lecture, réalisée à l'aide d'un lecteur de plaque *Bio-Plex 200 system* (Biorad, réf. 171-000201).



## VIII. Biologie moléculaire

### A. Extraction et contrôle qualité des ARN totaux

Les ARN totaux ont été extraits des rétines par la méthode TRIZOL® (Ambion). Brièvement, les rétines d'un même animal sont broyées et incubées 5 minutes à température ambiante dans un volume de TRIZOL (150 $\mu$ l). Une fois les liaisons nucléopeptidiques rompus, un volume de BCP (BromoChloroPhénol) est ajouté (15 $\mu$ l) afin de solubiliser les acides nucléiques. Après incubation (15 minutes - température ambiante) et centrifugation (12000g, 15 minutes à 4°C), nous obtenons 3 phases différentes (de haut en bas) : 1) une phase aqueuse, contenant les ARN totaux, 2) un anneau d'interphase blanc, contenant l'ADN et 3) une phase phénolique rouge, contenant l'ensemble des débris cellulaires. Après avoir



recupéré la phase aqueuse, les ARN totaux sont précipités avec de (75 µl). Après vortex et centrifugation (12000g, 8 minutes à 4°C), les culots sont nettoyés avec de l'éthanol 75% (500 µl). Une fois les culots séchés, les ARN totaux sont resuspendus dans 50µL d'eau « Nucleases Free ». La concentration ARN totaux extraits (ng/µL) est déterminée à l'aide d'un Nanodrop ND1000 (Thermofisher). Les rapports d'absorbance 260/280 et 230/260 permettant de déterminer respectivement la contamination de l'échantillon par des protéines et par des sels/solvants sont évalués. Des rapports proches de 2 sont signes de pureté et de non contamination. Tous nos échantillons sont situés entre 1,95 et 2,03 pour 260/280 et entre 1,64 et 1,88 pour 230/260. La qualité de ces ARN a été évaluée par micro-électrophorèse capillaire sur l'appareil Experion® (BIORAD, Marnes-la-Coquette, France) équipé du logiciel Experion™ software V3.0. L'analyse de l'électrophorégramme permet de visualiser les 2 pics correspondant aux ARN ribosomaux 18S et 28S. La qualité des ARN est attestée sous forme de score, sur une échelle de 1 à 10, nommé coefficient RQI (RNA Quality Indicator), basé sur l'aspect des pics des ARN ribosomaux 18S et 28S et la valeur du rapport des intensités des pics 28S/18S. Tous les ARN préparés au cours de ce projet avaient un RQI supérieur à 9.

#### **B. Préparation d'ADNc par rétro-transcription (RT) à partir des ARN totaux**

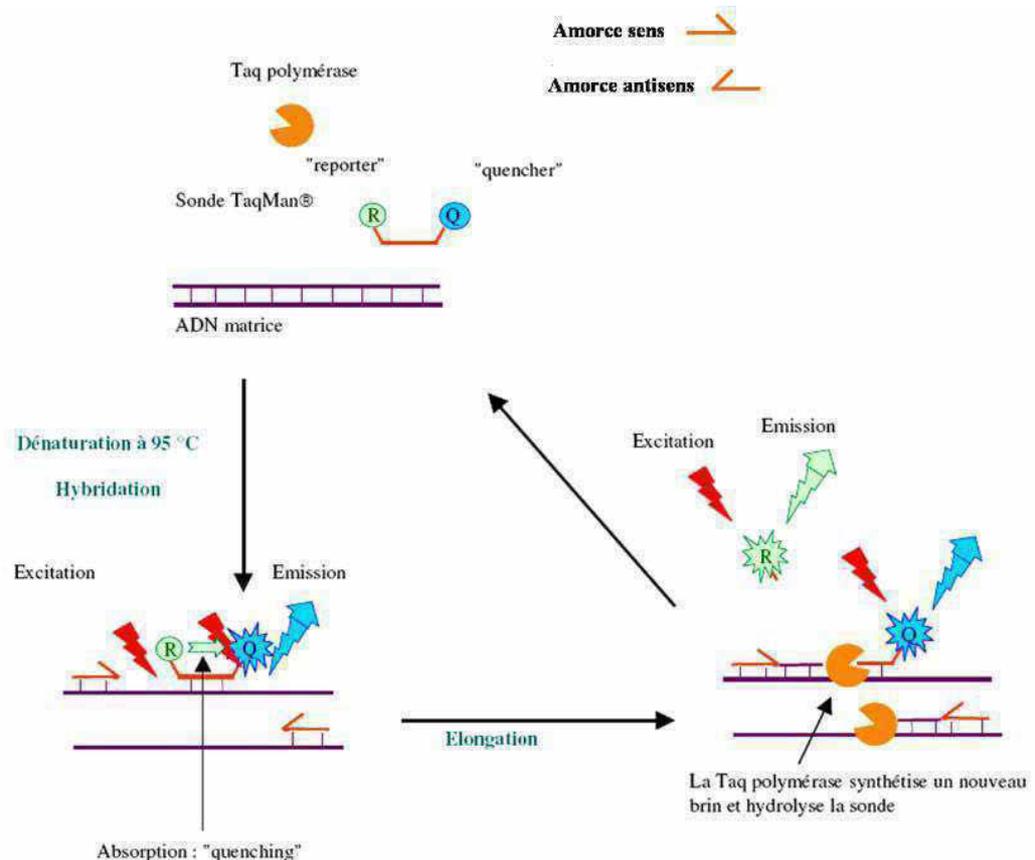
Les ADNc simples brins sont synthétisés par rétrotranscription des ARN totaux. La rétrotranscription est réalisée à partir de 2µg d'ARN totaux, à l'aide du *First-Strand cDNA Synthesis* (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France), selon les instructions du fabricant. Des hexamères aléatoires sont utilisés comme amorces oligonucléotidiques, afin de rétrotranscrire tous les ARN. Un inhibiteur de RNase est ajouté dans le mélange réactionnel. La réaction comporte une étape d'hybridation (10 min à 25°C) suivie d'une étape d'élongation (2h à 37°C), puis d'une étape de dénaturation (5 min à 85°C). Les ADNc obtenus sont stockés à -20°C.

#### **C. Réaction de Polymérisation en Chaîne quantitative (qPCR)**

L'expression des gènes d'intérêts a été quantifiée par PCR quantitative en temps réel à haut débit, grâce à l'utilisation de TaqMan™ et de l'automate 7900HT Real time PCR system (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France). Cette technologie est basée sur le principe des sondes TaqMan™. Ces sondes sont marquées à leur extrémité 5' par un fluorochrome reporter, le 6-FAM (6-carboxyfluorescéine), et portent à leur extrémité 3' un quencher non fluorescent ainsi qu'une molécule MGB (minor groove binder). Le quencher induit l'extinction de la fluorescence émise par le reporter ; l'hydrolyse de la sonde par l'activité 5'



exonucléase de la Taq polymérase provoque la séparation du fluorochrome et du quencher entraînant ainsi l'émission d'un signal fluorescent. La molécule MGB augmente le T<sub>m</sub> de la sonde et stabilise le duplex formé entre la sonde et la matrice d'ADNc, ce qui permet l'utilisation de sondes plus petites de spécificité et de sensibilité augmentées.



**Principe des sondes TaqMan™.** Les sondes présentent à leur extrémité 5' un fluorochrome reporter, le 6-FAM (6- carboxyfluorescéine), et à leur extrémité 3' un quencher non fluorescent qui induit l'extinction de la fluorescence émise par le reporter. L'hydrolyse de la sonde par l'activité 5' exonucléase de la Taq polymérase provoque la séparation du fluorochrome et du quencher entraînant ainsi l'émission d'un signal fluorescent. (D'après Céline Loriol, Thèse d'Université, Limoges, septembre 2006).

Nous utiliserons un TaqMan™ Gene Expression Assay composé d'un couple d'amorces et d'une sonde MGB TaqMan™ spécifiques d'un gène cible (liste des gènes). Les TaqMan™ Gene Expression Assays ont été créés grâce à un processus automatisé de conception qui prend en compte les homologies de séquence entre gènes, les différents ARNm résultant d'un



épissage alternatif et l'existence potentielle de pseudo-gènes transcrits. Ils sont donc spécifiques d'un gène donné, sauf dans de rares cas où l'homologie de séquence nucléotidique est trop importante. L'efficacité d'amplification avec les assays TaqMan™ est garantie comme étant comprise entre 90% et 100%.

La RT-PCR quantitative en temps réel consiste à quantifier les produits amplifiés en « temps réel », c'est-à-dire au fur et à mesure de leur accumulation. La quantification de l'expression des gènes d'intérêt a été réalisée par la méthode comparative des cycles seuil ou Ct (threshold cycle). L'intensité de la fluorescence émise par le fluorochrome reporter augmente à chaque cycle de PCR, à mesure que la quantité d'amplicons augmente. Une valeur seuil de fluorescence (threshold) est fixée dans une zone où le signal généré par chaque échantillon est significativement différent du bruit de fond (au moins 10 fois le signal de la ligne de base) et où la réaction de PCR est en phase exponentielle pour tous les échantillons. Nous avons fixé ce seuil à 0,3 pour tous les gènes. Le Ct, ou nombre de cycles de PCR. Les résultats d'expression ont été mesurés de façon relative par rapport au gène de référence. Ainsi, les valeurs de Ct des gènes d'intérêt ont été normalisées grâce à la valeur de Ct du gène de l'ARNr 18S, générant ainsi des valeurs de  $\Delta Ct$  ( $Ct_{\text{gène cible}} - Ct_{\text{ARNr 18S}}$ ). La méthode d'amplification choisie ne permet pas de réaliser une quantification absolue de l'expression génique et les niveaux d'expression ne peuvent pas être directement comparés entre les gènes. Cependant, il est admis que les  $\Delta Ct$  faibles correspondent à des gènes fortement exprimés et les  $\Delta Ct$  élevés indiquent une expression faible des gènes.

Afin de mesurer les différentiels d'expression entre différentes conditions expérimentales, les valeurs de  $\Delta\Delta Ct$  ont ensuite été calculées ; elles correspondent à la différence entre le  $\Delta Ct$  du gène dans une condition donnée et le  $\Delta Ct$  de ce même gène dans une condition de référence dite de calibration. Pour tous les gènes cibles, une valeur moyenne des  $\Delta\Delta Ct$  obtenus pour chaque culture primaire a été calculée ( $\text{moy}\Delta\Delta Ct$ ). La quantité relative (RQ) de transcrits entre deux conditions a été déterminée avec la formule  $RQ = 2^{-(\text{moy}\Delta\Delta Ct)}$ . De manière arbitraire, nous avons considéré que seuls les différentiels d'expression supérieurs à 2 avaient un intérêt biologique ( $RQ \geq 2$  or  $\leq 0.5$ ).



# Références



## Références bibliographiques

- (1993). "Antioxidant status and neovascular age-related macular degeneration. Eye Disease Case-Control Study Group." Arch Ophthalmol **111**(1): 104-109.
- (1994). "The effect of vitamin E and beta carotene on the incidence of lung cancer and other cancers in male smokers. The Alpha-Tocopherol, Beta Carotene Cancer Prevention Study Group." N Engl J Med **330**(15): 1029-1035.
- (2001). "A randomized, placebo-controlled, clinical trial of high-dose supplementation with vitamins C and E, beta carotene, and zinc for age-related macular degeneration and vision loss: AREDS report no. 8." Arch Ophthalmol **119**(10): 1417-1436.
- Abler, A. S., C. J. Chang, et al. (1996). "Photoc injury triggers apoptosis of photoreceptor cells." Res Commun Mol Pathol Pharmacol **92**(2): 177-189.
- Acar, N., O. Berdeaux, et al. (2009). "Red blood cell plasmalogens and docosahexaenoic acid are independently reduced in primary open-angle glaucoma." Exp Eye Res **89**(6): 840-853.
- Adamus, G., S. Webb, et al. (2006). "Anti-recoverin antibodies induce an increase in intracellular calcium, leading to apoptosis in retinal cells." J Autoimmun **26**(2): 146-153.
- Age-Related Eye Disease Study Research, G. (2001). "A randomized, placebo-controlled, clinical trial of high-dose supplementation with vitamins C and E, beta carotene, and zinc for age-related macular degeneration and vision loss: AREDS report no. 8." Arch Ophthalmol **119**(10): 1417-1436.
- Ahmed, J., R. D. Braun, et al. (1993). "Oxygen distribution in the macaque retina." Invest Ophthalmol Vis Sci **34**(3): 516-521.
- Akagi, T., M. Kaneda, et al. (2001). "Differential subcellular localization of zinc in the rat retina." J Histochem Cytochem **49**(1): 87-96.
- Allikmets, R., N. F. Shroyer, et al. (1997). "Mutation of the Stargardt disease gene (ABCR) in age-related macular degeneration." Science **277**(5333): 1805-1807.
- Amaratunga, A., C. R. Abraham, et al. (1996). "Apolipoprotein E is synthesized in the retina by Muller glial cells, secreted into the vitreous, and rapidly transported into the optic nerve by retinal ganglion cells." J Biol Chem **271**(10): 5628-5632.
- Ames, B. N. and M. K. Shigenaga (1992). "Oxidants are a major contributor to aging." Ann N Y Acad Sci **663**: 85-96.
- Anderson, D. H., S. Ozaki, et al. (2001). "Local cellular sources of apolipoprotein E in the human retina and retinal pigmented epithelium: implications for the process of drusen formation." Am J Ophthalmol **131**(6): 767-781.
- Arakawa, S., M. Yasuda, et al. (2011). "Nine-year incidence and risk factors for retinal vein occlusion in a general Japanese population: the Hisayama Study." Invest Ophthalmol Vis Sci **52**(8): 5905-5909.
- Ardeljan, C. P., D. Ardeljan, et al. (2014). "Inflammation and Cell Death in Age-Related Macular Degeneration: An Immunopathological and Ultrastructural Model." J Clin Med **3**(4): 1542-1560.
- Ariel, A. and C. N. Serhan (2007). "Resolvins and protectins in the termination program of acute inflammation." Trends Immunol **28**(4): 176-183.
- Armstrong, V. T., M. R. Brzustowicz, et al. (2003). "Rapid flip-flop in polyunsaturated (docosahexaenoate) phospholipid membranes." Arch Biochem Biophys **414**(1): 74-82.
- Attakpa, E., A. Hichami, et al. (2009). "Docosahexaenoic acid modulates the expression of T-bet and GATA-3 transcription factors, independently of PPARalpha, through suppression of MAP kinase activation." Biochimie **91**(11-12): 1359-1365.



