



HAL
open science

Métabolisme des plasmalogènes dans les cellules gliales rétiniennes : interactions cellule-cellule au cours du développement vasculaire rétinien normal ou pathologique

Julie Mazzocco

► **To cite this version:**

Julie Mazzocco. Métabolisme des plasmalogènes dans les cellules gliales rétiniennes : interactions cellule-cellule au cours du développement vasculaire rétinien normal ou pathologique. Sciences agricoles. Université Bourgogne Franche-Comté, 2017. Français. NNT : 2017UBFCI003 . tel-02084862

HAL Id: tel-02084862

<https://theses.hal.science/tel-02084862>

Submitted on 29 Mar 2019

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.

UNIVERSITE DE BOURGOGNE FRANCHE-COMTE

Ecole doctorale Environnements – Santé

THESE

Pour l'obtention du grade de

Docteur de l'Université de Bourgogne Franche-Comté

Discipline : Science de la vie – Biologie Cellulaire

Présentée et soutenue publiquement par

Julie MAZZOCCO

Le 14 février 2017

**Métabolisme des plasmalogènes dans les cellules gliales
rétiniennes : interactions cellule-cellule au cours du
développement vasculaire rétinien normal ou pathologique**

Directeur de thèse

Alain BRON

Co-directeur

Niyazi ACAR

| | | |
|----------------------------------|---|-----------------------|
| Mme RANCHON-COLE Isabelle | <i>Professeur, Université d'Auvergne</i> | Rapporteur |
| Mr PAQUES Michel | <i>Professeur, Université Pierre et Marie Curie Praticien Hospitalier, CHNO des 1520, Paris</i> | Rapporteur |
| Mr BELLENGER Jérôme | <i>Maitre de Conférences des Universités Université de Bourgogne Franche-Comté</i> | Examineur |
| M PERCHE Olivier | <i>Ingénieur de Recherche, CHR Orléans INEM, CNRS, Université d'Orléans</i> | Examineur |
| Mr BRON Alain | <i>Professeur, Université de Bourgogne Praticien Hospitalier, CHU Dijon</i> | Directeur de thèse |
| Mr ACAR Niyazi | <i>Chargé de Recherche, INRA, Dijon</i> | Co-directeur de thèse |

Remerciements

Cette thèse a été réalisée au sein de l'équipe Œil, Nutrition et Signalisation à l'UMR CSGA INRA 1324 CNRS 6265 dirigée par Luc Pénicaud jusqu'à la fin de l'année 2016 et à présent par Lionel Bretilon.

Mes remerciements s'adressent en premier lieu à mon co-directeur de thèse Niyazi Acar, sans qui cette thèse n'aurait pas pu avoir lieu. Merci de m'avoir confié ce travail et de m'avoir fait confiance durant ces trois ans (et quelques mois). Merci pour ton encadrement, ton suivi et pour ces moments un peu stressants qui m'ont fait progresser dans le bon sens. Merci d'avoir toujours été disponible pour discuter de la mise en place de nouveaux protocoles, de mes résultats, ainsi que pour m'avoir aidé à la rédaction d'articles et enfin à relire et corriger ma thèse. Merci également de m'avoir permis de communiquer sur mes travaux de thèse au cours de congrès internationaux, tel que l'ARVO. Bon courage dans tes nouvelles fonctions de chef d'équipe, que je pense, tu gèreras à merveille.

Je remercie mon directeur de thèse, le Professeur Alain Bron, pour ses conseils, ses corrections de publications et de thèse et pour les moments conviviaux partagés en congrès.

Je remercie également notre chef d'équipe, Lionel Bretilon, pour m'avoir offert l'opportunité d'intégrer l'équipe Œil, Nutrition et Signalisation. Merci pour les moments sportifs partagés durant les congrès (les trottoirs de Denver garderont un souvenir de mon passage !).

Je tiens également à remercier les membres de mon comité de thèse Jérôme Bellenger et Florian Sennlaub pour leurs conseils pertinents et constructifs.

Merci aux membres de mon jury qui ont accepté d'évaluer mes travaux, Madame Isabelle Ranchon-Cole pour avoir accepté d'être rapporteur et de présider le jury de ma soutenance de thèse et Monsieur Michel Paques d'avoir accepté de juger mon travail. Je remercie également Messieurs Olivier Perche et Jérôme Bellenger d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse.

Merci au Professeur Catherine Creuzot-Garcher, pour son aide à la mise en place de l'étude clinique et pour ses relectures d'articles.

Merci à toute l'équipe de l'animalerie Alexia, Elise, Laurence pour la gestion et les soins apportés à tous les animaux nous permettant de réaliser nos travaux de recherche.

Merci également à toutes les personnes du CSGA qui m'ont apporté leur aide technique et scientifique, notamment Claire, Sylvie, Vincent et Xavier.

Je tiens maintenant à remercier l'ensemble de l'équipe 6 et les membres de la plateforme du bout du couloir pour m'avoir accueilli au sein de cette grande famille à laquelle j'ai adoré être intégrée. Merci pour tous les bons moments partagés, le rendez-vous pause-café quotidien, le 20 minutes, les pots en toutes occasions, les pique-niques, les repas de Noël et surtout pour votre bonne humeur !

Merci aux stagiaires qui ont contribué à mon projet, Charlène et Pierre-Manuel, mes « petits » BTS super efficaces et super sympas et Charlotte sans qui le projet d'étude clinique OmégaROP n'aurait pas eu lieu.

Merci Laurent pour ta grande disponibilité et pour toute l'aide technique que tu m'as apporté, que ce soit en culture cellulaire ou au cours des expériences de communication calcique.

Merci Béné pour ta bonne humeur et pour ton aide que ce soit en culture cellulaire ou en biochimie.

Merci Marie-Annick de m'avoir initiée aux coupes au cryostat et de m'avoir apporté ton aide technique au niveau de l'immunomarquage. Merci également pour tes conseils et astuces de vie dijonnaise à mes débuts ici.

Merci Lucy pour ta gentillesse, ton soutien et pour la découverte du yoga !

Merci Stéphane pour ta gentillesse, ta bonne humeur, ton soutien, tous nos petits papotages sur la vie, la coupe bad de Montpellier... Merci également pour toutes les analyses que tu as réalisé pour moi !

Merci Élodie pour ta gentillesse, ta disponibilité, notamment en fin de thèse et pour les discussions sur l'avenir que nous avons pu avoir notamment à l'ARVO.

Merci Marie-Agnès pour ta gentillesse, ta bonne humeur et ta capacité à me rassurer dans certains moments de stress.

Merci Ségolène pour ton sourire toujours présent, ta gentillesse et ta disponibilité autant que possible avec ton emploi du temps plus que chargé.

Merci à la plateforme, quasiment équipe 6, Stéphanie, Olivier, Nico pour nos moment de détente à la pause-café.

Merci également à Rodolphe et Cynthia qui m'ont beaucoup appris en western à mes débuts de thèse.

Je tiens également à remercier toutes mes copines de thèse.

Sarah, pour ton soutien tout au long de ces trois années, nos moments de folies, toutes nos activités extra labo que je ne listerai pas, ce dernier été de rédaction... Merci d'avoir été et d'être encore là pour moi.

Estelle ma super coloc de moitié de thèse. Merci pour ton soutien, pour tous nos moments de vie partagés hors du labo, pour ta motivation sportive et pour ton expérience de thèse !

Elisa ma coloc de bureau au bel accent chantant. Merci pour ton sourire, ta capacité à prendre la vie du bon côté et pour tous ces moments hors labo également. Merci de m'avoir supportée dans cette fin de thèse et d'avoir toujours su me remonter le moral.

Zoé et Mathilde les supers « nouvelles » doctorantes du bout du couloir. Merci les filles pour tous ces moments partagés et sachez que je suis toujours disponible pour servir de cobaye à toutes vos pâtisseries. Merci Mathilde de m'avoir accueillie chez toi pour ces derniers mois avant soutenance et pour ton réconfort quand le moral n'était pas au top.

Mayssa (PPAP...) et Elise, nos bébés thésardes, je vous souhaite le meilleur pour vos thèses débutantes, je suis sûre que vous allez tout déchirer.

Valérie qui était là au départ, qui est partie puis revenue et qui termine en même temps que moi ! Merci pour ta bonne humeur et ton sourire toujours présent.

Je remercie également toutes les personnes qui ont fait partie de ma vie durant ces années dijonnaises et qui m'ont permis de manière plus ou moins indirecte de mener à bien ce projet de thèse.

Enfin, je souhaite remercier ma famille. Merci à mes parents pour leur soutien et leurs encouragements dans certains moments difficiles qui ont pu jalonné ma thèse. Merci beaucoup à mes deux sœurs pour nos appels souvent interminables et pour tous ces moments de bonheur partagés, nos vacances, weekends, festival et fêtes à trois ! Love you !

Résumé

Dans les pays industrialisés, les pathologies oculaires à composante vasculaires, que ce soit la rétinopathie du prématuré (ROP), la rétinopathie du diabétique ou la dégénérescence liée à l'âge, représentent la première cause de cécité respectivement chez l'enfant, l'adulte et la personne âgée. Plusieurs études sur l'homme ou sur des modèles animaux ont souligné le rôle crucial joué des acides gras polyinsaturés (AGPI) au cours de ces rétinopathies et notamment l'action préventive des acides gras polyinsaturés oméga 3 (AGPI n-3) sur l'angiogenèse pathologique. Ces AGPI sont estérifiés dans les glycérophospholipides constituant les membranes cellulaires. On les retrouve également dans une classe particulière de glycérophospholipides, les plasmalogènes. La particularité des plasmalogènes réside dans leur liaison vinyl-éther en position *sn*-1 au lieu d'une liaison ester dans les autres glycérophospholipides. Les AGPI sont libérés des plasmalogènes par une phospholipase indépendante au calcium, la iPLA2, pour devenir des métabolites actifs. Les plasmalogènes *via* la libération des AGPI joueraient un rôle dans la mise en place et la maturation du réseau vasculaire rétinien et ce, notamment grâce à la bonne mise en place du réseau astrocytaire. Les astrocytes et les cellules de Müller sont les cellules macrogliales qui servent de soutien physique et métabolique à la rétine. De plus, les cellules de Müller participent au métabolisme des lipides. L'objectif de ce travail de thèse a été d'évaluer l'implication des plasmalogènes dans le métabolisme des cellules de Müller et des astrocytes mais aussi dans la communication entre ces cellules macrogliales. Nous avons également étudié le profil lipidique d'enfants prématurés pour mettre en évidence de potentielles altérations du métabolisme des plasmalogènes chez des nouveau-nés développant une rétinopathie à composante vasculaire, la rétinopathie du prématuré (ROP). Pour ce faire nous avons étudié les effets d'une diminution en plasmalogènes et/ou en iPLA2 sur des cellules de Müller en culture primaire après avoir préalablement vérifié l'expression de l'enzyme clef de la biosynthèse des plasmalogènes. Nous avons ensuite étudié les effets d'une diminution des teneurs en plasmalogènes sur la communication calcique entre les cellules de Müller et les astrocytes. Nos résultats ont montré que les cellules de Müller expriment l'enzyme-clé de synthèse des plasmalogènes et que ces cellules sont plus riches en plasmalogènes que la rétine entière. Les plasmalogènes seraient impliqués dans le contrôle de la migration des cellules de Müller par l'action de la voie ERK1/2 MAPK. Ces effets ne semblent pas passer par la libération des AGPI. De plus nos résultats suggèrent une dégradation de la communication entre les astrocytes et les cellules de Müller en cas de diminution des teneurs en plasmalogènes dans les cellules de Müller. Enfin chez l'homme nous avons mis en évidence une

accumulation des AGPI n-6 au détriment des AGPI n-3 dans les érythrocytes des enfants développant une rétinopathie du prématuré et inversement dans le groupe d'enfants prématuré contrôle. L'ensemble de ces travaux confirme l'importance du métabolisme lipidique, et plus particulièrement celui des plasmalogènes, sur le fonctionnement de la rétine.

Mots clés : Plasmalogènes, rétine, cellules gliales, rétinopathie du prématuré, acides gras polyinsaturés.

Abstract

Retinal vascular disorders such as retinopathy of prematurity (ROP), diabetic retinopathy or age-related macular degeneration represent the first cause of vision loss at all ages in industrialized countries. Many epidemiological or animal studies have shown the involvement of polyunsaturated fatty acids (PUFA) in the regulation of vascular development and more specifically the beneficial properties of omega 3 PUFA (n-3 PUFA) against pathological vascularization. Those PUFA are esterified on glycerophospholipids (GP). GP are the primary constituents of the lipid bilayer of cell membranes. PUFA can be also esterified on a specific class of GP, called plasmalogens. Plasmalogens are characterized by the presence of a vinyl ether linkage at the *sn*-1 position of glycerol instead of an ester linkage as seen in other GP. PUFA are released from plasmalogens by a calcium-independent phospholipase (iPLA2). Free PUFA can be converted into biologically active metabolites. Plasmalogens may have an impact on the development and the maturation of retinal vascular network through the PUFA they release through the control of astrocyte template formation prior to vessel formation. Astrocytes and Müller cells are macroglial cells providing physical and metabolic supports to the retina. Müller cells are key actors of the retinal lipid metabolism. The aim of this work was to evaluate the involvement of plasmalogens in Müller cells and astrocytes metabolism as well as in the ability of these cells to communicate. On one hand, we have studied the effects of a decrease in plasmalogen biosynthesis and/or in iPLA2 activity on Müller cell physiology. Müller cells express a biosynthesis key enzyme of plasmalogen and reducing the biosynthesis of plasmalogens affects Müller cell ability to migrate through the ERK1/2 MAPK signalling. In a second series of studies, we studied the repercussions of such modifications on Müller cell physiology on their ability to communicate with retinal astrocytes through calcium signalling. Our results suggest that affecting plasmalogen metabolism in Müller cells alters the communication between astrocytes and Müller cells. Finally, and in order to investigate whether plasmalogen metabolism may be modified in a human disease displaying abnormal retinal vascular development, we performed a lipidomic study of circulating lipids in infants affected by retinopathy of prematurity. ROP was characterized by the accumulation of n-6 PUFA at the expense of n-3 PUFA, these changes being associated to plasmalogens. All these experiments confirm the importance of lipid metabolism, and especially plasmalogens, on the retina functioning.

Keywords: plasmalogen, retina, glial cells, retinopathy of prematurity, PUFA.

Table des matières

| | |
|--|-----------|
| Abréviations..... | 15 |
| Index des figures | 17 |
| Index des tableaux..... | 19 |
| Introduction..... | 21 |
| Chapitre I : Rappels | 25 |
| 1. Anatomie de l'oeil et de la rétine..... | 27 |
| 1.1. Les tuniques..... | 27 |
| 1.1.1. La tunique fibreuse..... | 27 |
| 1.1.2. La tunique uvéale | 28 |
| 1.1.3. La tunique nerveuse | 29 |
| 1.1.3.1. L'épithélium pigmentaire rétinien | 29 |
| 1.1.3.2. La rétine neurale | 30 |
| 1.1.3.2.1. Les cellules photoréceptrices..... | 31 |
| 1.1.3.2.2. Les cellules bipolaires | 32 |
| 1.1.3.2.3. Les cellules ganglionnaires..... | 32 |
| 1.1.3.2.4. Les cellules horizontales, amacrine et interplexiformes | 33 |
| 1.1.3.2.5. Les cellules gliales | 33 |
| 1.2. Les milieux transparents..... | 33 |
| 1.2.1. L'humeur aqueuse..... | 33 |
| 1.2.2. Le cristallin..... | 34 |
| 1.2.3. Le vitré | 34 |
| 1.3. Les systèmes vasculaires de l'œil | 34 |
| 1.3.1. Le système vasculaire rétinien | 36 |
| 1.3.2. Le système vasculaire choroidien..... | 36 |
| 1.3.3. La barrière hémato-rétinienne..... | 37 |
| 2. Le développement vasculaire de l'œil..... | 38 |
| 2.1. Le système vasculaire hyaloïde | 39 |
| 2.2. Le système vasculaire rétinien | 40 |
| 2.3. Le système vasculaire choroidien..... | 42 |
| 3. Intérêt des AGPI dans la prévention des rétinopathies à composantes vasculaires | 44 |

| | | |
|----------|---|------------|
| 3.1. | Acides gras polyinsaturés et dégénérescence maculaire liée à l'âge..... | 47 |
| 3.2. | Acides gras polyinsaturés et rétinopathie du diabétique | 51 |
| 3.3. | Acides gras polyinsaturés et rétinopathie des prématurés..... | 52 |
| 4. | La rétinopathie des prématurés..... | 54 |
| 4.1. | Les facteurs de risque de la ROP | 57 |
| 4.2. | Modèle animal présentant des phénotypes de ROP..... | 57 |
| 5. | Les plasmalogènes..... | 60 |
| 5.1. | Structure..... | 60 |
| 5.2. | Nomenclature..... | 61 |
| 5.3. | Distribution tissulaire des plasmalogènes..... | 61 |
| 5.4. | Biosynthèse des plasmalogènes..... | 64 |
| 5.5. | Fonctions des plasmalogènes..... | 67 |
| 5.5.1. | Propriétés physiques des membranes | 67 |
| 5.5.2. | Rôle anti-oxydant des plasmalogènes..... | 69 |
| 5.5.3. | Réservoirs de messagers secondaires et médiateurs lipidiques | 69 |
| 5.5.3.1. | Libération des AGPI par la iPLA2..... | 71 |
| 5.5.4. | Pathologies associées au métabolisme des plasmalogènes | 72 |
| 5.5.5. | Pathologies oculaires associées au métabolisme des plasmalogènes..... | 73 |
| 6. | Les cellules gliales rétiniennes..... | 75 |
| 6.1. | Les cellules de Müller | 75 |
| 6.1.1. | Structure et localisation des cellules de Müller | 75 |
| 6.1.2. | Rôle des cellules de Müller..... | 77 |
| 6.1.3. | Déficiences en cellules de Müller..... | 79 |
| 6.2. | Les astrocytes | 79 |
| 6.2.1. | Structure et localisation des astrocytes | 79 |
| 6.2.2. | Rôles des astrocytes | 80 |
| 6.3. | Communication entre les cellules macrogliales | 81 |
| 7. | Objectifs..... | 85 |
| | Chapitre 2 : Plasmalogènes et rétine..... | 87 |
| | Problématique | 89 |
| | Conclusions | 99 |
| | Chapitre 3 : Plasmalogènes et métabolisme des cellules de Müller | 101 |
| | Problématique | 103 |

| | |
|--|------------|
| Principaux résultats et conclusions..... | 143 |
| Chapitre 4 : Impact de la déficience en plasmalogènes sur les cellules gliales rétiniennes et leurs capacités à communiquer par ondes calciques | 147 |
| Problématique | 149 |
| Principaux résultats et conclusions..... | 186 |
| Chapitre 5 : Etude OmégaROP | 189 |
| Problématique | 191 |
| Résultats principaux, complémentaires et conclusions..... | 219 |
| Chapitre 6 : Discussion des résultats, conclusions et perspectives | 220 |
| Références bibliographiques | 233 |

Abréviations

| | |
|----------|---|
| AA | Acide arachidonique |
| A-DHAP-S | Alkyl dihydroxyacétone phosphate synthase |
| AE | Apport énergetique |
| AGPI | Acides gras polyinsaturé |
| AGPI-LC | Acides gras polyinsaturé à longue chaine |
| AGPI-VLC | Acides gras polyinsaturé à très longue chaine |
| ALA | Acide α -linoléinique |
| ANC | Apport nutritionnel conseillé |
| AQP4 | Aquaporine 4 |
| AREDS | Age-related eye disease study |
| ATP | Adénosine triphosphate |
| BEL | Bromoénol lactone |
| BHR | Barrière hémato-rétinienne |
| CHU | Centre hospitalo-universitaire |
| COX | Cyclooxygénase |
| cPLA2 | Phospholipase A2 cytosolique |
| Cx | Connexine |
| DAPAT | Souris KO pour l'enzyme DHAP-AT |
| DHA | Acide docosahexaénoïque |
| DHAP | Dihydroxyacétone phosphate |
| DHAP-AT | Dihydroxyacétone phosphate acyltransférerase |
| DMLA | Dégénérescence maculaire liée à l'âge |
| EPA | Acide eicosapentaénoïque |
| EPR | Epithélium pigmentaire rétinien |
| ERK | Extracellular signal-regulated kinase |
| GFAP | Glial fibrillary acidic protein |
| GP | Glycérophospholipide |
| GPCho | Glycérophospholipide à choline |
| GPETn | Glycérophospholipide à éthanolamine |
| GS | Glutamine synthétase |
| HDHA | Acide docosahexaénoïque hydroxylé |
| HDL | Lipoprotéine de haute densité |

| | |
|-----------------|---|
| IGF | Insulin growth factor |
| INSEE | Institut national de la statistique et des études économiques |
| iPLA2 | Phospholipase A2 indépendante du calcium |
| IP ₃ | Inositol triphosphate |
| LA | Acide linoléique |
| LDL | Lipoprotéine de basse densité |
| LOX | Lipoxygénase |
| MAPK | Mitogen activated protein kinase |
| MLA | Maculopathie liée à l'âge |
| NFκB | Nuclear factor-kappa B |
| OMS | Organisation mondiale de la santé |
| PGE2 | Prostaglandine E2 |
| PLA2 | Phospholipase A2 |
| Pls | Plasmalogènes |
| PlsEtn | Plasmalogène à éthanolamine |
| PPAR | Peroxisome proliferator-activated receptor |
| PTG | Produit terminaux de glycation avancée |
| PTS | Signal de ciblage des peroxysomes |
| RCDP | Chondrodysplasie rhizomélique ponctuée |
| RD | Rétinopathie du diabétique |
| ROP | Rétinopathie du prématuré |
| ROS | Espèces réactives de l'oxygène |
| SP1 | Sphingosine-1-phosphate |
| VEGF | Vascular endothelial growth factor |
| VHP | <i>Vasa hyaloidea propria</i> |
| VLDL | Lipoprotéine de très basse densité |

Index des figures

| | |
|--|------------|
| <i>Figure 1 : Représentation schématique d'une coupe sagittale d'œil humain.....</i> | <i>27</i> |
| <i>Figure 2 : Représentation schématique de l'organisation cellulaire de la rétine</i> | <i>29</i> |
| <i>Figure 3 : Représentation graphique de la densité des photorécepteurs le long de l'axe méridien horizontal</i> | <i>32</i> |
| <i>Figure 4 : Représentation schématique des systèmes vasculaires de l'œil</i> | <i>35</i> |
| <i>Figure 5 : Représentation schématique de l'architecture vasculaire rétinienne</i> | <i>36</i> |
| <i>Figure 6 : Représentation schématique d'une ébauche oculaire d'un embryon humain de 33 jours.</i> | <i>38</i> |
| <i>Figure 7 Représentation schématique de la vascularisation fœtale.....</i> | <i>39</i> |
| <i>Figure 8 : Schéma du développement du réseau vasculaire rétinien chez l'homme à différents stades de gestation.</i> | <i>41</i> |
| <i>Figure 9 : Visualisation par immunomarquage du réseau astrocytaire et vasculaire sur une rétine à plat</i> | <i>42</i> |
| <i>Figure 10 : Représentation topologique de la structure de l'acide arachidonique (AA, C20:4n-6).....</i> | <i>44</i> |
| <i>Figure 11 : Chaîne de conversion métabolique des AGPI n-3 et n-6 et biosynthèse des AGPI-LC à partir des précurseurs indispensables</i> | <i>46</i> |
| <i>Figure 12 : Schémas des évènements cellulaires au cours du développement de la DMLA</i> | <i>48</i> |
| <i>Figure 13 : Zones et stades pour la classification des ROP.....</i> | <i>56</i> |
| <i>Figure 14 : Anomalie des réseaux vasculaires rétiniens chez les souris DAPAT et iPLA2</i> | <i>59</i> |
| <i>Figure 15 : Structure chimique des différentes classes de glycérophospholipides</i> | <i>60</i> |
| <i>Figure 16 : Schéma représentant la biosynthèse des plasmalogènes</i> | <i>65</i> |
| <i>Figure 17 : Conformation d'un glycérophospholipide et d'un plasmalogène</i> | <i>68</i> |
| <i>Figure 18 : Médiateurs lipidiques générés à partir des plasmalogènes</i> | <i>70</i> |
| <i>Figure 19 : Dessin d'une cellule de Müller et des neurones associés dans une rétine de mammifère.....</i> | <i>76</i> |
| <i>Figure 20 : Structure et organisation des jonctions gap.....</i> | <i>82</i> |
| <i>Figure 21 : Microphotographies électroniques de jonction homologue (A) et hétérologue (B).....</i> | <i>83</i> |
| <i>Figure 22 : Expression relative de la protéine GFAP dans la rétine de souris DAPAT.....</i> | <i>144</i> |
| <i>Figure 23 : Etat d'activation des cellules de Müller sur coupe de rétine de souris DAPAT</i> | <i>145</i> |
| <i>Figure 24 : Expression relative de la connexine 43 des astrocytes transfectés par des siRNA dirigés contre l'ARNm de la DHAP-AT.....</i> | <i>186</i> |

Figure 25 : Fond d'œil de souris contrôle et de souris transgéniques pour la connexine 43 188

Figure 26 : Association entre les teneurs en DMA 18:1 et les AGS et AGPI 220

Index des tableaux

Tableau 1 : Taux de plasmalogènes dans différents tissus..... 62

Introduction

Dans le monde, près de 285 millions de personnes souffrent d'une déficience visuelle. D'après l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) environ 80 % des déficiences visuelles sont évitables ou curables. On appelle rétinopathie toute altération de l'un ou plusieurs constituants de la rétine : les neurones, la glie et/ou les vaisseaux sanguins. Dans les pays industrialisés, les rétinopathies à composante vasculaires telles que la rétinopathie du diabétique (RD) ou la dégénérescence liée à l'âge (DMLA) sont les premières causes de malvoyance à l'âge adulte. Chez le nouveau né la première cause de cécité est la rétinopathie du prématuré (ROP). Près de 65 % des personnes présentant une déficience visuelle sont âgées de plus de 50 ans. En France l'institut national de la statistique et des études économiques (INSEE) prévoit qu'un tiers de la population aura plus de 60 ans en 2060 (Blanpain, Chardon et al. 2010). De même l'OMS estime que le diabète pourrait affecter 300 millions de personnes dans le monde d'ici 2025 (contre 177 millions en 2000). Avec l'amélioration des techniques de réanimation, la survie des enfants prématurés augmente elle aussi. A l'avenir, cet accroissement du nombre de personnes âgées, de personnes diabétiques et de nouveau-nés prématurés augmentera les risques de survenue des différentes rétinopathies dont celles à composante vasculaires.

Les anomalies vasculaires sont le mécanisme majeur provoquant une baisse de l'acuité visuelle pouvant, dans certaines conditions, conduire à la cécité. Les traitements de ces rétinopathies ont été jusqu'alors limités au contrôle et à l'inhibition de la néovascularisation anarchique de la rétine. Depuis quelques années, les lipides alimentaires, incluant les acides gras polyinsaturés oméga 3 (AGPI n-3), sont considérés comme pouvant potentiellement limiter ces phénomènes de vascularisation pathologique. En effet, plusieurs études épidémiologiques montrent le caractère préventif d'un régime riche en AGPI n-3 sur l'apparition et le développement de néovaisseaux sanguins au cours de la DMLA (Cho, Hung et al. 2001; Seddon, Rosner et al. 2001; Seddon, George et al. 2006; Delcourt, Carriere et al. 2007; Souied, Delcourt et al. 2013; Merle, Benlian et al. 2014; Rezende, Lapalme et al. 2014; Zampatti, Ricci et al. 2014; Zerbib, Delcourt et al. 2014). D'autres études ont montré, sur des modèles animaux, le rôle bénéfique des AGPI n-3 et de leur métabolites sur la prévention de l'angiogenèse pathologique dans des modèles de rétinopathie du prématuré (Connor, SanGiovanni et al. 2007; Sapienza, Stahl et al. 2011; Wang, Chen et al. 2015).

Les AGPI sont apportés par l'alimentation sous forme de triglycérides. A partir d'AGPI essentiels comme l'acide linoléique et l'acide α -linoléique, sont synthétisés des AGPI à plus longues chaînes pouvant impacter le métabolisme cellulaire. Dans les membranes cellulaires, les

AGPI sont retrouvés dans des glycérophospholipides (GP). Il existe une classe particulière de GP nommés les plasmalogènes. Les plasmalogènes représentent près de 18 % des GP chez l'homme (Nagan and Zoeller 2001) et plus de 60 % des GP à éthanolamine (GPEtn) dans le cerveau et environ 30 % des GPEtn dans la rétine. Les plasmalogènes jouent un rôle essentiel dans le développement de l'œil. En effet, chez les souris déficientes en plasmalogènes, des anomalies de structure de l'œil ont pu être observées, notamment au niveau du développement vasculaire de la rétine (Rodemer, Thai et al. 2003; Saab, Buteau et al. 2014). Les défauts liés à l'absence de Pls sont relativement proches de ceux pouvant être observés au cours de la rétinopathie du prématuré. La libération des AGPI estérifiés sur les plasmalogènes serait impliquée dans les mécanismes d'action des plasmalogènes (Saab, Buteau et al. 2014). Les plasmalogènes affecteraient le développement vasculaire via des anomalies dans la mise en place du réseau astrocytaire sur lequel se développent les vaisseaux rétiniens primitifs.

Les astrocytes et les cellules de Müller sont les deux types de cellules macrogliales de la rétine, les cellules microgliales composant le troisième volet de la glie rétinienne. Elles apportent un soutien physique mais surtout métabolique aux neurones rétiniens. Ces deux types cellulaires sont capables de communiquer notamment par échange de flux calciques à travers des jonctions gap.

Les cellules de Müller traversent les différentes couches cellulaires horizontales de la rétine. Elles sont donc en contact avec les différentes cellules neuronales de la rétine. Elles sont capables de métaboliser les lipides et l'enzyme clef de synthèse des plasmalogènes est exprimée dans des zones de la rétine pouvant correspondre aux cellules de Müller (Acar, Gregoire et al. 2007).

D'après ces données, nous avons émis l'hypothèse d'une synthèse de plasmalogènes par les cellules de Müller et nous avons étudié le rôle de ces plasmalogènes sur le fonctionnement de ces cellules. Nous avons aussi supposé que les déficits dans l'architecture vasculaire observés lors d'une déficience en plasmalogènes, à savoir un défaut de vascularisation rétinienne, pouvaient être le résultat d'un défaut de communication entre les cellules de Müller et les astrocytes. Enfin, connaissant l'importance des plasmalogènes dans le développement vasculaire rétinien et en tentant d'extrapoler nos connaissances sur le rôle des AGPI sur la vascularisation pathologique au cours de la DMLA, nous avons caractérisé le statut lipidique de sujets présentant une rétinopathie à composante vasculaire telle que la rétinopathie du prématuré pour savoir si le développement de la ROP est corrélé à la teneur de plasmalogènes érythrocytaires.

Ce manuscrit va s'articuler autour de six chapitres. Le premier chapitre essentiellement bibliographique se composera d'un rappel de l'anatomie de l'œil, puis du développement vasculaire de la rétine. Ensuite le rôle des acides gras polyinsaturés (AGPI) dans les

rétinopathies à composante vasculaire sera développé. Une partie se concentrera ensuite plus particulièrement sur la rétinopathie des prématurés et une autre sur les plasmalogènes. Enfin, ce chapitre sera clos par une partie sur les cellules gliales rétiniennes. Ces paragraphes s'intéresseront entre autres aux échanges de flux calciques entre ces deux types de cellules gliales.

Le deuxième chapitre est un état des lieux des connaissances sur les plasmalogènes dans la rétine. Ce travail sera présenté sous forme d'une revue publiée dans le journal *Biochimie*. Le troisième chapitre présentera l'étude de l'implication du métabolisme des plasmalogènes dans les cellules de Müller, ceci à travers des observations réalisées sur des cellules en cultures soumises à une inhibition de la biosynthèse de plasmalogènes ou l'inhibition de la libération des AGPI estérifiés sur les plasmalogènes. Les résultats seront exposés sous formes d'un article soumis à la revue *PLoS ONE*.

Le quatrième chapitre exposera les résultats obtenus sur l'étude de l'influence des plasmalogènes sur le métabolisme des astrocytes et sur la communication entre les cellules macrogliales de la rétine.

Le cinquième chapitre sera dédié aux résultats à mi-parcours d'une étude clinique visant à caractériser le statut lipidique d'enfants prématurés développant ou non une rétinopathie du prématuré. Ce travail sera présenté sous la forme d'un article soumis à la revue *Investigative Ophthalmology & Visual Science*.

La discussion des résultats obtenus ainsi qu'une conclusion générale et les perspectives qui découlent de ces travaux seront exposés dans un sixième chapitre.

Chapitre I : Rappels

1. Anatomie de l'œil et de la rétine

L'œil est l'organe de la vue. Chez l'homme, il est de forme sphérique, mesure environ 6,5 cm³ et pèse en moyenne 7 grammes. Le globe oculaire est protégé par l'orbite osseuse. Il est composé de trois tuniques : fibreuse, uvéale et nerveuse. Dans la partie centrale de l'œil on retrouve trois milieux transparents : le vitré, le cristallin et l'humeur aqueuse.

1.1. Les tuniques

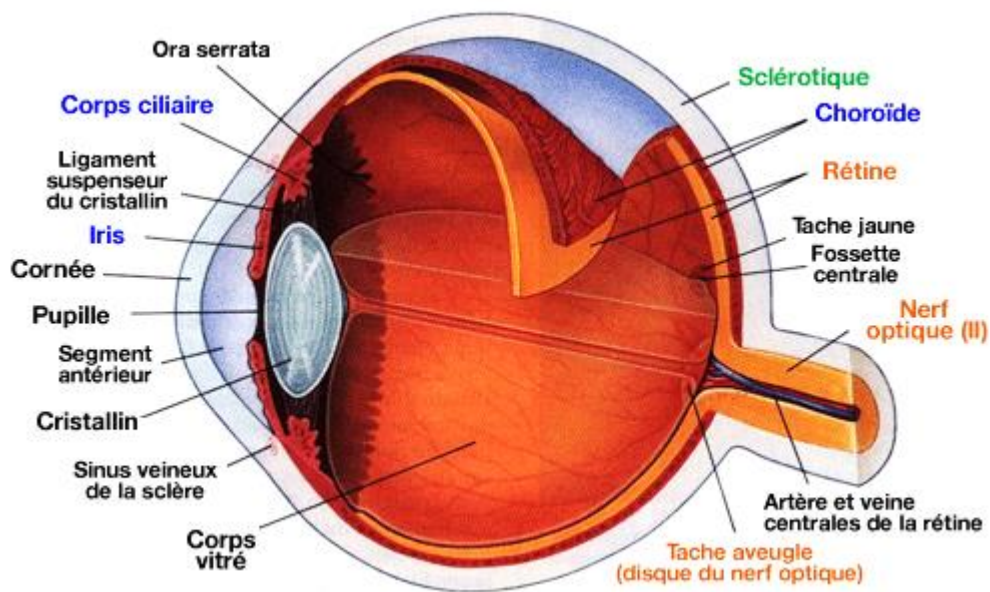


Figure 1 : Représentation schématique d'une coupe sagittale d'œil humain

Adapté de www.vetopsy.fr/sens/vision/cornee.php

1.1.1. La tunique fibreuse

La tunique fibreuse est un tissu fibreux formant la partie la plus externe du globe oculaire, la sclère en arrière et la cornée en avant transparente. Résistante, elle assure une protection mécanique de l'œil tout en maintenant sa forme (Figure 1). Elle est composée au 4/5^{ème} postérieur par la sclère (ou sclérotique en vert sur la Figure 1) et au 1/5^{ème} antérieur par la cornée. La cornée est le prolongement de la sclère, elle est transparente, avasculaire, très innervée et a une épaisseur variable, plus fine en son centre. Elle constitue la lentille principale du système optique. La sclère est le tissu blanc de l'œil. Fibreuse, inextensible et acellulaire, elle permet de conserver le volume de l'œil et joue un rôle protecteur contre les contraintes mécaniques. A l'arrière se trouve le canal scléral dans lequel passent les fibres du nerf optique, la

veine et l'artère centrale de la rétine. La jonction entre la sclère et la cornée est appelée le limbe ; il s'agit d'une zone semi-transparente qui a la particularité d'être richement innervée et vascularisée. La conjonctive est une fine muqueuse transparente. Elle est composée d'une part, de la conjonctive bulbaire qui recouvre la partie antérieure de l'œil excepté la cornée et d'autre part, de la conjonctive palpébrale ou tarsale qui recouvre la partie postérieure des paupières supérieures et inférieures. Dans le limbe cornéo-scléral, au niveau de l'angle irido-cornéen, des structures telles que le canal de Schlemm (ou sinus veineux de la sclère) et le trabéculum, interviennent dans la régulation de la pression intraoculaire, en permettant notamment l'évacuation de l'humeur aqueuse depuis la chambre antérieure.

1.1.2. La tunique uvéale

La tunique uvéale est constituée de l'iris et du corps ciliaire en avant, ainsi que de la choroïde en arrière (en bleu sur la Figure 1). L'iris est une membrane pigmentée de 12 à 13 mm de diamètre en forme de disque insérée en arrière au corps ciliaire et située entre la cornée et le cristallin. Il donne la couleur de l'œil, en son centre se trouve un orifice appelé pupille. Le réflexe de contraction ou de dilatation de l'iris par des muscles antagonistes (le sphincter irien et le dilatateur) permet de contrôler le degré d'illumination de la rétine. Cette pupille est une sorte de diaphragme se réglant de manière automatique suivant l'intensité lumineuse, de 1,5 à 8 mm de diamètre. On parlera de mydriase lorsque la pupille se dilate en lumière réduite et de myosis quand la pupille se rétracte en cas de forte intensité lumineuse. Le corps ciliaire est le segment intermédiaire de l'uvée, il est composé de deux parties : les procès ciliaires responsables de la sécrétion de l'humeur aqueuse et le muscle ciliaire sur lequel sont ancrés la zonule qui suspend le cristallin et l'iris et qui permet l'accommodation. Enfin la choroïde, segment postérieur de l'uvée, est une membrane riche en éléments vasculaires et nerveux. Elle a pour but d'approvisionner la rétine en nutriments et en oxygène mais aussi d'évacuer les déchets produits par cette dernière. Grâce à la présence de mélanine, la choroïde est pigmentée limitant ainsi la réflexion des rayons lumineux traversant la rétine. Chez l'homme, la choroïde est constituée de quatre couches. La couche la plus externe est la couche de Haller contenant les artères ciliaires postérieures, vient ensuite la couche de Sattler contenant des vaisseaux sanguins de diamètre moyen. Ces deux couches sont constituées de tissu conjonctif très pigmenté. La couche choriocapillaire est accolée à la couche de Sattler. Elle permet d'apporter l'oxygène et les nutriments aux cellules de la rétine externe. Enfin, la partie la plus interne de la choroïde est constituée par la membrane de Bruch directement accolée à l'épithélium pigmentaire rétinien (EPR).

1.1.3. La tunique nerveuse

La tunique nerveuse est constituée par la rétine. Elle est divisée en deux parties : l'EPR et la rétine neurale. Il s'agit d'un tissu neuronal très fin faisant partie du système nerveux central. Recouvrant les deux tiers de la surface du globe postérieur, son rôle est de transformer la lumière en signaux électriques transmis au corps genouillé latéral *via* le nerf optique. Au centre de la rétine, dans l'axe optique, se trouve la macula (tâche jaune Figure 1), en temporal de la papille, réunion des axones des cellules ganglionnaires de la rétine avant leur sortie du globe oculaire. C'est la macula qui est responsable de la vision fine et la vision des couleurs, c'est aussi elle qui est précocement touchée lors de l'apparition d'une dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA). Au centre de cette macula se trouve une forte dépression : la fovéa ou fossette centrale. Elle est constituée uniquement de cônes et elle est largement responsable de l'appréciation des couleurs et de la vision centrale.

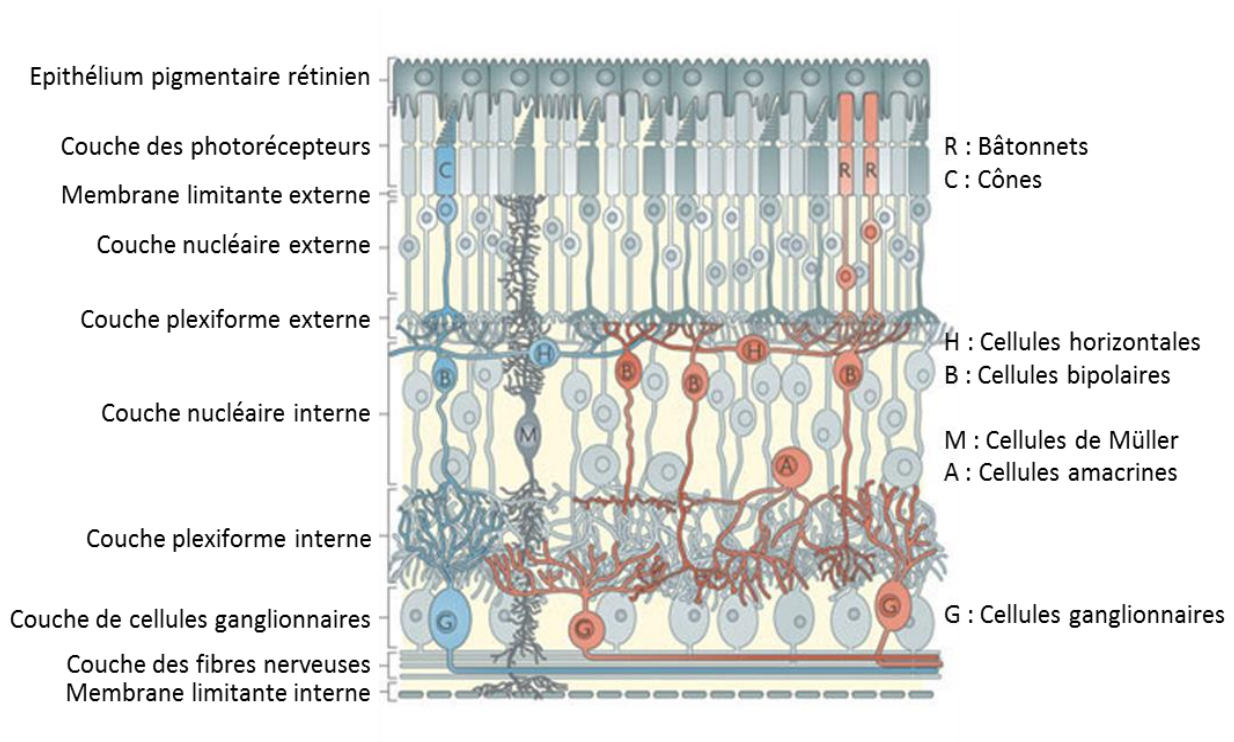


Figure 2 : Représentation schématique de l'organisation cellulaire de la rétine

Adapté de Swaroop and Forrest 2010 Nature

1.1.3.1. L'épithélium pigmentaire rétinien

L'épithélium pigmentaire rétinien (EPR), pigmenté du fait de la présence dans ses cellules de mélanine, est constitué d'une monocouche de cellules cubiques insérées entre la rétine neurale et la choroïde (Figure 4). Ces cellules adhèrent par leur pôle basal à la membrane de Bruch et leurs villosités, coté apical, englobent une partie des segments externes des photorécepteurs.

Ces cellules sont liées par des jonctions serrées faisant office de barrière hémato-rétinienne externe. Les cellules de l'EPR jouent un rôle essentiel dans l'homéostasie de la rétine neurale. Elles permettent notamment le renouvellement des segments externes des photorécepteurs par phagocytose de leurs disques membranaires, le transport de nutriments et l'évacuation des déchets des photorécepteurs ainsi que le transport et la régénération du pigment visuel (le rétinol) (SanGiovanni and Chew 2005; Strauss 2005). En général une cellule de l'EPR est en contact avec 30 à 50 segments externes de photorécepteurs (Bonilha 2008).

1.1.3.2. La rétine neurale

La rétine neurale ou neurorétine est une unité fonctionnelle du système nerveux central par son origine embryonnaire. Sa structure stratifiée est composée de 7 types cellulaires : cinq types de cellules neurales et trois types de cellules gliales. Les photorécepteurs, les cellules bipolaires, les cellules horizontales, les cellules amacrines et les cellules ganglionnaires sont des cellules neurales. Les cellules microgliales et les cellules de Müller et les astrocytes sont des cellules gliales. Lorsqu'ils sont présents, les astrocytes sont localisés dans la couche des fibres nerveuses et dans la couche des cellules ganglionnaires (Reichenbach and Bringmann 2010). La rétine neurale est limitée en avant par la membrane limitante interne et en arrière par le segment externe des photorécepteurs. La rétine est structurée en couches de noyaux cellulaires et de couches de synapses et de prolongements cellulaires. On peut distinguer 7 couches (Figure 2) :

- la couche des photorécepteurs, la plus externe, comprenant les segments externes et internes des photorécepteurs ;
- la couche nucléaire externe, exclusivement composée des corps cellulaires des photorécepteurs ;
- la couche plexiforme externe formée des connexions synaptiques entre les photorécepteurs et les cellules bipolaires ;
- la couche nucléaire interne, composée de noyaux de trois types de neurones, les cellules horizontales, bipolaires et amacrines ainsi que par les noyaux des cellules gliales de Müller ;
- la couche plexiforme interne constituée des connexions synaptiques entre les axones des cellules bipolaires et les dendrites des cellules ganglionnaires ;
- la couche des cellules ganglionnaire composée des noyaux des cellules ganglionnaires ;
- la couche des fibres nerveuses constituée des axones des cellules ganglionnaires.

1.1.3.2.1. Les cellules photoréceptrices

Les photorécepteurs sont des neurones hautement spécialisés. Il existe deux types de photorécepteurs, les cônes et les bâtonnets. Ces cellules sont constituées d'un segment externe permettant la transformation de l'énergie lumineuse en un signal électrique (transduction visuelle) et d'un segment interne contenant le noyau cellulaire et se prolongeant par une terminaison synaptique permettant d'établir le contact avec les autres cellules nerveuses, notamment les cellules bipolaires. Les bâtonnets sont très sensibles à la lumière grâce à leur pigment photosensible : la rhodopsine. Ils sont responsables de la vision nocturne. Les cônes quant à eux contribuent à la vision des couleurs et des détails. Leur pigment photosensible est la iodopsine. Il existe trois types de cônes permettant de couvrir une partie de l'étendue du spectre visible des couleurs rouge, vert et bleu. La rétine humaine est constituée d'environ 3 à 4,6 millions de cônes et de 60 à 92 millions de bâtonnets (Curcio, Sloan et al. 1990; Jonas, Schneider et al. 1992). La répartition des photorécepteurs dans la rétine n'est pas homogène. Chez l'homme, la concentration de cônes est majeure au niveau de la fovéa (tracé rouge sur la Figure 3) avec une densité de 150000 à 180000 cônes/mm². Cette densité diminue rapidement dans les zones périphériques. A 1,5 mm autour de la fovéa la densité des cônes est de 6000 cônes/mm² et proche de l'ora serrata (Figure 1) la densité n'est plus que de 2500 cônes/mm². Les bâtonnets, absents de la fovéa, sont fortement concentrés au niveau d'un cercle situé à environ 4 mm autour de la fovéa. Leur densité à cet endroit est de 72000 ± 17000 bâtonnets/mm² (Jonas, Schneider et al. 1992). Chez la souris, animal nocturne et sans macula, le pic de densité des cônes n'est pas observé. Ces animaux nocturnes possèdent une densité de bâtonnets plus importante, leur permettant une vision de nuit. Dans la zone centrale de la rétine, de 0 à 20°, la densité de bâtonnets et de cônes chez la souris est peu variable, de 500000 à 560000 bâtonnets/mm² et de 13000 à 17000 cônes/mm². Chez l'homme, de 0 à 20°, on observe une forte augmentation de la densité des bâtonnets, avec en parallèle une forte diminution de la densité des cônes (Volland, Esteve-Rudd et al. 2015).

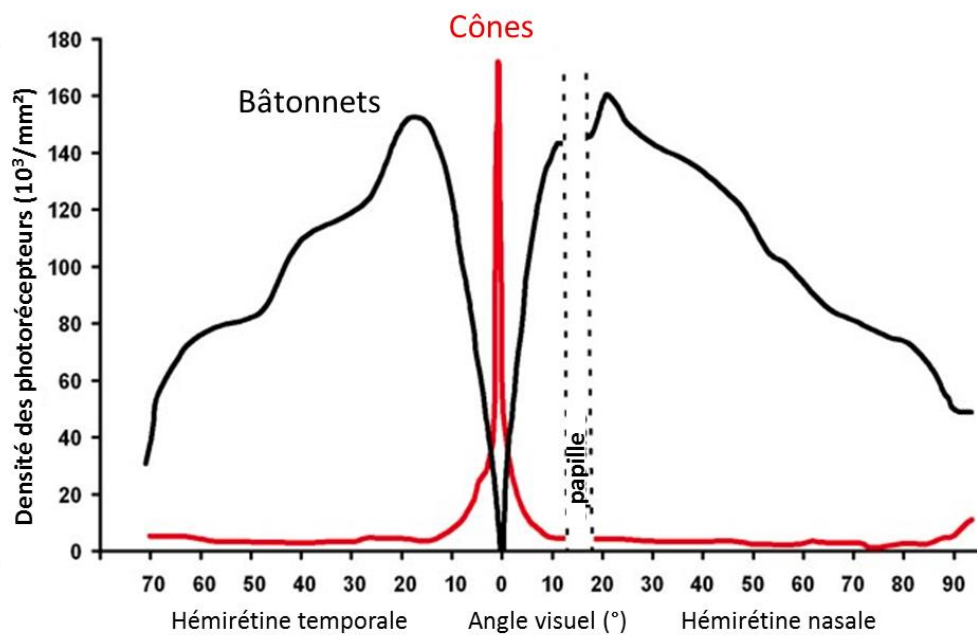


Figure 3 : Représentation graphique de la densité des photorécepteurs le long de l'axe méridien horizontal

Le tracé noir représente la densité des bâtonnets et le tracé rouge la densité des cônes. Le 0 sur l'axe des abscisses correspond à la fovéa. D'après <http://webvision.med.utah.edu/book/part-ii-anatomy-and-physiology-of-the-retina/photoreceptors/> adapté de Osterberg G 1935 Acta Ophthal Suppl

1.1.3.2.2. Les cellules bipolaires

Situées au niveau de la couche nucléaire interne, les cellules bipolaires permettent la transmission du signal entre les photorécepteurs et les cellules ganglionnaires. Par leur prolongement dendritique, elles reçoivent les influx nerveux provenant des photorécepteurs au niveau de la couche plexiforme externe et elles sont en contact synaptique avec les cellules amacrines et les cellules ganglionnaires par leur prolongement axonal, au niveau de la couche plexiforme interne (Figure 2).

1.1.3.2.3. Les cellules ganglionnaires

Les cellules ganglionnaires, situées dans la partie la plus interne de la rétine, sont les dernières actrices de la chaîne de transmission de l'information visuelle des photorécepteurs vers le cerveau. Ces cellules sont en relation avec les cellules bipolaires et les cellules amacrines. Au nombre d'environ 1,2 million chez l'homme, les axones des cellules ganglionnaires se regroupent au niveau de la papille optique pour former le nerf optique avant de sortir du globe oculaire. Les nerfs optiques gauche et droit se croisent au niveau du chiasma optique situé au-dessus de l'hypophyse. Il existe trois sortes de cellules ganglionnaires : les cellules

ganglionnaires naines de type P1 ou P2 représentant 90 % de la population totale des cellules ganglionnaires, les cellules ganglionnaires parasols représentant environ 5 % de la population et les cellules bistratifiées, moins nombreuses, projetant leurs axones au niveau des voies koniocellulaires. Ces dernières semblent jouer un rôle important dans le transfert des informations codant pour le canal bleu/jaune (Szmajda, Grunert et al. 2008). Une quinzaine d'autres types de cellules ganglionnaires ont été identifiés. Parmi elles, les cellules ganglionnaires dites luminosensibles ont été mises en évidence. Elles expriment spécifiquement un pigment, la mélanopsine (Hannibal and Fahrenkrug 2002; Newman, Walker et al. 2003) et joueraient un rôle dans la régulation du rythme circadien et le réflexe pupillaire (Ramsey, Ramsey et al. 2013; Semo, Gias et al. 2014; Ait-Hmyed Hakkari, Acar et al. 2016).

1.1.3.2.4. Les cellules horizontales, amacrines et interplexiformes

Les cellules horizontales et amacrines sont des cellules d'association qui participent au traitement de l'information visuelle. Ces cellules ne possèdent que des dendrites dont certaines peuvent être présynaptiques. Les cellules horizontales communiquent entre elles par de nombreuses jonctions gap. Elles ont pour rôle d'inhiber l'activité des cellules avoisinantes. Cette suppression sélective de certains signaux nerveux s'appelle l'inhibition latérale, son rôle général étant d'amplifier le signal sensoriel. Les cellules amacrines sont des cellules d'associations entre les cellules bipolaires et les cellules ganglionnaires, formant une voie alternative entre ces cellules. Enfin les cellules interplexiformes, qui sont un type de cellules amacrines, permettent la mise en relation des cellules de la couche plexiforme interne avec celles de la couche plexiforme externe, formant une voie rétinienne centrifuge (Gallego 1971).

1.1.3.2.5. Les cellules gliales

Il existe trois types de cellules gliales dans la rétine : les cellules microgliales et les cellules macrogliales représentées par les cellules de Müller et les astrocytes. Un chapitre leur sera dédié plus loin dans le manuscrit.

1.2. Les milieux transparents

1.2.1. L'humeur aqueuse

L'humeur aqueuse est un liquide composé quasi entièrement d'eau. Elle est située entre la cornée et l'iris et permet de maintenir la forme de la partie antérieure de l'œil ainsi que l'apport en nutriments des cellules de la cornée, de l'iris et du cristallin. Elle est en constant renouvellement, puisque produite par le corps ciliaire et réabsorbée au niveau du canal de

Schlemm. Un défaut d'écoulement de l'humeur aqueuse provoque l'augmentation de la pression intraoculaire, qui est le facteur de risque principal des glaucomes.

1.2.2. Le cristallin

Le cristallin est une lentille transparente de forme biconvexe. Situé derrière l'iris, il est relié au globe oculaire par le corps ciliaire. C'est grâce à ce muscle que le cristallin peut se contracter pour permettre l'accommodation. Le cristallin permet la focalisation des rayons lumineux sur la rétine. Il est composé de cellules particulières puisque sans noyau ni organites, de sorte qu'elles sont complètement transparentes et ne gênent en rien le passage de la lumière.

1.2.3. Le vitré

Le corps vitré, situé entre la rétine et le cristallin, occupe 90% du volume de l'œil. Il permet de donner sa forme à l'œil et de maintenir la rétine en place contre la choroïde. Le vitré est une substance transparente et visqueuse composé à plus de 98% d'eau (Bishop 2000).

1.3. Les systèmes vasculaires de l'œil

Le développement du globe oculaire, tout comme celui des autres organes, est dépendant de la formation concomitante du système vasculaire. La vascularisation apporte l'oxygène et les nutriments au moment où les cellules de l'œil se différencient. Chez la plupart des mammifères, la rétine adulte est vascularisée par deux systèmes vasculaires indépendants : Le réseau vasculaire rétinien (Figure 4 A) assurant la vascularisation directe des couches internes de la rétine et le réseau vasculaire choroïdien assurant la vascularisation indirecte de la rétine externe *via* l'EPR (Figure 4). Au cours du développement de l'œil, l'oxygénation de la rétine est assurée par les vaisseaux choroïdiens et par le système hyaloïde. Le rôle et la description de ce système vasculaire transitoire seront développés dans le paragraphe 2.1.

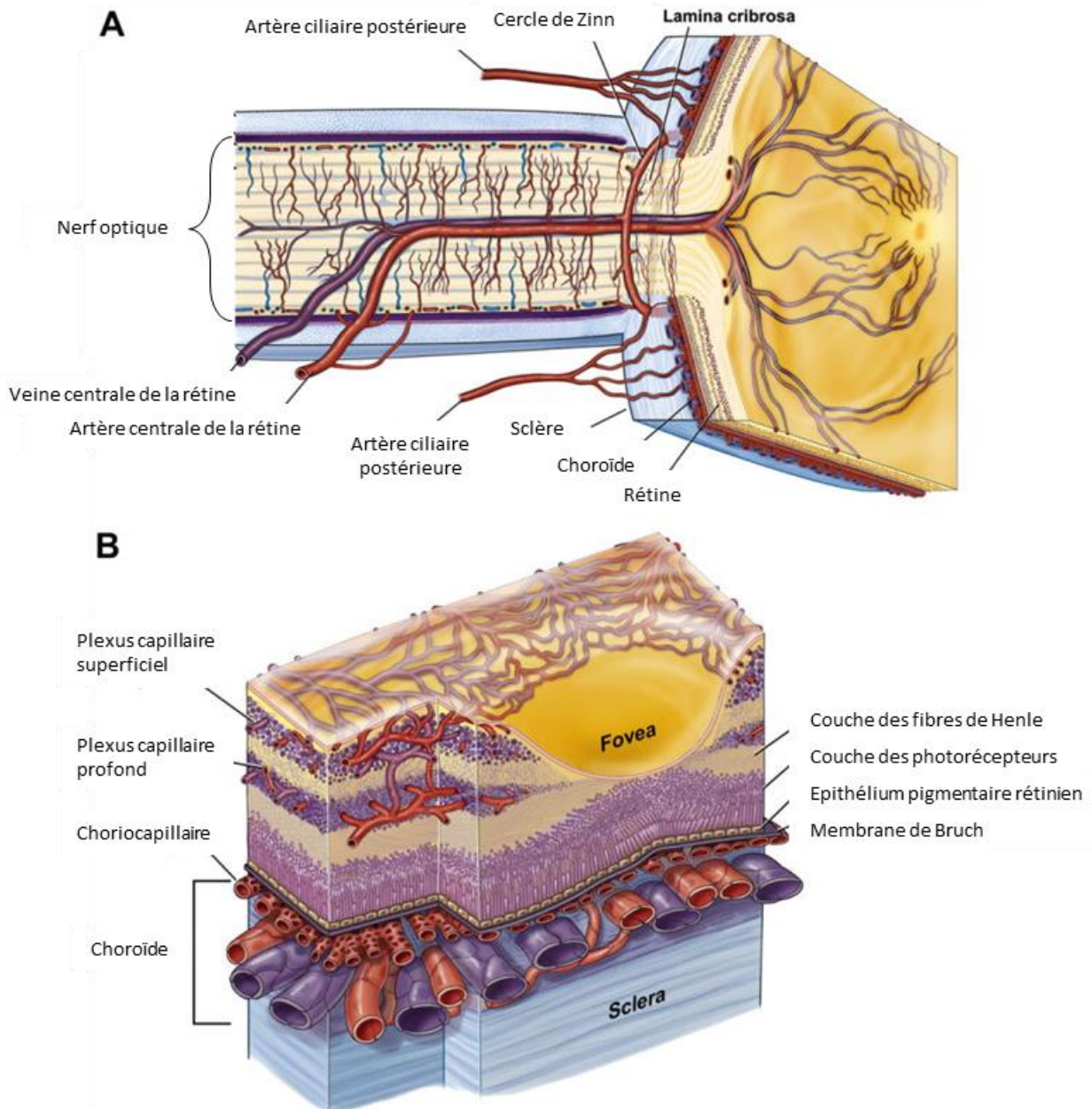


Figure 4 : Représentation schématique des systèmes vasculaires de l'œil

A : Schéma d'une coupe sagittale d'un œil humain passant par le nerf optique et dévoilant la vascularisation rétinienne et choroïdienne. **B** : Schéma d'une coupe de rétine à travers la fovéa représentant la vascularisation rétinienne et choroïdienne. D'après Kur et al. 2012 Prog Retin Eye Res

1.3.1. Le système vasculaire rétinien

Les artères et les veines rétiniennes sont localisées dans la couche des fibres nerveuses (Figure 5). L'artère centrale de la rétine rejoint le nerf optique situé à l'arrière du globe oculaire puis suit un trajet intra neural pour émerger au niveau de la papille où elle se divise en quatre branches terminales (Figure 4 A). Chaque branche se divise alors en collatérales puis en terminales comportant des collatérales jusqu'à former un réseau de capillaires couvrant un quadrant de la rétine interne pour chacune des quatre artères. On retrouve alors deux plans de capillaires, le réseau superficiel qui parcourt la couche des fibres nerveuses et le réseau profond qui s'installe entre les couches plexiforme externe et nucléaire interne (Figure 5). Les veines drainant la rétine se rejoignent au niveau du nerf optique pour former la veine centrale de la rétine. Chaque quadrant de rétine est donc approvisionné par une artère et drainé par une veine.

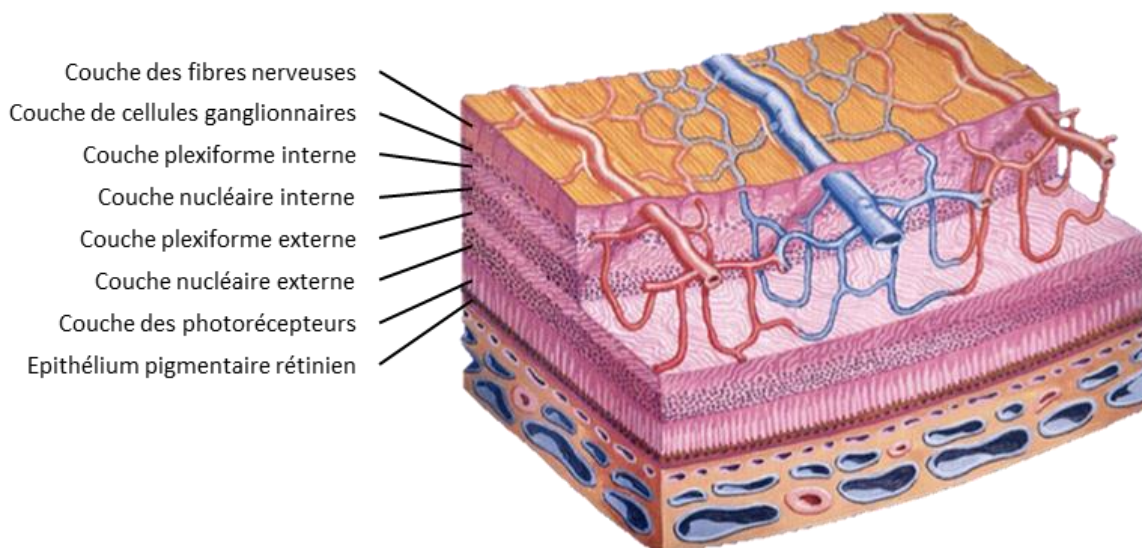


Figure 5 : Représentation schématique de l'architecture vasculaire rétinienne

Schéma des deux réseaux vasculaires (supérieur et profond) de la rétine et de leur collatérales.

Le système veineux est représenté en bleu, le système artériel rouge.

D'après <http://retinadoctor.com.au/the-retinal-blood-vessels/>

1.3.2. Le système vasculaire choroïdien

La vascularisation choroïdienne est fournie par des branches de l'artère ophtalmique issue des branches de la carotide interne. Les artères irrigant la choroïde sont les artères ciliaires postérieures (Figure 4 A). La choroïde est vascularisée par trois types de vaisseaux : les capillaires, les vaisseaux moyens et les gros vaisseaux. Sous la macula, les capillaires forment un réseau dense en nid d'abeille avec plusieurs anastomoses inter-artériolaires. Le débit choroïdien

moyen est estimé à 800 ml/min et est considéré comme l'un des plus importants de l'organisme. De plus, le nombre moyen de péricytes du réseau choroïdien est équivalent à un tiers de leurs homologues dans la rétine. Les péricytes sont des cellules se trouvant autour des cellules endothéliales des capillaires. La diminution du nombre de péricytes autour du réseau choroïdien contribue à la formation de la barrière hémato-rétinienne en assurant la perméabilité des capillaires. Le système vasculaire choroïdien apporte les nutriments et l'oxygène nécessaire au fonctionnement de la rétine externe par diffusion à travers la membrane de Bruch.

1.3.3. La barrière hémato-rétinienne

La barrière hémato-rétinienne est semblable de par sa structure à la barrière hémato-encéphalique. Elle est constituée de deux parties : la barrière hémato-rétinienne externe et la barrière hémato-rétinienne interne. La barrière hémato-rétinienne externe au niveau de la vascularisation choroïdienne est constituée par les jonctions serrées de l'EPR. La barrière hémato-rétinienne interne est basée en grande partie sur les jonctions serrées des cellules endothéliales et sur la structure non fenestrée des vaisseaux rétiens. Les jonctions intercellulaires serrées (*zonula occludens*) sont les composantes les plus importantes de ces barrières. Elles empêchent les substances extracellulaires de diffuser entre les cellules et les obligent à traverser la membrane cytoplasmique selon des mécanismes actifs et passifs très sélectifs. Les jonctions serrées sont composées de protéines, les plus importantes sont les claudines et les occludines dont la teneur est proportionnelle aux propriétés de perméabilité cellulaire (González-Mariscal, Betanzos et al. 2003; Erickson, Sundstrom et al. 2007).

2. Le développement vasculaire de l'œil

Le développement de la rétine débute à partir du 20^{ème} jour de vie embryonnaire chez l'homme. Le développement des systèmes vasculaires de l'œil se déroule en même temps que sa formation anatomique en s'adaptant à ses besoins au cours du développement. La rétine neurale est, embryologiquement parlant, en continuité avec le système nerveux central (Figure 6). Sa vascularisation passe par un système temporaire, le système vasculaire hyaloïde, et deux systèmes permanents, les systèmes vasculaires rétiniens et choroïdiens.

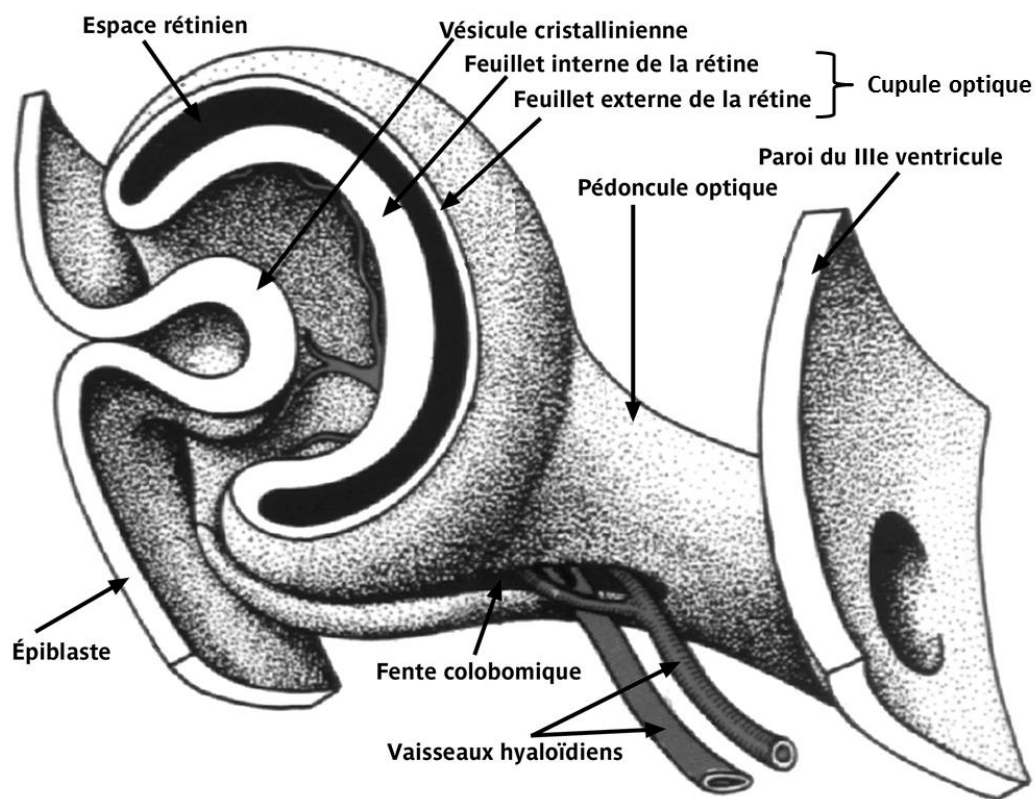


Figure 6 : Représentation schématique d'une ébauche oculaire d'un embryon humain de 33 jours.

La vésicule cristalliniennne repousse en dedans la paroi de la vésicule optique qui s'invagine pour former la cupule optique. Cette invagination s'étend jusqu'au pédoncule optique qui présente ainsi une fente à sa partie inférieure : la fente colobomique. C'est dans cette fente que viennent se loger les vaisseaux hyaloïdiens.

Adapté de « Embryologie ». In : « Anatomie pour les écoles d'Orthoptie, v1.0 ». M Santallier, J & A

Péchereau. Ed A & J Péchereau. Nantes, 2008, p.13

2.1. Le système vasculaire hyaloïde

Chez les mammifères la vascularisation fœtale de l'œil inclut l'artère hyaloïde qui se ramifie dans le vitré et se termine à la partie postérieure du cristallin. La vascularisation hyaloïdienne se développe de manière précoce en intégrant le tube optique, à partir de la 4^{ème} semaine de gestation chez l'homme, mais sans y entrer. Elle s'immisce dans l'espace entre la rétine et le cristallin et atteint le pôle postérieur de ce dernier où elle se ramifie pour former la *tunica vasculosa lentis* (Figure 7). Ce réseau forme des anastomoses et communique avec les vaisseaux de la membrane pupillaire (Saint-Geniez and D'Amore 2004) (Figure 7). Durant la transformation du tube optique en nerf optique, l'artère hyaloïde s'immisce à l'intérieur du tube par la fente colobomique et se ramifie formant la *vasa hyaloidea propria* ou VHP (Figure 6). L'artère hyaloïdienne est entourée par les axones et s'isole au centre du nerf optique vers la 8^{ème} semaine de gestation. A ce stade du développement, la rétine est complètement avasculaire, son apport en oxygène et nutriments est assuré par les artères hyaloïdes et le réseau choroïdien (Mann 1964; Hamming, Apple et al. 1977; Chan-Ling, McLeod et al. 2004; Alvarez, Cederlund et al. 2007). Puis à partir de la 9^{ème} semaine de gestation chez l'homme et à la naissance chez la

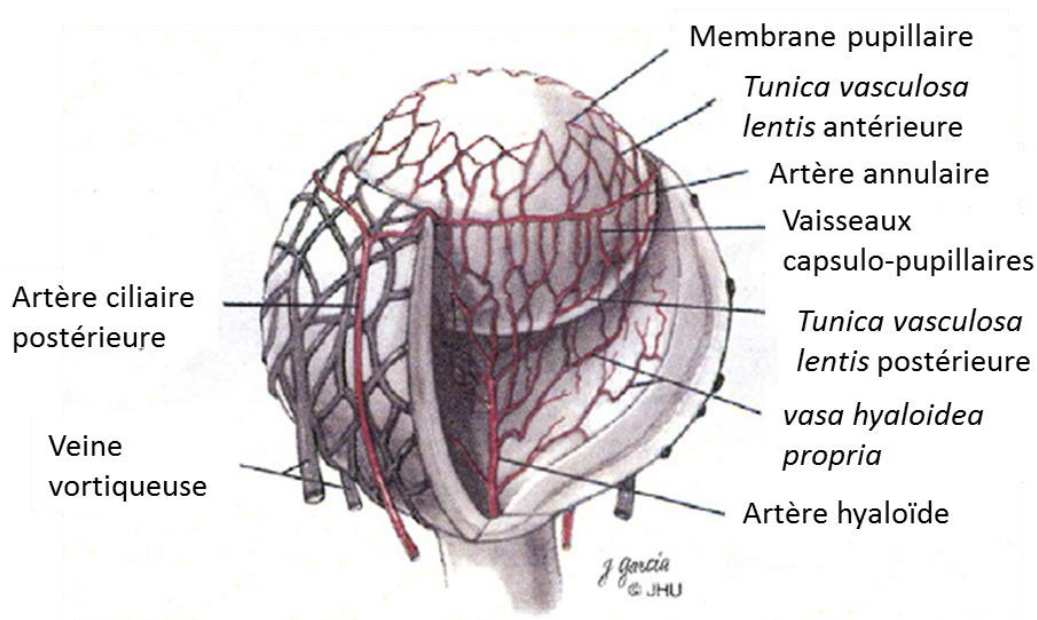


Figure 7 Représentation schématique de la vascularisation fœtale

Visualisation du système vasculaire hyaloïdien. L'artère hyaloïde et la *vasa hyaloidea propria* traverse le vitré pour alimenter en oxygène et nutriments le cristallin.

Adapté d'après Zigler et al. 2016

souris, l'artère centrale intègre la papille optique, donnant naissance aux prémices du réseau vasculaire rétinien. Au cours de la période périnatale chez l'homme et post natale chez les rongeurs, l'ensemble du système vasculaire hyaloïdien régresse par apoptose (Xu, Wang et al. 2004). L'apport en oxygène et en nutriments est alors entièrement pris en charge par les réseaux vasculaires rétinien et choroïdien.

2.2. *Le système vasculaire rétinien*

Le réseau vasculaire rétinien n'est présent que chez certaines espèces, comme par exemple le chat, l'homme, le rat ou la souris. La rétine est avasculaire tant que son épaisseur permet la diffusion efficace de l'oxygène depuis la choroïde. La formation du système vasculaire rétinien est donc associé à l'épaisseur de la rétine (Dreher, Robinson et al. 1992). Ce système vasculaire rétinien prend le relai du réseau hyaloïdien vers la 20^{ème} semaine de gestation chez l'homme. Le système vasculaire rétinien se développe de manière centrifuge à partir de la tête du nerf optique. Chez l'homme, ce développement se déroule au cours de la période périnatale alors que chez la souris le développement du réseau vasculaire rétinien est observé de 0 à 21 jours après la naissance (Figure 8) (Dorrell, Aguilar et al. 2002). Le réseau vasculaire commence à envahir la rétine à partir de 14 à 15 semaines de gestation chez l'homme. Le développement du réseau vasculaire rétinien commence par la formation du réseau superficiel sur la face interne de la rétine puis la formation du réseau profond entre les couches plexiforme externe et nucléaire interne (en violet sur la Figure 8) (Provis 2001). Le plexus intermédiaire est formé par la suite (Fruttiger 2007). Les plexus vasculaires sont plans et communiquent grâce aux ramifications intermédiaires qui leur sont perpendiculaires. Cette direction perpendiculaire est contrôlée localement par les cellules de la couche nucléaire interne et par les cellules de Müller qui guident les vaisseaux géographiquement dans la rétine. Deux mécanismes de formation des vaisseaux ont été décrits pour le système vasculaire rétinien : la vasculogenèse et l'angiogenèse. La vasculogenèse décrit un mécanisme par lequel les vaisseaux se forment à partir de cellules

précurseurs indifférenciées pour migrer relativement tôt au cours du développement à travers la rétine. L'angiogenèse décrit le mécanisme par lequel de nouveaux vaisseaux se forment par bourgeonnement de vaisseaux préalablement établis. Suite au développement des réseaux superficiel et profond, un remodelage des vaisseaux s'effectue pour qu'ils deviennent des veines, artères ou capillaires matures.

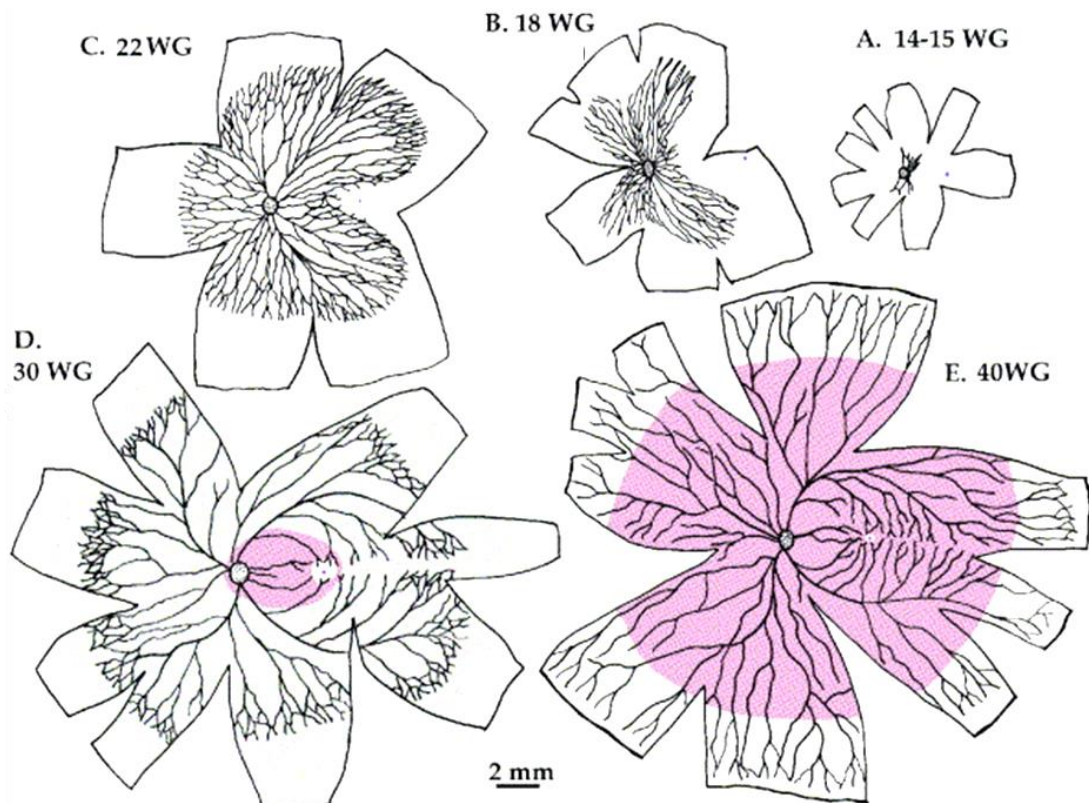


Figure 8 : Schéma du développement du réseau vasculaire rétinien chez l'homme à différents stades de gestation.

