



Caractérisation et prévention des conséquences d'un syndrome métabolique dans la rétine

Elisa Vidal

► To cite this version:

Elisa Vidal. Caractérisation et prévention des conséquences d'un syndrome métabolique dans la rétine. Alimentation et Nutrition. Université de Bourgogne Franche-Comté (COMUE), 2018. Français. NNT: . tel-02787688

HAL Id: tel-02787688

<https://hal.inrae.fr/tel-02787688>

Submitted on 5 Jun 2020

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

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

THESE DE DOCTORAT
DE L'ETABLISSEMENT UNIVERSITE BOURGOGNE FRANCHE-COMTE

Préparée au Centre des Sciences du Goût et de l'alimentation

Ecole doctorale Environnements-Santé

Doctorat de PHYSIOLOGIE

Par

Vidal Elisa

**Caractérisation et prévention des conséquences d'un syndrome métabolique
dans la rétine**

Thèse présentée et soutenue à Dijon, le 11 juillet 2018

Mr Alain BRON	Professeur, Université de Bourgogne Praticien hospitalier, CHU Dijon	Président du jury
Mme Corinne JOFFRE	Chargée de recherches, INRA Bordeaux	Rapporteur
Mme Corinne MALPUECH-BRUGERE	Professeure des universités, Université d'Auvergne	Rapporteur
Mme Isabelle RANCHON-COLE	Professeure des universités, Université d'Auvergne	Examineur
Mme Martine CLARET	Docteur en pharmacie, Horus Pharma, Saint Laurent du Var	Examineur
Mr Lionel BRETILLON	Directeur de recherches, INRA Dijon	Directeur de thèse

A ma mère,

Table des matières

Table des matières	5
Résumé	9
Abstract	13
Remerciements	15
Liste des abréviations	19
Index des figures	21
Index des tableaux.....	22
Introduction générale.....	23
Etat de l'art.....	27
I. Organisation et fonctionnement de l'œil.....	29
A. Anatomie générale de l'œil	29
B. Les milieux transparents	30
1. L'humeur aqueuse.....	30
2. Le cristallin.....	30
3. L'humeur vitrée	31
C. Les tuniques.....	31
1. Tunique uvéale	31
2. Tunique sclérale	31
3. Tunique nerveuse ou rétine	32
4. Vascularisation de la rétine	49
D. Fonctionnement : de la perception jusqu'à l'intégration du signal	51
E. Moyens d'étude chez le rongeur.....	57
1. Electrorétinographie	57
2. Ophtalmoscopie à balayage laser	58
II. Alimentation normale et pathologique.....	60
A. Alimentation.....	60
1. Prise alimentaire.....	60
2. Habitudes alimentaires	64
3. Un sucre particulier : le métabolisme du fructose	66
4. Le métabolisme des lipides	67
B. Syndrome métabolique	71
1. Définition	71

2.	Epidémiologie.....	73
3.	Pathogenèse.....	75
4.	Modélisation chez l'animal.....	77
C.	Rôle du fructose dans l'apparition des désordres métaboliques.....	80
III.	Rétinopathies liées aux désordres métaboliques	81
A.	La Rétinopathie Diabétique.....	82
1.	Définition et épidémiologie.....	82
2.	Pathogénèse.....	84
3.	Modélisation chez l'animal.....	86
B.	La Dégénérescence Maculaire Liée à l'Age	87
1.	Définition.....	87
2.	Facteurs de risques.....	91
3.	Pathogenèse.....	92
4.	Modélisation chez l'animal.....	95
C.	Points communs de ces pathologies	98
D.	Syndrome métabolique et conséquences sur la rétine.....	99
1.	Rétinopathie diabétique.....	100
2.	Dégénérescence maculaire liée à l'âge	101
IV.	La prévention.....	102
A.	Prévention par l'alimentation	102
1.	Les nutriments dans la rétinopathie diabétique	102
2.	Les nutriments dans la Dégénérescence Maculaire liée à l'Age	104
B.	Lipides - Acides gras polyinsaturés.....	107
1.	Définition.....	107
2.	AGPI LC et rétine	115
3.	La biodisponibilité en AGPI-LC de type oméga 3.....	123
V.	Objectifs et enjeux de thèse.....	126
	Etudes.....	129
I.	Caractérisation dans le temps des changements systémiques induits par un régime diabétogène	131
A.	Problématique.....	131
B.	Article	133
C.	Résultats principaux et conclusions	166
II.	Différences métaboliques entre des rats Brown Norway et Wistar nourris par un régime diabétogène	169

A. Problématique.....	169
B. Article	170
C. Résultats principaux et conclusions	193
III. Biodisponibilité des acides gras polyinsaturés à longue chaîne pour la rétine : Incorporation et localisation dans la rétine.....	195
A. Problématique.....	195
B. Article	197
C. Résultats principaux et conclusions	243
Discussion générale et perspectives	247
Références bibliographiques.....	259

Résumé

Le Syndrome métabolique (SMet) se définit par la coexistence d'au moins 3 des symptômes suivants : une hypertriglycémie, un faible taux de Cholestérol-HDL sanguin, une hyperglycémie à jeun, une adiposité abdominale élevée et une hypertension. Il traduit le développement de désordres glucidiques et lipidiques résultant d'une balance énergétique positive. Par ses caractéristiques, le SMet est un facteur de risque de développer un diabète de type 2 qui se caractérise dans ses formes pathologiques par des altérations macro et microvasculaires, en particulier au niveau de la rétine, créant ainsi une rétinopathie diabétique (RD). Fortement vascularisée et bien que présentant une barrière hémato-rétinienne qui limite l'entrée de composés sanguins, la rétine subit les variations métaboliques. Alors même que les conséquences du diabète à long terme sur la rétine sont bien connues dans le cas de la RD, les conséquences du SMet sur la rétine sont peu étudiées, alors même qu'une prise en charge précoce pourrait diminuer leur importance. A cet égard, une alimentation à la fois riche en acides gras polyinsaturés à longue chaîne (AGPI-LC) de type oméga 3, comme l'acide docosahexaénoïque (DHA) et l'acide eicosapentaénoïque (EPA) et pauvre en oméga 6 participerait à la prévention de l'insulinorésistance, une composante du SMet, et serait protectrice vis-à-vis des premiers stades de la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) et du vieillissement de la rétine. Toutefois, la biodisponibilité des AGPI de type oméga 3 dans les tissus, dont la rétine, est un paramètre important à prendre en compte pour bénéficier de leurs effets protecteurs. Pourtant, ces données de biodisponibilité, selon la source de provenance des acides gras, sont très peu accessibles et méritent d'être étudiées.

Ainsi, nos travaux avaient un double objectif. D'abord nous voulions évaluer l'effet d'un régime pro-diabétogène sur le métabolisme glucidique et lipidique chez le rat pour, de manière concomitante, en étudier les conséquences fonctionnelles et structurales sur la rétine. Nous souhaitions ainsi associer les dysfonctions métaboliques aux altérations de la rétine. Notre second objectif était de comparer l'intégration de plusieurs formulations à base de phospholipides ou triglycérides, portant EPA ou DHA, dans la rétine.

Pour vérifier nos hypothèses, des rats Brown Norway ont été nourris 8 jours, 4 semaines ou 12 semaines avec un régime composé de 60% de fructose et 10% de lipides saturés (HFHF). À l'issue de ces durées, l'étude du métabolisme glucidique a révélé une hyperglycémie à jeun, une intolérance au glucose et une résistance à l'insuline dès 8 jours de régime, alors que les

taux plasmatiques d'insuline, de leptine et des facteurs pro-inflammatoires n'ont pas été modifiés. D'autre part, si une stéatose hépatique est survenue transitoirement à 4 semaines de régime HFHF, nos analyses n'ont pas révélé de dyslipidémie. Ainsi, compte tenu de la résistance de ces rats à développer de manière précoce des altérations d'un mécanisme clé du syndrome métabolique comme la dyslipidémie, nous avons réalisé une étude comparative entre rats Brown Norway (BN) et Wistar (W) soumis à 8 jours et 4 semaines de régime HFHF. Cette étude a révélé que les rats W étaient plus sensibles aux dérégulations lipidiques puisque ces derniers présentaient une dyslipidémie importante dès 8 jours de régime, s'accroissant à 4 semaines de régime. Toutefois, les rats W n'ont pas développé d'insulinorésistance, et présentaient une hyperglycémie à jeun plus tardive que les rats BN. En complément de ces données, les analyses fonctionnelles de la rétine des rats BN par électrorétinographie ont révélé une diminution de sensibilité des photorécepteurs de type cône, après 4 semaines de régime HFHF, sans que d'autres atteintes aient pu être mises en évidence. Après 3 semaines de régime, une néovascularisation choroïdienne a été induite par des impacts laser dans la membrane de Bruch. Nos résultats révèlent ainsi que le régime HFHF constitue un terrain favorable au développement néovasculaire dans la rétine, avec une exacerbation de l'activation des cellules de Müller.

Dans l'objectif d'optimiser la forme d'apport en acides gras à effets protecteurs de la rétine, nous souhaitons étudier l'intégration du DHA dans la rétine apporté par 6 sources de lipides intégrées dans l'alimentation de rats Wistar. L'originalité de ce travail résidait dans un apport principalement en EPA ou en DHA, soit sous forme de phospholipides, soit sous forme de triglycérides. L'équilibre de l'apport en oméga 6/oméga 3 et des autres acides gras a été contrôlé, puisqu'il influence l'intégration du DHA dans les tissus. Nos données qualitatives, obtenues au cours d'un séjour doctoral au Neuroscience Center of Excellence à la Nouvelle Orléans (USA), dans le laboratoire du Pr. Bazan, mettent principalement en évidence un enrichissement de la rétine, et notamment de la couche des photorécepteurs dans une zone à proximité du nerf optique, ceci quelle que soit la formule lipidique considérée lorsqu'elle contenait des AGPI de type oméga 3. Nos données quantitatives révèlent quant à elles une meilleure intégration du DHA, notamment estérifié sur les phosphatidylcholines, dans la rétine lorsque l'EPA est apporté sous forme de phospholipides, et que le DHA est apporté par les phospholipides ou les triglycérides. L'ensemble des régimes permettent d'augmenter la teneur en AGPI à très longue chaîne (VLC) dans la rétine.

Pour conclure, nos travaux suggèrent une altération très précoce de la rétine, concomitante à des désordres majoritairement glucidiques induits par une alimentation riche en fructose et lipides. Ils attirent également l'attention sur le choix du modèle utilisé, pouvant présenter des spécificités à prendre en compte telles que la pathogenèse. Enfin, nos résultats permettent de recommander l'apport en mélange d'EPA et de DHA sous forme de phospholipides et de triglycérides pour améliorer l'incorporation des AGPI oméga 3 dans la rétine, facteur à prendre en compte dans la prévention des pathologies oculaires par les AGPI de type oméga 3.

Abstract

Metabolic syndrome (MetS) is characterized by at least three symptoms among the following ones: hypertriglyceridaemia, a low level of HDL cholesterol, hyperglycaemia, an excess of central body fat and hypertension. It results from carbohydrate and lipid disorders that originate from misbalanced energy metabolism. MetS is a risk factor for type 2 diabetes that, in pathophysiological conditions, is characterized by macro and microvascular alterations, particularly in the retina, creating the diabetic retinopathy (DR). Despite it presents a barrier limiting the input of blood factors, the retina is under metabolic variations. Although the consequences of diabetes on the retina are well known leading to DR, the consequences of MetS are less characterized. Accounting the socioeconomic burden associated to retinal diseases, prevention is timely adapted to limit the threatening consequences of retinal aging and pathologies. MetS would be responsible for the inflammation and microvascular alterations in the retina and could participate to the development of age-related macular degeneration (AMD). A diet rich in omega-3 long chain polyunsaturated fatty acids (LC-PUFA) i.e. docosahexaenoic acid (DHA) and eicosapentaenoic acid (EPA) and low omega-6 fatty acid, should participate to the prevention of insulin resistance, a feature of MetS. Such diet would be protective against AMD. The leading cause of visual impairment after the age of 55 years in Western populations. Meanwhile, the bioavailability of omega-3 in tissues, including the retina, is an important parameter to consider to fully take advantages of their protective effects. Yet, data on the bioavailability of fatty acids from different origins are sparse and need to be studied.

Our first goal was to associate metabolic and retinal disturbances in the context of MetS. For that purpose, we evaluated the impact of a pro diabetic diet on carbohydrate and lipid metabolism in the rat, and further analyzed the function and structure of the retina. Our second objective was to compare the efficacy of phospholipids and triglycerides to improve the incorporation of omega-3 LC-PUFA in the retina and others tissues in the rat.

Brown Norway (BN) rats were fed 8 days, 4 weeks or 12 weeks with a 60% fructose and 10% saturated lipid diet (HFHF). The results revealed fasted hyperglycaemia, glucose intolerance and insulin resistance at 8 days and afterwards, while plasma insulin levels, leptin and pro-inflammatory factors were not modified. In addition, liver steatosis was transiently present at 4 weeks of HFHF diet, without dyslipidaemia. Thus, considering the resistance of BN rats to

develop dyslipidaemia, we performed a comparative study with BN and W rats by feeding them with HFHF for 8 days and 4 weeks. Our results showed that W rats were more sensitive to lipid deregulations since they developed dyslipidaemia at 8 days and 4 weeks of HFHF diet. However, they did not develop insulin resistance, and developed hyperglycaemia later than BN. Regarding these data, functional analyses of retina by electroretinography was performed in BN. Electroretinograms revealed a loss of cone photoreceptor sensitivity after 4 weeks of HFHF diet without other functional dysfunction.

In one independent group of BN rats, choroidal neovascularization was induced by rupture of Bruch's membrane with impact lasers in eye fundus. Retinal angiography revealed that feeding HFHF diet during 4 weeks favoured neovascular development in the retina, and activated Müller cells. Then, we wanted to compare omega-3 LC-PUFA integration in the retina by feeding Wistar rats with 6 different lipid sources. The strength of this work was to use either phospholipids, triglycerides or a mix of both, that contained either EPA or DHA as the prominent omega-3 fatty acid. Our qualitative data, obtained from a doctoral internship in the Neuroscience center of excellence at New Orleans (USA), in Pr. Bazan's laboratory, revealed an increase of DHA in the retina, particularly in the photoreceptor layer, around the optic nerve, regardless lipid formula. Our quantitative data revealed a better integration of DHA, particularly DHA-containing phosphatidylcholine, in the retina, when EPA is provided esterified on phospholipids, and DHA is provided on both, phospholipids and triglycerides. All the supplemented diets allowed an increase in very long chain-PUFAs in the retina.

To conclude, our work suggested that in a model of MetS induced by feeding with HFHF diet, deregulation of glucose metabolism, but no dyslipidemia, was sufficient to favor the development of vascular changes in the retina. Based on strain differences in the effects of HFHF diet on glucose and lipid metabolism between BN and W rats, our data pointed out the need to fully characterize the model in the objective to define its strengths and weaknesses. Finally, our results allow recommending the supplementation of triglycerides and phospholipids containing EPA and DHA to improve incorporation of omega-3 LC-PUFAs in the retina, one parameter that could be useful for primary prevention of ocular diseases with omega-3 LC-PUFAs.

Remerciements

Cette thèse CIFRE a été réalisée au sein de l'équipe Œil, Nutrition et Signalisation cellulaire à l'UMR CSGA INRA 1324 CNRS 6265 dirigée par Lionel Bretilon, en collaboration avec les laboratoires HORUS PHARMA, à Saint Laurent du var.

Lionel, merci de m'avoir intégré dans cette équipe, merci pour la confiance et la liberté que tu m'as accordée tout au long de cette thèse. Tu m'as tellement fait gagner en maturité ! Je sais à présent que je pourrai surmonter n'importe quel événement et tu m'as permis de développer des ressources dont je ne soupçonnais pas l'existence. Merci de m'avoir permis de participer deux fois à ce magnifique congrès qu'est l'ARVO et m'avoir permis de partir 3 mois dans le Bayou de la Big Easy pour ~~voir les crocodiles~~ faire du MALDI ! Je te souhaite du bonheur pour la suite !

Ce travail n'aurait pas été possible sans le soutien des Laboratoires Horus Pharma, qui m'ont permis de réaliser cette thèse CIFRE dans d'excellentes conditions, merci pour le financement des différents projets et pour m'avoir permis de participer aux différents congrès. Merci à Martine Claret, Claude Claret, Carole Gard et Magalie Thierry pour l'intérêt que vous avez porté à mon travail et pour nos différents échanges tout au long de ma thèse.

Je remercie chaleureusement mon comité de suivi de thèse, Sophie Layé et Dominique Delmas. Merci pour vos conseils, et nos discussions qui faisaient que j'attendais ce moment avec impatience.

Je tiens à remercier la Plateforme Chemosens pour leur travail en LC/MS. Merci Olivier pour tes conseils dans le choix des analyses, merci Stéphanie pour la réalisation des expériences et tes explications, merci pour nos discussions. Merci à Spiro pour ton travail sur mes analyse et tes conseils et corrections dans l'écriture de l'article. Merci à l'ensemble de la plateforme, sans oublier Esther, Géraldine et Nico, pour leur gentillesse, leur humour et pour les moments partagés ensemble.

Merci à la Plateforme Dimacell, notamment Jeannine Lherminier. Merci pour ton enthousiasme, ton énergie et pour la transmission de ton goût pour la MET, les choses imperceptibles sont effectivement les plus belles ! Merci à Véronique, pour ton aide et nos discussions en MET ! Christine, merci pour les essais de microdissection laser, extraction d'ARN et ta gentillesse !

Merci aux membres de l'animalerie, Alexia, pour ton aide et nos discussions, Elise, pour ton aide dans mes manips, Laurence, Martin et Anne pour votre gentillesse, merci à tous pour l'attention que vous avez porté à mes petits.

Sylvie, Laurence et Véronique, merci pour votre aide logistique et vos sourires.

Je remercie Novastell, en particulier Thierry Costes pour m'avoir fourni les matières premières, ainsi que pour nos discussions scientifiques et l'enthousiasme dont il a fait preuve vis-à-vis de mon travail.

De même un grand merci à Knut Fredrik d'Aker Biomarine pour m'avoir rapidement fourni l'huile de Krill, tout droit de Norvège.

Un immense merci au Pr. Nicolas Bazan, Pr. William Gordon et Dr. Bokkyoo Jun pour leur accueil, leur aide, leur inspiration. Merci Pr. Bazan pour votre enthousiasme scientifique incroyable. Merci Pr. Gordon pour l'ensemble de nos discussions scientifiques et non scientifiques, pour vos idées et votre malice, et pour m'avoir appris l'art de ~~faire et de boire des Martini~~ de faire « *a perfect jello for eyes* ». Bokkyoo, un immense merci pour toute ton aide, pour tes conseils, nos discussions, nos repas partagés pendant ma durée à NOLA. Un grand merci à l'ensemble de l'équipe du LSU, particulièrement Marie-Audrey Kautzmann pour sa gentillesse, pour l'ensemble des moments partagés, tes conseils, et ton super accueil dès mon arrivée.

Merci au Rotary club Riverband New Orleans pour leur accueil et particulièrement à Johan, David et Bill, qui m'ont reçu chez eux comme une reine pendant ces 3 mois, ce fut une incroyable aventure humaine. Je garderai votre philosophie, «Laissons le bon temps rouler» et j'espère vous revoir très bientôt !

Merci à l'ensemble de l'équipe Œil, ou chacune, chacun apporte un élément essentiel à la vie du labo, et fait qu'elle est agréable à vivre. Merci à tous pour votre gentillesse, votre bienveillance, votre sourire et votre humour.

Niyazi, un immense merci pour ton enthousiasme scientifique, la transmission de tes connaissances en lipides, ERG et angio, tes conseils en tout genre, ton soutien et encouragements, tu fais un super chef d'équipe !

Marie-Agnès, merci pour ta gentillesse, ta bienveillance, nos discussions et la pertinence de tes remarques permettant de trouver des solutions à tout !

Elodie, merci pour ta sympathie et tes conseils, et nos discussions lors des réunions cahier de Labo !

Marie-Annick, merci pour ton aide dans les nombreux projets où on a travaillé ensemble ! Merci pour toutes les discussions, autour du MET, du cryostat, de la microdissection laser, de l'animalerie ou encore de la salle de dissection au sous-sol ! Un bon départ dans la nouvelle vie qui s'ouvre à toi !

Merci à Stephane, l'épicurien, pour avoir partagé les adresses de resto, de bons vins, pour nos discussions sur la vie et bien sûr pour ton très bon travail et ton implication sur les lipides, et les nombreux essais avec ma poudre d'œuf ...

Lucy, merci pour ta gentillesse et pour nos discussions, merci pour l'aide que tu m'as apportée pour cette dernière manip, pour les ampoules aux mains qu'on a eu ...

Sékolène, merci pour ton perpétuel sourire, ton enthousiasme quotidien et ta bienveillance, ton aide dans les bilans lipidiques.

Béné et Lolo, merci pour votre gentillesse et votre humour toujours bien placé ! Merci pour les mots croisés, les horoscopes et tous les moments partagés !

Cynthia et Rodolphe, merci pour votre accueil lors de mon arrivée et votre sympathie.

Merci Alain Bron et Catherine Creuzot-Garcher pour vos conseils, notamment lors de l'ARVO.

Merci à Pierre Henry pour avoir si bien pris soin de mes urgences cérébrales et visuelles, le comble de la neuroscientifique bossant sur la vision...

Merci à Julie, ma première copine de bureau, merci pour ton super accueil, ton enthousiasme, ta joie de vivre et nos rires. Merci Estelle et Sarah pour votre accueil lors de mon arrivée et les supers bons moments partagés !

Valérie, merci pour ton sourire, ton rire et pour m'avoir motivé à aller au sport et m'avoir fait découvrir les body trucs ... et pour les analyses sur les foies ! ☺

Elise et Mayssa, mes habibi, je pourrai écrire une thèse sur vous tellement vous êtes ~~folles~~ géniales, je vous remercie tellement pour votre soutien, vos conseils, vos rires, vos expressions, votre musique (~~bof~~), votre folie qui fait que les journées passent très vite ! Ne pas vous voir tous les jours va me manquer... je vous souhaite de bonne ondes pour la suite ! Et surtout n'oubliez pas de lire régulièrement les petits mantras que je vous lègue ;). Vous allez tout déchirer ! Merci au baby Rémi, pour ton enthousiasme et tes conseils ~~et m'avoir fait découvrir le rhum du Barbrousse~~ ! Je te lègue mes poissons et mes copines, prends en bien soin parce que je ne serai jamais bien loin !

Merci à Vincent pour son travail lors de son stage de M1, bonne chance pour la suite !

En dehors du labo,

Je remercie les filles de l'atelier créatif de l'ADAS, merci pour votre créativité et vos rires !

Je tiens à remercier les personnes qui m'ont permis d'accéder étape par étape au doctorat, merci à Pacal Rouillet, Claire Rampon, Anne Lorsignol, Mathieu Wolff pour la transmission de votre esprit critique, de votre enthousiasme scientifique et votre bienveillance.

Merci aux membres de l'Expé pour ces supers moments de vulgarisation !

Merci à mes amis Amnestiens pour m'avoir transmis votre enthousiasmante ténacité envers la défense des droits humains, vous êtes pour moi de véritables exemples, et m'avez permis de relativiser tant de choses.

Immense merci à mes amis qui m'accompagnent quoi qu'il arrive et sans qui rien ne serait pareil, particulièrement Aubrée, Manon, Kiki, Sophie, Marie, Audrey, Marine, Jenny et Maria, ma belle rencontre Dijonnaise.

Un immense merci à ma famille,

Je remercie infiniment ma mère, mon pilier, tout ceci n'aurait pas été possible sans toi ! Merci pour la force, la ténacité et la joie de vivre, toutes ces choses que tu m'as transmises en toute situation. Merci pour ton soutien sans faille, ton sourire, merci de tout comprendre et d'être là!

Mon père, merci pour ton soutien, ta joie de vivre. Merci pour tes conseils pour relativiser quand il le faut, et tes histoires exotiques pour me changer les idées de la thèse ! Tu as raison ... c'est beau de faire un travail qu'on adore !

Merci à Jijou, pour ton soutien, merci d'être présent quoiqu'il arrive et pour ton aide dans toutes les situations ! Prends bien soin de toi !

Merci à Anita, pour ta gentillesse et ta bonne humeur quand on se voit !

Un grand merci à ma Mamie Marcelle pour tout ce que tu m'apportes, pour m'avoir appris d'abord à aimer l'école, m'avoir appris à assumer mes opinions, à être pugnace ~~ou têtue, on ne sait pas trop~~, forte et juste parfois à tout balancer et à rire. Sans oublier mon grand-père, bâtisseur de mon enfance.

Ma grand-mère Marie, merci de m'avoir appris que tout est possible, que « le non, on l'a toujours, mais le oui il suffit de le demander » ! Merci de m'avoir transmis une certaine force de caractère. Pensées à mon grand-père, la force tranquille.

Merci à Jeannine, pour votre gentillesse et votre bienveillance en tout point, merci d'être là ! A Yves et ses rires.

Mon vieil Oncle et ma Tatie Mumu, merci d'être là, merci pour votre soutien dans toutes les situations ! On va pouvoir le faire le voyage en Amazonie maintenant ☺

Annabelle, ma cousine, ma sœur on ne sait plus trop, merci pour ta grande aide tout le long de la thèse et tout au long de ma vie, de manière générale, merci de rationaliser quand je n'y arrive plus (~~j'ai 2/3 exemples~~), pour la gestion de crise, pour nos voyages en tout genre et nos moments de noirceurs et de lumière. Merci pour ta force et ta poésie. Merci d'être là, toujours. Ta thèse va être superbe, tu es la meilleure !

Guillaume, ma plus belle rencontre Dijonnaise, merci d'être là, quoiqu'il arrive. Merci pour ton enthousiasme à toute épreuve, pour ta force et tes conseils, la vie avec toi est d'une douceur acidulée dont j'aurai du mal à me passer.

Finalement, Merci à tous d'être le sel de ma vie et mon MOJO quotidien ☺

Liste des abréviations

AA	: acide arachidonique
AG	: acide gras
AGE	: produit de glycation avancé
AGMI	: acide gras mono-insaturé
AGPI-LC	: acide gras polyinsaturés à longue chaîne
AGPI-VLC	: acide gras polyinsaturés à très longue chaîne
AgRP	: agouti related protein
AGS	: acide gras saturé
ALA	: acide alpha-linolénique
AMD	: age-related macular degeneration (DMLA)
ANSES	: Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail
AREDS	: age-Related Eye Disease Study
BHR	: barrière hémato-rétinienne
BN	: brown norway
CETP	: protéine de transfert des esters de cholestérol
CNV	: choroïdal neovascularisation
COX	: cyclo-oxygénases
CRP	: protéine réactive-C
DHA	: docosahexaenoic acid
DMLA	: dégénérescence maculaire liée à l'âge
EC	: esters de cholestérol
ECM	: matrice extracellulaire
ELOVL4	: elongation of very long chain fatty acids protein 4
EPA	: eicosapentaenoic acid
EPR	: épithélium pigmentaire rétinien
ERG	: électrorétinographie
FAO	: organisation pour l'alimentation et l'agriculture des Nations Unies
GFAP	: protéine acide fibrillaire gliale
GLUT	: transporteur de glucose
HDL	: high density lipoproteins
HFCS	: high fructose corn syrup
HFHF	: high fructose high fat
IDF	: international diabetes federation
IL	: interleukine
IMC	: indice de masse corporelle
INCA	: étude sur les consommations et les habitudes alimentaires
IPM	: interphotoreceptor matrix
LA	: linoleic acid
LC/MS	: liquid chromatography / mass spectrometry
LCAT	: lécithine cholestérol transférase
LC-PUFA	: long chain polyunsaturated fatty acid
LDL	: low density lipoproteins

LOX	: lipoxygénases
MALDI-IMS	: désorption-ionisation laser assistée par matrice – imagerie par spectrométrie de masse
MLA	: maculopathie liée à l'âge
NCEP/ATP	: National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel
NHANES	: National Health and Nutrition Examination Survey
NPD1	: neuroprotectine D1
NPY	: neuropeptide Y
NTS	: noyau du tractus solitaire
PDE	: phosphodiesterase
PG	: prostaglandine
PGI	: prostacycline
PKC	: protéine kinase C
PL	: phospholipide
PLA2	: phospholipase A2
POMC	: proopiomélanocortine
PPAR	: peroxisome proliferator activated receptor
PR	: photorécepteur
RCPG	: récepteur couplé à une protéine G
RD	: rétinopathie diabétique
ROS	: espèces réactives de l'oxygène
Rv	: résolvine
RXR	: retinoid X receptor
SLO	: ophtalmoscopie par balayage laser confocal
SMet	: syndrome métabolique
TG	: triglycérides
TX	: thromboxane
VEGF	: vascular endothelium growth factor
VLDL	: very low density lipoproteins
VTA	: aire tegmentale ventrale
W	: wistar

Index des figures

Figure 1 : Représentation schématique d'une coupe sagittale d'œil humain	30
Figure 2 : Anatomie de la rétine.....	34
Figure 3 : Architecture des différentes zones de la rétine centrale.	35
Figure 4 : Distribution des photorécepteurs dans l'œil.....	36
Figure 5 : Structure des photorécepteurs.....	37
Figure 6: Longueurs d'ondes absorbées par les différentes opsines.....	40
Figure 7: Interactions cellules de Müller-neurones dans la rétine adulte normale.....	46
Figure 8: Principales fonctions de l'épithélium pigmentaire rétinien.....	48
Figure 9 : Réseaux vasculaires de la rétine.	49
Figure 10 : Schéma moléculaire de transmission, d'amplification et de régulation du signal dans les bâtonnets rétiens.	52
Figure 11 : Cycle visuel des cônes.	54
Figure 12: Représentation schématique des champs récepteurs de la rétine.....	56
Figure 13 : Réponse ERG d'un rat.....	58
Figure 14: Visualisation des différentes couches selon la longueur d'onde.....	59
Figure 15 : Convergence de multiples signaux du statut énergétique de l'organisme dans le système nerveux central.	62
Figure 16 : Métabolisme du fructose et du glucose dans l'hépatocyte.	67
Figure 17 : Métabolisme des lipoprotéines et action de l'insuline	70
Figure 18 : Pathophysiologie du Syndrome métabolique	77
Figure 19 : Caractéristiques de la rétinopathie diabétique	83
Figure 20 : Caractéristiques des différents stades de la dégénérescence maculaire liée à l'âge	90
Figure 21 : Principaux événements de la pathogenèse de la DMLA	95
Figure 22 : Elongation et désaturation des acides gras polyinsaturés à longue chaîne de type oméga-3 et oméga-6.....	109
Figure 23 : Mécanismes de biosynthèse des eicosanoïdes et docosanoïdes	112
Figure 24 : Transport du DHA entre cellules et organes.....	121

Index des tableaux

Tableau 1 : Critères cliniques proposés pour le diagnostic du syndrome métabolique	72
Tableau 2: Définition du Syndrome métabolique par la Fédération Internationale de Diabète.	73
Tableau 3 : Modèles rongeur de rétinopathie diabétique	87
Tableau 4 : Classification clinique de la DMLA.....	89
Tableau 5 : Modèles rongeur de DMLA	97
Tableau 6 : Comparaison des caractéristiques entre la DMLA et la RD	99
Tableau 7 : Nutriments et risque de Dégénérescence maculaire liée à l'âge.....	106

Introduction générale

L'œil est probablement l'organe le moins étudié dans les domaines de l'alimentation et la nutrition alors même que les conséquences d'un déséquilibre alimentaire sur la vue peuvent être dévastatrices. En effet, l'un des principaux facteurs de risque de la perte de vision dans les pays industrialisés est le diabète, qui touche 422 millions de personnes dans le monde (Mathers and Loncar 2006). L'incidence du diabète est amplifiée par le syndrome métabolique (SMet), dont le développement résulte des modifications de nos modes de vie et du vieillissement de la population (Ford, Li et al. 2008). Le SMet se caractérise par des troubles d'origine lipidique et glucidique, qui favorisent les altérations macro et microvasculaires.