- Augood, C., A. Fletcher, et al. (2004). "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." *Ophthalmic Epidemiol* **11**(2): 117-129.
- Augood, C. A., J. R. Vingerling, et al. (2006). "Prevalence of age-related maculopathy in older Europeans: the European Eye Study (EUREYE)." *Arch Ophthalmol* **124**(4): 529-535.
- Baird, P. N., E. Guida, et al. (2004). "The epsilon2 and epsilon4 alleles of the apolipoprotein gene are associated with age-related macular degeneration." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **45**(5): 1311-1315.
- Balaiya, S., R. K. Murthy, et al. (2013). "Resveratrol inhibits proliferation of hypoxic choroidal vascular endothelial cells." *Mol Vis* **19**: 2385-2392.
- Balasubramanian, K., B. Mirnikjoo, et al. (2007). "Regulated externalization of phosphatidylserine at the cell surface: implications for apoptosis." *J Biol Chem* **282**(25): 18357-18364.
- Barker, J. N., V. Sarma, et al. (1990). "Marked synergism between tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma in regulation of keratinocyte-derived adhesion molecules and chemotactic factors." *J Clin Invest* **85**(2): 605-608.
- Barclay LRC, Ingold KU. Autoxidation of biological molecules. The autoxidation of a model membrane. A comparison of the autoxidation of egg lecithin phosphatidylcholine in water and chlorobenzene. *J Am Chem Soc* 1981 ; 103 : 6478-85.
- Barnett, B. P. and J. T. Handa (2013). "Retinal microenvironment imbalance in dry age-related macular degeneration: a mini-review." *Gerontology* **59**(4): 297-306.
- Bazan, H. E., M. M. Careaga, et al. (1982). "Chain elongation and desaturation of eicosapentaenoate to docosahexaenoate and phospholipid labeling in the rat retina in vivo." *Biochim Biophys Acta* **712**(1): 123-128.
- Bazan, N. G. (2006). "Cell survival matters: docosahexaenoic acid signaling, neuroprotection and photoreceptors." *Trends Neurosci* **29**(5): 263-271.
- 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: S400-405.
- Bazan, N. G., W. C. Gordon, et al. (1992). "Docosahexaenoic acid uptake and metabolism in photoreceptors: retinal conservation by an efficient retinal pigment epithelial cell-mediated recycling process." *Adv Exp Med Biol* **318**: 295-306.
- Beatty, S., H. Koh, et al. (2000). "The role of oxidative stress in the pathogenesis of age-related macular degeneration." *Surv Ophthalmol* **45**(2): 115-134.
- Berson, E. L. (1971). "Light deprivation for early retinitis pigmentosa. A hypothesis." *Arch Ophthalmol* **85**(5): 521-529.
- Bhutto, I. and G. Luttj (2012). "Understanding age-related macular degeneration (AMD): relationships between the photoreceptor/retinal pigment epithelium/Bruch's membrane/choriocapillaris complex." *Mol Aspects Med* **33**(4): 295-317.
- Bian, Q., S. Gao, et al. (2012). "Lutein and zeaxanthin supplementation reduces photooxidative damage and modulates the expression of inflammation-related genes in retinal pigment epithelial cells." *Free Radic Biol Med* **53**(6): 1298-1307.
- Bian, Q., T. Qin, et al. (2012). "Lutein or zeaxanthin supplementation suppresses inflammatory responses in retinal pigment epithelial cells and macrophages." *Adv Exp Med Biol* **723**: 43-50.
- Bird, A. C. and J. Marshall (1986). "Retinal pigment epithelial detachments in the elderly." *Trans Ophthalmol Soc U K* **105 ( Pt 6)**: 674-682.
- Blomgren, K., C. Zhu, et al. (2001). "Synergistic activation of caspase-3 by m-calpain after neonatal hypoxia-ischemia: a mechanism of "pathological apoptosis"?" *J Biol Chem* **276**(13): 10191-10198.



- Bohr, V., R. M. Anson, et al. (1998). "Oxidative DNA damage processing and changes with aging." Toxicol Lett **102-103**: 47-52.
- Bohr, V. A., O. P. Ottersen, et al. (2007). "Genome instability and DNA repair in brain, ageing and neurological disease." Neuroscience **145**(4): 1183-1186.
- Bojanowski, C. M., D. Shen, et al. (2006). "An apolipoprotein E variant may protect against age-related macular degeneration through cytokine regulation." Environ Mol Mutagen **47**(8): 594-602.
- Bok, D. and R. W. Young (1972). "The renewal of diffusely distributed protein in the outer segments of rods and cones." Vision Res **12**(2): 161-168.
- Bone, R. A., J. T. Landrum, et al. (2001). "Macular pigment in donor eyes with and without AMD: a case-control study." Invest Ophthalmol Vis Sci **42**(1): 235-240.
- Bonilha, V. L. (2008). "Age and disease-related structural changes in the retinal pigment epithelium." Clin Ophthalmol **2**(2): 413-424.
- Bosco, M. C., R. E. Curiel, et al. (2000). "IL-2 signaling in human monocytes involves the phosphorylation and activation of p59hck." J Immunol **164**(9): 4575-4585.
- Bosco, M. C., M. Puppo, et al. (2006). "Hypoxia modifies the transcriptome of primary human monocytes: modulation of novel immune-related genes and identification of CC-chemokine ligand 20 as a new hypoxia-inducible gene." J Immunol **177**(3): 1941-1955.
- Boulton, M. E. (2009). "Lipofuscin phototoxicity: reality or myth?" J Cataract Refract Surg **35**(8): 1479; author reply 1479-1480.
- Bratton, D. L., V. A. Fadok, et al. (1997). "Appearance of phosphatidylserine on apoptotic cells requires calcium-mediated nonspecific flip-flop and is enhanced by loss of the aminophospholipid translocase." J Biol Chem **272**(42): 26159-26165.
- Bressler, N. M., S. B. Bressler, et al. (1988). "Drusen characteristics in patients with exudative versus non-exudative age-related macular degeneration." Retina **8**(2): 109-114.
- Brown, E. R. and P. V. Subbaiah (1994). "Differential effects of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid on human skin fibroblasts." Lipids **29**(12): 825-829.
- Brown, J., M. A. Wallet, et al. (2010). "Proteome bioprofiles distinguish between M1 priming and activation states in human macrophages." J Leukoc Biol **87**(4): 655-662.
- Buschini, E., A. M. Fea, et al. (2015). "Recent developments in the management of dry age-related macular degeneration." Clin Ophthalmol **9**: 563-574.
- Bush, R. A., A. Malnoe, et al. (1994). "Dietary deficiency of N-3 fatty acids alters rhodopsin content and function in the rat retina." Invest Ophthalmol Vis Sci **35**(1): 91-100.
- Bush, R. A., C. E. Reme, et al. (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**(6): 741-752.
- Calandria, J. M. and N. G. Bazan (2010). "Neuroprotectin D1 modulates the induction of pro-inflammatory signaling and promotes retinal pigment epithelial cell survival during oxidative stress." Adv Exp Med Biol **664**: 663-670.
- Calder, P. C. (2007). "Immunomodulation by omega-3 fatty acids." Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids **77**(5-6): 327-335.
- Calder, P. C. (2009). "Polyunsaturated fatty acids and inflammatory processes: New twists in an old tale." Biochimie **91**(6): 791-795.
- Calder, P. C. (2012). "Mechanisms of action of (n-3) fatty acids." J Nutr **142**(3): 592S-599S.
- Calder, P. C., P. Yaqoob, et al. (1994). "Incorporation of fatty acids by concanavalin A-stimulated lymphocytes and the effect on fatty acid composition and membrane fluidity." Biochem J **300** ( Pt 2): 509-518.
- Calero, C. I., E. Vickers, et al. (2011). "Allosteric modulation of retinal GABA receptors by ascorbic acid." J Neurosci **31**(26): 9672-9682.
- Cangemi, F. E. (2007). "TOZAL Study: an open case control study of an oral antioxidant and omega-3 supplement for dry AMD." BMC Ophthalmol **7**: 3.



- Cao, X., D. Shen, et al. (2011). "Macrophage polarization in the maculae of age-related macular degeneration: a pilot study." *Pathol Int* **61**(9): 528-535.
- Chan, A., J. S. Duker, et al. (2006). "Quantification of photoreceptor layer thickness in normal eyes using optical coherence tomography." *Retina* **26**(6): 655-660.
- Chan, S. M., R. Q. Sun, et al. (2013). "Activation of PPARalpha ameliorates hepatic insulin resistance and steatosis in high fructose-fed mice despite increased endoplasmic reticulum stress." *Diabetes* **62**(6): 2095-2105.
- Chen, H. and R. E. Anderson (1993). "Differential incorporation of docosahexaenoic and arachidonic acids in frog retinal pigment epithelium." *J Lipid Res* **34**(11): 1943-1955.
- Chen, M., H. Wang, et al. (2011). "Regulation of adaptive immunity by the NLRP3 inflammasome." *Int Immunopharmacol* **11**(5): 549-554.
- Chen, Y., J. C. Saari, et al. (1993). "Interactions of all-trans-retinol and long-chain fatty acids with interphotoreceptor retinoid-binding protein." *Biochemistry* **32**(42): 11311-11318.
- Chikano, S., K. Sawada, et al. (2000). "IL-18 and IL-12 induce intestinal inflammation and fatty liver in mice in an IFN-gamma dependent manner." *Gut* **47**(6): 779-786.
- Cho, E., J. M. Seddon, et al. (2004). "Prospective study of intake of fruits, vegetables, vitamins, and carotenoids and risk of age-related maculopathy." *Arch Ophthalmol* **122**(6): 883-892.
- Cho, E., M. J. Stampfer, et al. (2001). "Prospective study of zinc intake and the risk of age-related macular degeneration." *Ann Epidemiol* **11**(5): 328-336.
- Choe, H. G. and R. E. Anderson (1990). "Unique molecular species composition of glycerolipids of frog rod outer segments." *Exp Eye Res* **51**(2): 159-165.
- Chow, S. C., L. Sisfontes, et al. (1989). "Suppression of growth in a leukemic T cell line by n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids." *Lipids* **24**(8): 700-704.
- Christen, W. G., U. A. Ajani, et al. (1999). "Prospective cohort study of antioxidant vitamin supplement use and the risk of age-related maculopathy." *Am J Epidemiol* **149**(5): 476-484.
- Chua, B., V. Flood, et al. (2006). "Dietary fatty acids and the 5-year incidence of age-related maculopathy." *Arch Ophthalmol* **124**(7): 981-986.
- Chua, B. T., K. Guo, et al. (2000). "Direct cleavage by the calcium-activated protease calpain can lead to inactivation of caspases." *J Biol Chem* **275**(7): 5131-5135.
- Chucair, A. J., N. P. Rotstein, et al. (2007). "Lutein and zeaxanthin protect photoreceptors from apoptosis induced by oxidative stress: relation with docosahexaenoic acid." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **48**(11): 5168-5177.
- Cia, D., J. Vergnaud-Gauduchon, et al. (2014). "Epigallocatechin gallate (EGCG) prevents H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress in primary rat retinal pigment epithelial cells." *Curr Eye Res* **39**(9): 944-952.
- Cicerone, C. M. (1976). "Cones survive rods in the light-damaged eye of the albino rat." *Science* **194**(4270): 1183-1185.
- Cleland, L. G., M. J. James, et al. (1992). "Linoleate inhibits EPA incorporation from dietary fish-oil supplements in human subjects." *Am J Clin Nutr* **55**(2): 395-399.
- Clevidence, B. A. and J. G. Bieri (1993). "Association of carotenoids with human plasma lipoproteins." *Methods Enzymol* **214**: 33-46.
- Codenotti, M., F. Patelli, et al. (2002). "OCT findings in patients with retinopathy after watching a solar eclipse." *Ophthalmologica* **216**(6): 463-466.
- Cong, R., B. Zhou, et al. (2008). "Smoking and the risk of age-related macular degeneration: a meta-analysis." *Ann Epidemiol* **18**(8): 647-656.
- Conley, Y. P., A. Thalamuthu, et al. (2005). "Candidate gene analysis suggests a role for fatty acid biosynthesis and regulation of the complement system in the etiology of age-related maculopathy." *Hum Mol Genet* **14**(14): 1991-2002.