Développement de manière centrifuge à partir de la tête du nerf optique. WG = Semaine de gestation. En dessiné, le réseau vasculaire rétinien superficiel et en rose, le réseau vasculaire rétinien profond.

D'après Provis 2001 Prog Retin Eye Res

Le développement du réseau vasculaire rétinien est précédé par une invasion d'astrocytes. Ces astrocytes migrent dans la rétine depuis le nerf optique pour former un réseau cellulaire à la surface interne de la rétine. Ce réseau astrocytaire va servir de trame aux vaisseaux rétinien en formation (Figure 9) (Stone and Dreher 1987; Ling and Stone 1988; Watanabe and Raff 1988; Fruttiger, Calver et al. 1996). Les astrocytes seraient impliqués dans l'orientation et la migration

des cellules endothéliales (Dorrell, Aguilar et al. 2002). Il y a une stricte corrélation entre la présence d'astrocytes dans la rétine et la présence de vaisseaux rétiniens.

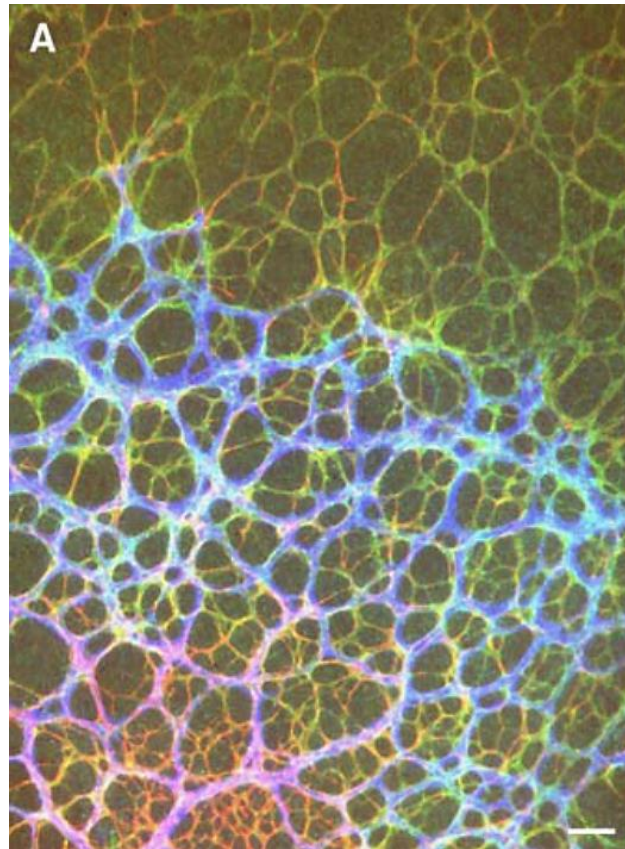


Figure 9 : Visualisation par immunomarquage du réseau astrocytaire et vasculaire sur une rétine à plat

La visualisation des astrocytes se fait par immunomarquage de PDGFR α (vert) et GFAP (rouge). La visualisation des vaisseaux se fait par marquage du collagen IV (bleu).

D'après Fruttiger 2007 Angiogenesis. Echelle = 50 μ m

2.3. *Le système vasculaire choroïdien*

Dans beaucoup d'espèces animales, la vascularisation rétinienne est absente et l'ensemble de la rétine est approvisionnée en oxygène par diffusion depuis la choriocapillaire, il en est de même chez l'homme pour la fovéa, qui est dépourvue de vaisseaux rétiniens. Chez l'homme le réseau choroïdien se développe vers la 6^{ème} semaine de gestation (embryon de 4 à 5 mm). Le mésoderme, en contact avec la face extérieure de la cupule optique, donne naissance aux vaisseaux choroïdiens primaires qui s'organisent en une couche anastomotique entourant la cupule. La cupule optique est composée de deux feuillets (Figure 6). Le feuillet externe donnera l'EPR et le feuillet interne deviendra la rétine. À partir du stade embryonnaire 13mm, les capillaires choroïdiens encerclent complètement la cupule optique mais restent séparés de la

rétilne neurale par l'EPR. Au cours du second et troisième mois de gestation, ce plexus primitif est organisé en un réseau plus complexe. Les vaisseaux choroïdiens se connectent aux artères ciliaires postérieures et la couche choriocapillaire définitive se met en place (Saint-Geniez and D'Amore 2004). Le développement du réseau choroïdien semble sous la dépendance de l'EPR. En effet, l'EPR produit du VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) nécessaire au développement des vaisseaux choroïdiens (Zhao and Overbeek 2001).

3. Intérêt des AGPI dans la prévention des rétinopathies à composantes vasculaires

Les acides gras sont des molécules constituées d'une chaîne hydrocarbonée présentant un groupement méthyle (-CH₃) à l'une de ses extrémités et d'un groupement carboxylique (-COOH) à l'autre extrémité. Les liaisons carbone-carbone de cette chaîne hydrocarbonée peuvent être saturés en hydrogène, on parle alors d'acides gras saturés, ou insaturés avec des doubles liaisons carbone-carbone, c'est le cas des acides gras monoinsaturés (une double liaison) et des acides gras polyinsaturés (AGPI) (au moins deux double liaisons). La nomenclature pour un AGPI est composée de **Ca:bn-c** avec **a** correspondant au nombre d'atomes de carbone de la chaîne carbonée, **b** au nombre d'insaturation et **c** à la position de la première insaturation. Les insaturations sont positionnées tous les trois carbones. Par exemple, un C20:4n-6 sera un AGPI composé de 20 carbones avec quatre insaturations à partir du 6^{ème} carbones (Figure 10). On parle d'acide gras polyinsaturé à longue chaîne (AGPI-LC) pour une chaîne carbonée d'une longueur de 18 à 24 atomes de carbones et d'acide gras polyinsaturés à très longue chaîne (AGPI-VLC) si la chaîne carbonée est composée de plus de 24 atomes de carbones. Les acides gras sont retrouvés dans les triglycérides et les phospholipides.

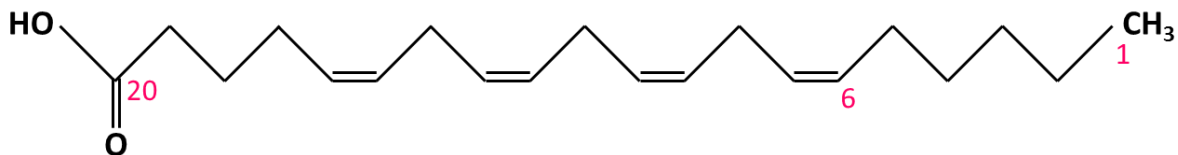


Figure 10 : Représentation topologique de la structure de l'acide arachidonique (AA, C20:4n-6)

En rose la numérotation des carbones à partir du groupement méthyle (-CH₃), permettant de définir le nombre de carbones (C20) et la position de la première double liaison (n-6).

Les acides gras sont libérés des triglycérides alimentaires lors de la digestion par l'action des lipases dans l'intestin, ils passent alors dans les entérocytes où ils sont à nouveau recombinaés en triglycérides, associés à des protéines pour former des chylomicrons, et transportés ensuite vers les tissus adipeux pour le stockage ou vers le foie pour utilisation. Dans le foie, les triglycérides sont pris en charge par des VLDL puis par des LDL pour être acheminés vers les tissus utilisateurs. Le foie exerce ainsi un rôle central dans la biodisponibilité des AGPI en régulant leur métabolisme et leur transport vers les tissus utilisateurs. Selon les besoins des tissus périphériques, les AGPI sont soit oxydés pour produire de l'énergie soit convertis en AGPI-LC pour être incorporés dans les membranes plasmiques des tissus périphériques.

Il existe deux familles principales d'AGPI, les AGPI oméga-3 (n-3) et les AGPI oméga-6 (n-6). Ils sont nommés en fonction de la position de la première double liaison sur la chaîne carbonée

en partant du groupement méthyle. Deux AGPI-LC, dit indispensables car non biosynthétisés par l'organisme, doivent être obligatoirement apportés par l'alimentation. Il s'agit de l'acide linoléique (C18:2n-6, LA) et l'acide α -linoléique (C18:3n-3, ALA.).

A partir de l'acide linoléique et l'acide α -linoléique, l'homme est capable de synthétiser des acides gras à plus longue chaîne et avec plus d'insaturations. Cette conversion d'AGPI permet notamment de synthétiser l'acide arachidonique (C20:4n-6, AA), l'acide eicosapentaénoïque (C20:5n-3, EPA) et l'acide docosahexaénoïque (C22:6n-3, DHA). Cette synthèse s'effectue au niveau du réticulum endoplasmique et des peroxysomes grâce à des enzymes capables, pour les unes d'ajouter des insaturations (les désaturases) et pour les autres d'allonger la chaîne carbonée (les élongases) (Figure 11) (Sprecher, Luthria et al. 1995). Ces deux types d'enzymes sont communs aux voies de conversion des AGPI n-3 et des AGPI n-6, induisant une compétition entre ces deux familles. Ainsi de part cette compétition, l'excès d'AGPI n-6 nuit à la synthèse optimale d'AGPI n-3.

La majorité des AGPI étant oxydée pour fournir de l'énergie, le taux de conversion des précurseurs en AGPI-LC est relativement faible. En effet le taux de conversion de l'ALA en EPA ne dépasse pas 6 % et la conversion jusqu'au DHA ne dépasse pas 4 % (Burdge 2006). De ce fait l'apport en AGPI-LC par l'alimentation est essentiel au maintien des fonctions physiologiques. Selon l'agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail, les apports nutritionnels conseillés (ANC) en lipides totaux sont de 35 % de l'apport énergétique (AE). Chez l'adulte l'ANC pour le LA est fixé à 2 % de l'AE soit 4,4 g/j contre 1 % pour l'ALA soit 1,8 g/j. Enfin l'ANC pour le DHA et l'EPA est fixé à 0,1 % des AE soit 250 mg/j chacun (Comité d'Experts Spécialisé Nutrition humaine - Groupe de travail ANC acides gras mai 2011). Le rapport AGPI n-6/AGPI n-3 dans l'alimentation occidentale est de 10/1 à 30/1 alors que ce rapport devrait idéalement se situer entre 1/1 et 4/1.

La rétine neurale est particulièrement riche en AGPI. Ils représentent 30 à 33 % des acides gras totaux (Fliesler and Anderson 1983; Bretillon, Thuret et al. 2008; Acar, Berdeaux et al. 2012). Les AGPI majeurs de la rétine sont le DHA et l'AA, ainsi que le DHA (Fliesler and Anderson 1983; SanGiovanni and Chew 2005). Alors qu'il représente un faible pourcentage des AGPI dans la plupart des tissus humains, le DHA est l'AGPI le plus abondant dans la rétine (Fliesler and Anderson 1983; Berdeaux, Juaneda et al. 2010). Il représente environ 16 % des acides gras totaux soit environ 50 % des AGPI et 95 % des AGPI n-3 de la rétine (Bretillon, Thuret et al. 2008; Acar, Berdeaux et al. 2012). Jusqu'à 50 % des acides gras sont du DHA dans les segments externes des bâtonnets (Gordon and Bazan 1990). Dans l'EPR c'est l'AA qui est l'AGPI majoritaire (15 % des acides gras totaux contre 4,5 % de DHA) (Bretillon, Thuret et al. 2008).

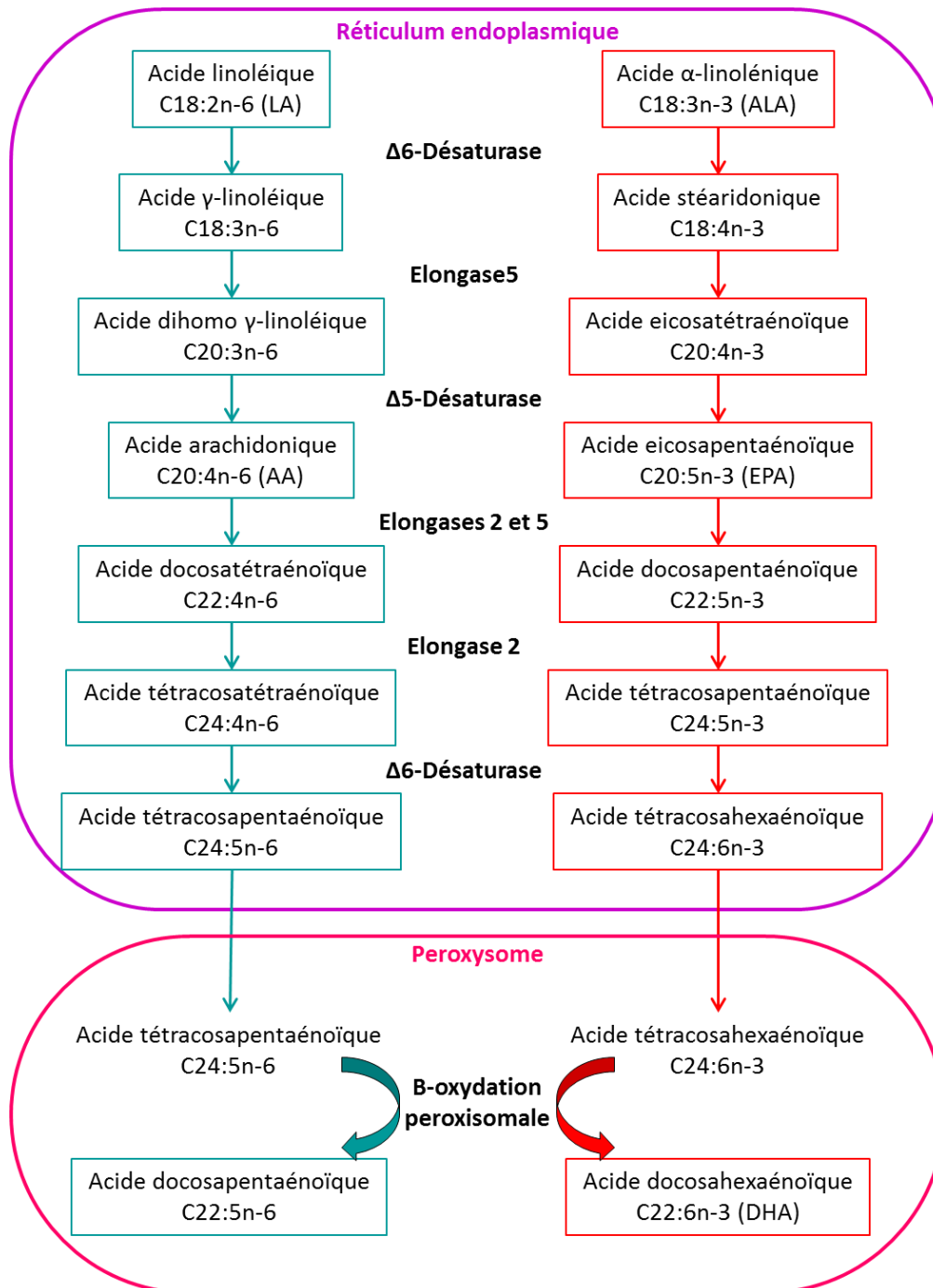


Figure 11 : Chaîne de conversion métabolique des AGPI n-3 et n-6 et biosynthèse des AGPI-LC à partir des précurseurs indispensables

Les AGPI, outre leur propriétés anti-inflammatoires (Calder 2002; Viau, Maire et al. 2009) et neuroprotectrices (Bazan 2013), peuvent influencer l'angiogenèse par leurs produits dérivés respectifs. En effet, les AGPI sont des substrats pour certains enzymes comme la cyclooxygénase (COX), la lipoxygénase (LOX) et l'époxygénase (CYP) formant différents médiateurs lipidiques

comme par exemple les eicosanoïdes, les résolvines et les protectines. Ces médiateurs selon s'ils sont issus d'AGPI n-3 ou d'AGPI n-6 ont souvent des actions antagonistes.

Les éicosanoïdes dérivés de la conversion des AGPI n-3 peuvent jouer un rôle anti-angiogénique dans la progression tumorale et sa dissémination (Rose and Connolly 2000). De même les dérivés de la conversion des AGPI par la cyclooxygénase peuvent participer à la modulation de l'expression de l'angiopoïétine 2 (Ang2), un facteur proangiogénique (Szymczak, Murray et al. 2008). Des études ont suggéré que ces effets anti-angiogéniques passent par l'intermédiaire de la PGE2 modulant l'expression de VEGF et d'Ang2 par l'intermédiaire des voies de signalisation ERK1/2 et HIF1. Ces études ont démontré que les AGPI n-6 stimulent les processus pro-angiogéniques dans les cellules endothéliales humaines, y compris l'induction de l'Ang2 et de la métalloprotéinase matricielle-9, l'invasion endothéliale et la formation de tubes, qui sont généralement activés par l'AA alors que les AGPI n-3 les inhibent. Ces effets sont médiés par les dérivés des AGPI impliquant la COX et le facteur de croissance Ang2. La prostaglandine E2 (PGE2) dérivée de l'AA induit la synthèse d'Ang2, tandis que la prostaglandine E3 (PGE3) dérivée des AGPI n-3 la réprime (Calviello, Di Nicuolo et al. 2004; Szymczak, Murray et al. 2008). Une supplémentation alimentaire en huile de poisson riche en EPA et DHA a montré des effets anti-angiogéniques par diminution de la production de PGE2 et des leucotriènes B4 (LTB4) par les cellules endothéliales humaines provenant du colon (Ibrahim, Mbodji et al. 2011).

L'implication de la neuroprotectine D1 et des résolvines E1 et E2 a été également mise en évidence dans les rétinopathies induites par l'oxygène (OIR), qui constituent un modèle de ROP (Connor, SanGiovanni et al. 2007). Le métabolite dérivé du DHA, l'acide 4- hydroxy DHA (4-HDHA), a également été montré comme ayant un rôle anti-angiogénique sur des modèles similaires (Sapieha, Stahl et al. 2011).

3.1. Acides gras polyinsaturés et dégénérescence maculaire liée à l'âge

La DMLA est la première cause de déficience visuelle dans les pays industrialisés après l'âge de 50 ans (Resnikoff, Pascolini et al. 2008). La maculopathie liée à l'âge (MLA) est une forme précoce de DMLA. Elle est caractérisée par une accumulation de drusen au niveau de la macula et/ou d'une altération de la pigmentation de l'EPR. Les drusen sont des dépôts de matériel extracellulaire entre la lame basale de l'EPR et la membrane de Bruch (Li, Chung et al. 2005). La MLA est le plus souvent asymptomatique. La présence d'une MLA constitue un risque de développer une DMLA. Il existe deux formes de DMLA. La forme atrophique dite « sèche » qui correspond à une atrophie de la macula avec dégénérescence progressive de cellules de l'EPR

puis des photorécepteurs. La progression de cette forme est lente mais peut se compliquer et évoluer en DMLA exsudative. La deuxième forme de DMLA est donc la forme exsudative dite « humide » caractérisée par une néovascularisation choroïdienne anarchique avec une désorganisation de la rétine (Figure 12). La forme exsudative représente 20 à 30% des cas de DMLA.

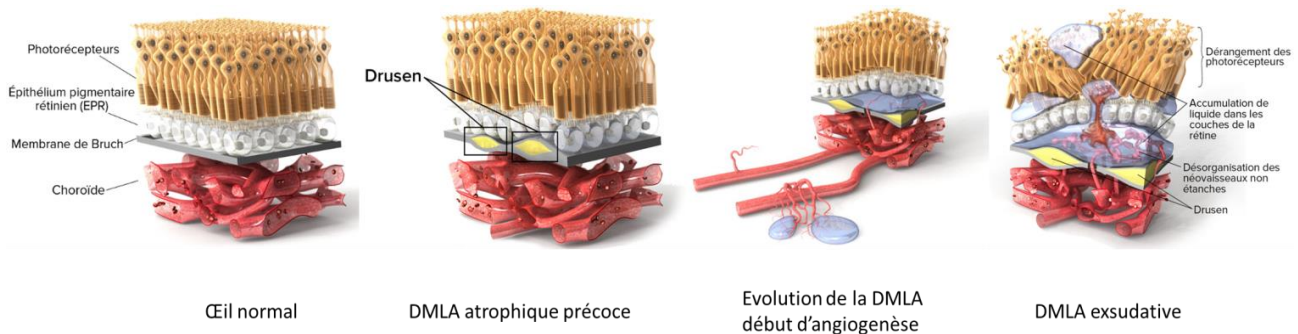


Figure 12 : Schémas des évènements cellulaires au cours du développement de la DMLA

D'après <http://www.scienceofamd.org/fr/learn/>

La DMLA est une pathologie multifactorielle associant des facteurs de risque génétiques et environnementaux modifiables ou non. L'âge est le facteur le plus important dans le risque de développer une DMLA (Ferris, Fine et al. 1984). Le tabagisme arrive en deuxième position des facteurs de risque mais contrairement à l'âge, ce dernier est modifiable (Smith, Assink et al. 2001). Le tabagisme influencerait l'apparition et la progression de la DMLA sèche (Mitchell, Wang et al. 2002; Khan, Thurlby et al. 2006). Le fait de fumer a aussi été corrélé avec l'atrophie géographique (Age-Related Eye Disease Study Research Group 2001). Au niveau génétique, une étude impliquant 18 groupes de recherche internationaux, a identifié une vingtaine de gènes de susceptibilité associés à la DMLA (Fritsche, Chen et al. 2013). Parmi ces gènes sont retrouvés le gène du facteur H du complément (*cfh*), le gène *apoE3* ou encore 3 gènes de la région 10q26 (Seddon, Santangelo et al. 2003; Rivera, Fisher et al. 2005). D'autres facteurs comme des facteurs nutritionnels, un indice de masse corporelle élevé, les maladies cardiovasculaires, l'hypertension ou encore l'exposition au soleil et au tabac sont considérés comme des facteurs de risque de développer une DMLA (Seddon, Ajani et al. 1994; Vingerling, Klaver et al. 1995; Delcourt, Cristol et al. 1999; Clemons, Milton et al. 2005; Khan, Shahid et al. 2006; Tan, Wang et al. 2008; Zhang, Tie et al. 2016).

L'étude AREDS a démontré, pour la première fois, l'importance des apports en micronutriments en ophtalmologie. Cette étude se déroule entre 1992 et 1998, sur 3640 patients âgés de 55 à 80 ans, divisés en quatre groupes d'études. Chaque groupe est supplémenté soit en vitamines C, E et en bêta-carotène, soit en zinc et cuivre, soit les deux, soit un placebo. Cette étude a mis en évidence l'intérêt de ce cocktail de micronutriments pour

diminuer la progression des formes avancées de DMLA (-25 % par rapport au groupe contrôle) (Age-Related Eye Disease Study Research Group 2001). Mais plusieurs limites à cette étude ont été soulignées comme par exemple les doses utilisées bien au dessus des recommandations quotidiennes pouvant générer des problèmes secondaires. De plus, il a été montré que le bêta-carotène pouvait augmenter le risque de développer un cancer du poumon chez les fumeurs ou les anciens fumeurs (Omenn, Goodman et al. 1996). Des études prospectives (notamment les rapports 20, 23 et 30) sur cette cohorte ont montré l'importance des AGPI n-3 sur le développement de la DMLA. Ces rapports montrent que les patients ayant un apport plus élevé en AGPI n-3 ont une diminution de près de 30 % du risque de développer une atrophie géographique et des néovaisseaux choroïdiens. Les auteurs observent aussi que cet effet diminue lorsque les apports en AGPI n-6 augmentent (SanGiovanni, Chew et al. 2007; SanGiovanni, Chew et al. 2008; Sangiovanni, Agron et al. 2009).

La prévalence de la DMLA est plus faible dans des pays fort consommateurs de poissons, source importante de DHA. Les AGPI pourraient donc vraisemblablement moduler la néovascularisation. En effet, différentes études réalisées à travers le monde, suggèrent un rôle protecteur des AGPI n-3 contenus dans les poissons ou certaines huiles contre cette néovascularisation (Seddon, Rosner et al. 2001; Seddon, George et al. 2006; Delcourt, Carriere et al. 2007; Chong, Kreis et al. 2008; Chong, Robman et al. 2009; Tan, Wang et al. 2009; Swenor, Bressler et al. 2010; Christen, Schaumberg et al. 2011; Zerbib, Delcourt et al. 2014). Dès 2001, une étude prospective montre une corrélation entre la prise d'un régime riche en graisse et l'apparition de la DMLA. Les facteurs de risque révélés par l'article sont l'acide α -linoléique et la graisse totale (Cho, Hung et al. 2001). Au contraire, la consommation de poissons riches en acides gras n-3, et notamment en DHA, pourrait réduire le risque de survenue d'une DMLA (Cho, Hung et al. 2001).

Deux études interventionnelles se sont intéressées à l'influence de la supplémentation en AGPI sur le développement d'une DMLA. Il s'agit de l'étude AREDS 2 (*Age-Related Eye Disease Study*) et de l'étude NAT2.

Le but de l'AREDS 2 était de déterminer si l'ajout d'AGPI-LC n-3 (DHA + EPA), d'antioxydants (lutéine + zéaxantine) ou les deux à la formule originale de l'AREDS pouvait diminuer le risque de développer une DMLA avancée. La lutéine et la zéaxantine sont des pigments retrouvés dans l'œil contrairement au bêta-carotène. Ce dernier a été supprimé de la formule de l'AREDS 2 puisqu'il a été démontré que cet anti-oxydant pouvait augmenter le risque de cancer du poumon chez les fumeurs (Omenn, Goodman et al. 1996; Paolini, Abdel-Rahman et al. 2003; Virtamo, Pietinen et al. 2003). La lutéine, son dérivé la méso-zéaxantine et la zéaxantine forment le pigment maculaire. Ce pigment maculaire est une couche protectrice contre l'oxydation provoquée par l'énergie importante des longueurs d'onde correspondant à la lumière bleue

(Bernstein, Li et al. 2016). L'étude AREDS 2 a été réalisée sur 4203 patients de 50 à 85 ans pendant 5 ans. Les auteurs de cette étude concluent que l'addition DHA + EPA à la formule de l'AREDS 1 ne réduit pas plus le risque de progression de la DMLA avancée. Par contre ils recommandent de remplacer le bêta-carotène par la lutéine et la zéaxanthine (Chew, Clemons et al. 2013). Concernant les AGPI n-3, l'AREDS 2 montre que l'apport de 1 gramme d'AGPI n-3 (DHA/EPA : 350/650 mg par jour) n'a aucun effet sur la progression de la DMLA. Ceci n'est pas en accord avec les nombreuses autres études publiées sur le sujet, mais ces études sont non interventionnelles.

Dans l'étude NAT2, conduite en France, les critères d'inclusions étaient l'existence de drusen dans l'œil étudié et la présence d'une DMLA exsudative dans l'œil controlatéral. Le but était de déterminer la fréquence d'apparition de nouveaux vaisseaux choroïdiens dans l'œil étudié mais également d'étudier l'évolution de l'acuité visuelle et l'apparition des drusen. Sur les 298 patients étudiés, l'étude montre que la consommation d'AGPI n-3 (DHA/EPA : 840/270 mg par jour) induit une augmentation des taux d'AGPI n-3 dans les membranes des érythrocytes. Chez les patient atteignant une augmentation en AGPI n-3 la plus importante, le risque de développer une DMLA exsudative dans l'œil étudié a été significativement réduit (Souied, Delcourt et al. 2013). La question de l'efficacité de l'incorporation de ces AGPI alimentaires dans la rétine, ainsi que la dose et la forme d'absorption de ces AGPI se pose alors. En effet si on compare ces deux études (AREDS 2 et NAT2), on remarque que les dose de DHA et d'EPA ne sont pas les mêmes. Dans l'étude AREDS 2, l'EPA est majoritaire alors que pour l'étude NAT2 c'est la DHA qui est majoritaire. Pour rappel, le DHA est très présent dans la rétine et notamment au niveau des photorécepteurs. De plus, la forme de supplémentation est différente entre ces deux études, esters éthyliques pour l'AREDS 2 et triglycérides pour NAT2. Or, le format d'apport des AGPI est important puisqu'il conditionne leur l'absorption intestinale et leur biodisponibilité sanguine. Les triglycérides, forme naturelle d'absorption, semblent être la forme de supplémentation la plus adaptée (Lawson and Hughes 1988; Yang, Kuksis et al. 1990; Dyerberg, Madsen et al. 2010; Neubronner, Schuchardt et al. 2011). En effet la forme ester éthylique serait plus résistante aux enzymes digestives, empêchant l'absorption des acides gras.

Une autre étude réalisée sur une population américaine montre que l'efficacité de prévention des AGPI n-3 n'est observée que lorsque l'apport en acide linoléique (C18:2n-6) est faible (Seddon, George et al. 2006). Le ratio AGPI n-6/AGPI n-3 idéal est de 3/1 voir de 4/1 alors que, dans les régimes alimentaires occidentaux, ce rapport est compris entre 15/1 et 16,7/1 (Simopoulos 2002). Du fait de la compétition enzymatique entre la voie de conversion des AGPI n-6 et la voie des AGPI n-3, l'absorption d'AGPI n-6 est donc aussi à prendre en compte. En effet, d'autres études ont confirmé que les régimes alimentaire riches en AGPI n-3 et pauvres en AGPI n-6 favorisent la prévention et diminuent le risque de développer une DMLA (Chong, Kreis

et al. 2008; Tan, Wang et al. 2009; Sin, Liu et al. 2013). Le statut lipidique des individus ainsi que le ratio AGPI n-6/AGPI n-3 doit être pris en compte.

3.2. Acides gras polyinsaturés et rétinopathie du diabétique

Dans les pays industrialisés, la rétinopathie du diabétique (RD) est la première cause de cécité avant l'âge de 50 ans (Klein, Klein et al. 1984). La RD est une des conséquences d'une hyperglycémie chronique développée au cours du diabète et se manifeste par des lésions vasculaires et neuronales. Comme la DMLA, la RD est asymptomatique dans les premiers stades et passe souvent inaperçue jusqu'à l'apparition de troubles visuels sévères liés à la formation de néovaisseaux, d'hémorragies et de décollements de la rétine. Les facteurs de risques principaux sont la durée du diabète, l'hyperglycémie et l'hypertension.

Le diabète est un trouble de l'assimilation et du stockage du glucose dû à un défaut au niveau du métabolisme de l'insuline. Il existe deux types de diabètes. Le diabète de type 1, insulino-dépendant résultant de la disparition des îlots de Langerhans du pancréas, conduit à l'arrêt de la production d'insuline. Le diabète de type 2 est quant à lui non-insulino-dépendant, il résulte d'une perte de sensibilité à l'insuline (insulinorésistance). Le pancréas continue donc de sécréter des doses croissantes d'insuline pour forcer les cellules à capter le glucose aboutissant à une hyperinsulinémie. A terme, même avec l'augmentation du taux d'insuline, les cellules ne captent plus le glucose sanguin. Le taux de glucose devient alors anormalement élevé et conduit à une hyperglycémie pouvant provoquer des lésions au niveau de différents organes. Les deux types de patients diabétiques peuvent développer une RD.

Parmi les différents phénotypes de la RD, différentes actions putatives des AGPI_{LC} n-3 ont été mises en évidence. Le métabolisme du glucose et des lipides sont étroitement liés, en effet l'insuline est une hormone pouvant agir sur le métabolisme du glucose mais également sur celui des lipides. Les voies métaboliques des lipides et du glucose peuvent se croiser, comme par exemple avec le glycérol formé suite à la dégradation des triglycérides qui peut former du glyceraldéhyde-3-phosphate et inversement. Les AGPI_{LC} n-3 pourraient inhiber plusieurs processus cellulaire et biochimique impliqués dans la physiopathologie de la RD.

Les AGPI_{LC} n-3 disposeraient tout d'abord d'un rôle modulateur au niveau des procédés immunitaires et inflammatoires. Leur action interviendrait au niveau des cytokines pro-inflammatoires, considérant l'inhibition de la synthèse de leukotriène B₄. L'EPA agirait au niveau de la voie des protéines kinase C (PKC) susceptible d'être impliquée dans les dysfonctionnements vasculaires liés au diabète en modulant les taux de diacylglycerol (Kuroki, Inoguchi et al. 1998). L'EPA et le DHA interviendraient aussi en protégeant la dégénérescence des péricytes (de Wilde, Farkas et al. 2002). De manière plus générale, l'EPA aurait un effet antiangiogénique en atténuant la production de VEGF (Yang, Morita et al. 1998). Enfin, le DHA

permettrait de limiter la toxicité du glucose en favorisant son absorption lors de la libération d'insuline au niveau intestinal (Onuki 2000).

Les AGPI n-3 pourraient aussi retarder la perte de vision chez des patients diabétiques atteints de RD (Sapieha, Chen et al. 2012). Dans un modèle de RD induite par la streptozotocine, il a été montré que le développement de la RD serait dû à un état pro-inflammatoire créé par une augmentation du ratio AGPI n-6/AGPI n-3. L'augmentation de ce rapport découlerait d'une diminution concomitante du DHA et de l'AGPI-VLC C32:6n-3 mais aussi de la diminution de certaines élongases, comme Elovl2 et Elovl4 (Tikhonenko, Lydic et al. 2010). En 2014, une étude a mis en évidence une diminution de la teneur totale en AGPI et AGPI-LC chez des patients diabétiques avec rétinopathie. Une baisse du DHA pour la famille des AGPI n-3 et de l'AA et LA pour les AGPI n-6 a notamment été observée, avec une augmentation des acides gras saturés et monoinsaturés (Koehrer, Saab et al. 2014). Plus récemment, il a été montré que le DHA pouvait inhiber l'activation de la microglie induite par les produits terminaux de glycation avancée (PTG). Cette inhibition serait induite par la modulation du recrutement, dans les radeaux lipidiques, des récepteurs des PTG et donc par l'inhibition des signaux de transduction entre ces PTG et leurs récepteurs. L'inhibition induite par le DHA découlerait aussi de l'activation de PPAR γ permettant de diminuer l'activation de NF κ B, puissant facteur de transcription pro-inflammatoire (Wang, Chen et al. 2015).

3.3. Acides gras polyinsaturés et rétinopathie des prématurés

La rétinopathie des prématurés (ROP) est une atteinte ischémique évolutive survenant chez des nouveau-nés prématurés dont la vascularisation rétinienne est immature. Le développement vasculaire est stoppé brutalement et une zone de la rétine reste alors avasculaire. Dans cette zone peut avoir lieu une néovascularisation anarchique pouvant entraîner une cécité. La ROP est une cause majeure de cécité chez l'enfant. Les facteurs de risque de la ROP sont l'âge gestationnel et le poids de naissance. Plus d'information sur la physiopathologie de la ROP sont données plus loin dans le chapitre 4. *La rétinopathie des prématurés.*

Comme la RD et la DMLA, le VEGF est un facteur clef impliqué dans la pathologie de la ROP (Aiello, Avery et al. 1994; Smith 2004). Les AGPI-LC n-3 peuvent également avoir une action bénéfique par l'inhibition de l'action du VEGF sur les cellules endothéliales (Szymczak, Murray et al. 2008). De plus, chez un modèle de ROP induit par l'oxygène chez la souris, Connor et al 2007, ont montré qu'une supplémentation en AGPI n-3 protège contre le développement et la progression de la néovascularisation anarchique rétinienne par le biais des résolvines (D1 et E2) et de la neuroprotectine D1 (Connor, SanGiovanni et al. 2007). Les AGPI n-3 augmenteraient la revascularisation physiologique des zones avasculaires de la rétine en supprimant la

néovascularisation pathologique. L'effet anti-angiogénique des AGPI n-3 serait médié par le 4-HDHA et PPAR γ (Stahl, Sapielha et al. 2010; Sapielha, Stahl et al. 2011).

Au cours du troisième trimestre de gestation, un transfert massif d'AGPI-LC s'effectue de la mère au fœtus dont notamment du DHA. Chez les enfants nés prématurément, le DHA provenant du placenta n'est plus disponible et les réserves faites sont trop faibles. En conséquence, les taux de DHA sanguin chutent d'environ 40% la première semaine et restent faibles durant au moins quatre semaines (Martin, Dasilva et al. 2011; Hard, Smith et al. 2013). La biodisponibilité faible du DHA chez le prématuré semble problématique aux vu des effets anti-angiogéniques exercés par les AGPI.

Récemment une étude a pu observer une corrélation positive entre la concentration en EPA, DHA et l'adiponectine dans le sérum d'enfants prématurés. L'adiponectine est une cytokine sécrétée par le tissu adipeux quand PPAR γ est activé, sa concentration est corrélée positivement avec la croissance post-natale et l'âge gestationnel des nouveau-nés prématurés. Les auteurs ont montré que la concentration d'adiponectine était plus faible dans le sérum des enfants prématurés développant une ROP. De plus ils ont montré qu'une supplémentation en AGPI-LC n-3 chez un modèle murin de rétinopathie induite par l'oxygène entraînait, en plus d'un effet protecteur sur le développement des phénotypes de ROP, une augmentation de la concentration de l'adiponectine. L'augmentation de la concentration en adiponectine, promue par l'activation de PPAR γ induite par la supplémentation en AGPI-LC n-3, pourrait donc protéger contre le développement d'une ROP (Fu, Lofqvist et al. 2015).

4. La rétinopathie des prématurés

La ROP, pathologie vasoproliférative de la rétine, est la principale cause de cécité chez l'enfant. Son incidence globale est de 0,17 % chez le nouveau-né et de 15 à 20 % chez le prématuré. Chez les enfants prématurés de moins de 1250 g, l'incidence de la ROP est de 70 %. L'incidence de la ROP varie de 6 à 34 % selon les études en fonction des critères utilisés pour l'âge de dépistage et le stade de ROP retenu (Good and Hardy 2001; Jordan 2014). La rétinopathie débute par un arrêt du développement des capillaires rétiniens et une dégénérescence microvasculaire. La ROP est décrite dans les années 1940 sous le nom de fibroplasie rétrolentale, en référence au décollement total de la rétine observé à des stades très avancés de la ROP (Terry 1942). L'augmentation des cas de ROP est fortement corrélée à l'avènement des traitements par l'oxygène pour augmenter la survie des enfants prématurés. La fibroplasie rétrolentale a pratiquement disparu depuis que l'effet nocif de l'oxygène sur la vascularisation rétinienne immature a été démontré en 1953 (Ashton, Ward et al. 1953; Ashton and Cook 1954; Ashton, Ward et al. 1954). La ROP est une pathologie multifactorielle. Certains facteurs de risque sont prépondérants dans son développement comme par exemple la prématurité et le faible poids à la naissance, le sujet sera développé dans le paragraphe suivant

4.1 Les facteurs de risque de la ROP.

Le réseau vasculaire rétinien se développe de manière centrifuge à partir de la 14^{ème} semaine et jusqu'à la naissance. En cas de naissance prématurée, le développement vasculaire n'est pas achevé et des zones de rétine avasculaires persistent. La mise en place de la ROP se déroule en deux phases. La première phase est caractérisée par un arrêt du développement des capillaires rétiniens et une dégénérescence microvasculaire avec l'apparition d'une ligne de démarcation entre la zone vasculaire et la zone avasculaire (Figure 13 B, stade 1). Cette phase est due en partie à l'hyperoxie de la rétine résultant de l'oxygénothérapie. L'hyperoxie résulte aussi des traitements par transfusions sanguines administrées aux enfants prématurés. En effet, l'hémoglobine adulte a une affinité plus faible pour l'oxygène que l'hémoglobine fœtale, cela entraîne une libération plus importante d'oxygène dans la rétine au cours des transfusions (Cooke, Clark et al. 1993). Les transfusions sont associées à un risque plus élevé de développer une ROP (Cooke, Clark et al. 1993; Dani, Reali et al. 2001). L'hyperoxie, source de stress oxydant et nitro-oxydant, favorise la vaso-oblitération et la suppression des facteurs de croissance vasculaire oxygène-dépendant tel que le VEGF. La deuxième phase de la ROP est caractérisée par la prolifération anarchique de néovaisseaux au niveau des zones avasculaires devenues ischémiques au cours de la croissance de la rétine. La zone ischémique va surexprimer des facteurs pro-angiogéniques comme le VEGF, l'EPO ou Ang2 pour compenser l'absence de vascularisation (Pierce, Avery et al. 1995; Stone, Chan-Ling et al. 1996). Cette deuxième phase

peut se compliquer d'hémorragies et de décollement de la rétine (Kermorvant-Duchemin, Sennlaub et al. 2011).

D'un point de vue clinique, on classe les ROP en suivant les recommandations de la classification internationale de la rétinopathie des prématurés publiée pour la première fois en 1985 (International Committee for the Classification of Retinopathy of Prematurity 1985) et revisitée en 2005 (International Committee for the Classification of Retinopathy of Prematurity 2005). La rétine est divisée en trois zones (Figure 13 A) et la sévérité de la ROP dans ces zones est classée en cinq stades (Figure 13 B). Le stade 1 est caractérisé par une ligne de démarcation entre la rétine mature (vascularisée) et la rétine immature (avascularisée). Dans le stade 2, un bourrelet est présent entre ces deux zones. Les stades 1 et 2 peuvent régresser spontanément. Dans le troisième stade, on observe une néovascularisation extrarétinienne pouvant devenir assez sévère et conduire à un décollement partiel (stade 4) ou total de la rétine (stade 5) amenant à la cécité. Différents facteurs de risques, dépendants et d'autres indépendants à l'oxygène sont en cause.

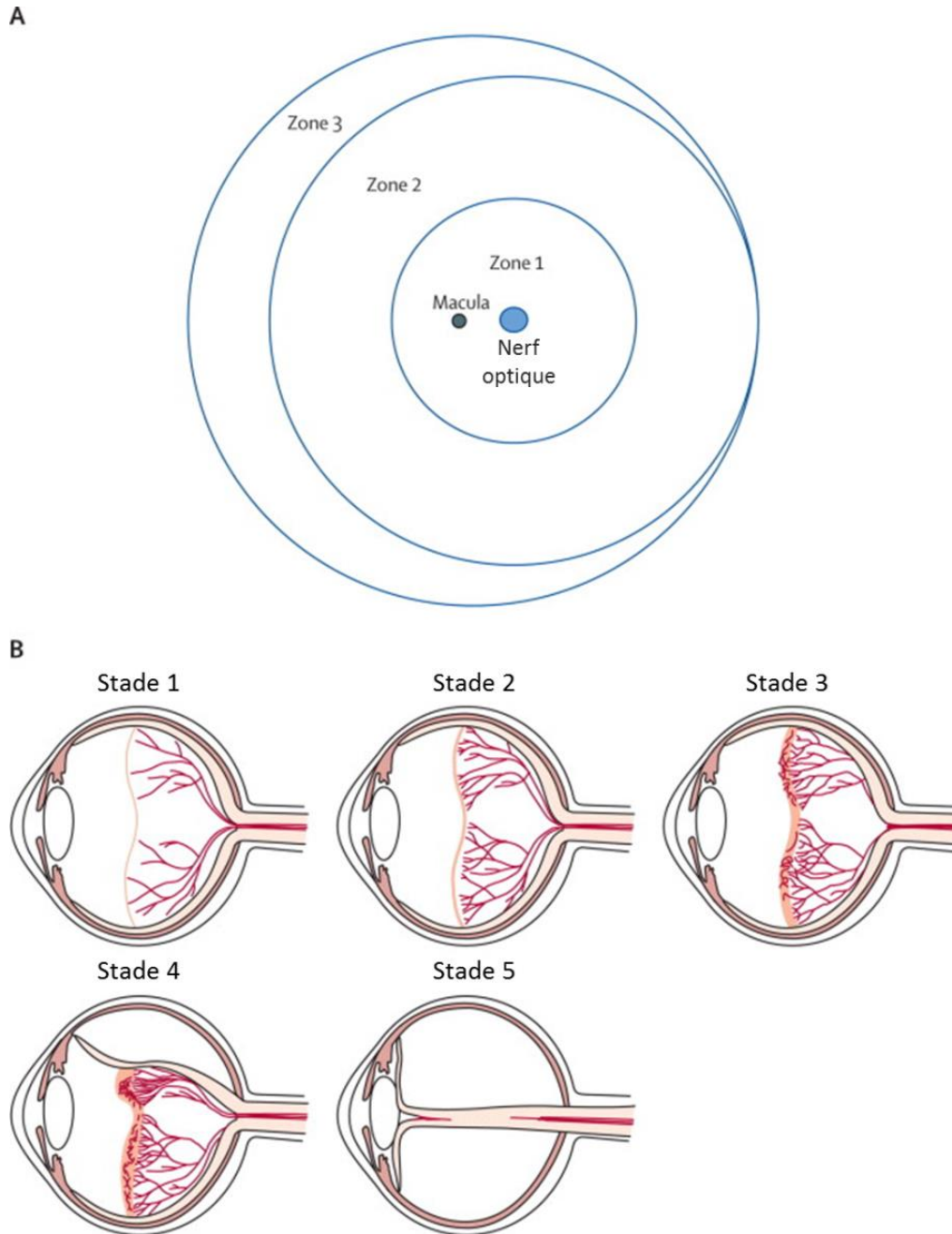


Figure 13 : Zones et stades pour la classification des ROP

A : Division en trois zones de la rétine. **B** : Classification de la sévérité des ROP. Le stade 1 est caractérisé par une petite démarcation entre la rétine vascularisée et la non-vascularisée, le stade 2 par une crête de démarcation, le stade 3 par une prolifération vasculaire extra rétinienne, le stade 4 par un détachement partiel de la rétine et le stade 5 par un détachement total de la rétine.

Adapté d'après Hellström2013 Lancet

4.1. Les facteurs de risque de la ROP

La ROP est une maladie plurifactorielle. L'un des facteurs de risque le plus important est l'oxygène apporté par l'oxygénothérapie et les transfusions sanguines nécessaires à la survie des prématurés. Les mécanismes pathologiques dépendants de l'oxygène comprennent les lésions induites par le stress oxydant et nitro-oxydant ainsi que la suppression des facteurs de croissance vasculaires comme le VEGF. L'oxygène supprime l'expression du VEGF par le biais du facteur de transcription HIF-1 α (Hypoxia Inducible Factor). L'hypoxie relative induite sera par la suite compensée par la surexpression de facteurs de croissance vasculaire entraînant une néovascularisation anarchique (Kermorvant-Duchemin, Sennlaub et al. 2011). L'administration d'érythropoïétine synthétique (EPO) peut être utilisée en substitut des transfusions sanguines chez les enfants prématurés. Ces traitements augmentent le risque de développer une ROP (Kandasamy, Kumar et al. 2014). L'âge gestationnel et le poids de naissance sont des facteurs de risque importants de développer une ROP. En effet, plus l'âge et le poids de naissance sont faibles et plus le risque de développer une ROP est élevé (Allvin, Hellstrom et al. 2014). Chez les enfants nés prématurément, il existe une forte association entre la faible concentration d'IGF-1 (Insulin like Growth factor 1) dans le sérum et le développement d'une ROP (Hellstrom, Ley et al. 2010). La prise de poids dans la période post-natale, la nutrition et l'hyperglycémie représentent aussi des facteurs de risque de la ROP (Hellstrom, Engstrom et al. 2003; Hard, Smith et al. 2013; Mohamed, Murray et al. 2013). Les infections néonatales et l'inflammation sont également des facteurs de risque de développer une ROP (Mittal, Dhanireddy et al. 1998; Dammann, Brinkhaus et al. 2009; Dammann 2010; Lee and Dammann 2012).

4.2. Modèle animal présentant des phénotypes de ROP

La ROP est une pathologie vasoproliférative pouvant aboutir à une cécité. Cette pathologie est caractérisée par un développement anormal des vaisseaux sanguins rétiniens. L'arrêt de croissance des capillaires rétiniens va laisser une zone de rétine avasculaire. Une néovascularisation excessive et anarchique va venir par la suite essayer de combler les manquements en oxygène et nutriments de cette zone. Ce phénotype de ROP est également observé dans les rétines de souris déficientes en plasmalogènes (souris DAPAT). Les souris DAPAT présentent une microphthalmie avec 20 % de réduction du diamètre du globe oculaire, une cataracte, une augmentation de l'épaisseur du cristallin, des synéchies irido-cristalliniennes, une hypoplasie du nerf optique ainsi que la persistance de l'artère hyaloïde à l'âge adulte (Farooqui and Horrocks 2001; Rodemer, Thai et al. 2003; Braverman and Moser 2012; da Silva, Sousa et al. 2012) alors que celle-ci est sensée avoir régressé au cours de la période péri natale (cf 2.1 *Le système vasculaire hyaloïde*) (Ito and Yoshioka 1999). Des travaux menés au laboratoire par Saab et al. ont montré un retard de croissance des capillaires rétiniens chez les

souris DAPAT. De plus des anomalies morphologiques des vaisseaux rétiniens ont été observées à l'âge adulte chez ces souris déficientes en plasmalogènes (Saab, Buteau et al. 2014). Dans le chapitre 3.3. *Acides gras polyinsaturés et rétinopathie des prématurés*, le rôle des AGPI dans la prévention des ROP a été abordé. Certains AGPI sont stockés dans des phospholipides particuliers appelés plasmalogènes (cf 5. *Les plasmalogènes*). Les plasmalogènes représentent environ 18 % de la masse des glycérophospholipides chez l'homme (Nagan and Zoeller 2001). Les défauts observés chez les souris déficientes en plasmalogènes pourraient être liés aux AGPI qui les composent. Ces AGPI sont libérés par des iPLA spécifiques des plasmalogènes. Après avoir mis au point, au laboratoire, un modèle d'inhibition de ces iPLA2 par le bromoénol lactone (BEL) (Saab-Aoude, Bron et al. 2013) chez la souris, Saab et al. ont caractérisé les étapes du développement vasculaire rétinien dans ce modèle iPLA2 et dans un modèle murin d'inhibition en Pls, les souris DAPAT (Saab, Buteau et al. 2014). Dans ces deux modèles d'études, des similitudes au niveau de la vascularisation rétinienne ont été observées, à savoir, la persistance de la vascularisation hyaloïdienne, un réseau astrocytaire défectueux, un retard de croissance des vaisseaux rétiniens (Figure 14A), suivi d'une augmentation de bourgeons angiogéniques, ainsi qu'une augmentation du diamètre (Figure 14B étoiles) et de la tortuosité des vaisseaux rétiniens (Figure 14B flèches). Les plasmalogènes seraient donc impliqués dans le contrôle du développement vasculaire rétinien *via* la libération de leurs AGPI (Saab, Buteau et al. 2014).

D'autres travaux du laboratoire ont également mis en évidence une activité astrocytaire très importante, à savoir une surexpression de l'ARNm de la GFAP et de la fibronectine 7 jours après la naissance, pouvant expliquer l'activité angiogénique plus élevée. La fibronectine est une protéine de la matrice extracellulaire produite par les astrocytes et qui favorise la prolifération et la migration des cellules endothéliales au cours du développement vasculaire (Jiang, Liou et al. 1994). La surexpression de la GFAP est un signe de gliose, fréquemment retrouvé dans l'angiogenèse pathologique. La gliose est un processus dans lequel les cellules gliales sont activées et peuvent proliférer pour combler une zone lésée. Des régimes enrichis en AGPI ont un effet protecteur contre la gliose dans la rétine de rat (Schnebelen, Fourgeux et al. 2011). Saab et al. ont par ailleurs montré que la déficience en plasmalogènes ou l'inhibition de la iPLA2 affectant le développement vasculaire rétinien impliquait la voie de signalisation Angpt-Tie (Angiopoïétines et leur récepteurs Tie) et non la voie du VEGF. Les auteurs ont aussi montré que la déficience en plasmalogènes ou l'inhibition de l'activité iPAL2 pouvait affecter l'expression de gènes impliqués dans l'inflammation et la neuroprotection. Ils en concluent donc que les plasmalogènes peuvent moduler la croissance, le bourgeonnement et la formation des vaisseaux par l'intermédiaire de l'activité du réseau astrocytaire et en modifiant l'expression de gènes impliqués dans l'angiogenèse, sans affecter l'étape de la stabilisation des vaisseaux par les

péricytes. Ces travaux prouvent que les plasmalogènes participent au développement vasculaire de la rétine à travers la libération des AGPI par les iPLA2.

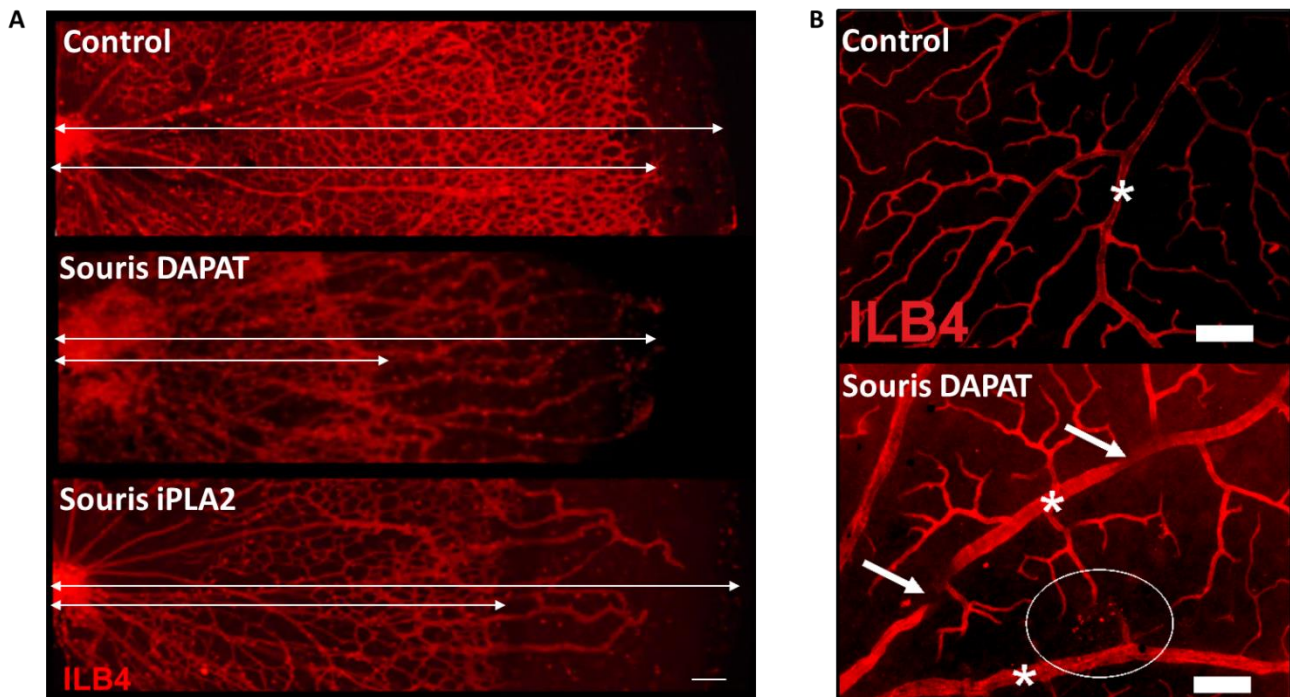


Figure 14 : Anomalie des réseaux vasculaires rétiniens chez les souris DAPAT et iPLA2

A : Visualisation par microscopie à fluorescence du retard de croissance vaisseaux rétiniens sur rétine à plat de souris par marquage ILB4. Echelle : 100 μm . B : Visualisation de la tortuosité (flèches), dilatation (étoiles) et des lésions vasculaires (cercle) des vaisseaux rétiniens chez la souris DAPAT adulte par marquage ILB4 sur rétine à plat. Echelle : 75 μm . D'après Saab et *al.* 2014

De plus, comme observé dans les souris DAPAT et pour lesquelles la iPLA2 a été inhibée, l'angiopoïétine est surexprimée dans la rétine d'un modèle murin de rétinopathie induite par l'oxygène (modèle de souris ROP) (Hoffmann, Feng et al. 2005; Feng, Wang et al. 2009), il existe également une corrélation entre les teneurs vitréennes des protéines Angpt1/Angpt2 et la sévérité de la ROP chez l'homme (Sato, Shima et al. 2011).

Les plasmalogènes semblent être un élément clef dans le développement de la vascularisation rétinienne. Nous allons à présent détailler plus en détail ce que sont les plasmalogènes.

5. Les plasmalogènes

5.1. Structure

Les plasmalogènes ou 1-O-1'-alkenyl-2-acylglycerophospholipides, sont des glycérophospholipides (GP) particuliers. Comme les autres GP, les plasmalogènes sont formés à partir d'une base glycérol sur laquelle vient s'estérifier en position *sn*-2 (numérotation stéréospécifique numéro 2) un radical acyle avec une liaison ester et en *sn*-3 un groupement phosphate polaire. Ce dernier est le plus souvent une phospho-choline ou une phospho-éthanolamine formant ainsi un glycérophospholipide à choline (GPCho) ou un glycérophospholipide à éthanolamine (GPEtn). Plus rarement, le groupement polaire phosphate est constitué par un phospho-insositol ou une phospho-serine. Dans les glycérophospholipides classiques, la position *sn*-1 est également occupée par un radical acyle (Figure 15 A). Parmi les GP, on distingue les alkyl-acyl-glycérophospholipides ou glycérophospholipides éther et les alkényl-acyl-glycérophospholipides ou glycérophospholipides vinyl-éther appelés également plasmalogènes. Les glycérophosphates éthers se différencient par la présence d'un alkyl gras (liaison éther) en position *sn*-1 du glycérol (Figure 15 B). La particularité des plasmalogènes vient de la présence d'un alcool gras (liaison vinyl-éther) au lieu de l'acyle gras en position *sn*-1, le plus souvent dérivé d'un C16:0, d'un C18:0 ou d'un C18:1 (Figure 15 C). Cette liaison vinyl-éther donne aux plasmalogènes leur identité et leur sensibilité envers les acides, les cations mercure et les espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Nagan and Zoeller 2001). De plus en positions *sn*-2 les plasmalogènes sont particulièrement riches en AGPI oméga-3 tel l'acide docosahexaénoïque (DHA) ou AGPI oméga-6 tel l'acide arachidonique (AA). Ils sont connus comme étant des « réservoirs » d'AGPI (Farooqui, Farooqui et al. 2008).

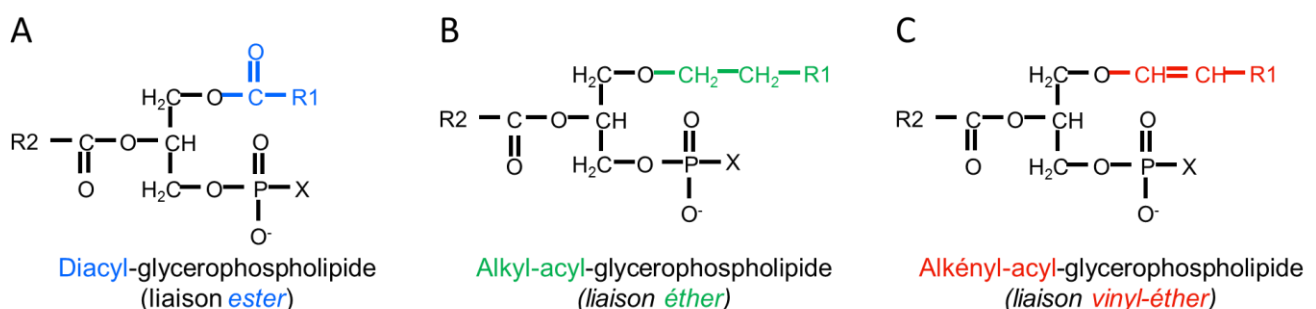


Figure 15 : Structure chimique des différentes classes de glycérophospholipides

A : diacyl-glycérophospholipide avec un liaison ester en bleu. B : alkyl-acyl-glycérophospholipide avec liaison éther en vert. C : alkényl-acyl-glycérophospholipide, autrement appelé plasmalogène avec liaison vinyl-éther en rouge. R : chaîne carbonée avec plus ou moins d'insaturations.

X : groupement polaire, éthanolamine, choline, inositol ou sérine.

5.2. Nomenclature

La nomenclature des plasmalogènes varie en fonction des auteurs et des publications. Souvent le terme « alkénylacyl » est ajouté au GP pour désigner le plasmalogène avec une liaison vinyl-éther en position *sn*-1 par rapport au terme « alkylacyl » et « diacyl » désignant respectivement les GP avec une liaison éther et ester en position *sn*-1 (Figure 15). En règle générale, un plasmalogène porte le préfixe "plasményl", plasményléthanolamine (PlsEtn) pour un plasmalogène à éthanolamine et plasménylcholine (PlsCho) pour un plasmalogène ayant un groupement phospho-choline. De la même façon, les phospholipides ayant une liaison alkyle en *sn*-1 portent le préfixe "plasmany". Les espèces diacylés sont généralement nommées phosphatidylcholines (ou PtdCho) et phosphatidyléthanolamines (ou PtdEtn). Dans ce manuscrit nous utiliserons PlsEtn pour désigner un plasmalogène à éthanolamine et GPEtn pour désigner un diacyl-glycérophospholipide à éthanolamine.

5.3. Distribution tissulaire des plasmalogènes

Les plasmalogènes sont largement retrouvés dans les cellules humaines et animales mais aussi chez les protozoaires et les eubactéries anaérobiques (Paltauf 1994). Plusieurs revues ont décrit le contenu et les compositions en plasmalogènes dans différents tissus (Tableau 1).

Tableau 1 : Taux de plasmalogènes dans différents tissus

| Espèce | Tissu | PlsEtn (%GPEtn) | PlsCho (%GPCho) | PlsEtn (%GP totaux) ^a | PlsCho (%GP totaux) ^a | Plasmalogènes (%GP totaux) ^a | Références | |
|---------|------------------------|--------------------|--------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|--|--------------|------|
| Homme | Cerveau | 58 | 1 | 20-22,4 | 0,8-0,9 | 22 | 1, 2, 24 | |
| | Matière grise | 56-63 | | | | 51-54 | 3, 4 | |
| | Matière blanche | 81-84 | | | | 76-100 | | |
| | Cœur | 53 | 26 | 12-17 | 11-16 | | 1, 2, 24 | |
| | Reins | 46 | 5 | 10-12 | 4,7 | | | |
| | Muscle squelettique | 48 | 19 | 14 | 6,5 | | | |
| | Foie | 8 | 3 | 1,1-4,7 | 3,4 | | 24 | |
| | Testicules | | | 10,8-12,4 | 0-1,2 | | | |
| | Cristallin | 70 | 14 | | | | 5 | |
| | Rétine | 29 | | | | | 9-12 | 6, 7 |
| | Nerf optique | | | | | 36 | | |
| | EPR | 28 | | | | | 12 | 6, 8 |
| | Erythrocytes | | | 20 | | | 10 | |
| Chien | Sarcoleme du cœur | 73 | 57 | | | 53 | 9 | |
| Rat | Cerveau | 56-64 | | 21,8-31,9 | | 10, 11, 24 | | |
| | Reins | 20 | 2,3 | 2,9 | | 12 | 4, 12, 13,24 | |
| | Foie | 3,3 - 6 | 0,4 | | | 3,4 | | |
| | Poumon | 42 | 1,6 | | | 16 | 13 | |
| | Plasma | 36 | | | | | | |
| | Testicules | | | 8,5-11,3 | | 24 | | |
| | Spermatozoïdes matures | 42 | 52 | | | 38 | 14 | |
| Cœur | 12,4-16,1 | | 1,7-5,6 | | 13 | 15, 16, 24 | | |
| Souris | Cerveaux | 46-53 | | | | 3, 4 | | |
| | Cœur | | | | | 13 | 16 | |
| Lapin | Cœur | 43-48 | 39-41 | | | 17 | | |
| Poulet | Cerveaux | 56 | 3,8 | | | 26 | 17, 18 | |
| | Rétine | | | | | 11 | 18 | |
| Veau | Rétine | 29 | | | 8 | | 18, 19 | |
| | RPE | 28 | | | | | 19 | |
| Bœuf | Cerveau | 62,4 | | | | 18 | | |
| | Cœur | 39-46 | | | | 20 | | |
| Porc | Spermatozoïdes matures | | | | | 23 | 21 | |
| Mouton | Cœur | | | | | 18 | 16 | |
| Chat | Cœur | | | | | 27 | | |
| Hamster | Cerveau | | | 19,9-22,3 | | 24 | | |
| | Reins | | | 4,1-6,3 | | | | |
| | Cellules ovarienne | 35 | 11 | | 11 | | 22, 23 | |
| | Testicules | | | 6-8,2 | 0,7-1,3 | 24 | | |
| | Cœur | | | 8,3-11,3 | 14,7-16,3 | 34 | 16, 24 | |

a : la teneur totale en phospholipides comprend la cardiolipine, GPEtn, PlsEtn, GPCho, PlsCho, GPIns, GPser et la sphingomyéline **1-** Heymans et al. 1983, **2-** Panganamala et al. 1990, **3-** Han et al. 2001, **4-** Rapport et Lerner 1959, **5-** Deeley et al 2009, **6-** Acar et al 2012, **7-** Bretillon et al 2008, **8-** Farquhar et Ahrens 1963, **9-** Gross 1985, **10-** Hoffman-Kuczynski et Reo 2005, **11-** Clarke et Dawson 1981, **12-** Blank et al 1991, **13-** Vance 1990, **14-** Vance 1990, **15-** Rabinowitz & Hercker 1976, **16-** Spanner 1966, **17-** Osanai & Sakagami 1979, **18-** Dorman et al 1976, **19-** Acar et al. 2007, **20-** Pugh et al 1977, **21-** Evans et al 1980, **22-** Honsho 2008, **23-** Zoeller 1999, **24-** Diagne et al. 1984

Les plasmalogènes représentent environ 18 % de la masse des phospholipides chez l'homme (Nagan and Zoeller 2001) mais leurs teneurs varient de manière drastique en fonction des tissus. En général les plasmalogènes les plus représentés sont les plasmalogènes à éthanolamine qui peuvent aller jusqu'à 84 % des GP à éthanolamine dans la matière blanche chez l'homme par exemple et 20 à 22 % des GP totaux (Heymans, Schutgens et al. 1983; Han, Holtzman et al. 2001).

Chez l'homme la concentration en PlsEtn dans le cerveau dépend du degré de myélinisation de ce dernier. En effet les PlsEtn sont des constituants majeurs de la gaine de myéline. Chez les nouveau-nés, les niveaux de plasmalogènes dans le système nerveux central sont relativement faibles. Une augmentation, d'un facteur proche de quatre, du niveau de PlsEtn se déroule durant la première année de vie (Balakrishnan, Goodwin et al. 1961). La concentration en PlsEtn augmente rapidement pendant la période de myélinisation jusqu'à 17 ans (Boggs and Rangaraj 1984) puis continue de croître jusqu'à l'âge de 30 à 40 ans. Le niveau de PlsEtn décline ensuite au cours du processus physiologique de vieillissement. En effet, à 70 ans, les niveaux de PlsEtn sont 18 % moins élevés qu'à 40 ans (Farooqui and Horrocks 2001). Chez le rat, les plasmalogènes s'accumulent dans le cerveau à partir du 7^{ème} jour après la naissance jusqu'à environ 30 jours après la naissance (Korey and Orchen 1959; Wells and Dittmer 1967). Les teneurs en plasmalogènes augmentent de 7 à 15 % du sevrage jusqu'au neuvième mois après sevrage. Ensuite ces teneurs en plasmalogènes diminuent à partir de l'âge adulte en fonction du vieillissement des rats. Chez le rat âgé les teneurs en plasmalogènes atteignent un niveau similaire à celui observé chez les ratons sevrés (André, Juanéda et al. 2006). De manière générale le cerveau est très riche en PlsEtn par rapport au GP Etn totaux. Chez le rat de 56 à 64 % des GP Etn du cerveau sont des PlsEtn, les PlsEtn représentent 46 à 53 % des GP Etn chez la souris, 56 % des GP Etn chez le poulet et 62 % des GP Etn chez le bœuf.

Contrairement au cerveau, la proportion de Pls est faible dans le foie. Ils représentent 8 % des GP Etn chez l'homme et seulement 3,3 à 6 % chez le rat. Pourtant les hépatocytes de rat en cultures sécrètent des lipoprotéines naissantes dans lesquelles 20 à 30 % des GP sont des PlsEtn. Puisque les lipoprotéines (VLDL, LDL, HDL) chez le rat sont riches en plasmalogènes, Vance suggère que les hépatocytes synthétisent les plasmalogènes et les exportent vers les autres tissus (Vance 1990). Chez l'homme, on retrouve aussi des niveaux élevés de PlsEtn dans le sérum. Par rapport au total des GP Etn, on trouve 53 % de PlsEtn dans le plasma, 60 % de PlsEtn dans les LDL et 55 % de PlsEtn dans les HDL (Bräutigam, Engelmann et al. 1996). Ces données semblent confirmer les hypothèses de Vance en 1990.

D'autres tissus sont riches en plasmalogènes comme les muscles, les poumons, les spermatozoïdes, les cellules ovariennes de même que le cœur. Dans le cœur, chez l'homme, les PlsEtn représentent 53 % des GP Etn et les PlsCho 26 % des GPCho. Les plasmalogènes

représentent 53 % des GP totaux dans le cœur de chien, 13 % chez le rat et la souris, 18 % dans le cœur de mouton, 27 % dans celui du chat et 34 % chez le hamster (Spanner 1966). Le cœur du chien est riche en PlsEtn et PlsCho qui représentent respectivement 73 % et 57 % des GP Etn et GP Cho (Gross 1984; Gross 1985).

Chez l'homme la teneur en plasmalogènes des érythrocytes est faible à la naissance et atteint un plateau autour de 6 mois d'âge (Labadaridis, Moraitou et al. 2009). A l'âge adulte, les PlsEtn représentent 20 % des GP totaux. Dans beaucoup de tissus humains, une diminution du taux de plasmalogènes s'effectue de manière physiologique au cours du vieillissement.

Au niveau oculaire, les éléments les plus riches en plasmalogènes sont le cristallin, les cellules de l'épithélium pigmentaire (EPR) et la rétine neurale (Broekhuysse 1969; Martinez, Ballabriga et al. 1988; Thai, Rodemer et al. 1999; Acar, Gregoire et al. 2007). Chez l'homme, au niveau du cristallin, 70 % des GP Etn sont des PlsEtn. Dans la rétine, les plasmalogènes représentent 9 à 12 % des GP totaux et 36 % dans le nerf optique (Bretillon, Thuret et al. 2008; Acar, Berdeaux et al. 2012). Dans la rétine de poulet, 11 % des GP totaux sont retrouvés sous forme de plasmalogènes. Dans la rétine de veau 29 % des GP Etn sont des PlsEtn (Dorman, Dreyfus et al. 1976; Acar, Gregoire et al. 2007).

Les plasmalogènes sont également des éléments importants des membranes subcellulaires comme le noyau (Albi and Magni 2004), le micrososome (majoritairement des morceaux de réticulum endoplasmique) et les mitochondries (Anderson, Maude et al. 1975). Cependant, ils n'ont pas été détectés dans les membranes des peroxysomes même si leur biosynthèse est exclusivement initiée dans cet organite (Honsho, Yagita et al. 2008). La structure particulière de ces membranes, qui consiste en une bicouche de phospholipides pauvres en cholestérol, semble essentielle pour un transport rapide des produits des premières étapes de la biosynthèse des plasmalogènes vers le réticulum endoplasmique où la synthèse sera achevée.

Les plasmalogènes sont aussi retrouvés dans les radeaux lipidiques (rafts) d'une lignée cellulaire de carcinome de l'épiderme humain (21 % de PlsEtn sur les phospholipides totaux) (Pike, Han et al. 2002).

5.4. Biosynthèse des plasmalogènes

La biosynthèse des plasmalogènes est initiée dans les peroxysomes et se poursuit dans le réticulum endoplasmique, ceci contrairement à la biosynthèse des diacylglycérophospholipides qui se déroule exclusivement dans le réticulum endoplasmique. Cette biosynthèse se décompose en sept étapes. Elle débute à partir d'une molécule de dihydroxyacétone phosphate (DHAP), un métabolite du cycle de la glycolyse, permettant de former le squelette glycérol (Figure 16). Les enzymes de biosynthèse n'ayant pas pu être purifiées et caractérisées à partir du cerveau, elles

ont été décrites dans d'autres tissus non neuronaux et notamment le foie (Webber and Hajra 1993; Paltauf and Hermetter 1994).

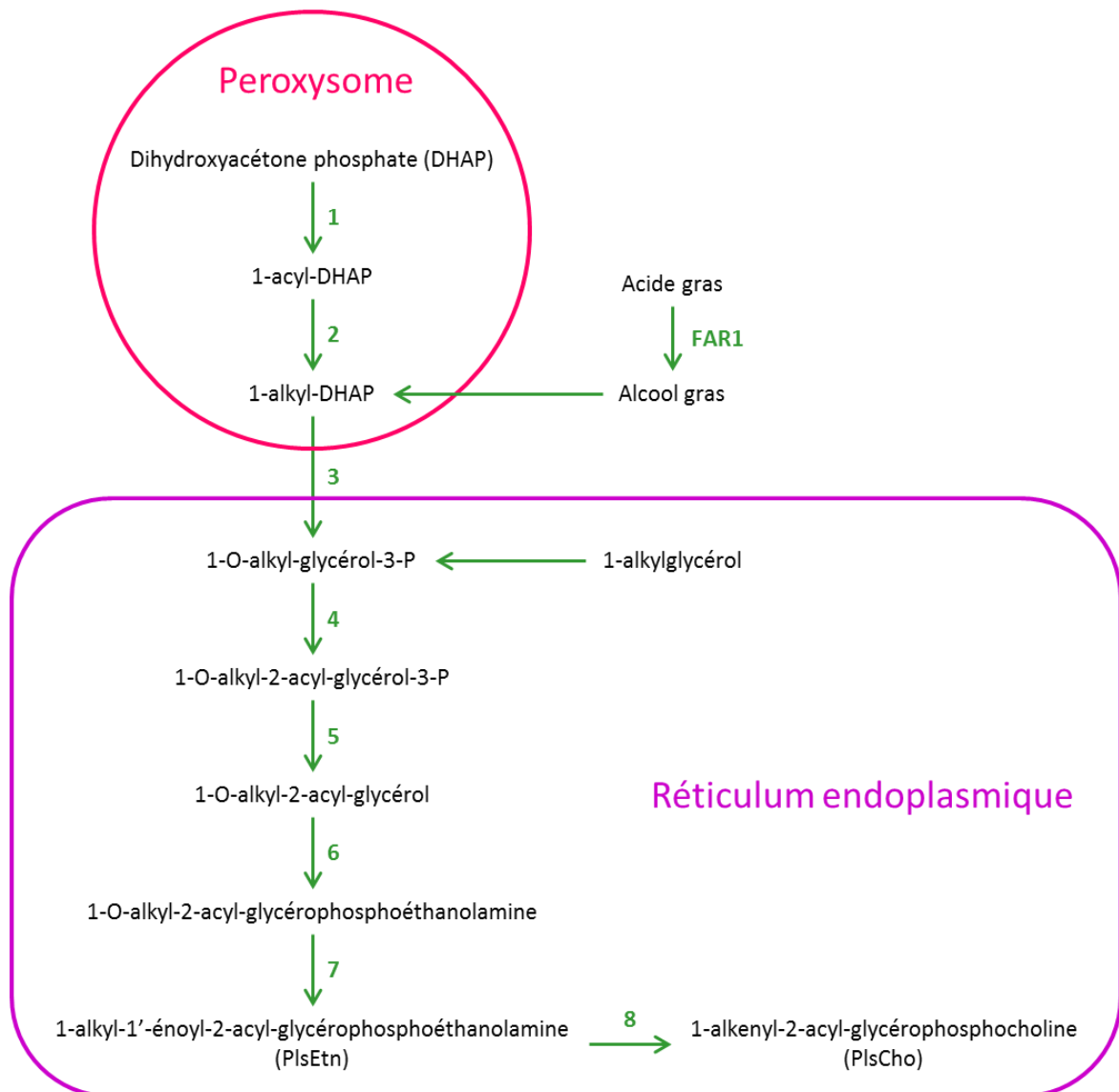


Figure 16 : Schéma représentant la biosynthèse des plasmalogènes

1- Dihydroxyacétone phosphate acyltransférase (DHAP-AT), 2- 1-acyl dihydroxyacétone phosphate synthase (A-DHAP-S), 3- 1-acyl/alkyl dihydroxyacétone phosphate réductase (ADHAP-R), 4- 1-alkyl-sn-glycérophosphate acyltransférase, 5- 1-alkyl-2-acylglycérophosphate phosphohydrolase, 6- alkylacylglycérol éthanolamine phosphotransférase ou CDP éthanolamine transférase, 7- 1-alkyl-2-acyl-snglycérophosphoéthanolamine désaturase, 8- méthyltransférases et enzymes échangeuses de bases.