Les pays industrialisés détiennent une ingestion de sucres ajoutés importante, favorisant les altérations retrouvées dans le SMet. Un de ces sucres ajoutés, le fructose, est particulièrement pernicieux au regard du métabolisme du glucose (Cordain, Eaton et al. 2005; Goran, Ulijaszek et al. 2013), et serait un des principaux responsables de l'épidémie d'obésité et de diabète mondiale (Stanhope, Schwarz et al. 2009).

Des pathologies oculaires des populations des pays industrialisés, comme la rétinopathie diabétique (RD) ou la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA), sont liées à nos conditions de vie. La sédentarité et le tabagisme interviennent notamment dans le développement de ces deux pathologies, alors que les apports nutritionnels trop gras et sucrés sont particulièrement liés au développement de la RD (Bourne, Stevens et al. 2013). La perte partielle ou totale de vue qui en résulte peut grandement affecter la qualité de vie des personnes et de leur environnement familial (Brown and Barrett 2011; Hong, Mitchell et al. 2014), et a un impact économique non médical important, équivalent à 7% des dépenses totales de santé en France (Lafuma, Brezin et al. 2006).

Mais l'alimentation, si elle peut être néfaste lorsqu'elle est déséquilibrée et en trop grande quantité, apporte également des nutriments ayant un effet thérapeutique ou préventif par leurs propriétés, comme les acides gras polyinsaturés à longue chaîne (AGPI-LC) de type oméga 3 (n-3 ou ω 3).

Les AGPI-LC ω 3, comme l'acide docosahexaénoïque (DHA) et l'acide eicosapentaénoïque (EPA), constituent par exemple une famille d'acides gras essentiels à notre organisme, qui

sont synthétisés en faible quantité à partir des précurseurs, et doivent donc être fournis par l'alimentation. Ces acides gras sont nécessaires au développement des tissus nerveux et permettent de réduire les risques cardiovasculaires. Ils sont anti-inflammatoires, et ont un effet positif sur le maintien de la santé mentale et sont acteurs de la prévention de la DMLA. Les AGPI-LC ω 3 sont retrouvés de manière abondante dans les poissons, notamment les poissons gras. Or, selon un rapport de la FAO (Organisation pour l'alimentation et l'agriculture des Nations Unies) de 2016, la consommation de poisson a doublé en 50 ans et est passée de 10 kg par an et par habitant en 1960 à plus de 20 kg par an et par habitant en 2016. Toutefois, les réserves en poisson sont à présent à des niveaux biologiquement non viables.

De manière concomitante, l'intérêt pour les compléments alimentaires s'accroît, selon la troisième étude sur les consommations et les habitudes alimentaires de la population française (INCA3), commandé par l'agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES), la consommation de compléments alimentaires est passée de 20 à 29% de 2006-2007 à 2014-2015. Ainsi, les ressources diminuent tandis que la consommation et l'intérêt pour les compléments alimentaires à visée santé augmente. C'est pourquoi il est indispensable de déterminer quelles sources d' ω 3 s'incorporent le mieux au niveau de leur lieu d'action.

Si l'œil dans sa globalité peut être affecté par l'alimentation, ce manuscrit s'intéressera plus particulièrement à la rétine, cette membrane photosensible, en relation avec son environnement.

Dans ce contexte, nous soutenons l'hypothèse qu'un régime riche en fructose et lipides saturés est inducteur d'un syndrome métabolique, ayant des conséquences précoces sur la fonction et la structure de la rétine. Les AGPI-LC ω 3 sont reconnus pour leurs effets bénéfiques dans la rétine. Nous avançons l'idée que l'intégration des ω 3 n'a pas lieu au niveau de l'ensemble de la rétine, mais particulièrement au niveau des photorécepteurs, et que certaines sources alimentaires ont une meilleure biodisponibilité pour la rétine.

Pour ce faire, ce manuscrit se compose de 3 parties.

La première partie rappelle le paysage bibliographique dans lequel la thèse s'inscrit. Cette partie évoque d'abord la composition et le fonctionnement de la rétine. Les pathologies induites notamment par des déséquilibres de l'alimentation tels que le syndrome métabolique et le diabète de type 2 seront ensuite abordées. Dans un troisième temps, il s'agira de

s'intéresser aux pathologies de la rétine ayant pour facteur de risque les désordres métaboliques tels que la RD et la DMLA. Enfin, l'apport de certains nutriments, et en particulier les AGPI-LC ω 3, comme moyen de prévention de ces pathologies, et leur impact direct ou non sur la rétine sera traité.

La deuxième partie de ce manuscrit s'intéressera quant à elle plus précisément aux trois études scientifiques menées au laboratoire.

La première étude concerne l'induction d'un syndrome métabolique par une alimentation riche en fructose et lipides (HFHF) chez le rat Brown Norway (BN). Cette étude avait pour but de caractériser et d'associer les désordres métaboliques induits par un régime HFHF, aux modifications de la rétine. La caractérisation des modifications induites par un régime HFHF a été réalisée d'une manière temporelle (8 jours, 4 semaines et 12 semaines), au niveau central, par des dosages plasmatiques et hépatiques, et au niveau rétinien par l'étude de la fonction, de la structure et de la vascularisation.

La deuxième étude compare le développement des désordres métaboliques induits par un régime HFHF dans deux souches de rats : les Brown Norway et les Wistar. Ces animaux ont donc reçu soit 1 semaine, soit 4 semaines de régime HFHF, et des dosages plasmatiques et hépatiques ont révélés une temporalité différente entre les souches, pour la mise en place d'un syndrome métabolique.

Enfin, la troisième étude s'intéresse à l'intégration dans les tissus dont la rétine, des AGPI-LC ω 3 apportés par l'alimentation. Pour ce faire, 7 régimes alimentaires différents par leur composition en lipides ont été présentés à des rats Wistar pendant 8 semaines. Ainsi, les différences majeures entre les 7 catégories de croquettes qui ont été utilisées, reposent sur la composition en AGPI-LC ω 3 composée majoritairement :

- De l'EPA lié aux phospholipides (PL-EPA)
- Du DHA lié aux phospholipides (PL-DHA)
- De l'EPA lié aux triglycérides (TG-EPA)
- Du DHA lié aux triglycérides (PL-DHA)
- De 2% d' ω 3 sans EPA ni DHA (régime témoin)

Deux autres régimes, non traité dans l'article étaient composés de :

- DHA lié à 100% aux phospholipides (œuf)

- Un mélange de triglycérides et de phospholipides liant EPA et DHA (hareng), reflétant la partie lipidique d'une formule de complément alimentaire.

Des analyses par spectrométrie de masse couplée à l'imagerie (MALDI-IMS) ont été réalisées pour établir une cartographie lipidique de la rétine. Des dosages de lipides dans la rétine et d'autres tissus ont également été réalisés par chromatographie en phase gazeuse (CPG) et chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC/MS).

Pour clore le manuscrit, la troisième partie discutera de l'ensemble des résultats, notamment leur intérêt par rapport aux connaissances cliniques. On tentera alors d'apporter des perspectives quant à la poursuite de ces travaux.

Etat de l'art

I. Organisation et fonctionnement de l'œil

A. Anatomie générale de l'œil

La vision est imputée à notre œil et à notre cerveau. L'œil est spécialisé dans la réception des photons et la transformation de cette information lumineuse en information électrochimique est transmise au cerveau par le nerf optique. Le cerveau traite ces informations et apporte la conscience de ce que nous voyons. Ainsi, la fonction de l'œil consiste à concentrer la lumière extérieure sur la partie photosensible de l'œil : la rétine. Des cellules spécialisées de la rétine vont alors transduire ces photons en signal électrochimique, qui est finalement transmis au cerveau via le nerf optique. Ainsi, toutes les structures de l'œil sont vouées à cette fonction, soit en facilitant la concentration de la lumière sur la rétine, soit en permettant la transmission et la modulation du signal.

Les globes oculaires sont placés dans les cavités orbitales au niveau de l'os frontal du crâne. Leur mobilité est assurée par les muscles oculomoteurs. L'œil est vascularisé par l'artère ophtalmique, émergeant de la carotide interne, puis par l'artère centrale de la rétine, les artères ciliaires postérieures, l'artère lacrymale, l'artère supra orbitaire, les artères ethmoïdales et les artères musculaires. Son hydratation se fait par les larmes, apportées par les glandes lacrymales.

Le globe oculaire se divise en deux segments :

- Le segment antérieur, qui est constitué de la cornée, de la chambre antérieure située devant l'iris, de l'iris, de la chambre postérieure à l'arrière de l'iris, du cristallin et des corps ciliaires. Le segment antérieur est rempli d'un liquide transparent, l'humeur aqueuse, produit par les corps ciliaires. Ce liquide va nourrir la cornée et circule de manière permanente entre les deux chambres du segment antérieur par la pupille. L'humeur aqueuse est éliminée dans l'angle iridocornéen, par le trabeculum.
- Le segment postérieur, à l'arrière du cristallin, comprend la sclère, la choroïde, la rétine et contient l'humeur vitrée, un autre corps transparent.

L'œil est formé de plusieurs parties fonctionnelles distinctes (Figure 1) et se définit comme un contenant et un contenu. Le contenant correspond à trois tuniques : la tunique uvéale, la tunique sclérale et la tunique nerveuse. Le contenu correspond quant à lui aux milieux transparents : l'humeur aqueuse, le cristallin et l'humeur vitrée. Ces milieux transparents permettant le passage des rayons lumineux jusqu'à la rétine.

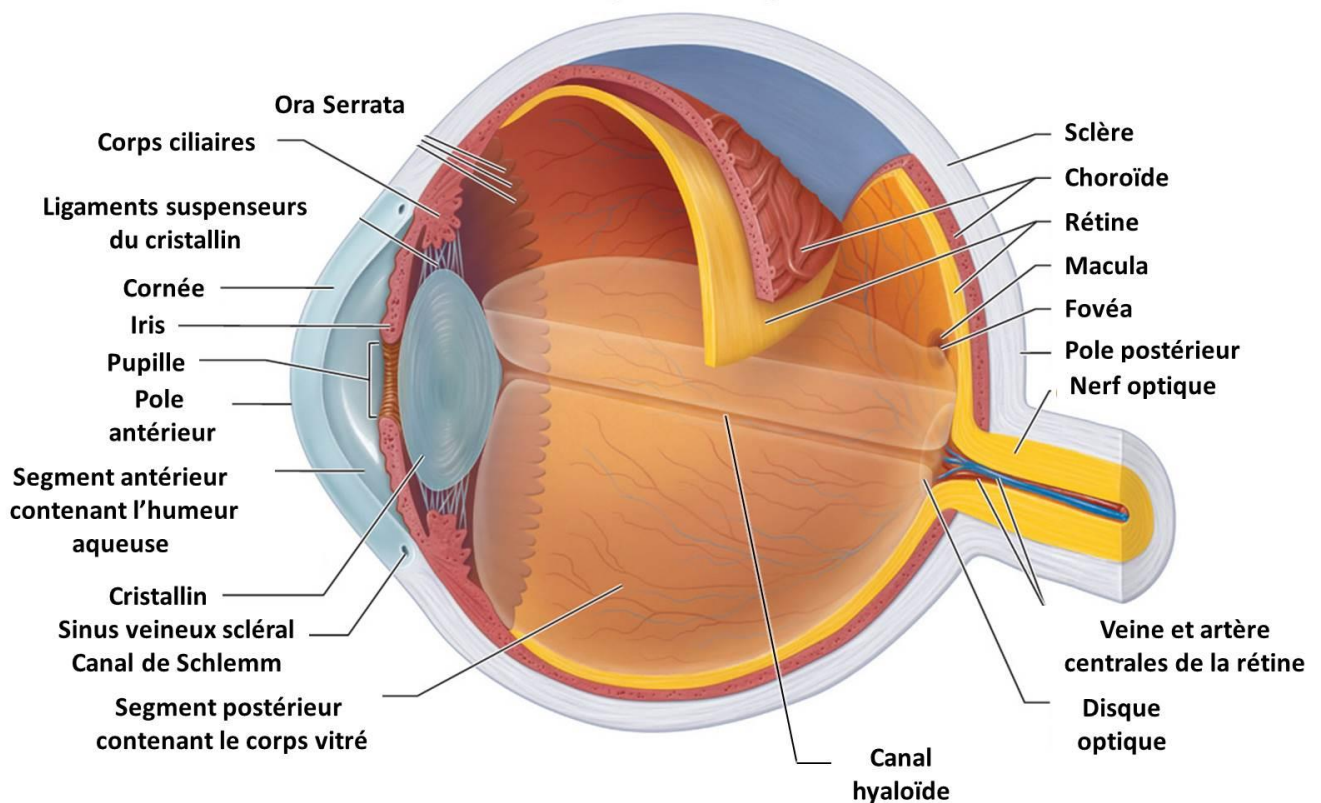


Figure 1: Représentation schématique d'une coupe sagittale d'œil humain

Marieb, Elaine N. Essentials of Human Anatomy & Physiology. 9th edition. Copyright 2009.

B. Les milieux transparents

1. L'humeur aqueuse

L'humeur aqueuse est un liquide transparent situé dans le segment antérieur de l'œil, à l'arrière de la cornée et en avant de l'iris. Sa fonction est de maintenir une pression intraoculaire constante. L'humeur aqueuse est sécrétée en continu par les procès ciliaires et est évacuée au niveau du trabéculum par le canal de Schlemm, situé dans l'angle iridocornéen, pour rejoindre la circulation générale.

2. Le cristallin

Le cristallin, à l'arrière de l'iris, est une lentille biconvexe, convergente et avasculaire, amarrée aux procès ciliaires par son ligament suspenseur : la zonule. Le cristallin est constitué de cellules anucléées en son centre, formant un bulbe, l'ensemble encapsulé dans une membrane conjonctive fine : la cristalloïde. Sa fonction est de focaliser la lumière sur la zone la plus sensible à la lumière de la rétine : la fovéa. Le cristallin assure la mise au point et l'accommodation grâce à une modification de sa courbure, sous l'effet de la contraction du muscle ciliaire. Il permet ainsi le passage de la vision de loin à la vision de près.

3. L'humeur vitrée

L'humeur vitrée ou corps vitré est un gel transparent à l'arrière du cristallin, entouré d'une fine membrane, la hyaloïde, tapissant la face postérieure du cristallin et la face antérieure de la rétine. Il remplit les 4/5èmes de la cavité oculaire. Le corps vitré est composé de 98% d'eau, de vitrosine, d'acide hyaluronique, d'opticine et de quelques phagocytes. Sa fonction est de maintenir la tension et la rigidité de l'œil. Il est sécrété par les cellules de la partie non pigmentée des corps ciliaires, qui dégèrent après la naissance. Il ne se renouvelle pas au cours de la vie.

C. Les tuniques

1. Tunique uvéale

La tunique uvéale se compose de l'iris et des corps ciliaires pour le segment antérieur et de la choroïde pour le segment postérieur.

L'iris, situé dans l'humeur aqueuse, est un diaphragme circulaire perforé en son centre par la pupille. La taille de l'orifice est contrôlée de manière réflexe par deux muscles : le sphincter de la pupille et le dilatateur de l'iris. La pupille est de petit diamètre à la lumière vive, c'est le myosis, et de grand diamètre dans l'obscurité, c'est la mydriase. La variation du diamètre de la pupille permet le contrôle de la quantité de lumière qui va atteindre la rétine. L'iris est pigmenté conférant à l'œil sa couleur.

Les corps ciliaires sont composés par une portion antérieure appelée les procès ciliaires. Ces procès ciliaires sont responsables de la sécrétion de l'humeur aqueuse. Ils possèdent des insertions pour le muscle suspenseur du cristallin, la zonule, et le muscle ciliaire permettant l'accommodation.

La choroïde est un tissu vasculaire responsable de la nutrition de l'épithélium pigmentaire rétinien et des couches externes de la rétine neurosensorielle. La présence de mélanine lui confère un aspect pigmenté qui limite la réflexion des rayons lumineux sur la face interne de la sclère. Une description plus complète de la choroïde est présente dans le paragraphe « vascularisation Choroïdienne ».

2. Tunique sclérale

La tunique sclérale est une membrane fibreuse apportant de la rigidité et de la résistance à l'œil. Elle est constituée à l'avant par la cornée, transparente, et se poursuit à l'arrière de l'œil

par la sclère, opaque. La jonction entre la cornée et la sclère est dénommée limbe sclérocornéen, qui est richement innervé et vascularisé.

La cornée est la première lentille qui permet une convergence des rayons lumineux sur le cristallin. Elle est composée de cinq couches cellulaires qui sont sur un axe antéro-postérieur : l'épithélium, la membrane de Bowman, le stroma cornéen, la membrane de Descemet et l'endothélium. La cornée est avasculaire mais très richement innervée.

La sclère est constituée d'un tissu conjonctif blanc, conférant la couleur blanche à l'œil. Elle est résistante et assure à l'œil sa forme ronde et sa rigidité. Elle est peu vascularisée, peu innervée et reçoit l'ensemble des muscles oculomoteurs. La partie antérieure de la sclère est recouverte jusqu'au limbe par la conjonctive, une muqueuse transparente. La partie postérieure de la sclère présente un orifice par lequel s'insère l'origine du nerf optique dénommé tête du nerf optique ou papille, ainsi que l'artère et la veine centrale de la rétine.

3. Tunique nerveuse ou rétine

La rétine s'étend de l'*ora serrata*, en avant au nerf optique en arrière de l'œil. Elle tapisse la face interne de la choroïde. La rétine est constituée de deux tissus : la rétine neurale ou neurosensorielle en interne, et l'épithélium pigmentaire rétinien, au contact de la choroïde.

a) Rétine neurale

D'origine diencéphalique, la rétine neurale est constituée des premiers neurones de la voie optique. Elle couvre 75% de la face interne du globe oculaire, allant de la papille optique à l'*Ora Serrata*. Elle présente une épaisseur non homogène de 0,5 mm en moyenne. A la périphérie, l'épaisseur de la rétine est de 100 μm puis elle s'épaissit progressivement jusqu'à atteindre 500 μm au niveau de la macula. Au centre de la macula, appelé fovéola (elle-même au centre de la fovéa), son épaisseur n'est plus que de 130 μm . Un tiers du poids sec de la rétine correspond à des lipides, dont la majeure classe est représentée par les phospholipides. Les phospholipides représentent 70 à 80% des lipides totaux dans la plupart des espèces (Fliesler and Anderson 1983). Les phospholipides de la rétine humaine correspondent à 47% de phosphatidylcholine et 31% de phosphatidyléthanolamine.

La neurorétine contient 8 types cellulaires dont 5 types de cellules neurales que sont les photorécepteurs, les cellules horizontales, les cellules bipolaires, les cellules amacrines et les

cellules ganglionnaires et 3 types de cellules gliales que sont les astrocytes, les cellules microgliales et les cellules de Müller (Figure 2).

Les différentes couches composant la rétine sont donc :

- La couche des segments externes et internes des photorécepteurs, cônes ou bâtonnets
- La couche nucléaire externe, constituée par les corps cellulaires des photorécepteurs
- La couche plexiforme externe, constituée par les synapses entre les photorécepteurs, les cellules horizontales et les cellules bipolaires
- La couche nucléaire interne, constituée par les corps cellulaires des cellules bipolaires, des cellules horizontales, des cellules amacrines et des cellules de Müller
- La couche plexiforme interne, constituée par les synapses entre les cellules bipolaires, amacrines et cellules ganglionnaires
- La couche des cellules ganglionnaires contenant les corps cellulaires des cellules ganglionnaires, et pouvant contenir certains corps cellulaires de cellules amacrines.
- La couche de fibres nerveuses, constituée par les axones des cellules ganglionnaires et contenant des astrocytes.

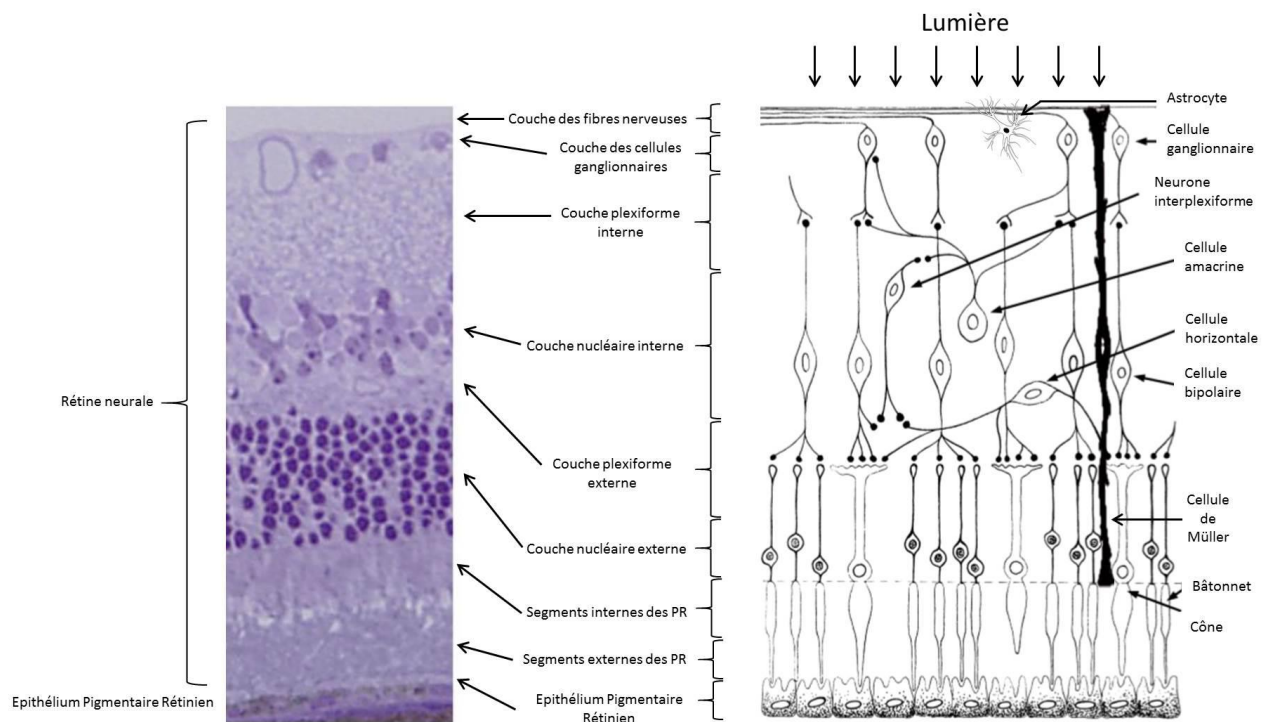


Figure 2 : Anatomie de la rétine

Gauche : Coupe semi fine de rétine de souris. Coloration hématoxyline, Source personnelle

Droite : Représentation schématique d'une coupe de rétine, adapté de « Anatomie pour les écoles d'Orthoptie, v1.0 ». M Santallier, J & A Pêchereau. Ed A & J Pêchereau. Nantes, 2008.

La rétine présente une composition hétérogène selon un axe temporo nasal, ainsi qu'au niveau central et périphérique. Sur une échelle macroscopique, trois régions particulières composent la rétine :

- En avant, au niveau de l'*Ora Serrata*, la rétine est plus fine et contient uniquement des photorécepteurs de type cône, possédant une morphologie différente comparée aux cônes rétiens. C'est la zone où les capillaires rétiens s'arrêtent. L'*Ora Serrata* est situé à 6,5 mm du limbe et est en rapport avec la base du vitré.
- La papille optique est la zone de convergence des axones des cellules ganglionnaires formant la tête du nerf optique. Cette zone couvre 2,7 mm². La papille optique est dépourvue de cellules photoréptrices entrainant donc une tache aveugle ou tache de Mariotte dans le champ visuel. C'est également le lieu de passage des vaisseaux sanguins.
- La rétine centrale comprend la macula au sein de laquelle la fovéa et la fovéola sont présentes (Figure 3). Elle est située au pôle postérieur entre l'artère supérieure et l'artère inférieure. La macula est une zone elliptique de 5,5 mm de diamètre. Elle

comprend en son centre la fovéa, elle-même constituée du clivus qui borde latéralement la fovéola.

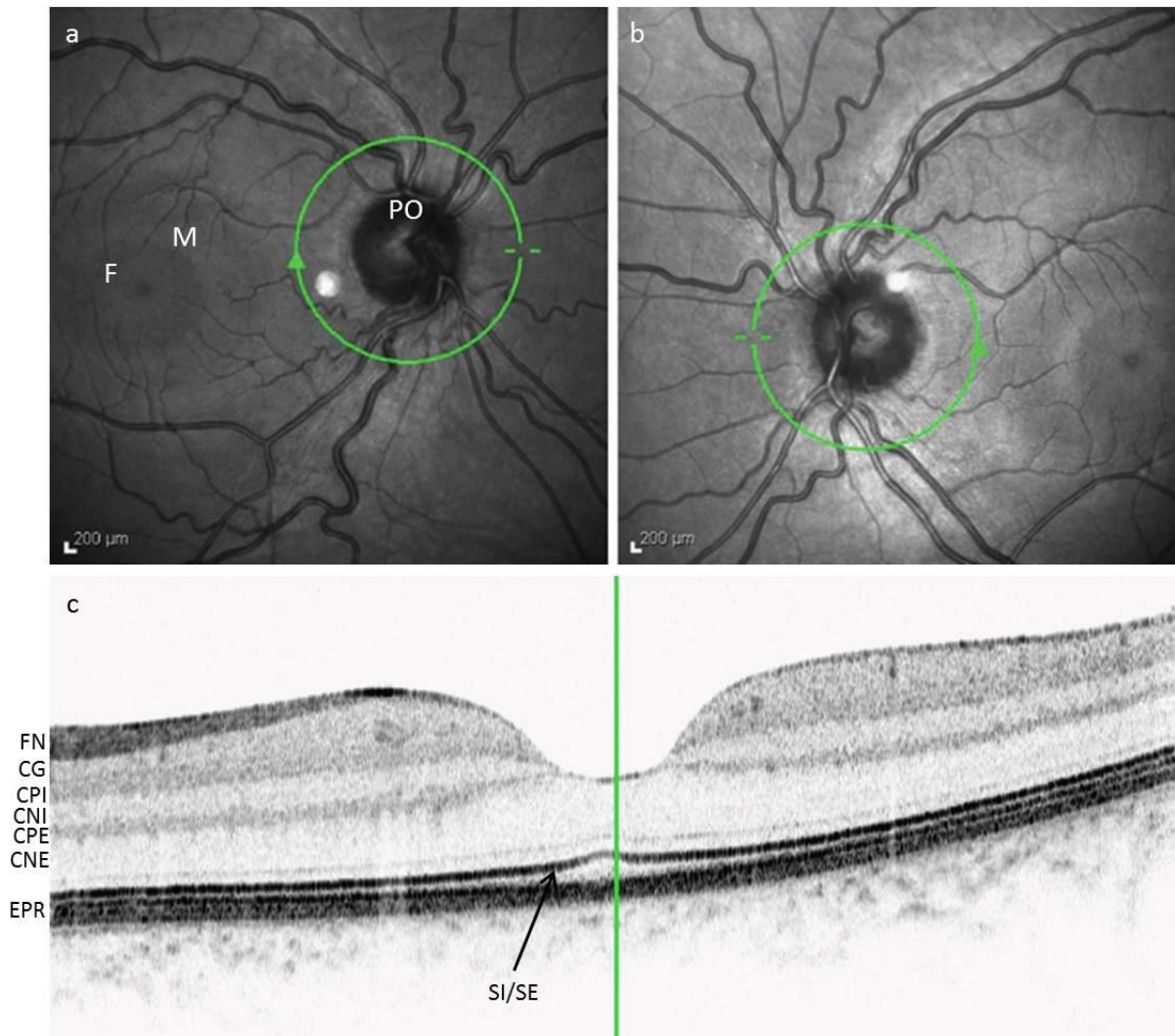


Figure 3 : Architecture des différentes zones de la rétine centrale.

a,b : Images de fond d'œil humain droit et gauche en infrarouge (Spectralis™, Heidelberg Engineering, Germany).

PO : Papille optique, F : Fovéa, M : Macula.

c : Structure fine détaillée de la cytoarchitecture maculaire en tomographie en cohérence optique ultra haute résolution in vivo (Spectralis™, Heidelberg Engineering, Germany). FN : Fibres nerveuses, CG : Couche des cellules ganglionnaires, CPI : Couche plexiforme interne, CNI : Couche nucléaire interne, CPE : Couche plexiforme externe, CNE : Couche nucléaire externe, EPR : Epithélium pigmentaire rétinien, SI/SE : Jonction des segments internes et externes des photorécepteurs. Adapté de J. Reynolds and S. Olitsky (eds.), Pediatric Retina, © Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2011.

En examen du fond d'œil, la macula apparaît d'un aspect jaunâtre dû à la présence d'un pigment xanthophylle composé de lutéine, zéaxanthine et méso-zéaxanthine qui appartiennent à la famille des caroténoïdes. Ces pigments permettent de filtrer la lumière bleue du soleil,

dont les longueurs d'ondes se situent entre 415 et 455 nm, et permettent de neutraliser les radicaux libres oxygénés et leur action délétère. La macula est partiellement vascularisée puisque les capillaires rétiens s'arrêtent à 200 μm de la fovéola. La fovéola est une dépression dans la rétine au centre de la fovéa, située à 2 diamètres papillaires en dehors du bord temporal de la papille. Elle a un diamètre de 150 μm , une épaisseur de 130 μm et est totalement avasculaire. La fovéola contient uniquement un bouquet de cônes (150000 cônes par mm^2), et la couche plexiforme externe cette fois uniquement constituée des axones des cônes. Les premiers bâtonnets sont visibles à 500 μm de la fovéola, pour atteindre leur concentration maximale aux environs de 5 à 6 mm du centre de la fovéola. Environ 75% de la lumière perçue converge sur la fovéa, région qui apporte l'acuité maximale et répond aux intensités maximales puisque c'est la région qui détient la concentration maximale de cônes (Figure 4).