- Counis, M. F. and A. Torriglia (2000). "DNases and apoptosis." Biochem Cell Biol **78**(4): 405-414.
- Crabb, J. W., M. Miyagi, et al. (2002). "Drusen proteome analysis: an approach to the etiology of age-related macular degeneration." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(23): 14682-14687.
- Cremers, F. P., A. Maugeri, et al. (2004). "The expanding roles of ABCA4 and CRB1 in inherited blindness." Novartis Found Symp **255**: 68-79; discussion 79-84, 177-178.
- Cruickshanks, K. J., R. Klein, et al. (2001). "Sunlight and the 5-year incidence of early age-related maculopathy: the beaver dam eye study." Arch Ophthalmol **119**(2): 246-250.
- Curran-Celentano, J., B. R. Hammond, Jr., et al. (2001). "Relation between dietary intake, serum concentrations, and retinal concentrations of lutein and zeaxanthin in adults in a Midwest population." Am J Clin Nutr **74**(6): 796-802.
- Coscas G. Dégénérescences maculaires acquises liées à l'âge. Rapport de la Société Française d'Ophthalmologie, Masson, Paris, 1991.
- Daemen, F. J. (1973). "Vertebrate rod outer segment membranes." Biochim Biophys Acta **300**(3): 255-288.
- Dalli, J., M. Zhu, et al. (2013). "The novel 13S,14S-epoxy-maresin is converted by human macrophages to maresin 1 (MaR1), inhibits leukotriene A4 hydrolase (LTA4H), and shifts macrophage phenotype." FASEB J **27**(7): 2573-2583.
- Danis, R. P., J. A. Lavine, et al. (2015). "Geographic atrophy in patients with advanced dry age-related macular degeneration: current challenges and future prospects." Clin Ophthalmol **9**: 2159-2174.
- Darzins, P., P. Mitchell, et al. (1997). "Sun exposure and age-related macular degeneration. An Australian case-control study." Ophthalmology **104**(5): 770-776.
- Das, H. K., J. McPherson, et al. (1985). "Isolation, characterization, and mapping to chromosome 19 of the human apolipoprotein E gene." J Biol Chem **260**(10): 6240-6247.
- Davis, M. D., R. E. Gangnon, et al. (2005). "The Age-Related Eye Disease Study severity scale for age-related macular degeneration: AREDS Report No. 17." Arch Ophthalmol **123**(11): 1484-1498.
- de Jong, P. T. (2006). "Age-related macular degeneration." N Engl J Med **355**(14): 1474-1485.
- De La Paz, M. A., J. Zhang, et al. (1996). "Antioxidant enzymes of the human retina: effect of age on enzyme activity of macula and periphery." Curr Eye Res **15**(3): 273-278.
- de Waal Malefyt, R., J. Abrams, et al. (1991). "Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes." J Exp Med **174**(5): 1209-1220.
- de Waal Malefyt, R., H. Yssel, et al. (1993). "Direct effects of IL-10 on subsets of human CD4+ T cell clones and resting T cells. Specific inhibition of IL-2 production and proliferation." J Immunol **150**(11): 4754-4765.
- Delcourt, C., J. P. Cristol, et al. (1999). "Age-related macular degeneration and antioxidant status in the POLA study. POLA Study Group. Pathologies Oculaires Liees a l'Age." Arch Ophthalmol **117**(10): 1384-1390.
- Delcourt, C., J. L. Diaz, et al. (1998). "Smoking and age-related macular degeneration. The POLA Study. Pathologies Oculaires Liees a l'Age." Arch Ophthalmol **116**(8): 1031-1035.
- Deshmane, S. L., S. Kremlev, et al. (2009). "Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview." J Interferon Cytokine Res **29**(6): 313-326.
- Dinarelli, C. A. (2009). "Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family." Annu Rev Immunol **27**: 519-550.
- Doly, M. (1994). "Transduction of the light message: from the photon to the optic nerve." Fundam Clin Pharmacol **8**(2): 147-154.
- Donoso, L. A., D. Kim, et al. (2006). "The role of inflammation in the pathogenesis of age-related macular degeneration." Surv Ophthalmol **51**(2): 137-152.



- Dorey, C. K., G. Wu, et al. (1989). "Cell loss in the aging retina. Relationship to lipofuscin accumulation and macular degeneration." Invest Ophthalmol Vis Sci **30**(8): 1691-1699.
- Doyle, S. L., M. Campbell, et al. (2012). "NLRP3 has a protective role in age-related macular degeneration through the induction of IL-18 by drusen components." Nat Med **18**(5): 791-798.
- Dugas, B., S. Charbonnier, et al. (2010). "Effects of oxysterols on cell viability, inflammatory cytokines, VEGF, and reactive oxygen species production on human retinal cells: cytoprotective effects and prevention of VEGF secretion by resveratrol." Eur J Nutr **49**(7): 435-446.
- Dunaief, J. L., T. Dentchev, et al. (2002). "The role of apoptosis in age-related macular degeneration." Arch Ophthalmol **120**(11): 1435-1442.
- Dunn, K. C., A. E. Aotaki-Keen, et al. (1996). "ARPE-19, a human retinal pigment epithelial cell line with differentiated properties." Exp Eye Res **62**(2): 155-169.
- Dunn, K. C., A. D. Marmorstein, et al. (1998). "Use of the ARPE-19 cell line as a model of RPE polarity: basolateral secretion of FGF5." Invest Ophthalmol Vis Sci **39**(13): 2744-2749.
- El Matri, L., R. Bouraoui, et al. (2012). "[Prevalence and risk factors of age-related macular degeneration (AMD) in a Tunisian hospital population]." Bull Soc Belge Ophthalmol(319): 35-41.
- Enari, M., H. Sakahira, et al. (1998). "A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD." Nature **391**(6662): 43-50.
- Eskes, R., S. Desagher, et al. (2000). "Bid induces the oligomerization and insertion of Bax into the outer mitochondrial membrane." Mol Cell Biol **20**(3): 929-935.
- Espinosa-Heidmann, D. G., I. J. Suner, et al. (2006). "Cigarette smoke-related oxidants and the development of sub-RPE deposits in an experimental animal model of dry AMD." Invest Ophthalmol Vis Sci **47**(2): 729-737.
- Espinoza-Delgado, I., M. C. Bosco, et al. (1995). "Interleukin-2 and human monocyte activation." J Leukoc Biol **57**(1): 13-19.
- Evans, J. R. and J. G. Lawrenson (2012). "Antioxidant vitamin and mineral supplements for preventing age-related macular degeneration." Cochrane Database Syst Rev **6**: CD000253.
- Ezzat, M. K., C. R. Hann, et al. (2008). "Immune cells in the human choroid." Br J Ophthalmol **92**(7): 976-980.
- Fadok, V. A., D. L. Bratton, et al. (2000). "A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells." Nature **405**(6782): 85-90.
- Fang, H. Y., R. Hughes, et al. (2009). "Hypoxia-inducible factors 1 and 2 are important transcriptional effectors in primary macrophages experiencing hypoxia." Blood **114**(4): 844-859.
- Ferris, F. L., 3rd, S. L. Fine, et al. (1984). "Age-related macular degeneration and blindness due to neovascular maculopathy." Arch Ophthalmol **102**(11): 1640-1642.
- Ferris, F. L., M. D. Davis, et al. (2005). "A simplified severity scale for age-related macular degeneration: AREDS Report No. 18." Arch Ophthalmol **123**(11): 1570-1574.
- Fiorentino, D. F., M. W. Bond, et al. (1989). "Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones." J Exp Med **170**(6): 2081-2095.
- Fliesler, S. J. and R. E. Anderson (1983). "Chemistry and metabolism of lipids in the vertebrate retina." Prog Lipid Res **22**(2): 79-131.
- Flood, V., W. Smith, et al. (2002). "Dietary antioxidant intake and incidence of early age-related maculopathy: the Blue Mountains Eye Study." Ophthalmology **109**(12): 2272-2278.
- Folch, J., M. Lees, et al. (1957). "A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues." J Biol Chem **226**(1): 497-509.



- Freire-de-Lima, C. G., Y. Q. Xiao, et al. (2006). "Apoptotic cells, through transforming growth factor-beta, coordinately induce anti-inflammatory and suppress pro-inflammatory eicosanoid and NO synthesis in murine macrophages." *J Biol Chem* **281**(50): 38376-38384.
- Friedman, D. S., B. J. O'Colmain, et al. (2004). "Prevalence of age-related macular degeneration in the United States." *Arch Ophthalmol* **122**(4): 564-572.
- Friedman, P. A. and M. L. Zeidel (1999). "Victory at C." *Nat Med* **5**(6): 620-621.
- Fritsche, L. G., W. Chen, et al. (2013). "Seven new loci associated with age-related macular degeneration." *Nat Genet* **45**(4): 433-439, 439e431-432.
- Gaillard, E. R., S. J. Atherton, et al. (1995). "Photophysical studies on human retinal lipofuscin." *Photochem Photobiol* **61**(5): 448-453.
- Gale, C. R., N. F. Hall, et al. (2003). "Lutein and zeaxanthin status and risk of age-related macular degeneration." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **44**(6): 2461-2465.
- Gao, Q., Y. Jiang, et al. (2010). "A critical function of Th17 proinflammatory cells in the development of atherosclerotic plaque in mice." *J Immunol* **185**(10): 5820-5827.
- Garelli, A., N. P. Rotstein, et al. (2006). "Docosahexaenoic acid promotes photoreceptor differentiation without altering Crx expression." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **47**(7): 3017-3027.
- Garlanda, C., C. A. Dinarello, et al. (2013). "The interleukin-1 family: back to the future." *Immunity* **39**(6): 1003-1018.
- Gass, J. D. (1973). "Drusen and disciform macular detachment and degeneration." *Arch Ophthalmol* **90**(3): 206-217.
- Gately, M. K., L. M. Renzetti, et al. (1998). "The interleukin-12/interleukin-12-receptor system: role in normal and pathologic immune responses." *Annu Rev Immunol* **16**: 495-521.
- Gaynes, B. I. (2003). "AREDS misses on safety." *Arch Ophthalmol* **121**(3): 416-417.
- Germain, M. and G. C. Shore (2003). "Cellular distribution of Bcl-2 family proteins." *Sci STKE* **2003**(173): pe10.
- Gladstone, G. J. and W. Tasman (1978). "Solar retinitis after minimal exposure." *Arch Ophthalmol* **96**(8): 1368-1369.
- Goldberg, J., G. Flowerdew, et al. (1988). "Factors associated with age-related macular degeneration. An analysis of data from the first National Health and Nutrition Examination Survey." *Am J Epidemiol* **128**(4): 700-710.
- Goldman, A. I., P. S. Teirstein, et al. (1980). "The role of ambient lighting in circadian disc shedding in the rod outer segment of the rat retina." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **19**(11): 1257-1267.
- Gordon, S. and P. R. Taylor (2005). "Monocyte and macrophage heterogeneity." *Nat Rev Immunol* **5**(12): 953-964.
- Gorn, R. A. and T. Kuwabara (1967). "Retinal damage by visible light. A physiologic study." *Arch Ophthalmol* **77**(1): 115-118.
- Green, D. R. and F. Llambi (2015). "Cell Death Signaling." *Cold Spring Harb Perspect Biol* **7**(12).
- Green, W. R., P. J. McDonnell, et al. (1985). "Pathologic features of senile macular degeneration." *Ophthalmology* **92**(5): 615-627.
- Green, W. R. and D. M. Robertson (1991). "Pathologic findings of photic retinopathy in the human eye." *Am J Ophthalmol* **112**(5): 520-527.
- Grindle, C. F. and J. Marshall (1978). "Ageing changes in Bruch's membrane and their functional implications." *Trans Ophthalmol Soc U K* **98**(1): 172-175.
- Gris, D., Z. Ye, et al. (2010). "NLRP3 plays a critical role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis by mediating Th1 and Th17 responses." *J Immunol* **185**(2): 974-981.