FAR1 est une alcool gras réductase.

La première étape débute par l'estérification du groupement hydroxyle du DHAP avec une longue chaîne d'acyl-CoA pour former l'acyl-DHAP (Figure 16.1). L'enzyme catalysant cette réaction est la **DHAP-acyltransférase (DHAP-AT)** (EC 2.3.1.42). Située sur le côté luminal de la membrane des peroxysomes (Jones and Hajra 1983), elle a été identifiée dans les cellules de foie

de cochon d'inde, de rat et de placenta humain (Singh, Beckman et al. 1993; Webber and Hajra 1993; Ofman and Wanders 1994; Paltauf and Hermetter 1994; Causeret, Bentejac et al. 1997). Cette enzyme est essentielle car, en son absence, la biosynthèse des plasmalogènes ne peut se produire (Rodemer, Thai et al. 2003; Liu, Nagan et al. 2005). Le niveau d'expression de l'ARNm de la DHAP-AT a aussi été détecté dans la substance blanche, en quantité moindre que dans le foie, mais pas dans le cortex préfrontal contenant pourtant des plasmalogène (André, Tessier et al. 2005). Au niveau de la rétine, la DHAP-AT est fortement exprimée dans les segments internes des photorécepteurs, dans l'EPR et la couche plexiforme externe (Acar, Gregoire et al. 2007).

Au cours de la deuxième étape, l'**alkyl DHAP synthase (A-DHAP-S)** (EC 2.5.1.26) (Figure 16.2) remplace le radical acyle en position *sn*-1 de l'acyl-DHAP par une chaîne longue d'alcool gras liée par une liaison éther pour former le 1-alkyl-DHAP. L'alcool gras peut être fourni soit par un apport alimentaire soit par la réduction d'une longue chaîne acyl-CoA par l'action d'une acyl-CoA reductase (FAR1) (en vert sur le schéma de biosynthèse). L'alcool gras pourrait aussi être produit dans le peroxyosome durant la β -oxydation peroxisomale (Hayashi and Hara 1997). Cette enzyme a aussi été détectée sur le côté luminal de la membrane des peroxyosomes dans les cellules de foie de cochon d'inde, de rat et dans les fibroblastes humains (Singh, Beckman et al. 1993; Webber and Hajra 1993; Biermann, Gootjes et al. 1999).

Pendant la troisième étape, l'alkyl-DHAP synthétisé du côté interne de la membrane du peroxyosome traverse la membrane et est réduit par l'**acyl/alkyl DHAP réductase (A-DHAP-R)** (EC 1.1.1.101) présent du côté cytosolique de la membrane du peroxyosome et dans une certaine mesure dans le réticulum endoplasmique. Cette enzyme a aussi été obtenue à partir des peroxyosomes de foie du cochon d'inde (Datta, Ghosh et al. 1990).

Les enzymes DHAP-AT et ADHAP-S forment un complexe hétérotrimérique (Biermann, Gootjes et al. 1999; Biermann, Just et al. 1999). Bien que les unités fonctionnelles actives de ces deux enzymes soient des monomères (Biermann, Schoonderwoerd et al. 1998), plusieurs observations directes et indirectes indiquent que le complexe peut réguler les activités enzymatiques et faciliter l'acheminement du substrat. La localisation peroxysomale de ces deux enzymes est formatée par la présence d'un signal de ciblage de peroxyosome (PTS) dans leurs séquences d'acides aminés, même si les deux enzymes ont un PTS différent (de Vet, van den Broek et al. 1997; Subramani, Koller et al. 2000).

Les étapes suivantes se déroulent dans le réticulum endoplasmique et sont communes à la biosynthèse de diacylglycérophospholipides.

L'**alkylglycérophosphate acyltransférase**, également connue sous le nom de lysophosphatidate acyltransférase (LPAAT) (Figure 16.4) catalyse le transfert du groupement acyle à partir d'une acyl-CoA sur l'alkyl-lysoglycérophosphate.

La **glycérophosphate phosphohydrolase I** (Figure 16.5) hydrolyse le groupement phosphate de l'alkyl-acyl-GP.

La **diacylglycerol-éthanolamine phosphotransférase** vient alors fixer un groupement phosphoéthanolamine à partir d'une CDP-éthanolamine (Figure 16.6), générant ainsi l'alkylacyl-GPEtn.

Enfin, la conversion de l'alkyl-acyl-GPEtn en alkényl-acyl-GPEtn (PlsEtn) est effectuée par la **plasmanyl-éthanolamine désaturase** (Figure 16.7). Ce système microsomal de transport d'électrons est composé du cytochrome b5 réductase et de la cyanure-dépendante Δ^1 -alkyl désaturase. La réaction correspond à l'insertion d'une double liaison de configuration cis en α de la liaison éther, donnant naissance à la liaison vinyl-éther. Cette réaction de désaturation conduit à la formation du plasményléthanolamine (PlsEtn).

Les PlsCho sont synthétisés à partir des PlsEtn par une modification de la tête polaire grâce à l'enzyme **N-méthyltransférase** (Figure 16.8) (Horrocks, Yeo et al. 1986; Mozzi, Gramignani et al. 1989; Lee, Qian et al. 1991; Paltauf 1994; Lee 1998; Brites, Waterham et al. 2004).

La perte ou le dysfonctionnement d'une des trois premières étapes de la voie de biosynthèse des plasmalogènes entraîne une déficience spécifique en Pls alors que le dysfonctionnement des autres étapes affecte les plasmalogènes mais aussi les autres GP (Nagan, Hajra et al. 1997; Nagan, Hajra et al. 1998; Rodemer, Thai et al. 2003). Néanmoins les plasmalogènes peuvent être synthétisés dans le réticulum endoplasmique sans passer par les premières étapes peroxysomales à partir de l'alkylglycérol-3-phosphate. Cette réaction est catalysée par l'action de l'**alkyl-glycérol phosphotransférase** (EC 2.7.1.93, alkylglycérol kinase). Le produit, 1-O-alkyl-2-lyso-sn-glycero-3-phosphate entre dans la voie de biosynthèse des plasmalogènes après l'étape de réduction (Figure 16.3), dans le réticulum endoplasmique (Nagan and Zoeller 2001). La supplémentation en alkylglycérols des cellules mutantes pour les premières étapes de la biosynthèse en plasmalogènes a pour conséquence un retour au niveau physiologique du taux de plasmalogènes (Schrakamp, Schalkwijk et al. 1988; Zoeller, Morand et al. 1988; Brites, Ferreira et al. 2011).

5.5. Fonctions des plasmalogènes

5.5.1. Propriétés physiques des membranes

Dans un diacyl-GP, la chaîne acyle en *sn*-1 est toujours orientée perpendiculairement à la surface membranaire, celle en *sn*-2 contient un coude qui augmente la distance de la section transversale entre les deux molécules (Figure 17). Cette structure est absente dans les PlsEtn et PlsCho, ce qui impose aux parties proximales des chaînes en *sn*-1 et *sn*-2 de se rapprocher et de s'orienter presque parallèlement (Han and Gross 1990; Paltauf 1994). De ce fait, les

plasmalogènes forment une double couche lipidique plus épaisse et plus condensée comparée aux GP correspondants. De plus, la liaison vinyl-éther des plasmalogènes augmente nettement la condensation de la couche lipidique. Ceci pourrait influencer la fonction des protéines de la membrane et l'adhésion des petites protéines et peptides pouvant augmenter la porosité de la membrane et faciliter les processus d'endocytose (Braverman and Moser 2012; Rog and Koivuniemi 2016), puisqu'il a été montré que l'épaisseur et la fluidité membranaire affectaient la perméabilité de la membrane vis-à-vis de petites molécules (Lande, Donovan et al. 1995).

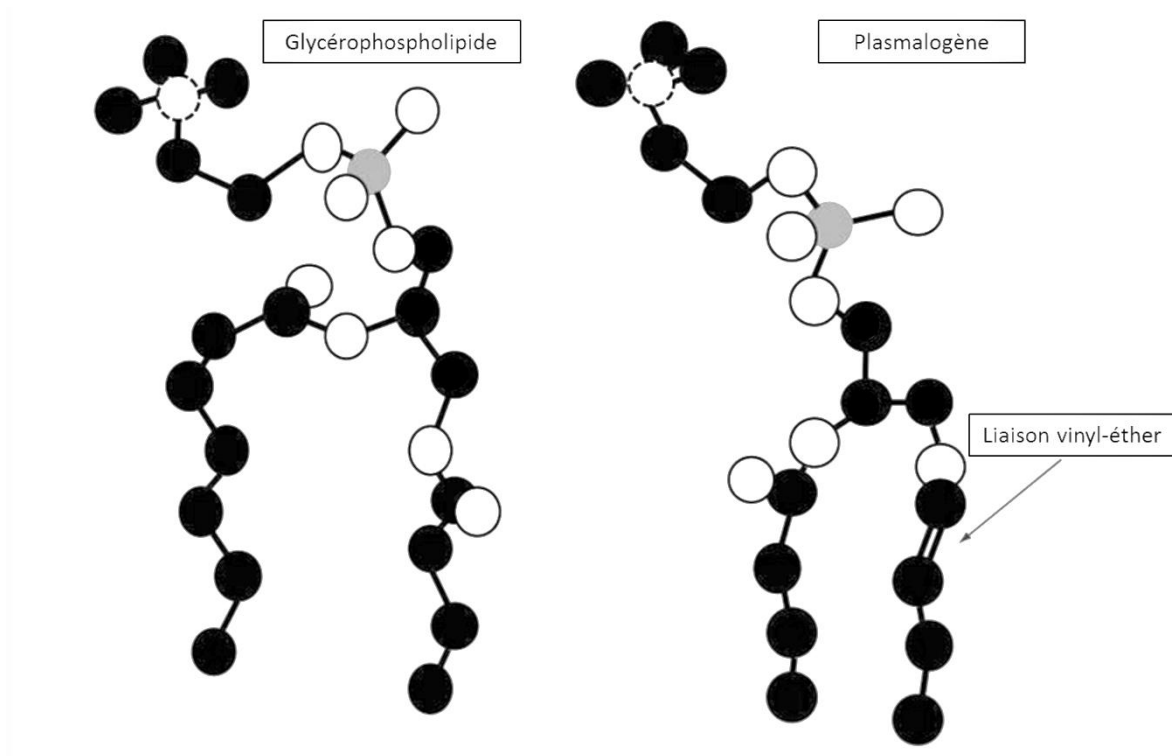


Figure 17 : Conformation d'un glycérophospholipide et d'un plasmalogène

Adapté de Ford 2010 Clin Lipidol

Les plasmalogènes sont aussi largement retrouvés dans les microdomaines membranaires (radeaux lipidiques ou raft). En effet, Pike et al. 2002 ont montré une augmentation de 30 % des PlsEtn dans les microdomaines membranaires en comparaison avec le reste des fractions membranaires. Ces microdomaines membranaires sont également enrichis en cholestérol et sphingomyéline (Pike, Han et al. 2002). Ils contiennent également des protéines nécessaires à la signalisation cellulaire, à l'interaction intercellulaire et à l'endocytose. Pike et al. ont également montré que les PlsEtn contenus dans ces microdomaines étaient particulièrement enrichis en acide arachidonique (AA). Ces microdomaines peuvent représenter un lieu de stockage de substrat pour la fabrication d'AA libre en réponse à une activation cellulaire (Pike, Han et al. 2002). De plus, une diminution des teneurs en plasmalogènes pourrait altérer les propriétés

physiques et la composition protéique de ces microdomaines membranaires (Brites, Waterham et al. 2004).

5.5.2. Rôle anti-oxydant des plasmalogènes

Les plasmalogènes protègent les structures biologiques contre l'attaque par des radicaux libres (Engelmann 2004; Maeba and Ueta 2004). En effet, de par leur liaison éther en position *sn*-1, les plasmalogènes sont très sensibles à l'oxydation (Yavin and Gatt 1972; Yavin and Gatt 1972; Mangold and Weber 1987; Farooqui and Horrocks 2001). De plus, ils sont plus stables en condition de pH extrême (Paltauf 1994). Dans une étude *in vitro* utilisant des micelles, Reiss et al. ont observé la réaction directe des oxydants avec la double liaison des plasmalogènes (Reiss, Beyer et al. 1997). Ils ont aussi pu observer que la présence des plasmalogènes, avec leur liaison viny-éther, suffisait pour empêcher l'oxydation des quatre doubles liaisons contenues dans l'acide arachidonique estérifié en position *sn*-2. Ceci est vrai pour les AGPI des plasmalogènes mais aussi pour ceux estérifiés sur d'autres types de phospholipides. Au niveau cellulaire, l'absence de plasmalogènes sensibilise les cellules aux dommages cytotoxiques causés par la lumière UV et d'autres pro-oxydants (Morand, Zoeller et al. 1988; Zoeller, Morand et al. 1988). De plus, les plasmalogènes protègent les cellules endothéliales pulmonaires contre le stress oxydatif observé lors de l'hypoxie (Zoeller, Grazia et al. 2002). De même les plasmalogènes pourraient avoir un rôle protecteur au niveau de la rétine. En effet, l'EPR est situé dans un environnement très riche en oxygène et très exposé à la lumière, ce qui le rend susceptible de subir un stress oxydatif important (Cai, Nelson et al. 2000; Acar, Gregoire et al. 2007). Pour rappel les PlsEtn représentent 30 % des GPEtn dans l'EPR (Acar, Gregoire et al. 2007), ces PlsEtn pourraient donc être impliqués dans la protection cellulaire contre le stress oxydatif (Braverman and Moser 2012).

5.5.3. Réservoirs de messagers secondaires et médiateurs lipidiques

Les AGPI localisés en position *sn*-2 sur le squelette glycérol des plasmalogènes peuvent être libérés sous l'action d'une phospholipase A2 indépendante du calcium. Les teneurs élevées en AGPI des plasmalogènes en comparaison aux diacylglycérophospholipides laissent penser qu'ils agissent comme des entités de stockage du DHA et de l'AA (Ford and Gross 1989; Gaposchkin and Zoeller 1999). Les AGPI représentent 25 à 30 % des acides gras du cerveau et sont impliqués dans son développement et la fonction cognitive. En dehors du cerveau, le DHA est retrouvé en quantités importantes dans les photorécepteurs où il joue un rôle important pour la transduction visuelle (Mitchell, Niu et al. 2003). L'AA est quant à lui un précurseur de molécules biologiquement actives appartenant à la famille des eicosanoïdes comme par exemple les leucotriènes (LTA4), les prostaglandines (PG) ou encore les thromboxanes (TX) (Figure 18). Les

dérivés du DHA sont les résolvines, les neuroprotectines ou les protectines (Figure 18). Ces dérivés participent à la signalisation cellulaire (Nagan and Zoeller 2001), aux réactions inflammatoires (Stables and Gilroy 2011) ou encore à la régulation de l'angiogenèse (Connor, SanGiovanni et al. 2007; Szymczak, Murray et al. 2008).

Les plasmalogènes caractérisés par la présence des chaînes acyles avec un haut degré d'insaturation à la position sn-2 sont abondants dans la matière grise, alors que les espèces saturées ou mono-insaturées prédominent dans la myéline. Ceci est cohérent avec le rôle métaboliquement actif des plasmalogènes dans la matière grise et leur rôle plutôt structural dans la myéline (Han, Holtzman et al. 2001; Rosenberger, Oki et al. 2002).

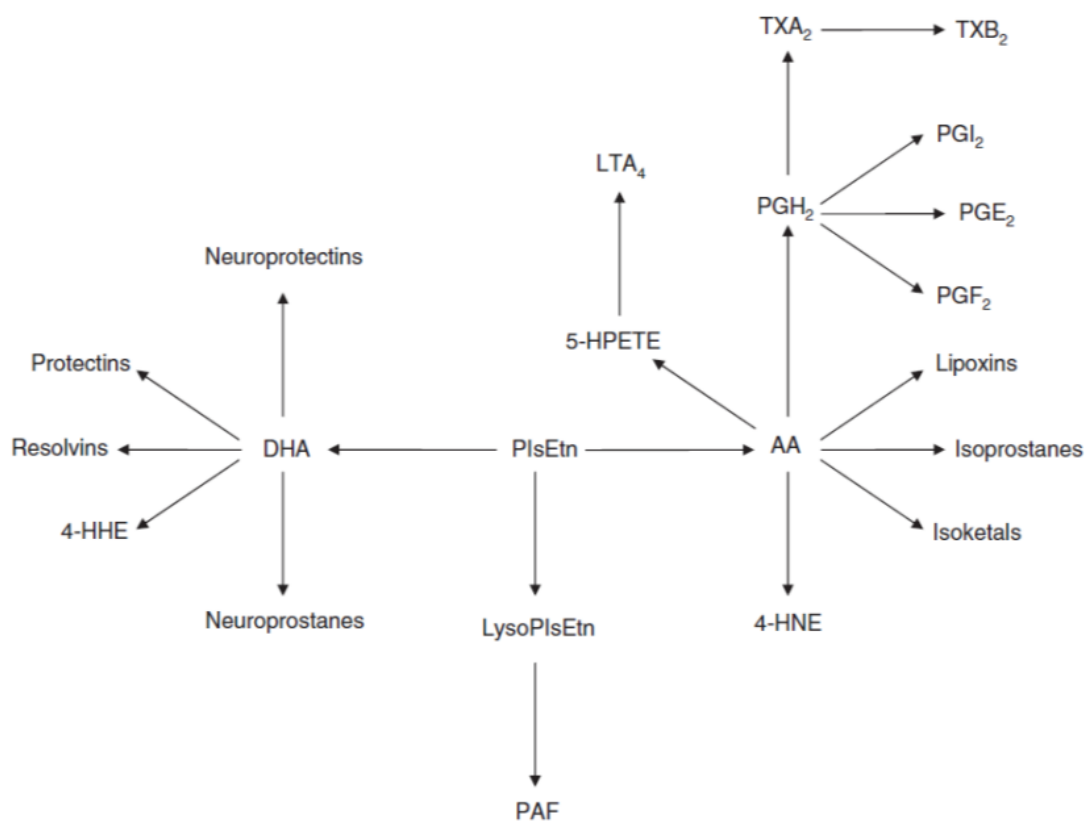


Figure 18 : Médiateurs lipidiques générés à partir des plasmalogènes

Composés dérivés de plasmalogènes après l'action enzymatique d'iPLA2, de cyclooxygénase, lipoxygénase et autres enzymes. AA : acide arachidonique, DHA : acide docosahexaénoïque, 4-HHE : 4-hydroxyhexenal, lyso-PlsEtn : lysoplasmalogène à éthanolamine, PAF : facteur d'activation plaquettaire, TXA₂ : thromboxanes, PGE₂ et PGF₂ : prostaglandines, PGI₂ : prostacyclin, LTA₄ : leucotriène. D'après Farooqui et al. 2008

5.5.3.1. Libération des AGPI par la iPLA2

La famille des phospholipases A2 (PLA2) regroupe des estérases hydrolysant la liaison *sn*-2 des phospholipides pour former des acides gras libres et des lysophospholipides. Les PLA2s sont classées en deux grandes familles : les PLA2s extracellulaires comprenant les PLA2s sécrétées (sPLA2) et les PLA2s intracellulaires ou cytosolique (cPLA2). Ces dernières pouvant être dépendantes du calcium (cPLA2) ou indépendantes (iPLA2). Il existe une vingtaine de d'isoformes des PLA2s classées en différents groupes (Farooqui, Yang et al. 1997; Six and Dennis 2000; Ma and Turk 2001; Dennis, Cao et al. 2011). Les AGPI situés en position *sn*-2 des plasmalogènes peuvent être libérés sous l'action d'une iPLA2. Cette iPLA2 fait partie du groupe VI des PLA2. Un certain nombre d'études a démontré l'existence de plusieurs PLA2 spécifiques aux plasmalogènes (Pls-iPLA2). Wolf et Gross ont décrit cette activité enzymatique dans le myocarde canin (Wolf and Gross 1985) alors que Hazen et al. l'ont décrite dans le myocarde du lapin lors d'une ischémie (Hazen, Stuppy et al. 1990; Hazen, Ford et al. 1991; Hazen, Loeb et al. 1991). Trois PLA2s avec une spécificité pour les plasmalogènes ont été isolées. Le terme «spécifique» est utilisé parce que ces enzymes montrent, *in vitro*, une préférence pour la forme plasményl plutôt que pour la forme phosphatidyl, bien que la forme phosphatidyl soit également un substrat pour ces enzymes. La première PLA2, est une protéine de 40 kDa qui a été purifiée à partir de cytosol du myocarde canin (Hazen, Stuppy et al. 1990). Elle montre une meilleure affinité pour les PlsCho que pour les formes « phosphatidyl » ou « plasményl » et cible sélectivement ceux contenant l'acide arachidonique en position *sn*-2. En 1996, Yang et al. ont décrit une PLA2 de 39 kDa, spécifique des PlsEtn (Yang, Farooqui et al. 1996; Yang, Farooqui et al. 1996). Elle a été identifiée dans le cerveau bovin. Elle vise sélectivement le DHA à partir de la position *sn*-2 des PlsEtn plus que d'autres GP à éthanolamine (Hirashima, Farooqui et al. 1992; Portilla and Dai 1996). Cette PLA2 est 30 fois plus spécifique vis-à-vis des plasmalogènes que des autres GP à éthanolamine et son activité augmente avec l'âge (André, Juanéda et al. 2006). Une forme cytosolique de 28 kDa a également été purifiée à partir du cortex rénal de lapin (Portilla and Dai 1996). Chez le rat, il a été démontré que l'expression des ARNm codant pour cette forme était plus importante dans le rein et l'intestin par rapport aux autres formes (Portilla, Crew et al. 1998). Toutes ces PLA2 spécifiques des plasmalogènes sont des PLA2 indépendantes du calcium (Pls-iPLA2). Ces trois Pls-iPLA2s peuvent être inhibées chimiquement par le E-6-(Bromoéthylène) tetrahydro-3-(1-naphthyl)-2H-pyran-2-one ou BEL (Hazen, Zupan et al. 1991). Cette molécule est un inhibiteur irréversible et covalent des iPLA2s (Ackermann, Conde-Frieboes et al. 1995; Ong, Farooqui et al. 2015). Il est 1000 fois plus sélectif pour les iPLA2s que pour les cPLA2 ou les sPLA2 (Hazen, Zupan et al. 1991). Cependant, il a été montré que le BEL pouvait aussi inhiber la phosphatidate phosphohydrolase 1 (PAP1) une enzyme clef du métabolisme des phospholipides pour la libération de l'AA (Balsinde and Dennis 1996). Ces

données sont à prendre en compte dès l'utilisation du BEL comme inhibiteur des iPAL2s, comme par exemple dans le modèle d'inhibition des iPLA2 mis en place en 2013 au laboratoire (cf 4.2) (Saab-Aoude, Bron et al. 2013; Saab, Buteau et al. 2014).

5.5.4. Pathologies associées au métabolisme des plasmalogènes

Chez l'homme une carence en plasmalogènes, due à une mutation peroxysomale sur les gènes *PEX7*, *GNPAT* (DHAP-AT) ou *AGPS*, entraîne une chondrodysplasie ponctuée rhizomélique (RCDP) respectivement, de type 1, 2 ou 3 (Braverman, Steel et al. 1997; de Vet, Ijlst et al. 1998; Ofman, Hettema et al. 1998; Itzkovitz, Jiralerspong et al. 2012). Cette pathologie est caractérisée par un ralentissement de croissance osseuse avec une calcification des structures cartilagineuses, une cataracte et un retard mental (Spranger, Opitz et al. 1971). C'est une pathologie rare à transmission autosomique récessive. La prévalence de la RCDP est d'environ 1/100000. Les chances de survie des personnes atteintes par cette maladie est d'environ 90 % à 2 ans et passe à 50 % à 6 ans (White, Modaff et al. 2003).

Une baisse des teneurs tissulaires en plasmalogènes chez l'homme est également associée à la maladie d'Alzheimer (Hartmann, Kuchenbecker et al. 2007). Les patients atteints de la maladie d'Alzheimer présentent des teneurs réduites en PlsEtn, PlsCho et DHA dans les zones du cerveau concernées par la pathologie (Ginsberg, Rafique et al. 1995; Astarita, Jung et al. 2010; Igarashi, Ma et al. 2011). Il a été montré que la déficience en plasmalogènes est associée au stade clinique du patient (Han, Holtzman et al. 2001). De même, la sévérité d'une démence de type Alzheimer et le score sur l'échelle Adas-Cog de patients Alzheimer peuvent être corrélés avec la teneur de plasmalogènes plasmatiques (Goodenowe, Cook et al. 2007; Wood, Mankidy et al. 2010). La diminution de la teneur en plasmalogènes, corrélée à la progression de la maladie, serait liée à la perte générale des fonctions péroxysomales dans le cerveau (Kou, Kovacs et al. 2011). L'accumulation de plaques amyloïdes, chez les sujets Alzheimer, pourrait induire une diminution de l'expression de la protéine A-DAPT-S et par conséquent diminuer la biosynthèse des plasmalogènes (Grimm, Kuchenbecker et al. 2011). De plus, un catabolisme élevé des plasmalogènes est suggéré puisqu'il a été observé une forte activité des cPLA2 et en iPLA2 spécifique des plasmalogènes à éthanolamine (PlsEtn-PLA2) dans le cerveau des patients Alzheimer (Stephenson, Lemere et al. 1996; Stephenson, Rash et al. 1999; Farooqui, Ong et al. 2003; Farooqui, Ong et al. 2006; Ong, Farooqui et al. 2010). Plus récemment Hossain et al. ont montré que les plasmalogènes pourraient prévenir la mort neuronale en activant les voies AKT et ERK. A partir de ces résultats, les auteurs supposent que la réduction du taux de plasmalogènes dans les cerveaux de patient atteints de la maladie d'Alzheimer pourrait être une des raisons de leur perte neuronale (Hossain, Ifuku et al. 2013).

Dans une étude sur les souris déficientes pour le gène *PEX7* dans le nerf sciatique, Luoma et al. ont pu montrer que la myéline de ces souris était plus sensible aux atteintes induites par des espèces réactives de l'oxygène comme par exemple la dégradation des protéines transmembranaires. Cette augmentation de vulnérabilité de la myéline suggère que les plasmalogènes peuvent agir comme des antioxydants endogènes capables de prévenir la carbonylation et l'agrégation des protéines, tout en préservant la structure native des membranes. De plus les plasmalogènes *in vivo* pourraient être essentiels à la préservation de l'intégrité de la structure de la myéline pendant le stress oxydatif associé à l'âge ou aux maladies neurodégénératives (Luoma, Kuo et al. 2015).

Une étude sur un modèle murin d'athérosclérose a montré le rôle protecteur des plasmalogènes contre le développement de l'athérome. En effet, la supplémentation en alkylglycérol (précurseurs des plasmalogènes) permet d'atténuer l'incidence de l'athérosclérose, *via* notamment la réduction pondérale et du taux de glucose sanguin des souris (Rasmiena, Barlow et al. 2015). De plus, une étude cas-témoin a mis en évidence une diminution du taux de plasmalogènes (PlsCho) dans les HDL des patients atteints de maladies coronariennes. En effet les plasmalogènes permettent d'augmenter l'activité anti-apoptotique des HDL sur les cellules endothéliales et par conséquent leurs effets athéroprotecteurs (Sutter, Velagapudi et al. 2015).

Les plasmalogènes jouent un rôle important dans la physiologie normale des poumons. En effet, ils contribuent au rôle structural du surfactant pulmonaire. Le surfactant est une fine couche de phospholipides tapissant l'intérieur des alvéoles pulmonaires. Il permet de réduire les tensions exercées contre la paroi des alvéoles et de pallier la survenue d'un collapsus. Une diminution du taux de plasmalogènes est associée à la survenue de la dysplasie broncho-pulmonaire, cause majeure de mortalité chez les enfants prématurés (Rudiger, von Baehr et al. 2000). Les plasmalogènes par leur rôle antioxydant protégeraient aussi des maladies respiratoires puisque les poumons sont une cible directe des espèces réactives de l'oxygène (Braverman and Moser 2012).

5.5.5. Pathologies oculaires associées au métabolisme des plasmalogènes

Chez la souris, les plasmalogènes sont essentiels au bon développement de la vascularisation rétinienne. En effet une absence de plasmalogènes entraîne différentes anomalies anatomiques de l'œil et des défauts du développement vasculaire rétinien ressemblant à ceux observés dans les rétines des enfants prématurés ayant une ROP (cf 4.2 *Modèle animal présentant des phénotypes de ROP*)

Chez l'homme, la RDCP, conséquence d'une absence de plasmalogènes, est associée à une cataracte (Spranger, Opitz et al. 1971). Comme mentionné précédemment, le cristallin est riche

en plasmalogènes. En effet, la liaison vinyl-éther des plasmalogènes est impliquée dans la transparence des cellules épithéliales du cristallin. Une perte des plasmalogènes entraîne donc une opacification du cristallin.

Chez l'homme, une diminution du taux de PlsCho érythrocytaires, mais pas en PlsEtn, a été observée chez des patients atteints de glaucome primitif à angle ouvert (Acar, Berdeaux et al. 2009). Cette réduction est associée à la sévérité du glaucome. De même, Bhattacharya et al. ont montré une diminution similaire du taux de PlsCho dans des cellules issues de trabeculum de patients atteints de glaucome primitif à angle ouvert (Bhattacharya, Lee et al. 2013). Les plasmalogènes joueraient donc un rôle important dans la physiopathologie du glaucome.

Un article abordant l'importance des plasmalogènes dans la rétine a été publié en 2014 dans le journal Biochimie, plus de précisions à ce sujet sont apportées dans le chapitre suivant : *Plasmalogens in the retina : From occurrence in retinal cell membranes to potential involvement in pathophysiology of retinal diseases* (Saab, Mazzocco et al. 2014).

6. Les cellules gliales rétiniennes

La glie regroupe tous les types cellulaires non neuronaux du système nerveux, à l'exception des cellules du système vasculaire et endothélial. La glie peut être divisée en deux sous familles, la macroglie et la microglie. La macroglie désigne différents types cellulaires dérivés du neuroépithélium primitif. Dans la rétine, la macroglie comprend les cellules de Müller et les astrocytes. Les cellules de la microglie représentent les principales cellules immunitaires résidentes de la rétine en condition non pathologique (Hickey and Kimura 1988; Perry and Gordon 1988). Les cellules microgliales proviennent des macrophages apportés par le sang et envahissant le cerveau durant la dernière ontogenèse. Dans la rétine, elles résident dans les couches plexiformes interne et externe. En conditions pathologiques comme la rétinopathie du diabétique (Zeng, Green et al. 2008), la DMLA (Combadiere, Feumi et al. 2007), l'uvéite (Rao, Kimoto et al. 2003) ou au cours du vieillissement (Xu, Chen et al. 2008), les cellules microgliales s'activent et se transforment en cellules amiboïdes qui s'accumulent dans l'espace sous rétinien pour ensuite migrer vers les zones endommagées. Dans ce paragraphe, nous nous intéresserons plus particulièrement aux cellules macrogliales et à leurs interactions.

6.1. Les cellules de Müller

Les cellules de Müller sont des cellules gliales radiaires spécialisées présentes sur toute l'épaisseur de la rétine. Ce sont les cellules gliales principales de la rétine. Dans de nombreuses rétines avasculaires, elles constituent le seul type de cellules macrogliales (Bringmann, Pannicke et al. 2006). Elles sont très importantes que ce soit à travers leur rôle structural ou métabolique.

6.1.1. Structure et localisation des cellules de Müller

Les cellules de Müller ont été décrites pour la première fois en tant que fibres radiales par Heinrich Müller en 1851. Ce sont des cellules polarisées traversant toutes les couches de la rétine. Leurs corps cellulaires sont localisés dans la couche nucléaire interne. Deux extensions émergent du corps cellulaire en directions opposées. L'une côté externe, avec la formation de microvillosités entourant les photorécepteurs et l'autre, du côté interne avec un pied au niveau de la membrane limitante interne. Les cellules de Müller possèdent également des extensions au niveau des couches plexiformes pour entourer les structures synaptiques en formant un dessin en nid d'abeilles. La structure fonctionnelle des cellules de Müller est très similaire entre les différentes espèces de vertébrés (Uga and Smelser 1973), probablement du fait que les extensions des cellules de Müller s'adaptent toujours aux couches rétiniennes avec lesquelles elles sont en contact. Par contre, on observe une variabilité dans la densité spatiale des cellules de Müller en fonction des espèces et notamment en fonction du caractère plutôt scotopique ou

photopique de la rétine (Reichenbach and Robinson 1995). Chez le lapin par exemple, les cellules de Müller de la rétine périphérique sont plus petites et plus espacées que celles de la rétine centrale (Reichenbach, Schneider et al. 1989). Les cellules de Müller forment à travers la rétine un modèle dense et régulier, chaque cellule de Müller pouvant être considérée comme le noyau d'une micro-unité neuronale en forme de colonne, et parallèle aux autres cellules de Müller (Figure 19). Le nombre de neurones associés dans ces colonnes varie en fonction du type de rétine (photopique ou scotopique), chez l'homme par exemple, on retrouve une quinzaine de cellules par cellules de Müller dont environ 11 photorécepteurs (Reichenbach and Bringmann 2010). Ces micro-unités permettent le passage et la concentration de l'information visuelle. Les cellules de Müller participent aux interactions métaboliques et fonctionnelles entre les neurones rétinien.

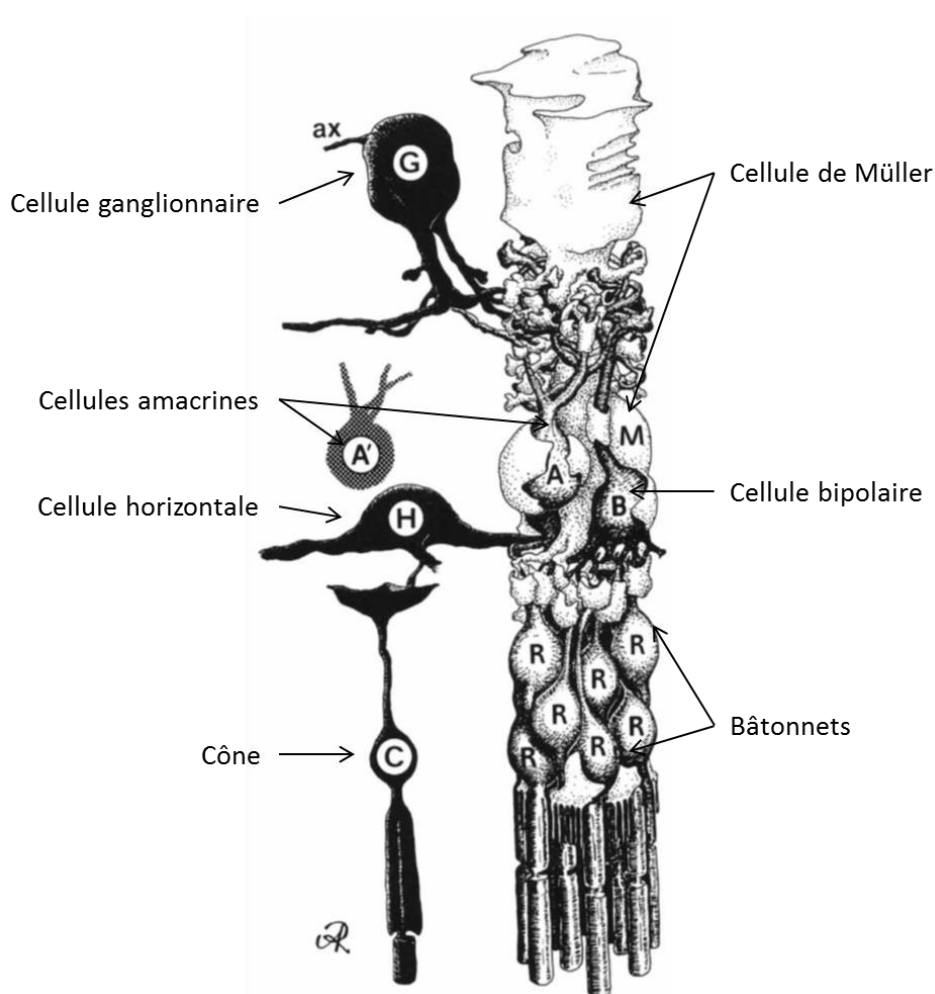


Figure 19 : Dessin d'une cellule de Müller et des neurones associés dans une rétine de mammifère

Les processus et soma neuronaux sont enchâssés dans les processus des cellules de Müller formant ainsi une colonne fonctionnelle. D'après Reichenbach et *al.* 1993

6.1.2. Rôle des cellules de Müller

Les cellules de Müller exercent différentes fonctions dans la rétine. Elles sont, entre autre, impliquées dans l'orientation et le positionnement des cellules neuronales au cours du développement (Stier and Schlosshauer 1998).

Les cellules de Müller sont capables de contrôler le microenvironnement neuronal de la rétine. Elles permettent la régulation des ions potassiques K^+ produits suite à la stimulation des photorécepteurs par la lumière. Les cellules de Müller suppriment l'excès de K^+ des espaces extracellulaires en le stockant et/ou en le redistribuant notamment grâce à la présence de canaux potassiques Kir4.1 (Newman and Reichenbach 1996; Bringmann, Pannicke et al. 2006). De la même manière, les cellules de Müller captent les neurotransmetteurs de l'espace extracellulaire juste après leur relargage à partir des terminaisons synaptiques. En effet, les cellules de Müller ont une forte affinité pour l'acide glutamique ou glutamate et l'acide gamma-aminobutyrique ou GABA, deux neurotransmetteurs antagonistes. Elles peuvent réguler de manière directe l'activité neuronale en délivrant des neurotransmetteurs, en particulier le glutamate, l'ATP ou l'adénosine aux neurones voisins (Newman 2003; Newman 2004; Newman 2004). Ces cellules peuvent aussi réguler le pH extracellulaire de la rétine en récupérant le dioxyde de carbone produit par le métabolisme du glucose des photorécepteurs (Reichenbach and Bringmann 2013). En plus des ions K^+ et du pH, les cellules de Müller régulent aussi les flux hydriques de l'espace extracellulaire grâce à leurs nombreux canaux protéiques aqueux comme l'aquaporine-4 (AQP4) (Nagelhus, Veruki et al. 1998).

Les cellules de Müller servent de support métabolique aux neurones en stockant le glycogène, la glycogénolyse dans les cellules de Müller étant stimulée par l'activité neuronale (Reichenbach, Stolzenburg et al. 1993).

Les cellules de Müller sont également impliquées dans le support et la fonction des photorécepteurs par la sécrétion de facteurs de croissance, de cytokines ou encore de facteurs trophiques tels que le facteur neurotrophique ciliaire (CNTF). Les cellules de Müller expriment d'autres facteurs trophiques tels que le facteur neurotrophique dérivé du cerveau (BDNF) (Shen, Fruttiger et al. 2012). Le BDNF est essentiel à la survie des photorécepteurs. En effet, la suppression des cellules de Müller entraîne une apoptose des photorécepteurs pouvant être prévenue par une addition de ce facteur (Shen, Fruttiger et al. 2012).

Tout comme les astrocytes, les cellules de Müller participent à la formation d'une barrière hémato-rétinienne avec les cellules endothéliales (Tout, Chan-Ling et al. 1993). Tout et al. 1993 ont suggéré que les cellules de Müller seraient un facteur majeur pour la formation et la maintenance de l'intégrité de la barrière hémato-rétinienne, ce qui a été confirmé par la suite par (Shen, Fruttiger et al. 2012). De plus, les cellules de Müller créent un environnement anti prolifératif permanent pour les vaisseaux rétiniens, ceci inhibant la néovascularisation

rétinienne en condition ischémique (Eichler, Yafai et al. 2004). De manière inverse, les cellules de Müller sont capables de produire et de sécréter la protéine Nestin-4 qui agit sur les cellules endothéliales en stimulant leur migration et leur prolifération (Lange, Yafai et al. 2012).

Les cellules de Müller participent également au métabolisme lipidique dans la rétine. En effet, la rétine est riche en lipides est notamment en AGPI, qui peuvent représenter jusqu'à 30 à 33 % des acides gras totaux (Fliesler and Anderson 1983; Bretillon, Thuret et al. 2008; Acar, Berdeaux et al. 2012). Le DHA est un facteur trophique nécessaire au fonctionnement des photorécepteurs. Les cellules de Müller sont capables d'incorporer le DHA (Gordon and Bazan 1990) dans des phospholipides pour le transmettre aux photorécepteurs (Politi, Rotstein et al. 2001). Il existe un transfert lipidique des cellules de Müller vers les neurones impliquant des lipoprotéines de basse et de haute densité (respectivement LDL et HDL). Les cellules de Müller synthétisent les apolipoprotéines ApoE et ApoJ qui sont assemblées dans les lipoprotéines et qui leurs permettent de se fixer sur les récepteurs neuronaux avoisinant (Boyles, Pitas et al. 1985). De plus, les cellules de Müller sont capables de synthétiser un lipide complexe, à savoir la sphingosine-1-phosphate (SP1). Cette SP1 est impliquée dans la mobilité des cellules de Müller en cas de lésion rétinienne. La SP1 contribue également à la protection des photorécepteurs contre l'apoptose induite par un décollement de rétine (Simon, Prado Spalm et al. 2015).

Les cellules de Müller sont capables de s'activer sous certaines conditions, on parle alors de gliose. Cette gliose est caractérisée par des réponses spécifiques et non spécifiques. Les principales réponses non spécifiques à une pathologie ou une lésion de la rétine sont l'expression par les cellules de Müller de la protéine GFAP (Bignami and Dahl 1979; Eisenfeld, Bunt-Milam et al. 1984; Bringmann and Reichenbach 2001) et l'activation des protéines kinases ERK (Akiyama, Nakazawa et al. 2002; Takeda, Takamiya et al. 2002; Tezel, Chauhan et al. 2003; Fischer, Scott et al. 2009). En fonction de la pathologie ou de la lésion, les cellules de Müller répondent de manière différente, c'est la réponse spécifique. Par exemple, l'expression de la glutamine synthétase (GS) est réduite après une perte des photorécepteurs ou un décollement de la rétine (Lewis, Erickson et al. 1989; Grosche, Hartig et al. 1995) ou accrue lors d'une augmentation de la concentration en ammoniacque (Reichenbach, Stolzenburg et al. 1995). La gliose des cellules de Müller est dans un premier temps neuroprotective mais à des stades plus sévères de lésions ou de la pathologie, cette gliose peut s'avérer délétère. A ce moment, les cellules de Müller perdent peu à peu leurs fonctions pour, au final, pouvoir réintégrer en phase de prolifération et produire une réponse cicatricielle (Burke and Smith 1981; Lewis, Chapin et al. 2010).

Dans la rétine adulte, il existe un petit stock de cellules de Müller faisant office de progéniteurs neuronaux ou de cellules souches (Das, Mallya et al. 2006; Bernardos, Barthel et al. 2007; Nickerson, Da Silva et al. 2008; Wu, Cao et al. 2016). En réponse à une lésion de la rétine,

ces cellules peuvent rapidement se différencier, proliférer et générer des cellules souches neuronales qui vont migrer vers le site endommagé (Fischer and Reh 2001; Fischer and Reh 2003).

Les cellules de Müller sont également considérées comme des fibres optiques vivantes. En effet, les différentes couches et cellules composant la rétine ont un fort pouvoir de dispersion de la lumière. Au contraire, les propriétés optiques et géométriques des cellules de Müller miment celles d'une fibre optique. Les pieds des cellules de Müller couvrent la surface interne de la rétine et ont un faible index de réfraction autorisant l'entrée de la lumière. L'arrangement parallèle des cellules de Müller permet une bonne répartition de la lumière aux photorécepteurs. Chez l'homme, chaque cellule de Müller permet la transmission de la lumière à un cône et à environ une dizaine de bâtonnets (Franze, Grosche et al. 2007).

6.1.3. Déficience en cellules de Müller

La dysfonction voire même l'absence des cellules de Müller a été mise en cause dans une maladie rare, la télangiectasie maculaire de type 2 (Powner, Gillies et al. 2010). Le phénotype de cette pathologie, caractérisé par la dégénérescence des cellules endothéliales, l'accumulation de dépôts réfringents, l'apparition de cavités intrarétiniennes associées à une atrophie de la rétine, la perte de photorécepteurs et la fuite des capillaires rétiniens peut être expliqué par la dysfonction des cellules de Müller (Powner, Gillies et al. 2013; Wu, Evans et al. 2013). L'étude d'un modèle d'ablation des cellules de Müller chez la souris par un virus à ADN confirme l'implication de ces cellules dans les maladies dégénératives de la rétine telle que la télangiectasie maculaire de type 2 (Byrne, Khalid et al. 2013).

6.2. Les astrocytes

6.2.1. Structure et localisation des astrocytes

Les astrocytes, cellules étoilées, sont localisés à la surface de la rétine interne au niveau de la couche des fibres nerveuses. La présence d'astrocytes est corrélée à la présence et la distribution des vaisseaux rétiniens puisque les rétines avasculaires ne possèdent pas d'astrocytes et les rétines vascularisées dans des régions restreintes ne possèdent des astrocytes que dans ces régions vascularisées (Schnitzer 1987; Stone and Dreher 1987). Il existe deux types d'astrocytes chez le rat : les astrocytes « intervasculaires » localisés entre les artérioles majeures et les astrocytes « périvasculaires » en relation proche avec les vaisseaux rétiniens (Zahs and Wu 2001). Ces deux types d'astrocytes sont couplés aux cellules de Müller. Les astrocytes migrent depuis le nerf optique au cours du développement vasculaire (Watanabe and Raff 1988). Plusieurs études ont d'ailleurs mis en évidence une interaction entre les cellules endothéliales et

les astrocytes sous-jacents (Holash and Stewart 1993; Provis, Leech et al. 1997; Prat, Biernacki et al. 2001; Chan-Ling, McLeod et al. 2004).

6.2.2. Rôles des astrocytes

Les astrocytes seraient impliqués dans l'orientation et la migration des cellules endothéliales pour former le réseau vasculaire superficiel. En effet, ils forment un réseau en forme de nid d'abeille qui servirait de trame pour le développement du système vasculaire rétinien (Dorrell, Aguilar et al. 2002). Cette trame astrocytaire permettrait aussi de maintenir l'intégrité vasculaire en limitant la migration et la fuite des vaisseaux dans le vitré (Zhang and Stone 1997). Le réseau vasculaire profond ne possède pas d'astrocytes, ce sont donc les cellules de Müller qui prennent en charge le développement de ces vaisseaux (Dorrell, Aguilar et al. 2002). Le rôle des astrocytes dans la vascularisation rétinienne est joué par l'intermédiaire des molécules d'adhésion cellulaire comme la R-cadhérine (Gerhardt, Wolburg et al. 2000; Dorrell, Aguilar et al. 2002), des protéines de la matrice extra cellulaire comme la fibronectine (Jiang, Liou et al. 1994; Uemura, Kusuhara et al. 2006) ou encore par l'expression des isoformes du VEGF (Provis, Leech et al. 1997). Une autre protéine semble être importante dans le rôle joué par les astrocytes au cours de la vascularisation. Il s'agit de la protéine cristalline β A3/A1. Protéine de structure largement retrouvée dans le cristallin, la cristalline β A3/A1 est aussi exprimée dans la rétine neurale par les astrocytes. Elle joue un rôle essentiel pour la structure et les fonctions des astrocytes notamment au niveau du développement et de la maturation du réseau vasculaire (Sinha, Klise et al. 2008).

Les astrocytes, comme les cellules de Müller, jouent également un rôle dans l'homéostasie hydrique de la rétine. En effet, des canaux aqueux AQP4 sont présents sur les membranes des astrocytes, leur permettant de réguler le volume de l'espace extracellulaire, l'évacuation de déchets, la migration cellulaire, la signalisation calcique et de tamponner le potassium extracellulaire (Nagelhus and Ottersen 2013).

Les astrocytes produisent également des facteurs neurotrophiques pour les cellules ganglionnaires même si leur activité principale est le maintien de la barrière hémato-rétinienne (BHR) interne (Kim, Park et al. 2006). La BHR est essentielle au maintien de l'homéostasie de la rétine. En effet, un déséquilibre entre la demande et la disponibilité en oxygène et nutriments à travers la BHR peut entraîner une angiogenèse pathologique (Smith, Sivaprasad et al. 2016). La BHR est composée par les cellules endothéliales, les péricytes, la lame basale et les pieds des astrocytes qui entourent les autres éléments (Yao, Wang et al. 2014). La lame basale est en partie composée de collagène IV sécrété par les cellules endothéliales (Bai, Dilworth et al. 2009). Les astrocytes et les cellules endothéliales interagissent fortement. En effet, les astrocytes sont capables d'induire la production de protéines des jonctions serrées dans les cellules

endothéliales (Dehouck, Meresse et al. 1990). Les principales protéines des jonctions serrées sont la *zona occludens* (ZO-1), les claudines et les occludines (Smith, Sivaprasad et al. 2016). Les astrocytes pourraient également produire de l'Ang1 contribuant à l'imperméabilité des vaisseaux sanguins (Thurston, Suri et al. 1999; Lee, Kim et al. 2003). Les interactions entre les cellules endothéliales et les astrocytes semblent donc essentielles au maintien de la BHR.

6.3. Communication entre les cellules macrogliales

Les cellules de Müller et les astrocytes peuvent communiquer par le biais des jonctions communicantes ou jonctions gap. Les jonctions gap sont des canaux intercellulaires permettant une communication directe *via* des mouvements bidirectionnels d'ions, de métabolites ou de messagers secondaires vers ou depuis les cytoplasmes de cellules voisines (Nagy and Rash 2000). Les jonctions gap sont formées de deux héli-canaux ou connexons, présents chacun sur une cellule voisine, et reliés au-dessus d'un espace extracellulaire de 2 à 4 nm. Le canal formé permet la communication directe des deux cytoplasmes avec un échange par diffusion de molécules jusqu'à 1000 Daltons, telles que des nutriments, des métabolites, des messagers secondaires et des ions (Evans and Martin 2002). Chaque héli-canal est composé de 6 protéines transmembranaires qui sont des connexines (Cx) arrangées autour d'un pore central. Il existe une vingtaine d'isoformes de connexines (21 chez l'homme). Celles-ci sont identifiées par leur poids moléculaire, la connexine 43 (Cx43) par exemple ayant un poids d'environ 43 kDa. Un héli-canal peut être composé d'un seul type de connexine, on parlera alors d'une connexon homomérique ou de connexines différentes formant alors un connexon hétéromérique (Figure 20). Une jonction gap peut alors être composée de deux héli-canaux identiques formant une jonction homotypique ou de deux héli-canaux différents formant une jonction hétérotypique (Figure 20) (Bloomfield and Volgyi 2009). Les jonctions gap sont souvent retrouvées sous forme de plaques de jonctions de différentes tailles et composées de plusieurs canaux de jonction. Ces plaques de jonctions peuvent être observées par microscopie électronique (Figure 21).

La Cx43 est la connexine la plus abondante et la plus exprimée de manière ubiquitaire dans les cellules des mammifères, et notamment dans les astrocytes (Dermietzel, Hertberg et al. 1991). Il y a beaucoup de variations dans l'expression des Cx en fonction des tissus. Par exemple, les kératinocytes dans la peau expriment les Cx31, Cx26, Cx43, Cx32, Cx40, Cx30 et Cx45 (Di, Rugg et al. 2001). Dans l'atrium du cœur, les Cx40 et Cx43 sont co-exprimées et le plus souvent forment des connexons hétéromériques (Valiunas, Gemel et al. 2001). Dans le système nerveux central chez l'homme, les protéines majoritaires des jonctions gap sont la Cx36 et la Cx43. La Cx43 est retrouvée dans les jonctions gap entre les astrocytes mais pas entre les cellules neurales (Yamamoto, Ochalski et al. 1990).

Dans l'œil, on retrouve des connexines au niveau du cristallin et de la rétine. Dans le cristallin, les jonctions gap facilitent la communication intercellulaire pour permettre la survie de cette zone avasculaire. Les jonctions gap sont principalement composées des Cx43, Cx46 et Cx50. Des défauts au niveau de ces jonctions peuvent favoriser l'apparition d'une cataracte (Beyer and Berthoud 2014). Les connexines jouent un rôle important pour le développement de la rétine, notamment dans la coordination du cycle cellulaire, et le contrôle de la migration et de la survie cellulaire (Cook and Becker 2009). Dans la rétine humaine à l'âge adulte, la Cx36 est la plus retrouvée parmi les cellules neurales alors que la Cx43 est retrouvée dans les cellules gliales (Sohl, Guldenagel et al. 2000), les vaisseaux sanguins et les cellules épithéliales (Kerr, Johnson et al. 2010). Au niveau des cellules neurales de la rétine, l'expression de la Cx36 est observée entre les cônes et à la jonction entre les cônes et les bâtonnets. Elle est également retrouvée entre les dendrites des cellules bipolaires, entre les cellules amacrines et entre les cellules ganglionnaires (Sohl, Maxeiner et al. 2005). D'autres connexines sont retrouvées dans les cellules neurales rétinienne et notamment la Cx45 exprimée par certain type de cellules bipolaires et amacrines, mais aussi la Cx50 retrouvée dans les cellules horizontales (O'Brien, Li et al. 2006).

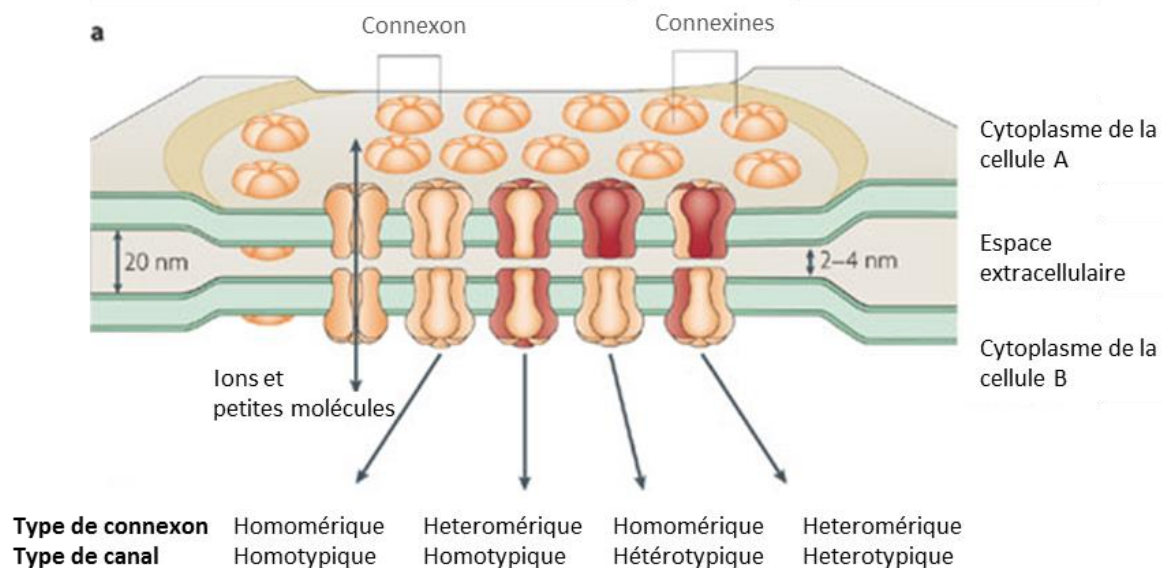


Figure 20 : Structure et organisation des jonctions gap

Les jonctions gap sont formées par apposition des membranes de cellules voisines. Chaque hémicanal se pose contre celui de la cellule voisine pour former un canal. Chaque hémicanal ou connexon est composé de 6 connexines. Adaptés d'après Bloomfield et al. 2009.

Les cellules macrogliales rétinienne (astrocyte et cellules de Müller) expriment majoritairement la Cx43. Chez le lapin et le rat, il existe des jonctions gap riches en Cx43 entre cellules de Müller et entre astrocytes (jonctions homologues) (Figure 21.A) mais aussi entre les

astrocytes et les cellules de Müller (jonctions hétérologues) (Figure 21.B) (Johansson, Bruun et al. 1999; Zahs, Kofuji et al. 2003).

La Cx43 est également retrouvée dans les cellules vasculaires rétiniennes où elle joue un rôle essentiel pour la survie cellulaire et l'intégrité des vaisseaux. En effet, en cas de diabète, l'hyperglycémie entraîne une diminution de l'expression de la Cx43 et par conséquent, induit la mort des cellules vasculaires et augmente la perméabilité vasculaire de la rétine (Tien, Muto et al. 2014). De même, les résultats d'une autre étude suggèrent que l'hyperglycémie inhibe la communication par jonctions gap entre les cellules de Müller et les péricytes, contribuant aux perturbations neurovasculaires rencontrées au cours de la rétinopathie du diabétique (Muto, Tien et al. 2014).

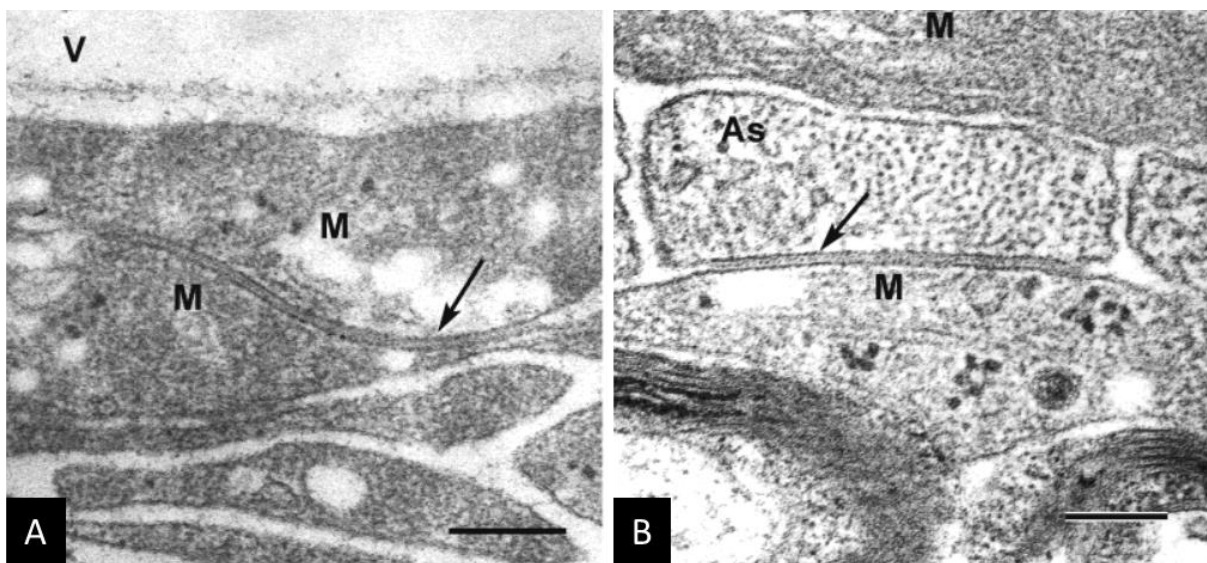


Figure 21 : Microphotographies électroniques de jonction homologue (A) et hétérologue (B)

Marquage immunologique de la connexine 43. Adapté d'après Johansson 1999 J Comp Neurol. M = cellule de Müller, As = Astrocyte, scale bar : 100nm.

Les cellules gliales de la rétine peuvent, par les jonctions gap, favoriser la libération de calcium de réserves internes, et donc permettre la propagation d'ondes calciques dans la rétine (Newman and Zahs 1997). Les astrocytes et les cellules de Müller forment un syncytium fonctionnel *via* les jonctions gap. Les ondes calciques traversant les cellules gliales de la rétine par ces jonctions gap peuvent représenter un signal extracellulaire contribuant à la régulation spatiale de l'activité neuronale *via* l'induction de la sécrétion de gliotransmetteurs (Newman and Zahs 1998; Newman 2003). Elles peuvent également affecter l'homéostasie de la rétine en régulant le volume extracellulaire et en contrôlant le flux sanguin des vaisseaux rétiniens superficiels (Metea and Newman 2006). Une autre étude montre que les flux calciques produits

par les pieds des cellules de Müller sont nécessaires et suffisants à la dilatation des capillaires rétiniens de la couche intermédiaire mais à priori ils n'ont pas d'effet sur la dilatation des artérioles (Biesecker, Srienc et al. 2016). Ces flux calciques seraient probablement initiés par l'activité neuronale.

D'après Zahs et Newman, 1997, les jonctions gap permettent la diffusion de petites molécules (comme le calcium) d'un astrocyte à un autre ou d'un astrocyte à une cellule de Müller, mais vraisemblablement pas d'une cellule de Müller vers un astrocyte (Zahs and Newman 1997). Un peu plus tard, Newman suggère que la propagation des ondes calciques entre les astrocytes est possible par la diffusion d'inositol triphosphate (IP₃) à travers les jonctions gap alors que la propagation entre astrocytes et cellules de Müller ou entre cellules de Müller serait plutôt favorisée par l'émission d'ATP (Ceelen, Lockridge et al. 2001; Newman 2001). Les héli-canaux de Cx43 présents dans les cellules de Müller pourraient également servir à la libération de l'ATP (Zahs, Kofuji et al. 2003).

Une stimulation de la rétine à plat par la lumière provoque l'apparition de courants calciques transitoires mais pas de flux calciques entre les cellules de Müller de la couche plexiforme interne, alors qu'en présence d'adénosine, les flashes lumineux induisent des vagues calciques entre ces cellules (Newman 2005). Ceci suggère que la propagation des flux calciques entre cellules de Müller ne se produirait que sous certaines conditions. De tels courants calciques transitoires ne sont pas observés chez les astrocytes.

En 2006, Zahs et Ceelen suggèrent que la communication limitée observée entre les cellules gliales et notamment, des cellules de Müller vers les astrocytes, dans les différentes expériences pourrait être attribuée à des artefacts dus aux conditions expérimentales (Zahs and Ceelen 2006). L'introduction d'une micropipette pour l'injection d'agent colorant passant à travers la membrane plasmique peut avoir des conséquences au niveau des jonctions gap. En effet Trexler et al. montrent que l'introduction de la micropipette peut entraîner la fermeture des jonctions gap entre les cellules neuronales de la rétine (Trexler, Li et al. 2001). Les résultats obtenus dans l'étude de Zahs et Ceelen indiquent que le réseau glial de la rétine n'est pas statique et pourrait être sujet à un remodelage rapide par les modifications des jonctions gap (Zahs and Ceelen 2006).

A ce jour et à notre connaissance, il n'existe pas de travaux relatant l'étude des flux calciques entre cellules de Müller et astrocytes en co-culture.

7. Objectifs

Nous avons vu que les AGPI jouent un rôle essentiel dans les mécanismes régulant le développement vasculaire rétinien. De plus, un grand nombre de données rapporte qu'un apport élevé en AGPI n-3 protège la rétine contre des pathologies à composante vasculaire telles que la DMLA, la RD ou encore la ROP.

Nous savons également qu'au sein des membranes cellulaires, les AGPI (notamment l'AA et le DHA) sont stockés de manière préférentielle dans des glycérophospholipides particuliers appelés plasmalogènes (Ford and Gross 1989; Gaposchkin and Zoeller 1999). Les plasmalogènes sont essentiels au bon développement du cerveau et de l'œil. Des travaux de notre laboratoire montrent qu'une déficience en plasmalogènes est associée à des défauts dans le développement vasculaire rétinien chez la souris, avec un phénotype semblable à celui observé dans la ROP. L'action des plasmalogènes semble médiée par les AGPI libérés à partir de leur position *sn-2* par les iPLA2 spécifiques des plasmalogènes (Saab, Buteau et al. 2014). Dans la rétine, l'enzyme clef de la biosynthèse des plasmalogènes, la DHAP-AT, est exprimée au niveau de l'EPR, des segments internes des photorécepteurs et de la couche plexiforme externe, ces dernières correspondant aux lieux où sont localisés les extensions et les corps cellulaires des cellules de Müller mais pas au niveau de la couche des cellules ganglionnaires ni au niveau du réseau astrocytaire rétinien (Acar, Gregoire et al. 2007).

Nous savons également que la formation préalable d'un réseau astrocytaire est cruciale pour le développement vasculaire puisque c'est sur cette trame que les vaisseaux rétiens se développeront de manière passive. Les données du laboratoire suggèrent que des anomalies dans la formation de cette trame seraient en cause dans le phénotype vasculaire rétinien de la souris déficiente en plasmalogènes. Enfin, nous savons que les astrocytes ont un lien physique et métabolique avec les cellules de Müller avec lesquelles ils communiquent. Ces cellules de Müller jouent un rôle central dans le métabolisme de la rétine en assurant un support métabolique aux cellules environnantes, en particulier à travers la métabolisation des lipides de la rétine.

Ces différents éléments nous amènent à nous poser la question de la place des cellules de Müller dans la régulation du développement vasculaire rétinien par les plasmalogènes. En d'autres termes, quel est l'impact de la déficience en plasmalogènes sur le métabolisme et le comportement de ces cellules ? A-t-elle une influence sur la communication des cellules de Müller avec les astrocytes ? Voire sur le développement vasculaire rétinien tel qu'observé dans la ROP ?

Nous formulons l'hypothèse selon laquelle les cellules de Müller, par le biais d'une signalisation plasmalogènes-dépendante, pourraient influencer le comportement des astrocytes au cours du développement *via* des anomalies dans la communication calcique. De façon plus

globale, nous formulons l'hypothèse d'une relation entre des anomalies dans le métabolisme des plasmalogènes et un développement vasculaire rétinien anormal tel qu'observé dans la ROP.

La première partie de ce travail consiste en l'établissement d'un état des connaissances sur les plasmalogènes dans la rétine, ceci sous forme d'une revue publiée dans le journal *Biochimie* en 2014.

La seconde partie de ce travail consiste en l'étude du métabolisme des plasmalogènes dans les cellules de Müller, à savoir leur capacité à synthétiser les plasmalogènes, l'étude des conséquences d'une déficience en plasmalogènes sur le comportement cellulaire à travers l'implication des AGPI portés en position *sn-2* des plasmalogènes.

Nous avons ensuite étudié l'impact d'une déficience en plasmalogènes sur les capacités de communication calcique des cellules de Müller avec les astrocytes.

Enfin, nous avons voulu vérifier l'association entre anomalies dans le métabolisme/biodisponibilité des plasmalogènes et des AGPI qu'ils portent avec l'apparition et la sévérité de la rétinopathie du prématuré à travers une étude clinique menée chez le nouveau-né.

Chapitre 2 : Plasmalogènes et rétine

Problématique

Les plasmalogènes sont, comme nous l'avons mentionné, des phospholipides particuliers caractérisés notamment par la liaison vinyl-éther en position *sn*-1 du squelette glycérol. Les phospholipides sont les constituants majeurs des membranes plasmiques des cellules et sont impliqués dans différentes fonctions telles que la régulation de la croissance cellulaire mais aussi dans la génération de molécules actives pouvant impacter les fonctions cellulaires. Chez l'homme, environ 18% des phospholipides sont des plasmalogènes (Nagan and Zoeller 2001). Les plasmalogènes ne sont pas répartis uniformément dans tous les tissus. Ils sont retrouvés en majorité dans les membranes des cellules des tissus nerveux tels le cerveau ou la rétine. De par leur structure particulière, les plasmalogènes peuvent influencer les propriétés biophysiques et biochimiques des membranes cellulaires en agissant comme par exemple la fluidité membranaire, les interactions lipide-lipide et lipide-protéine mais aussi le trafic membranaire. (Thai, Rodemer et al. 2001).

Des taux cellulaires réduits en plasmalogènes ou une altération de leur métabolisme ont été mis en évidence dans plusieurs pathologies, telles des maladies neurodégénératives ou encore le diabète, le cancer ou le glaucome. De plus, une déficience en plasmalogènes dans un modèle murin (souris DAPAT) entraîne différents déficits et notamment au niveau du développement de l'œil et de la rétine (Rodemer, Thai et al. 2003).

Nous savons qu'une des enzymes clef de synthèse des plasmalogènes est exprimée dans certaines régions de la rétine et que les plasmalogènes sont retrouvés dans la rétine neurale, l'épithélium pigmentaire rétinien et le nerf optique (Acar, Gregoire et al. 2007).

Ce premier article est une revue synthétisant les données de la littérature sur les plasmalogènes dans la rétine, depuis leur présence à leur implication possible dans la physiopathologie de la rétine. Cet article a été publié dans le journal Biochimie.



Review

Plasmalogens in the retina: From occurrence in retinal cell membranes to potential involvement in pathophysiology of retinal diseases



Sarah Saab^{a, b, c}, Julie Mazzocco^{a, b, c}, Catherine P. Creuzot-Garcher^{a, b, c, d},
Alain M. Bron^{a, b, c, d}, Lionel Bretillon^{a, b, c}, Niyazi Acar^{a, b, c, *}

^a CNRS, UMR6265 Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation, F-21000 Dijon, France

^b INRA, UMR1324 Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation, F-21000 Dijon, France

^c Université de Bourgogne, UMR Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation, F-21000 Dijon, France

^d Department of Ophthalmology, University Hospital, F-21000 Dijon, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 30 May 2014

Accepted 26 July 2014

Available online 12 August 2014

Keywords:

Plasmalogens

Phospholipids

Polyunsaturated fatty acids

Phospholipase A2

Retina

Angiogenesis

ABSTRACT

Plasmalogens (PLs) represent a specific subclass of glycerophospholipids characterized by the presence of a vinyl-ether bond at the *sn*-1 position of glycerol. PLs are quantitatively important in membranes of neuronal tissues, including the brain and the retina, where they can represent until almost two-third of ethanolamine glycerophospholipids. They are considered as reservoirs of polyunsaturated fatty acids as several studies have shown that arachidonic and docosahexaenoic acids are preferentially esterified on PLs when compared to other glycerophospholipids. Reduced levels of PLs were observed in a number of neurodegenerative disorders such as glaucoma, the second leading cause of blindness worldwide. In a mouse model of PLs deficiency, "glaucoma-like" optic nerve abnormalities were observed as well as developmental defects in the eye. These included microphthalmia, dysgenesis of the anterior segment of the eye, and abnormalities in retinal vessel architecture. Several data from animal and *in vitro* studies suggest that PLs may be involved in the regulation of retinal vascular development through the release of polyunsaturated fatty acids by a calcium-independent phospholipase A2.

© 2014 Elsevier B.V. and Société française de biochimie et biologie Moléculaire (SFBBM). All rights reserved.

1. Introduction

Phospholipids constitute the principal elements of the plasma membrane lipid bilayer. In addition to providing structure to a cell, membrane phospholipids are involved in multiple functional roles

Abbreviations: AA, arachidonic acid; A-DHAP-R, acyl/alkyl dihydroxyacetone-phosphate reductase; A-DHAP-S, alkyl-DHAP synthase; Angpt-2, angiotensin-2; bs2, blind sterile 2; DAPAT, DHAP-AT knock-out; DHA, docosahexaenoic acid; DHAP, dihydroxyacetone-phosphate; DHAP-AT, dihydroxyacetone-phosphate acyl-transferase; EPA, eicosapentaenoic acid; GPEtn, ethanolamine-glycerophospholipids; GPs, glycerophospholipids; IOP, intra ocular pressure; iPLA2, calcium-independent phospholipase A2; MMPs, matrix metalloproteinases; DR, diabetic retinopathy; PEX7, peroxine 7; PLA2, phospholipase A2; PLs, plasmalogens; PlsCho, plasmalogen-choline; PlsEtn, plasmalogen-ethanolamine; PLs-iPLA2, PLs-selective iPLA2 isoforms; POAG, primary open-angle glaucoma; PUFAs, polyunsaturated fatty acids; RCDP, rhizomelic chondrodysplasia punctuate; ROP, retinopathy of prematurity; VEGF, vascular endothelial growth factor.

* Corresponding author. UMR CSGA, Eye and Nutrition Research Group, 17, rue Sully, BP86510, 21065 Dijon Cedex, France. Tel.: +33 (0)3 80 69 32 69; fax: +33 (0)3 80 69 32 23.

E-mail addresses: acar@dijon.inra.fr, niyaziacar@yahoo.fr (N. Acar).

including regulation of cell growth and adhesion, anchoring of membrane proteins, and generation of products that are potent regulators and messengers. Plasmalogens (PLs) form a specific subclass of glycerophospholipids (GPs) characterized by the presence of a vinyl-ether bond at the *sn*-1 position of the glycerol backbone, instead of an ester bond as seen in diacyl-GPs (Fig. 1) [1]. PLs represent the most abundant ether-linked GPs in mammalian cells [2]. PLs are characterized by the presence of hexadeca-(16:0), octadeca-(18:0), 9-octadeca-(18:1n-9), and 7-octadeca-(18:1n-7) alkenyl moieties at *sn*-1 position of glycerol, whereas polyunsaturated fatty acids (PUFAs) are esterified at the *sn*-2 position of glycerol. These PUFAs mainly consist in arachidonic acid (AA) but omega-3 PUFAs such as docosahexaenoic acid (DHA) can also be found to be esterified to PLs. Finally, the *sn*-3 position consists of a polar head group such as phospho-choline or phospho-ethanolamine (Fig. 1) [3].

While diacyl-type GPs biosynthesis is taking place exclusively in the endoplasmic reticulum, the biosynthesis of PLs is initiated in peroxisomes and goes on in endoplasmic reticulum. The substrate

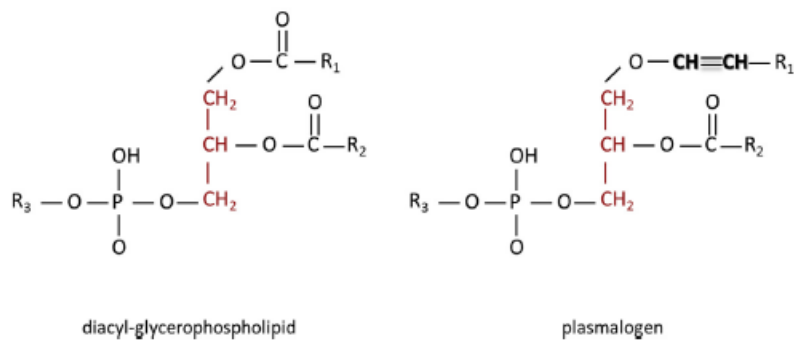


Fig. 1. Structure of diacyl-glycerophospholipids and plasmalogens: diacyl-glycerophospholipids (diacyl-GPs) and plasmalogens (PIs) are both composed of a glycerol backbone (in red). PIs are characterized by a vinyl-ether bond at the *sn*-1 position, instead of an ester bond as seen in diacyl-GPs. Diacyl-GPs contain ester bonds in order to link R_1 and R_2 acyl-moieties at *sn*-1 and *sn*-2 positions. In PIs, the *sn*-1 position carries a vinyl ether bond to link alkenyl-moieties. R_3 is either choline, ethanolamine, serine or inositol.

for PIs biosynthesis is dihydroxyacetone-phosphate (DHAP, formerly named glycerone-phosphate). During the first step of the PIs biosynthesis, DHAP is esterified with a long chain acyl-CoA at the *sn*-1 position by dihydroxyacetone-phosphate acyltransferase (DHAP-AT, glycerone-phosphate O-acyltransferase, EC 2.3.1.42) (Fig. 2). The second step is catalyzed by alkyl-DHAP synthase (A-DHAP-S, alkylglycerone-phosphate synthase, EC 2.5.1.26) and leads to the formation of an ether bond at the *sn*-1 position. The third step consists in the reduction of the ketone function at the *sn*-2 position by acyl/alkyl dihydroxyacetone-phosphate reductase (A-DHAP-R, acylglycerone-phosphate reductase, EC 1.1.1.101). These first three steps, that are specific of PIs biosynthesis, take place in peroxisomes and represent the key points of the regulation of PIs biosynthesis. The next steps are common with those for diacyl-GPs biosynthesis and take place in endoplasmic reticulum. Finally the last step

catalyzed by plasmalogen ethanolamine desaturase (EC 1.14.99.19) leads to the formation of the PIs-specific vinyl-ether bond [1].