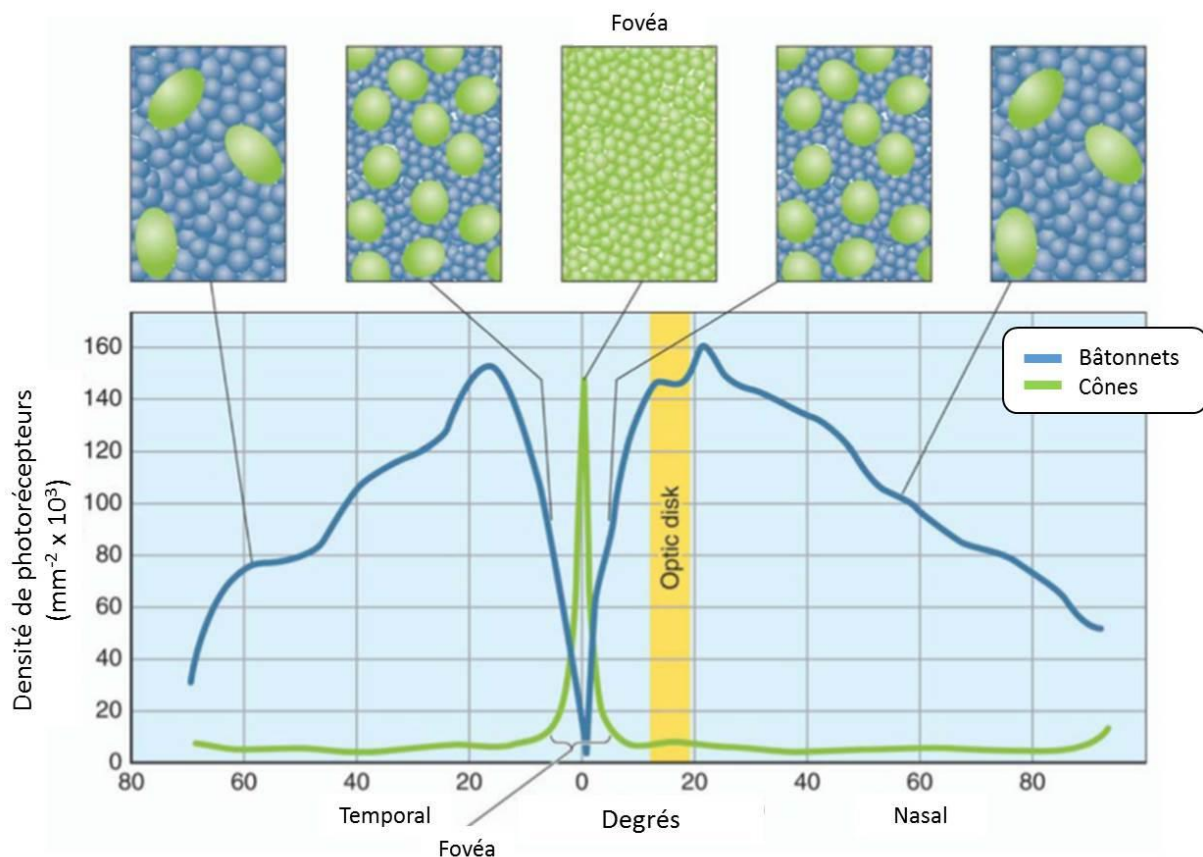


Figure 4 : Distribution des photorécepteurs dans l'œil.
Adapté de Mustafi et al, 2009.

A une échelle microscopique, la rétine contient des types cellulaires différents, avec des fonctions très différentes.

(1) Les cellules photoréceptrices

Les cellules photoréceptrices (PR) sont les neurones sensoriels du système visuel. Chez l'homme, il existe deux grandes familles des photorécepteurs : les cônes et les bâtonnets. Les cônes et les bâtonnets ont pour fonction de transduire le signal lumineux en signal électrochimique via le neurotransmetteur glutamate. Les photorécepteurs sont des cellules ciliées très spécialisées composés de 5 compartiments (Figure 5) :

- un segment externe en contact avec l'épithélium pigmentaire rétinien (EPR) à son coté apical,
- un segment interne,
- un noyau/soma,
- un axone,
- une terminaison synaptique.

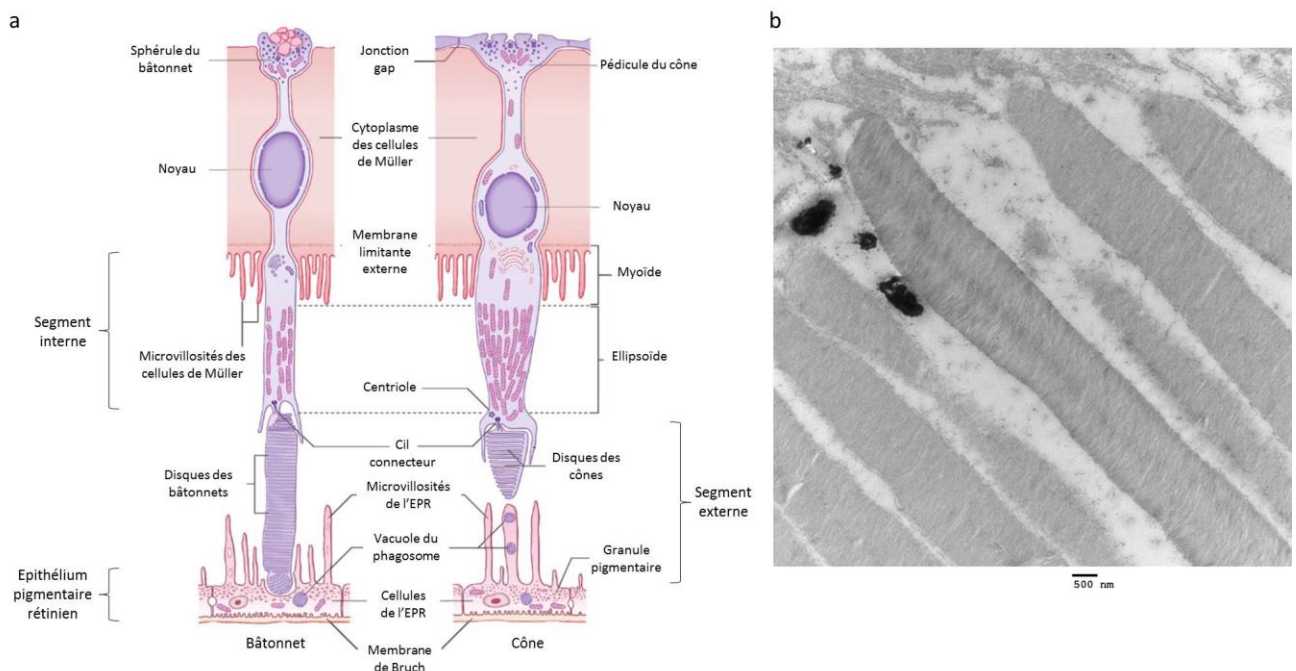


Figure 5 : Structure des photorécepteurs

a : Représentation schématique des photorécepteurs adapté de Gray's anatomy.

b : Images des segments externes des photorécepteurs en microscopie électronique à transmission. Source personnelle.

Cette organisation est maintenue chez tous les vertébrés malgré des spécificités propres à chaque espèce dans la taille et la morphologie de ces compartiments.

Le segment externe constitue la partie photosensible du photorécepteur car ils contiennent les photopigments. Il est constitué par des replis de la membrane plasmique créant un empilement

de saccules ou disques (environ 1000 disques par photorécepteurs). Le segment externe est une structure dynamique en permanent renouvellement. De nouveaux disques sont ainsi formés à la base du segment externe alors que les anciens disques sont dégradés coté apical par phagocytose par les cellules de l'EPR (Young 1967). La longueur des segments externes reste donc constante, et une altération de ces mécanismes entraîne la cécité (Kevany and Palczewski 2010).

Les bâtonnets sont des cellules sensibles dans des conditions de faibles intensités lumineuses. Ils permettent la vision des contrastes, mais pas la distinction des couleurs et ont une faible résolution spatiale, c'est la vision scotopique. Les bâtonnets sont au nombre de 120 millions par rétine, et sont situés à l'extérieur de la fovéa.

Les cônes sont au nombre de 5 millions principalement localisés dans la fovéa et permettent une importante résolution spatiale ainsi que la vision des couleurs dans des conditions de forte luminosité. C'est la vision photopique.

Le segment externe est long et de forme cylindrique pour les bâtonnets et court et de forme conique pour les cônes. Dans les bâtonnets, il est composé d'un empilement de 500-2000 disques indépendants de la membrane plasmique qui les englobe (Daemen 1973; Nickell, Park et al. 2007; Gilliam, Chang et al. 2012). Dans les cônes, les disques sont constitués par l'invagination à de nombreuses reprises de la membrane plasmique du cil connecteur.

Les segments externes sont principalement constitués par des phospholipides et un peu de cholestérol. Le cholestérol est distribué selon un gradient, dont la majeure quantité (30%), se situe dans les disques à la base du segment externe (Albert and Boesze-Battaglia 2005; Schultz 2011). Cette importante concentration de cholestérol au niveau de la base des segments externes pourrait refléter la nécessité à ce que les membranes soient richement composées de cholestérol pour la biogenèse des disques.

Les disques sont principalement composés de d'phospholipides liant des AGPI-LC composés de 14 à 22 carbones (C14-C22), et des acides gras polyinsaturés à très longue chaîne (AGPI-VLC) (C28-C40). L'acide docosahexaénoïque, C22:6 n-3 (DHA) est l'AGPI le plus abondant dans les membranes des segments externes, soit environ 50% des acides gras des segments externes (Fliesler and Anderson 1983; Bush, Malnoe et al. 1994; Stillwell and Wassall 2003). La richesse en DHA du segment externe procure une grande fluidité aux membranes et facilite ainsi la phototransduction (Brown 1994; Litman, Niu et al. 2001;

Mitchell, Niu et al. 2001; Niu, Mitchell et al. 2001; Gawrisch, Soubias et al. 2008). Les AGPI-VLC représentent environ 15% des acides gras liés aux phosphatidylcholines des segments externes (Rotstein and Avelano 1987) et sont synthétisés par une élongase : l'ELOVL4 (*elongation of very long chain fatty acids protein 4*). Leur localisation au sein des segments externes n'est pas totalement définie, mais leur importance est primordiale puisque la mutation de l'ELOVL4 provoque la dégénérescence maculaire de Stargardt (Edwards, Donoso et al. 2001; Zhang, Kniazeva et al. 2001; Agbaga, Brush et al. 2008).

Les disques contiennent également de nombreuses protéines. Les photopigments sont des récepteurs couplés à une protéine G (RCPG) couplés à un chromophore, le 11-cis-rétinal. Les photopigments sont donc des récepteurs à photons, enchâssés dans la membrane des disques de manière extrêmement concentrée. Ils correspondent à la protéine la plus abondante des segments externes, soit environ 90% des protéines totales (Papermaster and Dreyer 1974) pour une densité estimée entre 25000 et 55000 molécules/ μm^2 (Liang, Fotiadis et al. 2003). Ces photopigments permettent l'initiation de la transduction du signal grâce à la transformation des photons en cascade de signalisation. Pour les bâtonnets, ce photopigment est une protéine transmembranaire appelée rhodopsine. Elle a son maximum de sensibilité à une longueur d'onde de 498 nm dans le spectre électromagnétique de la lumière visible. Pour les cônes, le photopigment est appelée iodopsine. Des différences dans la séquence d'acides aminés de ces protéines entraînent des différences dans les courbes d'absorption de la lumière (Figure 6). Ainsi, il existe 3 types d'iodopsine correspondant à 3 catégories de cônes qui se différencient par leur sensibilité à la lumière. Un même cône contient les 3 opsines, mais est défini par l'iodopsine qu'il contient en majorité. Les cônes bleus sont principalement activés par une longueur d'onde autour de 420 nm, on parle également de cônes S (Short), signifiant que ces cônes absorbent les courtes longueurs d'onde. Les cônes verts ou M (Medium) sont activés par des longueurs d'onde moyennes autour de 534 nm. Enfin, les cônes rouges ou L (Long), sont sensibles à des longues longueurs d'onde autour de 564 nm (Gonzalez-Fernandez 2002).

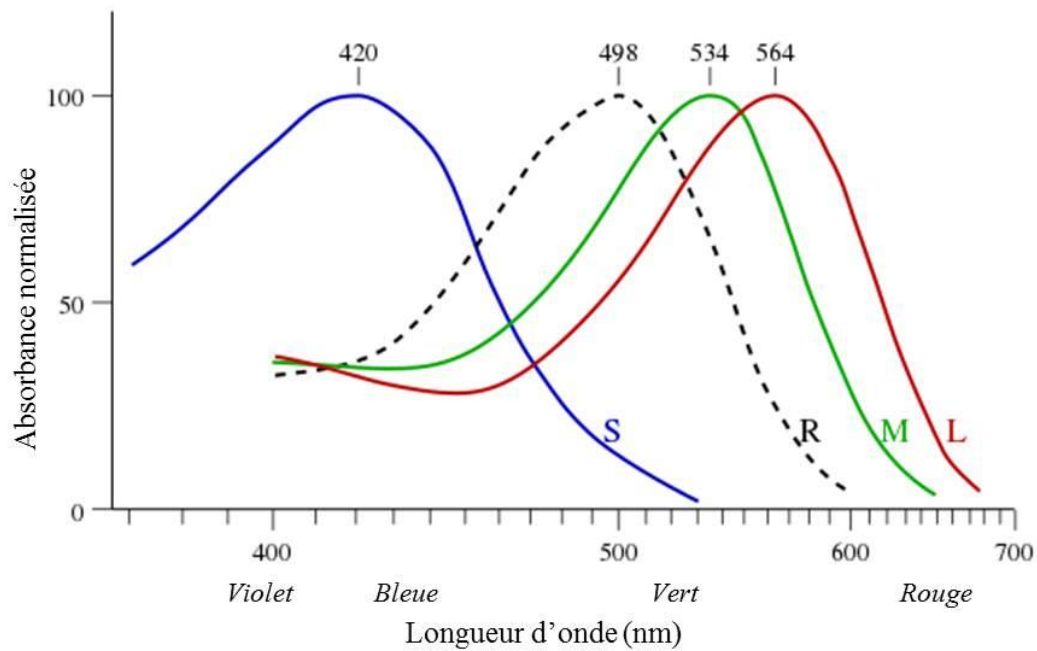


Figure 6: Longueurs d'ondes absorbées par les différentes opsines.

Dans la rétine humaine, il y aurait deux fois plus de cônes L que de cônes M, répartis de manière homogène dans la fovéa. La distribution des cônes S est différente sur plusieurs aspects. Les cônes S représentent uniquement 5% de la population totale des cônes (Roorda, Metha et al. 2001), sont absents du centre de la fovéa et sont situés en périphérie. En effet, le besoin de ces cônes est réduit puisque le cristallin et les pigments de la macula filtrent les courtes longueurs d'ondes. Les images que l'on perçoit sont donc dues principalement aux cônes L et M.

D'autre part, les segments externes contiennent d'autres protéines permettant d'assurer leur fonction. Ils disposent notamment de canaux ioniques, les CNG (*Cyclic Nucleotid Gated Channel*) (Weitz, Ficek et al. 2002), formant un complexe avec le canal Na^+/Ca^+ (Kang, Bauer et al. 2003; Altimimi, Szerencsei et al. 2013) indispensables pour la génération de la cascade de signalisation. Les transporteurs de lipides tels que le transporteur de phosphatidylsérine, ATP8a2 (*ATPase phospholipid transporting 8A2*) (Coleman, Kwok et al. 2009) également présents, nécessaires à une fonction visuelle normale. Les disques contiennent également le transporteur de lipides ABCA4 responsable de l'évacuation de l'acyl rétinoloïde, produit toxique généré par la phototransduction (ATP-binding cassette transporter) (Quazi, Lenevich et al. 2012). L'absence de ces protéines entraîne des conséquences sur la structure et la fonction des photorécepteurs.

Le segment externe est ainsi relié au segment interne par le cil connecteur, formé par des paires de microtubules (Breslow and Nachury 2011).

Le segment interne des photorécepteurs contient la machinerie de fonctionnement de toute cellule comme les mitochondries, l'appareil de Golgi, le réticulum endoplasmique. Sa membrane, différente de celle du segment externe, contient une Na/K ATPase, protéine nécessaire pour le maintien du gradient électrochimique (Schneider, Shyjan et al. 1991). D'autres transporteurs ioniques sont présents et assurent la fonction des photorécepteurs tels que les protéines HCN (de l'anglais *hyperpolarisation-activated cyclic-nucleotid modulated cation Non-selective channel*, c'est-à-dire canal activé par l'hyperpolarisation, modulé par les nucléotides cycliques et non sélectif aux cations) (Demontis, Moroni et al. 2002; Fyk-Kolodziej and Pourcho 2007).

Il existe d'autres types protéines supportant les besoins des photorécepteurs comme les transporteurs au glucose (Gospe, Baker et al. 2010), les récepteurs à la dopamine (Witkovsky 2004) et les complexes de jonctions communicantes (Bloomfield and Volgyi 2009).

Les photorécepteurs sont inclus dans une structure hautement organisée, une matrice extracellulaire (ECM) ou matrice interphotorécepteur (*interphotoreceptor matrix* : IPM). Cette matrice, essentiellement sécrétée par les bâtonnets, est retrouvée entre les segments externes des photorécepteurs et l'épithélium pigmentaire rétinien (EPR) (Ishikawa, Sawada et al. 2015). Cette matrice est composée à 98% de protéines, dont l'IRBP (*Interstitial retinol binding protein*) est la plus abondante, de glycoprotéines et à 2% de glycosaminoglycanes (Hageman and Johnson 1987).

Les photorécepteurs émettent en permanence leur neurotransmetteur, le glutamate, en absence de lumière.

(2) Les cellules bipolaires

Les cellules bipolaires correspondent aux interneurons, connectant les photorécepteurs au niveau de la couche plexiforme externe aux cellules ganglionnaires au niveau de la couche plexiforme interne. Les cellules bipolaires sont spécifiques des cônes ou des bâtonnets, jamais les deux. Les cellules bipolaires des bâtonnets contactent 30 à 50 bâtonnets. En revanche, il existe deux variétés de cellules bipolaires qui contactent les cônes : les cellules bipolaires naines et les cellules bipolaires géantes. On trouve les cellules bipolaires des cônes bleus, qui sont connectées aux cônes bleus. Les cônes rouges et verts sont connectés à huit différentes

cellules bipolaires. Ainsi, une cellule bipolaire reçoit des afférences d'un seul photorécepteur au centre, au niveau de la fovéa, et jusqu'à plusieurs centaines au niveau de la rétine périphérique. Les cellules bipolaires reçoivent également des afférences des cellules horizontales (Sharma and Ehinger 2003; Martemyanov and Sampath 2017).

(3) Les cellules horizontales

Les cellules horizontales sont connectées latéralement à plusieurs cônes, bâtonnets et cellules bipolaires au niveau de la couche plexiforme externe. Leur rôle est d'inhiber l'activité des cellules environnantes : c'est l'inhibition latérale. Elles permettent, en inhibant certains signaux de faible intensité, d'accroître le contraste et la définition du stimulus visuel. Certaines de ces cellules, tout comme les cellules amacrines, peuvent être dépourvues d'axone, mais possèdent des dendrites, pouvant se substituer aux axones (Boije, Shirazi Fard et al. 2016).

(4) Les cellules amacrines

Les cellules amacrines ont leurs corps cellulaires dans la couche nucléaire interne et leurs terminaisons synaptiques dans la couche plexiforme interne. Elles relient les neurones bipolaires aux neurones ganglionnaires. La morphologie de ces cellules est variée et elles utilisent de nombreux neurotransmetteurs et peptides neuroactifs comme les enképhalines, la substance P, les somatostatines, les neurotensines, l'histamine, le neuropeptide Y, l'acétylcholine et des monoamines comme le GABA et la dopamine (Diamond 2017). Elles libèrent de la dopamine qui active les récepteurs D1 et D2 distribués dans toute la rétine. La dopamine augmente le signal des cônes tandis qu'elle atténue le signal des bâtonnets. La dopamine possède également des rôles trophiques reliés au rythme circadien, à la survie cellulaire et à la croissance de l'œil. La santé des neurones dopaminergique dépend des connections synaptiques qu'ils reçoivent. Les patients Parkinsoniens présentent une diminution de la dopamine de la rétine, entraînant une sensibilité réduite aux contrastes.

(5) Les cellules ganglionnaires

Les cellules ganglionnaires sont les seules cellules à transmettre l'influx nerveux sous la forme de potentiels d'actions. Ces potentiels d'actions sont spontanés et leur fréquence de décharge dépend de l'apparition de lumière. Leurs axones forment le nerf optique. Il existe 3 types de cellules ganglionnaires :

- Les cellules ganglionnaires de type P (*parvus*), de petite taille. Elles représentent environ 90% des cellules ganglionnaires et seraient plus sensibles à la détection de la forme et des détails du stimulus ainsi que dans le traitement des couleurs.
- Les cellules ganglionnaires de type M (*magnus*) de grande taille. Elles représentent environ 5% de la population des cellules ganglionnaires, et seraient impliquées dans la détection du mouvement du stimulus.
- Les cellules non M et non P, mal caractérisées, constituant les 5% restant, spécialisées dans le traitement des couleurs.

(6) Les astrocytes

Les astrocytes, appelés de la sorte grâce à leur forme étoilée, sont des cellules gliales situées presque exclusivement dans la rétine interne. La présence et la distribution des astrocytes de la rétine sont corrélées à la présence et à la distribution des vaisseaux rétiniens, alors que les zones avasculaires de la rétine ne contiennent pas d'astrocytes. Ces données laissent à penser que les astrocytes migrent dans la rétine de manière concomitante au réseau vasculaire. Les astrocytes ont une distribution hétérogène dans la rétine, et sont absents des zones qui possèdent une fine couche de fibres nerveuses, ainsi que de l'ora serrata, la fovea centrale et la rétine péri-fovéolaire. Ces cellules possèdent des efférences à la fois sur les vaisseaux sanguins mais également au niveau des axones. La protéine acide fibrillaire gliale (GFAP) est le constituant majeur du filament intermédiaire astrocytaire (Bignami, Eng et al. 1972). Par nature, les astrocytes sont quiescents et deviennent actifs uniquement en réponse à certains stimuli comme l'élévation de la pression intraoculaire, l'excitotoxicité et l'ischémie rétinienne (Hernandez, Urcola et al. 2008). Lorsque les astrocytes sont activés, ils s'hypertrophient, développent des prolongements et leur immunoréactivité à la GFAP augmente.

Les astrocytes sont les principaux producteurs du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (*vascular endothelial growth factor*, VEGF), en condition normale (Stone, Itin et al. 1995) et pathologique (Ozaki, Seo et al. 2000). Les astrocytes possèdent également un rôle neurotrophique, apportent un soutien mécanique aux axones qui dégénèrent et participent au maintien de la barrière hémato-rétinienne (BHR). En conditions pathologiques, les astrocytes augmentent l'expression des gènes codant pour des cytokines, chimiokines, des éléments de la cascade du complément, favorisant la dégénérescence de la rétine et de la BHR (Anderson, Hoyt et al. 1967; Kim, Kim et al. 2006).

(7) Les cellules microgliales

Les cellules microgliales, jouent un rôle clé dans le contrôle de la réponse immunitaire de la rétine (Carson, Doose et al. 2006). La microglie présente différentes morphologies en fonction de l'état d'activation de ces cellules (Kettenmann, Hanisch et al. 2011). Dans des conditions physiologiques, les cellules microgliales sont retrouvées dans différentes couches cellulaires de la rétine, comme la couche des fibres nerveuses, la couche des cellules ganglionnaires, la couche plexiforme interne, la couche nucléaire interne et la couche plexiforme externe (Chen, Yang et al. 2002; Sobrado-Calvo, Vidal-Sanz et al. 2007; Li, Eter et al. 2015). Leur rôle est de sécréter des facteurs neurotrophiques et anti-inflammatoires (Streit 2002). Elles expriment également de nombreux récepteurs destinés à des ligands jouant un rôle prépondérant dans la réponse immunitaire qui a lieu lors de l'invasion de microorganismes, l'immunorégulation et la réparation tissulaire tels que les facteurs du complément C5a et C3a, les immunoglobulines, les thrombines, les interleukines (IL-6 et IL-18), les fractalkines, le VEGF, les radicaux libres oxygénés (ROS), les cyclooxygénases-2 entre autres (Streit 2002). De plus, les cellules microgliales peuvent jouer les mêmes rôles que les macrophages (Provis, Diaz et al. 1996) et détiennent deux fonctions essentielles comme la présentation de l'antigène (Hickey and Kimura 1988) et la phagocytose des débris. Ces cellules sont également impliquées dans le développement du système nerveux central, l'établissement des connexions synaptiques, le remodelage et la flexibilité synaptique dans le cerveau (Nimmerjahn, Kirchhoff et al. 2005; Wake, Moorhouse et al. 2009; Graeber 2010; Tremblay, Lowery et al. 2010; Paolicelli, Bolasco et al. 2011; Hughes 2012; Schafer, Lehrman et al. 2013). Les cellules microgliales, en interagissant avec les synapses, servent de senseurs en répondant aux changements de libération de neurotransmetteurs et aux changements de l'activité neuronale (Schafer, Lehrman et al. 2013). Ainsi, à l'état physiologique, ces cellules sont en état constant de surveillance de leur environnement. Ces actions sont amplifiées lorsque la rétine est en souffrance, dans les cas d'inflammation, de dommages tissulaires.

(8) Les cellules de Müller

Les cellules de Müller sont les cellules gliales majoritaires de la rétine et représentent 90% des cellules gliales. Elles entourent tous les neurones rétiens, reflétant leur importance primordiale dans la fonction de la rétine et de ses neurones (Figure 7) (Bringmann, Pannicke et al. 2006; Reichenbach and Bringmann 2013). La forme des cellules est conservée à travers les espèces. Au niveau de la face interne de la rétine, la cellule de Müller est composée de deux prolongements qui partent dans des directions opposées et s'insèrent entre le corps vitré

et la neurorétine, formant des pieds. Au niveau apical, des microvillosités s'intègrent entre les segments internes des photorécepteurs. Les cellules de Müller sont orientées de manière radiale et traversent transversalement la rétine depuis les bords du vitré vers l'extrémité apicale des photorécepteurs. Ce positionnement confère aux cellules de Müller la capacité à guider la lumière à travers la rétine pour qu'elle atteigne les photorécepteurs (Franze, Grosche et al. 2007; Labin and Ribak 2010). Il semble que les cellules de Müller soient au contact des corps cellulaires et terminaisons synaptiques des neurones rétiens, favorisant la formation de synapses, et maintiendraient la fonction des neurones en apportant substrats énergétiques et précurseurs de neurotransmetteurs (Pfrieger and Barres 1996). En effet, les cellules de Müller jouent un rôle dans la nutrition des neurones en délivrant du lactate/pyruvate, en stockant du glycogène et en réalisant la glycogénolyse (Kuwabara and Cogan 1961; Poitry-Yamate, Poitry et al. 1995). Elles contribuent à la signalisation des neurones en captant et en recyclant les neurotransmetteurs grâce au transporteur du glutamate excitotoxique, du GABA et la présence de la glutamine synthétase (Linser and Moscona 1979; Brew and Attwell 1987; Qian, Malchow et al. 1993; Pow and Robinson 1994; Rauen, Taylor et al. 1998; Biedermann, Bringmann et al. 2002). Ces cellules permettent également le recyclage des photopigments (Das, Bhardwaj et al. 1992). Elles libèrent dans certains cas des substances neuroactives (D-sérine, glutamate, ATP, BDNF) (Newman and Zahs 1998; Newman 2003; Stevens, Esguerra et al. 2003) et participent à l'angiogenèse via la sécrétion de substances vasoactives (VEGF, PEDF, TGF- β) (Ikeda, Homma et al. 1998; Eichler, Kuhrt et al. 2000)). Elles participent à l'homéostasie hydrique et potassique de la rétine grâce à la présence des canaux Kir4.1 et AQP4 (Newman 1985; Nagelhus, Veruki et al. 1998). D'autre part, les cellules de Müller sont impliquées dans l'organisation de la barrière hémato rétinienne (Reichenbach, Siegel et al. 1995), capable d'influencer sa perméabilité (Sarthy 2000). Elles protègent du stress oxydant, très important dans la rétine, en piégeant les radicaux libres via le glutathion (Schutte and Werner 1998).

Elles expriment différentes protéines retrouvées également dans les astrocytes, comme la vimentine et la GFAP dont l'immunoréactivité augmente en cas de stress rétinien.

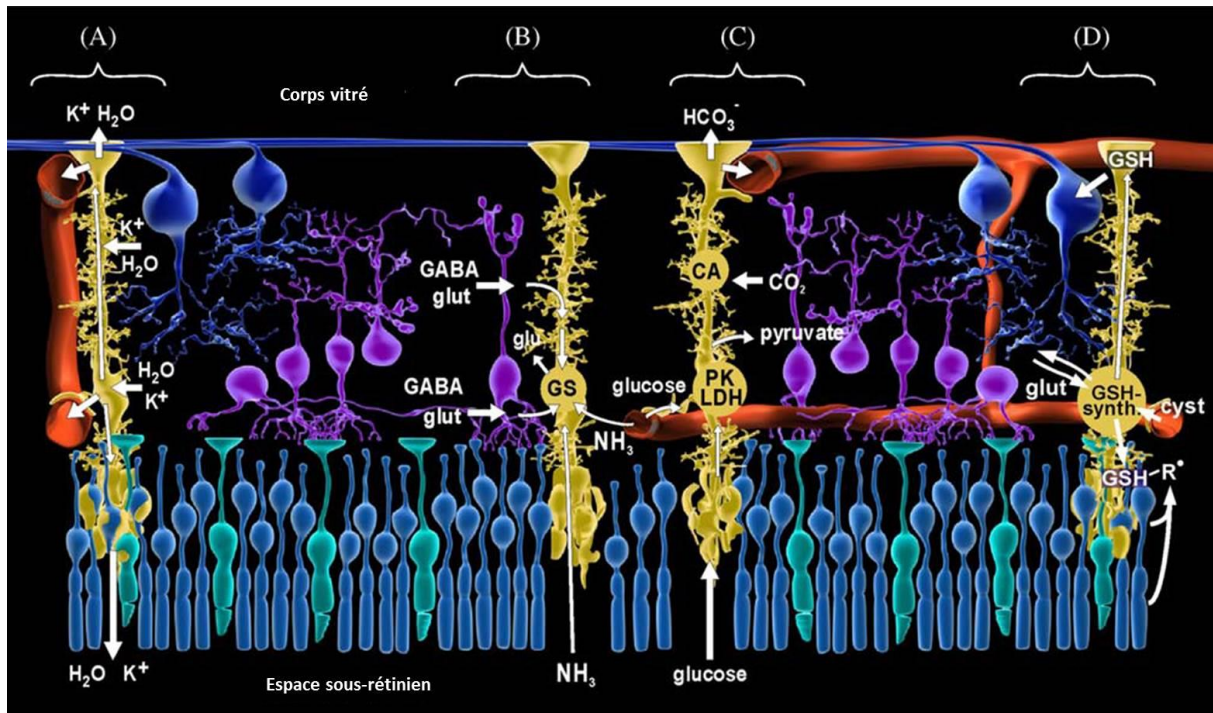


Figure 7: Interactions cellules de Müller-neurones dans la rétine adulte normale.

(A) Homéostasie potassique et hydrique. (B) Recyclage des neurotransmetteurs. (C) Symbiose métabolique. (D) Capture des radicaux libres oxygénés. CA : carbonic anhydrase. Cyst : cysteine. GABA : gamma-aminobutyric acid. Glut : glutamate. GS : glutamine synthetase. GSH : glutathione. LDH : lactate dehydrogenase. PK : pyruvate kinase. Adapté de Bringmann et al, 2006

b) Épithélium Pigmentaire Rétinien

L'épithélium pigmentaire rétinien (EPR) est la couche la plus externe de la rétine. Il contient 3,5 millions de cellules (Panda-Jonas, Jonas et al. 1996) et sépare la neurorétine de la choroïde. C'est un épithélium simple, avasculaire, qui s'étend de la papille à l'*ora serrata*, et se prolonge par l'épithélium pigmentaire du corps ciliaire. Il adhère fortement à la membrane de Bruch à son côté basal, une fine membrane perméable dont l'épaisseur varie entre 1,6 et 6µm. Il est au contact avec les segments externes des photorécepteurs à son côté apical via la matrice entre les photorécepteurs (IPM). L'EPR contient des grains de mélanine et de lipofuscine lui conférant son caractère pigmenté. Les grains de mélanine ont une concentration qui varie selon la zone de la rétine et selon les ethnies. Les grains de lipofuscine, produits de dégradation des lysosomes, ont une concentration augmentant avec l'âge. L'EPR a différentes fonctions (Figure 8) :

- Il a un rôle d'écran, permettant de capter les photons non captés par les différentes couches de la rétine. Ce sont les grains de mélanine contenus dans le RPE qui captent

60% des photons, les 40% restant étant captés par les grains de lipofuscine, responsables de stress oxydatif.