- Gross, A., J. M. McDonnell, et al. (1999). "BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis." *Genes Dev* **13**(15): 1899-1911.
- Grossniklaus, H. E., J. X. Ling, et al. (2002). "Macrophage and retinal pigment epithelium expression of angiogenic cytokines in choroidal neovascularization." *Mol Vis* **8**: 119-126.
- Group, A. R., E. Y. Chew, et al. (2012). "The Age-Related Eye Disease Study 2 (AREDS2): study design and baseline characteristics (AREDS2 report number 1)." *Ophthalmology* **119**(11): 2282-2289.
- Hageman, G. S., D. H. Anderson, et al. (2005). "A common haplotype in the complement regulatory gene factor H (HF1/CFH) predisposes individuals to age-related macular degeneration." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(20): 7227-7232.
- Haines, J. L., M. A. Hauser, et al. (2005). "Complement factor H variant increases the risk of age-related macular degeneration." *Science* **308**(5720): 419-421.
- Ham, W. T., Jr., H. A. Mueller, et al. (1982). "Action spectrum for retinal injury from near-ultraviolet radiation in the aphakic monkey." *Am J Ophthalmol* **93**(3): 299-306.
- Hammond, B. R., Jr., B. R. Wooten, et al. (1996). "Cigarette smoking and retinal carotenoids: implications for age-related macular degeneration." *Vision Res* **36**(18): 3003-3009.
- Hanisch, U. K. and H. Kettenmann (2007). "Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain." *Nat Neurosci* **10**(11): 1387-1394.
- Hasegawa, E., K. H. Sonoda, et al. (2013). "IL-23-independent induction of IL-17 from gammadeltaT cells and innate lymphoid cells promotes experimental intraocular neovascularization." *J Immunol* **190**(4): 1778-1787.
- He, L. and A. G. Marneros (2014). "Doxycycline inhibits polarization of macrophages to the proangiogenic M2-type and subsequent neovascularization." *J Biol Chem* **289**(12): 8019-8028.
- Hill, M. M., C. Adrain, et al. (2003). "Portrait of a killer: the mitochondrial apoptosome emerges from the shadows." *Mol Interv* **3**(1): 19-26.
- Hollyfield, J. G. (2010). "Age-related macular degeneration: the molecular link between oxidative damage, tissue-specific inflammation and outer retinal disease: the Proctor lecture." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **51**(3): 1275-1281.
- Hope-Ross, M. W., G. J. Mahon, et al. (1993). "Ultrastructural findings in solar retinopathy." *Eye (Lond)* **7** ( Pt 1): 29-33.
- Hosoya, K., A. Minamizono, et al. (2004). "Vitamin C transport in oxidized form across the rat blood-retinal barrier." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **45**(4): 1232-1239.
- Hoyer, K. K., H. Doms, et al. (2008). "Interleukin-2 in the development and control of inflammatory disease." *Immunol Rev* **226**: 19-28.
- Huber, A. M. and S. N. Gershoff (1975). "Effects of zinc deficiency on the oxidation of retinol and ethanol in rats." *J Nutr* **105**(11): 1486-1490.
- INSEE. Fiches thématiques. Les personnes âgées. 2005
- Imtiyaz, H. Z. and M. C. Simon (2010). "Hypoxia-inducible factors as essential regulators of inflammation." *Curr Top Microbiol Immunol* **345**: 105-120.
- Izumi-Nagai, K., N. Nagai, et al. (2007). "Macular pigment lutein is antiinflammatory in preventing choroidal neovascularization." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **27**(12): 2555-2562.
- Jager, R. D., W. F. Mieler, et al. (2008). "Age-related macular degeneration." *N Engl J Med* **358**(24): 2606-2617.
- Jain, S. K. (1985). "In vivo externalization of phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine in the membrane bilayer and hypercoagulability by the lipid peroxidation of erythrocytes in rats." *J Clin Invest* **76**(1): 281-286.
- Jakobsdottir, J., Y. P. Conley, et al. (2005). "Susceptibility genes for age-related maculopathy on chromosome 10q26." *Am J Hum Genet* **77**(3): 389-407.



- Jin, X. H., K. Ohgami, et al. (2006). "Inhibitory effects of lutein on endotoxin-induced uveitis in Lewis rats." Invest Ophthalmol Vis Sci **47**(6): 2562-2568.
- Joly, S., M. Francke, et al. (2009). "Cooperative phagocytes: resident microglia and bone marrow immigrants remove dead photoreceptors in retinal lesions." Am J Pathol **174**(6): 2310-2323.
- Jonasson, F., A. Arnarsson, et al. (2003). "The prevalence of age-related maculopathy in iceland: Reykjavik eye study." Arch Ophthalmol **121**(3): 379-385.
- Jonasson, F. and K. Thordarson (1987). "Prevalence of ocular disease and blindness in a rural area in the eastern region of Iceland during 1980 through 1984." Acta Ophthalmol Suppl **182**: 40-43.
- Juaneda, P. and G. Rocquelin (1985). "Rapid and convenient separation of phospholipids and non phosphorus lipids from rat heart using silica cartridges." Lipids **20**(1): 40-41.
- Kaarniranta, K. and A. Salminen (2009). "NF-kappaB signaling as a putative target for omega-3 metabolites in the prevention of age-related macular degeneration (AMD)." Exp Gerontol **44**(11): 685-688.
- Kaarniranta, K., A. Salminen, et al. (2009). "Heat shock proteins as gatekeepers of proteolytic pathways-Implications for age-related macular degeneration (AMD)." Ageing Res Rev **8**(2): 128-139.
- Kaczara, P., T. Sarna, et al. (2010). "Dynamics of H2O2 availability to ARPE-19 cultures in models of oxidative stress." Free Radic Biol Med **48**(8): 1064-1070.
- Kagan, V. E., J. P. Fabisiak, et al. (2000). "Oxidative signaling pathway for externalization of plasma membrane phosphatidylserine during apoptosis." FEBS Lett **477**(1-2): 1-7.
- Kallmark, F. P. and J. Ygge (2005). "Photo-induced foveal injury after viewing a solar eclipse." Acta Ophthalmol Scand **83**(5): 586-589.
- Kanda, A., W. Chen, et al. (2007). "A variant of mitochondrial protein LOC387715/ARMS2, not HTRA1, is strongly associated with age-related macular degeneration." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(41): 16227-16232.
- Karres, I., J. P. Kremer, et al. (1996). "Transforming growth factor-beta 1 inhibits synthesis of cytokines in endotoxin-stimulated human whole blood." Arch Surg **131**(12): 1310-1316; discussion 1316-1317.
- Kato, M., T. Nonaka, et al. (2000). "Caspases cleave the amino-terminal calpain inhibitory unit of calpastatin during apoptosis in human Jurkat T cells." J Biochem **127**(2): 297-305.
- Katz, M. L. and G. E. Eldred (1989). "Failure of vitamin E to protect the retina against damage resulting from bright cyclic light exposure." Invest Ophthalmol Vis Sci **30**(1): 29-36.
- Katz, M. L., K. R. Parker, et al. (1982). "Effects of antioxidant nutrient deficiency on the retina and retinal pigment epithelium of albino rats: a light and electron microscopic study." Exp Eye Res **34**(3): 339-369.
- Katz, M. L., W. L. Stone, et al. (1978). "Fluorescent pigment accumulation in retinal pigment epithelium of antioxidant-deficient rats." Invest Ophthalmol Vis Sci **17**(11): 1049-1058.
- Kauppinen, A., T. Suuronen, et al. (2013). "Antagonistic crosstalk between NF-kappaB and SIRT1 in the regulation of inflammation and metabolic disorders." Cell Signal **25**(10): 1939-1948.
- Kaur, I., A. Hussain, et al. (2006). "Analysis of CFH, TLR4, and APOE polymorphism in India suggests the Tyr402His variant of CFH to be a global marker for age-related macular degeneration." Invest Ophthalmol Vis Sci **47**(9): 3729-3735.
- Kaylor, J. J., J. D. Cook, et al. (2014). "Identification of the 11-cis-specific retinyl-ester synthase in retinal Muller cells as multifunctional O-acyltransferase (MFAT)." Proc Natl Acad Sci U S A **111**(20): 7302-7307.
- Kaylor, J. J., Q. Yuan, et al. (2013). "Identification of DES1 as a vitamin A isomerase in Muller glial cells of the retina." Nat Chem Biol **9**(1): 30-36.



- Kerr, J. F., A. H. Wyllie, et al. (1972). "Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics." Br J Cancer **26**(4): 239-257.
- Khachik, F., F. F. de Moura, et al. (2002). "Transformations of selected carotenoids in plasma, liver, and ocular tissues of humans and in nonprimate animal models." Invest Ophthalmol Vis Sci **43**(11): 3383-3392.
- Khan, J. C., H. Shahid, et al. (2006). "Age related macular degeneration and sun exposure, iris colour, and skin sensitivity to sunlight." Br J Ophthalmol **90**(1): 29-32.
- Kijlstra, A., Y. Tian, et al. (2012). "Lutein: more than just a filter for blue light." Prog Retin Eye Res **31**(4): 303-315.
- Kim, J. H., H. J. Na, et al. (2008). "The non-provitamin A carotenoid, lutein, inhibits NF-kappaB-dependent gene expression through redox-based regulation of the phosphatidylinositol 3-kinase/PTEN/Akt and NF-kappaB-inducing kinase pathways: role of H(2)O(2) in NF-kappaB activation." Free Radic Biol Med **45**(6): 885-896.
- Kim, Y. M., J. Y. Im, et al. (2000). "IFN-gamma up-regulates IL-18 gene expression via IFN consensus sequence-binding protein and activator protein-1 elements in macrophages." J Immunol **165**(6): 3198-3205.
- King, R. E., K. D. Kent, et al. (2005). "Resveratrol reduces oxidation and proliferation of human retinal pigment epithelial cells via extracellular signal-regulated kinase inhibition." Chem Biol Interact **151**(2): 143-149.
- Kishimoto, T. (2010). "IL-6: from its discovery to clinical applications." Int Immunol **22**(5): 347-352.
- Kishimoto, T., S. Akira, et al. (1995). "Interleukin-6 family of cytokines and gp130." Blood **86**(4): 1243-1254.
- Klaver, C. C., M. Kliffen, et al. (1998). "Genetic association of apolipoprotein E with age-related macular degeneration." Am J Hum Genet **63**(1): 200-206.
- Klein, R., M. D. Davis, et al. (1991). "The Wisconsin age-related maculopathy grading system." Ophthalmology **98**(7): 1128-1134.
- Klein, R., B. E. Klein, et al. (2007). "Fifteen-year cumulative incidence of age-related macular degeneration: the Beaver Dam Eye Study." Ophthalmology **114**(2): 253-262.
- Klein, R., B. E. Klein, et al. (1992). "Prevalence of age-related maculopathy. The Beaver Dam Eye Study." Ophthalmology **99**(6): 933-943.
- Klein, R., T. Peto, et al. (2004). "The epidemiology of age-related macular degeneration." Am J Ophthalmol **137**(3): 486-495.
- Klein, R. J., C. Zeiss, et al. (2005). "Complement factor H polymorphism in age-related macular degeneration." Science **308**(5720): 385-389.
- Kofler, J. and C. A. Wiley (2011). "Microglia: key innate immune cells of the brain." Toxicol Pathol **39**(1): 103-114.
- Komaromy, A. M., G. M. Acland, et al. (2008). "Operating in the dark: a night-vision system for surgery in retinas susceptible to light damage." Arch Ophthalmol **126**(5): 714-717.
- Kraushar, M. F. (1986). "Foveal diseases." Ann Ophthalmol **18**(12): 354-357.
- Kubota, S., T. Kurihara, et al. (2010). "Resveratrol prevents light-induced retinal degeneration via suppressing activator protein-1 activation." Am J Pathol **177**(4): 1725-1731.
- Kubota, S., T. Kurihara, et al. (2009). "Prevention of ocular inflammation in endotoxin-induced uveitis with resveratrol by inhibiting oxidative damage and nuclear factor-kappaB activation." Invest Ophthalmol Vis Sci **50**(7): 3512-3519.
- Kuwabara, T. and R. A. Gorn (1968). "Retinal damage by visible light. An electron microscopic study." Arch Ophthalmol **79**(1): 69-78.
- Kwon, M. J., H. Y. Shin, et al. (2015). "CCL2 Mediates Neuron-Macrophage Interactions to Drive Proregenerative Macrophage Activation Following Preconditioning Injury." J Neurosci **35**(48): 15934-15947.