Approximately 18% of total phospholipids in humans are PIs, but their distribution in tissues or cell types is heterogeneous. For example, rat liver GPs are composed of less than 5% of PIs [4] while those from spermatozoa contain 38% of PIs [5]. Except for the heart, PIs in tissues are mainly of plasmalogen-ethanolamine (PIsEtn) subtype. In human white matter, PIsEtn accounts for 80% of total ethanolamine-GPs (GPEtn) [6]. PIsEtn is also major components of the myelin sheath [7]. In erythrocytes, kidney, skeletal muscle and retina, PIsEtn represents up to 20–40% of total GPEtn [8–10]. Neonates are characterized by reduced levels of red blood cells PIs when compared to older children [11]. PIs amounts in the brain increase significantly during developmental stages and reach their maximum level at 30 years of age in

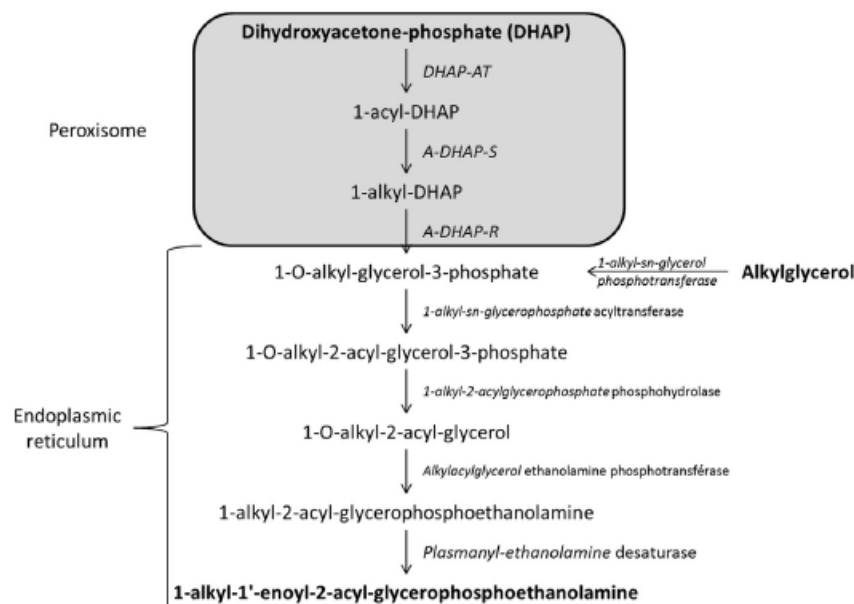


Fig. 2. Biosynthesis of plasmalogens: The first three steps of PIs biosynthesis take place in peroxisomes by the metabolization of dihydroxyacetone-phosphate (DHAP) by dihydroxyacetone-phosphate acyltransferase (DHAP-AT), alkyl-dihydroxyacetone-phosphate-synthase (A-DHAP-S) and acyl/alkyl dihydroxyacetone-phosphate reductase (A-DHAP-R). Alkylglycerols can bypass the first three steps and enter the pathway after the action of a kinase. The following steps of PIs biosynthesis occur in endoplasmic reticulum and are common with those for diacyl-GPs biosynthesis. The last step is catalyzed by plasmalogen-ethanolamine desaturase and leads to the formation of the PIs-specific vinyl-ether bond.

humans [12]. In the adult rat brain, an age-related decrease of Pls levels was observed [13].

Compared to other GPs, the lack of the carbonyl oxygen at the sn-1 position of Pls increases their hydrophobicity. Moreover the presence of the vinyl-ether bond reduces membrane fluidity, and increases order, thus promoting the formation of non-bilayer phases at lower temperatures which is necessary for membrane fusion and fission mechanisms [2]. Pls play also important functions in mechanisms related to cholesterol efflux [14] and in lipid raft microdomains formation [15]. The vinyl-ether bond being also very sensitive to oxidation, it was suggested that Pls may serve as a sacrificial trap for free radicals and singlet oxygen [16–18]. In the eye, Pls account for 30% of GPEtn in retinal pigment epithelial (RPE) cells [9] that are known to be highly exposed to oxidative damage due to their location in a highly oxygenated environment, and their exposition to high levels of light. In these cells, Pls were suggested to play protective roles against oxidative stress [19]. Another suspected role for Pls in cell membranes was the storage of PUFAs [3,12]. Indeed, Pls are considered as reservoirs of DHA and AA, these PUFAs being precursors of a number of oxygenated molecules belonging to prostaglandin, leukotriene, resolvin-, and protectin families [20].

2. Developmental eye defect related to plasmalogen deficiency

Reduced levels of Pls and alteration of Pls metabolism have been reported in several neurodegenerative disorders including Alzheimer's disease [6] and Parkinson's disease [21]. Circulating levels of Pls were also found to be altered in patients with diabetes [22,23], cancer [24], and glaucoma [25–27]. However, current evidence did not yet establish whether Pls deficiency was the primary cause or a downstream effect of these diseases. Genetic mutations in the sequence of enzymes involved in Pls biosynthesis or in peroxisomal receptors of these enzymes are known to lead to tissue Pls deficiencies. In human, Pls deficiency is the primary cause of rhizomelic chondrodysplasia punctata (RCDP) [28] and a contributing factor to several genetic diseases including Zellweger syndrome [29].

In the effort to better understand the involvement of Pls in these diseases, various animal models with defects in enzymes involved in Pls biosynthesis have been developed (reviewed in Ref. [30]). These mutants display several peroxisomal disorders resulting from deletion or mutation in genes encoding for PEX7, A-DHAP-S or DHAP-AT enzymes. *PEX7* is a gene encoding for the peroxisomal protein transporter peroxine 7. *PEX7* transporter is required for peroxisome localization of A-DHAP-S, peroxisomal acetyl-CoA C-acyltransferase (EC 2.3.1.16), phytanoyl-CoA dioxygenase (EC 1.14.11.18) and mevalonate kinase (EC 2.7.1.36). *PEX7* knockout mice display extremely reduced levels of Pls, and elevated levels of very long-chain fatty acid (VLCFA) and phytanic acid [31]. This model is used to study RCDP type 1 or mechanisms related to the generalized loss of peroxisomal functions. The blind sterile 2 (bs2) mouse is characterized by a spontaneous mutation in intron 14 of the A-DHAP-S locus. The bs2 mice represent a model for RCDP type 3, in which the limited deficiency in Pls biosynthesis allows studying the consequences of partial loss of Pls [32]. The DHAP-AT (DAPAT) knock-out mice were generated by the deletion of exons 5 to 7 through homologous gene recombination [7,33]. The DAPAT mouse model serves as a mouse model for RCDP type 2, and is very useful to study the pathophysiological mechanisms that are specifically related to a single Pls deficiency without affecting other peroxisomal functions.

DAPAT mice are characterized by a severe phenotype with impaired growth and up to 40% of lethality during the first weeks

after birth [7]. Mutants are about 30–40% underweighted with shortening in proximal bones. The absence of DHAP-AT leads to extremely reduced levels of Pls in tissues of DAPAT mice. The consequences of Pls deficiency corroborate the role of Pls in modulating membrane structure and organization. These defects include abnormal expression of flotillin, connexins and claudins, and altered lipid raft composition. Male DAPAT mice display impaired spermatogenesis and are infertile (Table 1). In adult mutants, testes are atrophic and the epididymis is devoid of spermatozoa. The seminiferous tubules exhibit reduction and disorganization of the multilayered seminiferous epithelium that presents more apoptotic cells than in wild-type mice. In female DAPAT mice ovaries are smaller in size but display intact folliculogenesis [7].

The importance of Pls for the normal development and homeostasis of the eye is strikingly evident in DAPAT mice and highlighted by the presence of a congenital cataract (Table 1). Distinct developmental eye defects were reported, including microphthalmia, dysgenesis of the anterior eye, and alterations in the number, the architecture and the differentiation of lens epithelial cells, disorganization and swelling of lens fiber cells, thickness of the lens capsule (anterior and posterior location), abnormal formation of lenticonus adhering to the corneal endothelium, and bilateral central dense cataract [7,34]. In the retina, an increase of Bruch's membrane thickness was observed as well as alterations in the RPE cell structure and function consisting in vacuolation, hypo- and hyperplasia, altered pigmentation as well as accumulation of photoreceptor degradation products.

The optic nerve of DAPAT mice displayed several alterations that may be related to the pathophysiology of glaucoma, the second leading cause of blindness worldwide. These were a reduced diameter of the nerve head and dilation of retinal ganglion cells [7]. The abnormalities seen on the optic nerve of DAPAT mice are indicative of optic nerve hypoplasia. In humans, optic nerve hypoplasia is a common congenital optic nerve anomaly usually resulting in moderate to severe vision loss in children. It is also observed in septo-optic dysplasia.

One of the most striking abnormalities of the adult DAPAT mouse eye was the persistence of hyaloid artery. Hyaloid artery is a branch of the ophthalmic artery, which is itself a branch of the internal carotid artery. Hyaloid artery extends from the optic disc through the vitreous body to the lens. Its role consists in supplying nutrients and oxygen to the growing lens during eye development. Hyaloid vessels fully regress before birth in humans, and within the first few weeks after birth in rodents. Hyaloid vasculature regresses while retinal vasculature develops [35]. Failure in hyaloid vasculature regression is generally associated with several ocular pathologies referred as hyperplastic primary vitreous or persistent fetal vasculature. Several studies focusing on the mechanisms by which hyaloid vessels regress have reported the implication of numerous

Table 1
Phenotypic characteristics of DAPAT mice (according to [7]).

| | |
|----------------------------|---|
| Reproductive system | |
| Females | Smaller ovaries, reduced number of tertiary follicles and corpora lutea leading to subfertility |
| Males | Atrophic testes, decreased diameter of seminiferous tubules leading to male infertility |
| Brain | |
| | Microcephaly |
| Eye | |
| | Microphthalmia, central dense cataract and dysgenesis of the anterior chamber |

molecules and growth factors [35]. In these studies, the persistence of the hyaloid vessels was often associated with defects in retinal vascularization, suggesting that hyaloid vessels persist to functionally compensate the undeveloped retinal vessels.

3. Distribution of plasmalogens in the retina

Pls are abundant in neural tissues, and particularly in the human brain where they can represent up to 22% of total GPs, and 58% of total GPEtn [10,36]. Recently, by *in situ* hybridization of the DHAP-AT mRNA sequence, we have reported that Pls are likely to be synthesized at least in two distinct cell types in the neural retina, namely in the inner segment of photoreceptor cells, and in the retinal pigmented epithelium (RPE) cells [9]. Pls were present in high amount in the neural retina, in the RPE cells and in the optic nerve [8,9,37]. PlsEtn was the predominant subclass of Pls in the neural retina and RPE cells whereas PlsCho was found in high quantities in the optic nerve. In the neural retina, the major PlsEtn species were those esterified with either AA or DHA at *sn*-2 position of glycerol (namely PlsEtn16:0/20:4, PlsEtn18:0/20:4, and PlsEtn18:0/22:6) [8]. By contrast, the most abundant PlsCho species in the optic nerve were PlsCho16:0/18:0, PlsCho18:0/18:0 and PlsCho18:1/18:0. PlsCho levels are known to be correlated to the degree of myelin content in a tissue, and their levels relative to the total GP concentrations can reach 76% in the white matter [6] and 36% in the optic nerve [8].

4. Plasmalogens, polyunsaturated fatty acids and pathophysiology of glaucoma

Glaucoma is the second cause of blindness worldwide after cataract. Quigley and Broman have predicted that 80 million people in the world will suffer from glaucoma in 2020 [38]. The term glaucoma encompasses a set of clinical presentations with a characteristic optic nerve head remodeling leading to alterations of visual field and progressive loss of vision. Several risk factors such as age or genetic background have been identified for glaucomatous optic neuropathy, elevated intra ocular pressure (IOP) being the best documented [39,40]. Primary open-angle glaucoma (POAG) represents the most common form of glaucomatous optic neuropathy. Despite successful therapeutic management of IOP, a substantial interest exists in other preventive approaches against the development of glaucomatous optic neuropathy. Indeed several observations showing that an elevated IOP does not inevitably lead to glaucoma and that glaucoma can develop under normal IOP conditions [41–43] strongly suggest that factors other than IOP are likely to play a role in the pathogenesis of glaucoma. In this context, the metabolism of PUFAs and Pls may be of interest.

Indeed, several epidemiologic studies have evaluated the influence of dietary omega-3 and omega-6 PUFAs intake on IOP. While one of them did not find any association [44], a study of Kang and collaborators demonstrated that the dietary ratio of omega-3 PUFAs to omega-6 PUFAs was associated with a higher risk of high-IOP POAG [45]. The authors speculated that a higher intake of omega-6 PUFA increases the bioavailability of omega-6 PUFA-derived prostaglandins, and particularly the IOP-lowering prostaglandin F_{2α}. In another work of Renard and collaborators, POAG was associated with low consumption of omega-3 PUFAs suggesting a potential protective role of omega-3 PUFAs [46]. These epidemiologic data are reinforced by results from two human studies demonstrating that patients with POAG have reduced blood levels in omega-3 PUFAs (eicosapentaenoic acid or EPA, and DHA) when compared to healthy subjects [25,47], and those from an animal study showing that IOP can be significantly reduced by a dietary supplementation in omega-3 PUFAs in rats [48].

In order to check whether the modifications in PUFAs metabolism observed in glaucoma may be related to Pls metabolism, we performed a profiling study in erythrocyte membranes from patients with POAG at different stages [25]. Lipidomic analyses showed a specific decrease of PlsCho in erythrocytes of subjects with POAG, this loss being stage-dependent and likely to have started decades before the first clinical manifestation of glaucoma. More recently, Aribindi et al. observed a reduction of the concentrations of DHA and several PlsCho species in trabecular meshwork – an ocular structure regulating IOP by promoting aqueous humor outflow – originating from human cadavers with POAG [27]. The same group observed a 24%-reduction of the total phospholipid content in aqueous humor in subjects with POAG compared to controls [26]. Based on the glaucoma-like alterations observed in eyes of DAPAT mice, these data reinforce the idea of a potential involvement of, at least, the metabolism of PUFAs, and probably that of Pls in the pathophysiology of glaucomatous optic neuropathy.

5. Plasmalogens and retinal vasculature

Recent data from our laboratory suggest that Pls are essential for physiologic and proper retinal vascular development. These data show that a lack of Pls during post-natal development leads to several defects in retinal vasculature (Fig. 3) [49].

Proliferative retinopathies including diabetic retinopathy (DR) and retinopathy of prematurity (ROP) are thought to be a result of molecular imbalance leading to microvascular degeneration, which precedes an abnormal neovascularization in the neural retina [50–53]. Whereas diabetic patients aged between 25 and 60 years are at risk of developing DR [54,55], ROP is a disease that can cause blindness in very low birth weight infants. The incidence of ROP is closely correlated with the weight and the gestational age at birth [56]. Historically, ROP is defined as a two-stage disease. The first stage begins with the interruption of normal retinal vascular development at the time of preterm birth [57]. The second phase of ROP begins at 32–34 weeks postmenstrual age and is characterized by an avascularized retina and subsequent hypoxia. The vascular obliteration occurring secondarily to hypoxia stimulates neovascularization [58] then vessel dilation and tortuosity appear [59].

DAPAT mice that are deficient in Pls display a retinal vascular phenotype resembling that observed in ROP [49]. In DAPAT mice, retinal capillarization is increased and preceded by a delay in vessel outgrowth. As for ROP, retinal vessels are characterized by exacerbated dilation and tortuosity. These abnormalities seem to be the results from a defective astrocyte template formation (Fig. 3). This astrocytic network develops prior to vessels and serves as a guide for endothelial cells in addition to influencing their proliferation [60]. The molecular mechanisms by which Pls may be involved in the regulation of postnatal retinal vascular development are still unclear. However, several data from this study suggest a potential release of PUFAs by a calcium-independent phospholipase A2 (iPLA2) and a subsequent action on angiotensin/ie pathways.

In the next paragraphs, we provide several elements that reinforce the idea of the potential involvement of Pls, phospholipases A2 (PLA2) and the subsequent PUFAs release in the control of vascular growth.

5.1. Potential involvement of calcium-independent PLA2 activity

A number of studies suggest that PUFA release from Pls is ensured by a specific PLA2 belonging to the group of iPLA2. In the early 90's, the existence of two Pls-selective iPLA2 isoforms (Pls-iPLA2) was shown in several tissues including canine myocardium, bovine brain and rabbit proximal tubules [61–64]. A 39 kDa isoform was purified and characterized in the brain and the kidney. It

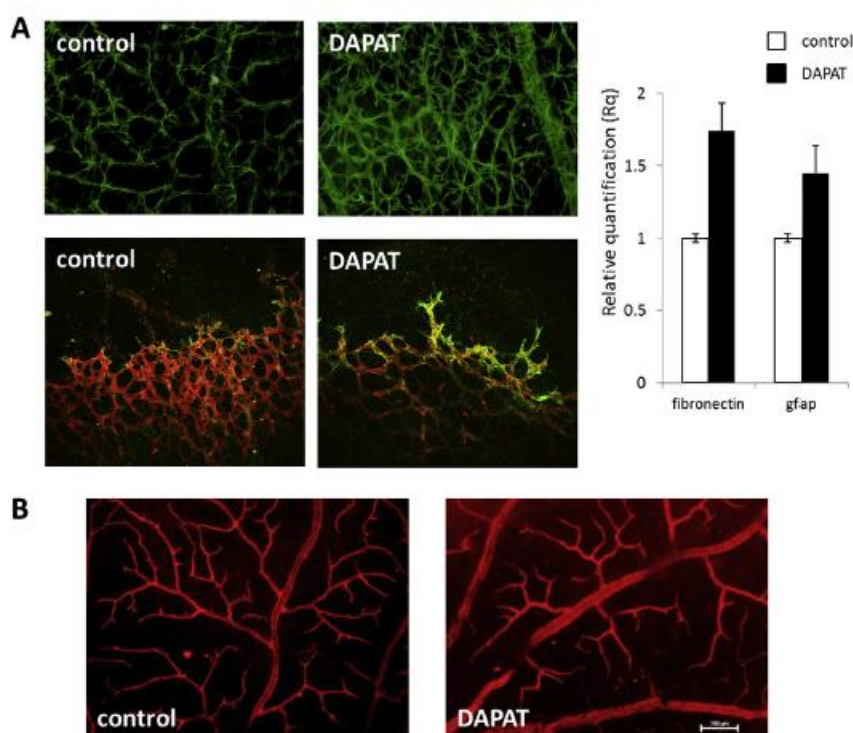


Fig. 3. Abnormalities in retinal vessels of DAPAT mice: **A.** Higher astroglial activity and defective astrocyte template formation in the retina of DAPAT mice. The retinal astrocytic template of DAPAT mice (green on upper panel) was denser when compared to control animals. Retinas of DAPAT mice were characterized by a higher secretion of fibronectin (green on lower panel) by astrocytes (red on lower panel) at the front of vascular development. RT-qPCR analyses confirmed the overexpression of fibronectin and the marker of glial activation GFAP in the retina of DAPAT mice at post-natal day 7. **B.** vascular abnormalities in the retina of adult DAPAT mice. Confocal micrographs of isolectin-B4 stained flat-mounted retinas of control and DAPAT mice showing enlarged arteries and veins and disorganized retinal capillaries in DAPAT mice (scale bar: 100 μ m). Adapted from Ref. [49].

selectively targets DHA from the *sn*-2 position of PlsEtn [62,65]. A 40 kDa isoform was purified from canine myocardial cytosol [61]. This enzyme selectively targets AA from the *sn*-2 position of PlsCho. Other recent studies revealed a specific role for Pls-metabolizing iPLA2 in human hypoxic coronary artery [66]. In these studies, the authors suggested an important implication of Pls-iPLA2 activity in atherosclerosis/thrombosis and myocardial ischemia.

Concerning the retina, even if we and others have previously reported an iPLA2 activity in this tissue [67,68], the existence of retinal isoforms of Pls-specific iPLA2s is still unknown.

5.2. Release of polyunsaturated fatty acids: a possible mechanism of action of plasmalogens

A particularity of Pls is that they represent a preferred source of PUFAs and particularly DHA and AA. This idea was firstly supported by a human study showing preferential incorporation of omega-3 PUFAs from fish oil in Pls when compared to diacyl-GPs [69]. Almost 71% of total incorporated omega-3 PUFAs was found at the *sn*-2 position of PlsEtn and in choline GPs [69]. Subsequent studies have confirmed this hypothesis by focusing on the preferential participation of omega-3 PUFAs in the biosynthesis of PlsEtn [70]. This preferred esterification of omega-3 PUFAs in Pls was also demonstrated on animal tissues including the spleen, the lung and the kidney [71]. Later, a significant decrease in the levels of Pls and DHA was shown in the brain, the liver and the retina of patients with peroxisomal disorders [72]. An improvement of clinical symptoms of the disease was observed following a treatment by DHA ethyl ethers [73]. More recently, it has been observed that when supplemented at low levels, DHA preferentially incorporates

in brain cells in PlsEtn [74,75]. These data are reinforced by lipidomic analyses showing that the cerebral tissue of DAPAT mice – that are deficient in Pls – is characterized by low levels of DHA [7].

While neuroprotective and anti-inflammatory properties of PUFAs are widely described in the literature [76–80], their roles in the modulation of angiogenesis is less documented. Anti-angiogenic functions have been suggested for DHA through the reduction of the activity of matrix metalloproteinases (MMPs) [81,82]. MMPs are enzymes produced during angiogenesis that digest tissue matrix along the front of sprouting vessels. Vascular endothelial growth factor (VEGF) is an angiogenic growth factor displaying a high specificity for endothelial cells and plays a central role in the regulation of vasculogenesis [83]. Dietary intake of DHA is known to reduce the VEGF-induced MMP-2 and MMP-9 activities in rat serum [84]. Later, it was reported that omega-3 PUFAs inhibit VEGF-induced endothelial cell proliferation and tube formation [85]. The molecular mechanisms by which omega-3 PUFAs may act on endothelial cells may involve modifications of the cell cycle and the promotion of cell death by apoptosis [86,87].

In the retina, omega-3 PUFAs have been demonstrated to inhibit endothelial cell proliferation and sprouting angiogenesis in oxygen-induced proliferative retinopathy, a model of retinopathy of prematurity in mice [88]. These processes involve the peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR-gamma) pathway and result in reduced levels of retinal tumor necrosis factor-alpha (TNF α) and angiogenic factors such as intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1), selectin and angiopoietin-2 (Angpt-2), but not VEGF [89,90]. In a mouse model of oxygen-induced retinopathy, high amounts of omega-3 PUFAs in the diet decreased retinal neovascularization by

up to 50% compared to mice kept on an omega-6 PUFA-rich diet [91].

Not only PUFAs but also their metabolites are suggested to be involved in tissue angiogenesis. An anti-angiogenic role of omega-3 PUFA-derived eicosanoids has been demonstrated during tumor progression [92]. A dietary intake of EPA- and DHA-rich fish oil significantly decreased the production of AA metabolites PGE2 and LTB4 in intestinal microvascular endothelial cells from human and rat and resulted in reduced angiogenesis [93]. Several studies have suggested that the molecular mechanisms involve VEGF and Angpt2 proteins through extracellular signal regulated kinases1/2 (ERK1/2) and hypoxia inducible factor 1 alpha (HIF1 α) signaling pathways. These studies have shown that omega-6 PUFAs such as AA stimulate pro-angiogenic processes in human endothelial cells while omega-3 PUFAs inhibit them. Pro-angiogenic processes mediated by PUFA metabolites involve cyclooxygenase activity and Angpt-2 growth factor. PGE2-derived from omega-6 PUFAs were shown to promote the production of Angpt2, while PGE3 that is produced from omega-3 PUFAs represses it [94,95]. More recently, the involvement of omega-3 PUFA-derived neuroprotectin D1 and resolvins E1 and E2 was highlighted in mice displaying oxygen-induced retinopathy [88]. An oxygenated metabolite of DHA, 4-hydroxy DHA, was also shown to have anti-angiogenic properties in a similar model [89]. Overall, these observations appear as consistent with the concept that PIs may be involved in retinal vascular development and remodeling through the liberation of PUFAs from the *sn*-2 position of the glycerol backbone. This is reinforced by recent data from our laboratory showing that retinal vascular defects in a mouse model with retinal iPLA2 inhibition are comparable to those observed in DAPAT mice [49].

6. Conclusions and perspectives: plasmalogens as a potential therapeutic target?

PIs represent an important class of phospholipids whose presence is required for proper brain and eye development. Despite the limited knowledge on specific functions of PIs, the preliminary data in the eye will hopefully inspire future studies to investigate the roles of PIs health and disease of the eye. In addition to understanding the molecular mechanisms by which PIs may act during physiologic and/or pathologic processes, these studies may determine if increasing tissue levels of PIs may be beneficial or not during PIs-related diseases. In this context, it is interesting to notice that PIs can be formed from alkylglycerols (after the action of a kinase), by bypassing the first three peroxisomal steps of PIs biosynthesis (Fig. 2) (see Ref. [1] for review). Several studies have successfully tried to deliver alkylglycerols through the diet to standard or PIs-deficient animals [96,97]. In the work from Das & Hajra, dietary alkylglycerols replaced up to 62% of tissue PIs in the kidney and the liver of young rats after a 10-day supplementation [97]. More recently, Brites and collaborators reported that dietary intake of alkylglycerols rescues plasmalogens levels and reduces the progression of RDCP phenotype in PEX7 and DAPAT mice [98]. Altogether, these works support the exciting expectation of using alkylglycerols as therapeutic molecules in nutritional trials aiming to prevent/treat disorders in which tissue levels of PIs are altered.

Conflict of interest

The authors declare to have no conflict of interest.

Funding

This work was supported by a French Government grant managed by the French National Research Agency (ANR) under the

program “Investissements d’Avenir” (ANR-11-LABX-0021), the French National Institute for Agricultural Research (INRA), the Regional Council of Burgundy (France), and the FEDER (European Funding for Regional Economic Development).”

Commercial relationship

None.

Acknowledgments

The authors acknowledge the French National Institute for Agricultural Research (INRA) and the Regional Council of Burgundy (France) for funding a PhD fellowship to Sarah Saab and Julie Mazzocco.

References

- [1] N. Nagan, R.A. Zoeller, Plasmalogens: biosynthesis and functions, *Prog. Lipid Res.* 40 (2001) 199–229.
- [2] F. Paltauf, Ether lipids in biomembranes, *Chem. Phys. Lipids* 74 (1994) 101–139.
- [3] P. Brites, H.R. Waterham, R.J. Wanders, Functions and biosynthesis of plasmalogens in health and disease, *Biochim. Biophys. Acta* 1636 (2004) 219–231.
- [4] J.E. Vanøe, Lipoproteins secreted by cultured rat hepatocytes contain the antioxidant 1-alk-1-enyl-2-acylglycerophosphoethanolamine, *Biochim. Biophys. Acta* 1045 (1990) 128–134.
- [5] M.J. Avelidano, N.P. Rotstein, N.T. Vermouth, Lipid remodeling during epididymal maturation of rat spermatozoa. Enrichment in plasmalogen lipids containing long-chain polyenoic fatty acids of the n-9 series, *Biochem. J.* 283 (Pt 1) (1992) 235–241.
- [6] X. Han, D.M. Holtzman, D.W. McKeel Jr., Plasmalogen deficiency in early Alzheimer’s disease subjects and in animal models: molecular characterization using electrospray ionization mass spectrometry, *J. Neurochem* 77 (2001) 1168–1180.
- [7] C. Rodemer, T.P. Thai, B. Brugger, T. Kaercher, H. Werner, K.A. Nave, F. Wieland, K. Gorgas, W.W. Just, Inactivation of ether lipid biosynthesis causes male infertility, defects in eye development and optic nerve hypoplasia in mice, *Hum. Mol. Genet.* 12 (2003) 1881–1895.
- [8] N. Acar, O. Berdeaux, S. Gregoire, S. Cabaret, L. Martine, P. Gain, G. Thuret, C.P. Creuzot-Garçher, A.M. Bron, L. Breillon, Lipid composition of the human eye: are red blood cells a good mirror of retinal and optic nerve fatty acids? *PLoS One* 7 (2012) e35102.
- [9] N. Acar, S. Gregoire, A. Andre, P. Juaneda, C. Joffre, A.M. Bron, C.P. Creuzot-Garçher, L. Breillon, 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.* 84 (2007) 143–151.
- [10] H.S. Heymans, R.B. Schutgens, R. Tan, H. van den Bosch, P. Borst, Severe plasmalogen deficiency in tissues of infants without peroxisomes (Zellweger syndrome), *Nature* 306 (1983) 69–70.
- [11] I. Labadardis, M. Moraitou, M. Theodoraki, G. Triantafyllidis, J. Sarafidou, H. Michelakakis, Plasmalogen levels in full-term neonates, *Acta Paediatr.* 98 (2009) 640–642.
- [12] N.E. Braverman, A.B. Moser, Functions of plasmalogen lipids in health and disease, *Biochim. Biophys. Acta* 1822 (2012) 1442–1452.
- [13] A. Andre, P. Juaneda, J.L. Sebedio, J.M. Chardigny, Plasmalogen metabolism-related enzymes in rat brain during aging: influence of n-3 fatty acid intake, *Biochimie* 88 (2006) 103–111.
- [14] H. Mandel, R. Sharf, M. Berant, R.J. Wanders, P. Vreken, M. Aviram, Plasmalogen phospholipids are involved in HDL-mediated cholesterol efflux: insights from investigations with plasmalogen-deficient cells, *Biochem Biophys. Res. Commun.* 250 (1998) 369–373.
- [15] L.J. Pike, X. Han, K.N. Chung, R.W. Gross, Lipid rafts are enriched in arachidonic acid and plasmalogen lipids and their composition is independent of caveolin-1 expression: a quantitative electrospray ionization/mass spectrometric analysis, *Biochemistry* 41 (2002) 2075–2088.
- [16] B. Engelmann, Plasmalogens: targets for oxidants and major lipophilic antioxidants, *Biochem. Soc. Trans.* 32 (2004) 147–150.
- [17] A. Broniec, R. Klosinski, A. Pawlak, M. Wrona-Krol, D. Thompson, T. Sarna, Interactions of plasmalogens and their diacyl analogs with singlet oxygen in selected model systems, *Free Radic. Biol. Med.* 50 (2011) 892–898.
- [18] R.A. Zoeller, A.C. Lake, N. Nagan, D.P. Gaposchkin, M.A. Legner, W. Lieberthal, Plasmalogens as endogenous antioxidants: somatic cell mutants reveal the importance of the vinyl ether, *Biochem. J.* 338 (Pt 3) (1999) 769–776.
- [19] O.H. Morand, R.A. Zoeller, C.R. Raetz, Disappearance of plasmalogens from membranes of animal cells subjected to photosensitized oxidation, *J. Biol. Chem.* 263 (1988) 11597–11606.
- [20] M.J. Stables, D.W. Gilroy, Old and new generation lipid mediators in acute inflammation and resolution, *Prog. Lipid Res.* 50 (2011) 35–51.

- [21] N. Fabelo, V. Martin, G. Santpere, R. Marin, L. Torrent, I. Ferrer, M. Diaz, Severe alterations in lipid composition of frontal cortex lipid rafts from Parkinson's disease and incidental Parkinson's disease, *Mol. Med.* 17 (2011) 1107–1118.
- [22] M. Oresic, S. Simell, M. Sysi-Aho, K. Nanto-Salonen, T. Seppanen-Laakso, V. Parikka, M. Katajamaa, A. Hekkala, I. Mattila, P. Keskinen, L. Yenkuri, A. Reinikainen, J. Lahde, T. Suortti, J. Hakalax, T. Simell, H. Hyoty, R. Veijola, J. Ilonen, R. Laheesmaa, M. Knip, O. Simell, Dysregulation of lipid and amino acid metabolism precedes islet autoimmunity in children who later progress to type 1 diabetes, *J. Exp. Med.* 205 (2008) 2975–2984.
- [23] R. Colas, V. Pruneta-Deloche, M. Guichardant, C. Luquain-Costaz, C. Cugnet-Anceau, M. Moret, H. Vidal, P. Moulin, M. Lagarde, C. Calzada, Increased lipid peroxidation in LDL from type-2 diabetic patients, *Lipids* 45 (2010) 723–731.
- [24] R.E. Smith, P. Lespi, M. Di Luca, C. Bustos, F.A. Marra, M.J. de Alaniz, C.A. Marra, A reliable biomarker derived from plasmalogens to evaluate malignancy and metastatic capacity of human cancers, *Lipids* 43 (2008) 79–89.
- [25] N. Acar, O. Berdeaux, P. Juaneada, S. Gregoire, S. Cabaret, C. Joffre, C.P. Creuzot-Garcher, L. Breillon, A.M. Bron, Red blood cell plasmalogens and docosahexaenoic acid are independently reduced in primary open-angle glaucoma, *Exp. Eye Res.* 89 (2009) 840–853.
- [26] G. Edwards, K. Aribindi, Y. Guerra, R.K. Lee, S.K. Bhattacharya, Phospholipid profiles of control and glaucomatous human aqueous humor, *Biochimie* 101 (2014) 232–247.
- [27] K. Aribindi, Y. Guerra, R.K. Lee, S.K. Bhattacharya, Comparative phospholipid profiles of control and glaucomatous human trabecular meshwork, *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* 54 (2013) 3037–3044.
- [28] J.C. Heikooop, R.J. Wanders, A. Strijland, R. Purvis, R.B. Schutgens, J.M. Tager, Genetic and biochemical heterogeneity in patients with the rhizomelic form of chondrodysplasia punctata – a complementation study, *Hum. Genet.* 89 (1992) 439–444.
- [29] M. Saitoh, M. Itoh, S. Takashima, M. Mizuguchi, M. Iwamori, Phosphatidyl ethanolamine with increased polyunsaturated fatty acids in compensation for plasmalogen defect in the Zellweger syndrome brain, *Neurosci. Lett.* 449 (2009) 164–167.
- [30] T.F. da Silva, V.F. Sousa, A.R. Malheiro, P. Brites, The importance of ether-phospholipids: a view from the perspective of mouse models, *Biochim. Biophys. Acta* 1822 (2012) 1501–1508.
- [31] P. Brites, A.M. Modley, P. Gressens, P.A. Mooyer, I. Ploegaert, V. Everts, P. Evrard, P. Carmeliet, M. Dewerchin, L. Schoonjans, M. Duran, H.R. Waterham, R.J. Wanders, M. Baes, Impaired neuronal migration and endochondral ossification in Pex7 knockout mice: a model for rhizomelic chondrodysplasia punctata, *Hum. Mol. Genet.* 12 (2003) 2255–2267.
- [32] R. Liegel, B. Chang, R. Dubielzig, D.J. Sidjanin, Blind sterile 2 (bs2), a hypomorphic mutation in Agps, results in cataracts and male sterility in mice, *Mol. Genet. Metab.* 103 (2011) 51–59.
- [33] C. Rodemer, T.P. Thai, B. Brugger, K. Gorgas, W. Just, Targeted disruption of ether lipid synthesis in mice, *Adv. Exp. Med. Biol.* 544 (2003) 355–368.
- [34] K. Gorgas, A. Teigler, D. Komljenovic, W.W. Just, The ether lipid-deficient mouse: tracking down plasmalogen functions, *Biochim. Biophys. Acta* 1763 (2006) 1511–1526.
- [35] M. Saint-Geniez, P.A. D'Amore, Development and pathology of the hyaloid, choroidal and retinal vasculature, *Int. J. Dev. Biol.* 48 (2004) 1045–1058.
- [36] R.V. Panganamala, L.A. Horrocks, J.C. Geer, D.G. Cornwell, Positions of double bonds in the monounsaturated alk-1-enyl groups from the plasmalogens of human heart and brain, *Chem. Phys. Lipids* 6 (1971) 97–102.
- [37] L. Breillon, G. Thuret, S. Gregoire, N. Acar, C. Joffre, A.M. Bron, P. Gain, C.P. Creuzot-Garcher, Lipid and fatty acid profile of the retina, retinal pigment epithelium/choroid, and the lacrimal gland, and associations with adipose tissue fatty acids in human subjects, *Exp. Eye Res.* 87 (2008) 521–528.
- [38] H.A. Quigley, A.T. Broman, The number of people with glaucoma worldwide in 2010 and 2020, *Br. J. Ophthalmol.* 90 (2006) 262–267.
- [39] D.R. Anderson, Glaucoma: the damage caused by pressure. XLVI Edward Jackson memorial lecture, *Am. J. Ophthalmol.* 108 (1989) 485–495.
- [40] M.C. Leske, S.Y. Wu, A. Hennis, R. Honkanen, B. Nemesure, Risk factors for incident open-angle glaucoma: the Barbados Eye Studies, *Ophthalmology* 115 (2008) 85–93.
- [41] S.M. Drance, Bowman lecture. Glaucoma—changing concepts, *Eye* 6 (Pt 4) (1992) 337–345.
- [42] M.B. Shields, Normal-tension glaucoma: is it different from primary open-angle glaucoma? *Curr. Opin. Ophthalmol.* 19 (2008) 85–88.
- [43] A. Sommer, J.M. Tielsch, J. Katz, H.A. Quigley, J.D. Gottsch, J. Javitt, K. Singh, Relationship between intraocular pressure and primary open angle glaucoma among white and black Americans, *Baltim. Eye Surv. Arch. Ophthalmol.* 109 (1991) 1090–1095.
- [44] C. Delcourt, J.F. Korobelnik, P. Barberger-Gateau, M.N. Delyfer, M.B. Rougier, M. Le Goff, F. Malet, J. Colin, J.F. Dartigues, Nutrition and age-related eye diseases: the Alienor (Antioxydants, Lipides Essentiels, Nutrition et maladies Oculaires) study, *J. Nutr. Health Aging* 14 (2010) 854–861.
- [45] J.H. Kang, L.R. Pasquale, W.C. Willett, B.A. Rosner, K.M. Egan, N. Faberowski, S.E. Hankinson, Dietary fat consumption and primary open-angle glaucoma, *Am. J. Clin. Nutr.* 79 (2004) 755–764.
- [46] J.P. Renard, J.F. Rouland, A. Bron, E. Sellem, J.P. Nordmann, C. Baudouin, P. Denis, M. Villain, G. Chaine, J. Colin, G. de Pouvourville, S. Pinchinat, N. Moore, M. Estephan, C. Delcourt, Nutritional, lifestyle and environmental factors in ocular hypertension and primary open-angle glaucoma: an exploratory case-control study, *Acta Ophthalmol.* (2012), <http://dx.doi.org/10.1111/j.1755-3768.2011.02356.x>.
- [47] H. Ren, N. Magulike, K. Ghebremeskel, M. Crawford, Primary open-angle glaucoma patients have reduced levels of blood docosahexaenoic and eicosapentaenoic acids, *Prostagl. Leukot. Essent. Fat. Acids* 74 (2006) 157–163.
- [48] C.T. Nguyen, B.V. Bui, A.J. Sinclair, A.J. Vingrys, Dietary omega 3 fatty acids decrease intraocular pressure with age by increasing aqueous outflow, *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* 48 (2007) 756–762.
- [49] S. Saab, B. Buteau, L. Leclere, A.M. Bron, C.P. Creuzot-Garcher, L. Breillon, N. Acar, Involvement of plasmalogens in post-natal retinal vascular development, *PLoS One* 9 (2014) e101076.
- [50] R.N. Frank, Diabetic retinopathy, *N Engl. J. Med.* 350 (2004) 48–58.
- [51] A. Praidou, I. Klangas, E. Papakonstantinou, S. Androudi, N. Georgiadis, G. Karakioulakis, S. Dimitrakos, Vitreous and serum levels of platelet-derived growth factor and their correlation in patients with proliferative diabetic retinopathy, *Curr. Eye Res.* 34 (2009) 152–161.
- [52] R.A. Mahdy, W.M. Nada, Evaluation of the role of vascular endothelial growth factor in diabetic retinopathy, *Ophthalmic Res.* 45 (2011) 87–91.
- [53] E. Kermorvant-Duchemin, F. Sennlaub, F. Behar-Cohen, S. Chemtob, Epidemiology and pathophysiology of retinopathy of prematurity, *Arch. Pediatr.* (18 Suppl. 2) (2011) S79–S85.
- [54] C. Delcourt, P. Massin, M. Rosilio, Epidemiology of diabetic retinopathy: expected vs reported prevalence of cases in the French population, *Diabetes Metab.* 35 (2009) 431–438.
- [55] K. Kostev, W. Rathmann, Diabetic retinopathy at diagnosis of type 2 diabetes in the UK: a database analysis, *Diabetologia* 56 (2013) 109–111.
- [56] G. Cavallaro, L. Filippi, P. Bagnoli, G. La Marca, G. Cristofori, G. Raffaeli, L. Padrini, G. Araimo, M. Fumagalli, M. Groppo, M. Dal Monte, S. Osngghi, P. Fiorini, F. Mosca, The pathophysiology of retinopathy of prematurity: an update of previous and recent knowledge, *Acta Ophthalmol.* 92 (2014) 2–20.
- [57] L.E. Smith, Pathogenesis of retinopathy of prematurity, *Growth Horm. IGF Res.* (14 Suppl. A) (2004) S140–S144.
- [58] T. Chan-Ling, B. Gock, J. Stone, The effect of oxygen on vasoformative cell division. Evidence that 'physiological hypoxia' is the stimulus for normal retinal vasculogenesis, *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* 36 (1995) 1201–1214.
- [59] J. Chen, A. Stahl, A. Hellstrom, L.E. Smith, Current update on retinopathy of prematurity: screening and treatment, *Curr. Opin. Pediatr.* 23 (2011) 173–178.
- [60] M.I. Dorrell, E. Aguilar, M. Friedlander, Retinal vascular development is mediated by endothelial filopodia, a preexisting astrocytic template and specific R-cadherin adhesion, *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* 43 (2002) 3500–3510.
- [61] S.L. Hazen, R.J. Stuppy, R.W. Gross, Purification and characterization of canine myocardial cytosolic phospholipase A2. A calcium-independent phospholipase with absolute fl-2 regioselectivity for diradyl glycerophospholipids, *J. Biol. Chem.* 265 (1990) 10622–10630.
- [62] Y. Hirashima, A.A. Farooqui, J.S. Mills, L.A. Horrocks, Identification and purification of calcium-independent phospholipase A2 from bovine brain cytosol, *J. Neurochem.* 59 (1992) 708–714.
- [63] D. Portilla, S.V. Shah, P.A. Lehman, M.H. Creer, Role of cytosolic calcium-independent plasmalogen-selective phospholipase A2 in hypoxic injury to rabbit proximal tubules, *J. Clin. Invest.* 93 (1994) 1609–1615.
- [64] Y. Hirashima, A.A. Farooqui, E.J. Murphy, L.A. Horrocks, Purification of plasmalogens using Rhizopus delemar lipase and Naja naja naja phospholipase A2, *Lipids* 25 (1990) 344–348.
- [65] D. Portilla, G. Dai, Purification of a novel calcium-independent phospholipase A2 from rabbit kidney, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 15451–15457.
- [66] M.C. Meyer, J. McHowat, Calcium-independent phospholipase A2-catalyzed plasmalogen hydrolysis in hypoxic human coronary artery endothelial cells, *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 292 (2007) C251–C258.
- [67] M. Kolko, J. Wang, C. Zhan, K.A. Poulsen, J.U. Prause, M.H. Nissen, S. Heegaard, N.G. Bazan, Identification of intracellular phospholipases A2 in the human eye: involvement in phagocytosis of photoreceptor outer segments, *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* 48 (2007) 1401–1409.
- [68] S. Saab-Aoude, A.M. Bron, C.P. Creuzot-Garcher, L. Breillon, N. Acar, A mouse model of in vivo chemical inhibition of retinal calcium-independent phospholipase A2 (iPLA2), *Biochimie* (2013).
- [69] H.M. Aukema, B.J. Holub, Effect of dietary supplementation with a fish oil concentrate on the alkenylacyl class of ethanolamine phospholipid in human platelets, *J. Lipid Res.* 30 (1989) 59–64.
- [70] M. Croset, Y. Bayon, M. Lagarde, Incorporation and turnover of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids in human blood platelets in vitro, *Biochem. J.* 281 (Pt 2) (1992) 309–316.
- [71] M.L. Blank, Z.L. Smith, E.A. Cress, F. Snyder, Molecular species of ethanolamine plasmalogens and transacylase activity in rat tissues are altered by fish oil diets, *Biochim. Biophys. Acta* 1214 (1994) 295–302.
- [72] M. Martinez, I. Mougán, Fatty acid composition of brain glycerophospholipids in peroxisomal disorders, *Lipids* 34 (1999) 733–740.
- [73] M. Martinez, E. Vazquez, M.T. Garcia-Silva, J.M. Beltran, F. Castello, M. Pineda, I. Mougán, Treatment of generalized peroxisomal disorders with docosahexaenoic acid ethyl ether, *Rev. Neurol.* 1 (28 Suppl) (1999) S59–S64.
- [74] A. Andre, P. Juaneada, J.L. Sebedio, J.M. Chardigny, Effects of aging and dietary n-3 fatty acids on rat brain phospholipids: focus on plasmalogens, *Lipids* 40 (2005) 799–806.

- [75] E. Vericel, A. Polette, S. Bacot, C. Calzada, M. Lagarde, Pro- and antioxidant activities of docosahexaenoic acid on human blood platelets, *J. Thromb. Haemost.* 1 (2003) 566–572.
- [76] P.C. Calder, n-3 polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases, *Am. J. Clin. Nutr.* 83 (2006) 1505S–1519S.
- [77] P.C. Calder, Fatty acids and inflammation: the cutting edge between food and pharma, *Eur. J. Pharmacol.* 668 (Suppl. 1) (2011) S50–S58.
- [78] J.M. Calandria, N.G. Bazan, Neuroprotectin D1 modulates the induction of pro-inflammatory signaling and promotes retinal pigment epithelial cell survival during oxidative stress, *Adv. Exp. Med. Biol.* 664 (2010) 663–670.
- [79] P.K. Mukherjee, V.L. Marcheselli, S. Barreiro, J. Hu, D. Bok, N.G. Bazan, Neurotrophins enhance retinal pigment epithelial cell survival through neuroprotectin D1 signaling, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104 (2007) 13152–13157.
- [80] P.K. Mukherjee, V.L. Marcheselli, C.N. Serhan, N.G. Bazan, Neuroprotectin D1: a docosahexaenoic acid-derived docosatriene protects human retinal pigment epithelial cells from oxidative stress, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101 (2004) 8491–8496.
- [81] X.H. Liu, D.P. Rose, Suppression of type IV collagenase in MDA-MB-435 human breast cancer cells by eicosapentaenoic acid in vitro and in vivo, *Cancer Lett.* 92 (1995) 21–26.
- [82] I. Suzuki, M. Iigo, C. Ishikawa, T. Kuhara, M. Asamoto, T. Kunimoto, M.A. Moore, K. Yazawa, E. Araki, H. Tsuda, Inhibitory effects of oleic and docosahexaenoic acids on lung metastasis by colon-carcinoma-26 cells are associated with reduced matrix metalloproteinase-2 and -9 activities, *Int. J. Cancer* 73 (1997) 607–612.
- [83] G. Neufeld, T. Cohen, S. Gengrinovitch, Z. Poltorak, Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors, *FASEB J.* 13 (1999) 9–22.
- [84] M.A. Harris, R.A. Hansen, P. Vidsudhiphan, J.L. Koslo, J.B. Thomas, B.A. Watkins, K.G. Allen, Effects of conjugated linoleic acids and docosahexaenoic acid on rat liver and reproductive tissue fatty acids, prostaglandins and matrix metalloproteinase production, *Prostagl. Leukot. Essent. Fat. Acids* 65 (2001) 23–29.
- [85] M. Tsuji, S.I. Murota, I. Morita, Docosapentaenoic acid (22:5, n-3) suppressed tube-forming activity in endothelial cells induced by vascular endothelial growth factor, *Prostagl. Leukot. Essent. Fat. Acids* 68 (2003) 337–342.
- [86] M. Artwohl, M. Roden, W. Waldhausl, A. Preudenthaler, S.M. Baumgartner-Parzer, Free fatty acids trigger apoptosis and inhibit cell cycle progression in human vascular endothelial cells, *FASEB J.* 18 (2004) 146–148.
- [87] H.J. Kim, C.A. Vosseler, P.C. Weber, W. Erl, Docosahexaenoic acid induces apoptosis in proliferating human endothelial cells, *J. Cell. Physiol.* 204 (2005) 881–888.
- [88] K.M. Connor, J.P. SanGiovanni, C. Lofqvist, C.M. Aderman, J. Chen, A. Higuchi, S. Hong, E.A. Pravda, S. Majchrzak, D. Carper, A. Hellstrom, J.X. Kang, E.Y. Chew, N. Salem Jr., C.N. Serhan, L.E. Smith, Increased dietary intake of omega-3-polyunsaturated fatty acids reduces pathological retinal angiogenesis, *Nat. Med.* 13 (2007) 868–873.
- [89] P. Sapieha, A. Stahl, J. Chen, M.R. Seaward, K.L. Willett, N.M. Krahn, R.J. Dennison, K.M. Connor, C.M. Aderman, E. Licican, A. Carughi, D. Perelman, Y. Kanaoka, J.P. Sangiovanni, K. Gronert, L.E. Smith, 5-Lipoxygenase metabolite 4-HDHA is a mediator of the antiangiogenic effect of omega-3 polyunsaturated fatty acids, *Sci. Transl. Med.* 3 (2011) 69ra12.
- [90] A. Stahl, P. Sapieha, K.M. Connor, J.P. Sangiovanni, J. Chen, C.M. Aderman, K.L. Willett, N.M. Krahn, R.J. Dennison, M.R. Seaward, K.I. Guerin, J. Hua, L.E. Smith, Short communication: PPAR gamma mediates a direct anti-angiogenic effect of omega 3-PUFAs in proliferative retinopathy, *Circ. Res.* 107 (2010) 495–500.
- [91] S. Hunt, Increased dietary intake of omega-3-PUFA reduces pathological retinal angiogenesis, *Ophthalmology* 104 (2007) 727–729.
- [92] D.P. Rose, J.M. Connolly, Regulation of tumor angiogenesis by dietary fatty acids and eicosanoids, *Nutr. Cancer* 37 (2000) 119–127.
- [93] A. Ibrahim, K. Mbodji, A. Hassan, M. Aziz, N. Boukhetala, M. Coeffier, G. Savoye, P. Dechelotte, R. Marion-Letellier, Anti-inflammatory and anti-angiogenic effect of long chain n-3 polyunsaturated fatty acids in intestinal microvascular endothelium, *Clin. Nutr.* 30 (2011) 678–687.
- [94] G. Calviello, F. Di Nicuolo, S. Ragnoli, E. Picconi, S. Serini, N. Maggiano, G. Tringali, P. Navarra, F.O. Ranelletti, P. Palozza, n-3 PUFAs reduce VEGF expression in human colon cancer cells modulating the COX-2/PGE2 induced ERK-1 and -2 and HIF-1alpha induction pathway, *Carcinogenesis* 25 (2004) 2303–2310.
- [95] M. Szymczak, M. Murray, N. Petrovic, Modulation of angiogenesis by omega-3 polyunsaturated fatty acids is mediated by cyclooxygenases, *Blood* 111 (2008) 3514–3521.
- [96] M.L. Blank, E.A. Cress, Z.L. Smith, F. Snyder, Dietary supplementation with ether-linked lipids and tissue lipid composition, *Lipids* 26 (1991) 166–169.
- [97] A.K. Das, A.K. Hajra, High incorporation of dietary 1-O-heptadecyl glycerol into tissue plasmalogens of young rats, *FEBS Lett.* 227 (1988) 187–190.
- [98] P. Brites, A.S. Ferreira, T.F. da Silva, V.F. Sousa, A.R. Malheiro, M. Duran, H.R. Waterham, M. Baes, R.J. Wanders, Alkyl-glycerol rescues plasmalogen levels and pathology of ether-phospholipid deficient mice, *PLoS One* 6 (2011) e28539.

Conclusions

Les plasmalogènes représentent une part importante des phospholipides et sont nécessaires au bon développement de l'œil, et en particulier à celui des vaisseaux rétiniens au cours de la période périnatale. Malgré le peu de connaissance sur les mécanismes impliqués, les études dans ce domaine suggèrent un impact fort de la déficience en plasmalogènes sur le métabolisme et le comportement des cellules gliales de la rétine. Compte-tenu du rôle central des cellules gliales aussi bien dans le métabolisme lipidique rétinien que dans la physiopathologie des pathologies qui semblent être associées à des modifications du métabolisme des plasmalogènes, nous avons orienté nos recherches sur le contrôle du développement vasculaire rétinien par les plasmalogènes sur les cellules macrogliales de la rétine, les cellules de Müller et les astrocytes.

Chapitre 3 : Plasmalogènes et métabolisme des cellules de Müller

Problématique

Les cellules de Müller sont, avec les astrocytes, les principales cellules gliales de la rétine. Alors que la majorité des cellules rétiniennes sont organisées en couche, tel un mille-feuille, les cellules de Müller traversent quasiment toute l'épaisseur de la rétine. Cette localisation leur permet potentiellement d'interagir avec toutes les cellules de la rétine. Le rôle principal des cellules de Müller est d'apporter un soutien physique et métabolique à la rétine, en témoignent des expériences d'ablation des cellules de Müller où la rétine est totalement désorganisée et non fonctionnelle (Byrne, Khalid et al. 2013). Dans cette expérience, l'ablation des cellules de Müller entraîne la formation de vaisseaux rétiniens tortueux, larges et perméables. Des résultats similaires ont été observés au niveau du réseau vasculaire rétinien des souris DAPAT, KO pour le gène DHAP-AT et donc déficientes en plasmalogènes (Saab, Buteau et al. 2014). Dans ce modèle de souris DAPAT, la malformation du réseau vasculaire est en partie dû à la malformation de la trame astrocytaire sur laquelle les vaisseaux poussent de manière passive. Les astrocytes et les cellules de Müller sont capables de communiquer, et nous supposons qu'un défaut de fonctionnement d'un type cellulaire pourrait influencer le fonctionnement de l'autre. Un marquage par hybridation in situ de l'ARNm de la DHAP-AT, réalisé au laboratoire, laisse supposer une biosynthèse des plasmalogènes par les cellules de Müller (Acar, Gregoire et al. 2007). De plus, les cellules de Müller participent activement au métabolisme des lipides dans la rétine.

Nous avons donc voulu confirmer, dans un premier temps, que les cellules de Müller sont dotées de la machinerie enzymatique pour synthétiser les plasmalogènes. Dans un second temps, nous avons évalué l'impact d'une modification du métabolisme des plasmalogènes sur le phénotype et la physiologie des cellules de Müller. Nous avons cherché à savoir si la diminution du taux de plasmalogènes pouvait favoriser la gliose et affecter la capacité des cellules à migrer et à proliférer. De plus, nous avons étudié l'impact de la modification du métabolisme des plasmalogènes sur les protéines de la voie de signalisation intracellulaire MAPK (ERK et p38).

Les résultats de cette étude font l'objet d'un article qui sera soumis dans le journal *Prostaglandins, Leukotrienes & Essential Fatty Acids*.

Impact of the Inhibition of Plasmalogen Biosynthesis and Degradation on Retinal Müller Cells Activation, Proliferation, and Migration

Short title: Plasmalogens in retinal Müller cells

Mazzocco Julie ^a, Charlotte Pallot ^b, Charlène Develay ^a, Laurent Leclere ^a,
Bénédicte Buteau ^a, Stéphane Grégoire ^a, Alain M Bron ^{a, b}, Catherine P Creuzot-
Garcher ^{a, b}, Lionel Bretilon ^a, and Niyazi Acar ^a

^a Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation, CNRS, INRA, Univ. Bourgogne
Franche-Comté, F-21000 Dijon, France

^b Department of Ophthalmology, University Hospital, F-21000 Dijon, France

Corresponding author:

Niyazi Acar, PhD

UMR CSGA

Eye and Nutrition Research Group

UMR CSGA

17, rue Sully, BP86510

21065 Dijon Cedex, France

Fax +33-(0)3.80.69.32.23

Tel. +33-(0)3.80.69.32.69

Email: niyazi.acar@inra.fr

Abstract

Background: As macroglial cells, Müller cells play crucial functions in the retinal homeostasis by providing structural, trophic and metabolic support to retinal neurons. Müller cells are also key actors of retinal lipid metabolism and supply to the retina. In this study, we investigated whether plasmalogens, a particular class of glycerophospholipids in the retina, are required for Müller cell functions.

Methodology and principal findings: The plasmalogen content as well as the expression of dihydroxyacetonephosphate-acyltransferase (DHAP-AT), the key enzyme of plasmalogen biosynthesis, was evaluated in primary cultures of Müller cells. Cells were treated with siRNA directed against DHAP-AT but also with an inhibitor of calcium-independent phospholipase A2 (iPLA2), the enzyme responsible for plasmalogen catabolism. The consequences on cell activation, proliferation, and migration as well as the activation of mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathways were evaluated. Retinal Müller glial cells express DHAP-AT and are enriched in plasmalogens when compared to the entire retina. Inhibiting the expression of DHAP-AT reduced Müller cell membrane concentrations of plasmalogens and was accompanied by the diminution of the levels of long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids, including docosahexaenoic acid (DHA). These biochemical changes were associated to a reduced migration and the activation of MAPK signaling through phosphorylation of ERK1/2. The inhibition of iPLA2 emphasized these changes. No significant effect of siRNA treatment was observed on Müller glia activation and proliferation.

Conclusions and significance: Taken together, our results suggest interfering with the biosynthesis and/or the degradation of plasmalogens decreases Müller glia

activation. ERK1/2 emerges as a potential pathway for the regulation of Müller cell motility by plasmalogens.

Keywords

Retinal Müller cells, plasmalogens, polyunsaturated fatty acids, migration, proliferation, mitogen-activated protein kinase

Introduction

Müller cells are the major macroglial cells in the retina. They have the basic morphology of polarized radial glial cells and are characterized by a microvilli-rich process at the level of photoreceptor inner segments and an endfoot near ganglion cells, whereas their nucleus is located in the inner nuclear layer. In addition to their role in the physical maintenance of retinal architecture, Müller cells play crucial functions in the homeostasis of the retina. They are involved in the formation and maintenance of the blood-retinal barrier [1], in the regulation of retinal vascularization through synthesis of pro- and anti-angiogenic compounds [2-6], in signal transduction and transmission mainly by the regulation of the extracellular concentrations of neurotransmitter molecules [7], and in neural waste management principally through ion and water homeostasis [8]. While Müller cells motility or proliferation is limited in healthy retina, Müller cells can be activated during retinal gliosis under pathologic conditions [9]. Gliosis results in several phenotypic and functional changes including rapid proliferation and migration [10]. Under conditions of high oxidative stress, Müller cells are also able to dedifferentiate and acquire characteristics of neural cells [11-13]. Even if the molecular mechanisms involved in the response of Müller cells to pathological conditions are poorly understood, recent data suggest that metabolism of lipids, and especially that of sphingolipids, is crucial for signaling pathways implicated in migration and involving the mitogen-activated protein kinase (MAPK) ERK [14].

In addition to be suspected to metabolize sphingolipids, Müller cells appear to be key actors of lipid metabolism within the retina. Indeed, Müller cells can synthesize cholesterol as well as apolipoproteins [15]. In addition, Müller cells are key actors of a lipid shuttle supplying neurons with lipids [16], express fatty acid-binding and –

transfer proteins [17], and are able to take-up omega-3 polyunsaturated fatty acids (PUFAs) such as docosahexaenoic acid (DHA) and incorporate it into membrane phospholipids [18]. Studies from our laboratory have shown by *in situ* hybridization that the expression of dihydroxyacetonephosphate-acyltransferase (DHAP-AT) –the key enzyme of plasmalogen biosynthesis is located in peroxisomes– in retinal layers corresponding to Müller cell microvilli, soma and endfoot [19]. Plasmalogens are glycerophospholipids with a vinyl-ether bond at the *sn-1* position of the glycerol backbone. Whereas polyunsaturated fatty acids (PUFAs) are preferentially esterified at the *sn-2* position, the head group at the *sn-3* position of glycerol is usually either phospho-ethanolamine or phospho-choline, but also phospho-serine as previously shown by our laboratory [20]. In the retina, plasmalogens account for about 30 % of ethanolamine phospholipids but their functions are still unclear [19]. Plasmalogens may influence membrane fluidity and membrane trafficking processes [21], and given that they are considered as reservoirs for PUFAs in membranes, they are suspected to have signalling functions by releasing these PUFAs through the action of a specific calcium independent phospholipase A2 (iPLA2) [22, 23]. This hypothesis is reinforced by studies showing higher iPLA2 activities in various pathologic conditions involving plasmalogen metabolism [22, 24].

In a mouse model of deficiency in plasmalogens (DHAP-AT^{-/-}), Rodemer and collaborators have observed several developmental defects in the eye [25]. These include microphthalmia, dysgenesis of the anterior eye, increased thickness of the lens capsule, persistent vascular remnants of pupillary membrane, and persistent hyaloid artery. In DHAP-AT^{-/-} mice and animals with chemical inhibition of iPLA2, we have further shown that plasmalogens are needed for the proper perinatal development of retinal vessels [26, 27]. Plasmalogens may regulate the formation of

retinal vasculature by impacting the metabolism of astrocytes through mechanisms involving the release of PUFAs by iPLA2.

Since previous data from our laboratory suggest that plasmalogen biosynthesis may take place in retinal Müller cells, and as Müller cells are key actors of retinal homeostasis, we wanted to evaluate the impact of modifications of plasmalogen metabolism on Müller cell phenotype and function. We investigated whether lowering the concentrations of plasmalogens through the use of siRNAs against DHAP-AT and/or inhibiting PUFA release from plasmalogens by iPLA2 would stimulate Müller cells and affect their abilities to proliferate and migrate. As lipid-dependent signaling pathways regulating Müller cell motility involve the MAPK ERK protein, we have also investigated whether the activation of this pathway is associated to modifications of plasmalogen metabolism.

Materials and methods

Animals

Experiments on animals were performed in accordance with the Association for Research in Vision Ophthalmology (ARVO) statements and with French legislation (personal authorization number 21CAE086 for N.A. and animal quarters agreement number A21231010 EA), after approval by local ethics committees (#105 *Comité d’Ethique de l’Expérimentation Animale Grand Campus Dijon*) and by the French Ministry of Higher Education and Research (reference number 02271.1).

Primary culture of retinal Müller cells

Primary Müller cells were prepared from rat retinas as described previously by Hicks and Courtois with slight modifications [28]. Nine- to 12-day-old were obtained from a Wistar rat colony established in animal quarters of the laboratory (Centre des Sciences du Goût et de l’Alimentation, Dijon, France). Animals were killed by decapitation. Eyes were isolated and placed in Dulbecco’s Modified Eagles Medium (DMEM, P04-04510, Pan biotech, Aidenbach, Germany) with 10 % of fetal calf serum (FCS) for overnight at room temperature in the dark. Eyeballs were then digested in DMEM containing 0.1 % Trypsin-EDTA 10X (T4174, Sigma-Aldrich, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and 70 U/mL collagenase (C5138, Sigma-Aldrich) at 37 °C for 45 min. Eyeballs were then placed in DMEM 10 % FCS, corneas were incised, lenses and vitreous bodies taken out, and retinas were delicately isolated. Retinas were dissociated into small pieces and placed into a Petri dish containing DMEM with 4.5 g/L of glucose, 10 % of FCS and 10 µL/mL of penicillin (10000 U/mL) streptomycin (10 mg/mL) (P06-07100, Pan Biotech). Medium was not changed during the first 2 days and then progressively substituted by DMEM with 1 g/L of

glucose. Cell at 80 % of confluence were reseeded on microscope slides for immunostainings, on 96-well microplates for cell viability assay, on 8 well-cover glasses for cell proliferation assay, on culture-insert for migration assay, and on 75°cm²-flask for protein expression analyses. They were used at second generation.

Immunostaining of DHAP-AT on Müller cells in culture and retina slices

Adult C57BL/6 mice (3 months of age, Centre d'Elevage Janvier, Le-Genest-Saint-Isle, France) were euthanized by CO₂ exposure. The eyeballs were isolated, embedded in Tissue-Tek O.C.T. (reference 4583, Sakura, Alphen aan den Rijn, Netherlands) and frozen into cold isopentane. Cryo-sections of 16 µm thickness were mounted on slides and stored at -80 °C until further experiments.

Second generation Müller cells seeded on microscope slides and 16 µm-retina slices were fixed for 5 min with a mixture composed of acetone and methanol (1:1, v:v), treated for 8 min with 0.3 % H₂O₂ in TBS-T (50mM Tris, 150mM NaCl, 0.01 % Tween 20), blocked 1 h with mouse IgG Blocking Reagent (reference BMK 2202, Vector Labs, Burlingame, CA, USA) and incubated for 1 h with the following primary antibodies in 1 % bovine serum albumin (BSA): glial fibrillary acidic protein (GFAP) at a dilution of 1:100 (mouse monoclonal, reference MS-280, Thermo Scientific), GNPAT at a dilution of 1:100 (rabbit polyclonal, reference 14931-1-AP, ProteinTech), and Vimentin at a dilution of 1:50 (goat polyclonal, reference SC-7557 Santa Cruz). Samples were then incubated with either Alexa Fluor 488 or Alexa Fluor 568-conjugated secondary antibodies for 1 h at room temperature (anti goat reference A11057, Invitrogen and goat anti rabbit reference 111-035-144, Jackson Immuno Research, West Grove, PA, USA, respectively), before being sealed in mounting

media for imaging on a fluorescence microscope (model Eclipse E600, Nikon, Champigny-sur-Marne, France)

Inhibition of DHAP-AT by Small interfering RNA (siRNA) transfection

Silencer® Select siRNAs were used to knockdown DHAP-AT gene expression. siGNAPT (siRNA ID s136618 sense 5'-CAUCGUUCUCAAUUCUGAAAtt-3', antisense 5'-UUCAGAAUUGAGAACGAUGga-3', and siRNA ID s136619 sense 5'-GGAUGUCCUUCAGUUGCUUUtt-3', antisense 5'-AAGCAACUGAAGACAUCc-3') and the non-targeting controls (siCtrl) were purchased from Ambion (references 4390771 and 4404020, ThermoFisher scientific, Waltham, MA, USA). The siRNA transfection of Müller cells was performed using Lipofectamine® RNAiMAX transfection reagent (13778150, ThermoFisher scientific) in OPTIMEM medium (31985070, ThermoFisher scientific) overnight at 37 °C in a humidified 5 %-CO₂ atmosphere according to manufacturer's instructions. Then medium was replaced by DMEM supplemented with 10 % FCS. First, a time course study was performed to determine the kinetics of inhibition of plasmalogen biosynthesis. Cells were submitted to either, a single 8 h-transfection following their first passage, or a double 8h-transfection following their first and second passages. Transfected cells were isolated for the determination of plasmalogen content 1, 2, 3, 4, 5, or 7 days after the single transfection and 5 days after double transfection. The double transfection protocol was used for further experimentations, meaning that all following experiments were performed 5 days after the cells were reseeded at second generation and treated with siRNA for the second time.

Determination of plasmalogen and fatty acid content of Müller cells and whole retinas

To evaluate whether the inhibition of DHAP-AT gene expression by siRNA transfection modified the cell levels of plasmalogens, we determined the amounts of dimethylacetals (DMAs) –formed from the transmethylation of aldehyde aliphatic groups in the sn-1 position of plasmalogens– by gas chromatography coupled with flame ionization detection (GC-FID). The amounts of DMAs were also determined in whole rat retinas in order to compare plasmalogen levels of Müller cells to those of the whole tissue.

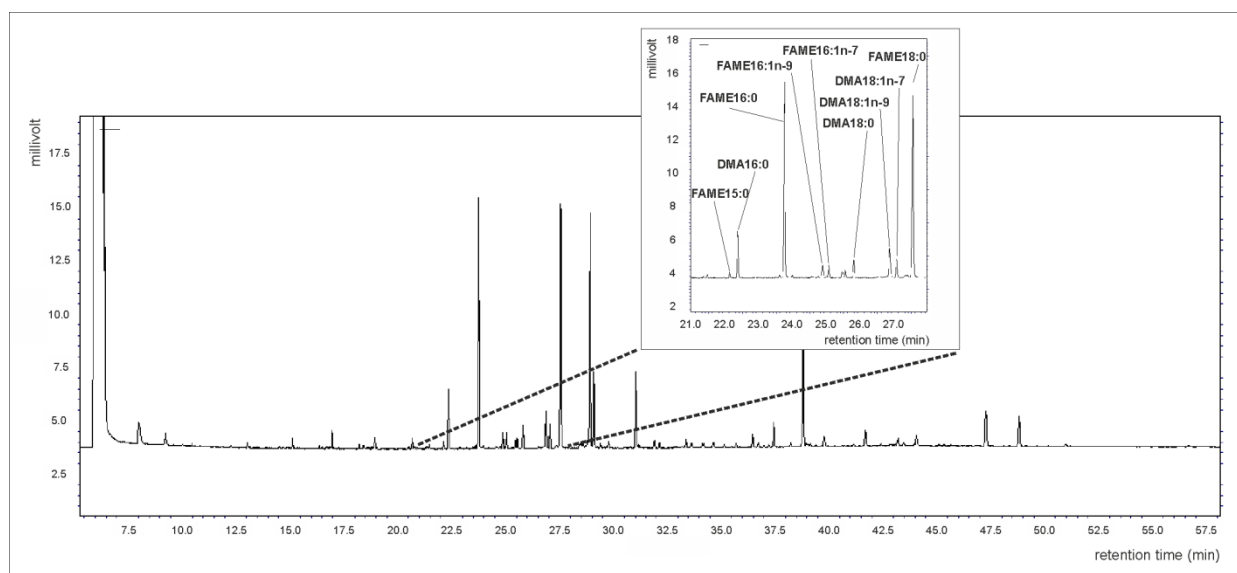
Lipid extraction from sample

Twenty one days-old Wistar rats (Centre d'Élevage Janvier) were euthanized by CO₂ exposure. Eyeballs were isolated, corneas were incised, lenses taken over and retinas were removed and stored at -80 °C until further use. Total lipids from Müller cells and from rat retinas were extracted according to the method of Folch and collaborators by using a mixture of chloroform/methanol (2:1, v:v) [29]. Lipid extracts were stored at -20 °C under inert gas until further analyses.

Gas chromatographic analyses

Total lipids were transmethylated using boron trifluoride in methanol according to Morrison and Smith [30]. 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 DMAs 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 m × 0.25 mm i.d., film thickness 0.20 µm; 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 DMAs 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 FAMES and DMAs. A representative chromatogram of Müller cell plasmalogen and fatty acid analysis is presented in Fig 1. Plasmalogen levels were calculated as $2 \times$ (% of total DMAs) as previously described [19].



[FIGURE CAPTION] Fig 1: Representative chromatogram of Müller cell plasmalogen and fatty acid analysis. Fatty acid methyl esters (FAMES) are formed from fatty acids originating from the *sn*-1 and *sn*-2 positions of diacylglycerophospholipids and the *sn*-2 position of plasmalogens whereas dimethylacetals (DMAs) are the product of the transmethylation of aldehyde aliphatic groups in the *sn*-1 position of plasmalogens.

Inhibition of iPLA2 activity by Bromoenol Lactone

Bromoenol Lactone (BEL) was used to inhibit iPLA2 in Müller cells as previously described [26, 27]. Briefly, a BEL stock solution (10 mM, B1552, Sigma-Aldrich) was

prepared in DMSO. Cells were treated before use for 24 h by 10 μ M of BEL diluted in DMEM. A mixture of DMEM and DMSO was used to treat the group without BEL.

Determination of cell viability

The MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) cell proliferation assay measures the mitochondrial succinate dehydrogenase activity and consequently mirrors cell viability. The results of MTT assay were normalized to the amount of total proteins.

MTT assay

Cell viability was determined by MTT assay on Müller cells seeded on 96-well microplates. A MTT stock solution (reference M5655, Sigma Aldrich) was prepared in DMSO (5 mg/mL). For each well, 100 μ L of MTT (0.5 mg/mL) in DMEM without phenol red were added. Three hours later, supernatants were removed and substituted by 100 μ L of DMSO. The formazan optical density was measured with a multilabel plate reader (Victor 3V, PerkinElmer, Waltham, MA, USA) at 544 nm. Two measurements were done for each sample.

Fluorescamine assay

Protein content of Müller cells was determined by the fluorescamine assay in comparison with dilutions of standards composed of BSA protein. After three cycles of freezing/thawing at -80 °C, 400 μ L of fluorescamine (300 μ g/mL) was added in each well. Fluorescence was measured with a multilabel plate reader (Victor 3V, PerkinElmer) with excitation filter at 405 nm and emission filter at 465 nm.

Evaluation of cell proliferation by ki67 immunocytochemistry

Second-generation Müller cells were seeded into 8 well-cover glasses (reference W1008Y, Lab-Tek, Thermo Scientific Nunc). After the treatments with siRNA and/or BEL, cells were washed with PBS and fixed for 10 min with 4 % formaldehyde in PBS. After 6 washes and a permeabilization step with TritonX100 (reference T8787, Sigma-Aldrich), cells were incubated with primary antibodies (mouse anti-ki67, reference M7248, Dako, Glostrup, Denmark, dilution 1:1000) overnight at 4 °C. Then, secondary antibody (reference A11001, Life Technology, Thermo Fischer Scientific, dilution 1:1000) and DAPI were added and cells were coverslipped using a fluorescence-mounting medium. Fluorescence microphotographs were taken using a Nikon microscope (model Eclipse E600, Nikon, Champigny-sur-Marne, France) and a Nikon digital camera (model DS-Ri2, Nikon) equipped with the Nikon Nis BR software. Images were analyzed with ImageJ software. Proliferation was evaluated as a ratio between the numbers of cells stained by ki67 to total cells stained by DAPI.

Evaluation of cell migration

Müller cells migration was evaluated by wound healing assay. Müller cells were seeded on Culture-Insert (80209, Ibidi, Munich, Germany) at a density of 1×10^4 cells/mL. Inserts were removed 5 days after cells were submitted to their second transfection by siRNAs thus creating a cell-free gap of 500 μm between Müller cells. Cell migration was monitored under microscope by recording a picture each hour during 72 hours. Three fields per insert were observed and the results were averaged. The cell-free area was measured thanks to the ImageJ software (National Institutes of Health, USA), in order to calculate the percentage of recovery.

Protein expression analyses

Extraction and quantification of total proteins

Proteins were extracted from Müller cells in a modified RIPA lysis buffer (25 mM Tris-HCL pH 7.5, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 0.1 % SDS, 1 % sodium deoxycholate, 1 % NP40, 150 mM NaCl) with extemporaneous addition of a phosphatase inhibitor (reference 04906837001, Roche, Sigma-Aldrich) and protease inhibitor (reference 05892970001, Roche, Sigma-Aldrich) cocktails. After 10 min of centrifugation at 10000 × g, the supernatant containing proteins was isolated. Protein content was measured by using the Pierce BCA Protein Assay Kit (23252, Pierce® Microplate BCA Protein Assay Kit, Life technologies, ThermoFisher scientific) at 562 nm by a multilabel plate reader (Victor 3V, PerkinElmer). Dilutions of known concentrations of BSA were prepared and used to determine a standard curve.

Western-blotting

Fifty micrograms of protein extracts were boiled for 10 min in a 4X Laemmli buffer (40 % Glycerol, 240 mM Tris/HCl pH 6.8, 8 % SDS, 0.04 % bromophenol blue, 5 % beta-mercaptoethanol) and then separated by electrophoresis (Mini-PROTEAN® Tetra System, Bio RAD, Hercules, CA, USA) on a 4-15 % SDS-PAGE gel (reference 456-8064, Bio RAD) at 120 V. Then proteins were transferred with a Trans-Blot® Turbo™ Transfer System to a polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (reference 1704156, Bio-Rad). Membranes were blocked for 1 hour at room temperature in a 5 % fat-free dry milk TBS solution and then incubated overnight with the primary antibody at 4 °C. The primary antibodies used were: 1:1000 p38 (reference #9212, Cell Signaling Technology®, Beverly, MA, USA) ,1:1000 Phospho p38 (reference #4511, Cell Signaling Technology®), 1:1000 44/42MAPK (reference #4695, Cell Signaling Technology®), 1:1000 Phospho 44/42MAPK (reference #4370, Cell Signaling Technology®), 1:1000 JNK (reference #9252, Cell Signaling Technology®),

1:1000 Phospho JNK (reference #4668, Cell Signaling Technology®), 1:1000 GNPAT (reference 14931-1-AP, Proteintech™, Rosemont, IL, USA), 1:1000 Actin (reference sc1616, SantaCruz), 1:1000 GFAP (reference MS-280-P, Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA). Membranes were then rinsed in a mixture of Tris-Buffered Saline (50 mM Tris, 150 mM NaCl) and Tween 20 (0.01 %) TBS-T and incubated with HRP-conjugated secondary antibodies (reference P0047, P0449, P0448, Dako, Glostrup, Denmark) for 1 h at room temperature. Blots were visualized by chemiluminescence using a charge-coupled device (CCD) camera (ChemiDoc, Bio RAD) which captures a digital image of the light produced by ECL reagents (reference NEL 105001EA, Perkin Elmer).