- Il a un rôle métabolique important, favorisant les échanges d'électrolytes, d'oxygène, de glucose entre le milieu sanguin et la neurorétine. En effet, via les aquaporines 1, l'EPR permet l'évacuation de l'eau depuis la neurorétine vers le système interstitiel, évitant le développement d'œdèmes (Stamer, Bok et al. 2003; Wimmers and Strauss 2007). Il a également un rôle protecteur en sécrétant des facteurs de croissance comme le VGF (*vascular growth factor*) ou des antioxydants.
- Il permet le renouvellement des segments externes des photorécepteurs en les phagocytant. En effet, les segments externes sont en perpétuel renouvellement, qui s'effectue complètement en 10 jours (Strauss 2005). De nouveaux disques sont créés à la base des segments externes (Young 1971), puis les disques les plus anciens se retrouvent du côté apical. Or, les segments externes ont une longueur constante (Boesze-Battaglia and Goldberg 2002), et sont donc phagocytés au niveau distal (Kevany and Palczewski 2010). Cette phagocytose commence par la formation d'un phagosome, qui est reconnu et active l'inositol 1,4,5 triphosphate qui active la fusion du phagosome avec des lysosomes qui sont dégradés. Les produits de dégradation sont également transformés en granules de lipofuscine, qui s'accumulent dans le RPE avec l'âge (Steinberg 1985; Delori, Goger et al. 2001). Cette phagocytose suit un rythme circadien, différent dans les cônes et les bâtonnets. Les segments externes des cônes sont particulièrement renouvelés lors du passage de la lumière à l'obscurité (Eckmiller 1997) tandis que les bâtonnets sont particulièrement renouvelés lors du passage de l'obscurité à la lumière (Besharse, Hollyfield et al. 1977). La perturbation de ces mécanismes peut être la source de rétinopathies neurodégénératives comme le syndrome de Usher ou la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) (Kevany and Palczewski 2010).
- Il joue un important rôle dans le cycle visuel en stockant la vitamine A, indispensable à la régénération de la rhodopsine.
- Il participe à la barrière hémato-rétinienne externe grâce à la présence de jonctions serrées entre ses cellules, qui bloquent le passage des molécules provenant de la circulation sanguine.

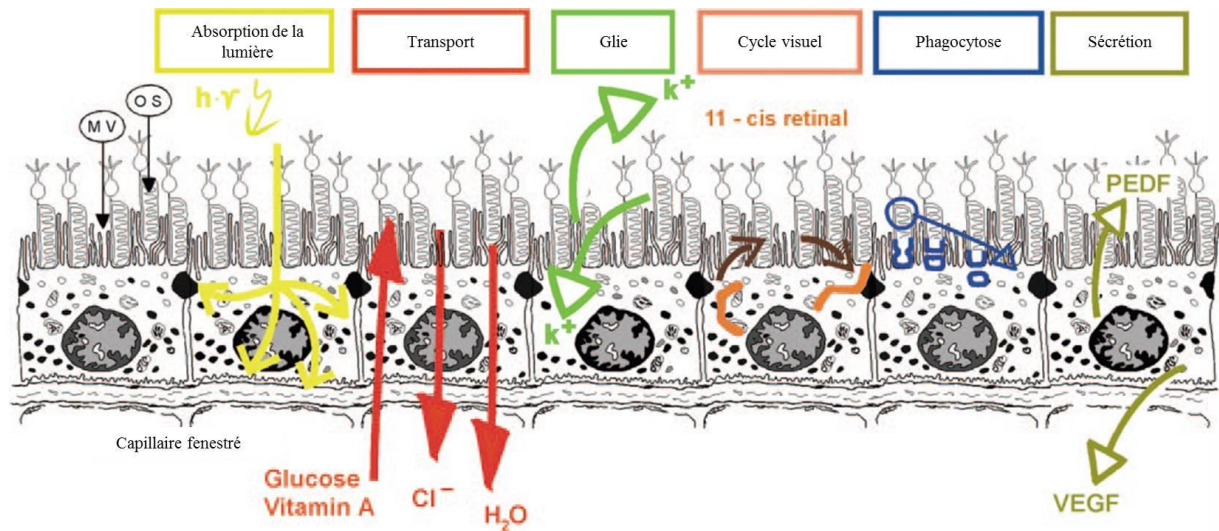


Figure 8: Principales fonctions de l'épithélium pigmentaire rétinien.

PEDF, pigment epithelium-derived growth factor; VEGF, vascular endothelial growth factor.

Adapté de Strauss, 2005.

4. Vascularisation de la rétine

La vascularisation de la rétine est double, directe par la vascularisation dite intrarétinienne et indirecte via le réseau choroïdien (Figure 9) (Ducasse and Segal 1885; Behar-Cohen, Kowalczyk et al. 2009).

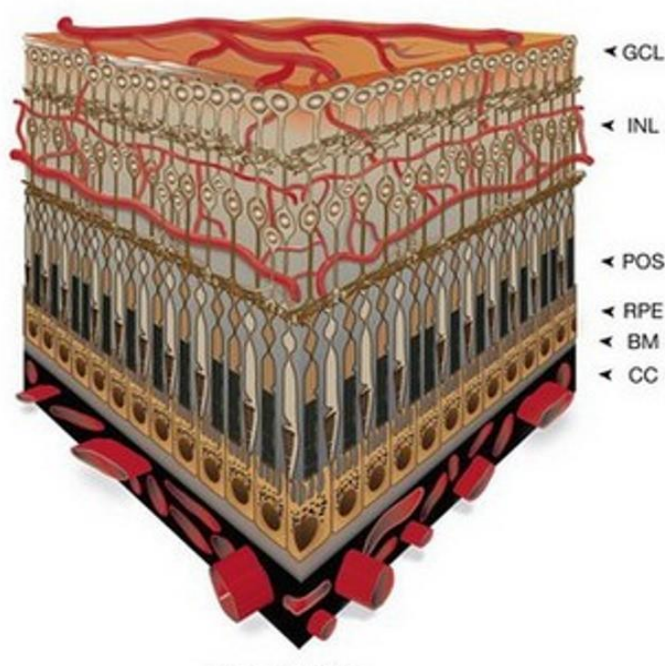


Figure 9 : Réseaux vasculaires de la rétine.

Le réseau vasculaire intrarétinien apporte l'oxygène et les nutriments aux 2/3 de la rétine interne, le réseau vasculaire choroïdien vascularise de manière indirecte l'EPR et les photorécepteurs. GCL : couche des cellules ganglionnaires, INL : couche nucléaire interne, POS : segments externes des photorécepteurs, RPE : épithélium pigmentaire rétinien, BM : membrane de Bruch, CC : circulation choroïdienne. Adapté de Demetrios G. Vavvas, Joan W. Miller, 2015.

a) Vascularisation rétinienne

La vascularisation intrarétinienne est issue de l'artère centrale de la rétine qui dérive de l'artère carotide interne et émerge dans la rétine par la tête du nerf optique. Ce réseau vasculaire s'organise en deux plans : un plan profond au niveau des cellules bipolaires et un plan superficiel au niveau de la couche des cellules ganglionnaires. Chez l'Homme, l'artère centrale se divise en deux branches principales (supérieure et inférieure). Chaque branche donne deux artères, temporale et nasale, qui se subdivisent jusqu'à la périphérie rétinienne au niveau de la couche des fibres nerveuses. Ces branches irriguent des capillaires : les branches horizontales irriguent la couche superficielle des fibres nerveuses et les branches plus profondes entrent dans la rétine formant entre 1 (périphérie et périfovéolaire) et 4

(péripapillaires) réseaux capillaires horizontaux, dépendant de l'épaisseur de la rétine (Oyster 1999). La circulation rétinienne vascularise toutes les couches de la neurorétine, à l'exception de la couche des photorécepteurs qui est avasculaire et qui dépend des choriocapillaires pour ses échanges avec le compartiment sanguin. Le sang des capillaires rétiens est drainé par les capillaires veineux dans les veines principales puis la veine rétinienne centrale. La zone fovéolaire n'est pas vascularisée par les branches terminales de l'artère centrale de la rétine (Provis and Hendrickson 2008).

b) Choroïdienne

Le réseau choroïdien s'organise sous la forme d'un réseau de capillaires en forme de mailles. Il est issu de l'artère ophtalmique via les artères ciliaires médianes, latérales et postérieures, et vascularise de manière indirecte l'épithélium pigmentaire et la couche des photorécepteurs qui ne sont pas vascularisés. Il représenterait entre 65% et 85% du flux sanguin rétinien (Henkind, Hansen et al. 1979). L'épaisseur de la choroïde varie entre 0,25 mm en postérieur et 0,1 mm en antérieur et consiste en trois couches vasculaires : la couche de Haller la plus externe composée de grosses veines ; la couche de Sattler, et au contact de la membrane de Bruch la couche des choriocapillaires. La distance anatomique entre les choriocapillaires et les photorécepteurs est de moins de 20 μm , ce qui facilite la diffusion rapide d'oxygène et de micronutriments (Oyster 1999). La zone fovéolaire est irriguée par le réseau choroïdien à travers l'EPR.

Ainsi, l'irrigation de la rétine en sang est double. Chaque réseau est indépendant et ne peut compenser l'autre ce qui confère à la rétine une double fragilité en cas de perte d'un des deux réseaux.

c) Barrière hémato-rétinienne

De la même manière que le cerveau présente une barrière hémato-encéphalique, la rétine est relativement isolée du milieu sanguin par la barrière hémato rétinienne (BHR) (Cunha-Vaz 2004). Elle est composée de la BHR interne et de la BHR externe. La BHR interne est formée par des jonctions serrées entre les cellules endothéliales non fenestrées des capillaires rétiens, des péricytes et des pieds des cellules macrogliales de la rétine (astrocytes et cellules de Müller). Les péricytes renforcent les cellules endothéliales par la sécrétion d'angiopoïétine 1 qui favorise l'expression des occludines, protéines formant les jonctions serrées (Hori, Ohtsuki et al. 2004). La BHR externe est constituée par des jonctions serrées et des jonctions adhérentes au niveau de l'EPR. Seules des petites molécules telles que l' O_2 , le CO_2 et des molécules lipophiles peuvent diffuser à travers ces barrières. Le maintien de ces

barrières est indispensable à la fonction visuelle, et un grand nombre de pathologies rétiniennes sont issues de la perte de ces barrières comme la DMLA et la rétinopathie diabétique (RD).

D. Fonctionnement : de la perception jusqu'à l'intégration du signal

La vision est un mécanisme sensoriel qui obéit au même schéma neuroanatomique que les autres voies sensitives, dont le but est de transmettre l'information sensorielle au cortex. Au niveau de la rétine, ce processus s'appelle la phototransduction (Baylor, Lamb et al. 1979). Ce schéma se compose des premiers neurones sensoriels, les photorécepteurs de type cône ou bâtonnet, ainsi que des cellules bipolaires, les premiers neurones de transmission considérés comme des interneurons. Les cellules ganglionnaires, deuxièmes neurones de transmission qui se projettent au niveau du corps genouillé latéral dans le cerveau, terminent la voie. Au sein de la rétine, le signal transmis est modulé par des cellules d'associations que sont les cellules amacrines et horizontales ainsi que les cellules gliales. Avant d'atteindre les photorécepteurs, la lumière doit traverser toutes les couches de la rétine, qui, et c'est une particularité de la rétine, sont translucides. Les photorécepteurs sont donc les cellules qui détectent les photons, grâce aux photopigments qu'ils détiennent au sein de leurs membranes. Ce pigment est constitué de deux composants : un chromophore appelé le 11-cis rétinol, un aldéhyde de la vitamine A, lié à une protéine, l'opsine. Le chromophore est lié de manière covalente à l'opsine. Le rétinol est une molécule commune à tous les photopigments. En revanche, des différences moléculaires de l'opsine donnent lieu à des différences d'absorbance de longueur d'onde. La rétine humaine contient quatre types de complexe rétinol-opsine : la rhodopsine, le pigment des bâtonnets, et 3 opsines contenues dans les cônes.

Lorsqu'un photon atteint les segments externes des photorécepteurs, l'énergie du photon est transférée au 11-cis rétinol qui s'isomérisse en tout trans rétinol. Ce changement de configuration du rétinol entraîne un changement de conformation de l'opsine, permettant l'activation du photopigment qui devient alors la métarhodopsine II. Ce changement de conformation permet l'activation de la transducine, une protéine G composée de trois sous-unités α , β , γ à la surface cytosolique de la membrane du disque, en catalysant l'échange d'un GDP en GTP. La sous-unité α se dissocie alors pour activer une phosphodiésterase (PDE). La PDE activée hydrolyse le GMPc en GMP. La diminution du taux de GMPc dans la cellule entraîne la fermeture des canaux cationiques (Na^+ et Ca^{2+}) des segments externes des

photorécepteurs, ce qui induit l'hyperpolarisation des photorécepteurs (Figure 10). Simultanément, au niveau du segment interne des photorécepteurs, les canaux K^+ permettent la sortie du K^+ , favorisant l'hyperpolarisation. Cette hyperpolarisation membranaire diminue la quantité du neurotransmetteur, le glutamate, libéré de manière continue dans les terminaisons synaptiques au contact avec les cellules bipolaires en condition d'obscurité. Le degré d'hyperpolarisation est dépendant de la quantité de photon absorbé par unité de temps.

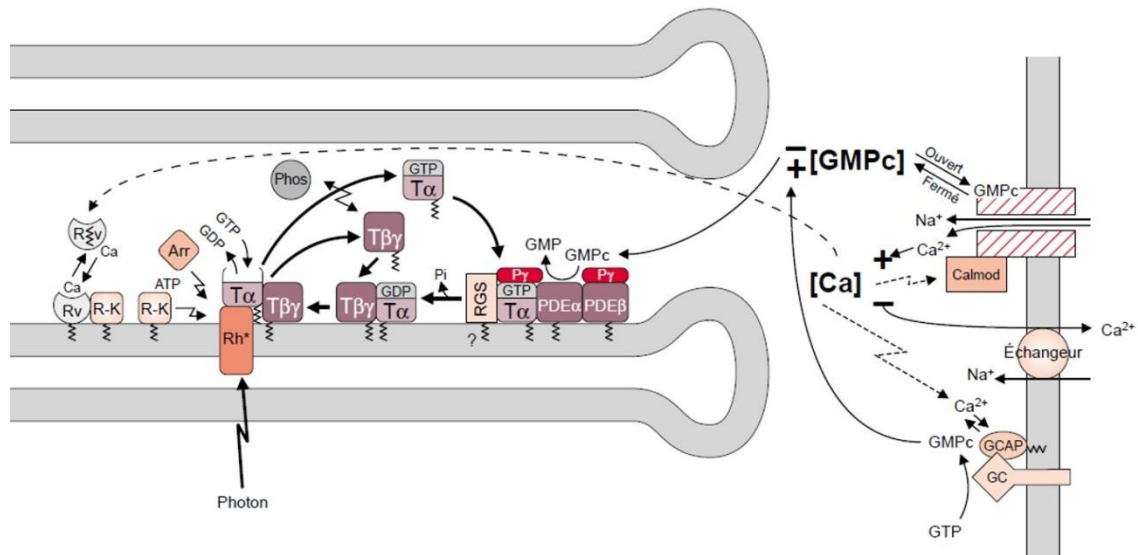


Figure 10 : Schéma moléculaire de transmission, d'amplification et de régulation du signal dans les bâtonnets rétiniens.

Arr : arrestine ; Calmod : calmoduline ; RGS : GTPase activating protein ; GC : guanylyl cyclase ; GCAP : calciprotéine activatrice de la guanylyl cyclase ; PDE $\alpha\beta$: sous-unité catalytique de la phosphodiésterase ; P γ : sous-unité inhibitrice ; Phos : phosducine ; Rh* : rhodopsine photoactivée ; R-K : rhodopsine kinase ; Rv : recoverine ; T α , T $\beta\gamma$: sous-unités de la transducine. Adapté de Chabre, 1998.

La génération du signal cellulaire à partir de l'absorption de photons est possible grâce un impressionnant système d'amplification au niveau de la cascade de transduction. En effet, une seule molécule de rhodopsine peut activer 800 protéines G en 50 ms, chacune d'elle pouvant activer une PDE, causant la dégradation de six molécules de GMPc. Soit pour l'activation d'une rhodopsine, la dégradation de 4800 GMPc représentant 2% du total des GMPc, cause une hyperpolarisation des photorécepteurs de 2 mV (Gonzalez-Fernandez 2002). Au même moment, il est important que ce mécanisme d'amplification du signal soit rapidement inhibé pour que les photorécepteurs puissent rapidement répondre à un nouveau signal. Ceci est permis par l'inactivation rapide du photopigment par un mécanisme de phosphorylation de la rhodopsine, puis la liaison d'une protéine, l'arrestine, sur les sites phosphorylés. Ce complexe permet l'isomérisation du tout-trans rétinale en 11-cis rétinale. L'arrestine se sépare alors de la

rhodopsine qui est déphosphorylée puis rapidement désactivée, et peut donc à nouveau interagir avec un photon. La transducine et la PDE sont inactivés, et le GMPc est rapidement resynthétisé par une guanylate cyclase (Pepe 2001; Hisatomi and Tokunaga 2002).

Un mécanisme permet la régénération de la rhodopsine au niveau de l'EPR. Ainsi, le tout-trans rétinol et l'opsine se séparent, le tout-trans rétinol devient du tout-trans rétinol qui est transporté au niveau de l'EPR, et qui par un enchainement d'isomérisation et d'oxydation, devient du 11-cis rétinol puis du 11-cis-rétinal (Chen, Lee et al. 2001). Wald et ses collaborateurs, en 1968, décrivent le cycle de régénération de la rhodopsine dans l'EPR, il est maintenant bien établi que ce cycle se produit simultanément dans les bâtonnets et l'EPR (Wald 1968; Lamb and Pugh 2006; Muniz, Villazana-Espinoza et al. 2007). Si le niveau lumineux est trop important, et que 10% de la rhodopsine totale est activée, le retour de la molécule sous sa forme inactive, en 11-cis rétinol, dans les photorécepteurs, est impossible, se produit alors un phénomène de saturation (Kawamura 1995).

Les étapes de phototransduction au niveau des cônes sont similaires à celles des bâtonnets, toutefois, les protéines impliquées dans le mécanisme, comme les transducines (Lee, Lieberman et al. 1992) ou les PDE (Farber 1995) sont moins sensibles aux photons que les transducines des bâtonnets, expliquant la plus faible sensibilité à la lumière des cônes (Gordon and Bazan 1997) par rapport aux bâtonnets. Néanmoins, le mécanisme de désactivation des photopigments de cônes est beaucoup plus rapide que celui des bâtonnets (Tachibanaki, Shimauchi-Matsukawa et al. 2007), ce qui permet de voir dans des conditions lumineuses photopiques permanentes (Wang and Kefalov 2009). Ainsi, l'originalité des cônes vient de la régénération du photopigment qui est en partie réalisée au niveau des cellules de Müller (Reichenbach, Siegel et al. 1995; Gordon and Bazan 1997), au cours de longues périodes d'illumination (Figure 11). Après son détachement de l'opsine, le tout-trans rétinol est pris en charge par les cellules de Müller qui l'isomérisent en 11-cis rétinol. Ce dernier est relargué dans le milieu extracellulaire puis capté par les cônes. Les cônes procèdent alors à son oxydation en 11-cis rétinol, qui est ensuite réassocié à l'opsine. Le 11-cis rétinol peut aussi être oxydé dans la cellule de Müller puis transporté dans le cône. Le photopigment de cône est alors reformé (Arshavsky 2002; Muniz, Villazana-Espinoza et al. 2007).

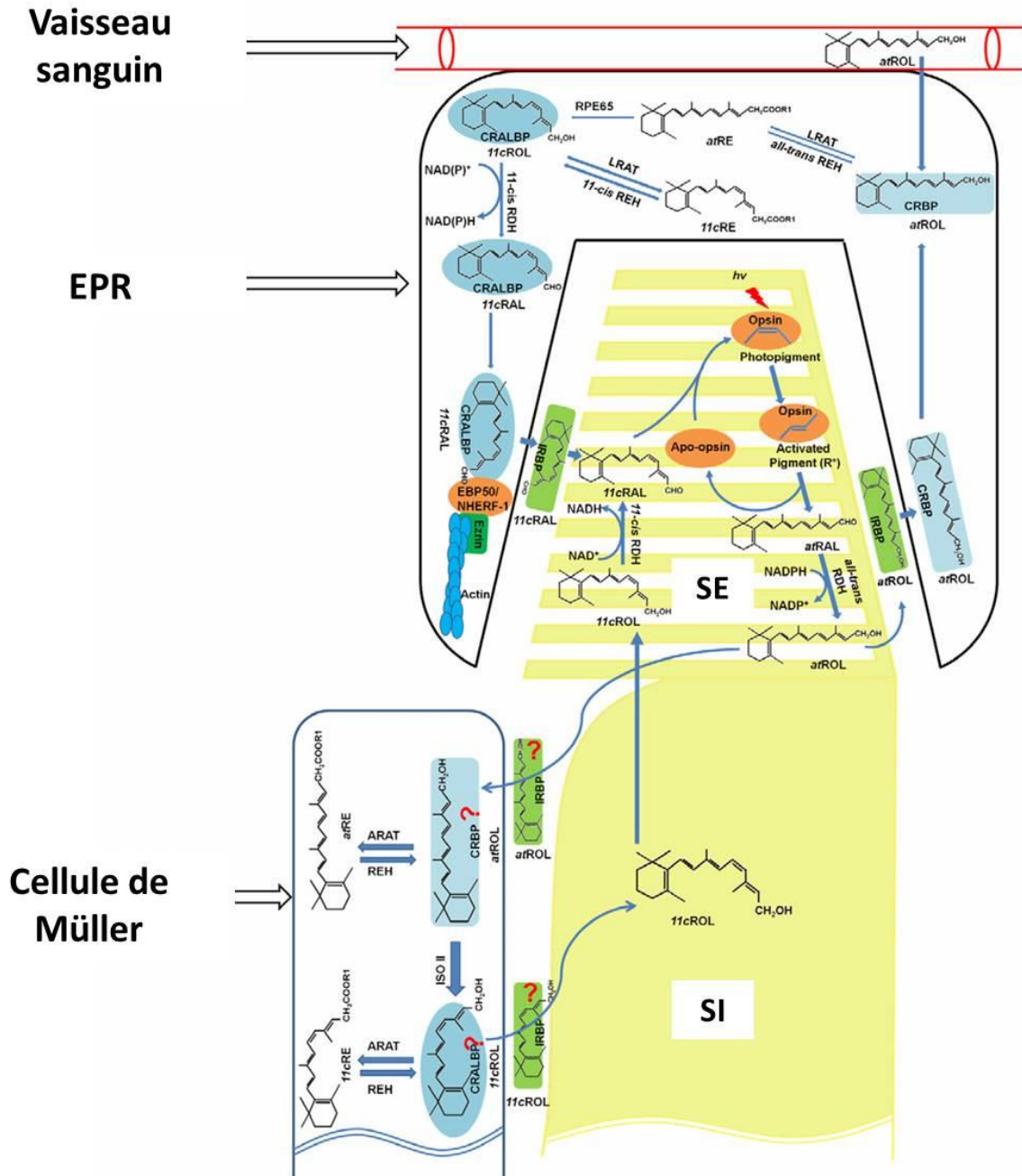


Figure 11 : Cycle visuel des cônes.

EPR : épithélium pigmentaire rétinien, SE : segment externe, SI : segment interne.

Adapté de Wang et Kefalov, 2012.

Au contact de la lumière, les photorécepteurs réduisent donc la libération du glutamate dans les synapses formées avec les cellules horizontales et bipolaires. Les cellules horizontales, connectées aux cônes, bâtonnets et aux cellules bipolaires, permettent l'amélioration du contraste via l'inhibition latérale des cellules les moins stimulées, ce qui permet d'augmenter l'acuité du signal transmis. La fonction des cellules bipolaires est de connecter la rétine externe avec la rétine interne en transmettant le signal des photorécepteurs et des cellules horizontales à la couche plexiforme interne. Le signal généré dans la couche plexiforme interne peut être une hyperpolarisation comme une dépolarisation, selon le type ON ou OFF de la cellule bipolaire. L'organisation centre/périphérie des cellules bipolaires en champs récepteurs va se transmettre aux cellules ganglionnaires par les synapses de la couche plexiforme interne. Ainsi, des synapses relient les cellules bipolaires ON aux cellules ganglionnaires ON, et les cellules bipolaires OFF aux cellules ganglionnaires OFF. Les axones des cellules ganglionnaires parcourent le nerf optique, le chiasma optique et le tractus optique, contournent le mésencéphale, et projettent sur le corps genouillé latéral (CGL), situé dans la partie dorsale du thalamus puis vers le cortex visuel primaire. Le cortex visuel primaire exerce également une rétroaction importante sur le CGL.

Ainsi, les cellules ganglionnaires apportent au cerveau de l'information en partie déjà traitée.

Les champs récepteurs :

Les neurones des différentes couches de la rétine couvrent une zone du champ visuel. Cette région de l'espace où la présence d'un stimulus approprié modifie l'activité nerveuse d'un neurone est appelée le champ récepteur de ce neurone. Ainsi, les champs récepteurs des cellules bipolaires sont circulaires, le centre et la périphérie du disque fonctionnant en opposition. La lumière qui va atteindre le centre du champ récepteur aura des effets inverses lorsque la lumière atteindra la périphérie du champ récepteur de ce disque. Un centre qui est excité, et dépolarisé par la lumière, et au contraire hyperpolarisé lorsque la lumière atteint la périphérie s'appelle un centre ON, tandis qu'un centre qui est hyperpolarisé par la lumière, ou dépolarisé lorsque la lumière atteint la périphérie s'appelle un centre OFF. Les cellules bipolaires sont donc différentes selon si elles appartiennent à un champ récepteur ON ou OFF. De même, les cellules ganglionnaires ont des champs récepteurs caractérisés par un antagonisme centre/périphérie. Toutefois, c'est la fréquence des potentiels d'action qui varie (Figure 12) (Schiller, Sandell et al. 1986; Schiller 1992). On retrouve également des champs

récepteurs au niveau du cortex visuel primaire, qui sont de forme allongée, et qui répondent plutôt à des traits de lumière orientés de manière spécifique.

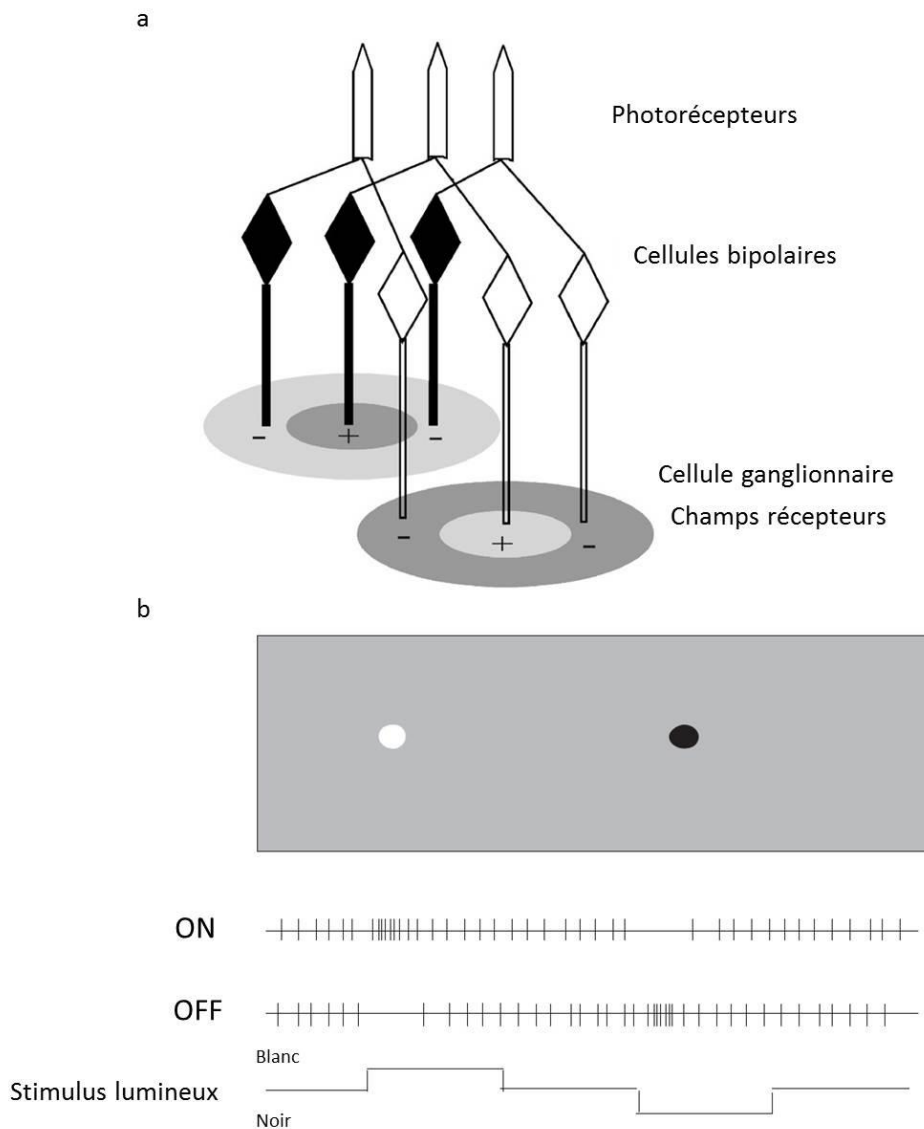


Figure 12: Représentation schématique des champs récepteurs de la rétine.

a. Schéma des signaux ON et OFF de la rétine, à partir des photorécepteurs via les cellules bipolaires, créant une structure centre/périphérie des champs récepteurs des cellules ganglionnaires, séparément pour les ON (symboles blancs) et OFF (symboles noirs). Les régions adjacentes sont antagonistes grâce à l'inhibition latérale.

b. Illustration schématique des décharges des cellules ganglionnaires ON et OFF quand des stimuli blancs et noirs sont délivrés au centre de leur champs récepteur. Les décharges apparaissent dans les cellules ON pour le signal blanc, et dans les cellules OFF pour le signal noir, et un arrêt des décharges dans la situation inverse. Adapté de Westheimer, 2007.

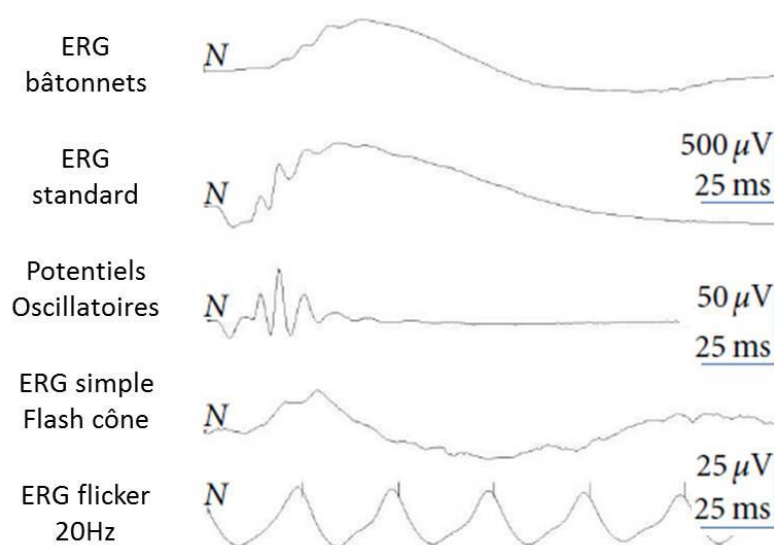
E. Moyens d'étude chez le rongeur

Chez le rongeur, l'évaluation de la fonction visuelle peut se faire par des protocoles issus de ceux utilisés chez l'homme et adaptés à la rétine et à l'œil du rongeur. C'est le cas de l'électrorétinographie (ERG) et de l'angiographie du fond d'œil qui permettent d'évaluer la fonction de la rétine et l'état de la vascularisation respectivement.