- Lankiewicz, S., C. Marc Luetjens, et al. (2000). "Activation of calpain I converts excitotoxic neuron death into a caspase-independent cell death." *J Biol Chem* **275**(22): 17064-17071.
- Laurence, A., C. M. Tato, et al. (2007). "Interleukin-2 signaling via STAT5 constrains T helper 17 cell generation." *Immunity* **26**(3): 371-381.
- LaVail, M. M. (1976). "Rod outer segment disk shedding in rat retina: relationship to cyclic lighting." *Science* **194**(4269): 1071-1074.
- LaVail, M. M. and P. A. Ward (1978). "Studies on the hormonal control of circadian outer segment disc shedding in the rat retina." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **17**(12): 1189-1183.
- Lavalette, S., W. Raoul, et al. (2011). "Interleukin-1beta inhibition prevents choroidal neovascularization and does not exacerbate photoreceptor degeneration." *Am J Pathol* **178**(5): 2416-2423.
- Lawrenson, J. G. and J. R. Evans (2013). "Advice about diet and smoking for people with or at risk of age-related macular degeneration: a cross-sectional survey of eye care professionals in the UK." *BMC Public Health* **13**: 564.
- Lecerf, J. M. and T. Desmettre (2010). "[Nutrition and age-related macular degeneration]." *J Fr Ophthalmol* **33**(10): 749-757.
- Leipe, J. and H. D. Chang (2015). "[Effector T cells]." *Z Rheumatol* **74**(1): 14-19.
- Levy, B. D., C. B. Clish, et al. (2001). "Lipid mediator class switching during acute inflammation: signals in resolution." *Nat Immunol* **2**(7): 612-619.
- Li, L., N. Eter, et al. (2015). "The microglia in healthy and diseased retina." *Exp Eye Res* **136**: 116-130.
- Lien, E. L. and B. R. Hammond (2011). "Nutritional influences on visual development and function." *Prog Retin Eye Res* **30**(3): 188-203.
- Lim, L. S., P. Mitchell, et al. (2012). "Age-related macular degeneration." *Lancet* **379**(9827): 1728-1738.
- Linsenmeier, R. A. (1986). "Effects of light and darkness on oxygen distribution and consumption in the cat retina." *J Gen Physiol* **88**(4): 521-542.
- Litman, B. J. and D. C. Mitchell (1996). "A role for phospholipid polyunsaturation in modulating membrane protein function." *Lipids* **31** *Suppl*: S193-197.
- Liu, B., L. Wei, et al. (2011). "Complement component C5a promotes expression of IL-22 and IL-17 from human T cells and its implication in age-related macular degeneration." *J Transl Med* **9**: 1-12.
- Liu, H., R. C. Bowes, 3rd, et al. (1997). "Endoplasmic reticulum chaperones GRP78 and calreticulin prevent oxidative stress, Ca<sup>2+</sup> disturbances, and cell death in renal epithelial cells." *J Biol Chem* **272**(35): 21751-21759.
- Lledias, F., P. Rangel, et al. (1998). "Oxidation of catalase by singlet oxygen." *J Biol Chem* **273**(17): 10630-10637.
- Loane, E., J. M. Nolan, et al. (2010). "The respective relationships between lipoprotein profile, macular pigment optical density, and serum concentrations of lutein and zeaxanthin." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **51**(11): 5897-5905.
- Loane, E., J. M. Nolan, et al. (2008). "Transport and retinal capture of lutein and zeaxanthin with reference to age-related macular degeneration." *Surv Ophthalmol* **53**(1): 68-81.
- Locksley, R. M., N. Killeen, et al. (2001). "The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology." *Cell* **104**(4): 487-501.
- Loyet, K. M., L. E. Deforge, et al. (2012). "Activation of the alternative complement pathway in vitreous is controlled by genetics in age-related macular degeneration." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **53**(10): 6628-6637.
- Magnusson, K. P., S. Duan, et al. (2006). "CFH Y402H confers similar risk of soft drusen and both forms of advanced AMD." *PLoS Med* **3**(1): e5.



- Mandal, M. N., G. P. Moiseyev, et al. (2011). "Alpha-phenyl-N-tert-butyl nitron (PBN) prevents light-induced degeneration of the retina by inhibiting RPE65 protein isomerohydrolase activity." *J Biol Chem* **286**(37): 32491-32501.
- Marcheselli, V. L., S. Hong, et al. (2003). "Novel docosanoids inhibit brain ischemia-reperfusion-mediated leukocyte infiltration and pro-inflammatory gene expression." *J Biol Chem* **278**(44): 43807-43817.
- Mares-Perlman, J. A., W. E. Brady, et al. (1995). "Serum carotenoids and tocopherols and severity of nuclear and cortical opacities." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **36**(2): 276-288.
- Mares-Perlman, J. A., W. E. Brady, et al. (1995). "Dietary fat and age-related maculopathy." *Arch Ophthalmol* **113**(6): 743-748.
- Mares-Perlman, J. A., A. I. Fisher, et al. (2001). "Lutein and zeaxanthin in the diet and serum and their relation to age-related maculopathy in the third national health and nutrition examination survey." *Am J Epidemiol* **153**(5): 424-432.
- Mares-Perlman, J. A., R. Klein, et al. (1996). "Association of zinc and antioxidant nutrients with age-related maculopathy." *Arch Ophthalmol* **114**(8): 991-997.
- Marion-Letellier, R., G. Savoye, et al. (2015). "Polyunsaturated fatty acids and inflammation." *IUBMB Life* **67**(9): 659-667.
- Martinez, F. O., L. Helming, et al. (2009). "Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective." *Annu Rev Immunol* **27**: 451-483.
- Maruo, T., N. Ikebukuro, et al. (1991). "Changes in causes of visual handicaps in Tokyo." *Jpn J Ophthalmol* **35**(3): 268-272.
- Matsubara, K., Y. Matsushita, et al. (2015). "Secreted ectodomain of sialic acid-binding Ig-like lectin-9 and monocyte chemoattractant protein-1 promote recovery after rat spinal cord injury by altering macrophage polarity." *J Neurosci* **35**(6): 2452-2464.
- Matsumoto, B., D. M. DeFoe, et al. (1987). "Membrane turnover in rod photoreceptors: ensheathment and phagocytosis of outer segment distal tips by pseudopodia of the retinal pigment epithelium." *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **230**(1260): 339-354.
- Matsumura, N., M. Kamei, et al. (2012). "Low-dose lipopolysaccharide pretreatment suppresses choroidal neovascularization via IL-10 induction." *PLoS One* **7**(7): e39890.
- McGinnis, K. M., M. E. Gnegy, et al. (1999). "Procaspase-3 and poly(ADP)ribose polymerase (PARP) are calpain substrates." *Biochem Biophys Res Commun* **263**(1): 94-99.
- Melkonian, G., C. Le, et al. (2000). "Normal patterns of angiogenesis and extracellular matrix deposition in chick chorioallantoic membranes are disrupted by mainstream and sidestream cigarette smoke." *Toxicol Appl Pharmacol* **163**(1): 26-37.
- Meng, X., P. Maliakal, et al. (2004). "Urinary and plasma levels of resveratrol and quercetin in humans, mice, and rats after ingestion of pure compounds and grape juice." *J Agric Food Chem* **52**(4): 935-942.
- Merbs, S. L. and J. Nathans (1992). "Absorption spectra of human cone pigments." *Nature* **356**(6368): 433-435.
- Miceli, M. V., M. R. Liles, et al. (1994). "Evaluation of oxidative processes in human pigment epithelial cells associated with retinal outer segment phagocytosis." *Exp Cell Res* **214**(1): 242-249.
- Michael, R. and A. Wegener (2004). "Estimation of safe exposure time from an ophthalmic operating microscope with regard to ultraviolet radiation and blue-light hazards to the eye." *J Opt Soc Am A Opt Image Sci Vis* **21**(8): 1388-1392.
- Miles, E. A. and P. C. Calder (1998). "Modulation of immune function by dietary fatty acids." *Proc Nutr Soc* **57**(2): 277-292.
- Mitchell, D. C., S. L. Niu, et al. (2001). "Optimization of receptor-G protein coupling by bilayer lipid composition I: kinetics of rhodopsin-transducin binding." *J Biol Chem* **276**(46): 42801-42806.



- Moeller, S. M., N. Parekh, et al. (2006). "Associations between intermediate age-related macular degeneration and lutein and zeaxanthin in the Carotenoids in Age-related Eye Disease Study (CAREDS): ancillary study of the Women's Health Initiative." Arch Ophthalmol **124**(8): 1151-1162.
- Moore, K. W., R. de Waal Malefyt, et al. (2001). "Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor." Annu Rev Immunol **19**: 683-765.
- Moran, E., L. Ding, et al. (2014). "Protective and antioxidant effects of PPARalpha in the ischemic retina." Invest Ophthalmol Vis Sci **55**(7): 4568-4576.
- Moran, E. P. and J. X. Ma (2015). "Therapeutic Effects of PPAR alpha on Neuronal Death and Microvascular Impairment." PPAR Res **2015**: 595426.
- Morandat, S., M. Bortolato, et al. (2003). "Plasmalogens protect unsaturated lipids against UV-induced oxidation in monolayer." Biochim Biophys Acta **1616**(2): 137-146.
- Morrison, S. A., R. M. Russell, et al. (1978). "Zinc deficiency: a cause of abnormal dark adaptation in cirrhotics." Am J Clin Nutr **31**(2): 276-281.
- Morrison, W. R. and L. M. Smith (1964). "Preparation of Fatty Acid Methyl Esters and Dimethylacetals from Lipids with Boron Fluoride--Methanol." J Lipid Res **5**: 600-608.
- Mosmann, T. (1983). "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays." J Immunol Methods **65**(1-2): 55-63.
- Mosser, D. M. (2003). "The many faces of macrophage activation." J Leukoc Biol **73**(2): 209-212.
- Mueller, M. J. (1998). "Radically novel prostaglandins in animals and plants: the isoprostanes." Chem Biol **5**(12): R323-333.
- Muhl, H. and J. Pfeilschifter (2003). "Anti-inflammatory properties of pro-inflammatory interferon-gamma." Int Immunopharmacol **3**(9): 1247-1255.
- Mukherjee, P. K., V. L. Marcheselli, et al. (2004). "Neuroprotectin D1: a docosahexaenoic acid-derived docosatriene protects human retinal pigment epithelial cells from oxidative stress." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(22): 8491-8496.
- Mutungi, G., D. Waters, et al. (2010). "Eggs distinctly modulate plasma carotenoid and lipoprotein subclasses in adult men following a carbohydrate-restricted diet." J Nutr Biochem **21**(4): 261-267.
- Nagineeni, C. N., R. Raju, et al. (2014). "Resveratrol Suppresses Expression of VEGF by Human Retinal Pigment Epithelial Cells: Potential Nutraceutical for Age-related Macular Degeneration." Aging Dis **5**(2): 88-100.
- Nagineeni, C. N., W. Samuel, et al. (2003). "Transforming growth factor-beta induces expression of vascular endothelial growth factor in human retinal pigment epithelial cells: involvement of mitogen-activated protein kinases." J Cell Physiol **197**(3): 453-462.
- Naka, T., N. Nishimoto, et al. (2002). "The paradigm of IL-6: from basic science to medicine." Arthritis Res **4 Suppl 3**: S233-242.
- Nakagawa, T. and J. Yuan (2000). "Cross-talk between two cysteine protease families. Activation of caspase-12 by calpain in apoptosis." J Cell Biol **150**(4): 887-894.
- Nathan, B. P., S. Bellosta, et al. (1994). "Differential effects of apolipoproteins E3 and E4 on neuronal growth in vitro." Science **264**(5160): 850-852.
- Neale, B. M., J. Fagerness, et al. (2010). "Genome-wide association study of advanced age-related macular degeneration identifies a role of the hepatic lipase gene (LIPC)." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(16): 7395-7400.
- Negre-Salvayre, A., C. Coatrieux, et al. (2008). "Advanced lipid peroxidation end products in oxidative damage to proteins. Potential role in diseases and therapeutic prospects for the inhibitors." Br J Pharmacol **153**(1): 6-20.
- Nir, I., C. Liu, et al. (1999). "Light treatment enhances photoreceptor survival in dystrophic retinas of Royal College of Surgeons rats." Invest Ophthalmol Vis Sci **40**(10): 2383-2390.



- Niu, S. L., D. C. Mitchell, et al. (2001). "Optimization of receptor-G protein coupling by bilayer lipid composition II: formation of metarhodopsin II-transducin complex." J Biol Chem **276**(46): 42807-42811.
- Noell, W. K. (1979). "Effects of environmental lighting and dietary vitamin A on the vulnerability of the retina to light damage." Photochem Photobiol **29**(4): 717-723.
- Noell, W. K. and R. Albrecht (1971). "Irreversible effects on visible light on the retina: role of vitamin A." Science **172**(3978): 76-79.
- Noell, W. K., V. S. Walker, et al. (1966). "Retinal damage by light in rats." Invest Ophthalmol **5**(5): 450-473.
- Nourooz-Zadeh, J., B. Halliwell, et al. (1997). "Evidence for the formation of F3-isoprostanes during peroxidation of eicosapentaenoic acid." Biochem Biophys Res Commun **236**(2): 467-472.
- Nowak, J. Z. (2013). "Oxidative stress, polyunsaturated fatty acids-derived oxidation products and bisretinoids as potential inducers of CNS diseases: focus on age-related macular degeneration." Pharmacol Rep **65**(2): 288-304.
- Omenn, G. S., G. E. Goodman, et al. (1996). "Effects of a combination of beta carotene and vitamin A on lung cancer and cardiovascular disease." N Engl J Med **334**(18): 1150-1155.
- Oprian, D. D., A. B. Asenjo, et al. (1991). "Design, chemical synthesis, and expression of genes for the three human color vision pigments." Biochemistry **30**(48): 11367-11372.
- Organisciak, D. T., M. Li, et al. (1999). "Photoreceptor cell damage by light in young Royal College of Surgeons rats." Curr Eye Res **19**(2): 188-196.
- Organisciak, D. T. and W. K. Noell (1977). "The rod outer segment phospholipid/opsin ratio of rats maintained in darkness or cyclic light." Invest Ophthalmol Vis Sci **16**(2): 188-190.
- Organisciak, D. T., H. M. Wang, et al. (1985). "The protective effect of ascorbate in retinal light damage of rats." Invest Ophthalmol Vis Sci **26**(11): 1580-1588.
- Parisi, V., M. Tedeschi, et al. (2008). "Carotenoids and antioxidants in age-related maculopathy italian study: multifocal electroretinogram modifications after 1 year." Ophthalmology **115**(2): 324-333 e322.
- Penfold, P., M. Killingsworth, et al. (1984). "An ultrastructural study of the role of leucocytes and fibroblasts in the breakdown of Bruch's membrane." Aust J Ophthalmol **12**(1): 23-31.
- Penfold, P. L., M. C. Killingsworth, et al. (1985). "Senile macular degeneration: the involvement of immunocompetent cells." Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol **223**(2): 69-76.
- Peng, Y., D. A. Martin, et al. (2007). "Innate and adaptive immune response to apoptotic cells." J Autoimmun **29**(4): 303-309.
- Penn, J. S. and T. P. Williams (1986). "Photostasis: regulation of daily photon-catch by rat retinas in response to various cyclic illuminances." Exp Eye Res **43**(6): 915-928.
- Petit, P. X., N. Zamzami, et al. (1997). "Implication of mitochondria in apoptosis." Mol Cell Biochem **174**(1-2): 185-188.
- Pintea, A., D. Rugina, et al. (2011). "Antioxidant effect of trans-resveratrol in cultured human retinal pigment epithelial cells." J Ocul Pharmacol Ther **27**(4): 315-321.
- Plafker, S. M., G. B. O'Mealey, et al. (2012). "Mechanisms for countering oxidative stress and damage in retinal pigment epithelium." Int Rev Cell Mol Biol **298**: 135-177.
- Plestina-Borjan, I. and M. Klinger-Lasic (2007). "Long-term exposure to solar ultraviolet radiation as a risk factor for age-related macular degeneration." Coll Antropol **31 Suppl 1**: 33-38.
- Pyper, S. R., N. Viswakarma, et al. (2010). "PPARalpha: energy combustion, hypolipidemia, inflammation and cancer." Nucl Recept Signal **8**: e002.