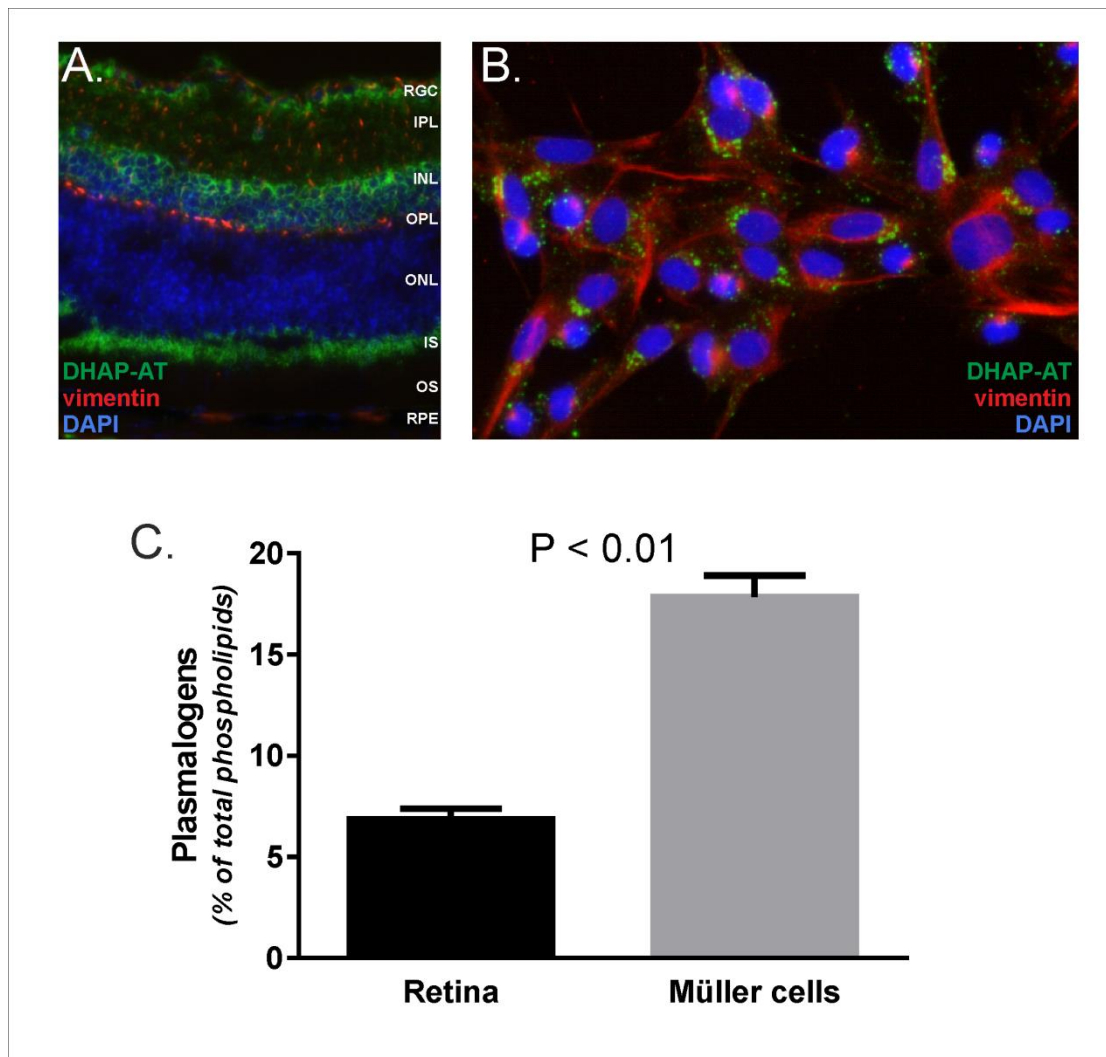
Statistical analyses

The data were analyzed using GraphPad Prism 6 software (GraphPad Software, Inc, La Jolla, CA, USA). The results are expressed as means \pm standard deviation (SD) or standard error of the mean (SEM). Data were first submitted to the D'Agostino & Pearson omnibus normality test, and were further analyzed by the non-parametric paired Wilcoxon's test to compare values from a same culture and the Mann-Whitney's test to compare plasmalogen levels between retina and Müller cells. In order to compare four groups over time in wound healing experiments, we performed a two-way ANOVA with Tukey's multiple comparisons test. Finally, a two-way ANOVA with Sidak's multiple comparisons test was performed in order to compare siRNA and siCtrl groups during the time course study. P values lower than 0.05 were considered as statistically different.

Results

Retinal Müller cells express DHAP-AT, and produce and concentrate plasmalogens

In a first series of experiments, we have investigated whether Müller cells have the ability to produce plasmalogens and have determined the concentrations of plasmalogens in these cells. Immunostainings of DHAP-AT protein –the key enzyme of plasmalogen biosynthesis– in mice retinal cryosections confirmed earlier *in situ* hybridization observations by showing a strong expression of DHAP-AT in retinal layers corresponding to photoreceptor inner segments (IS), inner nuclear layer (INL), and retinal ganglion cells (RGC) [19] (**Fig 2A**). As these layers match with the localization of Müller cell processes, nuclei, and endfeet, these data suggest the expression of DHAP-AT protein in retinal Müller cells. To confirm that, immunocytologic experiments were performed on primary cultures of Müller cells. The results showed an expression pattern of the protein in the form of small cytoplasmic dots (**Fig 2B**). At a sub-cellular level, DHAP-AT protein did not co-localize with the intermediate filament vimentin, a marker of Müller cells [31], neither in cultured Müller cells nor on retinal cryosections. Finally, we have evaluated the levels of plasmalogens, the product of DHAP-AT, in Müller cells in comparison to whole retinas (**Fig 2C**). In whole retinas, plasmalogens represented about 6.8 % of total phospholipids whereas their levels reached almost 18 % of total phospholipids in Müller cells ($P < 0.01$), thus suggesting a concentration of plasmalogens in Müller cells within the retina.



[FIGURE CAPTION] Fig 2: Müller cells express the key enzyme of plasmalogen biosynthesis DHAP-AT and are enriched in plasmalogens. **A.** Representative fluorescence microscopy picture of a mouse retina stained for DHAP-AT (green), vimentin (red) and DAPI (blue). DHAP-AT is expressed in photoreceptor inner segments (IS), inner nuclear layer (INL) and retinal ganglion cell layer (RGC), these layers corresponding to Müller cell microvilli, soma and endfeet. RPE: retinal pigment epithelium; OS: photoreceptor outer segments; ONL: outer nuclear layer; OPL: outer plexiform layer; IPL: inner plexiform layer. **B.** Representative fluorescence microscopy picture of Müller cells in primary culture stained for of DHAP-AT (green), vimentin (red) and DAPI (blue). Müller cells in primary culture express DHAP-AT according to a small cytoplasmic punctata pattern. **C.** Concentrations of plasmalogens in whole retinas and isolated Müller cells. The levels of

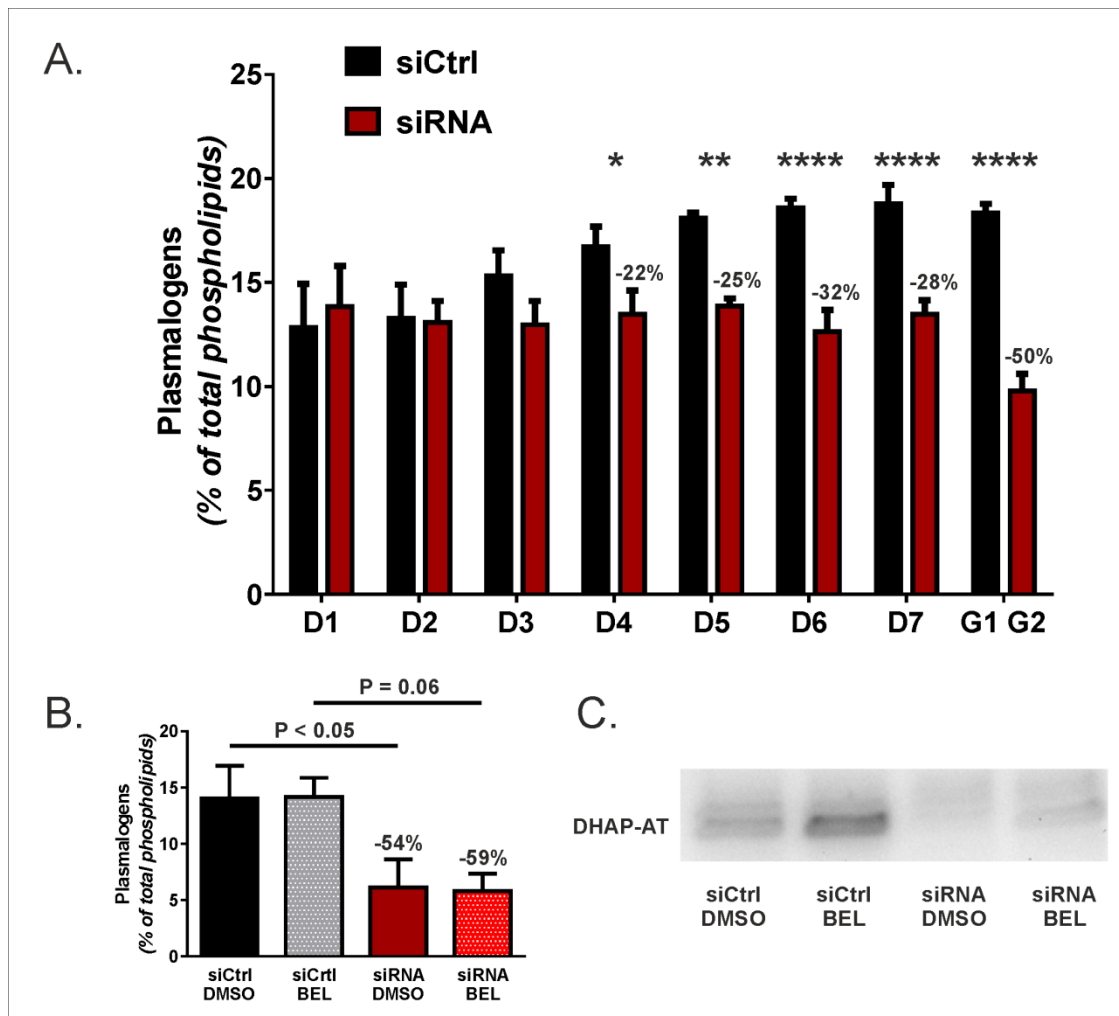
plasmalogens are 3-fold higher in Müller cells when compared to the entire retina, suggesting a concentration of plasmalogens in Müller glia within the retina. Results are expressed as mean \pm SD (n=6); Mann-Whitney's test

siRNA directed against DHAP-AT mRNAs and BEL decrease Müller cell content in plasmalogens and DHA

A time course study was performed to optimize the siRNA transfection protocol and determine whether it influences plasmalogen content of Müller cells (**Fig 3A**). The cellular concentrations of plasmalogens were determined 1, 2, 3, 4, 5, 6, and 7 days after a single transfection (D1, D2, D3, D4, D5, D6, D7, respectively) or 5 days after a double transfection (G1 G2). In control conditions, plasmalogen concentrations in Müller cells showed a time-dependent increase and reached 18 to 19 % of total phospholipids 4 days after reseeding. Following a single transfection with siRNA against DHAP-AT, Müller cell plasmalogen levels was stable and became significantly lower when compared to control cells from D4 (-22 %, $P < 0.05$) until D7 (-28 %, $P < 0.0001$). A double transfection of Müller cells was more efficient as it lowered cell content in plasmalogens by 50 % (G1 G2, $P < 0.0001$).

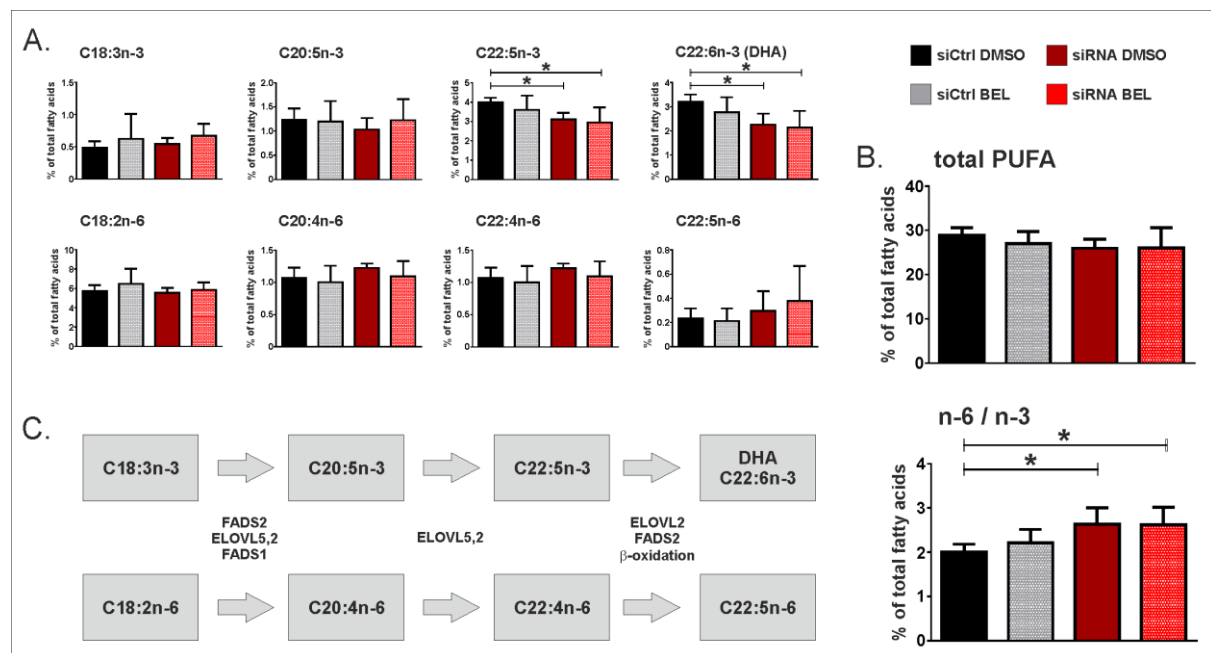
Double-transfection experiments were repeated in the presence or not of the inhibitor of iPLA2 Bromoenol lactone (BEL) (**Fig 3B**). The results confirmed the preliminary data and showed a 54%-decrease of plasmalogen levels in Müller cells following siRNA treatment ($P < 0.05$). BEL treatment did not result in any modification of Müller cell plasmalogen content. Finally, the decreased expression of DHAP-AT protein following the two-step transfection of Müller cells with siRNA directed against DHAP-AT was verified by western-blotting experiments (**Fig 3C**). This double transfection protocol was used for further experiments.

The inhibition of plasmalogen biosynthesis also affected the cell fatty acid composition. In cells treated with siRNA against DHAP-AT (siRNA DMSO and siRNA BEL groups), only the concentrations of longer-chain n-3 PUFAs, namely C22:5n-3 and DHA, were reduced (**Fig 4A**). The concentrations of n-6 PUFAs were unaffected by treatments even if a slight and non-significant increase of C22:5n-6 was observed in cells treated with siRNA. Treating cells with BEL had no impact on fatty acid composition (siCtrl BEL and siRNA DMSO). These modifications did not impact total PUFA content but significantly increased the n-6 PUFA to n-3 PUFA ratio in cells in which plasmalogen biosynthesis was inhibited (siRNA DMSO and siRNA BEL groups, **Fig 4B**). DHA and C22:5n-6 are synthesized from C18:3n-3 and C18:2n-6, respectively, by metabolic reactions involving desaturation, elongation, and β -oxidation reactions (**Fig 4C**).



[FIGURE CAPTION] Fig 3: siRNA directed against DHAP-AT decrease plasmalogen concentrations in Müller cells. A. Time course study of plasmalogen concentrations in Müller cells transfected by siRNA directed against DHAP-AT (siRNA) or controls (siCtrl). Whereas a single transfection led to a decrease of about 30 % of plasmalogen concentrations after 6 days (D6) and 7 days (D7), a two-step transfection procedure reduced by half the plasmalogen content of Müller cells (G1G2). Results are presented as means \pm SD (n=3); *: $P \leq 0.05$, **: $P \leq 0.001$, and ****: $P \leq 0.0001$ following a two-way ANOVA with Sidak's multiple comparisons test. **B.** Plasmalogen content of Müller cells after a two-step transfection with siRNA directed against DHAP-AT (siRNA), control siRNAs (SiCtrl), and without (BEL) or without (DMSO) inhibition of iPLA2. Inhibiting the expression of DHAP-AT reduced by 54 to 59 % the plasmalogen concentrations in Müller cells in primary culture ($P < 0.05$ and $P = 0.06$, respectively). No effect of iPLA2 inhibition was observed on cellular

plasmalogen concentrations. Results are expressed as means \pm SD ($n=7$ for DMSO groups and $n=5$ for both BEL groups); Wilcoxon's test. **C.** Representative blots of DHAP-AT protein analysis. Treating Müller cells with siRNAs directed against DHAP-AT silenced the expression of DHAP-AT protein.



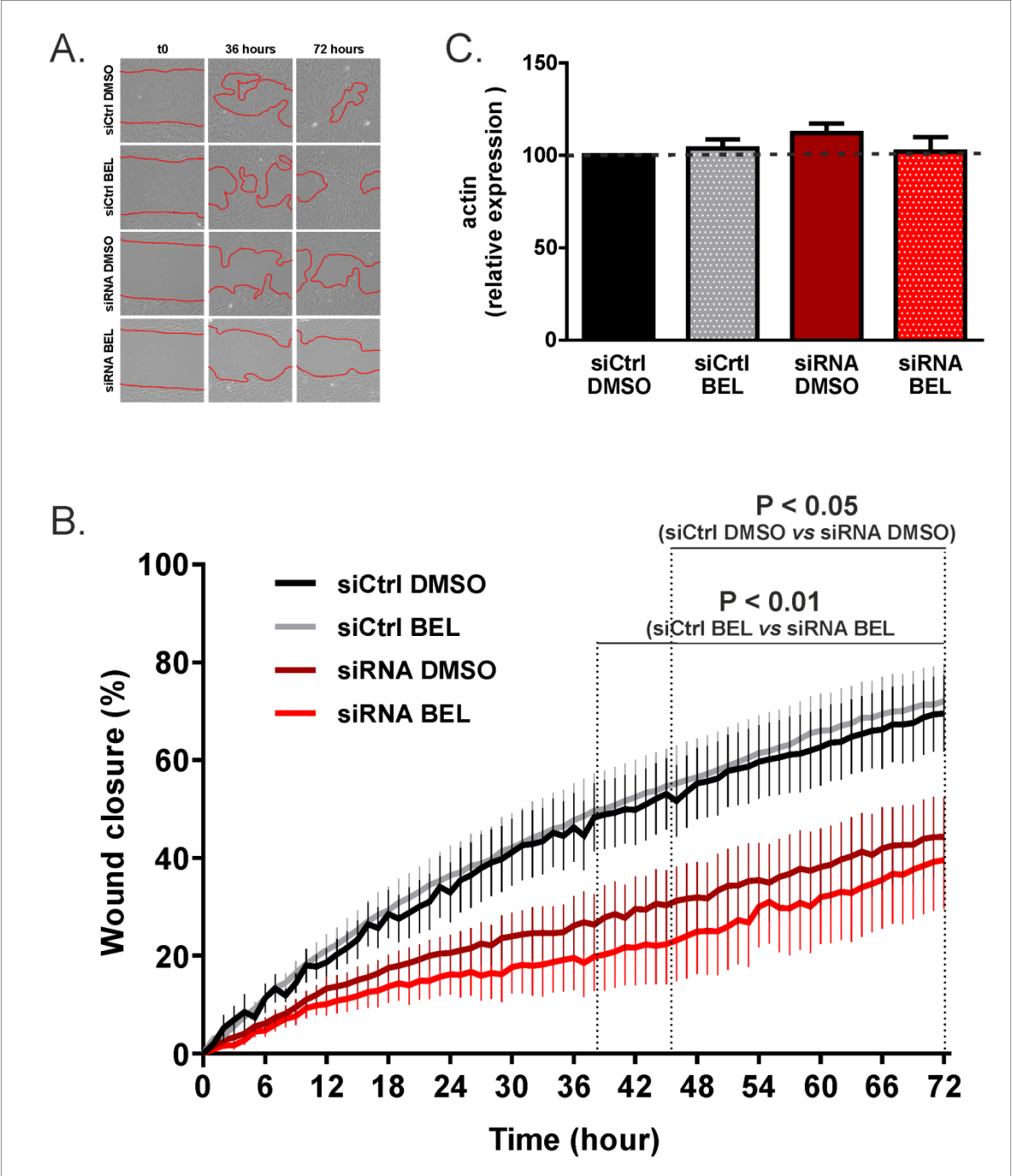
[FIGURE CAPTION] Fig 4: Reducing Müller cell levels of plasmalogens affects cell fatty acid composition. A. Effects siRNA against DHAP-AT and/or BEL on n-3 and n-6 PUFA concentrations in Müller cells. In cells treated with siRNA (siRNA DMSO and siRNA BEL groups), only the concentrations of longer-chain n-3 PUFAs were reduced, namely C22:5n-3 and DHA. No effect of BEL was observed (siCtrl BEL and siRNA DMSO). The cell concentrations of n-6 PUFAs were not modified even if a slight and non-significant increase of C22h5n-6 was observed in siRNA DMSO and siRNA BEL groups. Results are presented as means \pm SD ($n=6$); two-way ANOVA with Tukey's multiple comparisons test; *: $P < 0.05$. **B.** These modifications had no effect on the total PUFA content of Müller cells, only the n-6 PUFA to n-3 PUFA was significantly increased in cells in which plasmalogen biosynthesis was inhibited (siRNA DMSO and siRNA BEL groups). Results are presented as means \pm SD ($n=6$); two-way ANOVA with Tukey's multiple comparisons test; *: $P < 0.05$. **C.** Sequence of

metabolic reactions leading to n-3 and n-6 long-chain PUFA synthesis. DHA and C22:5n-6 are synthesized from C18:3n-3 and C18:2n-6, respectively. Metabolic reactions involve desaturation by Fatty Acid Desaturase 2 (FADS2), elongation by ELONGation of Very Long-chain fatty acid 5,2 (ELOVL5,2) and Fatty Acid Desaturase 1 (FADS1) to synthesize C20:5n-3 and C20:4n-6, which are elongated by ELOVL5,2 to C22:5n-3 and C22:4n-6, which in turn are elongated by ELOVL2, desaturated by FADS2, and β -oxidized to give rise to DHA and C22:5n-6.

The diminution of plasmalogen content alter the ability of Müller cells to migrate but not their content in actin filament

To measure the ability of Müller cells to migrate, we performed wound healing assays on cells treated or not with siRNA against DHAP-AT and/or with the chemical inhibitor of iPLA2, bromoenol lactone (**Fig 5A**). In control cells treated with siCtrl and DMSO, the wound closure was of about 70 % at a time point of 72 hours. Treating cells with BEL (siCtrl BEL group) did not modify Müller cell migration, suggesting that the inhibition of iPLA2 does not affect cell motility (**Fig 5B**). However, inhibiting the biosynthesis of plasmalogens strongly affected the ability of Müller cells to migrate as the rate of wound closure was significantly reduced at the level of 35-40 % after 72 hours in groups treated with siRNA against DHAP-AT ($P < 0.05$ between siCtrl DMSO and siRNA DMSO groups and $P < 0.01$ between siCtrl BEL and siRNA BEL groups from 38 and 46 hours of wound healing, respectively). No significant difference was observed between wound closure rates of cells from siCtrl BEL and siRNA BEL, thus confirming that the chemical inhibition of iPLA2 with BEL has no effect on Müller cells migration. However, cells treated with both, siRNA against DHAP-AT and BEL, seemed to display a more-pronounced, through non-significant, decrease in their ability to migrate.

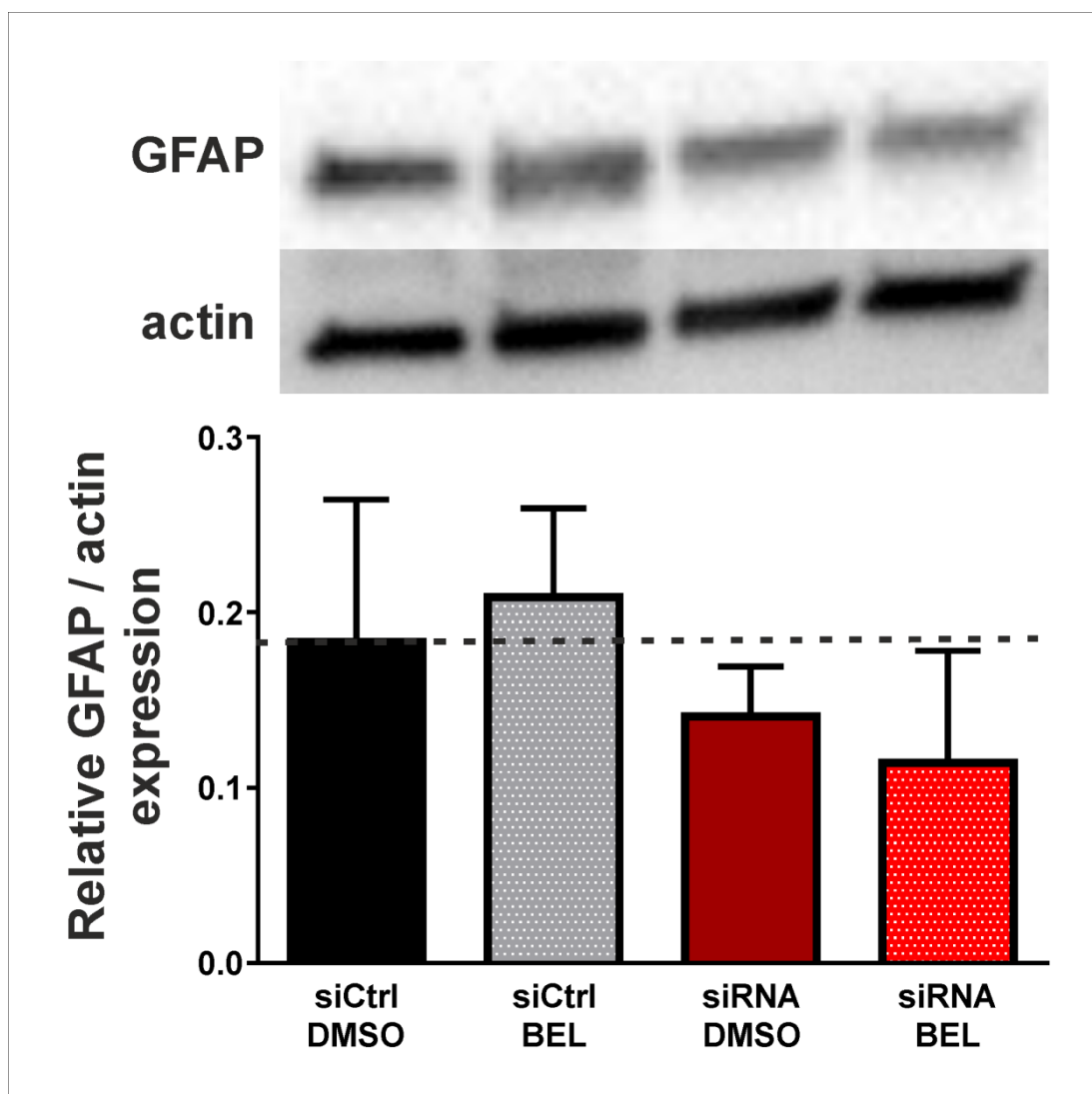
Because modifications in cell migration can be associated to remodeling, and retraction, of the actin cytoskeleton, we wanted to check whether the cellular levels of actin would be changed upon siRNA and/or BEL treatments. Results from western-blot analyses did not reveal any variation in Müller cell actin content in response to DHAP-AT and/or iPLA2 activity inhibition (**Fig 5C**).



[FIGURE CAPTION] Fig 5: The diminution of plasmalogen content reduces the ability of Müller cells to migrate. **A.** Representative pictures of Müller cells in primary culture after inhibition or not of DHAP-AT (siRNA and siCtrl, respectively) and iPLA2 (BEL and DMSO, respectively) at the time of treatment (t0), and after 36 and 72 hours following treatment. Red lines represent the limits of cell populations. The cell-free surface is lower by Müller cells in siCtrl DMSO and siCTRL BEL groups. **B.:** The quantification of wound closure confirmed a lower migration of Müller cells when treated with siRNA directed against DHAP-AT (siRNA DMSO and siRNA BEL groups) when compared to controls (siCtrl DMSO and siCtrl BEL groups, $P < 0.05$ from 38 h and $P < 0.01$ from 46 h, respectively). Results are presented as means \pm SEM (n=10 for siCtrl DMSO, n=9 for siCtrl BEL and siRNA DMSO, n=8 for siRNA BEL groups); two-way ANOVA with Tukey's multiple comparisons test. **C.** Decreasing plasmalogen content and/or inhibiting iPLA2 does not affect Müller cell content in actin filament. Western-blot analyses did not reveal any modification of actin expression in response to siRNA and/or BEL treatments. Results are presented as means \pm SEM (n=10); two-way ANOVA with Tukey's multiple comparisons test.

Diminution of cell content in plasmalogens and/or inhibition of iPLA2 does not activate Müller cells or affect their viability

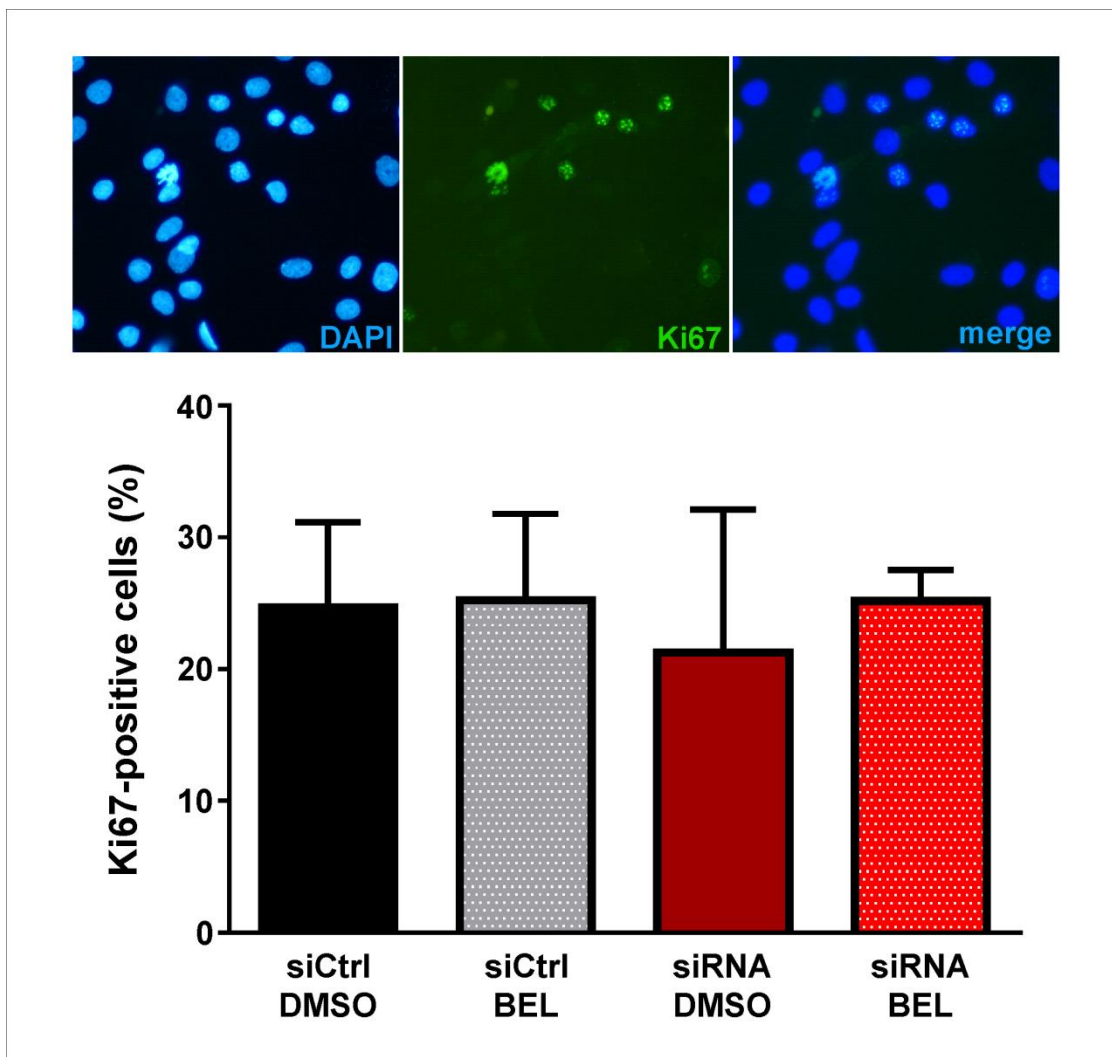
Müller cell activation in response to siRNA and/or BEL treatments was evaluated through the determination of cell GFAP protein content (**Fig 6**). No significant variation was observed between the different cell groups, suggesting that Müller cells are not activated following the treatments. However, inhibiting plasmalogen biosynthesis was associated to a non-significant decrease of GFAP expression of -24% and -38% in siRNA DMSO and siRNA BEL groups, respectively. Cell viability was evaluated by MTT assay that measures the mitochondrial succinate dehydrogenase activity. The diminution of cell content in plasmalogens and/or the inhibition of iPLA2 did affect the viability of Müller cells in culture (data not shown).



[FIGURE CAPTION] Fig 6: Inhibiting the expression of DHAP-AT and/or the iPLA2 activity does not activate Müller cells. Western-blot analyses of GFAP expression in Müller cells in primary culture did not reveal any significant variation when cells were treated with siRNA against DHAP-AT (siRNA), control siRNA (siCtrl) in combination or not with an inhibition of iPLA2 activity (BEL and DMSO, respectively). However a tendency to a lower expression of GFAP was detected in cells treated with siRNA (siRNA DMSO and siRNA BEL groups). Results are expressed as means \pm SD (n=4); Wilcoxon's test.

Müller cell proliferation is not affected by inhibition of DHAP-AT expression and/or of iPLA2 activity

Müller cell proliferation was determined by evaluating the expression of Ki67, a nuclear marker of cell division (**Fig 7**) [32]. The ratio of Ki67-positive cells (in green) on total cells (in blue) was calculated. No difference was observed between the different groups of treatments.

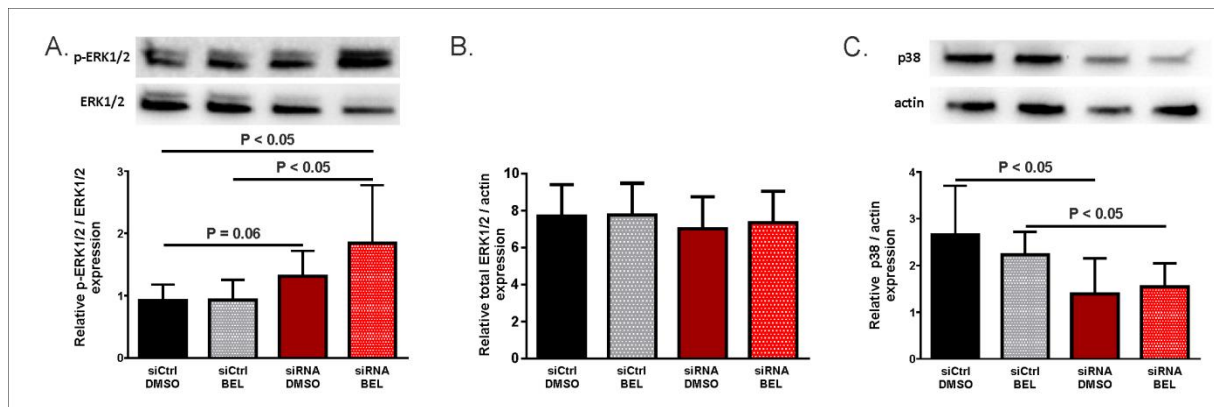


[FIGURE CAPTION] Fig 7: Decreasing plasmalogen content and/or inhibiting iPLA2 does not affect Müller cell proliferation. Treating Müller cells with siRNA against DHAPAT-siRNA), control siRNA (siCtrl), in combination or not with an inhibitor of iPLA2 activity (BEL and DMSO, respectively) did not change the ratio of proliferating cells stained with anti-Ki67

antibody (upper middle) on total cells stained with DAPI (upper left). Results are expressed as means \pm SD (n=6); Wilcoxon's test.

Inhibition of DHAP-AT expression and iPLA2 activity affects the phosphorylation of ERK but not that of p38

We studied the consequences of the inhibition of plasmalogen biosynthesis and/or iPLA2 inhibition on MAPK proteins on the basis of previous data showing that migration processes are, at least partly, driven by MAPK signaling [14]. For that purpose, we have evaluated the expression of 44/42MAPK (ERK1/2), Phospho 44/12MAPK (p-ERK1/2), p38, Phospho p38 (p-p38), JNK, and Phospho JNK (p-JNK) by western-blotting. Transfection by siRNA against DHAP-AT resulted in a significant increase of the phosphorylation rate of ERK1/2 in siRNA BEL group ($P < 0.05$) group, thus suggesting an activation of ERK1/2 pathway (**Fig 8A**). Cells treated with siRNA only (siRNA DMSO group) showed an increase in the phosphorylation rate of ERK1/2 that was not significant ($P = 0.06$). No variation of cell total ERK1/2 protein content was observed following treatments (**Fig 8B**). Inhibiting the biosynthesis of plasmalogens also resulted in the reduction of the expression of p38 by 1.9 fold between siCtrl DMSO and siRNA DMSO groups ($P < 0.05$) and by 1.4 fold between siCtrl BEL and siRNA BEL ($P < 0.05$) (**Fig 8C**). BEL treatment had no effect on the expression of p38. The inhibition of plasmalogen biosynthesis and iPLA2 activity had no repercussion on the expression of JNK (data not shown). The phosphorylated forms of p-38 and JNK, namely p-p38 and p-JNK, were not observed on blots (data not shown).



[FIGURE CAPTION] Fig 8: Decreasing the concentrations of plasmalogens in Müller cells activates ERK1/2 pathways and reduces the expression of p38. A. Western-blot analysis of ERK1/2 and phospho-ERK1/2 (p-ERK1/2) expression. Treating Müller cells with siRNA directed against DHAP-AT and BEL (siRNA BEL) favors the phosphorylation of ERK1/2 protein. Results are presented as means \pm SD (n=6); Wilcoxon's test. **B.** The total ERK protein content of Müller cells was not modified by treatments with siRNA and/or BEL. **C.** Western-blot analysis of p38 protein showing that the inhibition of the expression of DHAP-AT significantly reduces its expression (siRNA versus siCtrl groups) whereas the inhibition of iPLA2 activity had no effect (BEL versus DMSO groups). Results are expressed as means \pm SD (n=6); Wilcoxon's test.

Discussion

Plasmalogens are quantitatively important in the retina as they can account for up to 30 % of ethanolamine phospholipids [19]. This quantitative importance is likely to be the reflection of crucial functions played by plasmalogens in ocular physiology as shown by the retinal developmental abnormalities observed in plasmalogen deficiency [25]. Even if the functions of plasmalogens within the retina are still poorly understood, previous data from our laboratory showed that these particular glycerophospholipids are involved in the regulation of retinal vascular development [26]. As macroglial cells, Müller cells are key actors of retinal lipid metabolism [14, 15, 33], we wanted to evaluate the functional importance of plasmalogen metabolism in retinal Müller cells and to what extent retinal Müller cells would be sensitive to an alteration of their plasmalogen content.

For the first time, our data show that Müller cells express DHAP-AT –the key enzyme of plasmalogen biosynthesis– and are enriched in plasmalogens. The expression pattern and localization of DHAP-AT evidences a cytoplasmic localization, not bound to vimentin filaments. The small cytoplasmic dots observed are in agreement with a peroxisomal localization of the enzyme but a co-labeling with peroxisomal markers is mandatory to ascertain this assumption. Whereas the expression of DHAP-AT in retinal Müller cells is not surprising since Müller glia is a known actor of retinal lipid metabolism, these data open new questions as they suggest that Müller cells may play crucial roles in mechanisms related to retinal abnormalities observed in plasmalogen-deficient mice [25]. Particularly, as Müller cells are involved in the regulation of retinal vascularization through synthesis of pro- and anti-angiogenic compounds [2-6], it would be interesting to evaluate to what extent they are

implicated in the abnormal vascular development observed in DHAP-AT-deficient mice [26].

In this study, we have chosen to use a model of siRNA transfection against DHAP-AT instead of Müller cells derived from DHAP-AT-deficient mice. Our transfection protocol was efficient in significantly lowering the cell content in DHAP-AT protein but also in reducing the amounts of its product. Indeed, plasmalogen concentration was decreased in cells in which DHAP-AT expression was inhibited and this diminution was time-dependent. In our experimental conditions, a two-step transfection was even more efficient than a single transfection procedure as it resulted in a repeatable, 50 %-decrease of cell content in plasmalogens. To our knowledge, these data are the first describing the use of siRNA for the inhibition of DHAP-AT in retinal cells, and subsequently the production of plasmalogens in the eye. Such a protocol may be a good alternative to the use of cells derived from DHAP-AT-deficient mice, as these animals display an altered reproductive efficiency and reduced post-natal viability [25].

A 50 %-decrease of plasmalogen content did not affect cell viability, confirming that Müller glial cells are strikingly resistant as shown by their ability to survive during retinal injury [34, 35]. Under stress, Müller cells are known to be activated and to enter into metabolic conditions called “gliosis” and regrouping diverse responses. These include the over-expression of GFAP, the increase of their proliferation rate but also modifications in their ability to migrate [9, 10]. The transfection of cells with siRNA directed against DHAP-AT led to a decrease of the ability of Müller cells to migrate. These data suggest that plasmalogens are required for Müller cell motility. Because a decreased migration is likely to lead to a substantial remodeling and retraction of cytoskeleton proteins, we have checked whether the expression of actin

is affected by our treatments. The results clearly showed that the reduction of Müller cell content of PIs and/or the inhibition of iPLA2 activity does not affect the cellular content of actin cytoskeleton filament ($P = 0.40$, $n = 10$). Based on these data, we have used actin to normalize cell protein content in western-blot analyses.

Although no quantitative estimates have been made, previously described Müller glial cells obtained through the same methodology tended to show an increase in GFAP expression as well as an ability to proliferate and migrate [14, 28]. The data we obtained show that decreasing plasmalogen content reduces glial motility and seems to slightly decrease GFAP content, without affecting proliferation. Hence, rather than promoting gliotic response, the reduction of Müller cell plasmalogen content might be decreasing glial activation.

In our experimental conditions, the diminution of plasmalogen content of Müller cells was accompanied by a significant decrease in the concentrations of DHA and its metabolic precursor n-3 docosapentaenoic acid (C22:5n-3) whereas those of n-6 PUFA remained unchanged. These findings reinforce previous data demonstrating high levels of PUFAs on plasmalogens when compared to their diacyl counterparts [36-39] and suggest that in Müller cells, plasmalogens are critical for maintaining high levels of n-3 PUFAs rather than n-6 PUFAs. Such a specificity has also been observed in a plasmalogen-deficient macrophage-like cell line, where only the levels of n-3 PUFA were decreased [40] or in blood compartment of patients lacking plasmalogens, where the levels of DHA were reduced in plasma and red blood cells, while arachidonic acid levels (C20:4n-6) were significantly decreased only in plasma [41]. Our data adds then new information about a potential preferential esterification of n-3 PUFAs on retinal Müller cells plasmalogens.

The diminution of plasmalogen and n-3 PUFA content was associated to a reduction of Müller cell migration and to an activation of ERK1/2 pathway, represented by the increase of p-ERK1/2 to ERK1/2 ratio without changing cell total ERK protein content. The activation of ERK1/2 pathway is likely to be the consequence of the diminution of cell C22:5n-3 and/or DHA content of Müller cell membranes. Indeed, several studies have shown that n-3 PUFAs such as DHA can activate or repress MAPK pathways, and particularly influence the phosphorylation of ERK1/2 protein [42-48]. In smooth muscle and gastric cancer cells, the addition of DHA attenuated the activation of ERK1/2 pathway [49, 50]. The reaction of retinal Müller cells to n-3 PUFA bioavailability seems to be similar as the cell content in DHA was negatively associated to the phosphorylation of ERK1/2. However, whereas a reduced migration was associated to a lower activation of ERK1/2 pathway in these studies, our data suggest that the alteration of the ability of retinal Müller cells to migrate seems to be triggered by the phosphorylation of ERK1/2 protein. We can postulate that this difference is linked to the specificity of the cell model used. Another possibility is that migration is driven by other MAPK proteins such as p38, but our experimental conditions did not allow determining whether the diminution of p38 levels in response to siRNA is associated to the phosphorylation of this protein, and subsequently to the activation of p38/MAPK pathway.

Treating cells with BEL —a chemical inhibitor of iPLA2— did not reinforce the effect of plasmalogen decrease by decreasing even more an already low PUFA content. This result is not surprising since the analytical technique we have used do not allow the discriminative quantification of plasmalogen degradation product by iPLA2, namely free fatty acids and lyso-plasmalogens [51]. The isolation of free fatty acids before their analysis or the use of liquid chromatography coupled to mass spectrometry

would have helped to better characterize the effects of BEL on lipid composition of Müller cells. However, using BEL together with siRNAs against DHAP-AT enhanced the activation of ERK1/2 pathway and seemed to reduce even more the inhibition of cell migration. Further studies are needed to better understand the role played by iPLA2 in Müller cell migration driven by MAPK.

In summary, our study suggests a crucial role for plasmalogens in maintaining high levels of n-3 PUFA in Müller cells and in pathways driving Müller cell activation and migration and involving ERK1/2. Alteration of retinal metabolism of plasmalogens might then have an impact on the ability of Müller cells to enter in gliosis and expand their processes, and subsequently to their capacity to support enviroing retinal cells under pathologic conditions. This work has several limitations the first one being the cell model used. Indeed, it would be interesting to repeat the experiments on Müller cells isolated from DHAP-AT- and iPLA2-deficient mice in order to place the experiments in conditions of a total plasmalogen deficiency and a blockade of plasmalogen catabolism, respectively. Second, it would be interesting to better characterize the metabolic products of plasmalogen degradation in order to firmly confirm the involvement of iPLA2 in the mechanisms by which plasmalogens are involved in cell migration. Finally, it will be mandatory to determine the kinetics of ERK1/2 and p38 expression in their native and phosphorylated forms in order to better identify the molecular pathways driven by plasmalogens in retinal Müller glia.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge Elise Lalarme and Laurence Decocq (from the animal facility of Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation, Dijon, France) for their assistance in animal handling and André Bouchot and Audrey Geissler (Cellmap Imaging Platform, Université de Bourgogne Franche-Comté, Dijon, France) for their assistance in immuno-labelling experiments.

References

1. Tout S, Chan-Ling T, Hollander H, Stone J. The role of Muller cells in the formation of the blood-retinal barrier. *Neuroscience*. 1993;55(1):291-301. Epub 1993/07/01. PubMed PMID: 8350991.
2. Behzadian MA, Wang XL, Jiang B, Caldwell RB. Angiostatic role of astrocytes: suppression of vascular endothelial cell growth by TGF-beta and other inhibitory factor(s). *Glia*. 1995;15(4):480-90. Epub 1995/12/01. doi: 10.1002/glia.440150411. PubMed PMID: 8926041.
3. Eichler W, Yafai Y, Keller T, Wiedemann P, Reichenbach A. PEDF derived from glial Muller cells: a possible regulator of retinal angiogenesis. *Exp Cell Res*. 2004;299(1):68-78. Epub 2004/08/11. doi: 10.1016/j.yexcr.2004.05.020. PubMed PMID: 15302574.
4. Eichler W, Yafai Y, Wiedemann P, Reichenbach A. Angiogenesis-related factors derived from retinal glial (Muller) cells in hypoxia. *Neuroreport*. 2004;15(10):1633-7. Epub 2004/07/03. PubMed PMID: 15232297.
5. Eichler W, Yafai Y, Kuhrt H, Grater R, Hoffmann S, Wiedemann P, et al. Hypoxia: modulation of endothelial cell proliferation by soluble factors released by retinal cells. *Neuroreport*. 2001;12(18):4103-8. Epub 2001/12/14. PubMed PMID: 11742246.
6. Rivera JC, Aranda J, Riesgo J, Nava G, Thebault S, Lopez-Barrera F, et al. Expression and cellular localization of prolactin and the prolactin receptor in mammalian retina. *Exp Eye Res*. 2008;86(2):314-21. Epub 2007/12/22. doi: 10.1016/j.exer.2007.11.003. PubMed PMID: 18096157.
7. Poitry-Yamate CL, Poitry S, Tsacopoulos M. Lactate released by Muller glial cells is metabolized by photoreceptors from mammalian retina. *J Neurosci*. 1995;15(7 Pt 2):5179-91. Epub 1995/07/01. PubMed PMID: 7623144.
8. Newman E, Reichenbach A. The Muller cell: a functional element of the retina. *Trends Neurosci*. 1996;19(8):307-12. Epub 1996/08/01. PubMed PMID: 8843598.
9. Bringmann A, Pannicke T, Grosche J, Francke M, Wiedemann P, Skatchkov SN, et al. Muller cells in the healthy and diseased retina. *Prog Retin Eye Res*. 2006;25(4):397-424. Epub 2006/07/15. doi: 10.1016/j.preteyeres.2006.05.003. PubMed PMID: 16839797.
10. Tackenberg MA, Tucker BA, Swift JS, Jiang C, Redenti S, Greenberg KP, et al. Muller cell activation, proliferation and migration following laser injury. *Mol Vis*. 2009;15:1886-96. Epub 2009/09/22. PubMed PMID: 19768129; PubMed Central PMCID: PMC2746266.
11. Abrahan CE, Insua MF, Politi LE, German OL, Rotstein NP. Oxidative stress promotes proliferation and dedifferentiation of retina glial cells in vitro. *J Neurosci Res*. 2009;87(4):964-77. Epub 2008/10/16. doi: 10.1002/jnr.21903. PubMed PMID: 18855938.
12. Karl MO, Hayes S, Nelson BR, Tan K, Buckingham B, Reh TA. Stimulation of neural regeneration in the mouse retina. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(49):19508-13. Epub 2008/11/27. doi: 10.1073/pnas.0807453105. PubMed PMID: 19033471; PubMed Central PMCID: PMC2614791.
13. Ooto S, Akagi T, Kageyama R, Akita J, Mandai M, Honda Y, et al. Potential for neural regeneration after neurotoxic injury in the adult mammalian retina. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(37):13654-9. Epub 2004/09/09. doi: 10.1073/pnas.0402129101. PubMed PMID: 15353594; PubMed Central PMCID: PMC518808.
14. Simon MV, Prado Spalm FH, Politi LE, Rotstein NP. Sphingosine-1-Phosphate Is a Crucial Signal for Migration of Retina Muller Glial Cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2015;56(10):5808-15. Epub 2015/09/02. doi: 10.1167/iops.14-16195. PubMed PMID: 26325420.
15. Shanmugaratnam J, Berg E, Kimerer L, Johnson RJ, Amaratunga A, Schreiber BM, et al. Retinal Muller glia secrete apolipoproteins E and J which are efficiently assembled

- into lipoprotein particles. *Brain Res Mol Brain Res*. 1997;50(1-2):113-20. Epub 1997/12/24. PubMed PMID: 9406925.
16. Mauch DH, Nagler K, Schumacher S, Goritz C, Muller EC, Otto A, et al. CNS synaptogenesis promoted by glia-derived cholesterol. *Science*. 2001;294(5545):1354-7. Epub 2001/11/10. doi: 10.1126/science.294.5545.1354. PubMed PMID: 11701931.
 17. Kingma PB, Bok D, Ong DE. Bovine epidermal fatty acid-binding protein: determination of ligand specificity and cellular localization in retina and testis. *Biochemistry*. 1998;37(10):3250-7. Epub 1998/04/02. doi: 10.1021/bi972520l. PubMed PMID: 9521644.
 18. Gordon WC, Bazan NG. Docosahexaenoic acid utilization during rod photoreceptor cell renewal. *J Neurosci*. 1990;10(7):2190-202. PubMed PMID: 2142959.
 19. 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(1):143-51. PubMed PMID: 17081518.
 20. Nagy K, Brahmabhatt VV, Berdeaux O, Bretillon L, Destailats F, Acar N. Comparative study of serine-plasmalogens in human retina and optic nerve: identification of atypical species with odd carbon chains. *J Lipid Res*. 2012;53(4):776-83. Epub 2012/01/24. doi: 10.1194/jlr.D022962. PubMed PMID: 22266369; PubMed Central PMCID: PMC3307654.
 21. Thai TP, Rodemer C, Jauch A, Hunziker A, Moser A, Gorgas K, et al. Impaired membrane traffic in defective ether lipid biosynthesis. *Hum Mol Genet*. 2001;10(2):127-36. PubMed PMID: 11152660.
 22. Hazen SL, Zupan LA, Weiss RH, Getman DP, Gross RW. Suicide inhibition of canine myocardial cytosolic calcium-independent phospholipase A2. Mechanism-based discrimination between calcium-dependent and -independent phospholipases A2. *J Biol Chem*. 1991;266(11):7227-32. PubMed PMID: 2016324.
 23. Hazen SL, Stuppy RJ, Gross RW. Purification and characterization of canine myocardial cytosolic phospholipase A2. A calcium-independent phospholipase with absolute f1-2 regiospecificity for diradyl glycerophospholipids. *J Biol Chem*. 1990;265(18):10622-30. PubMed PMID: 2355013.
 24. Farooqui AA. Studies on plasmalogen-selective phospholipase A2 in brain. *Molecular neurobiology*. 2010;41(2-3):267-73. PubMed PMID: 20049656.
 25. Rodemer C, Thai TP, Brugger B, Kaercher T, Werner H, Nave KA, et al. Inactivation of ether lipid biosynthesis causes male infertility, defects in eye development and optic nerve hypoplasia in mice. *Hum Mol Genet*. 2003;12(15):1881-95. PubMed PMID: 12874108.
 26. Saab S, Buteau B, Leclere L, Bron AM, Creuzot-Garcher CP, Bretillon L, et al. Involvement of plasmalogens in post-natal retinal vascular development. *PLoS ONE*. 2014;9(6):e101076. Epub 2014/06/26. doi: 10.1371/journal.pone.0101076. PubMed PMID: 24963632; PubMed Central PMCID: PMC4071069.
 27. Saab-Aoude S, Bron AM, Creuzot-Garcher CP, Bretillon L, Acar N. A mouse model of in vivo chemical inhibition of retinal calcium-independent phospholipase A2 (iPLA2). *Biochimie*. 2013;95(4):903-11. Epub 2012/12/26. doi: 10.1016/j.biochi.2012.12.008. PubMed PMID: 23266358.
 28. Hicks D, Courtois Y. The growth and behaviour of rat retinal Muller cells in vitro. 1. An improved method for isolation and culture. *Exp Eye Res*. 1990;51(2):119-29. Epub 1990/08/01. PubMed PMID: 2387332.
 29. Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem*. 1957;226(1):497-509. PubMed PMID: 13428781.
 30. Morrison WR, Smith LM. Preparation of fatty acid methyl esters and dimethylacetals from lipids with boron fluoride methanol. *J Lipid Res*. 1964;53:600-8. PubMed PMID: 14221106.

31. Okada M, Matsumura M, Ogino N, Honda Y. Muller cells in detached human retina express glial fibrillary acidic protein and vimentin. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 1990;228(5):467-74. Epub 1990/01/01. PubMed PMID: 2227494.
32. Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol*. 2000;182(3):311-22. Epub 2000/02/01. doi: 10.1002/(SICI)1097-4652(200003)182:3<311::AID-JCP1>3.0.CO;2-9. PubMed PMID: 10653597.
33. Boyles JK, Pitas RE, Wilson E, Mahley RW, Taylor JM. Apolipoprotein E associated with astrocytic glia of the central nervous system and with nonmyelinating glia of the peripheral nervous system. *J Clin Invest*. 1985;76(4):1501-13. Epub 1985/10/01. doi: 10.1172/JCI112130. PubMed PMID: 3932467; PubMed Central PMCID: PMC424114.
34. Silver IA, Deas J, Erecinska M. Ion homeostasis in brain cells: differences in intracellular ion responses to energy limitation between cultured neurons and glial cells. *Neuroscience*. 1997;78(2):589-601. Epub 1997/05/01. PubMed PMID: 9145812.
35. Stone J, Maslim J, Valter-Kocsi K, Mervin K, Bowers F, Chu Y, et al. Mechanisms of photoreceptor death and survival in mammalian retina. *Prog Retin Eye Res*. 1999;18(6):689-735. Epub 1999/10/26. PubMed PMID: 10530749.
36. Blank ML, Wykle RL, Snyder F. The retention of arachidonic acid in ethanolamine plasmalogens of rat testes during essential fatty acid deficiency. *Biochim Biophys Acta*. 1973;316(1):28-34. PubMed PMID: 4352922.
37. Sugiura T, Soga N, Nitta H, Waku K. Occurrence of alkyl ether phospholipids in rabbit platelets: compositions and fatty chain profiles. *Journal of biochemistry*. 1983;94(5):1719-22. Epub 1983/11/01. PubMed PMID: 6654882.
38. Akoh CC, Chapkin RS. Composition of mouse peritoneal macrophage phospholipid molecular species. *Lipids*. 1990;25(10):613-7. Epub 1990/10/01. PubMed PMID: 2079868.
39. Ford DA, Gross RW. Plasmalogen is the major storage depot for arachidonic acid in rabbit vascular smooth muscle and is rapidly hydrolyzed after angiotensin II stimulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989;86(10):3479-83. Epub 1989/05/01. PubMed PMID: 2498871; PubMed Central PMCID: PMC287161.
40. Gaposchkin DP, Zoeller RA. Plasmalogen status influences docosahexaenoic acid levels in a macrophage cell line. Insights using ether lipid-deficient variants. *J Lipid Res*. 1999;40(3):495-503. Epub 1999/03/05. PubMed PMID: 10064738.
41. Martinez M, Mougan I, Roig M, Ballabriga A. Blood polyunsaturated fatty acids in patients with peroxisomal disorders. A multicenter study. *Lipids*. 1994;29(4):273-80. Epub 1994/04/01. PubMed PMID: 8177020.
42. Sun H, Hu Y, Gu Z, Owens RT, Chen YQ, Edwards IJ. Omega-3 fatty acids induce apoptosis in human breast cancer cells and mouse mammary tissue through syndecan-1 inhibition of the MEK-Erk pathway. *Carcinogenesis*. 2011;32(10):1518-24. Epub 2011/07/21. doi: 10.1093/carcin/bgr132. PubMed PMID: 21771724; PubMed Central PMCID: PMC3179420.
43. Pan HC, Kao TK, Ou YC, Yang DY, Yen YJ, Wang CC, et al. Protective effect of docosahexaenoic acid against brain injury in ischemic rats. *J Nutr Biochem*. 2009;20(9):715-25. Epub 2008/09/23. doi: 10.1016/j.jnutbio.2008.06.014. PubMed PMID: 18805685.
44. Wu H, Ichikawa S, Tani C, Zhu B, Tada M, Shimoishi Y, et al. Docosahexaenoic acid induces ERK1/2 activation and neuriteogenesis via intracellular reactive oxygen species production in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Biochim Biophys Acta*. 2009;1791(1):8-16. Epub 2008/11/11. doi: 10.1016/j.bbalip.2008.10.004. PubMed PMID: 18996496.
45. German OL, Insua MF, Gentili C, Rotstein NP, Politi LE. Docosahexaenoic acid prevents apoptosis of retina photoreceptors by activating the ERK/MAPK pathway. *J Neurochem*. 2006;98(5):1507-20. Epub 2006/08/23. doi: 10.1111/j.1471-4159.2006.04061.x. PubMed PMID: 16923163.

46. Denys A, Hichami A, Khan NA. Eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid modulate MAP kinase (ERK1/ERK2) signaling in human T cells. *J Lipid Res.* 2001;42(12):2015-20. Epub 2001/12/06. PubMed PMID: 11734574.
47. Denys A, Hichami A, Maume B, Khan NA. Docosahexaenoic acid modulates phorbol ester-induced activation of extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 in NIH/3T3 cells. *Lipids.* 2001;36(8):813-8. Epub 2001/10/11. PubMed PMID: 11592732.
48. Chauvin L, Goupille C, Blanc C, Pinault M, Domingo I, Guimaraes C, et al. Long chain n-3 polyunsaturated fatty acids increase the efficacy of docetaxel in mammary cancer cells by downregulating Akt and PKCepsilon/delta-induced ERK pathways. *Biochim Biophys Acta.* 2016;1861(4):380-90. Epub 2016/01/29. doi: 10.1016/j.bbaliip.2016.01.012. PubMed PMID: 26821209.
49. Wu MH, Tsai YT, Hua KT, Chang KC, Kuo ML, Lin MT. Eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid inhibit macrophage-induced gastric cancer cell migration by attenuating the expression of matrix metalloproteinase 10. *J Nutr Biochem.* 2012;23(11):1434-9. Epub 2012/01/31. doi: 10.1016/j.jnutbio.2011.09.004. PubMed PMID: 22285823.
50. Whyte C, Thies F, Peyrol L, Balcerzak D. N-3 long-chain polyunsaturated fatty acids inhibit smooth muscle cell migration by modulating urokinase plasminogen activator receptor through MEK/ERK-dependent and -independent mechanisms. *J Nutr Biochem.* 2012;23(11):1378-83. Epub 2012/01/10. doi: 10.1016/j.jnutbio.2011.08.005. PubMed PMID: 22221673.
51. Nagan N, Zoeller RA. Plasmalogens: biosynthesis and functions. *Prog Lipid Res.* 2001;40(3):199-229. PubMed PMID: 11275267.

Principaux résultats et conclusions

Le premier objectif de cette étude a été de déterminer si les cellules de Müller avaient la capacité à synthétiser les plasmalogènes. Par analyse de la composition lipidique des membranes des cellules de Müller par GC-FID nous avons observé des plus fortes teneurs en plasmalogènes dans ces cellules par rapport à la rétine entière, suggérant une concentration de ces lipides dans les cellules de Müller. Nous avons pu confirmer l'expression de la DHAP-AT, enzyme clef de synthèse des plasmalogènes, dans les cellules de Müller par marquage immunologique sur coupe de rétine de rat et sur culture primaire de cellules de Müller. Ces résultats ont été appuyés par western blot confirmant l'expression de la DHAP-AT dans les cellules de Müller.

A la vue des déficits oculaires similaires engendrés par l'inhibition des plasmalogènes dans les souris DAPAT (Rodemer, Thai et al. 2003) et l'inhibition de la libération des AGPI (Saab, Buteau et al. 2014), et comme les cellules de Müller produisent des plasmalogènes, nous avons voulu étudier l'effet d'une diminution du taux de plasmalogènes et d'une inhibition de la libération des AGPI sur le phénotype et les fonctions des cellules de Müller en culture primaire. Nous avons mis au point un système d'inhibition par transfection de siRNA dirigés contre l'ARNm de la DHAP-AT sur culture primaire de cellules de Müller issus de rat wistar. Cette transfection a engendré une diminution de plus de 50% du taux de plasmalogènes dans les cellules de Müller. L'inhibition des iPLA2 libérant les AGPI des plasmalogènes a été réalisée par traitement chimique au BEL.

La diminution de la teneur en plasmalogènes a entraîné une augmentation du ratio AGPI n-6/AGPI n-3 avec notamment une diminution des AGPI n-3 comme le DHA et l'un de ses précurseurs, l'acide docosapentaénoïque n-3 (C22:5 n-3). Au niveau fonctionnel, l'inhibition de la production de la DHAP-AT a pour conséquence une diminution de la capacité à migrer des cellules de Müller mais sans pour autant activer les cellules de Müller, l'expression de la GFAP n'ayant pas été modifiée. Au niveau des voies de signalisation intracellulaires MAPK, nous avons pu observer une activation par phosphorylation de la protéine ERK et donc une augmentation du ratio p-ERK/ERK et une diminution de l'expression de la protéine p38. Nous n'avons pas observé de modifications de la prolifération suite aux différents traitements ni de différence avec l'inhibition des iPA2 par traitement au BEL.

Des analyses complémentaires ont été réalisées sur des rétines de souris DAPAT. Au cours de l'étude du suivi du développement vasculaire des souris DAPAT, une surexpression des ARNm de la GFAP avait été détectée (Saab, Buteau et al. 2014). Ici, nous avons pu confirmer ces résultats en observant une augmentation de l'expression protéique de la GFAP dans les rétines de souris DAPAT par Western Blot (Figure 22). Ces résultats sont contradictoires avec ceux obtenus sur cellules de Müller en culture ayant subi une inhibition de la DHAP-AT. La principale différence entre les souris DAPAT et les cellules de Müller en culture est le pourcentage de diminution des teneurs en plasmalogènes. En effet, le traitement des cellules de Müller entraîne une diminution de près de 50 % des teneurs en plasmalogènes, alors que chez les souris DAPAT cette diminution est totale. Les teneurs en plasmalogènes ne sont peut-être pas assez faibles dans les cellules de Müller pour les activer complètement et qu'elles augmentent l'expression de

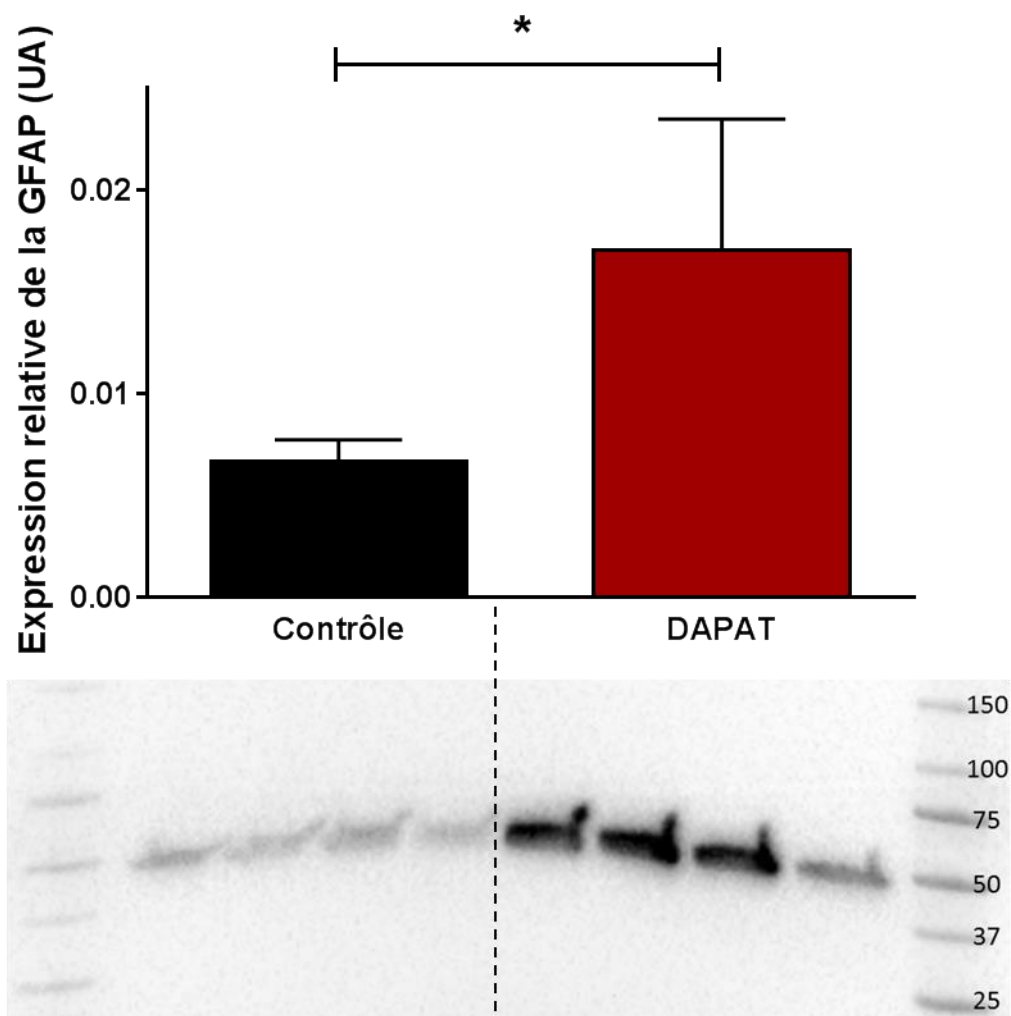


Figure 22 : Expression relative de la protéine GFAP dans la rétine de souris DAPAT

Analyse par western blot de l'expression de la protéine GFAP dans les rétines totales de souris contrôle ou DAPAT. L'intensité de l'expression de la GFAP est rapportée à l'intensité de l'expression protéique totale. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SD (n=4); test de Mann-Whitney, * = $p < 0,05$

la GFAP.

Nous avons par la suite réalisé un marquage immunohistochimique pour localiser l'expression de la GFAP. Dans les rétines de souris DAPAT, l'absence de plasmalogènes est associée à un profil de marquage conforme à une activation des cellules de Müller. En effet, les cellules de Müller semblent exprimer fortement la GFAP sur toute leur longueur (Figure 23).

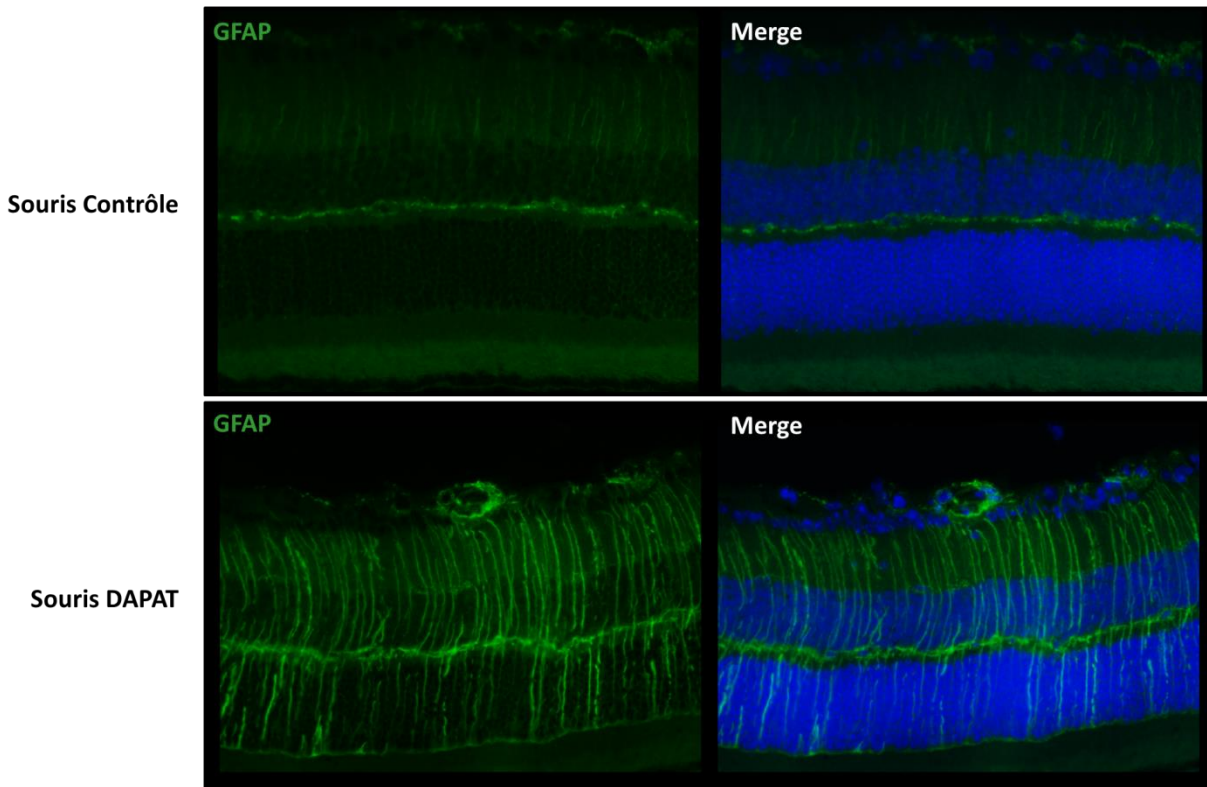


Figure 23 : Etat d'activation des cellules de Müller sur coupe de rétine de souris DAPAT

Photographies prises en microscopie à fluorescence sur des coupes de rétine de souris contrôlé ou déficiente en plasmalogènes (souris DAPAT). Coupes de 10 μm d'épaisseur marquées par l'anticorps anti-GFAP en vert et un intercalant de l'ADN, le DAPI en bleu. La GFAP exprimée sur toute la longueur des cellules de Müller des souris DAPAT montre une activation de ces cellules lors d'une déficience en plasmalogènes.

L'ensemble de ces résultats suggèrent donc un rôle crucial des plasmalogènes dans le métabolisme des cellules de Müller. Les plasmalogènes joueraient un rôle dans le maintien d'un bon ratio AGPI n-6/AGPI n-3, mais aussi dans les mécanismes d'activation et de migration des cellules de Müller impliquant les voies MAPK. Par la suite nous nous focaliserons sur l'impact que peuvent avoir ces modifications dans les cellules de Müller sur leurs capacités à communiquer avec les astrocytes.

***Chapitre 4 : Impact de la déficience
en plasmalogènes sur les cellules
gliales rétiniennes et leurs
capacités à communiquer par
ondes calciques***

Problématique

Au cours du développement vasculaire rétinien, les astrocytes forment une trame sur laquelle les cellules endothéliales migrent de manière passive pour former le réseau vasculaire primitif (Dorrell, Aguilar et al. 2002). De même que les cellules de Müller, les astrocytes participent à la mise en place et au maintien de la barrière hémato-rétinienne (Yao, Wang et al. 2014). Une stricte corrélation existe entre la présence d'astrocytes dans une rétine et la présence de vascularisation rétinienne. Dans la rétine, les astrocytes sont couplés et communiquent *via* les jonctions gap (Cornell-Bell and Finkbeiner 1991; Finkbeiner 1992), formant ainsi un syncytium fonctionnel. Ils peuvent également communiquer avec les cellules de Müller.

Chez les souris DAPAT, une absence de plasmalogènes entraîne différentes anomalies dont une malformation de la trame astrocytaire ainsi qu'une activation des astrocytes. Comme nous l'avons dit précédemment, les plasmalogènes sont synthétisés par les cellules de Müller et sont essentiels à leur métabolisme. Les cellules de Müller et les astrocytes sont liés par des jonctions gap (Newman and Zahs 1997) et peuvent communiquer par diffusion d'ondes calciques. En effet, les jonctions gap autorisent le passage de petites molécules inférieures à 1KDa, tels les ions calcium par exemple. Nous supposons donc que les défauts dans la vascularisation rétinienne observés au cours du développement chez les souris DAPAT pourraient trouver leur origine dans une communication entre les cellules gliales rétiniennes altérées.

L'objectif de cette étude a été de vérifier cette hypothèse en étudiant l'impact d'une modification du métabolisme des plasmalogènes sur la communication calcique entre les cellules de Müller et les astrocytes.

Dans un premier temps, nous avons développé un modèle de co-culture primaire de cellules de Müller et d'astrocytes. Puis, nous avons mis au point un système de stimulation d'une cellule unique avec de l'ATP pour pouvoir observer la genèse et la diffusion des ondes calciques à partir de la cellule de Müller stimulée vers les astrocytes voisins. Les cellules de Müller ont été traitées par siRNA dirigés contre la DHAP-AT dans le but de diminuer les teneurs en plasmalogènes.

Les résultats de cette étude sont présentés sous la forme d'un article qui sera soumis au journal *Experimental Eye Research*.

Alteration of plasmalogen biosynthesis in Müller affects connexin 43 expression and calcium wave propagation in neighboring astrocytes

Mazzocco Julie ^a, Laurent Leclere ^a, Bénédicte Buteau ^a, Stéphane Grégoire ^a, Claire Fenech ^a, Alain M Bron ^{a,b}, Catherine P Creuzot-Garcher ^{a,b}, Corrine Leloup ^a, Lionel Bretilon ^a, Xavier Fioramonti ^a, and Niyazi Acar ^a

^a Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation, CNRS, INRA, Univ. Bourgogne Franche-Comté, F-21000 Dijon, France

^b Department of Ophthalmology, University Hospital, F-21000 Dijon, France

Corresponding author:

Niyazi Acar, PhD

UMR CSGA

Eye and Nutrition Research Group

UMR CSGA

17, rue Sully, BP86510

21065 Dijon Cedex, France

Fax +33-(0)3.80.69.32.23

Tel. +33-(0)3.80.69.32.69

Email: niyazi.acar@inra.fr

Abstract

Astrocytes and Müller cells are the two principal macroglial cells of the retina. Astrocytes are essential for the proper development of retinal vascularization. Müller cells are key actors of retinal lipid metabolism. These cells are able to synthesize plasmalogens, a particular class of glycerophospholipids present in high quantity in the retina. Müller cells and astrocytes are coupled by gap junctions to form a functional syncytium. Gap junctions are organized collections of protein channels in cell membranes that allow ions, like calcium, and small molecules to pass between adjacent cells. In this study we investigated whether diminution of plasmalogen content can influence calcium communication between retinal glial cells.

To study calcium communication from Müller cells to astrocytes, we performed two groups of co-culture of both glial cells. In the control group (Ctrl), Müller cells were transfected with a control siRNA, while in the treated group (siRNA), they were transfected with siRNAs directed against dihydroxyacetonephosphate-acyltransferase (DHAP-AT), the key enzyme of plasmalogen synthesis, to decrease plasmalogen content of these cells. To study the initiation of the signal in Müller cells and its diffusion to astrocytes in the co-cultured glial cells, a single Müller cell was stimulated with ATP. Calcium waves propagating between cells were observed by FURA 2-AM calcium dye.

The diminution of plasmalogen levels in Müller cells led to a decrease of connexin 43 expression, the principal gap junction protein in retinal glial cells. Moreover, lowering plasmalogen levels in Müller cells decreased the velocity of calcium wave propagation.

Taken together, our results suggest an importance of plasmalogens in glial cells communication.