1. Electrorétinographie

L'électrorétinographie, découverte par Holmgren en 1868, correspond à l'enregistrement de la réponse électrique des cellules neuronales et non neuronales de la rétine qui font suite à la stimulation par des photons. Chez le rongeur, l'exploration par ERG doit se faire sous anesthésie générale, tout en vérifiant que l'anesthésique utilisé n'interfère pas avec le signal. Chez l'homme, l'ERG est une procédure standardisée établie par l'International Society for Clinical Electrophysiology of Vision (www.iscev.org) (Marmor, Holder et al. 2004). Cette procédure, adaptée pour le rongeur permet d'uniformiser les pratiques afin que les résultats soient reproductibles et stables. Ces conditions regroupent le choix du stimulateur photonique et de l'amplificateur, l'intensité des stimulations, la qualité des électrodes, la température de l'animal, l'hydratation cornéenne, la dilatation pupillaire, le placement des électrodes de référence en sous cutané entre autres. Les composantes de l'ERG et leur genèse sont similaires à celles de l'homme, même si le profil est assez différent (Figure 13). La stimulation flash correspond à une énergie lumineuse délivrée en un temps bref, provenant d'une source primaire, projetée sur une surface totalement réfléchissante devenant une source secondaire. L'énergie lumineuse est mesurée en candela par mètre carré pour une seconde. La rétine est stimulée par un flash lumineux d'intensité croissante au niveau de toute la surface rétinienne, dite en plein champ ou Ganzfeld, dans une ambiance scotopique (obscurité) ou photopique (lumineuse) selon si l'on souhaite étudier les systèmes des bâtonnets ou celui des cônes respectivement, jusqu'à obtenir les amplitudes maximales. L'électrorétinogramme simple flash se compose de plusieurs ondes de polarités différentes qui se succèdent dans le temps. Les trois composantes de l'ERG sont l'onde négative « a » qui représente l'activité des photorécepteurs, l'onde positive « b », attribuée à l'activité successive de plusieurs types cellulaires de la rétine interne et une dernière composante positive appelée « c » ou appelée respectivement PIII, PII et PI (Einthoven and Jolly 1908). L'onde PIII consiste en deux phases, le potentiel récepteur des photorécepteurs, puis une phase plus lente attribuée aux cellules de Müller. D'autres ondes, comme les potentiels oscillatoires (PO) (Yonemura, Masuda et al. 1963), retrouvées sur l'ascendance de l'onde b dans les cas de flash lumineux

intenses, sont plus spécifiquement en rapport avec l'activité de la rétine interne. D'autres ERG ayant une fréquence de stimulation fixe, amènent à une réponse dite Flicker. Cette réponse est pseudopériodique. Elle est générée par le système des cônes et des bâtonnets (PR et cellules associées), selon l'intensité lumineuse et la fréquence choisies, mais ne comporte pas de réponse de la couche plexiforme interne (Viswanathan, Frishman et al. 2002).



*Figure 13 : Réponse ERG d'un rat.
Adapté de An et al, 2012*

2. Ophtalmoscopie à balayage laser

L'évaluation de la vascularisation rétinienne et choroïdienne chez le rongeur vivant peut être réalisée par la technique d'ophtalmoscopie par balayage laser confocal (SLO) (Seeliger, Beck et al. 2005). Cette technique non invasive d'imagerie du fond d'œil permet la visualisation des différentes couches de la rétine grâce à des stimulations laser à différentes longueurs d'ondes (Figure 14). Le laser de courte longueur d'onde (488 nm et 514 nm, bleu-vert), par rapport à celui de longue longueur d'onde (infrarouge) est plus fortement absorbé par les structures oculaires, notamment par les grains de mélanine contenus dans l'EPR et la choroïde (Preece and Claridge 2002). Ainsi, le laser bleu-vert fournit des images très contrastées de la rétine, mais ne peut pénétrer l'EPR et la choroïde chez les animaux pigmentés. Le laser infrarouge quant à lui, fournit des images moins détaillées de la rétine mais permet d'obtenir des images de la choroïde ou de la sclère. Des images de haute résolution peuvent être obtenues soit avec des produits de contraste comme la fluorescéine ou le vert d'indocyanine, soit sans produit de

contraste pour mettre en évidence les éléments auto fluorescents. L'angiographie après injection de fluorescéine permet la visualisation du réseau rétinien, alors que l'angiographie en infrarouge après injection de vert d'indocyanine permet la visualisation du réseau choroïdien. Les sondes circulent dans les deux réseaux vasculaires. Cependant, l'absorbance importante du laser bleu à 488 nm par les grains de mélanine limite grandement la visualisation du réseau choroïdien et permet la visualisation prépondérante du réseau vasculaire rétinien. Le SLO proche de l'infrarouge est particulièrement utile pour détecter les anomalies de la rétine externe, de l'EPR et de la membrane de Bruch, ainsi que la présence de liquide sous rétinien. Ainsi, par cette technique, il est possible de visualiser in vivo la néovascularisation rétinienne et choroïdienne (Campochiaro and Hackett 2003), qui sont des étapes observées lors d'atteintes rétinienne comme celles induites par lésion de la membrane de Bruch après impacts laser (Lambert, Lecomte et al. 2013).

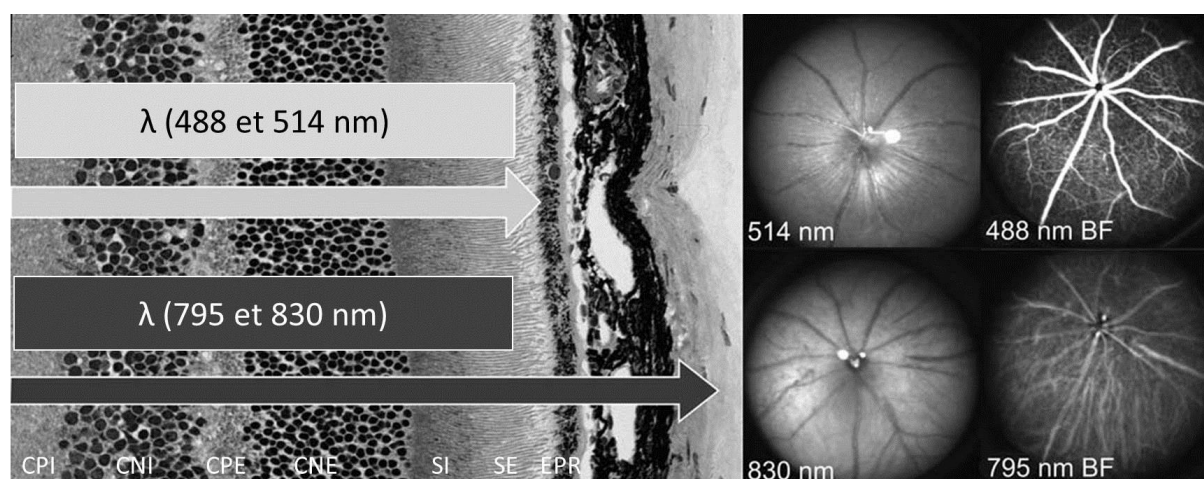


Figure 14: Visualisation des différentes couches selon la longueur d'onde.

CPI : couche plexiforme interne, CNI : couche nucléaire interne, CPE : couche plexiforme externe,

CNE : couche nucléaire externe, SI : segment interne, SE : segment externe, EPR : épithélium pigmentaire rétinien. BF : barrier filter, supprime la lumière réfléchie. Les courtes longueurs d'ondes ne peuvent passer l'EPR et la choroïde. Adapté de Seeliger et al, 2005

II. Alimentation normale et pathologique

A. Alimentation

1. Prise alimentaire

La prise alimentaire est un processus complexe correspondant à la consommation périodique de nutriments. Elle permet à l'organisme d'obtenir des ressources énergétiques pour sa survie, et participe à plusieurs mécanismes homéostatiques tels que le maintien de la glycémie et la régulation du bilan énergétique. Selon Claude Bernard (Bernard 1856), la prise alimentaire, en permettant la stabilité du milieu intérieur, assure à l'organisme une vie autonome. Elle répond à un ensemble de stimuli, internes et environnementaux, régulant la fréquence de la prise, la quantité et le type de nutriments ingérés. Ces stimuli, comme la faim ou la satiété (Le Magnen 1982), témoignent d'un besoin ou d'une réplétion. La prise alimentaire comprend ainsi une phase préprandiale, caractérisée par la sensation de faim, une phase prandiale correspondant à la prise alimentaire et une phase postprandiale qui correspond à l'état de satiété.

Les principaux centres de contrôle du comportement alimentaire se trouvent au niveau de l'hypothalamus et du tronc cérébral, où un grand nombre de neuromédiateurs et de récepteurs reçoivent des informations nerveuses et hormonales sur le statut énergétique de l'organisme (Figure 15). Ces hormones proviennent principalement de trois sites (Sam, Troke et al. 2012) : les cellules adipeuses, le pancréas et le tractus gastro-intestinal. D'autre part, les stimuli environnementaux, sociaux et psychologiques sont également des déterminants majeurs de la prise alimentaire, puisqu'ils influencent la prise des repas, ou encore le choix des aliments.

a) Régulation de la prise alimentaire

La régulation de la prise alimentaire peut se faire sur la quantité et la qualité des aliments ingérés, et sur la durée de l'intervalle entre deux prises alimentaires (Bellisle 2005). Les centres de régulation de la prise alimentaire sont l'hypothalamus, le noyau du tractus solitaire (NTS) et l'aire tegmentale ventrale (VTA).

Ainsi, au niveau de l'hypothalamus, le noyau arqué, richement vascularisé, est le senseur du glucose et des hormones lui parvenant. Il contient des neurones orexigènes définis par les neurones à neuropeptide Y (NPY) et les neurones à protéines liées à l'agouti (AgRP, « *Agouti related protein* ») (Gropp, Shanabrough et al. 2005) et des neurones anorexigènes définis par

les neurones à proopiomélanocortine (POMC) (Balthasar, Dalgaard et al. 2005). Le noyau paraventriculaire de l'hypothalamus est impliqué dans le contrôle inhibiteur de la prise alimentaire, de par sa communication avec le tronc cérébral et avec le noyau arqué (Harrold, Dovey et al. 2012). Enfin, le noyau ventromédian de l'hypothalamus, sensible au glucose, contrôle les dépenses énergétiques et la prise alimentaire. Sa destruction entraîne une hyperphagie et une obésité (Shimizu, Oomura et al. 1987).

Les noyaux du tractus solitaire, dans le tronc cérébral, sont le premier relais central des informations provenant du système digestif, via le nerf vague. La stimulation de ces noyaux entraîne l'arrêt de la prise alimentaire (Havel 2001).

L'aire tegmentale ventrale correspond à la composante hédonique entrant en jeu dans le comportement de prise alimentaire. Ce système, également appelé système de la récompense, peut lever l'inhibition présente sur les neurones orexigènes via la libération de dopamine (Tyree and de Lecea 2017).

Le système nerveux central modifie alors son activité grâce aux signaux afférents de régulation à court terme et à long terme qu'il reçoit.

Ainsi, le signal de faim repose sur les théories « glucostatiques » (Mayer 1953) et « lipostatiques » (Kennedy 1953). En effet, la prise alimentaire dépend des variations de la biodisponibilité cellulaire de glucose, détectée par les zones glucosensibles, grâce au principal récepteur du glucose : GLUT2. La baisse de la disponibilité cellulaire de glucose est reflétée par une baisse de la glycémie, induisant un signal de faim. D'autre part, le contrôle de la prise alimentaire est modifié en fonction des réserves adipeuses corporelles. En effet le tissu adipeux sécrète de manière proportionnelle à sa quantité, de la leptine à destination de l'hypothalamus, afin de réduire la prise alimentaire et maintenir des réserves adipeuses stables.

Avant le repas, la ghréline, est produite principalement par l'estomac, et stimule le noyau arqué et ainsi la prise alimentaire. C'est la seule hormone périphérique orexigène.

L'ingestion d'aliments induit différentes réponses. Les mécanorécepteurs gastriques et intestinaux sont activés. Les chimiorécepteurs sensibles à la présence des différents nutriments tels que les sucres, les acides gras et les peptides, présents dans le tractus gastrointestinal, sont également activés (Mei 1998). Ces signaux nerveux sont acheminés jusqu'au noyau du tractus solitaire via le nerf vague (Havel 2001) puis projetés au niveau de

l'hypothalamus. La présence de nutriments dans le tractus gastrointestinal stimule la sécrétion de plusieurs substances dans la circulation comme la cholécystokinine (CCK), le glucagon-like peptide 1 (GLP-1) et le peptide YY 3-36 (PYY3-36), qui ont un effet de rassasiement.

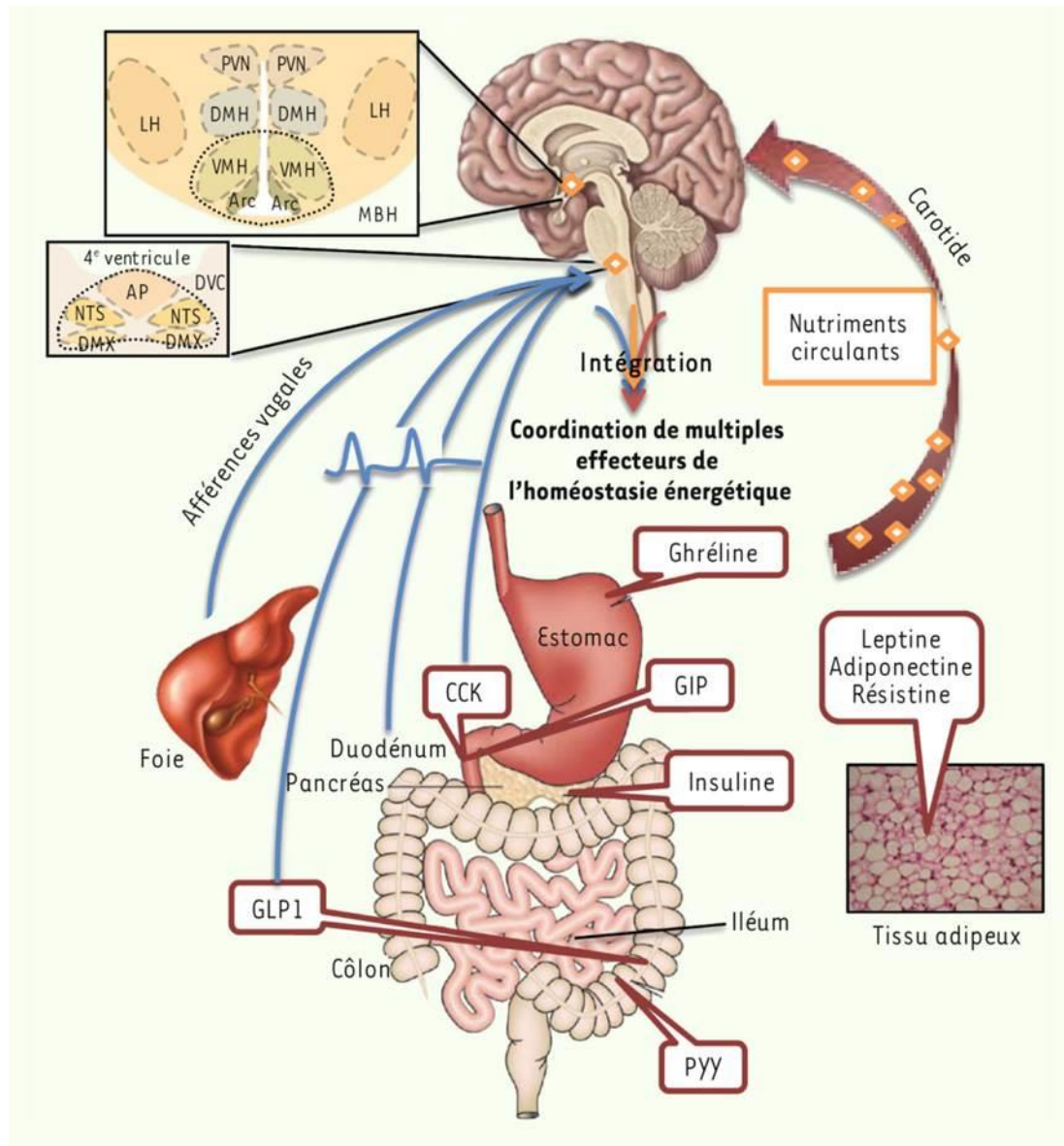


Figure 15 : Convergence de multiples signaux du statut énergétique de l'organisme dans le système nerveux central.

Arc : noyau de l'hypothalamus arqué ; DMH : noyau de l'hypothalamus dorsomédian ; LH : noyau de l'hypothalamus latéral ; MBH : noyau de l'hypothalamus médiobasal ; PVN : noyau paraventriculaire ; VMH : noyau de l'hypothalamus ventromédian ; DVC : noyaux du tronc cérébral formant le complexe dorsovagale ; AP : aire postrema ; DMX : noyau X du nerf vague ; NTS : noyau du tractus solitaire ; CCK : cholécystokinine ; GIP : polypeptide gastrique inhibiteur ; GLP1 : glucagon-like peptide 1 ; PYY : peptide YY. Adapté de Blouet, 2013.

Les signaux de régulation à long terme reposent sur les réserves énergétiques, accumulées sous forme de graisse dans le tissu adipeux, qui joue alors un rôle essentiel.

L'insuline, synthétisée par les cellules β des îlots de Langerhans dans le pancréas, est une hormone hypoglycémisante sécrétée après la prise alimentaire. Elle permet, par sa fixation à son récepteur (IRS, *insulin receptor substrate*), le stockage du glucose circulant en glycogène ou en triglycérides, par les cellules hépatiques, adipeuses et musculaires. De nombreuses études ont confirmé le rôle de l'insuline cérébrale comme modulateur de la motivation à manger (Havel 2001). En effet, des récepteurs à l'insuline ont été identifiés au niveau du noyau arqué de l'hypothalamus. L'insuline périphérique est donc transportée à travers la barrière hémato encéphalique, pour, au niveau cérébral, refléter l'état des réserves énergétiques de l'organisme. Au niveau central, l'insuline potentialise l'effet anorexigène de la CCK.

La leptine, découverte en 1994 (O'Rahilly 2002), est sécrétée par le tissu adipeux en proportion de sa masse grasse. Elle est un autre facteur hormonal régulant la masse grasse corporelle. La leptine, comme l'insuline, inhibe l'activité des neurones dans le noyau arqué paraventriculaire de l'hypothalamus basomédian qui produisent le NPY et l'AgRP, substances orexigènes (Penicaud, Meillon et al. 2012). Elle a, en ce sens, un effet antagoniste à la ghréline. Les personnes obèses développent une résistance à la leptine, provoquant une importante leptinémie. En effet, la leptine peut moduler la plasticité synaptique dans l'hypothalamus, en réduisant les connexions excitatrices au niveau des neurones orexigènes NPY et AgRP et en augmentant les connexions excitatrices au niveau des neurones anorexigènes POMC, ce qui induit une diminution de la prise alimentaire (Pinto, Roseberry et al. 2004). Aussi, l'injection de leptine à des patients obèses diminue leur sensation de faim, et augmente la sensation de satiété (Halford, Wanninayake et al. 1998).

La résistine est une hormone également sécrétée par le tissu adipeux. Elle se fixe sur les récepteurs de l'insuline au niveau des adipocytes, hépatocytes et myocytes induisant une résistance à l'insuline. De plus, chez les personnes obèses, les taux de résistine sont augmentés (Steppan, Bailey et al. 2001), attestant du lien entre obésité et diabète, deux pathologies qui se développent fréquemment conjointement.

Malgré la sécrétion par le tissu adipeux d'hormones favorisant son expansion et les défauts métaboliques qui en résultent, comme l'inflammation, le tissu adipeux est également capable

de sécréter des hormones favorables à un maintien de l'homéostasie : c'est notamment le cas pour l'adiponectine et l'apeline.

L'adiponectine, hormone sécrétée par le tissu adipeux, augmenterait la sensibilité à l'insuline au niveau du foie en diminuant la production de glucose et au niveau du muscle en augmentant l'entrée de glucose et des acides gras libres (Li, Shin et al. 2009).

L'apeline, une autre adipokine, améliore l'utilisation du glucose dans les cellules musculaires et adipeuses (Dray, Knauf et al. 2008) en augmentant la fonction et le nombre de mitochondries. L'injection d'apeline chez l'animal diabétique améliore la sensibilité à l'insuline, l'hyperglycémie ainsi que la prise de poids (Attane, Foussal et al. 2012). Un essai clinique est en cours pour déterminer son efficacité chez l'Homme (Gourdy, Cazals et al. 2018).

La dérégulation d'un ou de l'ensemble des signaux régulant la prise alimentaire participe au développement de maladies métaboliques. La prise alimentaire, en plus d'être régulée intrinsèquement, est conditionnée par des facteurs sociaux et culturels construisant nos habitudes alimentaires.

2. Habitudes alimentaires

a) Etude sur la consommation alimentaire

Les habitudes de consommation des Français sont évaluées par l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES). En 2017, la troisième étude individuelle nationale des consommations alimentaires (INCA3 2017) des Français en 2014-2015, est parue. Cette étude constitue un outil indispensable à l'évaluation des risques potentiels liés à l'alimentation, comme un excès de certains nutriments, ou un certain mode de consommation. Ces données permettent de mieux connaître les habitudes des Français notamment pour leur consommation d'aliments, leur niveau d'activité physique ou l'évaluation de leur sédentarité. Toute proportion gardée, ces données peuvent permettre de définir les risques pour la santé liés à l'alimentation et d'apporter des solutions. Ainsi, il est important de noter la présence d'une importante variabilité du comportement alimentaire selon l'âge des personnes, le sexe, le niveau d'étude ou encore entre les zones géographiques. Globalement, les Français consomment 2,9 kg d'aliments et de boisson par jour, à un ratio de 50/50. Seulement 50% des boissons correspondent à des eaux. Les nutriments qui contribuent aux apports énergétiques correspondent à 16,8% de protéines, 33,7% de lipides et 46,9% de

glucides. D'autre part, l'étude met en évidence la consommation accrue de produits transformés par rapport à l'étude antérieure, INCA2, portant sur les habitudes alimentaires de 2006-2007. En effet, les viennoiseries, biscuits sucrés et pizzas, biscuits salés sont des contributeurs majeurs aux apports de glucides, protéines et lipides, correspondant à environ 15% des apports énergétiques journaliers. Un autre élément marquant de la consommation des Français est le doublement de la consommation de poissons crus, passant de 15% à 31% de la consommation des denrées d'origine animale crues depuis la précédente étude de 2006-2007, INCA2.

De plus, les Français consomment une quantité croissante de compléments alimentaires. Le taux de consommateurs adultes de compléments alimentaires est passé de 20% en 2006-2007, à 29% en 2014-2015.

Par ailleurs, le statut pondéral et le niveau d'activité physique des Français restent inadaptés. INCA3 révèle qu'en 2014-2015, 13% des enfants et adolescents et 34% des adultes sont en surpoids, dont 4% et 17% respectivement sont obèses. De plus, les comportements sédentaires correspondant à au moins 3 heures de temps d'écran par jour, correspondent à la moitié des adolescents de 11 à 14 ans, deux tiers des adolescents de 15 à 17 ans et plus de 80% des adultes de 18 à 79 ans. En sept ans, le temps quotidien passé devant un écran, hors temps de travail, a augmenté de 20 minutes en moyenne chez les enfants et d'1h20 chez les adultes.

b) Consommation de lipides

Dans l'organisme, les lipides détiennent plusieurs fonctions. Ils ont un rôle de stockage de l'énergie, sous forme de triglycérides au niveau du tissu adipeux. Ils ont aussi un rôle structural par la formation des membranes cellulaires par les phospholipides et le cholestérol. Ils ont aussi un rôle dans la production d'hormones, via le cholestérol. Or, les triglycérides, les phospholipides et le cholestérol sont principalement apportés par l'alimentation, bien qu'une lipogenèse *de novo* existe. Comme pour tout nutriment, l'apport excessif de lipides peut être néfaste pour la santé mais la qualité des lipides apportés par l'alimentation est également importante à prendre en compte. En effet, les populations occidentales sont caractérisées par un apport en acides gras ne reflétant pas les recommandations de l'ANSES. Ainsi, les AGPI oméga-6 et oméga-3 apportés par l'alimentation industriellement transformée implique une quantité excessive d'oméga 6 et peu d'oméga 3, amenant à un ratio oméga 6/oméga 3 de 20:1. Ce ratio serait favorable au développement des pathologies cardiovasculaires, rétinienne comme la DMLA et maladies chroniques comme les cancers, les

maladies inflammatoires, alors qu'un ratio d'au moins 5:1, serait protecteur (Simopoulos 2002; SanGiovanni, Chew et al. 2007; Simopoulos 2008; Sangiovanni, Agron et al. 2009).

c) Consommation de glucides

La consommation de sucre augmente considérablement depuis le 17^{ème} siècle à travers le monde, via sa production massive. En effet, la consommation moyenne de sucres ajoutés est de 64kg par an et par Américain en 2005, une augmentation de 19% depuis 1970 (Wells and Busby 2008). L'utilisation croissante du sirop de maïs riche en fructose (HFCS, « *high fructose corn syrup* »), depuis quelques décennies, comme édulcorant dans les sodas, les biscuits et plats transformés, serait un des principaux responsables de l'épidémie actuelle d'obésité et de diabète des populations occidentales (DiNicolantonio, O'Keefe et al. 2015). Le saccharose, ou sucre de table, est un diholoside qui contient la même quantité de glucose et de fructose, alors que le HFCS contient 5% de plus de fructose par rapport au glucose que le saccharose. Pourtant, c'est bien le HFCS qui est préféré par les industriels, car le fructose apporte un pouvoir sucrant supérieur au glucose. L'Organisation Mondiale pour la Santé (OMS), recommande une limite de consommation de sucre ajouté équivalente à 10% maximum de l'apport énergétique quotidien, et souhaiterait plutôt tendre à 5% de l'apport énergétique. Au niveau mondial, la situation est variable. En Europe, la Hongrie et la Norvège présentent une ration de sucre ajouté équivalente à 7-8% de l'énergie totale, alors qu'elle est de 16-20% en Espagne, en France et au Royaume-Uni. Elle atteint près de 25% chez les enfants portugais (Azais-Braesco, Sluik et al. 2017).

3. Un sucre particulier : le métabolisme du fructose

Depuis plus de 50 ans, l'industrie agroalimentaire nord-américaine utilise le HFCS dans ses aliments. Le HFCS le plus communément utilisé est composé de 55% de fructose, de 42% de glucose et de 3% de maltose et maltodextrines. Le glucose et le fructose, bien qu'ayant la même formule chimique, $C_6H_{12}O_6$, sont métabolisés différemment (Figure 16). Glucose et fructose, après leur ingestion, passent au niveau de la circulation porte pour atteindre le foie. Le fructose est alors totalement métabolisé dans l'hépatocyte (Szendroedi and Roden 2009) ou il est transformé en fructose-1-phosphate par la phosphofructokinase, qui est clivé en trioses phosphates (glycéraldéhyde-3-phosphate et di-hydroxyacétone-phosphate) par l'aldolase B ou fructose-1-phosphate aldolase. Par la suite, 50% des trioses phosphates recirculent sous forme de glucose, 25% sous forme de lactate, 15% entrent dans la voie de la glycogénolyse hépatique et 10% sont oxydés pour participer, via la production d'acétate, à la lipogenèse hépatique, aboutissant à la formation d'acides gras, puis de triglycérides et de

phospholipides (Janket, Manson et al. 2003). Le métabolisme du glucose est différent puisqu'à partir de la circulation porte, le glucose est pris en charge par les hépatocytes, où il est phosphorylé en glucose-6-phosphate pour entrer dans la voie de la glycolyse. Seulement 20% du glucose est métabolisé par le foie, le reste est redirigé dans la circulation systémique pour alimenter la voie de la glycolyse dans les cellules musculaires et les adipocytes grâce à son transporteur GLUT4, afin de produire du pyruvate pour le cycle de Krebs. Le glucose va également interagir au niveau de son récepteur GLUT2 pancréatique déclenchant la sécrétion d'insuline. Contrairement au glucose, le fructose ne déclenche pas la sécrétion d'insuline. En effet, son principal récepteur, le récepteur GLUT5, est absent au niveau du pancréas, mais est abondant au niveau de l'intestin et du foie.

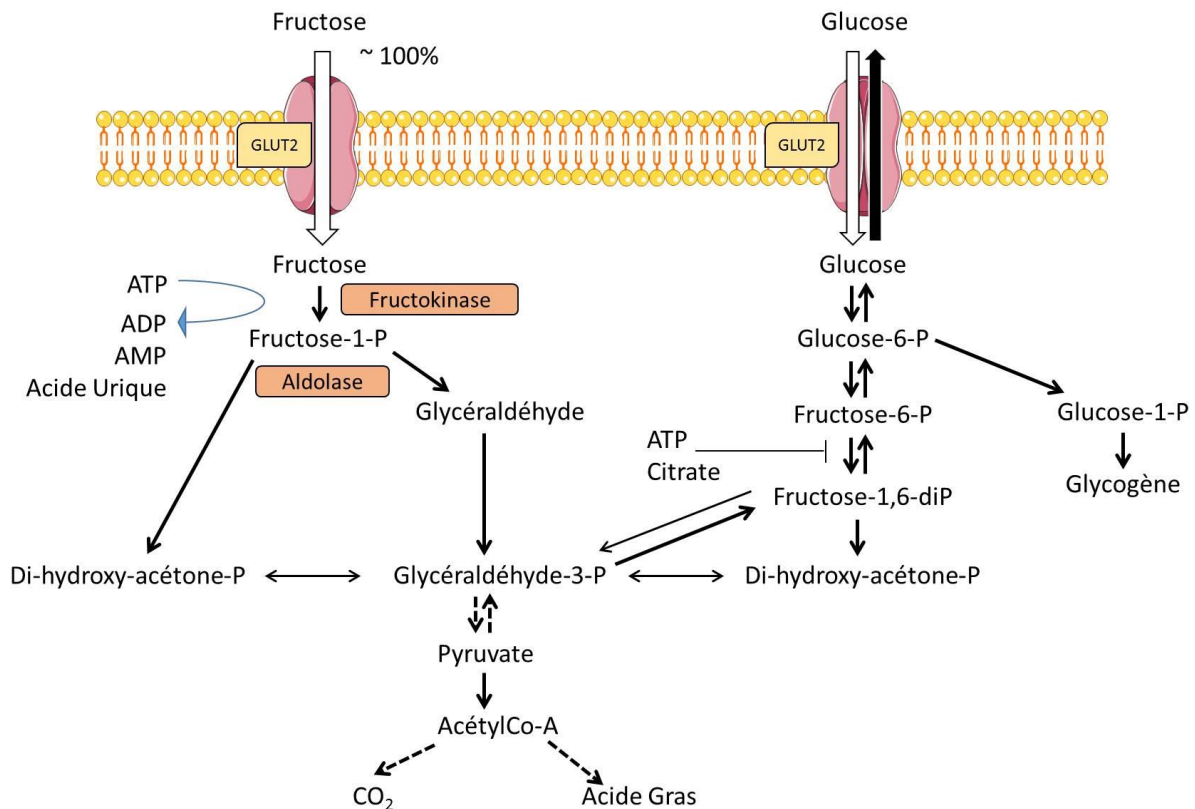


Figure 16 : Métabolisme du fructose et du glucose dans l'hépatocyte.
Adapté de Tappy et Lê, 2010

4. Le métabolisme des lipides

Les principaux lipides de l'alimentation sont des triacylglycérols (ou triglycérides), des phospholipides et des stérols. La digestion de ces lipides est réalisée par des enzymes pancréatiques et des sels biliaires. C'est au niveau de l'intestin grêle que les lipides vont être

hydrolysés. La lipase pancréatique conduit à la libération de 2 acides gras et du 2-monoacylglycérol. Les phospholipides sont hydrolysés par des phospholipases, au nombre de 4. Les phospholipases A1 et A2 libèrent les acides gras qui estérifient les fonctions alcool 1 et 2 du glycérol, respectivement. Le corps qui en résulte, dépourvu d'acide gras est appelé lysophospholipide. La phospholipase C hydrolyse la liaison ester entre le glycérol et le groupement phosphate, et la phospholipase D libère l'alcool. Ces enzymes interviennent à l'interface eau-lipide, et se fixent à la surface des gouttelettes lipidiques. Les sels biliaires participent à la formation des gouttelettes lipidiques, par la mise en émulsion et la formation de micelles de triglycérides.