- Qin, S., Y. Lu, et al. (2014). "Resveratrol protects RPE cells from sodium iodate by modulating PPARalpha and PPARdelta." Exp Eye Res **118**: 100-108.
- Rahal, A., A. Kumar, et al. (2014). "Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: the interplay." Biomed Res Int **2014**: 761264.
- Ramchani-Ben Othman, K., C. Cercy, et al. (2015). "Dietary supplement enriched in antioxidants and omega-3 protects from progressive light-induced retinal degeneration." PLoS One **10**(6): e0128395.
- Ramrattan, R. S., T. L. van der Schaft, et al. (1994). "Morphometric analysis of Bruch's membrane, the choriocapillaris, and the choroid in aging." Invest Ophthalmol Vis Sci **35**(6): 2857-2864.
- Ranchon, I., J. M. Gorrard, et al. (1999). "Functional protection of photoreceptors from light-induced damage by dimethylthiourea and Ginkgo biloba extract." Invest Ophthalmol Vis Sci **40**(6): 1191-1199.
- Rao, R. V., E. Hermel, et al. (2001). "Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. Mechanism of caspase activation." J Biol Chem **276**(36): 33869-33874.
- Rapoport, S. I. (2008). "Brain arachidonic and docosahexaenoic acid cascades are selectively altered by drugs, diet and disease." Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids **79**(3-5): 153-156.
- Rapp, L. M., S. S. Maple, et al. (2000). "Lutein and zeaxanthin concentrations in rod outer segment membranes from perifoveal and peripheral human retina." Invest Ophthalmol Vis Sci **41**(5): 1200-1209.
- Redenti, S. and R. L. Chappell (2004). "Localization of zinc transporter-3 (ZnT-3) in mouse retina." Vision Res **44**(28): 3317-3321.
- Redenti, S. and R. L. Chappell (2007). "Muller cell zinc transporter-3 labeling suggests a role in outer retina zinc homeostasis." Mol Med **13**(7-8): 376-379.
- Resnikoff, S., D. Pascolini, et al. (2008). "Global magnitude of visual impairment caused by uncorrected refractive errors in 2004." Bull World Health Organ **86**(1): 63-70.
- Richer, S., W. Stiles, et al. (2004). "Double-masked, placebo-controlled, randomized trial of lutein and antioxidant supplementation in the intervention of atrophic age-related macular degeneration: the Veterans LAST study (Lutein Antioxidant Supplementation Trial)." Optometry **75**(4): 216-230.
- Richer, S., W. Stiles, et al. (2013). "Observation of human retinal remodeling in octogenarians with a resveratrol based nutritional supplement." Nutrients **5**(6): 1989-2005.
- Ricote, M., A. C. Li, et al. (1998). "The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation." Nature **391**(6662): 79-82.
- Rigamonti, E., G. Chinetti-Gbaguidi, et al. (2008). "Regulation of macrophage functions by PPAR-alpha, PPAR-gamma, and LXRs in mice and men." Arterioscler Thromb Vasc Biol **28**(6): 1050-1059.
- Rivera, A., S. A. Fisher, et al. (2005). "Hypothetical LOC387715 is a second major susceptibility gene for age-related macular degeneration, contributing independently of complement factor H to disease risk." Hum Mol Genet **14**(21): 3227-3236.
- Rivest, S. (2009). "Regulation of innate immune responses in the brain." Nat Rev Immunol **9**(6): 429-439.
- Roberts, L. J., 2nd and G. L. Milne (2009). "Isoprostanes." J Lipid Res **50 Suppl**: S219-223.
- Robison, W. G., Jr., T. Kuwabara, et al. (1979). "Vitamin E deficiency and the retina: photoreceptor and pigment epithelial changes." Invest Ophthalmol Vis Sci **18**(7): 683-690.
- Rodriguez de Turco, E. B., D. Deretic, et al. (1997). "Post-Golgi vesicles cotransport docosahexaenoyl-phospholipids and rhodopsin during frog photoreceptor membrane biogenesis." J Biol Chem **272**(16): 10491-10497.



- Rodriguez, J. and Y. Lazebnik (1999). "Caspase-9 and APAF-1 form an active holoenzyme." Genes Dev **13**(24): 3179-3184.
- Rodriguez, M., E. Domingo, et al. (2014). "Polarization of the innate immune response by prostaglandin E2: a puzzle of receptors and signals." Mol Pharmacol **85**(1): 187-197.
- Roig-Perez, S., F. Guardiola, et al. (2004). "Lipid peroxidation induced by DHA enrichment modifies paracellular permeability in Caco-2 cells: protective role of taurine." J Lipid Res **45**(8): 1418-1428.
- Roodenburg, A. J., R. Leenen, et al. (2000). "Amount of fat in the diet affects bioavailability of lutein esters but not of alpha-carotene, beta-carotene, and vitamin E in humans." Am J Clin Nutr **71**(5): 1187-1193.
- Rosen, E. D. and B. M. Spiegelman (2001). "PPARgamma : a nuclear regulator of metabolism, differentiation, and cell growth." J Biol Chem **276**(41): 37731-37734.
- Rotstein, N. P., G. L. Pennacchiotti, et al. (1996). "Active synthesis of C24:5, n-3 fatty acid in retina." Biochem J **316** ( Pt 3): 859-864.
- Rozanowska, M., J. Jarvis-Evans, et al. (1995). "Blue light-induced reactivity of retinal age pigment. In vitro generation of oxygen-reactive species." J Biol Chem **270**(32): 18825-18830.
- Rozanowska, M., J. Wessels, et al. (1998). "Blue light-induced singlet oxygen generation by retinal lipofuscin in non-polar media." Free Radic Biol Med **24**(7-8): 1107-1112.
- Ruiz-Vela, A., G. Gonzalez de Buitrago, et al. (1999). "Implication of calpain in caspase activation during B cell clonal deletion." EMBO J **18**(18): 4988-4998.
- Rutar, M., R. Natoli, et al. (2012). "Small interfering RNA-mediated suppression of Ccl2 in Muller cells attenuates microglial recruitment and photoreceptor death following retinal degeneration." J Neuroinflammation **9**: 221.
- Saari, J. C. and L. Bredberg (1982). "Enzymatic reduction of 11-cis-retinal bound to cellular retinal-binding protein." Biochim Biophys Acta **716**(2): 266-272.
- Saari, J. C., M. Nawrot, et al. (2001). "Visual cycle impairment in cellular retinaldehyde binding protein (CRALBP) knockout mice results in delayed dark adaptation." Neuron **29**(3): 739-748.
- Sadun, A. C., A. A. Sadun, et al. (1984). "Solar retinopathy. A biophysical analysis." Arch Ophthalmol **102**(10): 1510-1512.
- Sakai, A., Y. Sugawara, et al. (2008). "Identification of IL-18 and Th17 cells in salivary glands of patients with Sjogren's syndrome, and amplification of IL-17-mediated secretion of inflammatory cytokines from salivary gland cells by IL-18." J Immunol **181**(4): 2898-2906.
- Saleh, M., J. C. Mathison, et al. (2006). "Enhanced bacterial clearance and sepsis resistance in caspase-12-deficient mice." Nature **440**(7087): 1064-1068.
- SanGiovanni, J. P., E. Agron, et al. (2009). "Omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acid intake inversely associated with 12-year progression to advanced age-related macular degeneration." Arch Ophthalmol **127**(1): 110-112.
- SanGiovanni, J. P. and E. Y. Chew (2005). "The role of omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in health and disease of the retina." Prog Retin Eye Res **24**(1): 87-138.
- SanGiovanni, J. P., E. Y. Chew, et al. (2007). "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." Arch Ophthalmol **125**(9): 1225-1232.
- Sarks, S. H. (1976). "Ageing and degeneration in the macular region: a clinico-pathological study." Br J Ophthalmol **60**(5): 324-341.
- Sarks, S. H., D. Van Driel, et al. (1980). "Softening of drusen and subretinal neovascularization." Trans Ophthalmol Soc U K **100**(3): 414-422.
- Sasaki, M., Y. Ozawa, et al. (2009). "Neuroprotective effect of an antioxidant, lutein, during retinal inflammation." Invest Ophthalmol Vis Sci **50**(3): 1433-1439.



- Schaumberg, D. A., W. G. Christen, et al. (2006). "A prospective assessment of the Y402H variant in complement factor H, genetic variants in C-reactive protein, and risk of age-related macular degeneration." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **47**(6): 2336-2340.
- Schmidt, S., M. A. Hauser, et al. (2006). "Cigarette smoking strongly modifies the association of LOC387715 and age-related macular degeneration." *Am J Hum Genet* **78**(5): 852-864.
- Schottelius, A. J., M. W. Mayo, et al. (1999). "Interleukin-10 signaling blocks inhibitor of kappaB kinase activity and nuclear factor kappaB DNA binding." *J Biol Chem* **274**(45): 31868-31874.
- Schreier, P. (2005). "Chemopreventive compounds in the diet." *Dev Ophthalmol* **38**: 1-58.
- Schremser, J. L. and T. P. Williams (1995). "Rod outer segment (ROS) renewal as a mechanism for adaptation to a new intensity environment. I. Rhodopsin levels and ROS length." *Exp Eye Res* **61**(1): 17-23.
- Schroder, K., P. J. Hertzog, et al. (2004). "Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions." *J Leukoc Biol* **75**(2): 163-189.
- Scorrano, L., S. A. Oakes, et al. (2003). "BAX and BAK regulation of endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>: a control point for apoptosis." *Science* **300**(5616): 135-139.
- Scott, B. L. and N. G. Bazan (1989). "Membrane docosaehaenoate is supplied to the developing brain and retina by the liver." *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**(8): 2903-2907.
- Seddon, J. M., U. A. Ajani, et al. (1994). "Dietary carotenoids, vitamins A, C, and E, and advanced age-related macular degeneration. Eye Disease Case-Control Study Group." *JAMA* **272**(18): 1413-1420.
- Seddon, J. M., J. Cote, et al. (2003). "Progression of age-related macular degeneration: association with dietary fat, transunsaturated fat, nuts, and fish intake." *Arch Ophthalmol* **121**(12): 1728-1737.
- Seddon, J. M., G. Gensler, et al. (2006). "C-reactive protein and homocysteine are associated with dietary and behavioral risk factors for age-related macular degeneration." *Nutrition* **22**(4): 441-443.
- Seddon, J. M., S. George, et al. (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**(7): 995-1001.
- Seddon, J. M., S. George, et al. (2006). "CFH gene variant, Y402H, and smoking, body mass index, environmental associations with advanced age-related macular degeneration." *Hum Hered* **61**(3): 157-165.
- Seddon, J. M., S. Sharma, et al. (2006). "Evaluation of the clinical age-related maculopathy staging system." *Ophthalmology* **113**(2): 260-266.
- Sen, E., A. Basu, et al. (2011). "Pre-conditioning induces the precocious differentiation of neonatal astrocytes to enhance their neuroprotective properties." *ASN Neuro* **3**(3): e00062.
- Sepp, T., J. C. Khan, et al. (2006). "Complement factor H variant Y402H is a major risk determinant for geographic atrophy and choroidal neovascularization in smokers and nonsmokers." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **47**(2): 536-540.
- Serhan, C. N., N. Chiang, et al. (2015). "The resolution code of acute inflammation: Novel pro-resolving lipid mediators in resolution." *Semin Immunol* **27**(3): 200-215.
- Serhan, C. N., A. Jain, et al. (2003). "Reduced inflammation and tissue damage in transgenic rabbits overexpressing 15-lipoxygenase and endogenous anti-inflammatory lipid mediators." *J Immunol* **171**(12): 6856-6865.
- Serhan, C. N. and N. A. Petasis (2011). "Resolvins and protectins in inflammation resolution." *Chem Rev* **111**(10): 5922-5943.
- Shen, J. K., A. Dong, et al. (2007). "Oxidative damage in age-related macular degeneration." *Histol Histopathol* **22**(12): 1301-1308.