Keyword

Retinal Müller cells, astrocytes, calcium, cell-cell communication, connexin 43

Abbreviations

Cx43: connexin 43, DHAP-AT: Dihydroxyacetone phosphate acyltransferase

Introduction

In the retina, two types of macroglial cells can be distinguished: astrocytes and Müller cells. Astrocytes form a two-dimensional glial syncytium at the inner surface of the retina. They originate from the brain and migrate into the eye through the optic nerve head during retinal development (Ling and Stone 1988; Ling, Mitrofanis et al. 1989). There is a strict correlation between the presence of astrocytes and blood vessels in the retina. Indeed, astrocytes are only present in vascular retina. In partially vascularized retinas, they are located only in vascularized areas (Stone and Dreher 1987). Astrocytes play important functions in retinal vascular development and in blood retinal barrier function. During development, the superficial vascular network of the retina is formed according to a preexisting astrocytic template. Retinal astrocytes express R-cadherin cell adhesion molecules as guidance cues for endothelial cells (Dorrell, Aguilar et al. 2002). β A3/A1-crystallin is also a key protein in the regulation of retinal vessel formation during development (Sinha, Klise et al. 2008; Sinha, Valapala et al. 2012). β A3/A1-crystallin is a protein that was primarily identified in the lens protein. In the retina, it is almost exclusively expressed in astrocytes. It was shown that defects in β A3/A1-crystallin expression in retinal astrocytes affect their initial patterning in order to form the vascular template, and has then consequences on the architecture of mature vessels.

Astrocytes are able to communicate with neighbouring cells by the way of intercellular calcium waves that propagate through gap junctions (Cornell-Bell and Finkbeiner 1991; Finkbeiner 1992). Gap junctions constitute channels between cells that allow direct intercellular communication. These channels consist of two hemichannels composed of six connexin subunit proteins. Connexin 43 (Cx43) is the major connexin found in gap junctions of retinal glial cells, including astrocytes

(Dermietzel, Hertberg et al. 1991). Gap junction channels allow the passive diffusion of molecules of up to 1 kDa such as ions (Evans and Martin 2002). Intercellular calcium waves are under the control of the internal messenger inositol trisphosphate (IP3) (Sanderson, Charles et al. 1994). Several studies have shown that intercellular calcium waves are propagated not only *via* gap junctions but also via the release of an extracellular messenger (Sanderson, Charles et al. 1994; Charles 1998; Scemes, Dermietzel et al. 1998). In the retina, astrocytes are coupled by gap junction to other astrocytes, to endothelial cells but also to Müller cells (Newman and Zahs 1997; Zahs, Kofuji et al. 2003). The major connexin in gap junctions located between Müller cells and astrocytes is Cx43 (Sohl, Guldenagel et al. 2000). According to a series of studies from the Newman group, calcium waves are propagated in the retina through astrocytes by diffusion of IP3, whereas waves are propagated from astrocyte to Müller cells and between Müller cells principally through the release of ATP (Newman 2001). Calcium waves can also propagated from Müller cell to astrocytes after Müller cell stimulation but less frequently (Newman 2001).

Müller cells are the major macroglial cells in the retina and play crucial functions in retinal homeostasis. While Müller cells motility or proliferation is limited in healthy retina, Müller cells can be activated during retinal gliosis under pathologic conditions (Bringmann, Pannicke et al. 2006). Müller cells are key actors of lipid metabolism within the retina. We have recently shown that Müller cells are able to synthesize plasmalogens, that are particular glycerophospholipids, and that a decrease of plasmalogen content in Müller cells affects their ability to be activated and to migrate (Mazzocco et al. 2016). In a mouse model of plasmalogen deficiency (DAPAT mouse), we have also shown that plasmalogens are key elements regulating retinal vascular development. Plasmalogen may act on early astrocyte template

formation and in vascular remodeling during retinal development (Saab, Buteau et al. 2014). These data suggest that astrocyte metabolism may be affected by plasmalogen deficiency.

Since reducing plasmalogen concentrations affects Müller cell metabolism and as retinal Müller cells are able to communicate with neighboring astrocytes, we wanted to investigate whether the inhibition of plasmalogen biosynthesis in Müller cells would affect calcium signaling with astrocytes. By treating Müller cells in primary cultures with siRNA against DHAP-AT, the key enzyme of plasmalogen biosynthesis, we have evaluated the integrity of Cx43-rich gap junctions and the integrity of calcium waves initiation and propagation to astrocytes in co-culture.

Materials and methods

Animals

Experiments on animals were performed in accordance with the Association for Research in Vision Ophthalmology (ARVO) statement for the use of animals in ophthalmic and vision research and with French legislation (personal authorization number 21CAE086 for N.A. and animal quarters agreement number A21231010 EA), after approval by ethics committees (#105 *Comité d’Ethique de l’Expérimentation Animale Grand Campus Dijon*) and by the French Ministry of Higher Education and Research (reference number 02271.1).

Primary cultures of retinal glial cell

Primary culture of retinal Müller cells

Primary Müller cells were prepared from rat retinas as described previously by Hicks and Courtois with slight modifications (Hicks and Courtois, 1990). Nine- to 12-day-old were obtained from a Wistar rat colony established in animal quarters of the laboratory (Centre des Sciences du Goût et de l’Alimentation, Dijon, France). Animals were killed by decapitation. Eyes were isolated and placed in Dulbecco’s Modified Eagles Medium (DMEM, P04-04510, Pan biotech, Aidenbach, Germany) with 10 % of fetal calf serum (FCS) for overnight at room temperature in the dark. Eyeballs were then digested in DMEM containing 0.1 % Trypsin-EDTA 10X (T4174, Sigma-Aldrich, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and 70 U/mL collagenase (C5138, Sigma-Aldrich) at 37 °C for 45 min. Eyeballs were then placed in DMEM 10 % FCS, corneas were incised, lenses and vitreous bodies taken out, and retinas were gently isolated. Retinas were dissociated into small pieces and placed into a Petri dish containing

DMEM with 4.5 g/L of glucose, 10 % of FCS and 10 μ L/mL of penicillin (10000 U/mL) streptomycin (10 mg/mL) (P06-07100, Pan Biotech). Medium was not changed during the first 2 days and then progressively substituted by DMEM with 1 g/L of glucose. Cell at 80 % of confluence were reseeded on different material depending on their final use. They were used at second generation.

Primary culture of cerebral cortex astrocytes

Primary astrocytes were prepared from rat cerebral cortex. Twenty one days old pups were obtained from a Wistar rat colony established in animal quarters. Anesthesia was performed via an intraperitoneal injection of pentobarbital (54.7 mg/kg, Ceva, Libourne, France). Animals were perfused through left ventricle with a cold PBS solution. The brain was removed and the cortex was isolated in a Petri dish. Cerebral cells were dissociated by three successive trituration and sedimentation steps in DMEM F12, with pipette. The dissociated cells were plated onto a 75 cm² poly-L-lysine coated culture flask and maintained in culture medium (DMEM F12 + 10 % FCS) in an incubator at 37 °C with 5 % CO₂ and 95 % humidity. The media was changed every 3-4 days. At 80 % of confluence, the flask was shaken overnight at 250 rotations per minute (rpm) to remove contaminating non-astroglial cells.

Co-culture of astrocytes and Müller cells

At second generation, Müller cells and astrocytes were seeded on poly-L-lysine coated glass coverslips (18 mm in diameter). Müller cells were seeded one day before astrocytes to allow the transfection with siRNAs. Cells were co-cultured together during 4 days in DMEM F12 + 10 % FBS medium.

Inhibition of DHAP-AT by small interfering RNA (siRNA) transfection

Silencer® Select siRNAs were used to knockdown DHAP-AT gene expression. siGNAPT (siRNA ID s136618 sense 5'-CAUCGUUCUCAAUUCUGAAAtt-3', antisense 5'-UUCAGAAUUGAGAACGAUGga-3', and siRNA ID s136619 sense 5'-GGAUGUCCUUCAGUUGCUUUtt-3', antisense 5'-AAGCAACUGAAGACAUCctc-3') and the non-targeting controls (siCtrl) were purchased from Ambion (references 4390771 and 4404020, ThermoFisher scientific, Waltham, MA, USA). The siRNA transfection of Müller cells was performed using Lipofectamine® RNAiMAX transfection reagent (13778150, ThermoFisher scientific) in OPTIMEM medium (31985070, ThermoFisher scientific) overnight at 37 °C in a humidified 5 %-CO₂ atmosphere according to manufacturer's instructions. Then medium was replaced by DMEM supplemented with 10 % FCS. Cells were submitted to a double 8h-transfection following their first and second passages. This protocol allows a 60 %-diminution of cell content in plasmalogens (Mazzocco et al. submitted). Transfected cells were isolated for experiments 5 days after the second transfection.

Determination of plasmalogen content of astrocytes

To evaluate the cell levels of plasmalogens, we determined the amounts of dimethylacetals (DMAs) –formed from the transmethylation of aldehyde aliphatic groups in the sn-1 position of plasmalogen– by gas chromatography coupled with flame ionization detection (GC-FID).

Lipid extraction from samples

Total lipids from astrocytes and Müller cells were extracted according to the method of Folch and collaborators by using a mixture of chloroform/methanol (2:1, v:v)(Folch, Lees et al. 1957). Lipid extracts were stored at -20 °C under inert gas until further analyses.

Gas chromatographic analyses

Total lipids were transmethylated using boron trifluoride in methanol according to Morrison and Smith (Morrison and Smith, 1964). 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 DMAs 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 m x 0.25 mm i.d., film thickness 0.20 µm; 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 DMAs 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 FAMES and DMAs. Plasmalogen levels were calculated as 2 × (% of total DMAs) as previously described (Acar, Gregoire et al. 2007).

Protein expression analysis

Extraction and quantification of total proteins

Proteins were extracted from astrocytes and Müller cells in a modified RIPA lysis buffer (25 mM Tris-HCL pH 7.5, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 0.1 % SDS, 1 % sodium deoxycholate, 1 % NP40, 150 mM NaCl) with extemporaneous addition of a phosphatase inhibitor (reference 04906837001, Roche, Sigma-Aldrich) and protease inhibitor (reference 05892970001, Roche, Sigma-Aldrich) cocktails. After 10 min of

centrifugation at 10000 × g, the supernatant containing proteins was isolated. Protein content was measured by using the Pierce BCA Protein Assay Kit (23252, Pierce® Microplate BCA Protein Assay Kit, Life technologies, ThermoFisher scientific) at 562 nm by a multilabel plate reader (Victor 3V, PerkinElmer). Dilutions of known concentrations of BSA were prepared and used to determine a standard curve.

Western-blotting

Twenty-five micrograms of protein extracts were boiled for 10 min in a 4X Laemmli buffer (40 % Glycerol, 240 mM Tris/HCl pH 6.8, 8 % SDS, 0.04 % bromophenol blue, 5 % beta-mercaptoethanol) and then separated by electrophoresis (Mini-PROTEAN® Tetra System, Bio RAD, Hercules, CA, USA) on a 4-15 % SDS-PAGE gel (reference 456-8064, Bio RAD) at 120 V. Then proteins were transferred with a Trans-Blot® Turbo™ Transfer System to a polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (reference 1704156, Bio-Rad). Membranes were blocked for 1 hour at room temperature in a 5 % fat-free dry milk TBS solution and then incubated overnight with the primary antibody at 4 °C. The primary antibodies used were: 1:1000 Actin (reference sc1616, SantaCruz), 1:1000 Cx43 (reference 610062, BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA). Membranes were then rinsed in a mixture of Tris-Buffered Saline (50 mM Tris, 150 mM NaCl) and Tween 20 (0.01 %) TBS-T and incubated with HRP-conjugated secondary antibodies (reference P0047, P0449, P0448, Dako, Glostrup, Denmark) for 1 h at room temperature. Blots were visualized by chemiluminescence using a charge-coupled device (CCD) camera (ChemiDoc, Bio RAD) which captures a digital image of the light produced by ECL reagents (reference NEL 105001EA, Perkin Elmer).

Calcium imaging on co-cultures of Müller cells and astrocytes

Calcium imaging

Astrocytes and Müller cells co-cultures were loaded for 30 minutes at 37°C under gently rocking with 2.5 μ M of Fura-2acetoxymethyl ester (Fura-2AM, Molecular Probes) in HANKS solution (135 mM NaCl, 5 mM KCl, 1.3 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 10 mM HEPES) containing 2.5 mM of D-glucose supplemented with 0.002 % pluronic acid. After the incubation step, glass plates covered by cells were mounted in a thermostatically regulated microscope chamber on an inverted Olympus microscope (IX 70, Olympus Corporation, Tokyo, Japan) and visualized with a 20X objective. Intercellular calcium releases were induced by the application of ATP at the final concentration of 50 μ M onto a Müller cell with an 8.4 mm glass micropipette. Two 100 msec pulses at 10 psi were delivered with a pneumatic PicoPump (PV830, World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA). A real-time movie of intercellular calcium waves in stimulated Müller cell and neighboring astrocytes following ATP stimulation was recorded at 2 Hz for 4 min by alternating excitations at 340 nm and 380 nm (emission spectrum: 420-600 nm). Images were recorded using a cooled charge-coupled device (CCD) camera with the Live Acquisition software (TiLL Photonics, Pittsfield, MA, USA). The 340/380 nm fluorescence ratio that is representative of the cell calcium concentration, was calculated after correction for background fluorescence values. A basal recording was performed for 2 min before stimulation.

Quantitative analysis of calcium waves

Each cell was considered as an individual region of interest (ROI). For each ROI, we obtained a curve, representing the 340/380 nm fluorescence ratio. Since the fluorescence intensity of Fluo-4 AM was proportional to calcium concentrations, changes in cytosolic calcium concentrations were inferred from the fluorescence profile of individual cells. The mask of each ROI was imported in ImageJ software

(National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <https://imagej.nih.gov/ij/>) to measure the distance between the stimulated Müller cell and its neighboring astrocytes. For the stimulated Müller and their neighboring astrocytes, values of 90 % of the intensity maximum and the time to reach them were calculated. The velocity of astrocytes response was calculated and expressed in $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$. The change in fluorescence intensity was normalized to the level of baseline fluorescence was used to calculate the intensity of calcium changes within cells.

Statistical analyses

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism v6.05 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Comparison between groups was performed by the non-parametric Kruskal-Wallis test with Dunn's multiple comparisons test for comparison of three groups and by non-parametric Mann-Whitney test for comparison of two groups. A p value lower than 0.05 was considered as statistically significant and noted by one star. Two and three stars were used for p values lower than 0.01 and 0.001, respectively.

Results

ATP initiates calcium waves in Müller cells and astrocytes

Astrocytes (empty arrows) and Müller cells (full arrow) were identified by their morphology, Müller cells were larger and displayed a trapezoid form when compared to astrocytes (**Fig 1A**). They both incorporated the FURA2-AM dye (**Fig 1B**). The addition of ATP in HANKS medium resulted in an increase of calcium concentration in all Müller cells (**Fig 2A**). The stimulation of one Müller cell (arrow) by the ejection of HANKS solution without ATP did not increase cytoplasmic calcium concentration (**Fig 2B**) whereas it resulted in an increase of calcium levels in a single astrocyte that was followed by the propagation of calcium waves in the neighboring astrocytic network (**Fig 2C**). These data suggest a specific sensitivity of astrocytes to mechanical stimulation.

Fatty acids composition of astrocytes and Müller cells in response or not to the decrease of their plasmalogen content.

The fatty acid contents of control Müller cells, Müller cells transfected by siRNA directed against DHAP-AT and astrocytes were compared (**Fig 3**). Significantly higher levels of monounsaturated fatty acids (MUFA) and lower levels of polyunsaturated fatty acids (PUFA) were observed in astrocytes when compared to control Müller cells (**Fig 3**). Plasmalogen content was similar between astrocytes and Müller cells but was significantly decreased in Müller cells transfected by siRNA directed against DHAP-AT (-60 %, $P < 0.05$). The n-6 /n-3 ratio was similar in the three groups. Astrocytes had lower levels of the n-6 PUFAs linoleic acid (LA) and arachidonic acid (AA) and lower levels of the n-3 PUFA docosahexaenoic acid (DHA) than Müller cells as well as higher levels in alpha-linolenic acid (ALA). DHA levels

were decreased in Müller cells treated with siRNA when compared to those treated with siCtrl.

Stimulation of one Müller cell with ATP initiates calcium waves propagating in neighboring astrocytes.

After 120 sec of baseline recording, the stimulation of a single Müller cell by ejection of ATP at 50 μ M increases the intracellular calcium levels of the stimulated cell and then that of neighboring astrocytes. This increase of calcium concentration can spread out of the site of stimulation to neighboring cells as a wave (**Fig 4A**). For each cell, a curve representing the kinetics of calcium concentration was recorded (**Fig 4B**). The increase in calcium concentration was first observed in stimulated Müller cell (red line) and then in neighboring astrocytes.

Diminution of plasmalogen content in Müller cells leads to a decreased expression of connexin 43.

Astrocytes and Müller cells express Cx43 in gap junctions. A 50 %-decrease of plasmalogen content in Müller cells leads to a significant decrease in the expression of connexin 43 (-67 %, $P < 0.05$) (**Fig 5**).

Diminution of plasmalogen content in Müller cells does not alter their ability to respond to ATP stimulation.

The stimulation of one single Müller cell by 50 μ M of ATP led to an increase of intracellular calcium concentration. The time to reach maximal calcium concentration was the same for control Müller cells and Müller cells treated by siRNA directed against DHAP-AT (**Fig 6A**). Similarly, the maximal intracellular calcium

concentrations were identical in both groups (**Fig 6B**). Plasmalogen decrease did not affect Müller cell calcium response to ATP stimulation.

The diminution of plasmalogen content in Müller cells alters the speed of diffusion of calcium waves to neighboring astrocytes as well as the level of stimulation.

In order to study the involvement of plasmalogen metabolism in cell-cell communication between astrocytes and Müller cells, the plasmalogen content was decreased in Müller cells before Müller cells and naïve astrocytes were co-cultured. The time to reach 90 % of the maximum intensity was significantly increased for astrocytes from siRNA group when compared to the Ctrl group (**Fig 7A**). Similarly, the velocity of calcium waves in siRNA group was significantly lower than that of the Ctrl group (**Fig 7B**). The increase of calcium concentration was significantly higher in astrocytes of siRNA group than in astrocytes of ctrl group (**Fig 7C**).

Discussion

Astrocytes are involved in the development of retinal vascularization (Dorrell, Aguilar et al. 2002). In conditions of plasmalogen deficiency, as seen in DAPAT mice, the astrocyte template is defective and consequently, retinal vascularization is abnormal (Rodemer, Thai et al. 2003; Saab, Buteau et al. 2014). In the retina, plasmalogens are produced by Müller cells and are essential for their physiology (Mazzocco et al. submitted). Müller cells and astrocytes are coupled by gap junctions. Gap junctions are composed of two hemichannels, forming a channel that directly communicates with the cytoplasm of neighboring cells. Hemichannels are composed of six transmembrane proteins, called connexins (Sohl, Guldenagel et al. 2000). Connexin 43 is the major connexin found in gap junctions of retinal glial cells (Dermietzel, Hertberg et al. 1991; Johansson, Bruun et al. 1999). The aim of our study was to determine the impact of the reduction of plasmalogen levels on calcium communication between astrocytes and Müller cells.

First of all, we have compared fatty acids composition of three cell groups: Müller cells with decreased plasmalogen levels, Müller cells control and astrocytes. Diminution of plasmalogen content in Müller cells leads to a significant decrease in the concentration of DHA suggesting that in Müller cells, plasmalogens are essential to maintaining high levels of n-3 PUFA. These data confirm previous observations showing high levels of PUFAs on plasmalogens when compared to their diacyl counterparts (Blank, Wykle et al. 1973; Sugiura, Soga et al. 1983; Gaposchkin and Zoeller 1999; Moukarzel, Dyer et al. 2016). Plasmalogen levels in astrocytes are the same as in control Müller cells, but with lower levels of DHA. These data suggest a less important role of plasmalogens in maintaining high levels of PUFA in astrocytes when compared to in Müller cells. Indeed, in astrocytes total PUFAs levels are

significantly lower than in Müller cells and total MUFA levels are significantly higher. In the retina, Müller cells may be more able than astrocytes to contribute to metabolism of fatty acids.

Although, an electrical and molecular coupling exists between glial cells in the retina (Robinson, Hampson et al. 1993; Ceelen, Lockridge et al. 2001), some studies suggested that calcium communication was unidirectional from astrocytes to Müller cells (Newman and Zahs 1997; Zahs and Newman 1997). However, touching Müller cells with a pipette or introducing the pipette into Müller might induced the closure of gap junctions as suggested by Trexler et al. (Trexler, Li et al. 2001). The asymmetrical coupling observed between astrocytes and Müller cells could be due to a closure of the gap junctions in Müller cells. In our study, the ejection of ATP was close to Müller cell without touching it, in order to avoid any parasitic reaction. Moreover, the ejection was oriented in the opposite direction of the perfusion flow, suggesting that the increase in calcium concentration initiated in Müller cells and propagating to astrocytes is not an artefact. To our knowledge, our study was the first to monitor calcium communication between retinal glial cells in co-culture. We observed that stimulation of a single Müller cell by ejection of ATP is able to increase intracellular calcium in the stimulated cell. This intracellular increase of calcium concentration generates propagating calcium waves into neighboring astrocytes. Ejection of neutral solution (HANKS) did not increase of calcium concentration in Müller cells while this solution could induce an augmentation of calcium concentration in astrocytes, suggesting that these cells are more sensitive to mechanical stimulation than Müller cells. To study the communication between Müller cells and astrocytes by calcium propagation, we performed a co-culture of Müller cells and astrocytes. Unlike some studies on whole mounted retina (Zahs and Newman 1997),

we observed a transmission of calcium waves from Müller cells to neighboring astrocytes, when a single Müller cell was stimulated. One hypothesis can be flat-mounted retinas are not prone to the observation of calcium waves from Müller cells to astrocytes. Indeed, the stimulation site of Müller cells in this conformation might not be optimal to induce an increase in the calcium concentration and a further propagation to neighboring cells. Indeed, Müller cells express different subtypes of ion channels and have different systems for neurotransmitter uptake and exchange systems that are heterogeneously distributed along their plasma membrane (Bringmann, Pannicke et al. 2006; Reichenbach and Bringmann 2013). Furthermore, Müller cells express at least four different P2Y receptor subtypes for ATP only in distinct regions (Fries, Goczalik et al. 2005). This heterogeneously distribution may be explained by the adaptation of Müller cells to the surrounding retinal layers (Reichenbach, Schneider et al. 1989). The stimulation of Müller cells at their end-foot, as done on flat-mounted retinas, might not be optimal to increase calcium levels in these cells.

In co-cultured glial cell, when plasmalogen levels was decreased in Müller cells we observed a higher delay to reach 90 % of the maximum calcium concentration in neighboring astrocytes. Moreover, the velocity of calcium wave propagation was lower in the siRNA group than in the control group. Similar to what was observed in the cortex of DAPAT mice (Rodemer, Thai et al. 2003); we observed a decrease in the expression of Cx43 in Müller cells undergoing a diminution in their plasmalogen content. Cx43 is the major connexin found in gap junctions of retinal glial cells, so a decrease in their expression may lead to a reduced number of gap junctions, and to a subsequent altered ability of these cells to communicate with the neighboring astrocytes. Moreover, decrease of plasmalogen levels in Müller cells lead to a

diminution of DHA content. Such a diminution was associated to the activation of ERK1/2 MAPK (Mazzocco et al. submitted). Previous studies have shown that DHA can regulate expression of Cx43 (Dlugosova, Okruhlicova et al. 2009). Indeed, a dietary supplementation with EPA and DHA in hypertensive rats induces a decrease of blood pressure due to increased Cx43 expression in media and endothelium of aorta (Dlugosova, Okruhlicova et al. 2009). Moreover, it was shown that the activation of ERK1/2 can close Cx43 hemichannels (Riquelme, Burra et al. 2015). Plasmalogens could influence calcium communication between retinal glial cells through decrease of DHA and activation of ERK1/2, influencing expression and conformation of Cx43, principal component of gap junctions. We have observed an increase in the intensity of the calcium response of astrocytes in the siRNA group. This increase might be a response of astrocytes to the slow signal coming from Müller cells. This reaction might be a way for astrocytes to transmit the signal from Müller cells to other astrocytes even if the communication coming from Müller cells is weak. Taking together, these data suggest that the reduction of plasmalogen content in Müller cells affect the communication between glial cells that is associated to a reduction of DHA concentrations. It would be interesting to repeat the experiments on co-cultures of astrocytes and Müller cells both transfected by siRNA directed against DHAP-AT in order to place the experiments in conditions resembling of these observed in DAPAT mice.

In summary, our study suggests a crucial role for plasmalogens in calcium communication between retinal glial cells. An alteration in the formation of the retinal vessels induced by a decrease in the retinal levels of plasmalogen, as observed in DAPAT mice, can find its origins in the altered communication between glial cells during retinal vascular development. This change in the glial communication might be

the cause of the defects observed in astrocytic template formation, guiding to the formation of the vessels. Further studies are needed to confirm this hypothesis.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge Elise Lalarme and Laurence Decocq (from the animal facility of Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation, Dijon, France) for their assistance in animal handling and David Jarriault, Fabienne Liénard and Chloé Chrétien (Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation, Dijon, France) for their assistance in calcium imaging experiments.

Funding

A PhD fellowship to Julie Mazzocco was funded by a grant from the French National Institute for Agricultural Research (INRA, France) and the Regional Council of Burgundy (France). This work was supported by a French Government grant managed by the French National Research Agency (ANR) under the program "Investissements d'Avenir" with reference ANR-11-LABEX-0021, and by grants from the Regional Council of Burgundy (France), and the FEDER (European Funding for Regional Economic Development). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript

References

- Acar, N., S. Gregoire, et al. (2007). "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* 84(1): 143-151.
- Blank, M. L., R. L. Wykle, et al. (1973). "The retention of arachidonic acid in ethanolamine plasmalogens of rat testes during essential fatty acid deficiency." *Biochim Biophys Acta* 316(1): 28-34.
- Bringmann, A., T. Pannicke, et al. (2006). "Muller cells in the healthy and diseased retina." *Prog Retin Eye Res* 25(4): 397-424.
- Ceelen, P. W., A. Lockridge, et al. (2001). "Electrical coupling between glial cells in the rat retina." *Glia* 35(1): 1-13.
- Charles, A. (1998). "Intercellular calcium waves in glia." *Glia* 24(1): 39-49.
- Cornell-Bell, A. H. and S. M. Finkbeiner (1991). "Ca²⁺ waves in astrocytes." *Cell Calcium* 12(2-3): 185-204.
- Dermietzel, R., E. L. Hertberg, et al. (1991). "Gap junctions between cultured astrocytes: immunocytochemical, molecular, and electrophysiological analysis." *J Neurosci* 11(5): 1421-1432.
- Dlugosova, K., L. Okruhlicova, et al. (2009). "Modulation of connexin-43 by omega-3 fatty acids in the aorta of old spontaneously hypertensive rats." *J Physiol Pharmacol* 60(3): 63-69.
- Dorrell, M. I., E. Aguilar, et al. (2002). "Retinal vascular development is mediated by endothelial filopodia, a preexisting astrocytic template and specific R-cadherin adhesion." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43(11): 3500-3510.
- Evans, W. H. and P. E. Martin (2002). "Gap junctions: structure and function (Review)." *Mol Membr Biol* 19(2): 121-136.
- Finkbeiner, S. (1992). "Calcium waves in astrocytes-filling in the gaps." *Neuron* 8(6): 1101-1108.
- 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.
- Fries, J. E., I. M. Goczalik, et al. (2005). "Identification of P2Y receptor subtypes in human muller glial cells by physiology, single cell RT-PCR, and immunohistochemistry." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46(8): 3000-3007.
- Gaposchkin, D. P. and R. A. Zoeller (1999). "Plasmalogen status influences docosahexaenoic acid levels in a macrophage cell line. Insights using ether lipid-deficient variants." *J Lipid Res* 40(3): 495-503.
- Johansson, K., A. Bruun, et al. (1999). "Gap junction protein connexin43 is heterogeneously expressed among glial cells in the adult rabbit retina." *J Comp Neurol* 407(3): 395-403.
- Ling, T. L., J. Mitrofanis, et al. (1989). "Origin of retinal astrocytes in the rat: evidence of migration from the optic nerve." *J Comp Neurol* 286(3): 345-352.
- Ling, T. L. and J. Stone (1988). "The development of astrocytes in the cat retina: evidence of migration from the optic nerve." *Brain Res Dev Brain Res* 44(1): 73-85.
- Moukarzel, S., R. A. Dyer, et al. (2016). "Human Milk Plasmalogens Are Highly Enriched in Long-Chain PUFAs." *J Nutr* 146(11): 2412-2417.
- Newman, E. A. (2001). "Propagation of intercellular calcium waves in retinal astrocytes and Muller cells." *J Neurosci* 21(7): 2215-2223.
- Newman, E. A. and K. R. Zahs (1997). "Calcium waves in retinal glial cells." *Science* 275(5301): 844-847.
- Reichenbach, A. and A. Bringmann (2013). "New functions of Muller cells." *Glia* 61(5): 651-678.

- Reichenbach, A., H. Schneider, et al. (1989). "The structure of rabbit retinal Muller (glial) cells is adapted to the surrounding retinal layers." *Anat Embryol (Berl)* 180(1): 71-79.
- Riquelme, M. A., S. Burra, et al. (2015). "Mitogen-activated Protein Kinase (MAPK) Activated by Prostaglandin E2 Phosphorylates Connexin 43 and Closes Osteocytic Hemichannels in Response to Continuous Flow Shear Stress." *J Biol Chem* 290(47): 28321-28328.
- Robinson, S. R., E. C. Hampson, et al. (1993). "Unidirectional coupling of gap junctions between neuroglia." *Science* 262(5136): 1072-1074.
- Rodemer, C., T. P. Thai, et al. (2003). "Inactivation of ether lipid biosynthesis causes male infertility, defects in eye development and optic nerve hypoplasia in mice." *Hum Mol Genet* 12(15): 1881-1895.
- Saab, S., B. Buteau, et al. (2014). "Involvement of plasmalogens in post-natal retinal vascular development." *PLoS One* 9(6): e101076.
- Sanderson, M. J., A. C. Charles, et al. (1994). "Mechanisms and function of intercellular calcium signaling." *Mol Cell Endocrinol* 98(2): 173-187.
- Scemes, E., R. Dermietzel, et al. (1998). "Calcium waves between astrocytes from Cx43 knockout mice." *Glia* 24(1): 65-73.
- Sinha, D., A. Klise, et al. (2008). "betaA3/A1-crystallin in astroglial cells regulates retinal vascular remodeling during development." *Mol Cell Neurosci* 37(1): 85-95.
- Sinha, D., M. Valapala, et al. (2012). "betaA3/A1-crystallin is required for proper astrocyte template formation and vascular remodeling in the retina." *Transgenic Res* 21(5): 1033-1042.
- Sohl, G., M. Guldenagel, et al. (2000). "Connexin expression in the retina." *Brain Res Brain Res Rev* 32(1): 138-145.
- Stone, J. and Z. Dreher (1987). "Relationship between astrocytes, ganglion cells and vasculature of the retina." *J Comp Neurol* 255(1): 35-49.
- Sugiura, T., N. Soga, et al. (1983, Nov). "Occurrence of alkyl ether phospholipids in rabbit platelets: compositions and fatty chain profiles." *J Biochem* 1983/11/01. Retrieved 5, 94, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6654882>.
- Trexler, E. B., W. Li, et al. (2001). "Coupling from All amacrine cells to ON cone bipolar cells is bidirectional." *J Comp Neurol* 437(4): 408-422.
- Zahs, K. R., P. Kofuji, et al. (2003). "Connexin immunoreactivity in glial cells of the rat retina." *J Comp Neurol* 455(4): 531-546.
- Zahs, K. R. and E. A. Newman (1997). "Asymmetric gap junctional coupling between glial cells in the rat retina." *Glia* 20(1): 10-22.

Figure captions

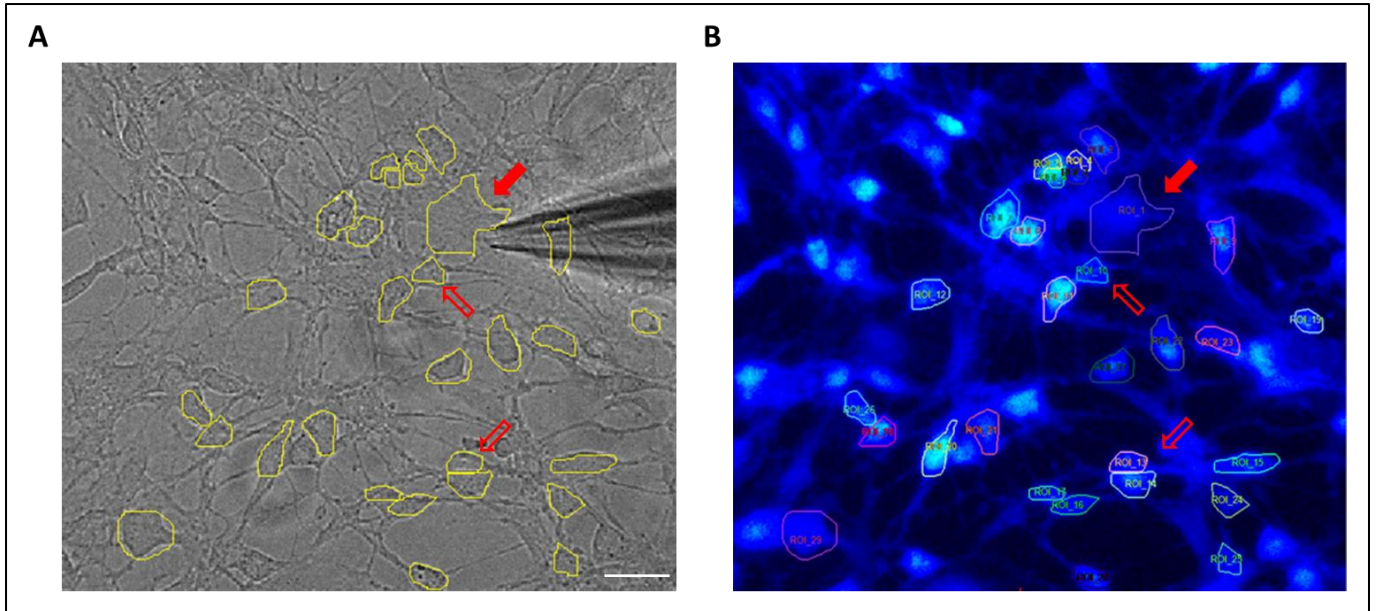


Figure 1: Glial cells could be differentiated morphologically and incorporate the FURA 2-AM dye. **A.** Representative bright-field microscopy image of co-culture Müller cells (empty arrow) and astrocytes (full arrows) in white light. Müller cells are larger than astrocytes and display a polyhedron shape. Yellow lines represent regions of interest (ROI), corresponding to the cells studied. **B.** Representative fluorescence microscopy picture showing incorporation of FURA 2-AM at 340 nm. Incorporation of FURA 2-AM was visualized by the blue color of the cells compared to the black background. Scale bar: 50 nm.

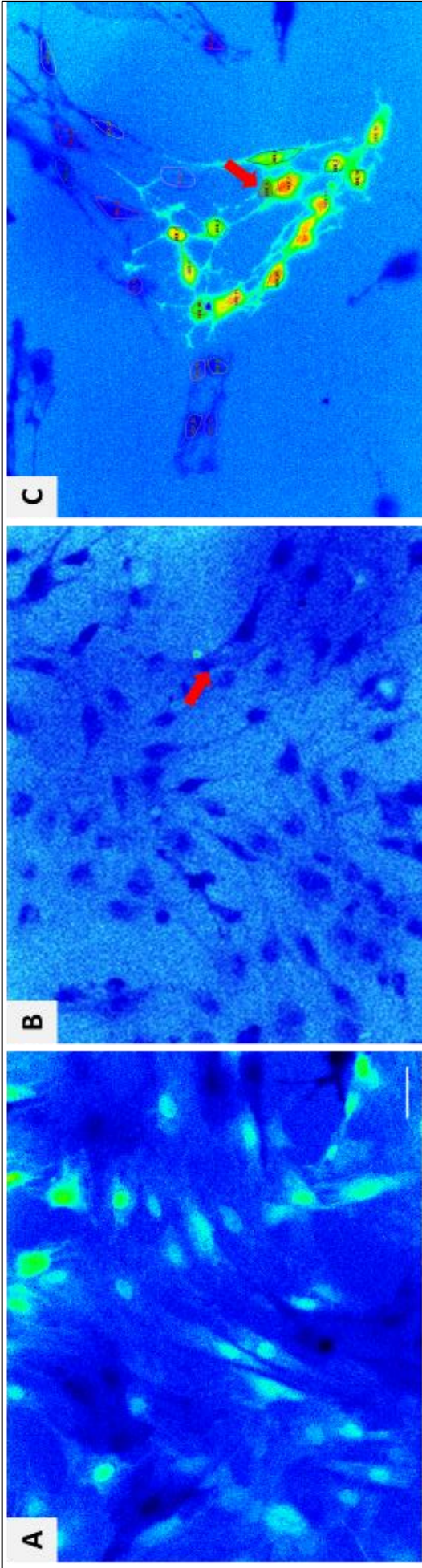


Figure 2: Differential sensitivity of retinal glial cells to mechanical but not chemical stimulation. **A.** Müller cells are sensitive to a chemical stimulation with ATP solution whereas **B.** they are insensitive to a mechanical stimulation through the ejection of HANKS solution onto one single cell. **C.** Contrary to Müller cells, astrocytes are stimulated by ejection of a neutral solution (HANKS) onto a single cell suggesting that they are more sensitive to mechanical stimulation than Müller cells. Red arrow indicates the stimulated cell. Pictures are visualized at a 304/380 nm fluorescence ratio. The pseudocolors scale indicates fluorescence ratio values. Scale bar: 50µm.

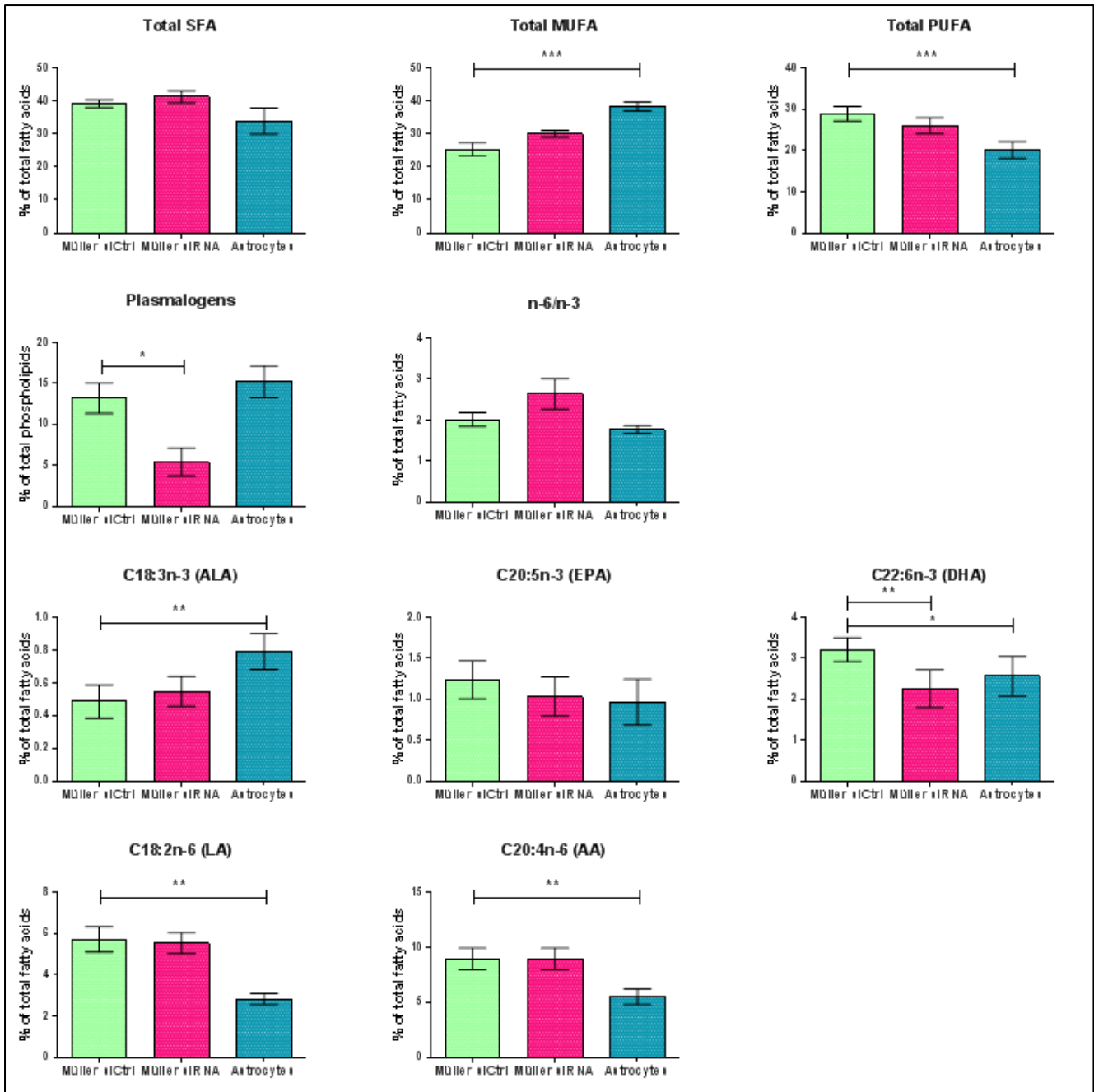


Figure 3: Fatty acid compositions of astrocytes in primary culture as well as primary Müller cells treated or not with siRNA against DHAP-AT. The lipid profiles of Müller cells treated with control siRNAs (Müller ctrl), with siRNAs against DHAP-AT (Müller siRNA) and non-treated astrocytes show that, compared to Müller ctrl, total MUFA levels were increased in astrocytes while total PUFA were lower. No difference as observed between Müller ctrl and Müller siRNA for total MUFA. Total

SFA levels did not vary between the three experimental groups. Plasmalogen levels were significantly decreased in Müller cells treated by siRNA directed against DHAP-AT. Müller ctrl and astrocytes displayed similar concentrations in plasmalogens. The n-6/n-3 ratio was similar in the three experimental groups even if a non-significant trend to increase was observed in Müller siRNA. Concerning PUFAs, we observed a significant increase in ALA in astrocytes when compared to Müller cells whereas the levels of EPA were unchanged. The concentrations of DHA, LA and AA were significantly decreased in astrocytes when compared to Müller ctrl. DHA was also significantly reduced in Müller siRNA when compared to Müller ctrl. Results are presented as means \pm SD (n=6); Kruskal-Wallis test with Dunn's multiple comparisons test, *:p \leq 0.05, **:p \leq 0.01, ***:p \leq 0.001. SFA: saturated fatty acids, MUFA: monounsaturated fatty acids, PUFA: polyunsaturated fatty acids, ALA: alpha-linolenic acid, EPA: eicosapentaenoic acid, DHA: docosahexaenoic acid, LA: linoleic acid, AA: arachidonic acid.

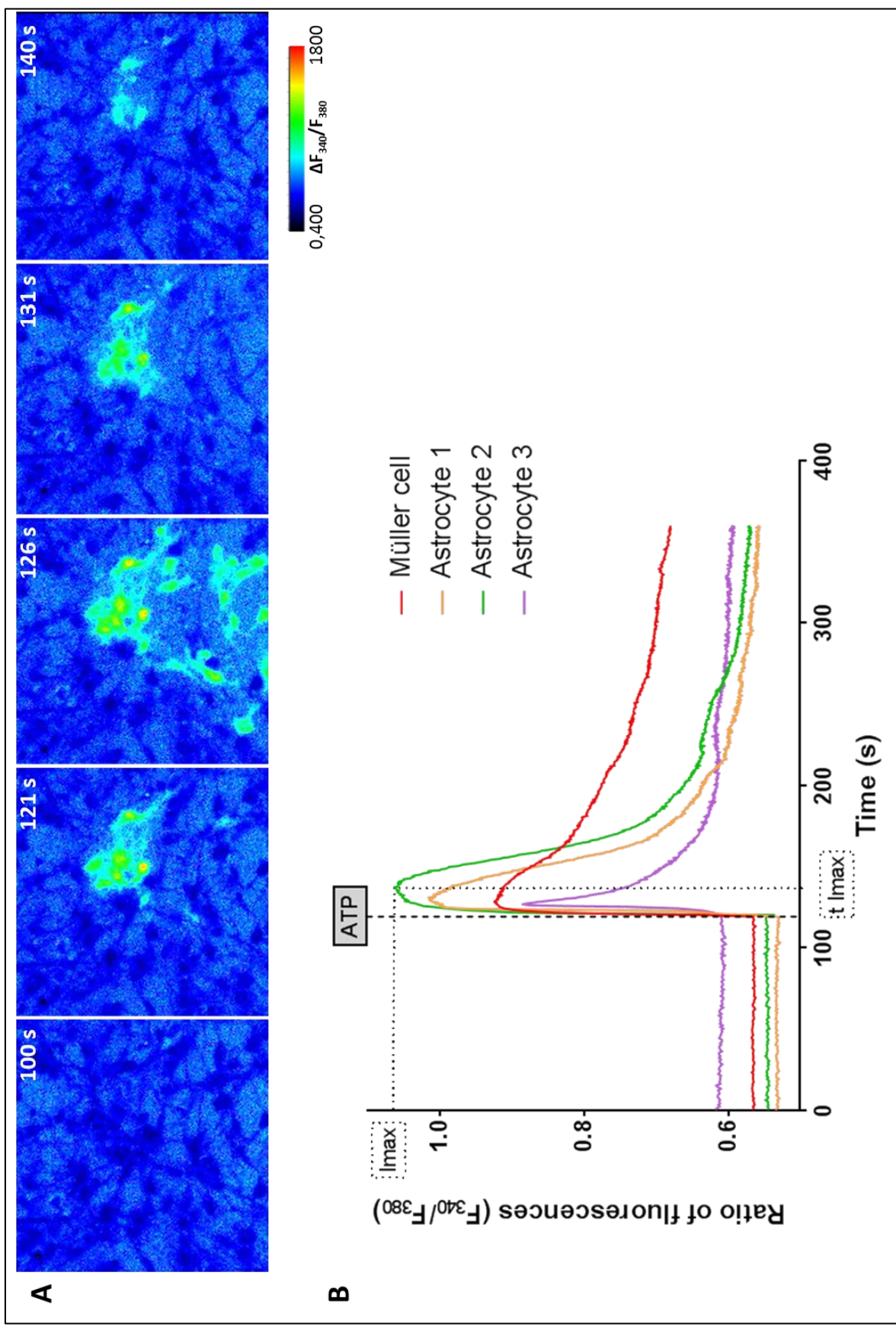


Figure 4: Stimulation of one Müller cell with ATP initiates calcium waves propagating in neighboring astrocytes. **A.** Representative fluorescence microscopy pictures showing the time-dependent propagation of calcium waves from a single Müller cell stimulated with ATP to neighboring cells. The pseudocolors images were obtained by the ratio of image at 340 nm and 380 nm. The pseudocolors scale indicates fluorescence ratio values. **B.** Representative response-curves recorded for single Müller cell and astrocytes after stimulation of the Müller cell with ATP. A baseline recording of 120 sec was set before stimulation. For each cell, the maximal intensity (I_{max}) of fluorescence and its corresponding latency ($t_{I_{max}}$) was set at 90 % of the measured maximal intensity.

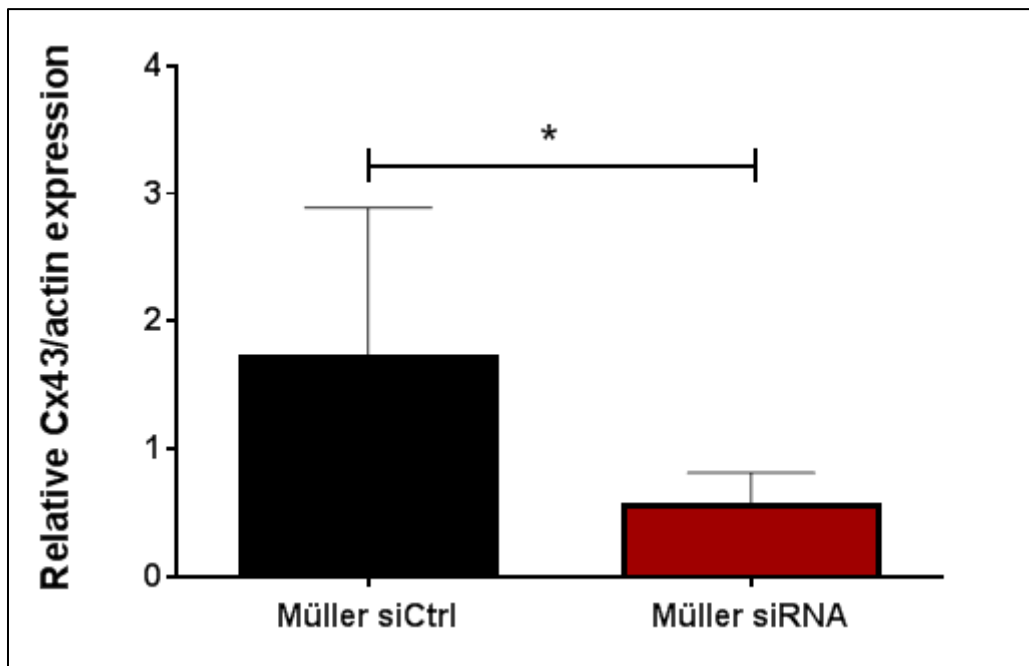


Figure 5: Decreasing plasmalogen concentrations in Müller cells lowers the expression of connexin 43. Western-blot analysis of connexin 43 expression. Treating Müller cells with siRNA directed against DHAP-AT leads to a reduction of connexin 43 expression. Results are presented as means \pm SD (n=6); Wilcoxon test; *: $p \leq 0.05$. DHAP-AT: Dihydroxyacetone phosphate acyltransferase, Müller siRNA: Müller cells treated with siRNA directed against DHAP-AT, Müller siCtrl: Müller cells transfected with control siRNA.

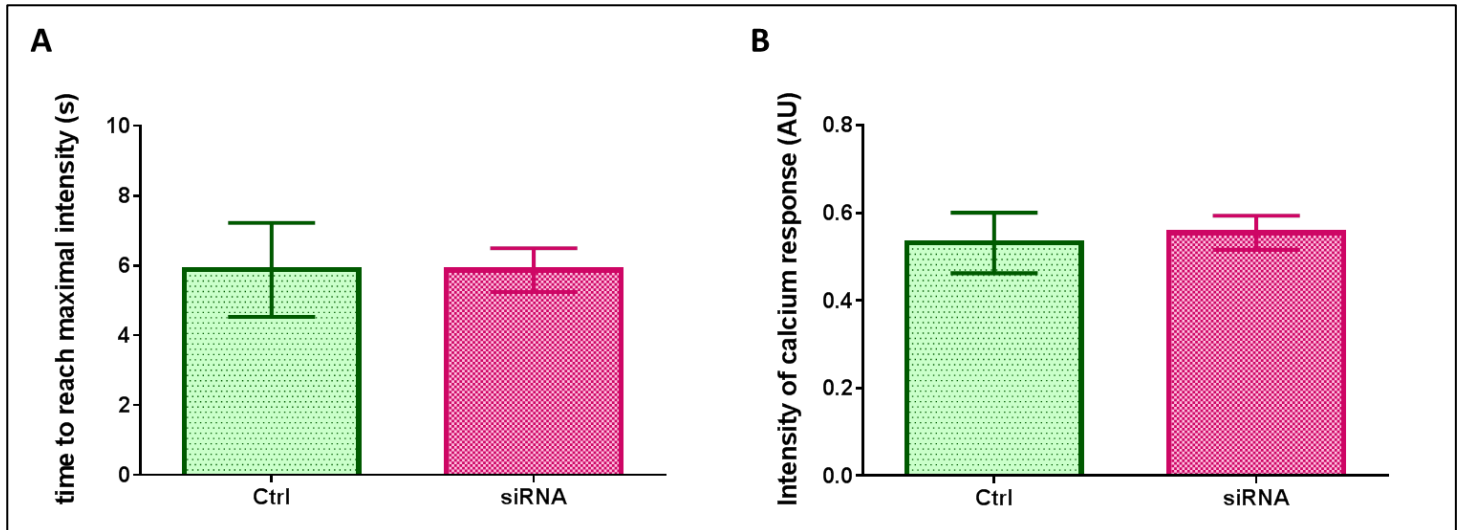


Figure 6: Decreasing plasmalogen concentrations in Müller cells did not change their response to ATP stimulation. A. Quantification of time needed to Müller cells to reach maximal intracellular concentration in calcium after stimulation through ATP ejection. **B.** Quantification of intensity of fluorescence representing calcium concentration in Müller cells after stimulation with ATP. All data are presented as mean \pm SD (n=8 for Ctrl group and 15 for siRNA group); Unpaired t-test. Ctrl: Müller cells treated with negative control siRNA, siRNA: Müller cells treated with siRNA directed against DHAP-AT.

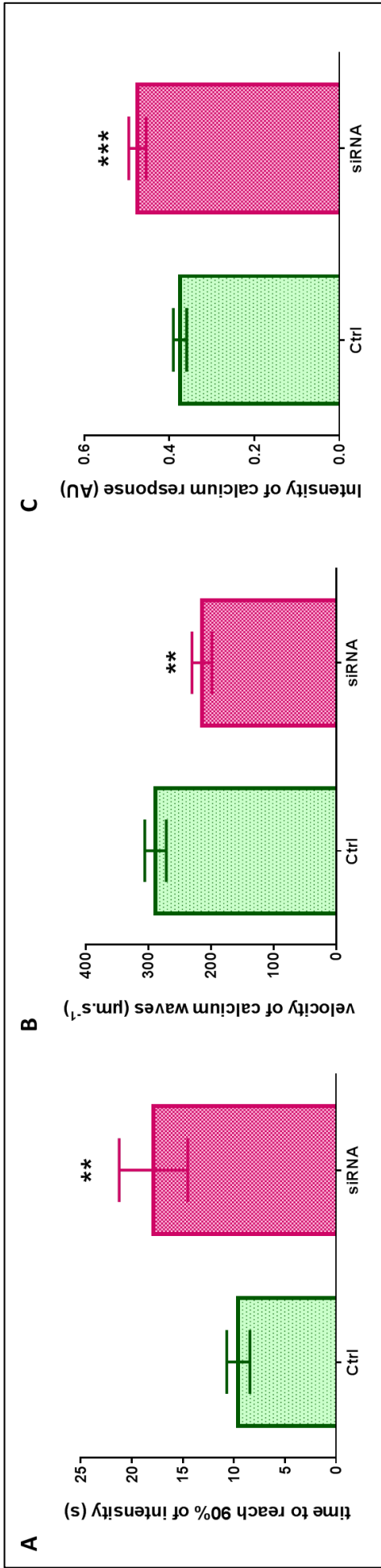


Figure 7: Reducing Müller cell levels of plasmalogens affects calcium communication between glial cells. Evaluation of astrocytes response after Müller cells stimulation: **A.** Quantification of the time needed to astrocytes to reach 90 % of maximal intracellular concentration (I_{max}) in calcium after stimulation of a neighboring Müller cell with ATP. A higher delay was observed in astrocytes from the siRNA group. **B.** Quantification of the velocity of calcium waves propagating from stimulated Müller cell to neighboring astrocytes. A lower velocity was observed in siRNA group, suggesting a reduced speed of propagation. **C.** Quantification of calcium concentrations in astrocytes after stimulation of a single Müller cell with ATP. Higher levels of calcium were observed in siRNA group, suggesting a more pronounced stimulation of these cells. All results are presented as mean \pm SD (n=126 for Ctrl group and 112 for siRNA group); Mann-Whitney test; **: $p \leq 0.01$, ***: $p \leq 0.001$. Ctrl: co-culture with Müller cells transfected with negative control siRNA, siRNA: co-culture with Müller cells treated with siRNA directed against DHAP-AT.

Principaux résultats et conclusions

L'objectif de cette étude a été de déterminer l'influence des plasmalogènes sur la communication calcique entre les cellules de Müller et les astrocytes. Dans un premier temps nous avons observé une diminution de l'expression de la protéine connexine 43 dans les cellules de Müller soumises à une diminution de leurs teneurs en plasmalogènes. De la même manière, une diminution de la synthèse des plasmalogènes dans les astrocytes entraîne une diminution de l'expression de la Cx43 dans ces cellules (Figure 24).

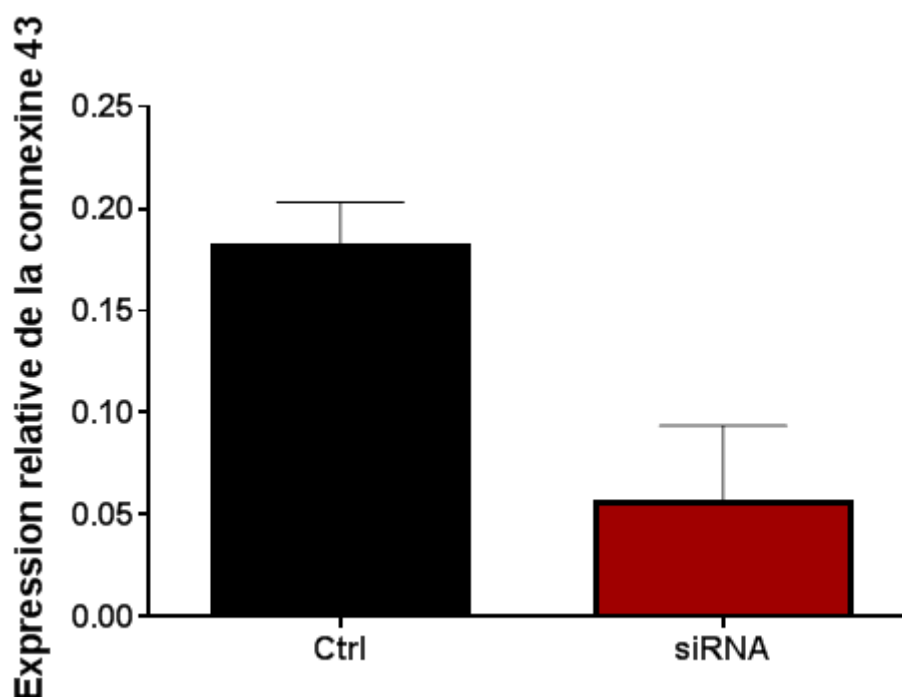


Figure 24 : Expression relative de la connexine 43 des astrocytes transfectés par des siRNA dirigés contre l'ARNm de la DHAP-AT

Analyse par western blot de l'expression de la protéine Cx43 dans des astrocytes ayant été transfectés par des siRNA dirigés contre la DHAP-AT. L'intensité de l'expression de la Cx43 est rapportée à l'intensité de l'expression protéique totale. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SD (n=3); test de Mann-Whitney, non significatif.

La Cx43 étant la protéine majoritaire des jonctions gap entre les cellules gliales, nous avons émis l'hypothèse que cette diminution d'expression de la Cx43 pouvait avoir une importance dans la communication entre les cellules de Müller et les astrocytes. Nous avons donc étudié la propagation de flux calcique à l'aide d'une sonde FURA2-AM et d'une stimulation à l'ATP d'une cellule unique. Contrairement à certaines études (Zahs and Newman 1997), nous avons observé, suite à la stimulation d'une cellule de Müller, une émission d'une onde de calcium aux astrocytes voisins, ce flux étant capable de se propager à d'autres astrocytes plus lointains. Nous avons également observé une diminution de la vitesse de propagation des ondes calciques lorsque les cellules de Müller avaient été traitées par siRNA dirigés contre la DHAP-AT.

Ces données confortent l'hypothèse d'une influence des cellules de Müller sur le métabolisme astrocytaire, mais aussi l'idée de l'importance des plasmalogènes dans la communication gliale.

En parallèle de ces travaux, nous avons examiné l'architecture vasculaire de la rétine de souris déficientes pour la Cx43 (Figure 25). Pour ce faire, nous avons utilisé l'angiographe Heidelberg Retinal Angiograph, HRA I SLO (Heidelberg Engineering, Dossenheim, Germany) adapté à l'animal selon une méthode déjà publiée (Seeliger, Beck et al. 2005; Paques, Simonutti et al. 2006). Le fond d'œil natif visualisé grâce à une stimulation en infrarouge ne montre pas d'anomalie macromorphologique et nous n'avons pas observé la présence de dépôts autofluorescents avec le laser à 830nm. Après administration de fluorescéine, produit de contraste permettant de visualiser les vaisseaux rétiniens, nous avons observé une tortuosité des gros vaisseaux ressemblant à celle observée à l'âge adulte chez les souris DAPAT (Figure 25). Les défauts observés restent minimes comparés à ceux visualisés dans les rétines des souris DAPAT, peut-être dûs à une compensation par d'autres connexines.

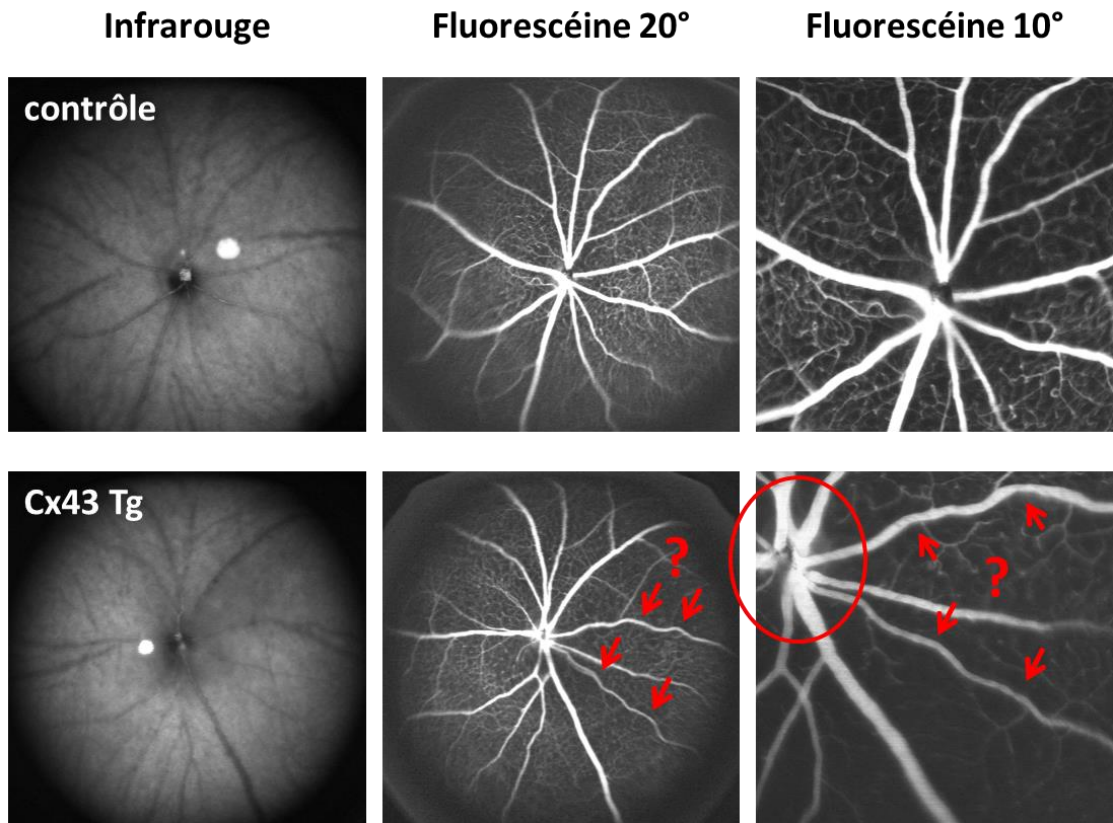


Figure 25 : Fond d'œil de souris contrôle et de souris transgéniques pour la connexine 43
 Images obtenues par angiographie du fond d'œil de souris contrôle (en haut) et de souris déficiente pour la connexine 43 (en bas). Images en infrarouge, à 830nm (à gauche) et images en fluorescence, à 488nm, pour visualiser les vaisseaux rétiniens colorés par la fluorescéine (au milieu et à droite).

Chapitre 5 : Etude OmégaROP

Problématique

La dernière partie de ce travail de thèse a consisté en la mise en évidence de potentielles altérations des teneurs en plasmalogènes et en AGPI dans une pathologie rétinienne humaine à composante vasculaire, à savoir la rétinopathie des prématurés. Notre choix découle des études antérieures réalisées sur les souris DAPAT au laboratoire (Saab, Buteau et al. 2014). En effet chez ces souris KO, l'absence de plasmalogènes entraîne des défauts oculaires semblables à ceux observés chez des sujets développant une ROP. Parmi ces phénotypes similaires, nous retrouvons une phase de retard de la croissance du réseau vasculaire rétinien suivie d'une phase de développement anarchique des vaisseaux sanguins. Nous avons donc voulu assoir formellement ce phénotype de ROP associé aux plasmalogènes chez la souris DAPAT en vérifiant chez l'homme la biodisponibilité des plasmalogènes circulant (dans les globules rouges). Les enfants étant prélevés quelques heures après leur naissance, le profil lipidique des globules rouges est indemne de toute influence alimentaire. De plus, il peut être considéré comme un excellent marqueur du profil lipidique de la rétine (Carlson, Carver et al. 1986; Makrides, Neumann et al. 1994; Sarkadi-Nagy, Wijendran et al. 2004).

Pour réaliser l'étude, l'effectif nécessaire calculé a été de 55 nouveau-nés prématurés de moins de 29 semaines d'aménorrhée incluant au moins 19 cas de ROP. Les sujets ont été recrutés dans le service de réanimation néonatale du centre hospitalier universitaire (CHU) de Dijon. La période d'inclusion des sujets est de deux ans, le premier prélèvement ayant été réalisé en juillet 2015. Cette étude a débuté dans le cadre du Master 2 Recherche de Charlotte Pallot, interne au Service d'Ophtalmologie du CHU de Dijon. Les résultats des profils lipidiques à mi-parcours de cette étude portent sur 26 enfants prématurés et font l'objet d'un article en révision dans le journal *Investigative Ophthalmology & Visual Science*.

Polyunsaturated fatty acid concentrations in erythrocytes of preterm newborns with retinopathy of prematurity: the OmegaROP Study.

Charlotte Pallot,¹ Julie Mazzocco,² Cyril Meillon,¹ Denis S. Semama,³ Corinne Chantegret,³ Ninon Ternoy,³ Delphine Martin,³ Aurélie Donier,³ Stéphane Gregoire,² Catherine P.Creuzot-Garcher,^{1,2} Alain M. Bron,^{1,2} Lionel Bretillon,² Niyazi Acar.²

¹ Department of Ophthalmology, University Hospital, F-21000, Dijon, France

² Eye and Nutrition Research Group, Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation, CNRS, INRA, Univ. Bourgogne Franche-Comté, F-21000 Dijon, France

³ Neonatal Intensive Care Unit, University Hospital, F-21000, Dijon, France

Correspondence

Niyazi Acar, PhD

UMR CSGA, Eye and Nutrition Research Group

17, rue Sully, BP86510

21065 Dijon Cedex, France

Fax +33-(0)3.80.69.32.23

Tel. +33-(0)3.80.69.32.69

Email: niyazi.acar@dijon.inra.fr

Clinical trial registration

Beginning date of the trial: July, 31, 2015.

Date of registration: June, 5, 2015.

Trial registration number: 2015-A00083-46

Registration site: CPP est III (Dijon, France).

Source of funding

Grant from the Inter Regional Group for Clinical Research and Innovation (GIRCI) under the program "Appel à projet jeune chercheur" 2014.

Grant from the French National Institute for Agricultural Research (INRA, France) and the Regional Council of Burgundy (France) for the PhD fellowship to Julie Mazzocco.

This work was supported by a French Government grant managed by the French National Research Agency (ANR) under the program “Investissements d’Avenir” with reference ANR-11-LABEX-0021,

Grants from the Regional Council of Burgundy (France), and the FEDER (European Funding for Regional Economic Development).

Key words

Polyunsaturated fatty acids, docosahexaenoic acid, erythrocyte, retinopathy of prematurity

Word count: 3546

Abstract

Purpose. The objective of the study was to characterize the erythrocyte concentrations of fatty acids, and particularly of polyunsaturated fatty acids (PUFAs) from n-6 and n-3 series among preterm infants that will develop (ROP group) or not a retinopathy of prematurity (no ROP group).

Methods. Preterm infants born before 29 weeks of gestational age were prospectively included. A blood sample was collected within the first 48 hours of life. The fatty acid composition of erythrocytes was performed by gas chromatography. ROP screening was realized with a wide-field camera.

Results. Out of the twenty-six preterm infants included in the study, 12 (46.1%) developed a ROP. The erythrocyte levels of total n-3 PUFA represented 2.35 % of total fatty acids (IQR: [0.97-3.45]) in the ROP group and 1.56 % of total fatty acids (IQR: [0.71-3.77]) in the no ROP group ($P = 0.7859$). No difference between these two groups was observed regarding erythrocyte PUFAs concentrations. However, principal component analysis revealed clustering between no ROP and ROP groups in the relation between the total n-6 to n-3 ratio and gestational age. Particularly, gestational age was correlated with an accumulation of arachidonic acid (AA) at the expense of eicosapentaenoic acid (EPA) only in infants that develop ROP.

Conclusions. In addition to documenting lipid composition of erythrocytes during human development before 29 weeks GA, these data suggest an age-dependent differential repartition of PUFAs, and particularly AA and EPA, in erythrocytes in preterm infants that will develop ROP during follow-up.

Introduction

The incomplete vascularization of the retina in preterm infants represents a risk to develop retinopathy of prematurity (ROP). This disease is characterized by neovascular complications that are the consequence of an imbalanced oxygen supply to the retina. ROP was first described in 1942 by Terry, who named it as “retrolental fibroplasia”, referring to the total retinal detachment observed in most severe stages of ROP.¹

Retinal vascularization begins *in utero* by the development of the embryonic vasculature —also called hyaloid system— that fully regresses before birth. Then an own vascular network develops by two complementary mechanisms, vasculogenesis and angiogenesis. Vasculogenesis begins at 6 weeks of embryonic life by the formation of four vascular arcades. Angiogenesis takes then place until the first two weeks after birth and corresponds to the emergence of vessels from these arcades. This late maturation makes infants born before the end of the third quarter of pregnancy at high risk of ROP. Although a better knowledge of risk factors and improved screening and treatment have significantly decreased the risk of developing a ROP, this disease remains the major cause of blindness in preterm infants.² The incidence of ROP in developed countries is highly variable and ranges from 6 to 34% according to studies.^{3 4}

Preterm birth (commonly before 32 weeks of gestational age (GA))⁵ and lower birth weight (generally below 1500 grams)⁶ represent independent risk factors of ROP, whereas high oxygen saturation is the major cause for developing the disease.⁷ Other risk factors such as red blood cell transfusion,⁸ use of erythropoietin (EPO),⁹ hyperglycemia,¹⁰ and maternal anemia¹¹ have also been identified.

Polyunsaturated fatty acids (PUFAs) also appear to be strong regulators of perinatal retinal vascular development. Indeed, n-3 PUFAs have been shown to prevent the vascular architecture defects observed in a mouse oxygen-induced retinopathy, an animal model of ROP.¹²⁻¹⁵ Particularly, n-3 PUFAs modulate cellular pathways activated by IGF-1¹⁶ and endothelial cellular proliferation through VEGF signaling,^{17 18} IGF-1 and VEGF being cellular pathways implicated in the pathogenesis of ROP.¹⁹⁻²² To our knowledge, very little knowledge is available on lipid or PUFA status in preterm infants developing a ROP. Martin *et al.* have evaluated the postnatal evolution of whole blood PUFA concentration in preterm newborns and have shown strong modifications in the levels of major n-6 and n-3 PUFAs such as arachidonic acid (AA) and docosahexaenoic acid (DHA).²³ However, these measurements were done, at least in part, after enteral and parenteral feeding, and might then have been influenced by the oral or intravenous lipid supplementation of preterm infants.

In this work, we have chosen to focus on erythrocyte lipids as they have been showed to be a good mirror of retinal lipid composition in newborn humans, primates and rodents.²⁴⁻²⁶ In this study, we wanted to evaluate the prospective value of erythrocyte concentrations of total PUFAs in preterm infants for the development of ROP. We have evaluated the individual concentrations of n-3 and n-6 PUFAs, namely alpha-linolenic acid (ALA), eicosapentaenoic acid (EPA) docosahexaenoic (DHA) acid, and arachidonic acid (AA), and the ratio of total n-6 PUFAs to total n-3 PUFAs in red blood cells in preterm infants collected immediately after birth to limit the interference with lipid nutritional intakes, and recorded the incidence of ROP.

Materials and methods

Ethic statement

Collection of samples from subjects was conducted in accordance with the guidelines of the Declaration of Helsinki. An information note was given to the parents and the protocol was accepted by the local ethics committee (CPP Est III, Faculty of Medicine, Dijon, France). In accordance with « *ethical considerations for clinical trials on medicinal products conducted with the paediatric population* » the volume of blood collected was limited to 0.5mL.²⁷

Selection of the patients

From July 31th 2015 to May 31th 2016, all preterm infants born before 29 weeks GA and hospitalized in the Neonatal Intensive Care Unit of the University Hospital of Dijon, France, have been included in the study. A blood sample of 0.5mL was collected by venipuncture within the first 48 hours of life in a heparinized tube. Red blood cells were immediately separated from serum by centrifugation at 3000 rpm for 10 min at 4°C. All samples were immediately stored at – 80°C until further analyses. Screening of ROP was performed with the wide-field RETCAM II® camera (Clarity medical systems Pleasanton, CA) using a lid speculum after topical anesthesia by chlorhydrate oxybuprocain (1.6mg/0.4mL, Thea Laboratories, Clermont-Ferrand, France). Pupillary dilation was previously performed using one drop of 2.5% epinephrine (Phenylephrine 5% diluted to 2.5%, Europhta, Monaco) and one drop of tropicamide (2mg/0.4mL, Thea Laboratories, Clermont-Ferrand, France). The procedure was completed by a trained nurse and all fundus photographs were analyzed by a trained ophthalmologist specialized in pediatrics. Screening began from 4 to 6 weeks of life but never before 31 weeks of postconceptional age (PCA),

and was repeated every two weeks until 39 weeks PCA if no ROP was detected and every week and up to twice a week in case of ROP. ROP staging was determined according to the International Classification of ROP.²⁸ Patients were classified into two groups, those suffering from ROP (ROP group) and unaffected controls (no ROP group). Within the ROP group, subjects were classified into ROP type 1 and ROP type 2. The major risks of developing ROP, namely term and weight at birth, duration of mechanical ventilation, sepsis, use of erythropoietin, red blood cell transfusion and cerebral hemorrhage were documented.

Lipidomic analyses

Lipid extraction from erythrocytes

Total lipids were extracted from erythrocytes according to Moilanen and Nikkari.²⁹ Phospholipids were purified from total lipid extracts using silica cartridges as previously described.³⁰⁻³² Phospholipid extracts were stored under inert gas until further analyses.

Determination of erythrocyte membrane fatty acid composition by gas chromatography

Total phospholipids from red blood cells were transmethylated using boron trifluoride in methanol according to Morrison and Smith.³³ The fatty acid methyl esters (FAMES) and dimethylacetals (DMAs) formed were extracted with hexane and analyzed on a Hewlett Packard Model 5890 gas chromatograph (Palo Alto, CA, USA) using a CPSIL-88 column (100m × 0.25mm i.d., film thickness 0.20µm; Varian, Les Ulis, France) equipped with a flame ionization detector. Hydrogen was used as carrier gas (inlet pressure 210kPa). The oven temperature was held at 60°C for 5min, increased to 165°C at 15°C/min and held for 1min, and then to 225°C at 2°C/min and finally

held at 225°C for 17min. The injector and the detector were maintained at 250°C. FAMES and DMAs 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 FAMES and DMAs.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism v6.05 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) and XLSTAT v2016.05.35252 (Addinsoft, Paris, France). Data with a normal distribution are expressed as mean \pm standard deviation (SD) whereas those having a non-Gaussian distribution are as median and interquartile range [IQR]. Comparison between groups was performed by the non-parametric Mann-Whitney test for quantitative variables and Chi-2 test or Fisher exact test for qualitative variables. A principal component analysis and Spearman correlations were used to analyze the extent to which the fatty acid composition of erythrocytes were associated to the major risk factors of ROP, namely mechanical ventilation, birthweight and GA. Linear regression analyses were performed to compare the levels of total n-3 and n-6 PUFAs, ALA, EPA, AA, DHA and the ratio of total n-6 PUFAs to total n-3 PUFAs as a function of GA and birth weight. A *p* value lower than 0.05 was considered as statistically significant and the tests were two-tailed.