Les micelles sont alors absorbées par les entérocytes, où les acides gras sont pris en charge pour atteindre le réticulum endoplasmique lisse, et sont rejoints par les 2-monoglycérides, afin d'être recombinaés en triglycérides.

Par la suite, les macromolécules lipidiques sont absorbées sous forme de chylomicrons, puis ils sont pris en charge par d'autres lipoprotéines, permettant le transport des lipides dans le plasma sanguin (Figure 18). Les lipoprotéines sont constituées d'un cœur hydrophobe de triglycérides, entouré de protéines, esters de cholestérol et phospholipides. Il existe différentes lipoprotéines :

- Les chylomicrons, synthétisés dans les entérocytes, permettent le transport des triglycérides alimentaires vers les tissus utilisateurs et le tissu adipeux. Les lipides alimentaires sont donc transportés dans un premier temps par les chylomicrons natifs. De par leur taille importante par rapport aux autres lipoprotéines, ils ne peuvent traverser les cellules endothéliales et vont emprunter le système lymphatique afin de rejoindre ensuite la circulation sanguine. Dans la circulation sanguine, leur taille doit être réduite par la lipoprotéine lipase (LPL) pour être acceptés par les récepteurs hépatiques. Après réduction, les chylomicrons restant ou « remnant » sont produits.
- Les lipoprotéines de très basse densité (VLDL, *very low density lipoproteins*) sont synthétisées dans le foie. Elles transportent les triglycérides du foie vers les tissus extra hépatiques. Dans la circulation, la protéine de transfert des esters de cholestérol (CETP) permet d'échanger des triglycérides contre des esters de cholestérol avec les lipoprotéines de haute densité (HDL, *high density lipoproteins*).

Lorsqu'ils circulent dans les capillaires sanguins, les chylomicrons et les VLDL s'attachent aux lipoprotéines lipases qui hydrolysent leurs triglycérides en acides gras et en 2-

monoacylglycérol, qui pénètrent dans les cellules musculaires ou les adipocytes, pour respectivement être utilisé directement dans la β -oxydation, ou être stockés sous forme de triglycérides. Le reste protéique du chylomicron est éliminé par le foie.

- Les lipoprotéines de basse densité (LDL, *low density lipoproteins*) sont synthétisées dans les tissus à partir des VLDL. Ils sont abondants dans la circulation sanguine et constituent une source exogène de cholestérol à destination des tissus. Ainsi, les LDL vont se fixer sur des sites spécifiques des membranes plasmiques, les vésicules recouvertes, qui vont s'invaginer pour former un réceptosome, qui fusionne à des lysosomes. Les enzymes contenus dans le lysosome libèrent les acides gras, le cholestérol, qui est incorporé dans le réticulum endoplasmique.
- Les HDL, synthétisées dans le sang, assurent le transport du cholestérol des tissus extra hépatiques vers le foie. La lécithine cholestérol transférase (LCAT), enzyme plasmique, estérifie le cholestérol libre au niveau des HDL et transforme les phospholipides de surface en lysolécithine. De cette manière, les HDL se gonflent en cholestérol. D'autre part, la CETP favorise les échanges de cholestérols estérifiés entre les différentes lipoprotéines, et permet donc de réguler la concentration en HDL.

L'ensemble de ces lipoprotéines contiennent des apolipoprotéines plus ou moins spécifiques. Ces lipoprotéines facilitent l'incorporation sélective des lipides dans les différents organes cibles en reconnaissant des récepteurs cellulaires spécifiques.

Les triglycérides de réserve dans les tissus sont mobilisés lorsque la glycémie est basse. Ils sont hydrolysés par la triglycéride lipase qui est hormonosensible (adrénaline, glucagon, noradrénaline, corticostéroïdes). Au niveau des adipocytes, le 2-monoacylglycérol est hydrolysé par une lipase intracellulaire non sensible aux hormones. L'insuline a un effet antilipolytique. En effet elle active la LPL et la LCAT et permet le transport du glucose dans le tissu adipeux, stimulant la lipogenèse. L'insuline active également les phosphatases dans le foie et les adipocytes. Ainsi, dans les hépatocytes, la synthèse de cholestérol prédomine, alors que la triglycéride lipase est inactivée dans les adipocytes.

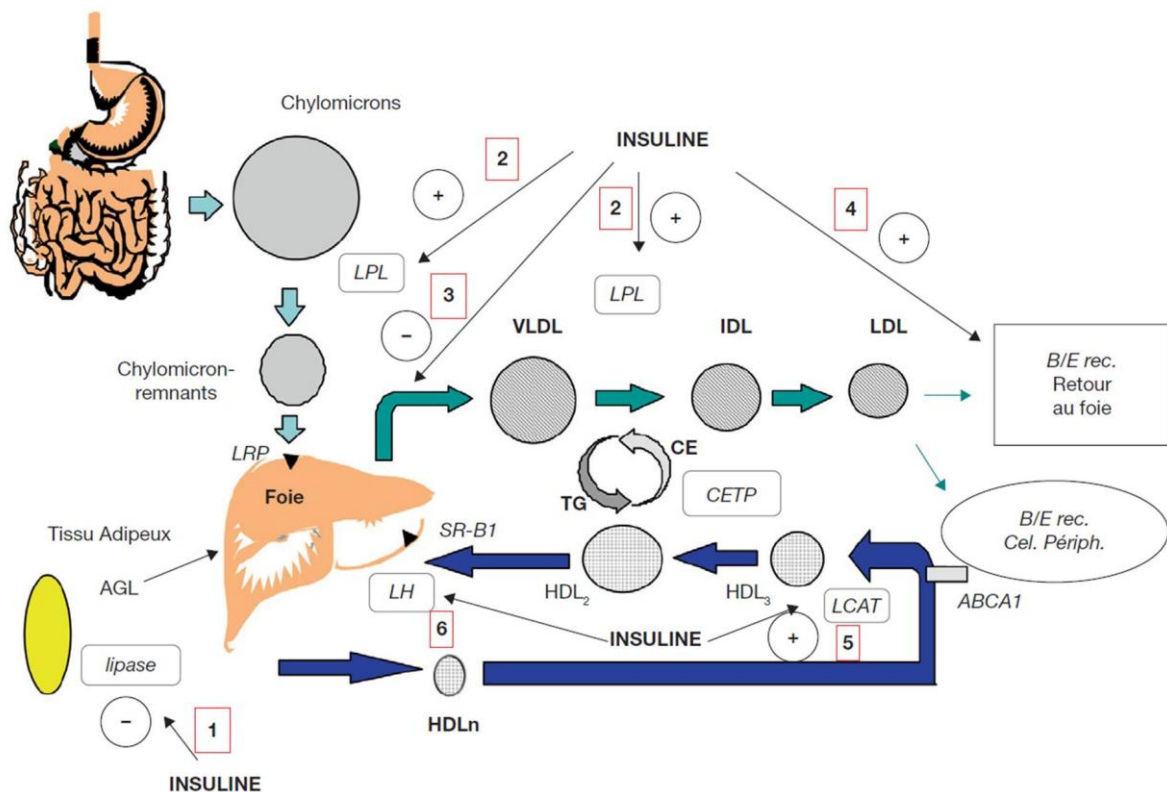


Figure 17 : Métabolisme des lipoprotéines et action de l'insuline

VLDL : Very Low Density Lipoprotein. IDL : Intermediate Density Lipoprotein. LDL : Low Density Lipoprotein. HDL : High Density Lipoprotein. HDLn : HDL naissante. LPL : LipoProtéine Lipase. LH : Lipase hépatique. CETP : Cholesteryl Ester Transfer Protein. LCAT : Lecithin-Cholesterol Acyl Transferase. AGL : Acides gras libres. LRP : LDL-receptor Related Protein. B/E rec.: récepteur B/E (LDL récepteur). ABCA1 : ATP Binding Cassette transporteur A1. SR-B1 : Scavenger Receptor Class B type 1 (récepteur des HDL). TG : Triglycerides ; CE : Cholestérol estérifié.

1 : l'insuline inhibe la lipase hormone-sensible.

2 : l'insuline active la LPL.

3 : l'insuline inhibe la production hépatique de VLDL.

4 : l'insuline augmente l'expression des récepteurs LDL (B/E rec.).

5 : l'insuline active la LCAT.

6 : l'insuline module l'activité de la lipase hépatique (LH).

Adapté de Vergès, 2013

B. Syndrome métabolique

Le syndrome métabolique est un problème croissant et majeur de santé publique à travers le monde. Le syndrome métabolique est considéré comme la maladie des sociétés industrialisées. Il a pour origine une dérégulation de la balance énergétique, résultat d'apports alimentaires excessifs par rapport à des dépenses énergétiques insuffisantes, reflétant en particulier un style de vie sédentaire. Il augmente le risque de développer un diabète de type 2 par 5, et double le risque de développer des pathologies cardiovasculaires dans les 5 à 10 ans (Alberti, Eckel et al. 2009).

1. Définition

Le syndrome métabolique, connu depuis près de 250 ans, s'est défini au fil des années. Sa première identification est due à Morgagni au 18^{ème} siècle. Il était initialement associé à l'obésité viscérale, l'hypertension, l'athérosclérose, et des taux importants d'acide urique sanguin avec des apnées du sommeil. En 1988, Reaven définit le Syndrome X comme un syndrome caractérisé par l'association des troubles du métabolisme glucidique, du métabolisme des lipides et de l'hypertension. Ces troubles avaient pour origine la résistance à l'insuline et pour conséquences le développement du diabète et de l'athérosclérose (Reaven 1994).

Après quelques années, le Syndrome X est renommé Syndrome de l'insulinorésistance (Haffner, Valdez et al. 1992).

Aujourd'hui, les scientifiques s'accordent sur le fait que le syndrome métabolique est caractérisé par l'ensemble des symptômes suivants :

- Obésité abdominale
- Dérégulation du métabolisme du glucose
- Dérégulation du métabolisme des lipides
- Hypertension

Ainsi, la présence de l'ensemble de ces symptômes augmente le risque de développer maladies cardiovasculaires, diabète de type 2 et ses pathologies associées, et augmente de manière générale le risque de mortalité (Wilson, D'Agostino et al. 2005).

Néanmoins, il existe différentes définitions qui reposent sur la détermination de critères cliniques précis dans le but d'identifier le syndrome métabolique. Ces critères sont retranscrits dans le Tableau 1, ci-après. Ces divergences de critères amènent des résultats difficilement

comparables entre les études, ainsi que d'importantes variabilités dans les données épidémiologiques. La première définition clinique fut celle établie par l'OMS en 1998 (Alberti and Zimmet 1998) suivi de la définition de l'EGIR (*European group for the study of insulin resistance*) en 1999 (Balkau and Charles 1999). En 2001, c'est au tour du groupe NCEP/ATPIII (*National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel*) d'établir sa définition (Expert Panel on Detection and Treatment of High Blood Cholesterol in 2001) suivi par l'AACE en 2003 (*American Association of Clinical Endocrinologists*) (Einhorn, Reaven et al. 2003). La plupart des définitions sont composées du critère résistance à l'insuline et de deux autres critères, au choix, parmi l'ensemble des critères définis. Toutefois, ces définitions présentaient le désavantage de ne pas être applicables de manière universelle, dans la mesure où elles ne s'appliquaient pas à tous les groupes ethniques, notamment concernant les caractéristiques cliniques de l'obésité, ou le ratio taille/hanche considéré comme normal, est différent. En effet, le risque de développer un Diabète de type 2 ou des pathologies cardiovasculaires ne sera pas le même pour une même mesure de tour de taille, selon les groupes ethniques.

Mesures cliniques	OMS (1998)	EGIR (1999)	NCEP/ATPIII (2001)	AACE (2003)
Résistance à l'insuline	Intolérance au glucose Hyperglycémie à jeun Diabète de type 2 Ou résistance à l'insuline	Insulinémie augmentée de 75%	non	Intolérance au glucose ou hyperglycémie à jeun
Obésité	Femmes: ratio taille/hanches > 0,85 Hommes: ratio taille/hanches > 0,9 Ou IMC > 30kg/m ²	Tour de taille: Femmes ≥ 80 cm Hommes ≥ 94 cm	Tour de taille: Femmes ≥ 88 cm Hommes ≥ 102 cm	IMC > 25kg/m ²
Lipides	TGs ≥ 150 mg/dL et/ou Femmes : HDL-C < 39 mg/dL Hommes : HDL-C < 35 mg/dL	TGs ≥ 150 mg/dL et/ou HDL-C < 39 mg/dL	TGs ≥ 150 mg/dL et/ou Femmes : HDL-C < 50 mg/dL Hommes : HDL-C < 40 mg/dL	TGs ≥ 150 mg/dL et/ou Femmes : HDL-C < 50 mg/dL Hommes : HDL-C < 40 mg/dL
Pression artérielle	≥ 140/90 mm Hg	≥ 140/90 mm Hg	≥ 130/85 mm Hg	≥ 130/85 mm Hg
Glycémie	Intolérance au glucose Hyperglycémie à jeun Diabète de type 2	Intolérance au glucose Hyperglycémie à jeun	> 110 mg/dL	Intolérance au glucose Hyperglycémie à jeun
Autre	Microalbuminurie (> 20 mg/min excrétion urinaire) ou ratio albumine/créatinine > 30 mg/g			
Critère résistance à l'insuline +	2 autres critères	2 autres critères	5 critères sans celui de la résistance à l'insuline	Jugement clinique (histoire familiale, mode de vie, âge, groupe ethnique)

Tableau 1 : Critères cliniques proposés pour le diagnostic du syndrome métabolique

IMC : Indice de Masse Corporelle. TGs : Triglycérides. HDL-C : Lipoprotéines de Haute Densité-Cholestérol.

Adapté de Kaur, 2014.

Finalement, un consensus a été trouvé en 2005 par la Fédération Internationale sur le Diabète (IDF, *International Diabetes Federation*) (Alberti, Zimmet et al. 2005). Cette définition,

illustrée dans le Tableau 2, est plus complète, et présente des critères différents, notamment en ce qui concerne le tour de taille, selon le groupe ethnique considéré.

a

Mesures cliniques	IDF (2005)
Résistance à l'insuline	non
Obésité	Augmentation du tour de taille (ethnique dépendant)
Lipides	TGs $\geq$ 150 mg/dL Femmes : HDL-C $<$ 50 mg/dL Hommes : HDL-C $<$ 40 mg/dL
Pression sanguine	$\geq$ 130/85 mm Hg
Glycémie	$\geq$ 100 mg/dL

b

Groupe Ethnique	Femmes	Hommes
Europe	$\geq$ 80 cm	$\geq$ 94 cm
Amérique du nord	$\geq$ 88 cm	$\geq$ 102 cm
Asie	$\geq$ 80 cm	$\geq$ 90 cm
Moyen Orient	$\geq$ 80 cm	$\geq$ 94 cm
Afrique sub-saharienne	$\geq$ 80 cm	$\geq$ 94 cm
Amérique du sud	$\geq$ 80 cm	$\geq$ 90 cm

Tableau 2: Définition du Syndrome métabolique par la Fédération Internationale de Diabète. a. Définition globale du Syndrome métabolique, b. Critères de tour de taille selon les groupes ethniques

2. Epidémiologie

La prévalence du SMet est comprise entre moins de 10% jusqu'à plus de 84%, dépendant de l'environnement, de l'âge, du groupe ethnique, du sexe de la population étudiée, et de la définition du SMet utilisée (Desroches and Lamarche 2007; Kolovou, Anagnostopoulou et al. 2007). En effet, une enquête nationale en Iran en 2007 indique une prévalence du SMet de 34,7-37,4% selon les critères de NCEP/ATPIII et de l'IDF respectivement alors qu'elle serait en Tunisie de 24,3%-41,6% selon les critères de NCEP/ATPIII et l'IDF respectivement (Delavari, Forouzanfar et al. 2009). De manière globale, l'IDF considère que 25% de la population mondiale est touchée par le SMet. Ainsi, un mode de vie sédentaire et un indice de masse corporelle (IMC) élevé sont significativement associés avec un SMet. D'autre part, le patrimoine génétique propre à chacun, l'alimentation, les antécédents familiaux de diabète, le

tabagisme, l'activité physique et les niveaux d'éducation sont autant de points pouvant influencer le développement d'un SMet (Cameron, Shaw et al. 2004). Une étude sur la prévalence du SMet aux USA a été réalisée la NHANES (*National Health and Nutrition Examination Survey*) entre 1988 et 1994. Dans cette étude, 22% des personnes en surpoids et 60% des personnes obèses ont un SMet (Park, Zhu et al. 2003). De plus, le SMet augmente avec l'âge, touchant 10% entre 20 et 29 ans, 20% des personnes entre 40 et 49 ans et 45% des personnes entre 60 et 69 ans (Ford, Giles et al. 2002). D'autre part, il existe une disparité entre les sexes, puisque la prévalence du SMet varie à travers le monde entre 8 et 43% chez les hommes et de 7 à 56% chez les femmes (Cameron, Shaw et al. 2004). En Chine, la prévalence du SMet est passée de 20 à 29% entre 1992 et 2002, et serait globalement en 2017 de 15.5% (Wang, Mi et al. 2007). Une autre étude a mis en évidence que l'augmentation de 11 cm du tour de taille est fortement associé au risque de développer un SMet dans les 5 ans (Palaniappan, Carnethon et al. 2004). De plus, selon une grande enquête sur l'obésité réalisée en 2015 sur 195 pays, la prévalence a doublé dans plus de 73 pays et a augmenté dans la plupart des autres pays, particulièrement chez les enfants (Collaborators, Afshin et al. 2017). Malgré le fait que l'obésité n'est pas synonyme de SMet, cette importante donnée témoigne de l'ampleur et de l'importance à venir des conséquences du SMet.

En France, deux études, DESIR (*Data Epidemiological Study on the Insulin Resistance*) et MONICA nous permettent d'avoir des données sur le SMet. L'étude DESIR, réalisée en 2003, s'appuie sur la définition de la NCEP pour déterminer la prévalence du SMet par un suivi sur 3 ans. Cette étude indique que la prévalence de SMet en France est autour de 16% chez les hommes et 11% chez les femmes, soit 2,5 fois moins que la prévalence aux Etats-Unis. L'étude MONICA quant à elle porte sur des données entre 1995 et 1998. Cette étude met en avant une variabilité selon l'âge, le sexe, l'activité physique, le niveau socio-économique et la région française de l'épidémiologie du SMet. Ainsi, la prévalence du SMet est plus importante chez les hommes par rapport aux femmes, et augmente avec l'âge et la sédentarité. Les personnes avec un niveau d'étude élevé sont moins atteintes par le SMet, compte tenu de la possibilité économique d'avoir un mode de vie sain. L'étude met également en avant une disparité régionale correspondant à deux fois plus de SMet dans le Nord que dans le Sud de la France.

Finalement, il n'existe pas d'étude généralisée à l'échelle mondiale, sur l'épidémiologie du SMet. Les prédictions indiquant que le SMet est 3 fois plus commun que le diabète, estiment la prévalence du SMet à 25% de la population mondiale. Il est néanmoins important de noter

que le risque de développer un SMet est supérieur au risque de développer indépendamment chacun des éléments le composant (Reilly and Rader 2003).

3. Pathogenèse

Le SMet est une pathologie inflammatoire à bas bruit qui se définit par la cooccurrence d'un certain nombre d'anomalies métaboliques (Figure 18). Cet état résulte de l'interaction de facteurs génétiques favorables au développement du SMet avec des facteurs environnementaux.

a) L'obésité centrale

L'obésité abdominale est un des premiers facteurs constituant le SMet. Cette obésité relève d'un déséquilibre de la balance énergétique caractérisé par un apport énergétique important de nutriments favorisant l'obésité et trop peu de dépense physique. Le tissu adipeux est un tissu hétérogène composé d'adipocytes, de stroma, de cellules immunitaires et d'endothélium. Il peut rapidement se modifier à la suite d'un apport particulier de nutriments, et notamment s'hypertrophier dans le cas d'un excès de nutriments (Halberg, Wernstedt-Asterholm et al. 2008; Laharrague and Casteilla 2010). Cette hypertrophie entraîne l'hypoxie du tissu adipeux, l'infiltration de macrophages, la production en excès d'adipocytokines, de glycérol, d'acides gras libres, de médiateurs pro-inflammatoires (facteur de nécrose tumorale (TNF- α) et interleukine 6 (IL-6)), mais aussi de l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène 1 (PAI-1) et de la protéine réactive-C (CRP) (Lau, Dhillon et al. 2005). L'ensemble des adipocytokines produites atteignent alors la circulation systémique pour médier la sensibilité à l'insuline (Saleem, Khaleghi et al. 2009), le stress oxydant, le métabolisme énergétique, la coagulation sanguine ou encore la réponse inflammatoire (Jacobs, van Greevenbroek et al. 2009).

b) La résistance à l'insuline

La résistance à l'insuline, autre facteur impliqué dans le SMet, est caractérisée par une hyperglycémie à jeun, une intolérance au glucose et une efficacité diminuée de l'insuline. Généralement, la diminution d'efficacité de l'insuline lors d'hyperglycémie conduit à une hyperinsulinémie, et aux manifestations du SMet (Gill, Mugo et al. 2005). En effet, la résistance à l'insuline va entraîner un épuisement du pancréas et une incapacité des cellules β du pancréas à sécréter plus d'insuline pour compenser l'hyperglycémie, favorisant le développement du diabète de type 2 (Ludwig, Peterson et al. 2001). Plus précisément, l'insuline, lorsqu'elle se fixe sur son récepteur, active les tyrosines kinases qui se phosphorylent et activent deux voies cellulaires parallèles : la voie de la phosphoinositide kinase 3 (PI3K) et la voie de la *Mitogen-activated protein kinases* (MAPK). Lorsqu'il y a

résistance à l'insuline, la voie MAPK fonctionne parfaitement tandis que le fonctionnement de la voie PI3K est altéré. L'inhibition de cette voie conduit à la réduction de la synthèse de monoxyde d'azote (NO) par l'endothélium, et donc une dysfonction de l'endothélium. La translocation de GLUT4, le récepteur au glucose, est alors réduite, ayant pour conséquence un défaut de captation de glucose dans les muscles et dans le tissu adipeux. La voie de la MAPK fonctionnelle, produit alors continuellement de l'endothéline 1 (ET-1), une molécule vasoconstrictrice, stimulante de la prolifération cellulaire, de la fibrose, et de l'inflammation. Le déséquilibre entre ces deux voies entraîne ainsi des dysfonctions vasculaires prédisposant à l'athérosclérose.

c) La dyslipidémie

La dyslipidémie correspond à une dérégulation du métabolisme des lipides ayant un rôle clé dans le développement du SMet, par l'induction d'effets athérogènes. Elle correspond à l'élévation des taux d'apolipoprotéine B (apoB), des triglycérides, des LDL-C et à une diminution des taux de HDL-C. La résistance à l'insuline conduit à la dyslipidémie en augmentant les taux d'acides gras libres, utilisés par le foie pour produire des triglycérides. Elle augmente également la production de VLDL, métabolisés en lipoprotéines rémanentes et en petites LDL, toutes deux responsables de la formation de plaques d'athérome. Ainsi, les foies des patients insulino-résistants présentent une augmentation du flux des acides gras libres, une augmentation de la synthèse et du stockage de triglycérides, qui sont sécrétés par les VLDL (Ginsberg, Zhang et al. 2005).

d) L'hypertension

L'hypertension est très régulièrement associée aux dérégulations du métabolisme comme l'obésité, l'intolérance au glucose et la dyslipidémie (Duvnjak 2007). L'adiposité viscérale et la résistance à l'insuline apparaissent comme les deux responsables de l'hypertension en activant le système rénine-angiotensine-aldostérone et le système nerveux sympathique. Ceci conduit à une réabsorption accrue du Na^+ et donc à une vasodilatation au niveau rénal ainsi qu'à une augmentation du volume sanguin.

Finalement, les prédispositions génétiques jouent un rôle important dans le développement du SMet, puisque de nombreuses études ont mis en évidence un polymorphisme du gène à la ghréline, associés à des prédispositions dans le développement du SMet (Comuzzie, Funahashi et al. 2001; Mora, Adam et al. 2015; Yang, Liu et al. 2015; Hajiluian, Abbasalizad Farhangi et al. 2017).

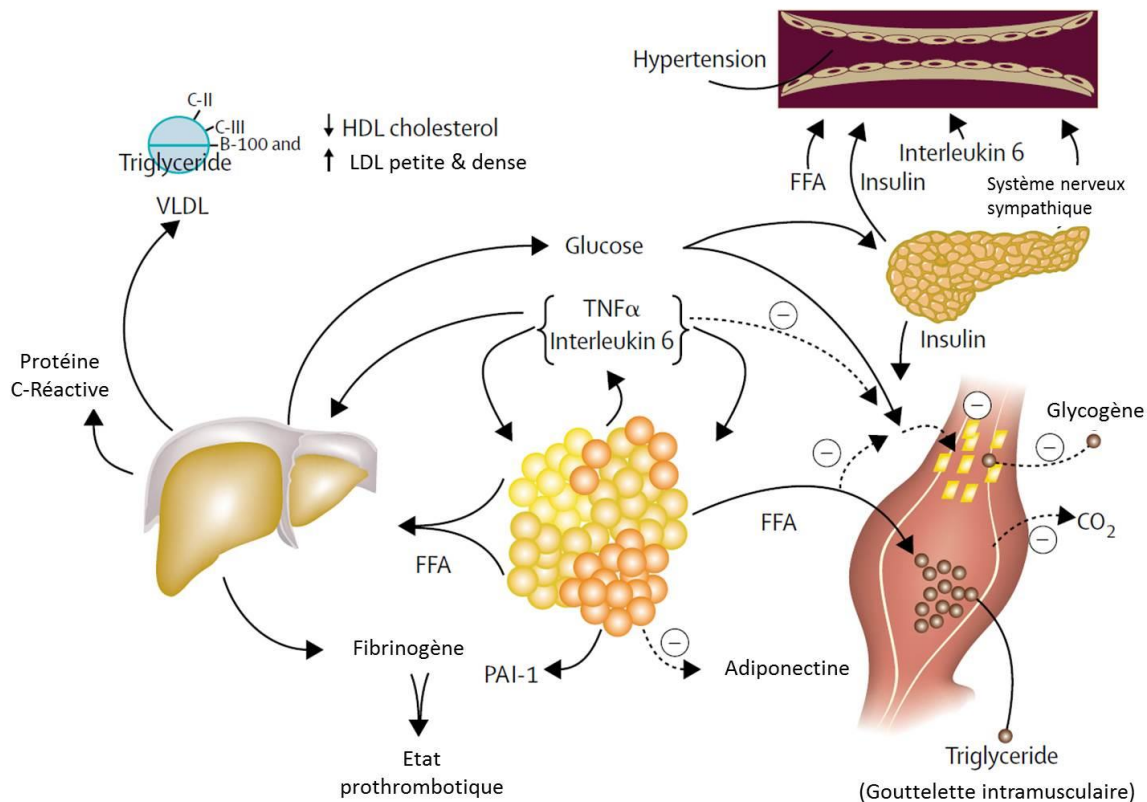


Figure 18 : Pathophysiologie du Syndrome métabolique

Acide gras libres : FFA. Facteur de Nécrose Tumorale alpha : TNF- α . Lipoprotéine de très faible densité : VLDL. Lipoprotéine de faible densité : LDL. Lipoprotéine de haute densité : HDL. Inhibiteur d'activation du plasminogène : PAI-1. Adapté de Eckel, 2005.

4. Modélisation chez l'animal

Le SMet regroupe un ensemble de symptômes complexes reposant sur des influences environnementales et génétiques. Compte tenu de la prévalence de ce syndrome et des conséquences qui lui sont associées, il est primordial d'obtenir des modèles animaux adaptés qui reflètent au mieux les symptômes retrouvés chez l'Homme. Ainsi, il existe trois approches pour induire un SMet chez le rongeur : l'induction par l'alimentation, par des modifications génétiques, et par l'administration de molécules pharmacologiques. En 2011, Panchal et Brown ont suggéré que le modèle de rongeur reflétant le mieux les caractéristiques du SMet retrouvé chez l'Homme était un modèle induit par une alimentation riche en sucres et riche en lipides (Panchal and Brown 2011).

a) Manipulation alimentaire

L'alimentation joue un rôle primordial dans le développement du SMet, et la composition du régime alimentaire détermine le statut nutritionnel. Les sociétés industrialisées consomment

des régimes alimentaires riches en hydrates de carbone, sucrose et fructose et en graisses saturées. Ainsi, de nombreuses études ont utilisé des manipulations de l'alimentation pour induire le SMet chez le rat (Wong, Chin et al. 2016). Ces modifications de l'alimentation correspondent à un seul ou à une combinaison de plusieurs régimes alimentaires, comme le régime riche en sucrose, en fructose, en lipides ou les régimes riches en fructose et lipides, sucrose et lipides.

Le fructose, retrouvé dans les fruits, est également ajouté dans de nombreux plats industrialisés comme exhausteur de goût (Le and Tappy 2006; Tappy and Le 2010). Théoriquement, l'apport de fructose dans le foie induit une accumulation hépatique de triglycérides et de cholestérol, mais réduit également la sensibilité à l'insuline, et crée une intolérance au glucose (Basciano, Federico et al. 2005; Jurgens, Haass et al. 2005). Le métabolisme du fructose, comme vu précédemment, apparaît alors plus favorable au développement du SMet par rapport au métabolisme du glucose. Une étude animale a montré qu'un régime alimentaire riche en fructose (60%) induit une augmentation de la tension artérielle, une intolérance au glucose, une résistance à l'insuline (Thirunavukkarasu, Anitha Nandhini et al. 2004). Des résultats similaires pour l'hypertension et l'hyperlipidémie sont induits par l'ajout de 10% de fructose dans l'eau de boisson (Sanchez-Lozada, Tapia et al. 2007).

De la même manière, le sucrose, composé d'une molécule de fructose et d'une molécule de glucose, permet l'induction d'un SMet. En effet, l'ajout de 30% de sucrose dans l'eau de boisson conduit chez le rat Wistar à une augmentation du poids corporel, à une hypertension, à une hyper insulinémie et à une dyslipidémie (Aguilera, Diaz et al. 2004).

De plus, les régimes enrichis en lipides, entre 20% et 60% de l'énergie totale, permettent d'induire l'obésité mais également l'hyperglycémie et la résistance à l'insuline. Les sources de lipides concernent particulièrement les huiles dérivées de plantes (maïs, tournesol, olive), ou les lipides dérivés de substances animales (lard riche en acides gras saturés et cholestérol) (Buettner, Scholmerich et al. 2007).