- Sheu, S. J., N. C. Liu, et al. (2013). "Resveratrol stimulates mitochondrial bioenergetics to protect retinal pigment epithelial cells from oxidative damage." Invest Ophthalmol Vis Sci **54**(9): 6426-6438.
- Shroyer, N. F., R. A. Lewis, et al. (1999). "The rod photoreceptor ATP-binding cassette transporter gene, ABCR, and retinal disease: from monogenic to multifactorial." Vision Res **39**(15): 2537-2544.
- Shuster, T. A., F. Martin, et al. (1996). "Zinc causes an apparent increase in rhodopsin phosphorylation." Curr Eye Res **15**(10): 1019-1024.
- Sies, H. (1991). "Oxidative stress: from basic research to clinical application." Am J Med **91**(3C): 31S-38S.
- Silverpil, E., P. Glader, et al. (2011). "Impact of interleukin-17 on macrophage phagocytosis of apoptotic neutrophils and particles." Inflammation **34**(1): 1-9.
- Simon, M. V., D. L. Agnolazza, et al. (2015). "Synthesis of docosahexaenoic acid from eicosapentaenoic acid in retina neurons protects photoreceptors from oxidative stress." J Neurochem.
- Simonelli, F., M. Margaglione, et al. (2001). "Apolipoprotein E polymorphisms in age-related macular degeneration in an Italian population." Ophthalmic Res **33**(6): 325-328.
- Simonelli, F., F. Zarrilli, et al. (2002). "Serum oxidative and antioxidant parameters in a group of Italian patients with age-related maculopathy." Clin Chim Acta **320**(1-2): 111-115.
- Skoog, K. O. (1985). "Fast and slow artificial diurnal rhythms (light-darkness-light) and the rate of progression of retinal degeneration in dystrophic RCS rats. An electroretinographic study." Br J Ophthalmol **69**(6): 468-470.
- Slee, E. A., C. Adrain, et al. (1999). "Serial killers: ordering caspase activation events in apoptosis." Cell Death Differ **6**(11): 1067-1074.
- Sliney, D. H. (1997). "Optical radiation safety of medical light sources." Phys Med Biol **42**(5): 981-996.
- Smith, K. A. and R. M. Maizels (2014). "IL-6 controls susceptibility to helminth infection by impeding Th2 responsiveness and altering the Treg phenotype in vivo." Eur J Immunol **44**(1): 150-161.
- Smith, W., J. Assink, et al. (2001). "Risk factors for age-related macular degeneration: Pooled findings from three continents." Ophthalmology **108**(4): 697-704.
- Smith, W., P. Mitchell, et al. (1999). "Dietary antioxidants and age-related maculopathy: the Blue Mountains Eye Study." Ophthalmology **106**(4): 761-767.
- Snellen, E. L., A. L. Verbeek, et al. (2002). "Neovascular age-related macular degeneration and its relationship to antioxidant intake." Acta Ophthalmol Scand **80**(4): 368-371.
- Snodderly, D. M. (1995). "Evidence for protection against age-related macular degeneration by carotenoids and antioxidant vitamins." Am J Clin Nutr **62**(6 Suppl): 1448S-1461S.
- Sobajima, T., K. Tamiya-Koizumi, et al. (1986). "Effects of fatty acid modification of ascites tumor cells on pulmonary metastasis in rat." Jpn J Cancer Res **77**(7): 657-663.
- Soleas, G. J., J. Yan, et al. (2001). "Ultrasensitive assay for three polyphenols (catechin, quercetin and resveratrol) and their conjugates in biological fluids utilizing gas chromatography with mass selective detection." J Chromatogr B Biomed Sci Appl **757**(1): 161-172.
- Souied, E. H., P. Benlian, et al. (1998). "The epsilon4 allele of the apolipoprotein E gene as a potential protective factor for exudative age-related macular degeneration." Am J Ophthalmol **125**(3): 353-359.
- Souied, E. H., D. Ducroq, et al. (1999). "A novel ABCR nonsense mutation responsible for late-onset fundus flavimaculatus." Invest Ophthalmol Vis Sci **40**(11): 2740-2744.
- Souied, E. H., N. Leveziel, et al. (2005). "Y402H complement factor H polymorphism associated with exudative age-related macular degeneration in the French population." Mol Vis **11**: 1135-1140.



- Sparrow, J. R., H. R. Vollmer-Snarr, et al. (2003). "A2E-epoxides damage DNA in retinal pigment epithelial cells. Vitamin E and other antioxidants inhibit A2E-epoxide formation." *J Biol Chem* **278**(20): 18207-18213.
- Sperling, H. G., C. Johnson, et al. (1980). "Differential spectral photic damage to primate cones." *Vision Res* **20**(12): 1117-1125.
- Spraul, C. W., G. E. Lang, et al. (1996). "Morphometric analysis of the choroid, Bruch's membrane, and retinal pigment epithelium in eyes with age-related macular degeneration." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **37**(13): 2724-2735.
- Stahl, W. (2005). "Macular carotenoids: lutein and zeaxanthin." *Dev Ophthalmol* **38**: 70-88.
- Stangos, A. N., I. K. Petropoulos, et al. (2007). "Optical coherence tomography and multifocal electroretinogram findings in chronic solar retinopathy." *Am J Ophthalmol* **144**(1): 131-134.
- Stephens, R. J., D. S. Negi, et al. (1988). "Vitamin E distribution in ocular tissues following long-term dietary depletion and supplementation as determined by microdissection and gas chromatography-mass spectrometry." *Exp Eye Res* **47**(2): 237-245.
- Stevens, J. F. and C. S. Maier (2008). "Acrolein: sources, metabolism, and biomolecular interactions relevant to human health and disease." *Mol Nutr Food Res* **52**(1): 7-25.
- Stiles, M., G. P. Moiseyev, et al. (2015). "PBN (Phenyl-N-Tert-Butylnitron)-Derivatives Are Effective in Slowing the Visual Cycle and Rhodopsin Regeneration and in Protecting the Retina from Light-Induced Damage." *PLoS One* **10**(12): e0145305.
- Stillwell, W. and S. R. Wassall (2003). "Docosahexaenoic acid: membrane properties of a unique fatty acid." *Chem Phys Lipids* **126**(1): 1-27.
- Stoyanovsky, D. A., R. Goldman, et al. (1995). "Endogenous ascorbate regenerates vitamin E in the retina directly and in combination with exogenous dihydrolipoic acid." *Curr Eye Res* **14**(3): 181-189.
- Strauss, O. (2005). "The retinal pigment epithelium in visual function." *Physiol Rev* **85**(3): 845-881.
- Streit, W. J. (2002). "Microglia as neuroprotective, immunocompetent cells of the CNS." *Glia* **40**(2): 133-139.
- Strokin, M., M. Sergeeva, et al. (2003). "Docosahexaenoic acid and arachidonic acid release in rat brain astrocytes is mediated by two separate isoforms of phospholipase A2 and is differently regulated by cyclic AMP and Ca<sup>2+</sup>." *Br J Pharmacol* **139**(5): 1014-1022.
- Strokin, M., M. Sergeeva, et al. (2004). "Role of Ca<sup>2+</sup>-independent phospholipase A2 and n-3 polyunsaturated fatty acid docosahexaenoic acid in prostanoid production in brain: perspectives for protection in neuroinflammation." *Int J Dev Neurosci* **22**(7): 551-557.
- Subczynski, W. K., A. Wisniewska, et al. (2010). "Location of macular xanthophylls in the most vulnerable regions of photoreceptor outer-segment membranes." *Arch Biochem Biophys* **504**(1): 61-66.
- Sugiura, H. and M. Ichinose (2011). "Nitrate stress in inflammatory lung diseases." *Nitric Oxide* **25**(2): 138-144.
- Sundelin, S. P. and S. E. Nilsson (2001). "Lipofuscin-formation in retinal pigment epithelial cells is reduced by antioxidants." *Free Radic Biol Med* **31**(2): 217-225.
- Susin, S. A., H. K. Lorenzo, et al. (1999). "Mitochondrial release of caspase-2 and -9 during the apoptotic process." *J Exp Med* **189**(2): 381-394.
- Sutton, C., C. Brereton, et al. (2006). "A crucial role for interleukin (IL)-1 in the induction of IL-17-producing T cells that mediate autoimmune encephalomyelitis." *J Exp Med* **203**(7): 1685-1691.
- Szegezdi, E., U. Fitzgerald, et al. (2003). "Caspase-12 and ER-stress-mediated apoptosis: the story so far." *Ann N Y Acad Sci* **1010**: 186-194.
- Szel, A. and P. Rohlich (1992). "Two cone types of rat retina detected by anti-visual pigment antibodies." *Exp Eye Res* **55**(1): 47-52.



- Tan, J. S., J. J. Wang, et al. (2008). "Dietary antioxidants and the long-term incidence of age-related macular degeneration: the Blue Mountains Eye Study." *Ophthalmology* **115**(2): 334-341.
- Tanito, M., S. Kaidzu, et al. (2007). "Delayed loss of cone and remaining rod photoreceptor cells due to impairment of choroidal circulation after acute light exposure in rats." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **48**(4): 1864-1872.
- Tarallo, V., Y. Hirano, et al. (2012). "DICER1 loss and Alu RNA induce age-related macular degeneration via the NLRP3 inflammasome and MyD88." *Cell* **149**(4): 847-859.
- Tate, D. J., Jr., M. V. Miceli, et al. (1995). "Phagocytosis and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induce catalase and metallothionein gene expression in human retinal pigment epithelial cells." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **36**(7): 1271-1279.
- Taylor, H. R., B. Munoz, et al. (1990). "Visible light and risk of age-related macular degeneration." *Trans Am Ophthalmol Soc* **88**: 163-173; discussion 173-168.
- Terrasa, A., M. Guajardo, et al. (2000). "Selective inhibition of the non-enzymatic lipid peroxidation of phosphatidylserine in rod outer segments by alpha-tocopherol." *Mol Cell Biochem* **211**(1-2): 39-45.
- Topouzis, F., A. Koskosas, et al. (2007). "Foveomacular retinitis and associated optical coherence tomography findings." *Ophthalmic Surg Lasers Imaging* **38**(4): 333-335.
- Totan, Y., R. Yagci, et al. (2009). "Oxidative macromolecular damage in age-related macular degeneration." *Curr Eye Res* **34**(12): 1089-1093.
- Tracey, D., L. Klareskog, et al. (2008). "Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: a comprehensive review." *Pharmacol Ther* **117**(2): 244-279.
- Tseng, W. A., T. Thein, et al. (2013). "NLRP3 inflammasome activation in retinal pigment epithelial cells by lysosomal destabilization: implications for age-related macular degeneration." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **54**(1): 110-120.
- Tsuchiya, M., A. Asada, et al. (2002). "Smoking a single cigarette rapidly reduces combined concentrations of nitrate and nitrite and concentrations of antioxidants in plasma." *Circulation* **105**(10): 1155-1157.
- Turner, D., S. H. Zlotkin, et al. (2007). "Omega 3 fatty acids (fish oil) for maintenance of remission in Crohn's disease." *Cochrane Database Syst Rev*(2): CD006320.
- Turner, M. D., B. Nedjai, et al. (2014). "Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease." *Biochim Biophys Acta* **1843**(11): 2563-2582.
- Ucker, D. S., P. S. Obermiller, et al. (1992). "Genome digestion is a dispensable consequence of physiological cell death mediated by cytotoxic T lymphocytes." *Mol Cell Biol* **12**(7): 3060-3069.
- Ugarte, M. and N. N. Osborne (2014). "Recent advances in the understanding of the role of zinc in ocular tissues." *Metallomics* **6**(2): 189-200.
- Ugarte, M., N. N. Osborne, et al. (2013). "Iron, zinc, and copper in retinal physiology and disease." *Surv Ophthalmol* **58**(6): 585-609.
- Valko, M., C. J. Rhodes, et al. (2006). "Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer." *Chem Biol Interact* **160**(1): 1-40.
- van de Kraats, J. and D. van Norren (2007). "Optical density of the aging human ocular media in the visible and the UV." *J Opt Soc Am A Opt Image Sci Vis* **24**(7): 1842-1857.
- van der Veen, R. L., T. T. Berendschot, et al. (2009). "Correspondence between retinal reflectometry and a flicker-based technique in the measurement of macular pigment spatial profiles." *J Biomed Opt* **14**(6): 064046.
- Vanden Berghe, W., L. Vermeulen, et al. (2003). "A paradigm for gene regulation: inflammation, NF-kappaB and PPAR." *Adv Exp Med Biol* **544**: 181-196.
- Vanden Heuvel, J. P. (2012). "Nutrigenomics and nutrigenetics of omega3 polyunsaturated fatty acids." *Prog Mol Biol Transl Sci* **108**: 75-112.