Results

Characteristics of the population

The characteristics of the population are presented in **Table 1**. Twenty-six preterm infants born before 29 weeks GA were included in the study. Three infants died and the rate of mortality was of 11.5%. Blood samples were obtained from twenty-three infants at a median time of 12 hours and a maximum time of 48 hours after birth. The population included two sets of heterozygotes twins. No difference was observed between the ROP and the no ROP groups for sampling time, gender, duration of mechanical ventilation, sepsis, use of EPO, red blood cell transfusion and cerebral hemorrhage. However, ROP was associated with significantly lower GA and birth weight ($p = 0.0123$ and $p = 0.0149$, respectively). The mean follow-up for ROP screening was 9.4 ± 4.0 weeks of life. The mean number of screening examinations was 3.8 ± 2.3 examinations per infants. The incidence of ROP in our population was 46.1% with one case with type 1 ROP (8.3%) and 11 type 2 ROP cases (91.7%). The type 1 ROP subject underwent laser therapy in both eyes. No intravitreal injection of bevacizumab was used. All ROP cases were observed in zone 2 according to the International Classification of ROP. No ROP in zone 1 or zone 3 was observed. There was one case of ROP at stage 1 (8.3%), 10 cases at stage 2 (83.3%) and one case at stage 3 (8.3%). One subject was classified as a stage “plus” and was the one who benefited from the laser treatment.

Fatty acid composition of erythrocytes

The fatty acid composition of erythrocytes in subjects from ROP and no ROP groups is presented in **Table 2**. No significant difference was observed between groups in individual fatty acids as well as in total saturated fatty acid (SFA), total

monounsaturated fatty acid (MUFA), total PUFA, and total dimethylacetals (DMA). The levels of total n-3 PUFAs were similar between the groups (1.5% [0.7-3.7] *versus* 2.3% [0.9-3.4] of total FAMES and DMAs for ROP and no ROP groups, respectively ($p = 0.7859$). The levels of total n-6 PUFAs were also similar between the groups 9.4% [1.7-21.7] *versus* 9.1% [3.9-21.4] of total FAMES and DMAs between ROP and no ROP groups, respectively ($p = 0.6075$). The total n-6 to total n-3 PUFA ratio was similar between newborns suffering or not from ROP ($p = 0.7398$). A striking characteristic of the measured erythrocyte fatty acid compositions of subjects from ROP and no ROP groups was a high variability, especially in the levels of total SFA, total MUFA, total PUFA, total n-6 PUFA, and total n-3 PUFA (**Figure 1**).

Principal component analysis of erythrocyte fatty acid composition

To better understand the origin of the high dispersion of the data, we performed a principal component analysis of lipidomic data in relation to the major risk factors of ROP, namely mechanical ventilation, birthweight, and GA (**Figure 2**). In no ROP and ROP groups, F1 Axis explained 69.93% and 66.38% of data variance, respectively, for total SFA, total MUFA, total PUFA, total n-6 PUFA, total n-3 PUFA, n-6 to n-3 ratio, mechanical ventilation, birthweight, and GA. Data variance was almost exclusively the reflection of the variability in fatty acid composition (78.51% and 92.25% of contribution to F1 axis in no ROP and ROP groups, respectively). In the no ROP group, principal component analysis indicated that total MUFA, total PUFA, total n-6 PUFA, total n-3 PUFA and n-6 to n-3 PUFA ratio formed a group loaded high on F1 axis whereas total SFA, birthweight and GA resided very high negative. The major differences in ROP group when compared to the no ROP group concerned GA and birthweight who switched from a highly negative to a highly positive position on F1

axis, and total n-6 to n-3 PUFA ratio who diverged from the cluster composed of total MUFA, total PUFA, total n-6 PUFA, and total n-3 PUFA. These changes resulted in the formation of a new cluster highly loaded on both, F1 and F2 axes, and composed of GA and n-6 PUFA to n-3 PUFA ratio.

Associations between gestational age and erythrocyte lipids

Considering the results from principal component analysis suggesting differential associations between GA and erythrocyte fatty acids in no ROP and ROP groups, we have checked for Spearman correlations between GA and total SFA, total MUFA, total PUFA, total n-6 PUFA, total n-3 PUFA, and n-6 PUFA to n-3 PUFA ratio (**Figure 3**). In the no ROP group, GA was positively correlated with erythrocyte total SFA concentrations ($r_{\text{Spearman}} = 0.595$, $p < 0.05$) and negatively associated to erythrocyte total MUFA, total PUFA, total n-6 PUFA, total n-3 PUFA, and n-6 to n-3 PUFA ($r_{\text{Spearman}} = -0.613$, -0.624 , -0.606 , -0.606 , and -0.524 respectively; $p < 0.05$ for all). The ROP group displayed opposite results but only GA and n-6 to n-3 ratio showed a significant positive correlation ($r_{\text{Spearman}} = 0.668$, $p < 0.05$).

In order to better understand the origin of the differential pattern of relationship between n-6 to n-3 ratio and GA, we have further investigated at which level of n-6 and n-3 PUFA metabolism the n-6 to n-3 ratio association with GA is discordant between no ROP and ROP groups (**Figure 4**). Indeed, long-chain PUFAs from n-6 and n-3 series such as C22:5n-6 and DHA are synthesized from C18:2n-6 and ALA, respectively through metabolic reactions involving desaturation by Fatty Acid Desaturase 2 (FADS2), elongation by ELongation of Very Long-chain fatty acid 5,2 (ELOVL5,2) and Fatty Acid Desaturase 1 (FADS1) to synthesize AA and EPA, respectively, which are elongated by ELOVL5,2 to C22:4n-6 and C22:5n-3, which in

turn are elongated by ELOVL2, desaturated by FADS2, and finally β -oxidized (**Figure 4A**). Within the different step of n-6 and n-3 PUFA metabolisms, only the ratio of PUFAs with 20 carbon atoms, namely AA and EPA, was significantly associated with GA in both subject groups ($r_{Spearman} = -0.595$ and 0.613 for no ROP and ROP groups, respectively, $p < 0.05$ for both) (**Figure 4B**). As for the total n-6 PUFA to total n-3 PUFA ratio, the erythrocyte AA to EPA ratio displayed opposite patterns between groups since the association between AA to EPA ratio and GA was positive for infants who will develop a ROP whereas it was negative in the no ROP group (**Figure 4C**).

Discussion

This report characterizes the erythrocyte concentrations of fatty acids, and especially that of n-6 and n-3 PUFAs in preterm infants born before 29 weeks GA at the first hours of their lives. The clinical characteristics of our population were comparable with those of several studies. The main risk factors for ROP in the present study were early GA and low birth weight as reported by Alvin *et al.* and Jalali *et al.*^{11 34} The incidence of ROP in our study was high (46.1%), in agreement with another study on preterm infants with very-low-GA.³⁵ In our study there was a majority of intermediate forms of ROP with only one child with a severe form needing treatment.

Whereas Martin *et al.* in 2011 looked at the whole blood lipids in preterm infants;²³ this study is to our knowledge the first characterizing erythrocyte lipids in preterm infants born before 29 weeks GA. First of all, our data showed that the erythrocyte fatty acid status within the first 72 hours of life in preterm infants born before 29 weeks GA is quite different from those measured in older preterm infants or adult human subjects. The proportion of total saturated fatty acids was very high ($69.8 \pm 16.7\%$) and the total level of PUFAs was very low ($15.1 \pm 11.1\%$). In the study of Yuan *et al.* on Chinese adults, total saturated fatty acids and PUFAs represented $53.0 \pm 0.9\%$ and $24.1 \pm 0.9\%$ of total fatty acids, respectively.³⁶ These differences might reflect the particular status of preterm infants and may suggest a remodelling of fatty acid metabolism during gestation. In addition, we observed a high inter-individual variability in the levels of fatty acids as shown by wide interquartile ranges. This variability was not restricted to any specific fatty acid but seemed to concern all of them, as confirmed by principal component analysis. One novelty of this work is that blood sampling was performed early in life in order to avoid any modification of erythrocyte lipids status by preterm infant's diet. Since blood sampling was performed

during the first 72 hours of life, and since lifetime of erythrocytes ranges from 35 to 50 days in preterm infants³⁷, the fact that fatty acid composition of erythrocytes should be affected by the preterm infant's diet is very unlikely. In our study, preterm infants received for the first 24 hours of life parenteral nutrition with no lipid and enteral feeding was ensured by maternal milk as soon as possible according to the general state of the preterm infants. Thus, the discrepancies observed between infants in our study may rather be assigned to differences in *in situ* fatty acid metabolisms than to a nutritional influence. In the studies of Collins *et al.* and Smither *et al.*, the concentrations of total n-3 PUFAs were higher than ours (between 7.1% and 8.8% of total fatty acids), but blood was sampled after 28 days, later than in our study.^{38 39} This difference is probably the consequence of a dietary supply in n-3 PUFA during early life.

It is now well known that n-3 PUFAs play crucial roles in retinal angiogenesis and vascularization.^{14 40} It was demonstrated that n-3 PUFAs can limit the severity of pathologic retinal neovascularization and improve the regression of vascular lesions in the choroid.^{12 14 40 41} Epidemiologic studies have shown that a higher dietary consumption of n-3 PUFAs is associated with a decrease risk of Age-related Macular Degeneration (AMD) to its neovascular forms,^{42 43} vascular abnormalities in diabetic retinopathy⁴⁴ and vascular architecture defects in a mouse model of oxygen-induced retinopathy, an animal model of ROP.¹²⁻¹⁵ In our study we did not find any difference regarding the total erythrocyte levels of n-3 PUFAs between the ROP and the no ROP groups whatever the GA of the subjects. So was the n-6 to n-3 PUFA ratio. According to the results of principal component analysis, showing a large shift of the GA variable between no ROP and ROP groups, we have checked for associations between erythrocyte concentrations of fatty acids and GA. We have observed that

GA is positively correlated with the n-6 PUFA to n-3 PUFA ratio in infants that will develop a ROP whereas this association was negative in controls. These data then suggest a remodelling of the n-6 to n-3 balance in favour of n-6 PUFA series in the ROP group. When regarding individual n-6 and n-3 PUFAs, only the AA to EPA ratio showed a similar pattern with a time-dependent accumulation of AA at the expense of EPA in erythrocytes of the ROP group. As n-6 and n-3 PUFAs, and especially AA and EPA, are precursors of metabolically active molecules involved in inflammation,⁴⁵ such a differential age-dependent evolution of AA to EPA ratio may have consequences on the inflammatory status of infants, which represents an additional risk factor of ROP.^{46 47} Moreover n-3 PUFAs are known to be involved in the own retinal vascular development by limiting the development of avascular areas and neovascularization during early and late phase of the disease, respectively.^{14 40 48} In these animal studies, n-6 PUFAs were not shown to prevent the development of ROP. PUFAs from n-3 series are known to act on vascular development through their oxygenated metabolites and by controlling the expression of IGF1 and VEGF growth factors.^{14 16-18 48} A differential evolution of n-6 to n-3 PUFA bioavailability in preterm infants might also represent another factor of susceptibility for the abnormal development of retinal vasculature.

On the contrary to the present work, data obtained by Martin *et al.* on whole blood collected on premature infants during the first four weeks of life did not show any association between the concentrations of n-6 and n-3 PUFAs and the incidence of ROP.²³ As hypothesized before, these findings are probably the result of the high lipid nutritional supplement given to the newborns since plasma lipids, and subsequently whole blood lipids, are very susceptible to dietary influence. In our study, as the diet of infants is very unlikely to have affected their erythrocyte lipid

composition, we can hypothesize that the differences observed between subjects that will suffer or not from ROP might be the result of differential *in utero* bioavailability of lipids and particularly of n-6 and n-3 PUFAs. To ascertain this assumption, it would be interesting to compare the erythrocyte lipid composition of newborns with that of their mother, and further investigate for the origins of potential abnormalities in maternal lipids (i.e. nutrition through food questionnaires).

We acknowledge several limitations to our study. First, the number of subjects is low. Second, the population includes only one severe ROP case that needed a treatment whereas such a case is the most concerned by neovascular abnormalities. Finally, it would be interesting to also measure plasma levels of PUFA derivatives involved in inflammation, such as prostaglandin E2 and prostaglandin E3, or in angiogenesis, such as resolvins and protectins, in order to check whether these differential patterns in lipids might have consequences on inflammatory status or angiogenic processes of infants.

In conclusion, this work shows that erythrocyte lipids of preterm infants that will develop or not a ROP display different patterns in term of n-6 and n-3 PUFA metabolisms. Because erythrocyte membranes are a good mirror of retinal lipid composition in the newborn, these data raise the question of potential modifications of retinal lipid metabolism in ROP with potential links with inflammatory and angiogenic processes. Further studies are needed to confirm this hypothesis.

References

1. Terry TL. Extreme prematurity and fibroblastic over-growth of persistent vascular sheath behind each crystalline lens. Preliminary report. *Am J Ophthalmology* 1942;25:203-4.
2. Steinkuller PG, Du L, Gilbert C, et al. Childhood blindness. *J AAPOS* 1999;3:26-32.
3. Good WV, Hardy RJ. The multicenter study of Early Treatment for Retinopathy of Prematurity (ETROP). *Ophthalmology* 2001;108:1013-4.
4. Jordan CO. Retinopathy of prematurity. *Pediatr Clin North Am* 2014;61:567-77.
5. Karkhaneh R, Mousavi SZ, Riazi-Esfahani M, et al. Incidence and risk factors of retinopathy of prematurity in a tertiary eye hospital in Tehran. *Br J Ophthalmol* 2008;92:1446-9.
6. Lad EM, Hernandez-Boussard T, Morton JM, Moshfeghi DM. Incidence of retinopathy of prematurity in the United States: 1997 through 2005. *Am J Ophthalmol* 2009;148:451-8.
7. Supplemental Therapeutic Oxygen for Prethreshold Retinopathy Of Prematurity Group. Supplemental Therapeutic Oxygen for Prethreshold Retinopathy Of Prematurity (STOP-ROP), a randomized, controlled trial. I: primary outcomes. *Pediatrics* 2000;105:295-310.
8. Fortes Filho JB, Eckert GU, Procianoy L, Barros CK, Procianoy RS. Incidence and risk factors for retinopathy of prematurity in very low and in extremely low birth weight infants in a unit-based approach in southern Brazil. *Eye (Lond)* 2009;23:25-30.
9. Romagnoli C, Tesfagabir MG, Giannantonio C, Papacci P. Erythropoietin and retinopathy of prematurity. *Early Hum Dev* 2011;87 Suppl 1:S39-42.
10. Mohamed S, Murray JC, Dagle JM, Colaizy T. Hyperglycemia as a risk factor for the development of retinopathy of prematurity. *BMC Pediatr* 2013;13:78.
11. Jalali S, Madhavi C, Reddy GP, Nutheti R. Pilot study on in vivo evaluation of retinal vascular maturity in newborn infants in the context of retinopathy of prematurity. *Am J Ophthalmol* 2006;142:181-3.
12. Leduc M, Kermorvant-Duchemin E, Checchin D, et al. Hypercapnia- and trans-arachidonic acid-induced retinal microvascular degeneration: implications in the genesis of retinopathy of prematurity. *Semin Perinatol* 2006;30:129-38.
13. Leduc M, Kermorvant-Duchemin E, Checchin D, Sennlaub F, Chemtob S. [Hypercapnia- and trans-arachidonic acid-induced retinal microvascular degeneration: implications in the genesis of retinopathy of prematurity]. *Med Sci (Paris)* 2007;23:939-43.
14. Connor KM, SanGiovanni JP, Lofqvist C, et al. Increased dietary intake of omega-3-polyunsaturated fatty acids reduces pathological retinal angiogenesis. *Nat Med* 2007;13:868-73.
15. Stahl A, Krohne TU, Sapieha P, et al. Lipid metabolites in the pathogenesis and treatment of neovascular eye disease. *Br J Ophthalmol* 2011;95:1496-501.
16. Aribat T, Nedelec B, Jobin N, Garrel DR. Decreased serum insulin-like growth factor-I in burn patients: relationship with serum insulin-like growth factor binding protein-3 proteolysis and the influence of lipid composition in nutritional support. *Crit Care Med* 2000;28:2366-72.
17. Calviello G, Di Nicuolo F, Gragnoli S, et al. n-3 PUFAs reduce VEGF expression in human colon cancer cells modulating the COX-2/PGE2 induced ERK-1 and -2 and HIF-1alpha induction pathway. *Carcinogenesis* 2004;25:2303-10.
18. Szymczak M, Murray M, Petrovic N. Modulation of angiogenesis by omega-3 polyunsaturated fatty acids is mediated by cyclooxygenases. *Blood* 2008;111:3514-21.
19. Smith LE, Shen W, Perruzzi C, et al. Regulation of vascular endothelial growth factor-dependent retinal neovascularization by insulin-like growth factor-1 receptor. *Nat Med* 1999;5:1390-5.

20. Hellstrom A, Perruzzi C, Ju M, et al. Low IGF-I suppresses VEGF-survival signaling in retinal endothelial cells: direct correlation with clinical retinopathy of prematurity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:5804-8.
21. Smith LE. Pathogenesis of retinopathy of prematurity. *Growth Horm IGF Res* 2004;14 Suppl A:S140-4.
22. Smith LE. IGF-1 and retinopathy of prematurity in the preterm infant. *Biol Neonate* 2005;88:237-44.
23. Martin CR, Dasilva DA, Cluette-Brown JE, et al. Decreased postnatal docosahexaenoic and arachidonic acid blood levels in premature infants are associated with neonatal morbidities. *J Pediatr* 2011;159:743-49 e1-2.
24. Carlson SE, Carver JD, House SG. High fat diets varying in ratios of polyunsaturated to saturated fatty acid and linoleic to linolenic acid: a comparison of rat neural and red cell membrane phospholipids. *J Nutr* 1986;116:718-25.
25. Sarkadi-Nagy E, Wijendran V, Diau GY, et al. Formula feeding potentiates docosahexaenoic and arachidonic acid biosynthesis in term and preterm baboon neonates. *J Lipid Res* 2004;45:71-80.
26. Makrides M, Neumann MA, Byard RW, Simmer K, Gibson RA. Fatty acid composition of brain, retina, and erythrocytes in breast- and formula-fed infants. *Am J Clin Nutr* 1994;60:189-94.
27. European Union. Ethical considerations for clinical trials on medicinal products conducted with the paediatric population. *Eur J Health Law* 2008;15:223-50.
28. Quinn GE. The International Classification of Retinopathy of Prematurity revisited. *Arch Ophthalmol* 2005;123:991-9.
29. Moilanen T, Nikkari T. The effect of storage on the fatty acid composition of human serum. *Clin Chim Acta* 1981;114:111-6.
30. Acar N, Berdeaux O, Gregoire S, et al. Lipid composition of the human eye: are red blood cells a good mirror of retinal and optic nerve fatty acids? *PLoS One* 2012;7:e35102.
31. Acar N, Berdeaux O, Juaneda P, et al. Red blood cell plasmalogens and docosahexaenoic acid are independently reduced in primary open-angle glaucoma. *Exp Eye Res* 2009;89:840-53.
32. Juaneda P, Rocquelin G. Rapid and convenient separation of phospholipids and non phosphorus lipids from rat heart using silica cartridges. *Lipids* 1985;20:40-1.
33. Morrison WR, Smith LM. Preparation of Fatty Acid Methyl Esters and Dimethylacetals from Lipids with Boron Fluoride--Methanol. *J Lipid Res* 1964;5:600-8.
34. Allvin K, Hellstrom A, Dahlgren J, Andersson Gronlund M. Birth weight is the most important predictor of abnormal retinal vascularisation in moderately preterm infants. *Acta Paediatr* 2014;103:594-600.
35. Austeng D, Kallen KB, Ewald UW, Jakobsson PG, Holmstrom GE. Incidence of retinopathy of prematurity in infants born before 27 weeks' gestation in Sweden. *Arch Ophthalmol* 2009;127:1315-9.
36. Yuan L, Zhen J, Ma W, et al. The Erythrocyte Fatty Acid Profile and Cognitive Function in Old Chinese Adults. *Nutrients* 2016;8:385-96.
37. Pearson HA. Life-span of the fetal red blood cell. *J Pediatr* 1967;70:166-71.
38. Collins CT, Sullivan TR, McPhee AJ, et al. A dose response randomised controlled trial of docosahexaenoic acid (DHA) in preterm infants. *PLEFA* 2015;99:1-6.
39. Smithers LG, Gibson RA, McPhee A, Makrides M. Effect of two doses of docosahexaenoic acid (DHA) in the diet of preterm infants on infant fatty acid status: results from the DINO trial. *PLEFA* 2008;79:141-6.
40. Sapienza P, Stahl A, Chen J, et al. 5-Lipoxygenase metabolite 4-HDHA is a mediator of the antiangiogenic effect of omega-3 polyunsaturated fatty acids. *Sci Transl Med* 2011;3:69ra12.
41. Stahl A. PPAR γ Mediates a Direct Antiangiogenic Effect of ω 3-PUFAs in Proliferative Retinopathy. *Circ Res* 2010;107:495-500.

42. Augood C, Chakravarthy U, Young I, et al. Oily fish consumption, dietary docosahexaenoic acid and eicosapentaenoic acid intakes, and associations with neovascular age-related macular degeneration. *Am J Clin Nutr* 2008;88:398-406.
43. Chua B, Flood V, Rochtchina E, et al. Dietary fatty acids and the 5-year incidence of age-related maculopathy. *Arch Ophthalmol* 2006;124:981-6.
44. Tikhonenko M, Lydic TA, Opreanu M, et al. N-3 polyunsaturated Fatty acids prevent diabetic retinopathy by inhibition of retinal vascular damage and enhanced endothelial progenitor cell reparative function. *PLoS One* 2013;8:e55177.
45. Calder PC. Marine omega-3 fatty acids and inflammatory processes: Effects, mechanisms and clinical relevance. *Biochim Biophys Acta* 2015;1851:469-84.
46. Hong HK, Lee HJ, Ko JH, et al. Neonatal systemic inflammation in rats alters retinal vessel development and simulates pathologic features of retinopathy of prematurity. *J Neuroinflammation* 2014;11:87.
47. Hartnett ME. Pathophysiology and mechanisms of severe retinopathy of prematurity. *Ophthalmology* 2015;122:200-10.
48. Stahl A, Sapieha P, Connor KM, et al. Short communication: PPAR gamma mediates a direct antiangiogenic effect of omega 3-PUFAs in proliferative retinopathy. *Circ Res* 2010;107:495-500.

Table 1: Main characteristics of the population

| | Total population n = 26 | ROP n = 12 | No ROP n = 11 | p Value |
|-------------------------------|----------------------------|------------------|------------------|---------------|
| Sampling time (hours) | 12 [12-48] | 12 [12-36] | 12 [12-48] | 0.5959 |
| Gender (male) | 12 (46.1) | 6 (50.0) | 5 (45.5) | 0.8274 |
| Gestational age (weeks) | 27.1 [26.1-28.1] | 26.5 [25.8-27.1] | 27.6 [27.3-28.6] | 0.0123 |
| Birth weight (grams) | 885 [752-1100] | 800 [730-886] | 1020 [885-1180] | 0.0149 |
| ROP | 12 (46.1) | 12 (100) | - | - |
| ROP treated | 1 (3.8) | 1 (8.3) | - | - |
| ROP detection (weeks) | 7.1 [6.4-8.4] | 7.1 [6.4-8.4] | - | - |
| Mechanical ventilation (days) | 9.0 [2.0-14.0] | 12.0 [9.3-19.8] | 4.0 [2.0-8.5] | 0.0518 |
| Sepsis | 10 (38.5) | 7 (58.3) | 3 (27.3) | 0.1333 |
| Erythropoietin use | 13 (50.0) | 6 (50.0) | 6 (54.5) | 0.8274 |
| RBC transfusion | 17 (65.4) | 10 (83.3) | 7 (63.6) | 0.2825 |
| Cerebral haemorrhage | 13 (50.0) | 5 (71.7) | 6 (54.5) | 0.5368 |

Continuous variables are expressed as median [IQR], categorical variables are expressed as number (%)

ROP: retinopathy of prematurity; RBC: red blood cells

p values in bold indicate a statistically significant difference ($p < 0.05$)

Table 2: Erythrocyte fatty acid composition of preterm infants without or with retinopathy of prematurity

| | No ROP n = 11 | | ROP n = 12 | | p Value |
|-------------------|---------------|----------------------|--------------|----------------------|---------------|
| | Median | IQR | Median | IQR | |
| C14:0 | 0.20 | [0.18-0.28] | 0.16 | [0.15-0.22] | 0.0785 |
| C15:0 | 0.24 | [0.19-0.34] | 0.21 | [0.14-0.26] | 0.5232 |
| DMA16:0 | 1.55 | [1.43-2.13] | 1.62 | [1.41-1.93] | 0.3846 |
| C16:0 | 33.63 | [26.70-38.27] | 31.88 | [28.38-36.62] | 0.9279 |
| C16:1n-9 | 0.19 | [0.10-0.28] | 0.19 | [0.12-0.20] | 0.5987 |
| C16:1n-7 | 0.36 | [0.16-0.44] | 0.21 | [0.17-0.40] | 0.8051 |
| C17:0 | 0.69 | [0.56-0.90] | 0.89 | [0.52-0.95] | 0.9019 |
| DMA18:0 | 4.77 | [4.38-5.07] | 4.61 | [4.06-5.43] | 0.8294 |
| DMA18:1n-9 | 0.31 | [0.18-0.63] | 0.25 | [0.12-0.67] | 0.7115 |
| DMA18:1n-7 | 0.18 | [0.11-0.20] | 0.17 | [0.09-0.20] | 0.7112 |
| C18:0 | 29.68 | [23.09-39.21] | 35.62 | [21.94-39.87] | 0.8801 |
| C18:1t | 0.18 | [0.16-0.22] | 0.18 | [0.16-0.21] | 0.8286 |
| C18:1n-9 | 4.48 | [1.86-9.87] | 3.58 | [0.68-9.66] | 1.0000 |
| C18:1n-7 | 0.62 | [0.35-1.53] | 0.64 | [1.18-1.46] | 0.7348 |
| C18:2n-6 | 1.17 | [0.67-2.87] | 1.59 | [0.31-2.42] | 0.7398 |
| C20:0 | 0.38 | [0.28-0.46] | 0.42 | [0.30-0.62] | 0.6002 |
| C20:1n-9 | 0.20 | [0.15-0.22] | 0.21 | [0.12-0.24] | 0.8529 |
| C18:3n-3 | 0.07 | [0.05-0.10] | 0.08 | [0.06-0.09] | 0.6418 |
| C20:2n-6 | 0.12 | [0.10-0.16] | 0.14 | [0.14-0.16] | 0.2388 |
| C20:3n-9 | 0.29 | [0.17-0.50] | 0.18 | [0.16-0.38] | 0.2949 |
| C22:0 | 0.92 | [0.64-1.18] | 0.81 | [0.58-1.28] | 0.9754 |
| C20:3n-6 | 1.15 | [0.76-2.00] | 0.98 | [0.41-1.76] | 0.3469 |
| C20:4n-6 | 5.39 | [1.80-12.98] | 5.04 | [0.49-14.06] | 0.8327 |
| C20:5n-3 | 0.37 | [0.25-0.51] | 0.34 | [0.13-0.41] | 0.2417 |
| C24:0 | 2.44 | [1.88-3.23] | 2.47 | [1.70-3.77] | 0.9754 |
| C24:1n-9 | 0.96 | [0.50-1.17] | 0.93 | [0.47-1.14] | 1.0000 |
| C22:4n-6 | 1.14 | [0.46-2.14] | 1.25 | [0.30-2.41] | 1.0000 |
| C22:5n-6 | 0.34 | [0.22-0.76] | 0.38 | [0.13-0.80] | 0.4598 |
| C22:5n-3 | 0.23 | [0.16-0.27] | 0.19 | [0.10-0.32] | 0.7814 |
| C22:6n-3 | 1.71 | [0.44-2.65] | 1.09 | [0.16-2.91] | 0.6006 |
| Total SFA | 74.95 | [53.48-82.85] | 77.54 | [52.27-88.16] | 0.8327 |
| Total MUFA | 6.66 | [3.44-13.83] | 5.79 | [2.27-13.62] | 0.9759 |
| Total PUFA | 11.69 | [5.04-25.43] | 11.10 | [2.61-26.04] | 0.6947 |
| Total DMA | 7.13 | [6.48-7.64] | 6.88 | [5.90-7.34] | 0.3887 |
| Total n-3 | 2.35 | [0.97-3.45] | 1.56 | [0.71-3.77] | 0.7859 |
| Total n-6 | 9.17 | [3.94-21.41] | 9.36 | [1.74-21.71] | 0.6075 |
| n-6/n-3 | 4.47 | [3.17-5.64] | 5.24 | [2.46-5.88] | 0.7398 |

Results are expressed as % of total fatty acid methyl esters (FAMES) + dimethylacetals (DMAs)

ROP: retinopathy of prematurity; IQR: inter quartile range; DMA: dimethylacetals;

SFA: saturated fatty acids; MUFA: monounsaturated fatty acids; PUFA: polyunsaturated fatty acids

Figure Legends

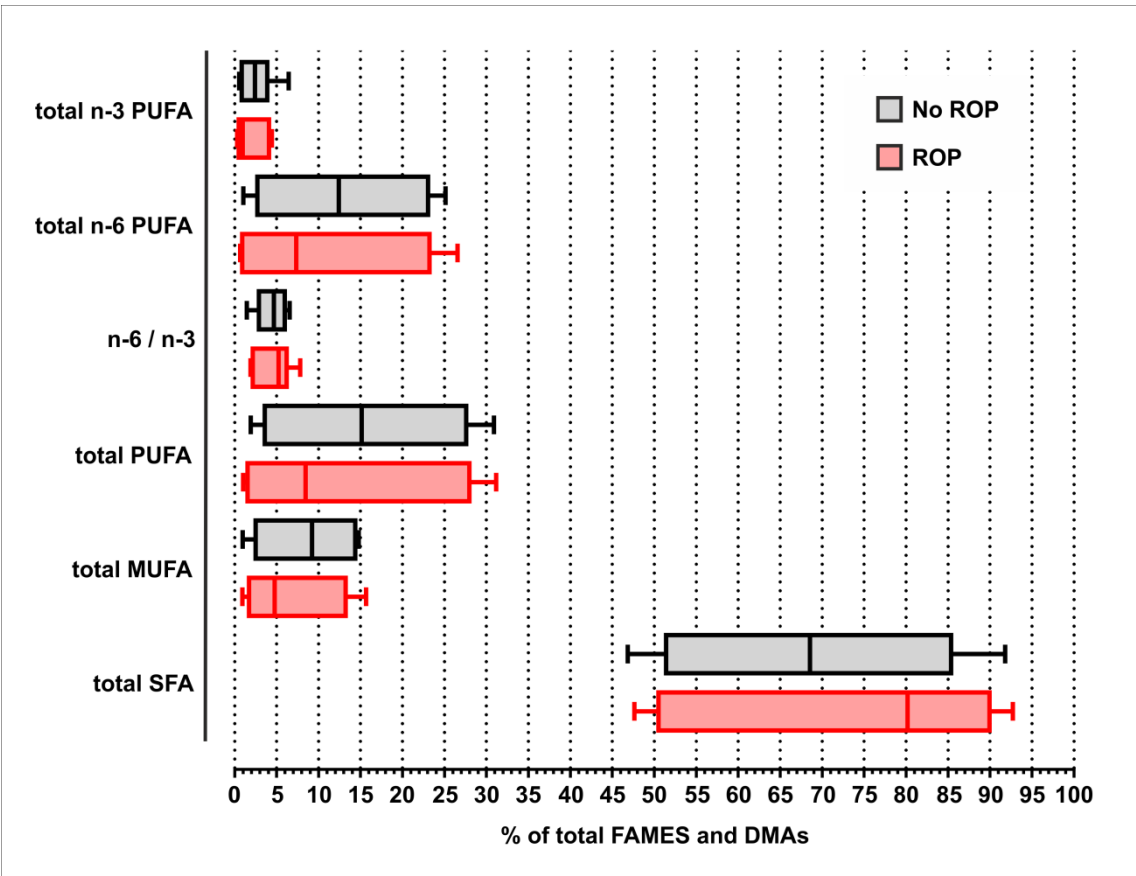


Figure 1: Distribution of total n-6 to total n-3 PUFA ratio, total n-3 PUFA, total n-6 PUFA, total DMA, total MUFA, total PUFA, and total SFA in ROP and no ROP groups. Results are presented as median, first and third quartiles and minimum and maximum in the no ROP and ROP groups. SFA: saturated fatty acids; MUFA: monounsaturated fatty acids; PUFA: polyunsaturated fatty acids.

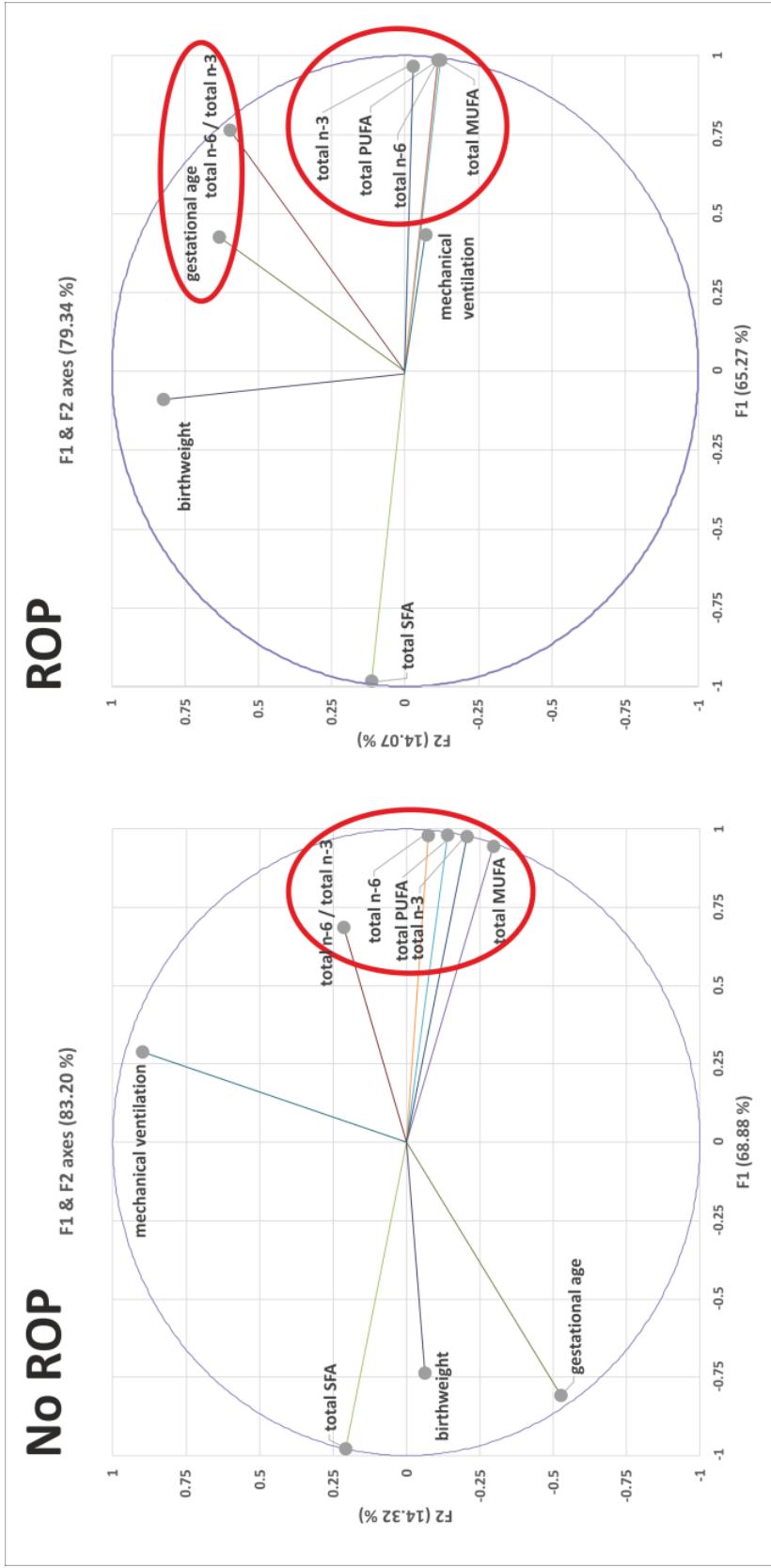


Figure 2: Principal component analysis of erythrocyte fatty acids and major risk factors of ROP in subjects suffering or not from ROP. SFA: saturated fatty acids; MUFA: monounsaturated fatty acids; PUFA: polyunsaturated fatty acids

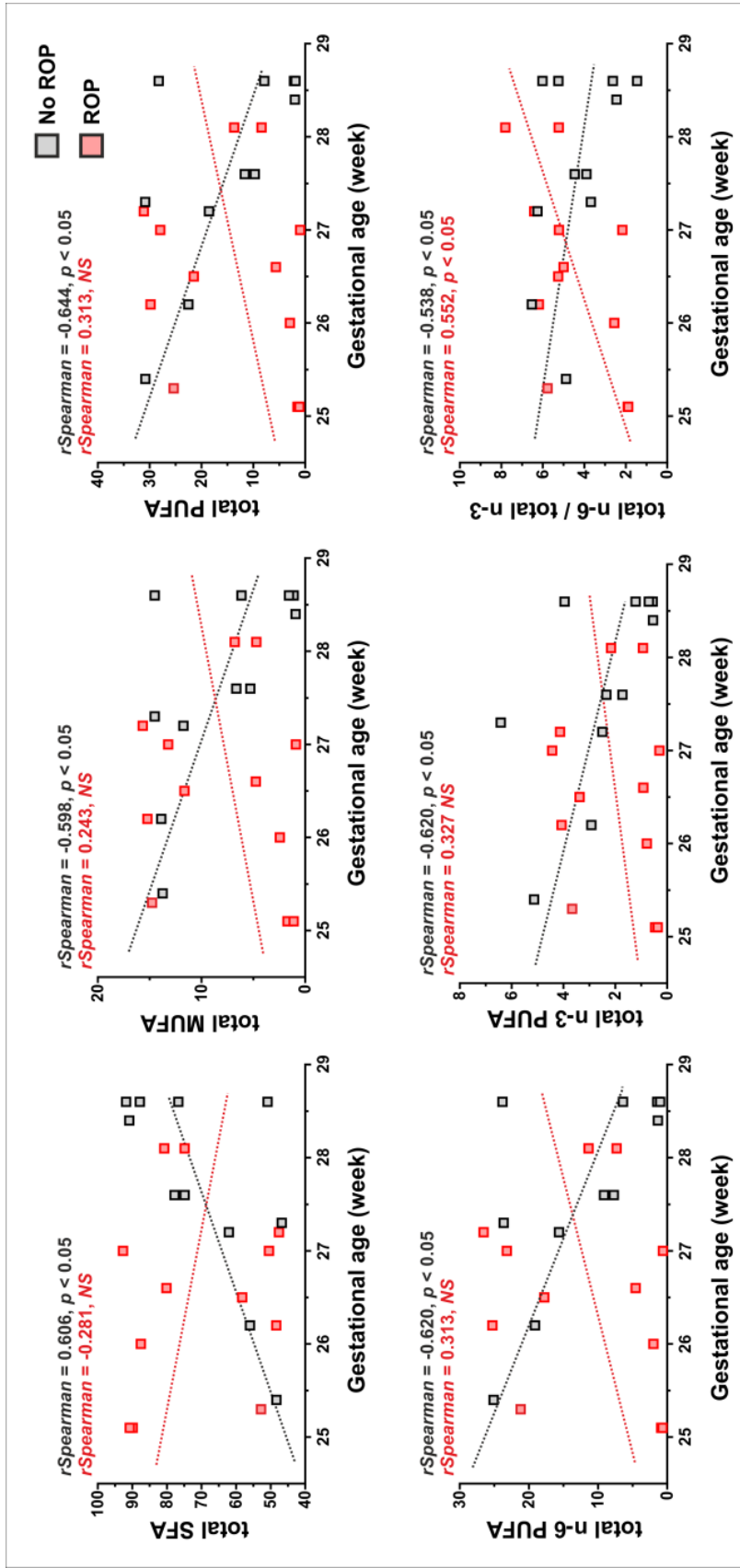


Figure 3: Association between gestational age and total SFA, total MUFA, total PUFA, total n-6 PUFA, total n-3 PUFA, and total n-6 PUFA to total n-3 PUFA ratio in preterm infants with or without ROP. SFA: saturated fatty acids; MUFA: monounsaturated fatty acids; PUFA: polyunsaturated fatty acids.

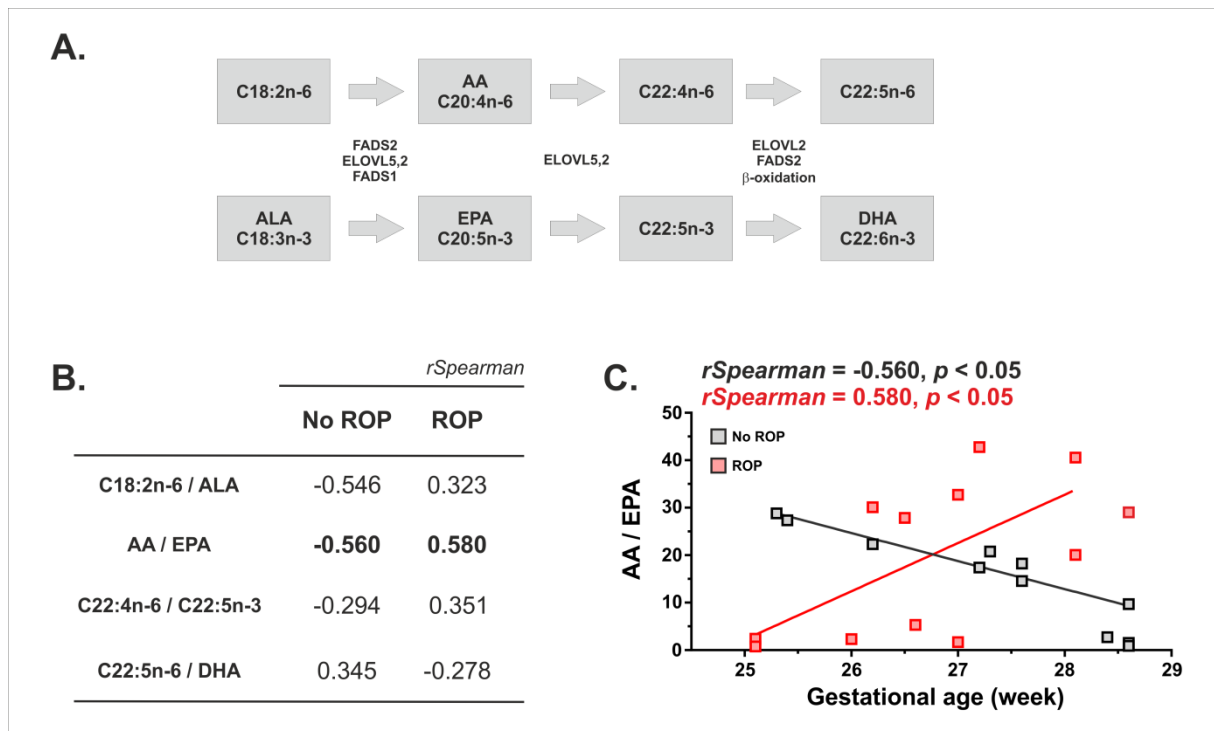


Figure 4: Origin of the differential evolution of the n-6 PUFA to n-3 PUFA ratio according to gestational age. **A.** Sequence of metabolic reactions leading to n-3 and n-6 long-chain PUFA synthesis. DHA and C22:5n-6 are synthesized from ALA and C18:2n-6, respectively, through metabolic reactions involving Fatty Acid Desaturase 2 (FADS2), ELongation of Very Long-chain fatty acid 5,2 (ELOVL5,2), Fatty Acid Desaturase 1 (FADS1), and β -oxidation. **B.** Spearman correlations between gestational age and n-6 to n-3 ratio for PUFAs with 18 carbon atoms (C18:2n-6 / ALA), 20 carbon atoms (AA / EPA), and 22 carbon atoms (C22:4n-6 / C22:5n-3 and C22:5n-6 / DHA). Values in bold are statistically significant ($p < 0.05$). **C.** Association between gestational age and AA to EPA ratio in preterm infants with or without ROP.

Résultats principaux, complémentaires et conclusions

Tout d'abord cette étude réalisée chez les enfants prématurés a montré une corrélation entre l'âge gestationnel au moment de la naissance et la biodisponibilité de certains AGPI dans les globules rouges. Chez les prématurés ne développant pas de ROP, nous avons pu observer une association négative entre le rapport AGPI n-6/AGPI n-3 et l'âge gestationnel suggérant une accumulation des AGPI n-3 pendant la gestation. Chez les sujets développant une ROP, cette tendance est inversée ce qui suppose une accumulation des AGPI n-6. Plus spécifiquement, nos données suggèrent que le rapport AA (n-6)/EPA (n-3) est le principal acteur à l'origine de ces différences. La modification potentielle des AGPI peut par conséquent affecter les métabolites actifs qui dérivent de ces AGPI et notamment ceux pouvant influencer la production systémique et/ou tissulaire des prostaglandines et donc influencer le statut inflammatoire des enfants. L'inflammation étant un facteur de risque de développer une ROP (Lee and Dammann 2012), nous nous proposons d'évaluer les concentrations circulantes en PGE2 (dérivé de l'AA) et PGE3 (dérivé de l'EPA) dans les plasmas de nos sujets.

En complément des données de l'article, nous avons testé les associations entre les teneurs en DMA et celles des AGPI n-6 et n-3. Les DMA sont produits à partir des alcools gras issus de la position sn-1 des plasmalogènes au cours de la phase de trans-méthylation avant l'analyse par chromatographie gazeuse couplée à un détecteur par ionisation de flamme (CG-FID). Les teneurs en DMA sont donc représentatives des teneurs en plasmalogènes d'un échantillon. Les résultats de l'analyse complémentaire montrent que les DMA18:1 sont associés positivement avec les AGPI n-6 (AA et DPAn-6) et les AGPI-3 (EPA et DHA), ce qui suggère que ces dérivés sont issus du même phospholipide (Figure 26). Ces données semblent donc confirmer que les AGPI comme l'AA et l'EPA sont portés par des plasmalogènes et confirment le rôle de réservoir d'AGPI attribué à ces phospholipides. Une analyse similaire avec les acides gras saturés totaux, ou un acide gras saturé comme le C24:0 montre à l'inverse une association négative, qui est attendue puisque les plasmalogènes ne sont pas connus pour porter spécifiquement les acides gras saturés. Dans un second temps, une fois l'inclusion de tous les sujet terminée, nous nous intéresserons aux phospholipides sur lesquels sont estérifiés les AGPI et regarderons notamment s'il existe une corrélation entre la nature des phospholipides et le risque de développer une ROP. Ces analyses nous permettront de confirmer formellement les corrélations

observées dans cette étude. L'analyse structurale des phospholipides des érythrocytes des sujets se fera par chromatographie liquide couplée à une analyse par spectrométrie de masse en tandem (Berdeaux, Juaneda et al. 2010; Acar, Berdeaux et al. 2012; Nagy, Brahmhatt et al. 2012; Koehrer, Saab et al. 2014). Cette partie sera réalisée en collaboration avec la plateforme Chemosens du Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation.

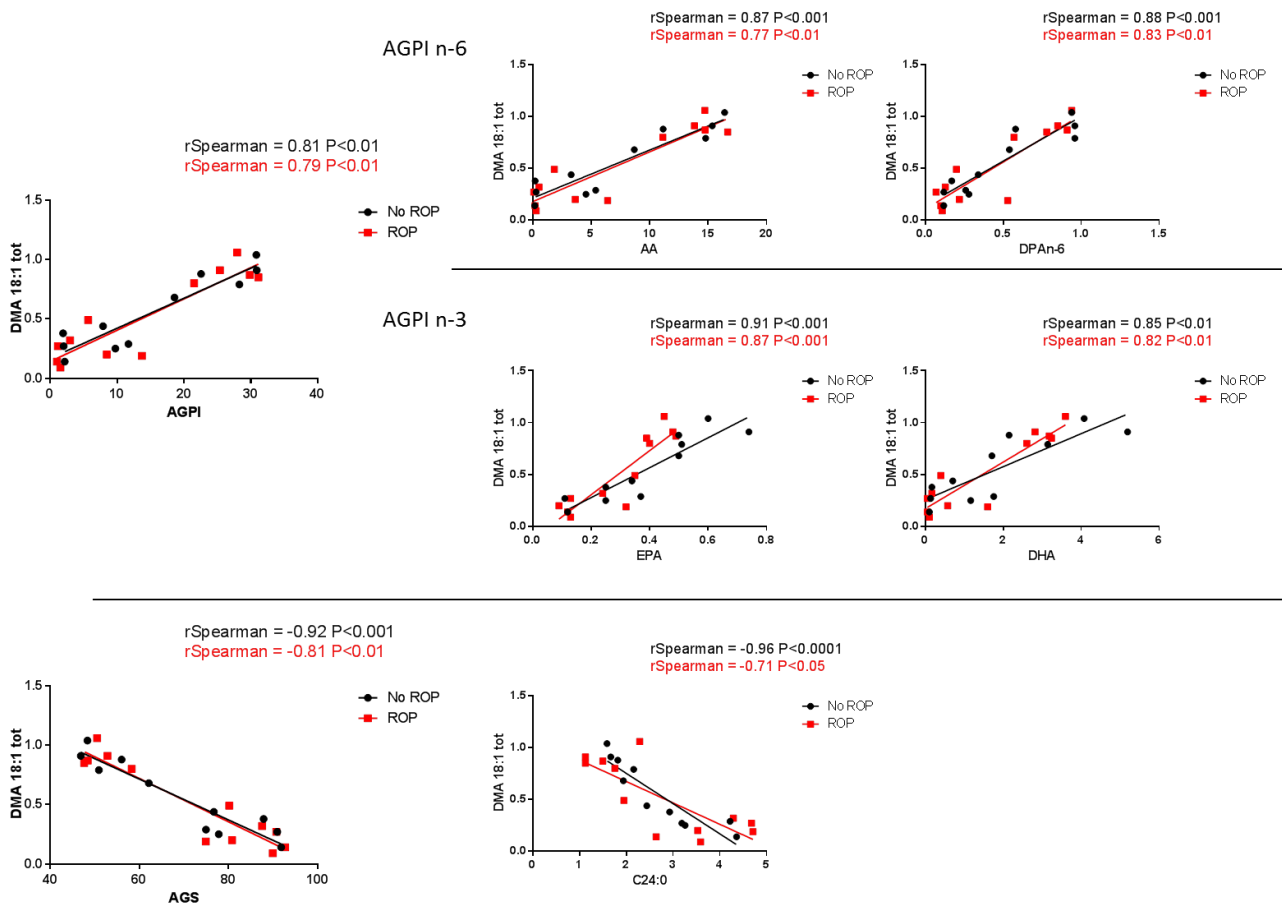


Figure 26 : Association entre les teneurs en DMA 18:1 et les AGS et AGPI

Les corrélations sont positives entre les teneurs en DMA18:1 totales (DMA 18:1 tot) et les AGPI, que ce soit AGPI n-6 (AA et DPAn-6) ou AGPI n-3 (EPA et DHA). Les corrélations sont négatives entre DMA18:1 et les acides gras saturés (AGS), comme par exemple l'AGS C24:0. AA : acide arachidonique, AGPI : acide gras polyinsaturés, AGS : acide gras saturés, DHA : acide docosahexaénoïque, DPA n-6 : acide docosapentaénoïque n-6, EPA : acide eicosapentaénoïque.

***Chapitre 6 : Discussion des
résultats, conclusions et
perspectives***

Dans les pays industrialisés, les rétinopathies à composante vasculaires telles la RD ou la DMLA sont les premières causes de malvoyance à l'âge adulte. Chez l'enfant la première cause de cécité par rétinopathie est la ROP. La prolifération vasculaire incontrôlée de la rétine est à l'origine de l'évolution de ces rétinopathies vers des stades les plus sévères pouvant mener à la cécité. L'enjeu est donc de réussir à prévenir ou éventuellement contrôler cette réaction vasculaire anormale du tissu. La prise en charge médicale pour ce type de rétinopathie classiquement basée sur la photocoagulation au laser des zones rétinienne ischémiques a s'est récemment enrichie de traitements anti-VEGF pour contrôler et/ou inhiber la néovascularisation. Néanmoins ces traitements ne sont pas adaptés à tous les patients et leur innocuité reste discutée. Depuis quelques années, de nombreux travaux suggèrent que les lipides alimentaires et les AGPI pourraient potentiellement prévenir et/ou retarder les phénomènes de vascularisation pathologique. Or, les lipides sont souvent diabolisés dans nos sociétés. En effet, leur surconsommation est associée à l'obésité, les maladies cardiovasculaires et la dyslipidémie. Néanmoins les lipides sont la source principale des acides gras précurseurs de métabolites biologiquement actifs. Ces acides gras et leurs métabolites sont impliqués dans la signalisation cellulaire, la modulation des processus inflammatoires, la neuroprotection mais aussi la modulation de l'angiogenèse rétinienne (SanGiovanni and Chew 2005; Handa, Cano et al. 2016). Les lipides représentent une source d'énergie importante puisqu'un gramme de lipide apporte approximativement 9 kilocalories (contre 4 kilocalories pour un gramme de glucide) (Atwater 1894). L'ANSES recommande chez l'adulte un apport en lipides de 30 % minimum de l'apport énergétique quotidien (45 à 50 % chez le nourrisson et l'enfant de moins de trois ans) (Comité d'Experts Spécialisé Nutrition humaine - Groupe de travail ANC acides gras mai 2011). Dans ses recommandations, l'ANSES préconise aussi une consommation minimum de 500 mg/jour d'AGPI n-3 (DHA + EPA). La rétine neurale étant riche en AGPI (Fliesler and Anderson 1983; Bretilon, Thuret et al. 2008; Acar, Berdeaux et al. 2012), l'apport en lipide alimentaire est essentiel au maintien des fonctions visuelles. Idéalement le rapport AGPI n-6/AGPI n-3 devrait se situer entre 1/1 et 4/1. Les AGPI n-3 pourraient jouer un rôle préventif dans l'apparition et le développement des rétinopathies à composante vasculaire. D'après l'ANSES, parmi les maladies étudiées, seules les études relatives à la DMLA permettent d'établir des apports nutritionnels conseillés, à savoir, 250 mg de DHA, plus 250 mg d'EPA et moins de 4 % de l'apport énergétique d'acide linoléique (18:2n-6).

Dans l'organisme, la plupart des AGPI sont soit stockés sous forme de triglycérides dans le tissu adipeux soit estérifiés sur des phospholipides composant la membrane plasmique des cellules. Les plasmalogènes sont une classe particulière de phospholipides présentant une liaison vinyl-éther en position *sn*-1 de leur base glycérol. Cette liaison particulière confère aux membranes plasmiques des propriétés physiques particulières. Les plasmalogènes estérifient de

manière préférentielle les AGPI en position *sn*-2, ils sont donc considérés comme étant des réservoirs d'AGPI. Les plasmalogènes sont distribués de manière hétérogène en fonction des organes. Ils sont retrouvés en grande concentration dans le cerveau mais aussi au niveau de la sphère oculaire et notamment dans la rétine neurale. Les AGPI sont libérés des plasmalogènes sous l'action d'une phospholipase spécifique des plasmalogènes appartenant à la famille des iPLA2 (Wolf and Gross 1985; Hazen, Zupan et al. 1991; Farooqui, Yang et al. 1995). En conditions physiologiques cette enzyme participe au maintien des fonctions cellulaires en approvisionnant les cellules en messagers secondaires dérivés des AGPI. Au contraire, en conditions pathologiques, les iPLA2 spécifiques des plasmalogènes peuvent être impliquées dans un excès de libération d'acides gras libres pouvant être responsable d'affections cellulaires comme notamment des dysfonctions mitochondriales, une altération de la perméabilité membranaire ou encore une augmentation de la sensibilité des organites aux espèces réactives de l'oxygène (Farooqui, Yang et al. 1995). L'absence de plasmalogènes affecte l'organisme et ses fonctions fondamentales comme par exemple la vision et la reproduction (Rodemer, Thai et al. 2003). Plus précisément, au niveau oculaire, l'absence de plasmalogènes entraîne la persistance du réseau vasculaire hyaloïde à l'âge adulte (Rodemer, Thai et al. 2003) alors que celui-ci est censé avoir régressé au cours de la période périnatale (Ito and Yoshioka 1999). Cette déficience en plasmalogènes conduit également à de nombreuses anomalies vasculaires au cours du développement. Un retard de croissance du réseau vasculaire rétinien est observé à 7 jours en post natal chez la souris DAPAT avec une forte activation des astrocytes et une modification de l'expression des gènes pro et anti angiogéniques. De plus, des anomalies morphologiques comme une dilatation, une tortuosité et une hyperdensité des capillaires rétiniens ont été observés à l'âge adulte chez ces souris déficientes en plasmalogènes (Saab, Buteau et al. 2014). Les plasmalogènes interviennent dans les mécanismes du développement vasculaire rétinien post-natal chez la souris et pourraient à ce titre présenter un intérêt potentiel dans le contrôle et la prévention de pathologies oculaires à composante vasculaires, et en particulier au cours de la ROP (Saab, Buteau et al. 2014). L'action des plasmalogènes sur le développement de la vascularisation rétinienne passerait par la libération des AGPI sous l'action des iPLA2 spécifiques des plasmalogènes (Saab, Buteau et al. 2014). Puisque les cellules de Müller participent au métabolisme des lipides dans la rétine (Shanmugaratnam, Berg et al. 1997) et produisent des facteurs pro et anti-angiogéniques (Eichler, Yafai et al. 2004), nous avons formulé l'hypothèse selon laquelle ces cellules pourraient être des acteurs impliqués dans les anomalies vasculaires rétiniennes retrouvées chez les souris DAPAT.

Ce travail a permis dans un premier temps de prouver que les cellules de Müller synthétisent les plasmalogènes. Les travaux réalisés au laboratoire en 2007 ont montré que les ARN messagers de la DHAP-AT étaient localisés au niveau des segments internes des

photorécepteurs, de la couche des RPE et au niveau de la couche plexiforme externe. Le marquage observé au niveau des segments internes des photorécepteurs pourrait donc correspondre aux villosités des cellules de Müller enserrant les photorécepteurs. De même, les cellules de Müller traversant toutes les couches de la rétine, le marquage détecté au niveau de la couche plexiforme externe pourrait aussi correspondre aux corps cellulaires des cellules de Müller. Compte tenu de la position des cellules de Müller dans la rétine et du fait qu'elles synthétisent les plasmalogènes, l'idée d'une importance physiologique des plasmalogènes dans la rétine est renforcée. De plus, nous avons pu montrer que les cellules de Müller présentent des taux de plasmalogènes plus élevés que ceux de la rétine entière, suggérant une concentration de ces lipides dans ces cellules.

La deuxième étape de ce projet a été de caractériser le métabolisme des plasmalogènes dans les cellules de Müller. N'ayant pas de souris DAPAT à disposition du fait de problèmes d'élevage, nous avons dû mettre au point un modèle d'inhibition de la synthèse des plasmalogènes dans les cellules de Müller en culture primaire. Pour ce faire, nous avons utilisé une technique d'inhibition par transfection de siRNA dirigés contre l'ARNm de la DHAP-AT, enzyme clef de la synthèse des plasmalogènes. Cette méthode a permis d'observer une diminution des teneurs en plasmalogènes de plus de 50 %. Même si cette diminution n'a pas été totale, elle a suffi à modifier la physiologie des cellules de Müller, tout en conservant leur viabilité. Des travaux sur des cellules de Müller provenant d'animaux DAPAT auraient été envisageables mais cette inhibition aurait pu affecter la viabilité de nos cellules en culture. Une optimisation de l'utilisation des siRNA pour obtenir une diminution du taux de plasmalogènes plus importante est également envisageable afin de se rapprocher du modèle des souris DAPAT mais sans affecter la survie des cellules de Müller. La diminution des teneurs en plasmalogènes entraîne une diminution de la capacité à migrer des cellules de Müller. En cas de lésion rétinienne, les noyaux des cellules de Müller sont capables de migrer le long de leur processus au niveau du site lésé pour participer à la régénération de la rétine (Tackenberg, Tucker et al. 2009). Bien que ces cellules ne migrent pas à proprement parler dans la rétine, en cas de stress rétinien, elles sont capables d'étendre des prolongements cytoplasmiques pour aller secourir les cellules neuronales en ayant besoin (Lewis and Fisher 2000). La diminution de la capacité à migrer des cellules de Müller en cas de diminution des teneurs en plasmalogènes pourrait donc être un reflet de l'altération de leur capacité à soutenir les neurones rétiniens en conditions de stress. Cependant la diminution du taux de plasmalogènes n'a pas été suffisante pour que les cellules de Müller entrent complètement en gliose. Deux des marqueurs de gliose non spécifique des cellules de Müller sont la surexpression de la protéine GFAP et l'activation de la protéine ERK (Bringmann, Pannicke et al. 2006). Même si nous avons observé une activation de la protéine ERK dans nos cultures de cellules de Müller transfectées par siRNA, l'inhibition de la DHAP-AT

n'a pas permis d'augmenter l'expression protéique de la GFAP comme observé sur les coupes de souris DAPAT. En effet, en absence de plasmalogènes, les cellules de Müller des souris DAPAT expriment fortement la GFAP en comparaison aux cellules de Müller des souris contrôles. Dans notre modèle cellulaire, l'inhibition de la synthèse des plasmalogènes n'est peut-être pas assez importante pour entraîner une activation suffisante des cellules de Müller et donc pour augmenter l'expression de la GFAP comme observé dans le cas d'une inhibition totale de la protéine de synthèse des plasmalogènes. La phosphorylation précoce des protéines ERK est aussi une étape permettant aux cellules de Müller d'exercer leur action neuroprotectrice contre la neurotoxicité induite par le glucose par exemple (Matteucci, Gaddini et al. 2014). Dans notre étude une phosphorylation des protéines ERK a été observée suite à la diminution des teneurs en plasmalogène. Au cours de la mise en place de la réponse gliale, une variation de la phosphorylation des protéines ERK peut potentiellement se produire. La phosphorylation des protéines étant un phénomène transitoire, une étude cinétique de la phosphorylation des protéines pourrait compléter notre travail.

Les cellules de Müller sont capables de se différencier et de proliférer en réponse à une lésion par laser de la rétine (Kohno, Sakai et al. 2006). Elles expriment alors différentes protéines et notamment la protéine Ki67, marqueur spécifique de la prolifération. Cette expression est transitoire, elle est retrouvée 3 jours après les impacts lasers mais a disparu au bout de 7 jours (Kohno, Sakai et al. 2006). Dans notre étude, sur les cellules de Müller en culture, nous n'avons pas observé de différence au niveau du taux de prolifération des cellules de Müller en fonction des différents traitements. En effet, nos observations ont été faites 4 jours après l'inhibition de la synthèse des plasmalogènes. Il serait donc intéressant par la suite de réaliser une étude de la prolifération à différents temps après nos traitements.

De manière étonnante et contrairement aux résultats obtenus précédemment au laboratoire (Saab, Buteau et al. 2014), nous n'avons pas observé de différence dans le phénotype des cellules de Müller dont l'activité iPLA2 a été inhibée par un traitement au BEL. La rétine a une activité iPLA2 qui est réduite après un traitement au BEL (Kolko, Wang et al. 2007; Saab-Aoude, Bron et al. 2013). Les astrocytes en culture primaire possèdent également une activité iPLA2 (Xu, Yu et al. 2003). Dans la rétine, Kolko et al. ont observé un marquage de l'expression protéique des iPLA2 dans la couche des fibres nerveuses, dans la couche des cellules ganglionnaires, dans la couche plexiforme interne et externe, au niveau des segments internes des photorécepteurs et de l'épithélium pigmentaire (Kolko, Wang et al. 2007). A notre connaissance, il n'y a pas de publication étudiant spécifiquement l'activité iPLA2 dans les cellules de Müller, mais à la vue des données précédentes, on peut supposer que cette activité existe. Mesurer l'activité iPLA2 dans les cellules de Müller en culture nous aurait permis de connaître le pourcentage d'inhibition de l'enzyme par le BEL et donc de pouvoir conclure quant aux résultats obtenus. Le BEL n'est

cependant pas l'inhibiteur idéal des iPLA2 spécifiques des plasmalogènes puisqu'il inhibe également d'autres isoformes de cette enzyme. Les résultats obtenus avec le traitement au BEL, pourraient donc ne pas être représentatifs d'une inhibition des iPLA2 spécifiques des plasmalogènes.

Comme pour le cortex cérébral des souris DAPAT (Rodemer, Thai et al. 2003), nous avons observé que la diminution des teneurs en plasmalogènes des cellules de Müller entraîne une forte diminution de l'expression de la connexine 43. De la même manière, l'expression de la Cx43 est réduite dans les cultures d'astrocytes traités par les siRNA dirigés contre la DHAP-AT. La Cx43 est un constituant des jonctions gap permettant une diffusion passive de petites molécules, comme des ions calcium, entre deux cytoplasmes de cellules voisines (Beyer, Paul et al. 1987; Beyer, Kistler et al. 1989; Yamamoto, Ochalski et al. 1990; Dermietzel and Spray 1993). La Cx43 étant la protéine majeure des jonctions gap des cellules gliales rétiniennes, nous avons voulu étudier les conséquences de la diminution de son expression à travers l'étude des flux calciques échangés entre les cellules de Müller et les astrocytes. En traitant uniquement les cellules de Müller par les siRNA, nous nous sommes focalisés sur la communication initiée dans les cellules de Müller et se propageant vers les astrocytes. En effet, nous supposons que les anomalies du réseau astrocytaire observées chez les souris DAPAT pourraient avoir pour origine une mauvaise communication entre cellules gliales. Nous supposons que la mise en place du réseau astrocytaire au cours du développement pourrait être favorisée par les interactions entre les cellules de Müller et les astrocytes. Les cellules de Müller expriment la DHAP-AT et sont enrichies en plasmalogènes. De ce fait une inhibition de la synthèse des plasmalogènes chez les souris DAPAT, entrainerait une mauvaise communication entre cellules gliales et donc des défauts des structures du maillage du réseau astrocytaire.

Nous avons observé qu'une diminution des teneurs en plasmalogènes et donc une diminution de l'expression de la Cx43 dans les cellules de Müller entraîne un retard de transmission des ondes calciques aux astrocytes voisins, ce qui semble confirmer notre hypothèse. Les études à venir, en plus de confirmer cette hypothèse viserons à étudier la communication calcique entre les cellules de Müller et les astrocytes ayant tous les deux subis une inhibition de l'expression de la DHAP-AT. Ces expériences nous permettrons de faire la part des choses entre l'action des plasmalogènes sur l'initiation du signal à partir des cellules de Müller et l'implication des plasmalogènes sur la propagation des ondes calciques entre astrocytes, sachant que dans les conditions du modèle de souris DAPAT les plasmalogènes sont absents dans toutes les cellules. L'expression de la Cx43 étant diminuée dans ces deux types cellulaires, un délai plus important de la propagation des ondes calciques est supposé.

La diminution des teneurs en plasmalogènes diminuant l'expression de la Cx43 nous avons réalisé une étude préliminaire sur des souris utilisant un système CRE-Lox, floxées pour la Cx43

dans les astrocytes (Theis, de Wit et al. 2001). Des anomalies morphologiques des vaisseaux au niveau de la tête du nerf optique et une tortuosité de certains vaisseaux rétiniens ont été observées par angiographie du fond d'œil. Ces anomalies, bien que moins importantes, sont similaires à celles observées chez les souris DAPAT à l'âge adulte. Les défauts observés chez la souris DAPAT sont-ils la conséquence de l'inhibition de synthèse des plasmalogènes ou la conséquence d'une diminution de l'expression de la connexine 43 qui en découle ? Pour répondre à cette question, il serait intéressant d'étudier le développement vasculaire rétinien des souris Cx43 en reprenant le protocole d'étude mis en place au laboratoire par Saab et al (Saab, Buteau et al. 2014). Il s'agit d'un protocole permettant de visualiser la mise en place du réseau astrocytaire et le développement du réseau vasculaire par immunomarquage sur rétine à plat au cours des 21 premiers jours de vie. Trois marquages sont réalisés : GFAP, ILB4 et fibronectine. Le marquage GFAP permet la visualisation des astrocytes et le marquage ILB4 celle des cellules endothéliales. Le troisième marquage permet de visualiser la fibronectine, qui est une protéine de la matrice extra cellulaire produite par les astrocytes et qui promeut la prolifération et la migration des cellules endothéliales au cours du développement (Jiang, Liou et al. 1994). Cette étude nous permettrait de connaître l'impact de l'absence de la connexine 43 sur les différentes cellules impliquées dans le développement du réseau vasculaire rétinien chez la souris DAPAT. En effet, l'absence de Cx43 semble entraîner des défauts moins importants de la vascularisation rétinienne à l'âge adulte que l'absence de plasmalogènes. D'autres connexines pourraient-elle compenser la perte de la Cx43 ? Il serait intéressant d'étudier l'expression de différentes connexines dans la rétine des souris transgéniques pour la Cx43 mais aussi dans la rétine des souris DAPAT.

Bien que la Cx43 soit exprimée par les cellules de Müller et les astrocytes (Ball and McReynolds 1998; Johansson, Bruun et al. 1999; Zahs and Ceelen 2006; Kerr, Johnson et al. 2010) et qu'il existe un couplage électrique (Ceelen, Lockridge et al. 2001) et moléculaire (Robinson, Hampson et al. 1993) entre ces deux types cellulaires, certains auteurs suggèrent que l'échange par flux calcique se fait de manière unidirectionnelle, des astrocytes vers les cellules de Müller (Newman and Zahs 1997; Zahs and Newman 1997; Newman 2001). Certaines études de couplage par diffusion de molécules fluorescentes comme le fluorochrome Lucifer Yellow montrent un passage unidirectionnel des molécules, des astrocytes vers les cellules de Müller chez le lapin (Robinson, Hampson et al. 1993). Des études sur rétine de rat montrent que le Lucifer Yellow ne passe jamais d'un astrocyte à une cellule de Müller mais qu'il existe une diffusion d'un autre fluorochrome, la Neurobiotine des astrocytes aux cellules de Müller (Zahs and Newman 1997). Il existerait donc un couplage asymétrique entre les cellules de Müller et les astrocytes. En 2001, Trexler et *al.* observent que l'introduction d'une micropipette à travers la membrane plasmique des cellules pouvait entraîner la fermeture des jonctions gap entre les

cellules neuronales de la rétine (Trexler, Li et al. 2001). Un tel phénomène pourrait se produire entre les cellules gliales également. Ce phénomène pourrait potentiellement expliquer le fait que certains auteurs n'observent pas de diffusion de fluorochrome des cellules de Müller vers les astrocytes. A notre connaissance, aucune étude de la communication calcique sur co-culture primaire de cellules gliales de rétine n'a à ce jour été publiée. Dans notre étude, nous stimulons les cellules de Müller sans contact physique et nous observons une transmission de flux calcique partant d'une cellule de Müller vers les astrocytes voisins. L'analyse de la communication calcique sur rétine à plat réalisée par Newman en 2001, laisse penser qu'il existe deux modes de propagation des ondes calciques dans la rétine (Newman 2001). Ces propagations se feraient soit de manière intracellulaire d'astrocyte à astrocyte par diffusion d'inositol triphosphate, soit de manière extracellulaire par sécrétion d'ATP pour la communication entre astrocytes et cellules de Müller et d'une cellule de Müller à une autre. Les ondes calciques pourraient aussi se propager à partir de la stimulation d'une cellule de Müller vers les astrocytes voisins mais de manière moins fréquente et avec un délai de propagation plus important que des astrocytes vers les cellules de Müller (Newman 2001).

L'apparition des ondes calciques et leur propagation entre les cellules de Müller peut être initiée par l'activité neuronale (Newman 2004; Newman 2005). Une communication bidirectionnelle entre les neurones réiniens et les cellules gliales a été montrée dans la rétine (Newman 2004). La propagation des ondes calciques à travers le syncytium glial des astrocytes et des cellules de Müller pourrait donc représenter une voie de signalisation extra neuronale pouvant influencer l'activité de la rétine. L'analyse fonctionnelle par électrorétinographie des rétines des souris déficientes en plasmalogènes montre une altération spécifique de l'onde-b, c'est-à-dire une altération de la réponse des cellules neuronales de la rétine interne à une stimulation lumineuse (Saab, Buteau et al. 2014). L'absence de plasmalogènes pourrait entraîner une moins bonne communication entre les cellules gliales de la rétine, impactant alors le fonctionnement des neurones réiniens.

Nos premiers résultats concernant l'étude clinique OmegaROP réalisée sur des prélèvements sanguins d'enfants nés prématurément montrent que ces enfants ont un statut lipidique particulier. En effet, les sujets ont un taux d'acides gras saturés très élevé et un taux d'AGPI relativement faible en comparaison à des adultes (environ 70 % *versus* 53 % pour les acides gras saturés et 15 % *versus* 24 % pour les AGPI) (Yuan, Zhen et al. 2016) pouvant suggérer une maturation du métabolisme lipidique au cours de la gestation. Au cours du troisième semestre de gestation se produit une augmentation des AGPI-LC dans la circulation fœtale et notamment une augmentation des teneurs en DHA pour assurer la croissance cérébrale et le développement visuel (Cetin, Alvino et al. 2009). Chez les enfants nés prématurément, ce transfert d'AGPI-LC n'est pas complet, ce qui pourrait entraîner des anomalies dans le développement neuronal. Les

prélèvements sanguins, on été réalisé au cours des premières 48 heures de vie chez des enfants nés prématurément. De ce fait, les profils lipidiques observés sont un reflet du métabolisme *in utero*, vierge de toute influence nutritionnelle. Des études post-mortem ont montré que la composition en acides gras des érythrocytes était parfaitement corrélée à celle des structures nerveuses chez l'enfant et le jeune animal (Carlson, Carver et al. 1986; Makrides, Neumann et al. 1994; Sarkadi-Nagy, Wijendran et al. 2004). Les lipides sanguins étant le reflet des lipides oculaires, l'analyse des globules rouges des enfants prématurés pourra donc nous donner des informations sur le profil lipidique de leur rétine. L'étude OmegaROP a mis en évidence une corrélation positive entre l'âge gestationnel et le rapport AGPI n-6/AGPI n-3 et notamment avec le ratio AA/EPA chez les enfants développant une ROP. Cette corrélation est négative chez les enfants prématurés ne développant pas la maladie. Ces résultats suggèrent un remodelage de la balance AGPI n-6/AGPI n-3 en faveur des AGPI de la famille n-6 chez les enfants développant une ROP. Il semblerait que l'inflammation systémique des enfants nés prématurément soit un facteur de risque, sensibilisant la rétine et favorisant le développement d'une ROP (Lee and Dammann 2012). Nous supposons que le remodelage de la composition lipidique observé, dans cette étude, peut avoir un impact sur la production des métabolites issus de ces AGPI. Certains métabolites actifs des AGPI sont des acteurs importants des phénomènes d'inflammation et notamment les prostaglandines, PGE2 dérivée de l'AA et la PGE3 dérivée de l'EPA. La PGE2 et la PGE3 ont des actions antagonistes sur l'inflammation, globalement, PGE2 induit des réponses inflammatoires et PGE3 les réduit (Wiktorowska-Owczarek, Berezinska et al. 2015). Puisque les lipides ont un rôle fondamental dans la cascade inflammatoire par l'intermédiaire des AGPI et de leurs métabolites (Bennett and Gilroy 2016), nous procéderons à un dosage plasmatique des prostaglandines de la série 2 (PGE2) et de la série 3 (PGE3) issues respectivement de l'AA et de l'EPA. L'état inflammatoire des enfants pourra ainsi être corrélé à une éventuelle modification de la teneur en AGPI. En cas de stress oxydatif, les iPLA2 permettent de libérer les AGPI des phospholipides et des plasmalogènes (Farooqui, Yang et al. 1995). Comme nous avons observé des différences dans les profils lipidiques des enfants prématurés développant ou non une ROP, les réponses au stress médiées par les AGPI pourraient être modifiées en fonction du statut lipidique des enfants et notamment en fonction du rapport AGPI n-6/AGPI n-3.