L'induction d'un SMet par la modification de l'alimentation permet d'atteindre les voies métaboliques du glucose et des lipides, ainsi que d'altérer la réponse hormonale impliquée dans la prise alimentaire. Les souches d'animaux les plus utilisées dans ce cas sont les rats de souche Wistar et les rats de souche Sprague Dawley. Toutefois, il n'existe pas de consensus clair sur l'utilisation d'un seul modèle pour induire le SMet (Panchal and Brown 2011). Selon

les besoins pour l'expérimentation, le sucre ou les lipides sont apportés dans la nourriture, ou dans l'eau de boisson, pendant des durées pouvant varier et chez des souches d'animaux différentes. Les comparaisons entre les études sont alors parfois délicates. En effet, l'ordre d'apparition des altérations métaboliques peuvent varier au sein d'une même souche de rongeurs selon le régime utilisé (de Moura, Ribeiro et al. 2009). Les altérations métaboliques peuvent également varier si la souche de rongeur est différente, pour un même régime alimentaire (Montgomery, Hallahan et al. 2013). Néanmoins, l'induction d'un SMet par l'alimentation apparaît la manière la plus adéquate pour reproduire les altérations retrouvées dans le SMet humain.

b) Modification génétique

Il n'existe pas de modèle génétique de SMet. En effet, le SMet chez l'Homme n'est pas induit par la dérégulation ou l'invalidation d'un seul gène. Néanmoins, les modèles génétiques de diabète et d'obésité sont intéressants pour comprendre les mécanismes moléculaires pouvant être impliqués dans le développement du diabète et de l'obésité chez le rongeur. Ces modèles correspondent par exemple :

- aux souris db/db, qui ont leur gène invalidé pour le récepteur à la leptine, et sont donc obèses.
- aux souris ob/ob, qui ont le gène permettant la production de la leptine invalidé. Ces souris ne produisent donc pas de leptine et sont obèses.
- aux rats Zucker, qui comme les souris db/db, ont le récepteur à la leptine invalidé, et sont donc obèses.
- aux rats long-Evans Otsuka Tokushima, qui sont diabétiques non dépendant de l'insuline et obèses à cause d'une déficience spontanée du récepteur à la CCK (signal périphérique de satiété).
- aux rats Goto-Kakisaki, qui sont des rats Wistar non obèses avec diabète de type 2 due à une perte de la réponse des cellules β .

Il est également possible d'invalider une protéine comme les récepteurs à l'insuline, ou les récepteurs au glucose. Ces modèles apportent des informations importantes sur la fonction même de la protéine invalidée, mais ne miment pas les effets du SMet chez l'Homme. Ainsi, les modèles génétiques ne permettent pas d'induire l'ensemble des traits phénotypiques présents dans le SMet.

Un modèle émergent de SMet est l'animal dont le récepteur au TLR5 (*Toll-like receptor*) est invalidé (Vijay-Kumar, Aitken et al. 2010). L'invalidation du TLR5, exprimé par la muqueuse de l'intestin, conduirait aux caractéristiques d'un SMet, à savoir l'hyperlipidémie, l'hypertension, la résistance à l'insuline, et l'augmentation de l'adiposité abdominale. Ce modèle appuie le fait que le microbiote intestinal contribue aux maladies métaboliques.

c) Induction pharmacologique

L'induction pharmacologique d'un SMet est impossible puisque ce biais ne permet pas d'altérer l'ensemble des altérations métaboliques retrouvées dans le SMet. Néanmoins, l'injection de streptozotocine et d'alloxan, des analogues du glucose, qui vont atteindre les cellules pancréatiques via GLUT2, entraînant la destruction de ces cellules vont régulièrement être utilisées dans le but d'induire un SMet. Toutefois, ces modèles créent un modèle de diabète de Type 1, mais pas de SMet (Lenzen 2008). De plus, contrairement aux patients avec SMet, ces modèles de rats présentent une hypoinsulinémie, témoignant de l'incapacité du pancréas à sécréter de l'insuline. L'induction d'un diabète de type 2 peut également être induit par l'injection d'une faible dose de streptozotocine en néonatal, produisant une hyperglycémie modérée et une diminution des niveaux sanguins de HDL-C (Sharma and Srinivasan 2009; Sinzato, Lima et al. 2009). Encore une fois, l'induction d'un diabète 2 n'est pas synonyme de SMet.

C. Rôle du fructose dans l'apparition des désordres métaboliques

Le fructose, avec son métabolisme exclusif au niveau du foie, est très utilisé pour l'induction du SMet, car il correspond aux habitudes alimentaires des sociétés industrialisées et que l'augmentation de la consommation du fructose est associée avec l'augmentation de la prévalence d'obésité (Le and Tappy 2006; Tappy and Le 2010). Contrairement au glucose, une alimentation riche en fructose induit les symptômes du SMet chez le rongeur, comprenant hypertension, dyslipidémie, hyperglycémie, intolérance au glucose et résistance à l'insuline (Bray, Nielsen et al. 2004; Tran, Yuen et al. 2009). De plus, parce que le métabolisme du fructose est exclusivement dans le foie, une alimentation riche en fructose sature le foie, induisant une stéatose hépatique (Kawasaki, Igarashi et al. 2009). Les signes d'obésité induit par une alimentation riche en fructose sont assez controversés selon les études (Patel, Iyer et al. 2009; Bocarsly, Powell et al. 2010). Les régimes enrichis en fructose ont également l'avantage d'induire une dyslipidémie, et agissent sur le métabolisme du glucose. Néanmoins, le fructose, contrairement au glucose, n'induit pas la sécrétion d'insuline car il n'y a pas le récepteur au fructose, GLUT5, au niveau du pancréas (Bray, Nielsen et al. 2004), ni de

leptine. En l'absence de rétrocontrôle négatif, le fructose apporte des substrats de manière illimitée pour la lipogenèse dans le foie.

Toutefois, si la théorie est claire, il existe de nombreuses variations dans la manière d'induire le SMet par un régime enrichi en fructose, ayant une variabilité des effets et des conséquences.

Ainsi, les différences entre les protocoles reposent sur la forme liquide ou solide d'administration ainsi que sur la quantité de fructose administré. En effet, l'apport peut être directement dans la nourriture à 60% de fructose (Joyeux-Faure, Rossini et al. 2006; Sanchez-Lozada, Tapia et al. 2007), dans l'eau de boisson à une concentration de 10% (Sanchez-Lozada, Tapia et al. 2007; de Moura, Ribeiro et al. 2009) ou encore par gavage à une dose de 8 g/kg (Barbosa, Albuquerque et al. 2007). La durée d'administration n'est pas non plus standardisée, pouvant être courte, de l'ordre de quelques jours (Thierry, Pasquis et al. 2015), à 4 (Barbosa, Albuquerque et al. 2007), 6 (Lee, Ko et al. 2006), 8 semaines (Sanchez-Lozada, Tapia et al. 2007), voire pouvant durer plusieurs mois (Lee, Ko et al. 2006; Thierry, Pasquis et al. 2014). L'âge des animaux au début de la mise sous régime, peut également jouer un rôle dans les modifications métaboliques induites par le fructose, selon si les animaux sont mis sous régime lorsqu'ils sont jeunes (Joyeux-Faure, Rossini et al. 2006; Barbosa, Albuquerque et al. 2007) ou adultes (Sanchez-Lozada, Tapia et al. 2007). Enfin, la souche d'animal utilisée, Wistar (Joyeux-Faure, Rossini et al. 2006; Barbosa, Albuquerque et al. 2007) ou Sprague-Dawley (Lee, Ko et al. 2006; Sanchez-Lozada, Tapia et al. 2007) pour les plus répandus, peuvent influencer la pathogenèse du SMet.

III. Rétinopathies liées aux désordres métaboliques

La rétine est l'organe qui, de tout le corps humain, consomme le plus d'énergie. Elle est soumise à un important stress oxydatif et possède le plus de mitochondries du corps. De plus, sa fonction repose sur de nombreux composés retrouvés dans l'alimentation comme le glucose, les lipides, la vitamine A. Ainsi, l'apport en nutriments de la rétine apparaît essentiel à son bon fonctionnement. Néanmoins, des dérégulations du métabolisme, comme c'est le cas lors du diabète ou du SMet peuvent induire des mécanismes d'inflammation, et la sécrétion de substances favorisant l'altération des vaisseaux et capillaires, mais également des cellules neuronales. Ainsi, l'ensemble de ces mécanismes peuvent participer au développement de

pathologies oculaires comme la rétinopathie diabétique et la dégénérescence maculaire liée à l'âge, via l'hyperglycémie chronique, l'inflammation, l'altération des capillaires rétiens.

A. La Rétinopathie Diabétique

La rétinopathie diabétique (RD) est la première cause de cécité dans les pays industrialisés avant l'âge de 50 ans. La RD est une complication commune du diabète qui touche 422 millions de personnes dans le monde. L'OMS estime que 100% de la population des diabétiques de type I sera atteinte de rétinopathie diabétique au bout de 10 ans d'évolution de leur diabète. Ce chiffre atteint 33% pour le diabète de type II au bout de 20 ans. Parmi ceux-ci, un tiers aura une rétinopathie potentiellement cécitante. Enfin un tiers des diabétiques ayant des complications cécitantes deviendra aveugle. Avec l'augmentation mondiale de la prévalence du diabète, la RD est devenue une cause majeure de cécité à travers le monde. Le nombre d'Américains atteints de RD en 2050 est estimé à 16 millions (*ADA. National Diabetes Statistics Report, 2014*). La RD est un véritable problème de santé publique dont le coût pour la société s'élève à 492 millions de Dollars (Saaddine, Honeycutt et al. 2008).

1. Définition et épidémiologie

La RD est une complication du diabète à long terme. Sa présence est principalement associée à la durée du diabète et au mauvais contrôle de la glycémie. Toutefois, la RD se développe chez toutes les personnes diabétiques, dans la mesure où le diabète est présent depuis une durée suffisante, même avec un bon contrôle de la glycémie et de la pression artérielle, (Klein, Klein et al. 1984; UKPDS38 1998).

La RD apparaît et progresse selon des phases définies, de la phase initiale non proliférative jusqu'à la phase la plus avancée, la phase proliférative (Figure 19).

La RD non proliférative (NPDR), est caractérisée par la présence d'anévrismes, d'hémorragies, d'exsudats, et d'autres anomalies vasculaires de la rétine. Ces caractéristiques peuvent être retrouvées dans d'autres pathologies affectant la vascularisation de la rétine et doivent être exclues par la connaissance de l'environnement et de la santé générale du patient.

La RD proliférative (PDR) est caractérisée par la présence de néovascularisation dans l'œil. La néovascularisation se développe au niveau de l'iris, de la rétine et du nerf optique et présente une véritable menace pour la vision, même lorsqu'elle est traitée.

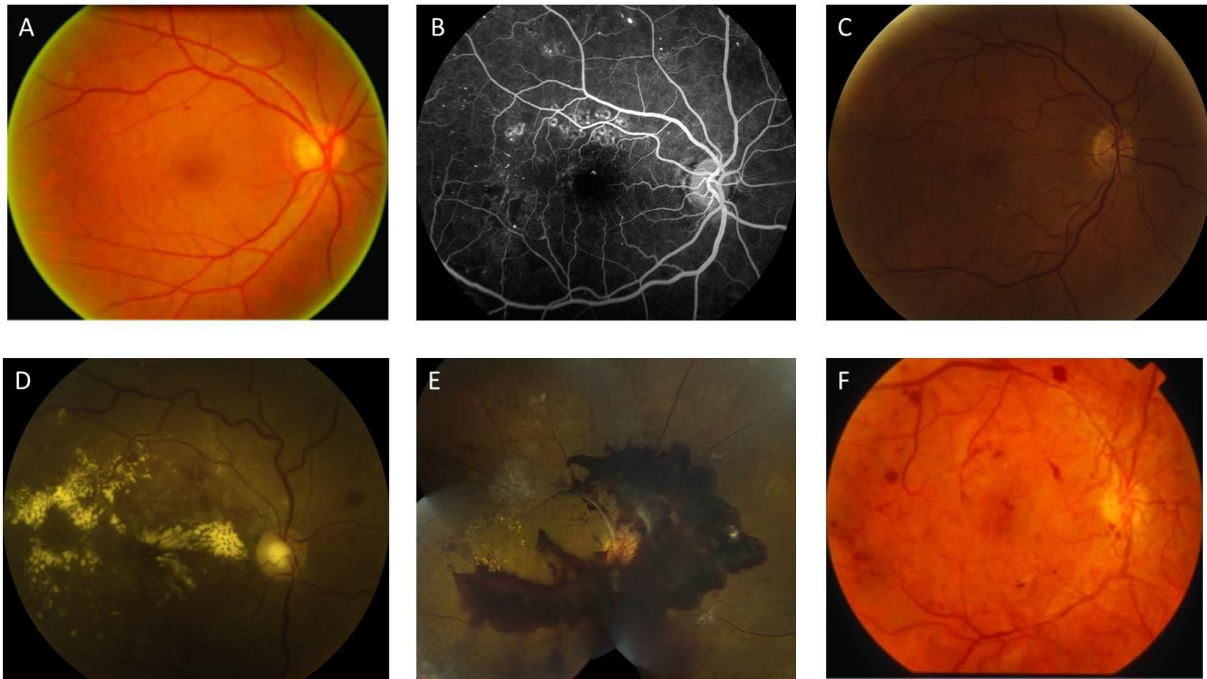


Figure 19 : Caractéristiques de la rétinopathie diabétique

Illustration de fonds d'œil. A. Fond d'œil normal. B. Angiographie à la fluorescéine présentant des microanévrismes. C. Fond d'œil présentant des microanévrismes et une hémorragie rétinienne. D. Fond d'œil présentant d'importants exsudats et accumulation de lipide dans la rétine. E. Fond d'œil présentant une hémorragie vitréenne et une néovascularisation du nerf optique. F. Fond d'œil présentant une néovascularisation. Adapté de Hendrick, 2015.

Les principales données concernant l'épidémiologie de la DR proviennent de l'étude épidémiologique sur la RD du Wisconsin (WESDR). Cette étude réalisée il y a 30 ans, a permis la mise en place de plusieurs traitements. Ainsi, après 20 ans de suivi, 99% des patients diabétiques de type 1 (insulinodépendant), et 60% des patients diabétiques de type 2 ont développé une RD (Klein, Klein et al. 1984). Dans la même étude, la prévalence de la cécité était de 3,6 % chez les diabétiques dont le diabète a été diagnostiqué avant 30 ans et de 1,6 % chez les diabétiques dont le diabète a été diagnostiqué après 30 ans, les taux de malvoyance étant respectivement de 1,4 et 3 %. Ainsi, la principale cause de malvoyance chez les diabétiques de type 1 est représentée par les complications de la rétinopathie diabétique proliférante, alors qu'il s'agit de l'œdème maculaire chez les diabétiques de type 2. En Europe, l'étude Eurodiab, enquête épidémiologique multicentrique menée sur 3 250 diabétiques de type 1, a déterminé une prévalence de cécité de 2,3 % (Sjolie, Stephenson et al. 1997). En France, il n'y a pas de données épidémiologiques nationales sur la rétinopathie diabétique. Delcourt, dans une étude menée sur 423 diabétiques de type 2 a obtenu une

prévalence de cécité de 1,2 % et de malvoyance de 7 % (Delcourt, Villatte-Cathelineau et al. 1995).

La prévalence du diabète de type 2 et de la RD sont en constante augmentation. En 2008, une enquête réalisée aux USA, la NHANES (*National Health and Nutrition Examination Survey*), estime que 28% des diabétiques ont une RD et 4% une RD potentiellement cécitante. Cette étude démontre notamment des variabilités ethniques dans le développement de la RD. En effet, les personnes diabétiques noires non hispaniques développent plus de RD (38,8%), et 5,9% de RD potentiellement cécitante (Zhang, Saaddine et al. 2010).

2. Pathogénèse

Les facteurs de risques identifiés pour la RD, sont l'équilibre glycémique et la tension artérielle. En effet, le point de départ de la RD est l'hyperglycémie chronique, mais les conséquences sur la rétine sont complexes.

La première hypothèse avancée pour expliquer les lésions de l'hyperglycémie est liée à la métabolisation du glucose via la voie de l'aldose réductase, dite voie des polyols. L'aldose réductase est impliquée dans l'étape de transformation du glucose en sorbitol, qui est par la suite transformé en fructose par la sorbitol déshydrogénase. Cette voie de métabolisation est peu active lorsque la glycémie est normale, mais est stimulée en présence d'une hyperglycémie. Il en résulte une importante production de sorbitol à l'intérieur des cellules, qui ne peuvent l'éliminer. Or, le sorbitol possède un pouvoir osmotique important, induisant l'altération de l'équilibre hydrique intracellulaire et donc le fonctionnement de la cellule.

De plus, l'hyperglycémie chronique induit la formation des produits de glycation avancés (AGE), c'est-à-dire la liaison d'une molécule de glucose à une protéine, sans l'intervention d'une enzyme. La présence des AGE dans un tissu induit des perturbations métaboliques. Les principales sont une rigidification des tissus par création de liaisons croisées entre protéines, l'altération de l'ADN et l'inflammation chronique via la liaison des AGE à des récepteurs spécifiques à la surface des macrophages. Le processus de la glycation est probablement la cause de l'épaississement de la membrane basale, de la rigidification du vitré et de l'adhésion des leucocytes à l'endothélium des capillaires rétinien.

Les perturbations biochimiques liées à l'hyperglycémie entraînent un déséquilibre métabolique caractérisé par un état d'hypoxie chronique. Cette situation est probablement due une augmentation du stress oxydatif généré par l'excès de synthèse de fructose dans la voie

des polyols. Or, le stress oxydatif induit par l'hyperglycémie est lié aux altérations microvasculaires retrouvées dans la RD (Cui, Xu et al. 2006). La production de radicaux libres oxygénés qui en résulte, altère les membranes mitochondriales et les systèmes de défenses antioxydants (Kowluru, Kowluru et al. 2015). Les métalloprotéinases matricielles (MMP) participeraient également au développement de la RD via son rôle dans l'apoptose et l'angiogenèse (Kowluru, Zhong et al. 2012).

L'activation de la protéine kinase C par l'augmentation du diacylglycérol (via l'augmentation du flux de glucose), entraînerait l'activation de voies impliquées dans la perméabilité endothéliale, mais également dans la sécrétion du VEGF dans les tissus rétiens (Aiello, Bursell et al. 1997; Aiello, Clermont et al. 2006).

Ces différentes voies modulent le développement de la RD en ayant des effets sur le métabolisme cellulaire, la signalisation et les facteurs de croissance.

Dans un premier temps, l'hyperglycémie conduit à des altérations des capillaires rétiens, et notamment par l'épaississement de leur membrane basale. Cet épaississement empêche l'interaction physique entre cellule endothéliale et péricyte, pouvant conduire à la perte du contrôle de la prolifération endothéliale. Lorsque la pathologie se prolonge, l'hyperglycémie chronique altère les vaisseaux rétiens et entraîne la perte des péricytes et l'augmentation de leur perméabilité. A un stade encore plus avancé, des occlusions vasculaires apparaissent entraînant des zones d'hypoxie. Cette hypoxie induit une vasodilatation réactionnelle des capillaires et des microanévrismes, qui ont une BHR déficiente et sont donc hyperperméables, source d'œdèmes rétiens.

Ainsi, les modifications structurales de la vascularisation de la rétine conduisent à des altérations de l'homéostasie vasculaire (Antonetti, Klein et al. 2012; Bandello, Lattanzio et al. 2013).

De plus, l'hypoxie qui en résulte induit une augmentation de la production de facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF), de l'adhésion des plaquettes, de la coagulation, les lipides plasmatiques et de la fibrinolyse. Le VEGF contribue de manière importante à la fragilité vasculaire et au développement de nouveaux vaisseaux. Au niveau de la rétine, les cellules de Müller participent grandement à l'inflammation de la rétine, à la sécrétion de VEGF, et jouerait également un rôle primordial dans le développement de la RD (Coughlin, Feenstra et al. 2017; Le 2017). La néovascularisation apparaît donc comme une

réponse adaptative à l'hypoxie. Néanmoins, la prolifération fibrovasculaire se présente comme un mauvais pronostic pour le maintien de la vision, si elle n'est pas enrayée.

Le VEGF est ainsi naturellement ciblé en thérapeutique pour réduire la propagation de la néovascularisation (Tarr, Kaul et al. 2013).

De plus, la RD n'est pas seulement une pathologie à composante vasculaire, mais est également une pathologie neurodégénérative où tous les types cellulaires de la rétine sont affectés, y compris les cellules ganglionnaires (Abu-El-Asrar, Dralands et al. 2004).

Ainsi, le développement de la RD conduit à un amincissement de la rétine interne, à une diminution du nombre de synapse et des protéines synaptiques, à un changement de la morphologie des dendrites, et à une dysfonction de l'EPR, ce qui induit une perte graduelle de la fonction de la rétine (Barber 2015).

De plus, la présence d'un diabète n'induit pas uniquement un risque de développer une RD, il augmente le risque de développer de nombreuses pathologies oculaires telles que la cataracte, les neuropathies.

La RD n'induit pas de manifestation visible, jusqu'à des stades déjà très avancés, notamment lorsqu'elle ne touche qu'un seul œil, bien qu'une étude ait montré une diminution de la vision des couleurs chez les personnes diabétiques ne présentant pas de rétinopathie (Gella, Raman et al. 2015).

Les causes de cécité dans la RD sont l'œdème maculaire et la néovascularisation. En effet, l'œdème dans la macula peut survenir à n'importe quel stade de la RD. Néanmoins, des traitements existent afin de résorber l'œdème, permettant potentiellement de récupérer la vision perdue (Das, McGuire et al. 2015). La néovascularisation est la deuxième cause de cécité dans les stades avancés de la RD. Elle conduit au développement de nouveaux vaisseaux anormaux, menant à des hémorragies vitréennes, et des décollements de la rétine, stade ultime de perte de vision irréversible.

3. Modélisation chez l'animal

La plupart des modèles de RD sont des modèles de rongeurs, souris et rats. Ils sont basés sur des inductions chimiques, spontanées, ou génétiques. Néanmoins, l'ensemble des mécanismes cellulaires et moléculaires responsables de l'initiation de la RD dans ces modèles ne sont pas encore bien connus. De plus, il n'existe pas de modèles spontanés de RD, qui reproduisent

parfaitement la pathophysiologie de la RD chez l'homme. La néovascularisation par exemple, ne peut être développée spontanément chez les modèles animaux de RD (Jiang, Yang et al. 2015). Toutefois, les modèles existants de RD reproduisent une partie des changements retrouvés dans la RD humaine (Tableau 3).

Modèle	Diabète	Age de début de diabète	Stade de RD	Effets	
Induction pharmacologique					
STZ ou Alloxan	Rat	Type 1	3j après injection	RD précoce	Perte des péricytes, rupture des vaisseaux, perte des CG, endommagement des cellules endothéliales, occlusion des vaisseaux et des capillaires rétinien, affinement de la MB
STZ ou Alloxan	Souris	Type 1	3j après injection	RD précoce	Perte des péricytes, capillaires acellulaires, apoptose des cellules vasculaires, perte des CG, affinement de la rétine
VEGF humain sous promoteur rhodopsine	Souris Kimba	-		Début de RD proliférante	Endommagement des vaisseaux, début de néovascularisation (4 semaines), affinement de la rétine, hémorragie, détachement rétinien, microanévrismes, rupture des vaisseaux, rupture de la BHR
Induction génétique					
Souris Akita Ins2 ^{Akita +/-}	Souris	Type 1	1 mois	RD précoce	Rapide hyperglycémie et hypoinsulinémie, augmentation de la perméabilité vasculaire (12 semaines), affinement de la rétine, perte des CG (22 semaines), perte des cônes et amacrine
Souris Akimba Ins2 ^{Akita} VEGF ^{+/-}	Souris	Type 1	1 mois	RD avancée	Hyperglycémie et néovascularisation, rupture importante des vaisseaux, rupture BHR, perte des péricytes, capillaires acellulaires. Avec le temps, perte des PR, affinement de la membrane, occlusion des capillaires, œdème persistant, détachement rétinien
Souris db/db lepr ^{db}	Souris	Type 2	8 semaines	RDNP	Activation gliale importante (GFAP), perte progressive des CG, affinement de la rétine, fonction anormale de la rétine, accumulation de glutamate, rupture de la BHR, dysfonction de l'EPR, diminution de la transmission synaptique
Souris IGF-1 surexpression	Souris	-		RDNP à RDP	Altération vasculaire, augmentation VEGF, rupture BHR, augmentation perméabilité vasculaire, altération gliale (3 mois), neurodégénérescence rétinienne (6 à 8 mois), augmentation stress oxydant (NADPH oxydase, TNF-α, MCP-1)

Tableau 3 : Modèles rongeur de rétinopathie diabétique

CG : cellules ganglionnaires. BHR : barrière hémato rétinienne. GFAP : Protéine acide gliale fibrillaire. PR : photorécepteurs. EPR : Epithélium pigmentaire rétinien. VEGF : facteur de croissance de l'endothélium vasculaire. NADPH : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate. TNF : facteur de nécrose tumorale. MCP : protéine chimioattractante des monocytes. RD : rétinopathie diabétique. RDNP : rétinopathie diabétique non proliférante. RDP : rétinopathie diabétique proliférante. Adapté de Cai, 2015

B. La Dégénérescence Maculaire Liée à l'Age

1. Définition

La dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) est la principale cause de cécité dans les pays industrialisés, après l'âge de 55 ans. Sa prévalence augmente avec le vieillissement de la population (Pennington and DeAngelis 2016). Une étude de 2013 réalisée sur 39 populations, estime la prévalence de la DMLA pour un âge entre 45-49 ans, de 4,17%, de 11,61% pour une

tranche d'âge de 60-69 ans et atteindre 27,17% pour la tranche d'âge 80-84 ans. De plus, il est estimé qu'en 2020, 200 millions de personnes seront atteintes (Wong, Su et al. 2014). La perte irréversible de vision qui en résulte fait de cette pathologie un important enjeu de santé publique, avec des conséquences incapacitantes et un coût de 300 billions de dollars pour la société (Cruess, Zlateva et al. 2008; international 2010). La détection précoce de la DMLA est cruciale car malgré le nombre croissant de traitements pour retarder la perte de vision, il n'existe pas à l'heure actuelle de traitement curatif.

La DMLA est une maladie évolutive. Sa forme précoce se nomme maculopathie liée à l'âge (MLA), et les deux formes avancées sont la DMLA exsudative, humide ou néovasculaire et la DMLA atrophique, ou sèche.

La MLA se caractérise par une diminution de l'épaisseur de l'EPR et de la membrane de Bruch ainsi que par l'apparition d'amas lipidiques et protéiques dans le fond d'œil appelés drusens. Ces phénomènes conduisent progressivement à une atrophie de l'EPR et des PR. La DMLA atrophique est caractérisée par la perte des PR, précédée par une altération de l'EPR, qui nourrit et participe au métabolisme des PR. La DMLA exsudative est caractérisée par des événements vasculaires, notamment la production, sous la macula, de nouveaux vaisseaux anormaux provenant de la choroïde et une cicatrisation fibreuse. La prévalence de la DMLA exsudative est de 55% et de 45% pour la DMLA atrophique (Friedman, O'Colmain et al. 2004).

Les mécanismes du développement de la DMLA sont encore mal connus de par la nature multifactorielle de cette pathologie. La définition de ces types de maculopathies repose sur 3 stades de lésions au niveau du fond de l'œil (taille des drusens et anomalies de l'EPR), évalué à une distance de 2 disques de la fovéa, chez les personnes âgées de plus de 55 ans (Ferris, Wilkinson et al. 2013). Ainsi, les changements normaux liés à l'âge correspondent à la présence de moins de 5 drusens, d'une taille inférieure à 63 μm . Les caractéristiques cliniques de la MLA et de la DMLA sont décrites dans le Tableau 4 et illustrées Figure 20.

Classification	Caractéristiques
Vieillessement normal	Pas de changements liés à l'âge Changements normaux liés à l'âge : → Quelques gouttelettes lipidiques (drusens $\leq 63 \mu\text{m}$) → Pas de changement dans l'EPR
DMLA précoce = MLA	Taille des drusens $> 63 \mu\text{m}$ et $\leq 125 \mu\text{m}$ et/ou anomalies de l'EPR
DMLA intermédiaire = MLA	Un seul drusen dont la Taille $> 125 \mu\text{m}$ et/ou anomalies de l'EPR
DMLA avancée	Atrophie géographique centrale Ou néovascularisation choroïdienne

Tableau 4 : Classification clinique de la DMLA

*DMLA : dégénérescence maculaire liée à l'âge. MLA : maculopathie liée à l'âge.
EPR : épithélium pigmentaire rétinien.*

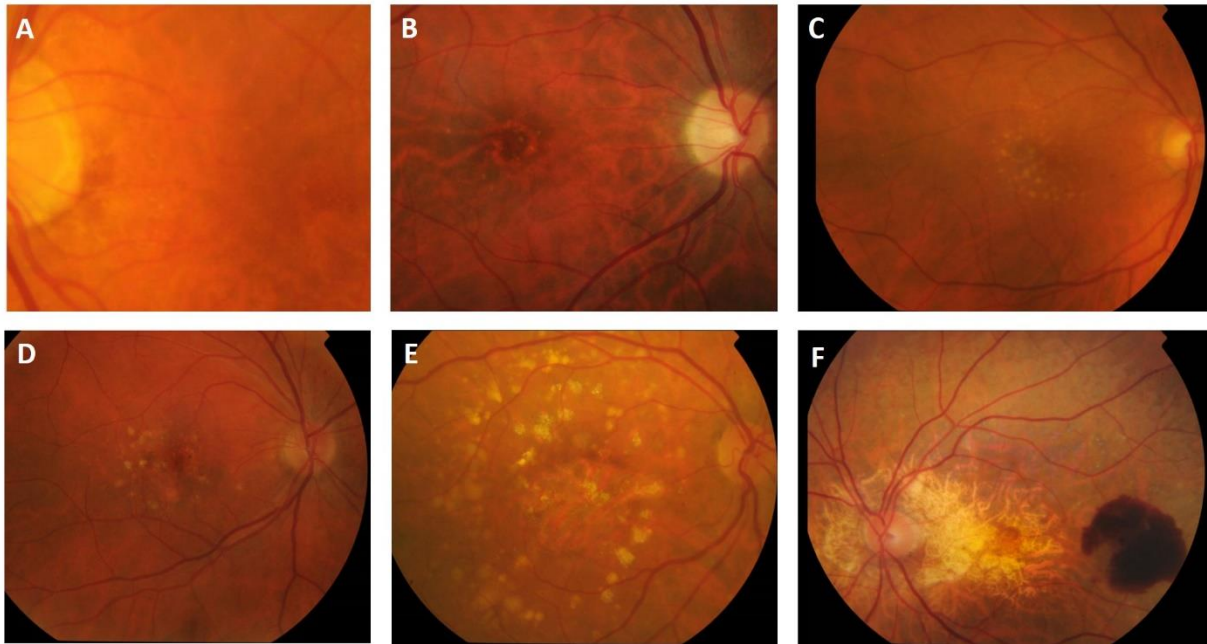


Figure 20 : Caractéristiques des différents stades de la dégénérescence maculaire liée à l'âge. Illustrations de fond d'œil. A. Fond d'œil présentant des changements normaux liés à l'âge (drusens $< 63 \mu\text{m}$ et pas d'anomalies de l'EPR). B. DMLA précoce sans anomalie de l'EPR. C. DMLA intermédiaire présentant des drusens petits, intermédiaires et larges. D. DMLA intermédiaire avec anomalies de l'EPR et quelques drusens $> 63 \mu\text{m}$. E. DMLA tardive présentant des larges drusens, des anomalies de l'EPR et une atrophie géographique = DMLA sèche ou atrophique. F. DMLA tardive avec néovascularisation choroïdienne et hémorragies sous rétiniennes. Adapté de Garcia-Layana, 2017

De manière éloquent, l'étude sur les maladies de l'œil associées à l'âge (AREDS, *Age-Related Eye Disease Study*) a établi une échelle de risque sur 5 ans, basée sur la combinaison de minimum 1 drusen supérieur à $125 \mu\text{m}$, et des anomalies de l'EPR dans les deux yeux (Ferris, Davis et al. 2005). Cette classification permet d'établir des scores maximum de 2 par œil et de 4 au maximum par patient. Ainsi, le risque de développer une DMLA dans les 5 ans augmente d'un facteur 100 entre un score de 0 et un score de 4. Le risque dans les 5 ans d'avoir une DMLA qui apparaît ou progresse est de 0,5% pour un score de 0 (correspondant aux changements normaux liés au vieillissement), à 3% pour un score de 1, à 12% pour un score de 2, à 25% pour un score de 3 et à 50% pour un score de 4. Ce risque peut être sur ou sous-évalué selon la présence d'autres facteurs de risques tels que les risques génétiques et le tabagisme.