- VandenLangenberg, G. M., J. A. Mares-Perlman, et al. (1998). "Associations between antioxidant and zinc intake and the 5-year incidence of early age-related maculopathy in the Beaver Dam Eye Study." Am J Epidemiol **148**(2): 204-214.
- Velilla, S., J. J. Garcia-Medina, et al. (2013). "Smoking and age-related macular degeneration: review and update." J Ophthalmol **2013**: 895147.
- Venza, I., M. Visalli, et al. (2012). "Association between oxidative stress and macromolecular damage in elderly patients with age-related macular degeneration." Aging Clin Exp Res **24**(1): 21-27.
- Villalpando Rodriguez, G. E. and A. Torriglia (2013). "Calpain 1 induce lysosomal permeabilization by cleavage of lysosomal associated membrane protein 2." Biochim Biophys Acta **1833**(10): 2244-2253.
- Vojnikovic, B., S. Njiric, et al. (2007). "Ultraviolet sun radiation and incidence of age-related macular degeneration on Croatian Island Rab." Coll Antropol **31 Suppl 1**: 43-44.
- Wada, M., C. M. Gelfman, et al. (2001). "Density-dependent expression of FGF-2 in response to oxidative stress in RPE cells in vitro." Curr Eye Res **23**(3): 226-231.
- Wallace, D. C. (2009). "Mitochondria, bioenergetics, and the epigenome in eukaryotic and human evolution." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **74**: 383-393.
- Wallace, D. C. (2010). "Mitochondrial DNA mutations in disease and aging." Environ Mol Mutagen **51**(5): 440-450.
- Walle, T., F. Hsieh, et al. (2004). "High absorption but very low bioavailability of oral resveratrol in humans." Drug Metab Dispos **32**(12): 1377-1382.
- Wang, J. J., E. Rochtchina, et al. (2007). "Ten-year incidence and progression of age-related maculopathy: the blue Mountains Eye Study." Ophthalmology **114**(1): 92-98.
- Wang, K. K., R. Posmantur, et al. (1998). "Caspase-mediated fragmentation of calpain inhibitor protein calpastatin during apoptosis." Arch Biochem Biophys **356**(2): 187-196.
- Wang, N. and R. E. Anderson (1993). "Synthesis of docosahexaenoic acid by retina and retinal pigment epithelium." Biochemistry **32**(49): 13703-13709.
- Wang, N., H. Liang, et al. (2014). "Molecular mechanisms that influence the macrophage m1-m2 polarization balance." Front Immunol **5**: 614.
- Wang, W., S. L. Connor, et al. (2007). "Effect of dietary lutein and zeaxanthin on plasma carotenoids and their transport in lipoproteins in age-related macular degeneration." Am J Clin Nutr **85**(3): 762-769.
- Wang, Y., S. L. Connor, et al. (2007). "The selective retention of lutein, meso-zeaxanthin and zeaxanthin in the retina of chicks fed a xanthophyll-free diet." Exp Eye Res **84**(3): 591-598.
- Wang, Z. Y., G. Danscher, et al. (2003). "Zinc transporter 3 and zinc ions in the rodent superior cervical ganglion neurons." Neuroscience **120**(3): 605-616.
- Wangsa-Wirawan, N. D. and R. A. Linsenmeier (2003). "Retinal oxygen: fundamental and clinical aspects." Arch Ophthalmol **121**(4): 547-557.
- Wankun, X., Y. Wenzhen, et al. (2011). "Protective effect of paeoniflorin against oxidative stress in human retinal pigment epithelium in vitro." Mol Vis **17**: 3512-3522.
- Weigel, A. L., J. T. Handa, et al. (2002). "Microarray analysis of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-, HNE-, or tBH-treated ARPE-19 cells." Free Radic Biol Med **33**(10): 1419-1432.
- Wenzel, A., C. E. Reme, et al. (2001). "The Rpe65 Leu450Met variation increases retinal resistance against light-induced degeneration by slowing rhodopsin regeneration." J Neurosci **21**(1): 53-58.
- West, S., S. Vitale, et al. (1994). "Are antioxidants or supplements protective for age-related macular degeneration?" Arch Ophthalmol **112**(2): 222-227.
- Wiegand, R. D., N. M. Giusto, et al. (1983). "Evidence for rod outer segment lipid peroxidation following constant illumination of the rat retina." Invest Ophthalmol Vis Sci **24**(10): 1433-1435.



- Wiegand, R. D., C. D. Joel, et al. (1986). "Polyunsaturated fatty acids and vitamin E in rat rod outer segments during light damage." Invest Ophthalmol Vis Sci **27**(5): 727-733.
- Wiegand, R. D., C. A. Koutz, et al. (1991). "Conservation of docosahexaenoic acid in rod outer segments of rat retina during n-3 and n-6 fatty acid deficiency." J Neurochem **57**(5): 1690-1699.
- Wilkinson, J. T. and F. W. Fraunfelder (2011). "Use of herbal medicines and nutritional supplements in ocular disorders: an evidence-based review." Drugs **71**(18): 2421-2434.
- Williams, T. P. and W. L. Howell (1983). "Action spectrum of retinal light-damage in albino rats." Invest Ophthalmol Vis Sci **24**(3): 285-287.
- Wills, N. K., V. M. Ramanujam, et al. (2008). "Copper and zinc distribution in the human retina: relationship to cadmium accumulation, age, and gender." Exp Eye Res **87**(2): 80-88.
- Woodall, A. A., S. W. Lee, et al. (1997). "Oxidation of carotenoids by free radicals: relationship between structure and reactivity." Biochim Biophys Acta **1336**(1): 33-42.
- Woodford, B. J., M. O. Tso, et al. (1983). "Reduced and oxidized ascorbates in guinea pig retina under normal and light-exposed conditions." Invest Ophthalmol Vis Sci **24**(7): 862-867.
- Wrona, M., M. Rozanowska, et al. (2004). "Zeaxanthin in combination with ascorbic acid or alpha-tocopherol protects ARPE-19 cells against photosensitized peroxidation of lipids." Free Radic Biol Med **36**(9): 1094-1101.
- Wu, Y. C., G. M. Stanfield, et al. (2000). "NUC-1, a caenorhabditis elegans DNase II homolog, functions in an intermediate step of DNA degradation during apoptosis." Genes Dev **14**(5): 536-548.
- Wyllie, A. H., J. F. Kerr, et al. (1980). "Cell death: the significance of apoptosis." Int Rev Cytol **68**: 251-306.
- Yakes, F. M. and B. Van Houten (1997). "Mitochondrial DNA damage is more extensive and persists longer than nuclear DNA damage in human cells following oxidative stress." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(2): 514-519.
- Yang, J. L., L. Weissman, et al. (2008). "Mitochondrial DNA damage and repair in neurodegenerative disorders." DNA Repair (Amst) **7**(7): 1110-1120.
- Yang, L. Y., A. Kuksis, et al. (1990). "Lipolysis of menhaden oil triacylglycerols and the corresponding fatty acid alkyl esters by pancreatic lipase in vitro: a reexamination." J Lipid Res **31**(1): 137-147.
- Yannuzzi, L. A., Y. L. Fisher, et al. (1987). "Solar retinopathy: a photobiological and geophysical analysis." Trans Am Ophthalmol Soc **85**: 120-158.
- Yau, K. W. and K. Nakatani (1985). "Light-induced reduction of cytoplasmic free calcium in retinal rod outer segment." Nature **313**(6003): 579-582.
- Yin, S. J., C. F. Chou, et al. (2003). "Human class IV alcohol dehydrogenase: kinetic mechanism, functional roles and medical relevance." Chem Biol Interact **143-144**: 219-227.
- Yoneda, T., K. Imaizumi, et al. (2001). "Activation of caspase-12, an endoplasmic reticulum (ER) resident caspase, through tumor necrosis factor receptor-associated factor 2-dependent mechanism in response to the ER stress." J Biol Chem **276**(17): 13935-13940.
- Yorek, M., E. Leeney, et al. (1989). "Effect of fatty acid composition on insulin and IGF-I binding in retinoblastoma cells." Invest Ophthalmol Vis Sci **30**(10): 2087-2092.
- Yoshimura, T., E. A. Robinson, et al. (1989). "Purification and amino acid analysis of two human monocyte chemoattractants produced by phytohemagglutinin-stimulated human blood mononuclear leukocytes." J Immunol **142**(6): 1956-1962.
- Young, R. W. (1967). "The renewal of photoreceptor cell outer segments." J Cell Biol **33**(1): 61-72.
- Young, R. W. (1988). "Solar radiation and age-related macular degeneration." Surv Ophthalmol **32**(4): 252-269.



- Yu, Y., T. R. Bhangale, et al. (2011). "Common variants near FRK/COL10A1 and VEGFA are associated with advanced age-related macular degeneration." Hum Mol Genet **20**(18): 3699-3709.
- Zarepari, S., K. E. Branham, et al. (2005). "Strong association of the Y402H variant in complement factor H at 1q32 with susceptibility to age-related macular degeneration." Am J Hum Genet **77**(1): 149-153.
- Zarepari, S., A. C. Reddick, et al. (2004). "Association of apolipoprotein E alleles with susceptibility to age-related macular degeneration in a large cohort from a single center." Invest Ophthalmol Vis Sci **45**(5): 1306-1310.
- Zhang, H., S. He, et al. (2015). "SIRT1 mediated inhibition of VEGF/VEGFR2 signaling by Resveratrol and its relevance to choroidal neovascularization." Cytokine **76**(2): 549-552.
- Zhu, Y., K. Valter, et al. (2010). "Environmental damage to the retina and preconditioning: contrasting effects of light and hyperoxic stress." Invest Ophthalmol Vis Sci **51**(9): 4821-4830.



## **Sites internet**

1. Statistiques sanitaires OMS, 2014,  
[http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/131954/1/9789240692688\\_fre.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/131954/1/9789240692688_fre.pdf) (consulté en septembre 2015)
2. La directive 2002/46/CE  
<http://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000000637294&dateTexte=> (consulté en février 2015)





## Résumé

Les compléments alimentaires à visé oculaire qui envahissent le marché, contiennent dans la majorité des cas des oméga-3, des vitamines, des oligoéléments auxquels sont associés d'autres molécules connues pour leurs propriétés anti-inflammatoires et/ou anti-oxydantes. Néanmoins, à notre connaissance il n'existait pas d'étude portant sur les formes finalisées complexes de ces compléments. **Notre projet a donc pour objectif** d'évaluer et de caractériser *in-vivo* et *in-vitro* l'effet protecteur sur les cellules rétiniennes d'une supplémentation alimentaire à visé oculaire commercialisée en France et en Tunisie. Ce supplément contient des oméga-3, des caroténoïdes, des vitamines, des oligoéléments et du résvératrol. *In-vivo*, nous avons utilisé un modèle de dégénérescence rétinienne progressive induite par la lumière et *in-vitro* un modèle de mort des cellules d'épithélium pigmentaire rétinien (ARPE-19) induite par le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

Dans **une première étape** nous avons mis en évidence que le complément alimentaire protège la fonction (électrorétinographie, ERG) et la structure (histologie et comptage de cellules apoptotiques) de la rétine contre les lésions induites par la lumière et protège les cellules ARPE-19 contre le stress oxydant induit par le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (MTT). Dans **une deuxième étape**, nous avons montré qu'une semaine de supplémentation entraîne une modification du contenu en acides gras dans le plasma et les rétines *in vivo*, et dans les cellules ARPE-19 *in-vitro*, caractérisée par une augmentation des taux d'EPA et DPA, deux précurseurs de DHA (HPLC). *In-vivo*, ni la quantité (spectromètre) ni la vitesse de régénération de la rhodopsine (ERG) ne sont affectées. Au cours de l'exposition à la lumière, l'expression des cytokines (milliplex) est orientée vers un profil anti-inflammatoire et l'expression génique (qPCR) d'iPLA<sub>2</sub>, PPAR- $\alpha$ , Caspase-12 est maintenue élevée tout au long de l'exposition à la lumière cyclique intense chez les animaux supplémentés.

En conclusion, nous avons émis l'hypothèse que l'accumulation préférentielle des acides gras polyinsaturés à longue chaîne (EPA et DPA) participe à l'effet protecteur du complément alimentaire en permettant 1/ un renouvellement facilité du DHA rétinien et 2/ ainsi le maintien de l'activité d'iPLA<sub>2</sub>. Le DHA libéré des membranes activerait les voies de signalisation anti-inflammatoire et anti-oxydante par l'intermédiaire du récepteur nucléaire PPAR- $\alpha$ .

**Mots clés :** dégénérescence rétinienne progressive induite par la lumière, complément alimentaire, oméga-3, antioxydants, inflammation, cytokines, stress oxydant, isoprostanes, cellules ARPE-19.