Il serait par la suite intéressant de réaliser un suivi longitudinal de l'évolution des profils lipidiques des enfants nés prématurément pour confirmer les corrélations que nous avons obtenues des lipides en fonction de l'âge gestationnel des enfants. Cette analyse nous permettrait de savoir si les différences observées, dans le groupe ROP *versus* le non ROP, en fonction de l'âge gestationnel des enfants est aussi observé au cours du temps chez un même enfant. Il serait par la suite intéressant de réaliser ce même type d'étude mais en incluant les mères pour pouvoir comparer la composition lipidique des érythrocytes de la mère et ceux de

l'enfant. Dans un premier temps, nous pourrions étudier le statut lipidique maternel pour voir si des modifications en acides gras chez l'un sont retrouvées chez l'autre. Comme il n'y a pas encore d'influence de l'alimentation au stade où sont effectués les prélèvements chez les nouveau-nés prématurés, nous supposons que des modifications similaires seront observables chez la mère et chez son enfant. Si tel est le cas, la suite de l'étude sera de proposer une enquête alimentaire sous forme de questionnaire à la mère pour essayer de comprendre d'où peuvent provenir les éventuelles modifications des profils lipidiques. En fonction des résultats obtenus, une potentielle supplémentation en AGPI des femmes enceintes pourrait être envisagée. En effet, certaines études montrent qu'une supplémentation maternelle en AGPI n-3 est associée à une augmentation de la durée de gestation (Szajewska, Horvath et al. 2006) et à une diminution du statut inflammatoire du prématuré (Enke, Seyfarth et al. 2008). De plus, une étude sur les habitudes alimentaires maternelles pourrait nous renseigner sur l'origine d'éventuelles anomalies du profil lipidique. En effet, dans la littérature il a été suggéré qu'une supplémentation en AGPI n-3 dans l'alimentation de la mère pourrait prévenir la survenue d'une ROP chez des enfants nés prématurément en augmentant le taux d'adiponectine circulant dans le sérum des enfants (Fu, Lofqvist et al. 2015). Les AGPI sont stockés de manière préférentielle dans les plasmalogènes par rapport aux autres phospholipides. Au cours de l'étude des profils lipidiques de la première moitié des enfants prématurés, nous avons observé une association positive entre les taux d'AGPI (AA, DPA n-6, EPA et DHA) et le taux de DMA 18:1. Les diméthylacétal ou DMA sont des alcools gras méthylés provenant de la trans-méthylation des plasmalogènes lors des analyses par GC-FID. Ils permettent de déterminer la teneur en plasmalogènes d'un échantillon. Puisque l'association est positive, nous pouvons supposer que ces AGPI sont estérifiés sur les plasmalogènes. C'est aussi ce qui a été montré dans l'étude comparant les souris DAPAT aux souris ayant subi une inhibition de l'activité iPAL2 (Saab, Buteau et al. 2014). En effet, cette étude confirme que les défauts observés lors d'une déficience en plasmalogènes sont médiés à travers la libération des AGPI estérifiés sur les plasmalogènes. L'origine des AGPI semble donc être importante. Les corrélations obtenues entre les AGPI et les plasmalogènes, au cours de l'étude OmegaROP, restent à confirmer. Une analyse lipidique par chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse en tandem nous permettra de déterminer la structure des phospholipides sur lesquels sont estérifiés les AGPI. Cette analyse sera réalisée au terme des inclusions des sujets de l'étude OmegaROP, en août 2017.

Pour moduler les teneurs en AGPI de la rétine, nous supposons qu'il faudrait en plus d'une supplémentation en AGPI, permettre leur estérification dans les plasmalogènes. Les alkyglycérol sont des précurseurs des plasmalogènes qui administrés dans le cadre d'une supplémentation alimentaire, permettent une augmentation des teneurs en plasmalogènes chez des individus ou des rongeurs déficients (Das, Holmes et al. 1992) ou bien le remplacement des plasmalogènes

existants par des néo-plasmalogènes dans les organismes non déficients (Rosenberger, Oki et al. 2002). Cette supplémentation en plasmalogènes permettrait en particulier d'inverser les déficits observés lors d'une absence de plasmalogènes. Chez des souris DAPAT, déficientes en plasmalogènes, une supplémentation en alkylglycérols permet d'augmenter les teneurs en plasmalogènes dans différents tissus et permet également de stopper la progression de certains déficits spécifiques à ces souris, comme par exemple la modification de la taille des adipocytes dans les glandes de Harder et le métabolisme intra-testiculaire des spermatoocytes (Brites, Ferreira et al. 2011). Une supplémentation en alkylglycérol, lorsque les plasmalogènes cellulaires sont présents dans des teneurs physiologiques, ne permet pas d'augmenter la concentration en plasmalogènes au-delà des seuils physiologiques. De plus, une supplémentation concomitante en AGPI pourrait permettre d'influencer la composition en AGPI des plasmalogènes. L'augmentation des teneurs en plasmalogènes par le biais des alkylglycérols nécessite une supplémentation alimentaire directe. En effet, les alkylglycérols ne passent pas la barrière placentaire et sont très faiblement sécrétés dans le lait maternel (Brites, Ferreira et al. 2011). Une orientation du stockage des AGPI vers les plasmalogènes pourrait donc être envisagée par une supplémentation alimentaire en alkylglycérol additionné des AGPI d'intérêt dès la naissance des enfants prématurés.

En conclusion, ce travail nous a permis d'étudier l'implication des plasmalogènes dans le métabolisme des cellules de Müller et dans la communication entre les cellules gliales rétinienne. Les études à venir pourraient envisager une stratégie nutritionnelle de prévention des anomalies vasculaires rétinienne au cours du développement en se penchant sur les effets d'une supplémentation en alkylglycérols et en AGPI sur ces mêmes paramètres que ce soit au niveau des cellules de Müller, de la communication calcique entre cellules gliales ou au niveau du développement vasculaire rétinien des souris DAPAT. Enfin, l'étude des profils lipidiques des enfants prématurés montre une modification de la balance AGPI n-6/AGPI n-3 en faveur des AGPI de la famille n-6 chez les enfants développant une ROP. Puisque le transfert d'AGPI de la mère à l'enfant à lieu au cours du troisième semestre de gestation (Haggarty 2010), il serait intéressant de réaliser une étude mère-enfant pour peut-être corrélérer l'alimentation maternelle au profil lipidique des enfants. De nombreuses études démontrent les bienfaits des AGPI n-3 pour la prévention de diverses pathologies. Tout comme l'importance d'une alimentation riche en AGPI n-3, l'importance de leur forme d'absorption pour la biodisponibilité dans l'organisme est bien documentée. Toutefois, nos résultats suggèrent que suivant leur origine phospholipidique, ces AGPI ne sont pas égaux en termes de signalisation cellulaire. Il semblerait intéressant de considérer que leur estérification sur un plasmalogène plutôt que sur un diacylglycérophospholipide pourrait impacter la manière dont ils influencent les fonctions cellulaires.

Références bibliographiques

- Acar, N., O. Berdeaux, et al. (2012). "Lipid composition of the human eye: are red blood cells a good mirror of retinal and optic nerve fatty acids?" PLoS One **7**(4): e35102.
- 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.
- Acar, N., S. Gregoire, et al. (2007). "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 **84**(1): 143-151.
- Ackermann, E. J., K. Conde-Frieboes, et al. (1995). "Inhibition of macrophage Ca(2+)-independent phospholipase A2 by bromoenol lactone and trifluoromethyl ketones." J Biol Chem **270**(1): 445-450.
- Age-Related Eye Disease Study Research Group (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.
- Aiello, L. P., R. L. Avery, et al. (1994). "Vascular endothelial growth factor in ocular fluid of patients with diabetic retinopathy and other retinal disorders." N Engl J Med **331**(22): 1480-1487.
- Ait-Hmyed Hakkari, O., N. Acar, et al. (2016). "Rev-Erbalpha modulates retinal visual processing and behavioral responses to light." FASEB J **30**(11): 3690-3701.
- Akiyama, H., T. Nakazawa, et al. (2002). "Presence of mitogen-activated protein kinase in retinal Muller cells and its neuroprotective effect ischemia-reperfusion injury." Neuroreport **13**(16): 2103-2107.
- Albi, E. and M. P. V. Magni (2004). "The role of intranuclear lipids." Biology of the Cell **96**(8): 657-667.
- Allvin, K., A. Hellstrom, et al. (2014). "Birth weight is the most important predictor of abnormal retinal vascularisation in moderately preterm infants." Acta Paediatr **103**(6): 594-600.
- Alvarez, Y., M. L. Cederlund, et al. (2007). "Genetic determinants of hyaloid and retinal vasculature in zebrafish." BMC Dev Biol **7**: 114.
- Anderson, R. E., M. B. Maude, et al. (1975). "Lipids of ocular tissues--X. Lipid composition of subcellular fractions of bovine retina." Vision Res **15**: 1087-1090.
- André, A., P. Juanéda, et al. (2006). "Plasmalogen metabolism-related enzymes in rat brain during aging: influence of n-3 fatty acid intake." Biochimie **88**(1): 103-111.
- André, A., C. Tessier, et al. (2005). "In situ hybridization of dihydroxyacetone phosphate acyltransferase, the regulating enzyme involved in plasmalogen biosynthesis." Molecular Brain Research **136**(1-2): 142-147.
- Ashton, N. and C. Cook (1954). "Direct observation of the effect of oxygen on developing vessels: preliminary report." Br J Ophthalmol **38**(7): 433-440.
- Ashton, N., B. Ward, et al. (1953). "Role of oxygen in the genesis of retrolental fibroplasia; a preliminary report." Br J Ophthalmol **37**(9): 513-520.
- Ashton, N., B. Ward, et al. (1954). "Effect of oxygen on developing retinal vessels with particular reference to the problem of retrolental fibroplasia." Br J Ophthalmol **38**(7): 397-432.
- Astarita, G., K. M. Jung, et al. (2010). "Deficient liver biosynthesis of docosahexaenoic acid correlates with cognitive impairment in Alzheimer's disease." PLoS One **5**(9): e12538.
- Atwater, W. O. (1894). Foods: nutritive value and cost. USDA Farmer's Bulletin. **23**: 1-32.
- Bai, X., D. J. Dilworth, et al. (2009). "Developmental distribution of collagen IV isoforms and relevance to ocular diseases." Matrix Biol **28**(4): 194-201.

- Balakrishnan, S., H. Goodwin, et al. (1961). "The distribution of phosphorus-containing lipid compounds in the human brain." J Neurochem **8**: 276-284.
- Ball, A. K. and J. S. McReynolds (1998). "Localization of gap junctions and tracer coupling in retinal Muller cells." J Comp Neurol **393**(1): 48-57.
- Balsinde, J. and E. A. Dennis (1996). "Bromo-enol lactone inhibits magnesium-dependent phosphatidate phosphohydrolase and blocks triacylglycerol biosynthesis in mouse P388D1 macrophages." J Biol Chem **271**(50): 31937-31941.
- Bazan, N. G. (2013). "The docosanoid neuroprotectin D1 induces homeostatic regulation of neuroinflammation and cell survival." Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids **88**(1): 127-129.
- Bennett, M. and D. W. Gilroy (2016). "Lipid Mediators in Inflammation." Microbiol Spectr **4**(6).
- Berdeaux, O., P. Juaneda, et al. (2010). "Identification and quantification of phosphatidylcholines containing very-long-chain polyunsaturated fatty acid in bovine and human retina using liquid chromatography/tandem mass spectrometry." J Chromatogr A **1217**(49): 7738-7748.
- Bernardos, R. L., L. K. Barthel, et al. (2007). "Late-stage neuronal progenitors in the retina are radial Muller glia that function as retinal stem cells." J Neurosci **27**(26): 7028-7040.
- Bernstein, P. S., B. Li, et al. (2016). "Lutein, zeaxanthin, and meso-zeaxanthin: The basic and clinical science underlying carotenoid-based nutritional interventions against ocular disease." Prog Retin Eye Res **50**: 34-66.
- Beyer, E. C. and V. M. Berthoud (2014). "Connexin hemichannels in the lens." Front Physiol **5**: 20.
- Beyer, E. C., J. Kistler, et al. (1989). "Antisera directed against connexin43 peptides react with a 43-kD protein localized to gap junctions in myocardium and other tissues." J Cell Biol **108**(2): 595-605.
- Beyer, E. C., D. L. Paul, et al. (1987). "Connexin43: a protein from rat heart homologous to a gap junction protein from liver." J Cell Biol **105**(6 Pt 1): 2621-2629.
- Bhattacharya, S. K., R. K. Lee, et al. (2013). "Molecular Biomarkers in Glaucoma." Invest Ophthalmol Vis Sci **54**(1): 121-131.
- Biermann, J., J. Gootjes, et al. (1999). "Immunological analyses of alkyl-dihydroxyacetone-phosphate synthase in human peroxisomal disorders." Eur J Cell Biol **78**(5): 339-348.
- Biermann, J., W. W. Just, et al. (1999). "Alkyl-dihydroxyacetone phosphate synthase and dihydroxyacetone phosphate acyltransferase form a protein complex in peroxisomes." Eur J Biochem **261**(2): 492-499.
- Biermann, J., K. Schoonderwoerd, et al. (1998). "The native molecular size of alkyl-dihydroxyacetonephosphate synthase and dihydroxyacetonephosphate acyltransferase." Biochim Biophys Acta **1393**(1): 137-142.
- Biesecker, K. R., A. I. Srienc, et al. (2016). "Glial Cell Calcium Signaling Mediates Capillary Regulation of Blood Flow in the Retina." J Neurosci **36**(36): 9435-9445.
- Bignami, A. and D. Dahl (1979). "The radial glia of Muller in the rat retina and their response to injury. An immunofluorescence study with antibodies to the glial fibrillary acidic (GFA) protein." Exp Eye Res **28**(1): 63-69.
- Bishop, P. N. (2000). "Structural macromolecules and supramolecular organisation of the vitreous gel." Prog Retin Eye Res **19**(3): 323-344.
- Blanpain, N., O. Chardon, et al. (2010). "Projection de population à l'horizon 2060. Un tiers de la population âgé de plus de 60 ans." Institut National de la Statistique des des études économiques. Insee Première(N°1320-octobre 2010).
- Bloomfield, S. A. and B. Volgyi (2009). "The diverse functional roles and regulation of neuronal gap junctions in the retina." Nat Rev Neurosci **10**(7): 495-506.

- Boggs, J. M. and G. Rangaraj (1984). "Changes in the composition of two molecular species of ethanolamine plasmalogen in normal human myelin during development." Biochim Biophys Acta **793**(2): 313-316.
- Bonilha, V. L. (2008). "Age and disease-related structural changes in the retinal pigment epithelium." Clin Ophthalmol **2**(2): 413-424.
- Boyles, J. K., R. E. Pitas, et al. (1985). "Apolipoprotein E associated with astrocytic glia of the central nervous system and with nonmyelinating glia of the peripheral nervous system." J Clin Invest **76**(4): 1501-1513.
- Bräutigam, C., B. Engelmann, et al. (1996). "Plasmalogen phospholipids in plasma lipoproteins of normolipidemic donors and patients with hypercholesterolemia treated by LDL apheresis." Atherosclerosis **119**(1): 77-88.
- Braverman, N., G. Steel, et al. (1997). "Human PEX7 encodes the peroxisomal PTS2 receptor and is responsible for rhizomelic chondrodysplasia punctata." Nat Genet **15**(4): 369-376.
- Braverman, N. E. and A. B. Moser (2012). "Functions of plasmalogen lipids in health and disease." Biochim Biophys Acta **1822**(9): 1442-1452.
- Bretillon, L., G. Thuret, et al. (2008). "Lipid and fatty acid profile of the retina, retinal pigment epithelium/choroid, and the lacrimal gland, and associations with adipose tissue fatty acids in human subjects." Exp Eye Res **87**(6): 521-528.
- Bringmann, A., T. Pannicke, et al. (2006). "Muller cells in the healthy and diseased retina." Prog Retin Eye Res **25**(4): 397-424.
- Bringmann, A. and A. Reichenbach (2001). "Role of Muller cells in retinal degenerations." Front Biosci **6**: E72-92.
- Brites, P., A. S. Ferreira, et al. (2011). "Alkyl-glycerol rescues plasmalogen levels and pathology of ether-phospholipid deficient mice." PLoS One **6**(12): e28539.
- Brites, P., H. R. Waterham, et al. (2004). "Functions and biosynthesis of plasmalogens in health and disease." Biochim Biophys Acta **1636**(2-3): 219-231.
- Broekhuysse, R. M. (1969). "Phospholipids in tissues of the eye. 3. Composition and metabolism of phospholipids in human lens in relation to age and cataract formation." Biochim Biophys Acta **187**(3): 354-365.
- Burdge, G. C. (2006). "Metabolism of alpha-linolenic acid in humans." Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids **75**(3): 161-168.
- Burke, J. M. and J. M. Smith (1981). "Retinal proliferation in response to vitreous hemoglobin or iron." Invest Ophthalmol Vis Sci **20**(5): 582-592.
- Byrne, L. C., F. Khalid, et al. (2013). "AAV-mediated, optogenetic ablation of Muller Glia leads to structural and functional changes in the mouse retina." PLoS One **8**(9): e76075.
- Cai, J., K. C. Nelson, et al. (2000). "Oxidative damage and protection of the RPE." Prog Retin Eye Res **19**(2): 205-221.
- Calder, P. C. (2002). "Dietary modification of inflammation with lipids." Proc Nutr Soc **61**(3): 345-358.
- Calviello, G., F. Di Nicuolo, et al. (2004). "n-3 PUFAs reduce VEGF expression in human colon cancer cells modulating the COX-2/PGE2 induced ERK-1 and -2 and HIF-1alpha induction pathway." Carcinogenesis **25**(12): 2303-2310.
- Carlson, S. E., J. D. Carver, et al. (1986). "High fat diets varying in ratios of polyunsaturated to saturated fatty acid and linoleic to linolenic acid: a comparison of rat neural and red cell membrane phospholipids." J Nutr **116**(5): 718-725.
- Causseret, C., M. Bentejac, et al. (1997). "Copurification of dihydroxyacetone-phosphate acyl-transferase and other peroxisomal proteins from liver of fenofibrate-treated rats." Biochimie **79**(7): 423-433.
- Ceelen, P. W., A. Lockridge, et al. (2001). "Electrical coupling between glial cells in the rat retina." Glia **35**(1): 1-13.

- Cetin, I., G. Alvino, et al. (2009). "Long chain fatty acids and dietary fats in fetal nutrition." J Physiol **587**(Pt 14): 3441-3451.
- Chan-Ling, T., D. S. McLeod, et al. (2004). "Astrocyte-endothelial cell relationships during human retinal vascular development." Invest Ophthalmol Vis Sci **45**(6): 2020-2032.
- Chew, E. Y., T. E. Clemons, et al. (2013). "Lutein + zeaxanthin and omega-3 fatty acids for age-related macular degeneration: the Age-Related Eye Disease Study 2 (AREDS2) randomized clinical trial." JAMA **309**(19): 2005-2015.
- Cho, E., S. Hung, et al. (2001). "Prospective study of dietary fat and the risk of age-related macular degeneration." Am J Clin Nutr **73**(2): 209-218.
- Chong, E. W., A. J. Kreis, et al. (2008). "Dietary omega-3 fatty acid and fish intake in the primary prevention of age-related macular degeneration: a systematic review and meta-analysis." Arch Ophthalmol **126**(6): 826-833.
- Chong, E. W., L. D. Robman, et al. (2009). "Fat consumption and its association with age-related macular degeneration." Arch Ophthalmol **127**(5): 674-680.
- Christen, W. G., D. A. Schaumberg, et al. (2011). "Dietary omega-3 fatty acid and fish intake and incident age-related macular degeneration in women." Arch Ophthalmol **129**(7): 921-929.
- Clemons, T. E., R. C. Milton, et al. (2005). "Risk factors for the incidence of Advanced Age-Related Macular Degeneration in the Age-Related Eye Disease Study (AREDS) AREDS report no. 19." Ophthalmology **112**(4): 533-539.
- Combadiere, C., C. Feumi, et al. (2007). "CX3CR1-dependent subretinal microglia cell accumulation is associated with cardinal features of age-related macular degeneration." J Clin Invest **117**(10): 2920-2928.
- Comité d'Experts Spécialisé Nutrition humaine - Groupe de travail ANC acides gras (mai 2011). "Actualisation des Apports Nutritionnels Conseillés pour les acides gras." Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES), France Edition scientifique(Saisine n° 2006-SA-0359, ANC AG).
- Connor, K. M., J. P. SanGiovanni, et al. (2007). "Increased dietary intake of omega-3-polyunsaturated fatty acids reduces pathological retinal angiogenesis." Nat Med **13**(7): 868-873.
- Cook, J. E. and D. L. Becker (2009). "Gap-junction proteins in retinal development: new roles for the "nexus"." Physiology (Bethesda) **24**: 219-230.
- Cooke, R. W., D. Clark, et al. (1993). "The apparent role of blood transfusions in the development of retinopathy of prematurity." Eur J Pediatr **152**(10): 833-836.
- Cornell-Bell, A. H. and S. M. Finkbeiner (1991). "Ca²⁺ waves in astrocytes." Cell Calcium **12**(2-3): 185-204.
- Curcio, C. A., K. R. Sloan, et al. (1990). "Human photoreceptor topography." J Comp Neurol **292**(4): 497-523.
- da Silva, T. F., V. F. Sousa, et al. (2012). "The importance of ether-phospholipids: a view from the perspective of mouse models." Biochim Biophys Acta **1822**(9): 1501-1508.
- Dammann, O. (2010). "Inflammation and retinopathy of prematurity." Acta Paediatr **99**(7): 975-977.
- Dammann, O., M. J. Brinkhaus, et al. (2009). "Immaturity, perinatal inflammation, and retinopathy of prematurity: a multi-hit hypothesis." Early Hum Dev **85**(5): 325-329.
- Dani, C., M. F. Reali, et al. (2001). "The role of blood transfusions and iron intake on retinopathy of prematurity." Early Hum Dev **62**(1): 57-63.
- Das, A. K., R. D. Holmes, et al. (1992). "Dietary ether lipid incorporation into tissue plasmalogens of humans and rodents." Lipids **27**(6): 401-405.
- Das, A. V., K. B. Mallya, et al. (2006). "Neural stem cell properties of Muller glia in the mammalian retina: regulation by Notch and Wnt signaling." Dev Biol **299**(1): 283-302.

- Datta, S. C., M. K. Ghosh, et al. (1990). "Purification and properties of acyl/alkyl dihydroxyacetone-phosphate reductase from guinea pig liver peroxisomes." *J Biol Chem* **265**(14): 8268-8274.
- de Vet, E. C., L. Ijst, et al. (1998). "Alkyl-dihydroxyacetonephosphate synthase. Fate in peroxisome biogenesis disorders and identification of the point mutation underlying a single enzyme deficiency." *J Biol Chem* **273**(17): 10296-10301.
- de Vet, E. C. J. M., B. T. E. van den Broek, et al. (1997). "Nucleotide sequence of human alkyl-dihydroxyacetonephosphate synthase cDNA reveals the presence of a peroxisomal targeting signal 21." *Biochim Biophys Acta* **1346**(1): 25-29.
- de Wilde, M. C., E. Farkas, et al. (2002). "The effect of n-3 polyunsaturated fatty acid-rich diets on cognitive and cerebrovascular parameters in chronic cerebral hypoperfusion." *Brain Res* **947**(2): 166-173.
- Dehouck, M. P., S. Meresse, et al. (1990). "An easier, reproducible, and mass-production method to study the blood-brain barrier in vitro." *J Neurochem* **54**(5): 1798-1801.
- Delcourt, C., I. Carriere, et al. (2007). "Dietary fat and the risk of age-related maculopathy: the POLANUT study." *Eur J Clin Nutr* **61**(11): 1341-1344.
- 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.
- Dennis, E. A., J. Cao, et al. (2011). "Phospholipase A2 enzymes: physical structure, biological function, disease implication, chemical inhibition, and therapeutic intervention." *Chem Rev* **111**(10): 6130-6185.
- Dermietzel, R., E. L. Hertberg, et al. (1991). "Gap junctions between cultured astrocytes: immunocytochemical, molecular, and electrophysiological analysis." *J Neurosci* **11**(5): 1421-1432.
- Dermietzel, R. and D. C. Spray (1993). "Gap junctions in the brain: where, what type, how many and why?" *Trends Neurosci* **16**(5): 186-192.
- Di, W. L., E. L. Rugg, et al. (2001). "Multiple epidermal connexins are expressed in different keratinocyte subpopulations including connexin 31." *J Invest Dermatol* **117**(4): 958-964.
- Dorman, R. V., H. Dreyfus, et al. (1976). "Ether lipid content of phosphoglycerides from the retina and brain of chicken and calf." *Biochim Biophys Acta* **486**(1): 55-59.
- Dorrell, M. I., E. Aguilar, et al. (2002). "Retinal vascular development is mediated by endothelial filopodia, a preexisting astrocytic template and specific R-cadherin adhesion." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **43**(11): 3500-3510.
- Dreher, Z., S. R. Robinson, et al. (1992). "Muller cells in vascular and avascular retinæ: a survey of seven mammals." *J Comp Neurol* **323**(1): 59-80.
- Dyerberg, J., P. Madsen, et al. (2010). "Bioavailability of marine n-3 fatty acid formulations." *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **83**(3): 137-141.
- Eichler, W., Y. Yafai, et al. (2004). "Angiogenesis-related factors derived from retinal glial (Muller) cells in hypoxia." *Neuroreport* **15**(10): 1633-1637.
- Eisenfeld, A. J., A. H. Bunt-Milam, et al. (1984). "Muller cell expression of glial fibrillary acidic protein after genetic and experimental photoreceptor degeneration in the rat retina." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **25**(11): 1321-1328.
- Engelmann, B. (2004). "Plasmalogens: targets for oxidants and major lipophilic antioxidants." *Biochem Soc Trans* **32**(Pt 1): 147-150.
- Enke, U., L. Seyfarth, et al. (2008). "Impact of PUFA on early immune and fetal development." *Br J Nutr* **100**(6): 1158-1168.
- Erickson, K. K., J. M. Sundstrom, et al. (2007). "Vascular permeability in ocular disease and the role of tight junctions." *Angiogenesis* **10**(2): 103-117.
- Evans, W. H. and P. E. Martin (2002). "Gap junctions: structure and function (Review)." *Mol Membr Biol* **19**(2): 121-136.

- Farooqui, A. A., T. Farooqui, et al. (2008). Occurrence and Importance of Ether Lipids in Brain. Metabolism and Functions of Bioactive Ether Lipids in the Brain. L. Springer Science + Business Media: 1-13.
- Farooqui, A. A. and L. A. Horrocks (2001). "Plasmalogens, phospholipase A2, and docosahexaenoic acid turnover in brain tissue." J Mol Neurosci **16**(2-3): 263-272; discussion 279-284.
- Farooqui, A. A. and L. A. Horrocks (2001). "Plasmalogens: workhorse lipids of membranes in normal and injured neurons and glia." Neuroscientist **7**(3): 232-245.
- Farooqui, A. A., W. Y. Ong, et al. (2003). "Plasmalogens, docosahexaenoic acid and neurological disorders." Adv Exp Med Biol **544**: 335-354.
- Farooqui, A. A., W. Y. Ong, et al. (2006). "Inhibitors of brain phospholipase A2 activity: their neuropharmacological effects and therapeutic importance for the treatment of neurologic disorders." Pharmacol Rev **58**(3): 591-620.
- Farooqui, A. A., H. C. Yang, et al. (1995). "Plasmalogens, phospholipases A2 and signal transduction." Brain Res Brain Res Rev **21**(2): 152-161.
- Farooqui, A. A., H. C. Yang, et al. (1997). "Phospholipase A2 and its role in brain tissue." J Neurochem **69**(3): 889-901.
- Feng, Y., Y. Wang, et al. (2009). "Decreased hypoxia-induced neovascularization in angiopoietin-2 heterozygous knockout mouse through reduced MMP activity." Cell Physiol Biochem **23**(4-6): 277-284.
- 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.
- Finkbeiner, S. (1992). "Calcium waves in astrocytes-filling in the gaps." Neuron **8**(6): 1101-1108.
- Fischer, A. J. and T. A. Reh (2001). "Muller glia are a potential source of neural regeneration in the postnatal chicken retina." Nat Neurosci **4**(3): 247-252.
- Fischer, A. J. and T. A. Reh (2003). "Potential of Muller glia to become neurogenic retinal progenitor cells." Glia **43**(1): 70-76.
- Fischer, A. J., M. A. Scott, et al. (2009). "Mitogen-activated protein kinase-signaling stimulates Muller glia to proliferate in acutely damaged chicken retina." Glia **57**(2): 166-181.
- Fliesler, S. J. and R. E. Anderson (1983). "Chemistry and metabolism of lipids in the vertebrate retina." Prog Lipid Res **22**(2): 79-131.
- Ford, D. A. and R. W. Gross (1989). "Plasmalogen ethanolamine is the major storage depot for arachidonic acid in rabbit vascular smooth muscle and is rapidly hydrolyzed after angiotensin II stimulation." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(10): 3479-3483.
- Franze, K., J. Grosche, et al. (2007). "Muller cells are living optical fibers in the vertebrate retina." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(20): 8287-8292.
- 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.
- Fruttiger, M. (2007). "Development of the retinal vasculature." Angiogenesis **10**(2): 77-88.
- Fruttiger, M., A. R. Calver, et al. (1996). "PDGF mediates a neuron-astrocyte interaction in the developing retina." Neuron **17**(6): 1117-1131.
- Fu, Z., C. A. Lofqvist, et al. (2015). "Dietary omega-3 polyunsaturated fatty acids decrease retinal neovascularization by adipose-endoplasmic reticulum stress reduction to increase adiponectin." Am J Clin Nutr **101**(4): 879-888.
- Gallego, A. (1971). "Horizontal and amacrine cells in the mammal's retina." Vision Res Suppl **3**: 33-50.
- Gaposchkin, D. P. and R. A. Zoeller (1999). "Plasmalogen status influences docosahexaenoic acid levels in a macrophage cell line. Insights using ether lipid-deficient variants." J Lipid Res **40**(3): 495-503.

- Gerhardt, H., H. Wolburg, et al. (2000). "N-cadherin mediates pericytic-endothelial interaction during brain angiogenesis in the chicken." *Dev Dyn* **218**(3): 472-479.
- Ginsberg, L., S. Rafique, et al. (1995). "Disease and anatomic specificity of ethanolamine plasmalogen deficiency in Alzheimer's disease brain." *Brain Res* **698**(1-2): 223-226.
- González-Mariscal, L., A. Betanzos, et al. (2003). "Tight junction proteins." *Prog Biophys Mol Biol* **81**(1): 1-44.
- Good, W. V. and R. J. Hardy (2001). "The multicenter study of Early Treatment for Retinopathy of Prematurity (ETROP)." *Ophthalmology* **108**(6): 1013-1014.
- Goodenowe, D. B., L. L. Cook, et al. (2007). "Peripheral ethanolamine plasmalogen deficiency: a logical causative factor in Alzheimer's disease and dementia." *J Lipid Res* **48**(11): 2485-2498.
- Gordon, W. C. and N. G. Bazan (1990). "Docosahexaenoic acid utilization during rod photoreceptor cell renewal." *J Neurosci* **10**(7): 2190-2202.
- Grimm, M. O., J. Kuchenbecker, et al. (2011). "Plasmalogen synthesis is regulated via alkyl-dihydroxyacetonephosphate-synthase by amyloid precursor protein processing and is affected in Alzheimer's disease." *J Neurochem* **116**(5): 916-925.
- Grosche, J., W. Hartig, et al. (1995). "Expression of glial fibrillary acidic protein (GFAP), glutamine synthetase (GS), and Bcl-2 protooncogene protein by Muller (glial) cells in retinal light damage of rats." *Neurosci Lett* **185**(2): 119-122.
- Gross, R. W. (1984). "High plasmalogen and arachidonic acid content of canine myocardial sarcolemma: a fast atom bombardment mass spectroscopic and gas chromatography-mass spectroscopic characterization." *Biochemistry* **23**(1): 158-165.
- Gross, R. W. (1985). "Identification of plasmalogen as the major phospholipid constituent of cardiac sarcoplasmic reticulum." *Biochemistry* **24**(7): 1662-1668.
- Haggarty, P. (2010). "Fatty acid supply to the human fetus." *Annu Rev Nutr* **30**: 237-255.
- Hamming, N. A., D. J. Apple, et al. (1977). "Ultrastructure of the hyaloid vasculature in primates." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **16**(5): 408-415.
- Han, X., D. M. Holtzman, et al. (2001). "Plasmalogen deficiency in early Alzheimer's disease subjects and in animal models: molecular characterization using electrospray ionization mass spectrometry." *J Neurochem* **77**(4): 1168-1180.
- Han, X. L. and R. W. Gross (1990). "Plasmenylcholine and phosphatidylcholine membrane bilayers possess distinct conformational motifs." *Biochemistry* **29**(20): 4992-4996.
- Handa, J. T., M. Cano, et al. (2016). "Lipids, oxidized lipids, oxidation-specific epitopes, and Age-related Macular Degeneration." *Biochim Biophys Acta*.
- Hannibal, J. and J. Fahrenkrug (2002). "Melanopsin: a novel photopigment involved in the photoentrainment of the brain's biological clock?" *Ann Med* **34**(5): 401-407.
- Hard, A. L., L. E. Smith, et al. (2013). "Nutrition, insulin-like growth factor-1 and retinopathy of prematurity." *Semin Fetal Neonatal Med*.
- Hartmann, T., J. Kuchenbecker, et al. (2007). "Alzheimer's disease: the lipid connection." *J Neurochem* **103 Suppl 1**: 159-170.
- Hayashi, H. and M. Hara (1997). "1-Alkenyl group of ethanolamine plasmalogen derives mainly from de novo-synthesized fatty alcohol within peroxisomes, but not extraperoxisomal fatty alcohol or fatty acid." *J Biochem* **121**(5): 978-983.
- Hazen, S. L., D. A. Ford, et al. (1991). "Activation of a membrane-associated phospholipase A2 during rabbit myocardial ischemia which is highly selective for plasmalogen substrate." *J Biol Chem* **266**(9): 5629-5633.
- Hazen, S. L., L. A. Loeb, et al. (1991). "Purification and characterization of cytosolic phospholipase A2 activities from canine myocardium and sheep platelets." *Methods Enzymol* **197**: 400-411.
- Hazen, S. L., R. J. Stuppy, et al. (1990). "Purification and characterization of canine myocardial cytosolic phospholipase A2. A calcium-independent phospholipase with

- absolute f1-2 regiospecificity for diradyl glycerophospholipids." J Biol Chem **265**(18): 10622-10630.
- Hazen, S. L., L. A. Zupan, et al. (1991). "Suicide inhibition of canine myocardial cytosolic calcium-independent phospholipase A2. Mechanism-based discrimination between calcium-dependent and -independent phospholipases A2." J Biol Chem **266**(11): 7227-7232.
- Hellstrom, A., E. Engstrom, et al. (2003). "Postnatal serum insulin-like growth factor I deficiency is associated with retinopathy of prematurity and other complications of premature birth." Pediatrics **112**(5): 1016-1020.
- Hellstrom, A., D. Ley, et al. (2010). "New insights into the development of retinopathy of prematurity--importance of early weight gain." Acta Paediatr **99**(4): 502-508.
- Heymans, H. S., R. B. Schutgens, et al. (1983). "Severe plasmalogen deficiency in tissues of infants without peroxisomes (Zellweger syndrome)." Nature **306**(5938): 69-70.
- Hickey, W. F. and H. Kimura (1988). "Perivascular microglial cells of the CNS are bone marrow-derived and present antigen in vivo." Science **239**(4837): 290-292.
- Hirashima, Y., A. A. Farooqui, et al. (1992). "Identification and purification of calcium-independent phospholipase A2 from bovine brain cytosol." J Neurochem **59**(2): 708-714.
- Hoffmann, J., Y. Feng, et al. (2005). "Endothelial survival factors and spatial completion, but not pericyte coverage of retinal capillaries determine vessel plasticity." FASEB J **19**(14): 2035-2036.
- Holash, J. A. and P. A. Stewart (1993). "The relationship of astrocyte-like cells to the vessels that contribute to the blood-ocular barriers." Brain Res **629**(2): 218-224.
- Honsho, M., Y. Yagita, et al. (2008). "Isolation and characterization of mutant animal cell line defective in alkyl-dihydroxyacetonephosphate synthase: localization and transport of plasmalogens to post-Golgi compartments." Biochim Biophys Acta **1783**(10): 1857-1865.
- Horrocks, L. A., Y. K. Yeo, et al. (1986). "Choline plasmalogens, glycerophospholipid methylation, and receptor-mediated activation of adenylate cyclase." Adv Cyclic Nucleotide Protein Phosphorylation Res **20**: 263-292.
- Hossain, M. S., M. Ifuku, et al. (2013). "Plasmalogens rescue neuronal cell death through an activation of AKT and ERK survival signaling." PLoS One **8**(12): e83508.
- Ibrahim, A., K. Mbodji, et al. (2011). "Anti-inflammatory and anti-angiogenic effect of long chain n-3 polyunsaturated fatty acids in intestinal microvascular endothelium." Clin Nutr **30**(5): 678-687.
- Igarashi, M., K. Ma, et al. (2011). "Disturbed choline plasmalogen and phospholipid fatty acid concentrations in Alzheimer's disease prefrontal cortex." J Alzheimers Dis **24**(3): 507-517.
- International Committee for the Classification of Retinopathy of Prematurity (1985). "An international classification of retinopathy of prematurity." Int Ophthalmol **8**(1): 3-10.
- International Committee for the Classification of Retinopathy of Prematurity (2005). "The International Classification of Retinopathy of Prematurity revisited." Arch Ophthalmol **123**(7): 991-999.
- Ito, M. and M. Yoshioka (1999). "Regression of the hyaloid vessels and pupillary membrane of the mouse." Anat Embryol (Berl) **200**(4): 403-411.
- Itzkovitz, B., S. Jiralerspong, et al. (2012). "Functional characterization of novel mutations in GNPAT and AGPS, causing rhizomelic chondrodysplasia punctata (RCDP) types 2 and 3." Hum Mutat **33**(1): 189-197.
- Jiang, B., G. I. Liou, et al. (1994). "Astrocytes modulate retinal vasculogenesis: effects on fibronectin expression." J Cell Sci **107** (Pt 9): 2499-2508.

- Johansson, K., A. Bruun, et al. (1999). "Gap junction protein connexin43 is heterogeneously expressed among glial cells in the adult rabbit retina." J Comp Neurol **407**(3): 395-403.
- Jonas, J. B., U. Schneider, et al. (1992). "Count and density of human retinal photoreceptors." Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol **230**(6): 505-510.
- Jones, C. L. and A. K. Hajra (1983). "Solubilization and partial purification of dihydroxyacetone-phosphate acyltransferase from guinea pig liver." Arch Biochem Biophys **226**(1): 155-165.
- Jordan, C. O. (2014). "Retinopathy of prematurity." Pediatr Clin North Am **61**(3): 567-577.
- Kandasamy, Y., P. Kumar, et al. (2014). "The effect of erythropoietin on the severity of retinopathy of prematurity." Eye (Lond) **28**(7): 814-818.
- Kermorvant-Duchemin, E., F. Sennlaub, et al. (2011). "[Epidemiology and pathophysiology of retinopathy of prematurity]." Arch Pediatr **18 Suppl 2**: S79-85.
- Kerr, N. M., C. S. Johnson, et al. (2010). "Immunolocalization of gap junction protein connexin43 (GJA1) in the human retina and optic nerve." Invest Ophthalmol Vis Sci **51**(8): 4028-4034.
- 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.
- Khan, J. C., D. A. Thurlby, et al. (2006). "Smoking and age related macular degeneration: the number of pack years of cigarette smoking is a major determinant of risk for both geographic atrophy and choroidal neovascularisation." Br J Ophthalmol **90**(1): 75-80.
- Kim, J. H., J. A. Park, et al. (2006). "Blood-neural barrier: intercellular communication at glio-vascular interface." J Biochem Mol Biol **39**(4): 339-345.
- Klein, R., B. E. Klein, et al. (1984). "The Wisconsin epidemiologic study of diabetic retinopathy. IV. Diabetic macular edema." Ophthalmology **91**(12): 1464-1474.
- Koehrer, P., S. Saab, et al. (2014). "Erythrocyte phospholipid and polyunsaturated Fatty Acid composition in diabetic retinopathy." PLoS One **9**(9): e106912.
- Kohno, H., T. Sakai, et al. (2006). "Induction of nestin, Ki-67, and cyclin D1 expression in Muller cells after laser injury in adult rat retina." Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol **244**(1): 90-95.
- Kolko, M., J. Wang, et al. (2007). "Identification of intracellular phospholipases A2 in the human eye: involvement in phagocytosis of photoreceptor outer segments." Invest Ophthalmol Vis Sci **48**(3): 1401-1409.
- Korey, S. R. and M. Orchen (1959). "Plasmalogens of the nervous system. I. Deposition in developing rat brain and incorporation of C 14 isotope from acetate and palmitate into the alpha, beta-unsaturated ether chain." Arch Biochem Biophys **83**: 381-389.
- Kou, J., G. G. Kovacs, et al. (2011). "Peroxisomal alterations in Alzheimer's disease." Acta Neuropathol **122**(3): 271-283.
- Kuroki, T., T. Inoguchi, et al. (1998). "Effect of eicosapentaenoic acid on glucose-induced diacylglycerol synthesis in cultured bovine aortic endothelial cells." Biochem Biophys Res Commun **247**(2): 473-477.
- Labadaridis, I., M. Moraitou, et al. (2009). "Plasmalogen levels in full-term neonates." Acta Paediatrica **98**(4): 640-642.
- Lande, M. B., J. M. Donovan, et al. (1995). "The relationship between membrane fluidity and permeabilities to water, solutes, ammonia, and protons." J Gen Physiol **106**(1): 67-84.
- Lange, J., Y. Yafai, et al. (2012). "The axon guidance molecule Netrin-4 is expressed by Muller cells and contributes to angiogenesis in the retina." Glia **60**(10): 1567-1578.
- Lawson, L. D. and B. G. Hughes (1988). "Absorption of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid from fish oil triacylglycerols or fish oil ethyl esters co-ingested with a high-fat meal." Biochem Biophys Res Commun **156**(2): 960-963.

- Lee, J. and O. Dammann (2012). "Perinatal infection, inflammation, and retinopathy of prematurity." Semin Fetal Neonatal Med **17**(1): 26-29.
- Lee, S. W., W. J. Kim, et al. (2003). "SSeCKS regulates angiogenesis and tight junction formation in blood-brain barrier." Nat Med **9**(7): 900-906.
- Lee, T.-c., C. Qian, et al. (1991). "Biosynthesis of choline plasmalogens in neonatal rat myocytes." Arch Biochem Biophys **286**(2): 498-503.
- Lee, T. C. (1998). "Biosynthesis and possible biological functions of plasmalogens." Biochim Biophys Acta **1394**(2-3): 129-145.
- Lewis, G. P., E. A. Chapin, et al. (2010). "The fate of Muller's glia following experimental retinal detachment: nuclear migration, cell division, and subretinal glial scar formation." Mol Vis **16**: 1361-1372.
- Lewis, G. P., P. A. Erickson, et al. (1989). "Changes in the expression of specific Muller cell proteins during long-term retinal detachment." Exp Eye Res **49**(1): 93-111.
- Lewis, G. P. and S. K. Fisher (2000). "Muller cell outgrowth after retinal detachment: association with cone photoreceptors." Invest Ophthalmol Vis Sci **41**(6): 1542-1545.
- Li, C. M., B. H. Chung, et al. (2005). "Lipoprotein-like particles and cholesteryl esters in human Bruch's membrane: initial characterization." Invest Ophthalmol Vis Sci **46**(7): 2576-2586.
- Ling, T. L. and J. Stone (1988). "The development of astrocytes in the cat retina: evidence of migration from the optic nerve." Brain Res Dev Brain Res **44**(1): 73-85.
- Liu, D., N. Nagan, et al. (2005). "Role of dihydroxyacetonephosphate acyltransferase in the biosynthesis of plasmalogens and nonether glycerolipids." J Lipid Res **46**(4): 727-735.
- Luoma, A. M., F. Kuo, et al. (2015). "Plasmalogen phospholipids protect internodal myelin from oxidative damage." Free Radical Biology and Medicine **84**: 296-310.
- Ma, Z. and J. Turk (2001). "The molecular biology of the group VIA Ca²⁺-independent phospholipase A₂." Prog Nucleic Acid Res Mol Biol **67**: 1-33.
- Maeba, R. and N. Ueta (2004). "A novel antioxidant action of ethanolamine plasmalogens in lowering the oxidizability of membranes." Biochem Soc Trans **32**(Pt 1): 141-143.
- Makrides, M., M. A. Neumann, et al. (1994). "Fatty acid composition of brain, retina, and erythrocytes in breast- and formula-fed infants." Am J Clin Nutr **60**(2): 189-194.
- Mangold, H. K. and N. Weber (1987). "Biosynthesis and biotransformation of ether lipids." Lipids **22**(11): 789-799.
- Mann, I. (1964). The development of the human eye, Cambridge: British Medical association.
- Martin, C. R., D. A. Dasilva, et al. (2011). "Decreased postnatal docosahexaenoic and arachidonic acid blood levels in premature infants are associated with neonatal morbidities." J Pediatr **159**(5): 743-749 e741-742.
- Martinez, M., A. Ballabriga, et al. (1988). "Lipids of the developing human retina: I. Total fatty acids, plasmalogens, and fatty acid composition of ethanolamine and choline phosphoglycerides." J Neurosci Res **20**(4): 484-490.
- Matteucci, A., L. Gaddini, et al. (2014). "Neuroprotection by rat Muller glia against high glucose-induced neurodegeneration through a mechanism involving ERK1/2 activation." Exp Eye Res **125**: 20-29.
- Merle, B. M., P. Benlian, et al. (2014). "Circulating omega-3 Fatty acids and neovascular age-related macular degeneration." Invest Ophthalmol Vis Sci **55**(3): 2010-2019.
- Metea, M. R. and E. A. Newman (2006). "Glial cells dilate and constrict blood vessels: a mechanism of neurovascular coupling." J Neurosci **26**(11): 2862-2870.
- Mitchell, D. C., S. L. Niu, et al. (2003). "DHA-rich phospholipids optimize G-Protein-coupled signaling." J Pediatr **143**(4 Suppl): S80-86.
- Mitchell, P., J. J. Wang, et al. (2002). "Smoking and the 5-year incidence of age-related maculopathy: the Blue Mountains Eye Study." Arch Ophthalmol **120**(10): 1357-1363.

- Mittal, M., R. Dhanireddy, et al. (1998). "Candida sepsis and association with retinopathy of prematurity." Pediatrics **101**(4 Pt 1): 654-657.
- Mohamed, S., J. C. Murray, et al. (2013). "Hyperglycemia as a risk factor for the development of retinopathy of prematurity." BMC Pediatr **13**: 78.
- Morand, O. H., R. A. Zoeller, et al. (1988). "Disappearance of plasmalogens from membranes of animal cells subjected to photosensitized oxidation." J Biol Chem **263**(23): 11597-11606.
- Mozzi, R., D. Gramignani, et al. (1989). "Choline plasmalogen synthesis by the methylation pathway in chick neurons in culture." Neurochem Res **14**(6): 579-583.
- Muto, T., T. Tien, et al. (2014). "High glucose alters Cx43 expression and gap junction intercellular communication in retinal Muller cells: promotes Muller cell and pericyte apoptosis." Invest Ophthalmol Vis Sci **55**(7): 4327-4337.
- Nagan, N., A. K. Hajra, et al. (1997). "A fibroblast cell line defective in alkyl-dihydroxyacetone phosphate synthase: a novel defect in plasmalogen biosynthesis." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(9): 4475-4480.
- Nagan, N., A. K. Hajra, et al. (1998). "Isolation of a Chinese hamster fibroblast variant defective in dihydroxyacetonephosphate acyltransferase activity and plasmalogen biosynthesis: use of a novel two-step selection protocol." Biochem J **332** (Pt 1): 273-279.
- Nagan, N. and R. A. Zoeller (2001). "Plasmalogens: biosynthesis and functions." Prog Lipid Res **40**(3): 199-229.
- Nagelhus, E. A. and O. P. Ottersen (2013). "Physiological roles of aquaporin-4 in brain." Physiol Rev **93**(4): 1543-1562.
- Nagelhus, E. A., M. L. Veruki, et al. (1998). "Aquaporin-4 water channel protein in the rat retina and optic nerve: polarized expression in Muller cells and fibrous astrocytes." J Neurosci **18**(7): 2506-2519.
- Nagy, J. I. and J. E. Rash (2000). "Connexins and gap junctions of astrocytes and oligodendrocytes in the CNS." Brain Res Brain Res Rev **32**(1): 29-44.
- Nagy, K., V. V. Brahmabhatt, et al. (2012). "Comparative study of serine-plasmalogens in human retina and optic nerve: identification of atypical species with odd carbon chains." J Lipid Res **53**(4): 776-783.
- Neubronner, J., J. P. Schuchardt, et al. (2011). "Enhanced increase of omega-3 index in response to long-term n-3 fatty acid supplementation from triacylglycerides versus ethyl esters." Eur J Clin Nutr **65**(2): 247-254.
- Newman, E. and A. Reichenbach (1996). "The Muller cell: a functional element of the retina." Trends Neurosci **19**(8): 307-312.
- Newman, E. A. (2001). "Propagation of intercellular calcium waves in retinal astrocytes and Muller cells." J Neurosci **21**(7): 2215-2223.
- Newman, E. A. (2003). "Glial cell inhibition of neurons by release of ATP." J Neurosci **23**(5): 1659-1666.
- Newman, E. A. (2004). "A dialogue between glia and neurons in the retina: modulation of neuronal excitability." Neuron Glia Biol **1**(3): 245-252.
- Newman, E. A. (2004). "Glial modulation of synaptic transmission in the retina." Glia **47**(3): 268-274.
- Newman, E. A. (2005). "Calcium increases in retinal glial cells evoked by light-induced neuronal activity." J Neurosci **25**(23): 5502-5510.
- Newman, E. A. and K. R. Zahs (1997). "Calcium waves in retinal glial cells." Science **275**(5301): 844-847.
- Newman, E. A. and K. R. Zahs (1998). "Modulation of neuronal activity by glial cells in the retina." J Neurosci **18**(11): 4022-4028.
- Newman, L. A., M. T. Walker, et al. (2003). "Melanopsin forms a functional short-wavelength photopigment." Biochemistry **42**(44): 12734-12738.

- Nickerson, P. E., N. Da Silva, et al. (2008). "Neural progenitor potential in cultured Muller glia: effects of passaging and exogenous growth factor exposure." Brain Res **1230**: 1-12.
- O'Brien, J. J., W. Li, et al. (2006). "Coupling between A-type horizontal cells is mediated by connexin 50 gap junctions in the rabbit retina." J Neurosci **26**(45): 11624-11636.
- Ofman, R., E. H. Hetteema, et al. (1998). "Acyl-CoA:dihydroxyacetonephosphate acyltransferase: cloning of the human cDNA and resolution of the molecular basis in rhizomelic chondrodysplasia punctata type 2." Hum Mol Genet **7**(5): 847-853.
- Ofman, R. and R. J. Wanders (1994). "Purification of peroxisomal acyl-CoA: dihydroxyacetonephosphate acyltransferase from human placenta." Biochim Biophys Acta **1206**(1): 27-34.
- Omenn, G. S., G. E. Goodman, et al. (1996). "Risk factors for lung cancer and for intervention effects in CARET, the Beta-Carotene and Retinol Efficacy Trial." J Natl Cancer Inst **88**(21): 1550-1559.
- Ong, W. Y., T. Farooqui, et al. (2010). "Involvement of cytosolic phospholipase A(2), calcium independent phospholipase A(2) and plasmalogen selective phospholipase A(2) in neurodegenerative and neuropsychiatric conditions." Curr Med Chem **17**(25): 2746-2763.
- Ong, W. Y., T. Farooqui, et al. (2015). "Synthetic and natural inhibitors of phospholipases A2: their importance for understanding and treatment of neurological disorders." ACS Chem Neurosci **6**(6): 814-831.
- Paltauf, F. (1994). "Ether lipids in biomembranes." Chem Phys Lipids **74**(2): 101-139.
- Paltauf, F. and A. Hermetter (1994). "Strategies for the synthesis of glycerophospholipids." Prog Lipid Res **33**(3): 239-328.
- Paolini, M., S. Z. Abdel-Rahman, et al. (2003). "Beta-carotene: a cancer chemopreventive agent or a co-carcinogen?" Mutat Res **543**(3): 195-200.
- Paques, M., M. Simonutti, et al. (2006). "High resolution fundus imaging by confocal scanning laser ophthalmoscopy in the mouse." Vision Res **46**(8-9): 1336-1345.
- Perry, V. H. and S. Gordon (1988). "Macrophages and microglia in the nervous system." Trends Neurosci **11**(6): 273-277.
- Pierce, E. A., R. L. Avery, et al. (1995). "Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor expression in a mouse model of retinal neovascularization." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(3): 905-909.
- Pike, L. J., X. Han, et al. (2002). "Lipid Rafts Are Enriched in Arachidonic Acid and Plasmenylethanolamine and Their Composition Is Independent of Caveolin-1 Expression: A Quantitative Electrospray Ionization/Mass Spectrometric Analysis†." Biochemistry **41**(6): 2075-2088.
- Politi, L., N. Rotstein, et al. (2001). "Effects of docosahexaenoic acid on retinal development: cellular and molecular aspects." Lipids **36**(9): 927-935.
- Portilla, D., M. D. Crew, et al. (1998). "cDNA cloning and expression of a novel family of enzymes with calcium-independent phospholipase A2 and lysophospholipase activities." J Am Soc Nephrol **9**(7): 1178-1186.
- Portilla, D. and G. Dai (1996). "Purification of a novel calcium-independent phospholipase A2 from rabbit kidney." J Biol Chem **271**(26): 15451-15457.
- Powner, M. B., M. C. Gillies, et al. (2010). "Perifoveal Müller Cell Depletion in a Case of Macular Telangiectasia Type 2." Ophthalmology **117**(12): 2407-2416.
- Powner, M. B., M. C. Gillies, et al. (2013). "Loss of Muller's cells and photoreceptors in macular telangiectasia type 2." Ophthalmology **120**(11): 2344-2352.
- Prat, A., K. Biernacki, et al. (2001). "Glial cell influence on the human blood-brain barrier." Glia **36**(2): 145-155.
- Provis, J. M. (2001). "Development of the primate retinal vasculature." Prog Retin Eye Res **20**(6): 799-821.

- Provis, J. M., J. Leech, et al. (1997). "Development of the human retinal vasculature: cellular relations and VEGF expression." Exp Eye Res **65**(4): 555-568.
- Ramsey, D. J., K. M. Ramsey, et al. (2013). "Genetic advances in ophthalmology: the role of melanopsin-expressing, intrinsically photosensitive retinal ganglion cells in the circadian organization of the visual system." Semin Ophthalmol **28**(5-6): 406-421.
- Rao, N. A., T. Kimoto, et al. (2003). "Pathogenic role of retinal microglia in experimental uveoretinitis." Invest Ophthalmol Vis Sci **44**(1): 22-31.
- Rasmiena, A. A., C. K. Barlow, et al. (2015). "Plasmalogen modulation attenuates atherosclerosis in ApoE- and ApoE/GPx1-deficient mice." Atherosclerosis **243**(2): 598-608.
- Reichenbach, A. and A. Bringmann (2010). Introduction. Müller Cells in the Healthy and Diseased Retina. L. Springer Science + Business Media: 1-34.
- Reichenbach, A. and A. Bringmann (2010). Müller Cells in the Healthy Retina. Müller Cells in the Healthy and Diseased Retina. L. Springer Science + Business Media: 35-313.
- Reichenbach, A. and A. Bringmann (2013). "New functions of Muller cells." Glia **61**(5): 651-678.
- Reichenbach, A. and S. R. Robinson (1995). "Phylogenetic constraints on retinal organisation and development." Prog Retin Eye Res **15**(1): 139-171.
- Reichenbach, A., H. Schneider, et al. (1989). "The structure of rabbit retinal Muller (glial) cells is adapted to the surrounding retinal layers." Anat Embryol (Berl) **180**(1): 71-79.
- Reichenbach, A., J. U. Stolzenburg, et al. (1993). "What do retinal muller (glial) cells do for their neuronal 'small siblings'?" J Chem Neuroanat **6**(4): 201-213.
- Reichenbach, A., J. U. Stolzenburg, et al. (1995). "Effects of enhanced extracellular ammonia concentration on cultured mammalian retinal glial (Muller) cells." Glia **13**(3): 195-208.
- Reiss, D., K. Beyer, et al. (1997). "Delayed oxidative degradation of polyunsaturated diacyl phospholipids in the presence of plasmalogen phospholipids in vitro." Biochemical Journal **323**(3): 807-814.
- 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.
- Rezende, F. A., E. Lapalme, et al. (2014). "Omega-3 supplementation combined with anti-vascular endothelial growth factor lowers vitreal levels of vascular endothelial growth factor in wet age-related macular degeneration." Am J Ophthalmol **158**(5): 1071-1078.
- 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.
- Robinson, S. R., E. C. Hampson, et al. (1993). "Unidirectional coupling of gap junctions between neuroglia." Science **262**(5136): 1072-1074.
- Rodemer, C., T. P. Thai, et al. (2003). "Inactivation of ether lipid biosynthesis causes male infertility, defects in eye development and optic nerve hypoplasia in mice." Hum Mol Genet **12**(15): 1881-1895.
- Rog, T. and A. Koivuniemi (2016). "The biophysical properties of ethanolamine plasmalogens revealed by atomistic molecular dynamics simulations." Biochim Biophys Acta **1858**(1): 97-103.
- Rose, D. P. and J. M. Connolly (2000). "Regulation of tumor angiogenesis by dietary fatty acids and eicosanoids." Nutr Cancer **37**(2): 119-127.
- Rosenberger, T. A., J. Oki, et al. (2002). "Rapid synthesis and turnover of brain microsomal ether phospholipids in the adult rat." J Lipid Res **43**(1): 59-68.

- Rudiger, M., A. von Baehr, et al. (2000). "Preterm infants with high polyunsaturated fatty acid and plasmalogen content in tracheal aspirates develop bronchopulmonary dysplasia less often." *Crit Care Med* **28**(5): 1572-1577.
- Saab-Aoude, S., A. M. Bron, et al. (2013). "A mouse model of in vivo chemical inhibition of retinal calcium-independent phospholipase A2 (iPLA2)." *Biochimie* **95**(4): 903-911.
- Saab, S., B. Buteau, et al. (2014). "Involvement of plasmalogens in post-natal retinal vascular development." *PLoS One* **9**(6): e101076.
- Saab, S., J. Mazzocco, et al. (2014). "Plasmalogens in the retina: From occurrence in retinal cell membranes to potential involvement in pathophysiology of retinal diseases." *Biochimie*.
- Saint-Geniez, M. and P. A. D'Amore (2004). "Development and pathology of the hyaloid, choroidal and retinal vasculature." *Int J Dev Biol* **48**(8-9): 1045-1058.
- Sangiovanni, J. P., E. Agron, et al. (2009). "{omega}-3 Long-chain polyunsaturated fatty acid intake and 12-y incidence of neovascular age-related macular degeneration and central geographic atrophy: AREDS report 30, a prospective cohort study from the Age-Related Eye Disease Study." *Am J Clin Nutr* **90**(6): 1601-1607.
- 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. (2008). "The relationship of dietary omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acid intake with incident age-related macular degeneration: AREDS report no. 23." *Arch Ophthalmol* **126**(9): 1274-1279.
- SanGiovanni, J. P., E. Y. Chew, et al. (2007). "The relationship of dietary lipid intake and age-related macular degeneration in a case-control study: AREDS Report No. 20." *Arch Ophthalmol* **125**(5): 671-679.
- Sapieha, P., J. Chen, et al. (2012). "Omega-3 polyunsaturated fatty acids preserve retinal function in type 2 diabetic mice." *Nutr Diabetes* **2**: e36.
- Sapieha, P., A. Stahl, et al. (2011). "5-Lipoxygenase metabolite 4-HDHA is a mediator of the antiangiogenic effect of omega-3 polyunsaturated fatty acids." *Sci Transl Med* **3**(69): 69ra12.
- Sarkadi-Nagy, E., V. Wijendran, et al. (2004). "Formula feeding potentiates docosahexaenoic and arachidonic acid biosynthesis in term and preterm baboon neonates." *J Lipid Res* **45**(1): 71-80.
- Sato, T., C. Shima, et al. (2011). "Vitreous levels of angiopoietin-1 and angiopoietin-2 in eyes with retinopathy of prematurity." *Am J Ophthalmol* **151**(2): 353-357 e351.
- Schnebelen, C., C. Fourgeux, et al. (2011). "Dietary polyunsaturated fatty acids reduce retinal stress induced by an elevation of intraocular pressure in rats." *Nutr Res* **31**(4): 286-295.
- Schnitzer, J. (1987). "Retinal astrocytes: their restriction to vascularized parts of the mammalian retina." *Neurosci Lett* **78**(1): 29-34.
- Schrakamp, G., C. G. Schalkwijk, et al. (1988). "Plasmalogen biosynthesis in peroxisomal disorders: fatty alcohol versus alkylglycerol precursors." *J Lipid Res* **29**(3): 325-334.
- 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., 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., B. Rosner, et al. (2001). "Dietary fat and risk for advanced age-related macular degeneration." *Arch Ophthalmol* **119**(8): 1191-1199.

- Seddon, J. M., S. L. Santangelo, et al. (2003). "A genomewide scan for age-related macular degeneration provides evidence for linkage to several chromosomal regions." Am J Hum Genet **73**(4): 780-790.
- Seeliger, M. W., S. C. Beck, et al. (2005). "In vivo confocal imaging of the retina in animal models using scanning laser ophthalmoscopy." Vision Res **45**(28): 3512-3519.
- Semo, M., C. Gias, et al. (2014). "A role for the ciliary marginal zone in the melanopsin-dependent intrinsic pupillary light reflex." Exp Eye Res **119**: 8-18.
- Shanmugaratnam, J., E. Berg, et al. (1997). "Retinal Muller glia secrete apolipoproteins E and J which are efficiently assembled into lipoprotein particles." Brain Res Mol Brain Res **50**(1-2): 113-120.
- Shen, W., M. Fruttiger, et al. (2012). "Conditional Muller cell ablation causes independent neuronal and vascular pathologies in a novel transgenic model." J Neurosci **32**(45): 15715-15727.
- Simon, M. V., F. H. Prado Spalm, et al. (2015). "Sphingosine-1-Phosphate Is a Crucial Signal for Migration of Retina Muller Glial Cells." Invest Ophthalmol Vis Sci **56**(10): 5808-5815.
- Simopoulos, A. P. (2002). "The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids." Biomed Pharmacother **56**(8): 365-379.
- Sin, H. P., D. T. Liu, et al. (2013). "Lifestyle modification, nutritional and vitamins supplements for age-related macular degeneration." Acta Ophthalmol **91**(1): 6-11.
- Singh, H., K. Beckman, et al. (1993). "Exclusive localization in peroxisomes of dihydroxyacetone phosphate acyltransferase and alkyl-dihydroxyacetone phosphate synthase in rat liver." J Lipid Res **34**(3): 467-477.
- Sinha, D., A. Klise, et al. (2008). "betaA3/A1-crystallin in astroglial cells regulates retinal vascular remodeling during development." Mol Cell Neurosci **37**(1): 85-95.
- Six, D. A. and E. A. Dennis (2000). "The expanding superfamily of phospholipase A(2) enzymes: classification and characterization." Biochim Biophys Acta **1488**(1-2): 1-19.
- Smith, L. E. (2004). "Pathogenesis of retinopathy of prematurity." Growth Horm IGF Res **14 Suppl A**: S140-144.
- Smith, R. L., S. Sivaprasad, et al. (2016). "Retinal Biochemistry, Physiology and Cell Biology." Dev Ophthalmol **55**: 18-27.
- Smith, W., J. Assink, et al. (2001). "Risk factors for age-related macular degeneration: Pooled findings from three continents." Ophthalmology **108**(4): 697-704.
- Sohl, G., M. Guldenagel, et al. (2000). "Connexin expression in the retina." Brain Res Brain Res Rev **32**(1): 138-145.
- Sohl, G., S. Maxeiner, et al. (2005). "Expression and functions of neuronal gap junctions." Nat Rev Neurosci **6**(3): 191-200.
- Souied, E. H., C. Delcourt, et al. (2013). "Oral docosahexaenoic acid in the prevention of exudative age-related macular degeneration: the Nutritional AMD Treatment 2 study." Ophthalmology **120**(8): 1619-1631.
- Spanner, S. (1966). "Variations in the plasmalogen content of mammalian heart muscle." Nature **210**(5036): 637.
- Spranger, J. W., J. M. Opitz, et al. (1971). "Heterogeneity of Chondrodysplasia punctata." Humangenetik **11**(3): 190-212.
- Sprecher, H., D. L. Luthria, et al. (1995). "Reevaluation of the pathways for the biosynthesis of polyunsaturated fatty acids." J Lipid Res **36**(12): 2471-2477.
- Stables, M. J. and D. W. Gilroy (2011). "Old and new generation lipid mediators in acute inflammation and resolution." Prog Lipid Res **50**(1): 35-51.
- Stahl, A., P. Sapieha, et al. (2010). "Short communication: PPAR gamma mediates a direct antiangiogenic effect of omega 3-PUFAs in proliferative retinopathy." Circ Res **107**(4): 495-500.

- Stephenson, D., K. Rash, et al. (1999). "Cytosolic phospholipase A2 is induced in reactive glia following different forms of neurodegeneration." *Glia* **27**(2): 110-128.
- Stephenson, D. T., C. A. Lemere, et al. (1996). "Cytosolic phospholipase A2 (cPLA2) immunoreactivity is elevated in Alzheimer's disease brain." *Neurobiol Dis* **3**(1): 51-63.
- Stier, H. and B. Schlosshauer (1998). "Different cell surface areas of polarized radial glia having opposite effects on axonal outgrowth." *Eur J Neurosci* **10**(3): 1000-1010.
- Stone, J., T. Chan-Ling, et al. (1996). "Roles of vascular endothelial growth factor and astrocyte degeneration in the genesis of retinopathy of prematurity." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **37**(2): 290-299.
- Stone, J. and Z. Dreher (1987). "Relationship between astrocytes, ganglion cells and vasculature of the retina." *J Comp Neurol* **255**(1): 35-49.
- Strauss, O. (2005). "The retinal pigment epithelium in visual function." *Physiol Rev* **85**(3): 845-881.
- Subramani, S., A. Koller, et al. (2000). "Import of peroxisomal matrix and membrane proteins." *Annu Rev Biochem* **69**: 399-418.
- Sutter, I., S. Velagapudi, et al. (2015). "Plasmalogens of high-density lipoproteins (HDL) are associated with coronary artery disease and anti-apoptotic activity of HDL." *Atherosclerosis* **241**(2): 539-546.
- Swenor, B. K., S. Bressler, et al. (2010). "The impact of fish and shellfish consumption on age-related macular degeneration." *Ophthalmology* **117**(12): 2395-2401.
- Szajewska, H., A. Horvath, et al. (2006). "Effect of n-3 long-chain polyunsaturated fatty acid supplementation of women with low-risk pregnancies on pregnancy outcomes and growth measures at birth: a meta-analysis of randomized controlled trials." *Am J Clin Nutr* **83**(6): 1337-1344.
- Szmajda, B. A., U. Grunert, et al. (2008). "Retinal ganglion cell inputs to the koniocellular pathway." *J Comp Neurol* **510**(3): 251-268.
- Szymczak, M., M. Murray, et al. (2008). "Modulation of angiogenesis by omega-3 polyunsaturated fatty acids is mediated by cyclooxygenases." *Blood* **111**(7): 3514-3521.
- Tackenberg, M. A., B. A. Tucker, et al. (2009). "Muller cell activation, proliferation and migration following laser injury." *Mol Vis* **15**: 1886-1896.
- Takeda, M., A. Takamiya, et al. (2002). "Extracellular signal-regulated kinase activation predominantly in Muller cells of retina with endotoxin-induced uveitis." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **43**(4): 907-911.
- Tan, J. S., J. J. Wang, et al. (2009). "Dietary fatty acids and the 10-year incidence of age-related macular degeneration: the Blue Mountains Eye Study." *Arch Ophthalmol* **127**(5): 656-665.
- 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.
- Terry, T. L. (1942). "Fibroblastic Overgrowth of Persistent Tunica Vasculosa Lentis in Infants Born Prematurely: II. Report of Cases-Clinical Aspects." *Trans Am Ophthalmol Soc* **40**: 262-284.
- Tezel, G., B. C. Chauhan, et al. (2003). "Immunohistochemical assessment of the glial mitogen-activated protein kinase activation in glaucoma." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **44**(7): 3025-3033.
- Thai, T.-P., C. Rodemer, et al. (1999). "Synthesis of plasmalogens in eye lens epithelial cells." *FEBS Lett* **456**(2): 263-268.
- Thai, T. P., C. Rodemer, et al. (2001). "Impaired membrane traffic in defective ether lipid biosynthesis." *Hum Mol Genet* **10**(2): 127-136.

- Theis, M., C. de Wit, et al. (2001). "Endothelium-specific replacement of the connexin43 coding region by a lacZ reporter gene." *Genesis* **29**(1): 1-13.
- Thurston, G., C. Suri, et al. (1999). "Leakage-Resistant Blood Vessels in Mice Transgenically Overexpressing Angiopoietin-1." *Science* **286**(5449): 2511-2514.
- Tien, T., T. Muto, et al. (2014). "Downregulation of Connexin 43 promotes vascular cell loss and excess permeability associated with the development of vascular lesions in the diabetic retina." *Mol Vis* **20**: 732-741.
- Tikhonenko, M., T. A. Lydic, et al. (2010). "Remodeling of retinal Fatty acids in an animal model of diabetes: a decrease in long-chain polyunsaturated fatty acids is associated with a decrease in fatty acid elongases Elovl2 and Elovl4." *Diabetes* **59**(1): 219-227.
- Tout, S., T. Chan-Ling, et al. (1993). "The role of Muller cells in the formation of the blood-retinal barrier." *Neuroscience* **55**(1): 291-301.
- Trexler, E. B., W. Li, et al. (2001). "Coupling from All amacrine cells to ON cone bipolar cells is bidirectional." *J Comp Neurol* **437**(4): 408-422.
- Uemura, A., S. Kusuhara, et al. (2006). "Tlx acts as a proangiogenic switch by regulating extracellular assembly of fibronectin matrices in retinal astrocytes." *J Clin Invest* **116**(2): 369-377.
- Uga, S. and Smelser (1973). "Comparative study of the fine structure of retinal Muller cells in various vertebrates." *Invest Ophthalmol* **12**(6): 434-448.
- Valiunas, V., J. Gemel, et al. (2001). "Gap junction channels formed by coexpressed connexin40 and connexin43." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **281**(4): H1675-1689.
- Vance, J. E. (1990). "Lipoproteins secreted by cultured rat hepatocytes contain the antioxidant 1-alk-1-enyl-2-acylglycerophosphoethanolamine." *Biochim Biophys Acta* **1045**(2): 128-134.
- Viau, S., M. A. Maire, et al. (2009). "Efficacy of a 2-month dietary supplementation with polyunsaturated fatty acids in dry eye induced by scopolamine in a rat model." *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* **247**(8): 1039-1050.
- Vingerling, J. R., C. C. Klaver, et al. (1995). "Epidemiology of age-related maculopathy." *Epidemiol Rev* **17**(2): 347-360.
- Virtamo, J., P. Pietinen, et al. (2003). "Incidence of cancer and mortality following alpha-tocopherol and beta-carotene supplementation: a postintervention follow-up." *JAMA* **290**(4): 476-485.
- Volland, S., J. Esteve-Rudd, et al. (2015). "A comparison of some organizational characteristics of the mouse central retina and the human macula." *PLoS One* **10**(4): e0125631.
- Wang, L., K. Chen, et al. (2015). "DHA inhibited AGEs-induced retinal microglia activation via suppression of the PPARgamma/NFkappaB pathway and reduction of signal transducers in the AGEs/RAGE axis recruitment into lipid rafts." *Neurochem Res* **40**(4): 713-722.
- Watanabe, T. and M. C. Raff (1988). "Retinal astrocytes are immigrants from the optic nerve." *Nature* **332**(6167): 834-837.
- Webber, K. O. and A. K. Hajra (1993). "Purification of dihydroxyacetone phosphate acyltransferase from guinea pig liver peroxisomes." *Arch Biochem Biophys* **300**(1): 88-97.
- Wells, M. A. and J. C. Dittmer (1967). "A comprehensive study of the postnatal changes in the concentration of the lipids of developing rat brain." *Biochemistry* **6**(10): 3169-3175.
- White, A. L., P. Modaff, et al. (2003). "Natural history of rhizomelic chondrodysplasia punctata." *Am J Med Genet A* **118A**(4): 332-342.
- Wiktorowska-Owczarek, A., M. Berezinska, et al. (2015). "PUFAs: Structures, Metabolism and Functions." *Adv Clin Exp Med* **24**(6): 931-941.

- Wolf, R. A. and R. W. Gross (1985). "Identification of neutral active phospholipase C which hydrolyzes choline glycerophospholipids and plasmalogen selective phospholipase A2 in canine myocardium." *J Biol Chem* **260**(12): 7295-7303.
- Wood, P. L., R. Mankidy, et al. (2010). "Circulating plasmalogen levels and Alzheimer Disease Assessment Scale-Cognitive scores in Alzheimer patients." *J Psychiatry Neurosci* **35**(1): 59-62.
- Wu, L., T. Evans, et al. (2013). "Idiopathic macular telangiectasia type 2 (idiopathic juxtafoveolar retinal telangiectasis type 2A, Mac Tel 2)." *Surv Ophthalmol* **58**(6): 536-559.
- Wu, Z. K., L. Cao, et al. (2016). "Promotion on the differentiation of retinal Muller cells into retinal ganglion cells by Brn-3b." *Int J Ophthalmol* **9**(7): 948-954.
- Xu, H., M. Chen, et al. (2008). "Age-dependent accumulation of lipofuscin in perivascular and subretinal microglia in experimental mice." *Aging Cell* **7**(1): 58-68.
- Xu, J., S. Yu, et al. (2003). "Oxidant-mediated AA release from astrocytes involves cPLA(2) and iPLA(2)." *Free Radic Biol Med* **34**(12): 1531-1543.
- Xu, Q., Y. Wang, et al. (2004). "Vascular development in the retina and inner ear: control by Norrin and Frizzled-4, a high-affinity ligand-receptor pair." *Cell* **116**(6): 883-895.
- Yamamoto, T., A. Ochalski, et al. (1990). "LM and EM immunolocalization of the gap junctional protein connexin 43 in rat brain." *Brain Res* **508**(2): 313-319.
- Yang, H. C., A. A. Farooqui, et al. (1996). "Characterization of plasmalogen-selective phospholipase A2 from bovine brain." *Adv Exp Med Biol* **416**: 309-313.
- Yang, H. C., A. A. Farooqui, et al. (1996). "Plasmalogen-selective phospholipase A2 and its role in signal transduction." *J Lipid Mediat Cell Signal* **14**(1-3): 9-13.
- 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.
- Yang, S. P., I. Morita, et al. (1998). "Eicosapentaenoic acid attenuates vascular endothelial growth factor-induced proliferation via inhibiting Flk-1 receptor expression in bovine carotid artery endothelial cells." *J Cell Physiol* **176**(2): 342-349.
- Yao, H., T. Wang, et al. (2014). "The development of blood-retinal barrier during the interaction of astrocytes with vascular wall cells." *Neural Regen Res* **9**(10): 1047-1054.
- Yavin, E. and S. Gatt (1972). "Oxygen-dependent cleavage of the vinyl-ether linkage of plasmalogens. 1. Cleavage by rat-brain supernatant." *Eur J Biochem* **25**(3): 431-436.
- Yavin, E. and S. Gatt (1972). "Oxygen-dependent cleavage of the vinyl-ether linkage of plasmalogens. 2. Identification of the low-molecular-weight active component and the reaction mechanism." *Eur J Biochem* **25**(3): 437-446.
- Yuan, L., J. Zhen, et al. (2016). "The Erythrocyte Fatty Acid Profile and Cognitive Function in Old Chinese Adults." *Nutrients* **8**(7).
- Zahs, K. R. and P. W. Ceelen (2006). "Gap junctional coupling and connexin immunoreactivity in rabbit retinal glia." *Vis Neurosci* **23**(1): 1-10.
- Zahs, K. R., P. Kofuji, et al. (2003). "Connexin immunoreactivity in glial cells of the rat retina." *J Comp Neurol* **455**(4): 531-546.
- Zahs, K. R. and E. A. Newman (1997). "Asymmetric gap junctional coupling between glial cells in the rat retina." *Glia* **20**(1): 10-22.
- Zahs, K. R. and T. Wu (2001). "Confocal microscopic study of glial-vascular relationships in the retinas of pigmented rats." *J Comp Neurol* **429**(2): 253-269.
- Zampatti, S., F. Ricci, et al. (2014). "Review of nutrient actions on age-related macular degeneration." *Nutr Res* **34**(2): 95-105.
- Zeng, H. Y., W. R. Green, et al. (2008). "Microglial activation in human diabetic retinopathy." *Arch Ophthalmol* **126**(2): 227-232.

- Zerbib, J., C. Delcourt, et al. (2014). "Risk factors for exudative age-related macular degeneration in a large French case-control study." Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol **252**(6): 899-907.
- Zhang, Q. Y., L. J. Tie, et al. (2016). "Overweight, Obesity, and Risk of Age-Related Macular Degeneration." Invest Ophthalmol Vis Sci **57**(3): 1276-1283.
- Zhang, Y. and J. Stone (1997). "Role of astrocytes in the control of developing retinal vessels." Invest Ophthalmol Vis Sci **38**(9): 1653-1666.
- Zhao, S. and P. A. Overbeek (2001). "Regulation of choroid development by the retinal pigment epithelium." Mol Vis **7**: 277-282.
- Zoeller, R. A., T. J. Grazia, et al. (2002). "Increasing plasmalogen levels protects human endothelial cells during hypoxia." Am J Physiol Heart Circ Physiol **283**(2): H671-679.
- Zoeller, R. A., O. H. Morand, et al. (1988). "A possible role for plasmalogens in protecting animal cells against photosensitized killing." J Biol Chem **263**(23): 11590-11596.