La MLA peut être asymptomatique ou caractérisée par des difficultés d'adaptation aux changements d'ambiance lumineuse, ou par un besoin accru d'éclairage lors de la lecture par exemple.

2. Facteurs de risques

Les causes initiales du développement de la DMLA restent inconnues, bien que l'âge, le tabagisme et les facteurs génétiques aient clairement été identifiés comme facteurs de risques (Armstrong and Mousavi 2015; Saunier, Merle et al. 2018).

Le vieillissement est le principal facteur de risque de la DMLA. Un des paramètres les plus significatifs associé à l'âge est le dépôt de matériel acellulaire entre l'EPR et la membrane de Bruch. Ces dépôts, ou drusens, apparaissent comme de petits points jaunes au niveau de la macula. Le vieillissement entraîne également une diminution de 50% de l'épaisseur de la choroïde, et une perte de sa structure sinusoïde, causant l'hypoxie de la rétine externe. Cette hypoxie, si elle est prolongée, peut induire la sécrétion de VEGF, et participer au développement pathologique de maculopathie. De plus, le vieillissement entraîne l'augmentation de la rigidité de la sclère, le développement de dyslipidémie et d'athérosclérose. Ces altérations liées au vieillissement affectent l'élimination des lipoprotéines, qui s'accumulent sous forme de drusens au niveau de la membrane de Bruch. Ces changements rétiens sont associés à l'augmentation de la prévalence de la DMLA chez les personnes vieillissantes. En effet, près de 5,6% des personnes âgées de plus de 80 ans ont développé une DMLA tardive, alors que la prévalence est de 1,4% pour les personnes âgées de 70 ans, et 20% pour les personnes âgées de 90 ans (Rudnicka, Jarrar et al. 2012).

En plus des changements liés à l'âge, il a été montré que les facteurs génétiques contribuaient de manière significative au développement de DMLA tardive (Wang, Zhao et al. 2016; Wu, Guo et al. 2016). En effet, environ 20 gènes ont été identifiés comme participant au développement de la DMLA, dont les plus importants seraient CFH (complément du facteur H), C3, C2, impliqués dans le système du complément et de la réponse immunitaire et inflammatoire, ARMS2, FB, CFHR4, CFHR5, et F13B. Le polymorphisme de CFH Y402H est notamment fortement associé à la DMLA dans 60% des cas (Edwards, Ritter et al. 2005; Klein, Zeiss et al. 2005; Thakkinstian, Han et al. 2006). Ce polymorphisme varie selon les races, puisqu'il est retrouvé avec une forte fréquence chez les populations caucasiennes (39%) et les populations noires (30%), alors qu'il est présent dans seulement 7% de la population asiatique.

Enfin, des études épidémiologiques ont mis en évidence que le tabagisme augmentait le risque de développer une DMLA de deux à quatre fois par rapport à des personnes n'ayant jamais fumé (Velilla, Garcia-Medina et al. 2013; Myers, Klein et al. 2014). En effet, le tabagisme

affecterait la pathogenèse de la DMLA en favorisant le stress oxydant et l'angiogenèse, en altérant la circulation choroïdienne, et en activant le système immunitaire via la voie du complément (Ni Dhubhghaill, Cahill et al. 2010). L'arrêt de la cigarette réduit le risque de développer une DMLA, et ce risque revient à un risque identique aux non-fumeurs au bout de 20 ans d'arrêt.

D'autres facteurs de risque, tels que l'hypertension artérielle, l'athérosclérose, les antécédents familiaux de DMLA, l'obésité, les habitudes alimentaires, le diabète, ainsi que le SMet, sont associés au développement de la DMLA (Chakravarthy, Wong et al. 2010; Ghaem Maralani, Tai et al. 2015; Vassilev, Ruigomez et al. 2015). Par exemple, il a été montré chez des souris que hyperglycémie augmente la néovascularisation choroïdienne via l'augmentation du stress oxydant dans les cellules de l'EPR (Li, Cai et al. 2012).

3. Pathogenèse

Le processus par lequel la DMLA se développe repose en partie sur l'accumulation d'amas acellulaires lipidiques et protéiques appelés drusens. Ces drusens correspondent à des débris de segments externes de PR, non phagocytés. La phagocytose des segments externes des PR par l'EPR est essentielle pour le bon fonctionnement de la rétine. Avec l'âge, l'EPR devient moins efficace conduisant à l'accumulation de dépôts non phagocytés dans les cellules de l'EPR, causant la perte de ces cellules.

Dans la forme de DMLA atrophique, les débris membranaires et les résidus de vitamine A vont alors former des grains de lipofuscine au sein de l'EPR, qui vont être toxiques pour les cellules et entraîner de la mort cellulaire. En effet, l'analyse des grains de lipofuscine ont permis de mettre en évidence des molécules toxiques telles que la malon-dihaldéhyde (MDA), le 4-hydroxynonénal, les produits de glycation avancés (AGE) et le N-rétinylidène-N-rétinyléthanolamine (A2-E) (Eldred 1993). Ce dernier composé, autofluorescent, pourrait empêcher la dégradation lysosomale de l'EPR (Holz, Schutt et al. 1999), par ses propriétés phototoxiques (Schutt, Davies et al. 2000; Davies, Elliott et al. 2001). Or, les études convergent vers un rôle important des dommages oxydatifs au niveau de l'EPR dans la pathogenèse de la DMLA, liée à trop peu de production d'éléments antioxydants et une présence trop importante d'éléments pro-oxydants (Anderson, Kretzer et al. 1994).

En effet, l'influence du tabac, de l'âge et de l'exposition à la lumière, suggèrent l'importance des dommages oxydatifs dans la pathogenèse de la DMLA. La rétine, de par son importante consommation d'oxygène, de par sa composition riche en AGPI et par son importante

exposition à la lumière, est sensible à la photo-oxydation. Ainsi, la photo-oxydation conduit à la formation de radicaux libres oxygénés (ROS), et la peroxydation des AGPI (Beatty, Koh et al. 2000). De plus, la diminution du pigment maculaire avec l'âge, constitué de lutéine et zéaxanthine, des anti-oxydants, qui filtrent la lumière, favoriserait ces effets d'oxydations. Ainsi, les antioxydants apportés par l'alimentation pourraient palier aux effets du stress oxydatif. En effet, c'est l'étude AREDS, qui sera décrite dans le chapitre suivant, qui montre un effet favorable des anti-oxydants apportés par l'alimentation, dans la conversion des stades précoces vers les stades tardifs de la DMLA (Age-Related Eye Disease Study Research 2001).

Avec l'âge, la composition biochimique de la membrane de Bruch est modifiée (Feeney-Burns and Ellersieck 1985). La modification de la membrane ainsi que l'accumulation de dépôts en son sein conduisent à une diminution de la perméabilité entre l'EPR et la choroïde, et donc à la diminution des échanges et du transport des nutriments, et à l'accumulation de liquide dans l'espace sous l'EPR.

De nombreuses études ont également mis en évidence la présence de réactions inflammatoires locales et l'activation de la voie du complément (Johnson, Leitner et al. 2001; Anderson, Mullins et al. 2002). En effet, l'accumulation de débris au niveau de l'EPR et de la membrane de Bruch, entraîne la sécrétion de cytokines, elles même responsables de l'altération des cellules de l'EPR, et la formation des drusens. Cette hypothèse est cohérente le polymorphisme du CFH, facteur de risque de la DMLA (Klein, Zeiss et al. 2005).

Les drusens interviennent aussi dans le développement de la DMLA exsudative en se positionnant au niveau de la membrane de Bruch, créant une barrière physique qui limite les échanges. Ainsi, les drusens induisent une hypoxie de la rétine, qui, en réponse, augmente la sécrétion de VEGF et de signaux inflammatoires, responsables de la néovascularisation choroïdienne. La DMLA exsudative présente une progression et des défauts visuels très rapides. Il semblerait que ces phénomènes de néovascularisation choroïdienne soient le résultat de déséquilibres de sécrétion de facteurs de croissance, associés à une hypoxie rétinienne (Strauss 2005), notamment le facteur dérivé de l'épithélium pigmentaire (PEDF), le VEGF, et les angiopoïétines 1 et 2 (Hangai, Murata et al. 2001). En effet, chez des patients avec DMLA, ce déséquilibre implique une diminution de la sécrétion de PEDF, inhibant la production de néovaisseaux (Holekamp, Bouck et al. 2002), et une augmentation des taux de VEGF et d'angiopoïétine 2 (Frank, Amin et al. 1996). Ces mécanismes sont d'autant plus

accentués par les effets inflammatoires non spécifiques des macrophages dans l'apparition des néovaisseaux (Ambati, Anand et al. 2003).

Un autre acteur responsable du développement de la DMLA serait la cellule microgliale rétinienne (Sennlaub and Combadiere 2008). En effet, le CX3CR1, un récepteur de chimiokine, permet le recrutement de cellules immunitaires de la circulation sanguine vers un tissu en réponse à une inflammation (Combadiere, Salzwedel et al. 1998). Or le polymorphisme du gène du CX3CR1, est associé au développement de la maladie (Tuo, Smith et al. 2004). Dans la rétine, lors d'un stress oxydant par exemple, les cellules immunitaires résidentes, les cellules microgliales, s'accumulent au niveau de l'espace sous rétinien, au contact des PR et de l'EPR, pour phagocyter les PR et sont éliminés par un mécanisme dépendant de CX3CR1. Dans le cas d'une perte de fonction de CX3CR1, comme c'est le cas chez certains patients atteints de DMLA, et comme montré chez un modèle de souris, les cellules microgliales et les macrophages s'accumulent au niveau de l'espace sous-rétinien. Leur présence en excès s'accompagne alors d'une phagocytose excessive des PR et de leur transformation en cellules spumeuses ainsi que d'une production de VEGF (Raoul, Auvynet et al. 2010).

Finalement, les PR, de par leur localisation dans la fovéa et leur dépendance à l'EPR, sont les cellules de la neurorétine qui sont le plus rapidement atteintes lors du développement de la DMLA. Des études ont ainsi montré que les premiers stades s'accompagnaient d'une diminution de la fonction des bâtonnets (Owsley, Jackson et al. 2000). En effet, avec l'âge, il existe une mort cellulaire des bâtonnets dans les zones périfovéolaires (Curcio, Millican et al. 1993), et cette perte est retrouvée dans 75% des stades précoces et tardifs de DMLA (Curcio, Medeiros et al. 1996). Ainsi, la DMLA qui atteint la zone riche en PR de type cône, perdrait dans un premier temps les bâtonnets. Il semblerait en effet que la survie des cônes dépende de la présence des bâtonnets, qui sécrètent un facteur de survie : le facteur de survie dérivé des bâtonnets (RdVf : *Rod-derived viability factor*) (Mohand-Said, Hicks et al. 2000; Mohand-Said, Hicks et al. 2001; Fintz, Audo et al. 2003; Leveillard, Mohand-Said et al. 2004). Cette mort secondaire des cônes, retardant la perte de vision, offre des espoirs thérapeutiques quand à une supplémentation en ce facteur de survie.

du glucose ou des lipides, induire mécaniquement la néovascularisation choroïdienne, ou modifier la capacité d'autophagie.

Fibrose rétinienne
 Néoovascularisation choroïdienne
 Diminution signal ERG
 Atrophie photorécepteurs
 Complément
 Augmentation A2E
 Atrophie RPE
 Auto fluorescence
 Drusen
 Modifications pigments
 Epaississement MB

Voie du complément

souris Cfh -/-
 souris Cfh Y402H
 souris surexpression C3

				X		X		X	X				
X	X						X	X					
			X	X		X		X				X	

Chemokines

souris Ccl2 -/- et Ccr2 -/-
 souris Ccl2 -/-
 souris Cx3cr1 -/-
 souris Ccl2/Cx3cr1 -/-

X	X	X		X	X			X		X			
	X			X			X						
	X					X	X	X		X			
X	X	X			X	X		X		X			X

Stress Oxydant

Injection de produit de peroxydation des lipides
 souris céruloplasmine / Héphaestine -/-
 souris KO SOD1
 souris KD SOD2
 souris NRF2 -/-
 lumière bleue +/- régime gras +/- fumée de cigarette
 rat OXYS

X	X	X				X	X	X					
		X	X	X		X	X					X	
X	X							X	X	X			
X		X		X	X			X	X				
X	X	X	X	X		X			X	X			
X	X												
X	X	X						X	X			X	

Métabolisme Glucose/lipide

Souris âgée + régime gras
 Régime haut indew glycémique
 souris ApoE -/-
 souris ApoE2/e4 +/- régime gras
 souris ApoE 3 Leiden +/- régime gras
 souris ApoB100 + régime gras
 souris LDLr -/- + régime gras
 souris vldlr -/-
 souris CD36 -/-
 souris mcd/mcd

X	X												
X	X							X					
X	X												
X	X	X	X					X		X			
	X	X											
X	X												
X	X												
												X	X
X													
	X	X	X	X				X	X				

Néoovascularisation choroïdienne

Matrigel
 injection PEG-8
 souris MCP + injection PEC
 injection subrétinienne de lipides hydroperoxyde
 souris VEGF
 Impact laser dans la membrane de Bruch

	X	X					X	X		X			X
						X		X		X			
							X			X			X
	X						X	X		X			
										X	X		
										X			

Autophagie

souris atg7 ou atg5

X		X	X					X		X			
---	--	---	---	--	--	--	--	---	--	---	--	--	--

Tableau 5 : Modèles rongeur de DMLA

Adapté de Pennesi, 2012, Lambert, 2013 et Zhang, 2017

C. Points communs de ces pathologies

La DMLA et la RD sont deux pathologies appelées pathologies à composante vasoproliférative. En dépit du fait que ce soit le réseau vasculaire rétinien qui soit altéré dans la RD et le réseau vasculaire choroïdien dans la DMLA, il est bien documenté que les événements de néovascularisation présents dans les deux pathologies, sont associés aux mêmes effets : un état d'inflammation chronique, une augmentation de la perméabilité vasculaire, des ruptures de la barrière endothéliale, la formation d'œdème, l'infiltration de cellules inflammatoire, et le décollement rétinien, causant la perte de vision (Campochiaro 2015; Madeira, Boia et al. 2015; Le 2017). Des protéines communément dérégulées dans les deux pathologies apparaissent donc comme des cibles de premier choix dans les pathologies à composante néovasculaire.

Les traitements efficaces qui existent visent à arrêter la néovascularisation excessive en inhibant l'action d'un seul facteur, le VEGF, responsable de la formation des néovaisseaux anormaux (Ferrara 2010; Lim, Mitchell et al. 2012; Miller, Le Couter et al. 2013). Toutefois, d'autres facteurs contribuent à l'angiogenèse, et l'identification de voies alternatives pour bloquer l'angiogenèse apparaît comme essentielle d'un point de vue thérapeutique dans la mesure où certains patients développent des résistances.

Une autre protéine pouvant agir dans le cadre de ces deux pathologies a été identifiée. Slit 2 est une protéine qui intervient dans les connexions neuronales et dans le développement de certains cancers à travers ses récepteurs de la famille Robo. De plus, Slit 2 peut inhiber la perméabilité vasculaire et la migration cellulaire induite par le VEGF (Jones, London et al. 2008; Zhou, Yu et al. 2011), et est requis via Robo 1 et 2, pour la néovascularisation rétinienne (Rama, Dubrac et al. 2015) suggérant que slit peut être utilisé pour diminuer l'œdème et bloquer l'angiogenèse dans la RD et la DMLA. D'autre part, les 2 pathologies présentent de nombreux biomarqueurs communs, dans les voies de stress oxydant, d'inflammation ou des biomarqueurs vasculaires (Das 2016; Nath, Halder et al. 2017).

De plus, la DMLA et la RD présentent des facteurs de risques communs. En effet, le diabète, mais plus généralement le SMet sont des facteurs de risques majeurs dans le développement de la RD, mais également dans celui de la DMLA. En effet, le SMet est un facteur fort et indépendant associé à la prévalence de la RD (Gao, Xin et al. 2016), mais également au développement des stades avancés de la DMLA (Ghaem Maralani, Tai et al. 2015).

	DMLA	Rétinopathie Diabétique
Population	Personnes âgées > 55 ans	Personnes diabétiques type 1 ou type 2
Incidence	<u>Incidence à 10 ans:</u> DMLA précoce 12,1% DMLA tardive 2,1%	0,64/1000 et 42,1/1000 patients par an
Prévalence	1,47 % dans la population USA (âgée > 40 ans)	12.7%~75.1% chez les patients diabétiques
Cécité	Plus de 420000 cas par an	Plus de 10000 cas par an
Facteurs de risque	1. Age 2. Groupe ethnique 3. Tabagisme 4. Prédispositions génétiques 5. Obésité 6. Hypertension 7. Alimentation	1. Faible contrôle de la glycémie 2. Hypertension
Réseau vasculaire	Choroïde	Rétinien
Première aire rétinienne impactée	rétine externe (Photorécepteurs, membrane de Bruch, EPR) dans la macula	rétine interne (endothélium, péricytes)
Lésions aux stades précoces	Drusen, anomalies pigmentaires	spots
Lésions aux stades avancés	Atrophie géographique néovascularisation choroïdienne	néovascularisation rétinienne œdème maculaire rupture barrière hémato-rétinienne
Prévention	Mesures diététiques (tabac, alimentation) Antioxydants (Formule AREDS et AGPI oméga-3)	Contrôle glycémie et mesures diététiques
Traitement	Chirurgie Laser Anti-VEGF	Chirurgie Laser anti-VEGF Vitrectomie

Tableau 6 : Comparaison des caractéristiques entre la DMLA et la RD
Adapté de Chiu 2011

D. Syndrome métabolique et conséquences sur la rétine

Le SMet est majoritairement favorisé par des facteurs environnementaux liés aux habitudes alimentaires, induisant un état d'inflammation basal. L'OMS a récemment estimé que 186 millions de personnes à travers le monde, âgées de 50 ans et plus, étaient atteintes de défauts visuels, dont 36 millions présentent une cécité totale (Pascolini and Mariotti 2012). Les

causes principales de cécité à travers le monde sont la cataracte, la DMLA, la RD et les glaucomes. Or, plusieurs des composantes du SMet ont été associés à certaines pathologies oculaires (Klein, Klein et al. 1994; Lin, Chien et al. 2010; Raman, Gupta et al. 2010; Newman-Casey, Talwar et al. 2011; Sabanayagam, Wang et al. 2011; Song and Gray 2011; Moon, Joe et al. 2012; Olafsdottir, Andersson et al. 2012; Pang, Jia et al. 2012; Richter, Choudhury et al. 2012; Ghaem Maralani, Tai et al. 2013; Erke, Bertelsen et al. 2014; Howard, Klein et al. 2014).

1. Rétinopathie diabétique

Le SMet et la RD ont très régulièrement été associés dans les études. En effet les patients diabétiques de type 2 ont 3,42 fois plus de risque de développer une RD s'ils ont un SMet comparé à ceux sans (Abdul-Ghani, Nawaf et al. 2006). Il existe de même une association entre SMet et RD pour des patients diabétiques de type 2 européens (Costa, Canani et al. 2004), ou Indiens (Raman, Gupta et al. 2010). Les données sont néanmoins controversées pour les patients diabétiques de type 1, avec SMet. En effet, il n'a pas été trouvé d'association entre la présence du SMet et la RD chez les patients caucasiens diabétiques de type 1 (Kilpatrick, Rigby et al. 2007).

Ainsi, l'hyperglycémie est un important facteur de risque associée avec le début et la progression de la RD (Klein, Klein et al. 1996), de même concernant le contrôle glycémique (Rodriguez-Fontal, Kerrison et al. 2009).

L'hypertension a également été associée au risque de développer une RD dans plusieurs études (Zhang, Wang et al. 2013). Les anomalies du métabolisme des lipides et des lipoprotéines sont également associées à la RD (Zhang, Proenca et al. 1994).

L'association entre obésité et RD est sujet à de nombreux débats selon les études (Cheung and Wong 2007). Une étude en Suède a réalisé le suivi de 582 jeunes diabétiques de type 1, et a montré que les individus avec un IMC élevé développaient une rétinopathie de manière précoce (Henricsson, Nystrom et al. 2003). Toutefois, d'autres résultats générés dans l'étude épidémiologique de Wisconsin sur la RD ont montré que en dépit d'une obésité caractérisée par un IMC supérieur à 31 kg/m², aucune association n'a été mise en évidence sur la progression et la sévérité de la RD (Klein, Klein et al. 1984; Klein, Klein et al. 1994).

Ainsi, le traitement intensif de l'hyperglycémie et de la dyslipidémie aurait apporté de bons résultats en diminuant la progression de la RD (Chew, Davis et al. 2014).

Le SMet conduit à l'augmentation du stress oxydant par la production excessive des espèces réactives de l'oxygène (ROS), à la résistance à l'insuline et à l'inflammation, composants qui contribuent au développement de la RD. En effet, l'hyperglycémie provoque une production excessive d'anion superoxyde par la chaîne respiratoire des mitochondries, augmente la voie des polyols (Lee and Chung 1999), augmente la production des produits de glycation avancés (AGE), active les isoformes de la protéine kinase C (PKC) et augmente la voie des hexosamines (Brownlee 2001). L'ensemble de ces phénomènes est responsable d'altérations fonctionnelles et structurales des membranes cellulaires, et donc une augmentation de la perméabilité cellulaire (DeMarco, Johnson et al. 2010). Les personnes avec un SMet ont une hyperinsulinémie compensatoire de la résistance à l'insuline. Or, ce phénomène entraîne une accumulation de leucocytes dans les vaisseaux sanguins, causant l'occlusion des capillaires. Enfin, l'inflammation à bas bruit et la dysfonction endothéliale présentent lors d'un SMet sont impliquées dans la pathogenèse de la RD.

2. Dégénérescence maculaire liée à l'âge

Il existe uniquement une étude clinique associant le risque de développer une DMLA tardive avec le SMet (Ghaem Maralani, Tai et al. 2015). La plupart des études associent des composants du SMet seulement avec la DMLA (Klaver, Wolfs et al. 1998; Ghaem Maralani, Tai et al. 2013). Comme décrit précédemment, le métabolisme des glucides et des lipides peut avoir des conséquences directes sur la structure et la fonction de la rétine. Ainsi, le tour de taille ou l'IMC seraient associés au développement de la DMLA précoce et tardive chez les femmes non fumeuses (Howard, Klein et al. 2014). Aussi, un modèle de souris obèse (ob/ob) développe des modifications néfastes au niveau de la rétine comme stress oxydant, inflammation, activation du complément et une augmentation des métabolites des AGPI, les lyso-phosphatidylcholine, responsable de l'activation des macrophages et de la phagocytose (Natoli, Fernando et al. 2018). Toutefois, Klein dans une étude regroupant trois cohortes, appelées BDES, BMES et étude Rotterdam, n'obtient pas d'association entre le cholestérol total dans le sérum et l'incidence de la DMLA (Klein, Myers et al. 2014), alors qu'une étude sur un modèle de lapin nourris avec du cholestérol développe des altérations de la rétine mimant celles retrouvées dans la DMLA. (Dasari, Prasanthi et al. 2011). L'association entre l'hyperlipidémie et la DMLA précoce a également été démontrée dans une étude rétrospective contenant plus de 10000 Coréens (Moon, Joe et al. 2012).

Les mécanismes reliant SMet et DMLA ne sont pas encore établis. Néanmoins, une molécule permet de faire le lien entre ces deux pathologies, il semblerait que les 2 pathologies

présentent des niveaux élevés de norépinephrine (Fitzgerald 2013). La norépinephrine régule la voie intracellulaire MAPK qui joue un rôle dans l'autophagie, l'inflammation, angiogenèse et l'apoptose des cellules de l'EPR (Luo, Gu et al. 2018).

IV. La prévention

Le lien entre alimentation et fonction, de la rétine existe. La dyslipidémie, l'hyperglycémie, l'hypertension, le syndrome métabolique ou encore l'obésité, affectent la fonction de l'endothélium, conduisant à des dommages vasculaires. Une alimentation équilibrée qui se traduit par un apport et une dépense énergétique équivalente, est importante pour limiter les facteurs de risque et leurs conséquences sur la rétine.

A. Prévention par l'alimentation

1. Les nutriments dans la rétinopathie diabétique

Les signes cliniques de la RD sont décelables par imagerie du fond d'œil. La RD est asymptomatique dans ses premiers stades, et n'entraîne pas de dysfonction visuelle perceptible jusqu'à ce que la pathologie soit déclarée. Aussi, un examen du fond d'œil doit être réalisé annuellement chez tous les patients diabétiques afin de vérifier l'état de la rétine. Ainsi, le premier facteur de risque de développer une RD étant l'hyperglycémie, le premier moyen de prévenir son développement est de contrôler la glycémie à un niveau normal. En effet, les bénéfices de ce contrôle glycémique sur la progression de la RD ont été bien établis dans des études cliniques randomisées. L'étude sur le contrôle du diabète et de ses complications (DCCT, *Diabetes Control and Complications Trial*) a montré après des traitements intenses d'insuline de patients diabétiques de type 1, une diminution de 54% du risque de progression vers une RD (Group 1994; Cundiff and Nigg 2005). L'étude prospective sur la RD au Royaume-Uni (UKPDS, *United Kingdom Prospective Diabetic Retinopathy Study*) a démontré chez les patients diabétiques de type 2, une diminution de 25% des RD chez les patients recevant une thérapie intensive d'insuline par rapport à ceux soumis une thérapie classique. De plus, il a été montré que les patients présentant une faible pression artérielle diminuaient de 34% la progression de la RD. Alors que les facteurs de risque de la RD sont bien établis, la pathophysiologie de sa progression reste confuse. Plusieurs études ont néanmoins attesté que les Afro-américains avaient une plus grande incidence de RD. Si la raison de cette relation est inconnue, il est possible que la couleur noire de la peau soit liée à de plus faibles taux de vitamine D. Or, la vitamine D détient un important rôle dans le

développement de la RD. En effet, la vitamine D est impliquée dans le diabète de type 1 et de type 2, bien que leurs origines soient totalement différentes.

Plusieurs études chez le rat et l'Homme ont montré que de faibles taux plasmatiques de 25-hydroxy vitamine D (25(OH)D) induisaient une diminution de sécrétion d'insuline (Norman, Frankel et al. 1980; Boucher, Mannan et al. 1995), et que le 1,25(OH)₂D₃ améliorait la fonction des cellules β du pancréas et donc l'intolérance au glucose (Kumar, Davies et al. 1994; Luong, Nguyen et al. 2005). De plus, la vitamine D jouerait un rôle dans la pathogenèse de la RD en diminuant la production de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-2, l'IL6, l'IL-8, l'IL-12 et le TNF- α (Lemire 1995). Des études cliniques récentes ont également mis en exergue le lien entre déficience en vitamine D et développement des RD (Luo, Gao et al. 2017; Zhang, Upala et al. 2017). La vitamine D peut également contribuer au développement de la RD via des mécanismes d'angiogenèse. En effet, le calcitriol, un métabolite de la vitamine D, inhiberait la néovascularisation rétinienne *in vivo* (Albert, Scheef et al. 2007).

Malgré le fait que les preuves qui lient la prise alimentaire avec la RD soient de plus en plus fréquentes, les liens restent néanmoins à éclaircir. Une récente méta-analyse a permis de montrer que l'alimentation riche en fibres, en huile de poisson et une prise alimentaire faiblement calorique, caractéristiques du régime dit Méditerranéen (Diaz-Lopez, Babio et al. 2015), sont associés à de plus faibles risques de RD. L'alimentation trop calorique est alors associée à un risque élevé de développer une RD (Wong, Man et al. 2018). En effet, l'ingestion d'une alimentation riche en fibres provenant des fruits et des légumes tendrait à diminuer le risque de développer une RD chez les diabétiques de type 2 (Tanaka, Yoshimura et al. 2013). L'huile de poisson, source importante de vitamine D et d'AGPI-LC ω 3 serait modulatrice de la réponse immunitaire et posséderait des propriétés anti-angiogéniques qui pourraient jouer un rôle dans l'inhibition de la RD (Mora, Iwata et al. 2008; Das 2013; Ma, Shen et al. 2014). Toutefois, Millen et ses collaborateurs n'ont pas associé l'effet bénéfique de l'huile de poisson sur la RD à leur contenu en AGPI-LC ω 3, mais plutôt à leur contenu en vitamine D (Millen, Sahli et al. 2016). L'alimentation hypercalorique augmente ainsi l'incidence de la RD mais également sa progression (Cundiff and Nigg 2005; Roy and Janal 2010). Cette donnée est en accord avec les preuves cliniques démontrant que l'alimentation hypercalorique augmente le stress oxydatif et les déséquilibres métaboliques chez les personnes diabétiques, et pourrait donc augmenter le risque de développer une DR dans les rétines sensibles au stress (Weindruch, Keenan et al. 2001; Skrha, Kunesova et al. 2005). Néanmoins, concernant l'effet des antioxydants sur la RD, les études n'ont pas permis

d'établir un consensus clair sur les effets des vitamines C et E et des caroténoïdes (Lee, Gayton et al. 2010).

2. Les nutriments dans la Dégénérescence Maculaire liée à l'Age

De nombreuses stratégies ont été élaborées pour réduire le risque de développer une DMLA. Les nutriments de l'alimentation sont associés depuis de nombreuses années au développement de la DMLA (Tableau 7). En effet, la première donnée rapportant un effet bénéfique de l'apport d'un nutriment sur la DMLA a été publiée en 1988 par la NHANES, en recherchant les liens entre la prise alimentaire de vitamine A et la DMLA (Goldberg, Flowerdew et al. 1988).

Les Caroténoïdes (carotène et xanthophylles) sont des pigments retrouvés dans les chloroplastes des plantes et des algues. Leur fonction est d'absorber la lumière bleue pour protéger des dommages créés par les photons. Dans l'œil, la lutéine et la zéaxanthine sont des xanthophylles qui protègent la macula des dommages induits par les ultraviolets et la lumière bleue. Tous les caroténoïdes ont une fonction anti-oxydante dans la rétine.

Les minéraux, malgré le besoin en faible quantité, ont une importance primordiale dans la fonction de la rétine. Le zinc, toutefois, est en grande quantité dans la rétine (Ugarte and Osborne 2001). En effet, il possède des fonctions anti-oxydantes et agit comme cofacteur pour la rétinol déshydrogénase, une enzyme essentielle pour le cycle visuel de la vitamine A. Deux études observationnelles ont montré une relation inverse entre la prise alimentaire ou la supplémentation en zinc et l'apparition d'anomalies pigmentaires après 10 ans (VandenLangenberg, Mares-Perlman et al. 1998; Morris, Jacques et al. 2007). Le zinc peut également interagir avec la cascade du complément pour diminuer son activation (Ho, van Leeuwen et al. 2011).

Les vitamines A, C, D et E apparaissent également essentielles. Si la vitamine A, dans ses formes appelée rétinol ou rétinal qui interviennent dans le cycle des rétinoïdes est retrouvée dans la rétine (Yudkin 1931), pour participer à la transduction visuelle, les données associant la supplémentation en vitamine A et le risque de développer une DMLA ne sont pas claires. Une méta-analyse n'a pas trouvé d'association entre la prise alimentaire de vitamine A et l'incidence de la DMLA précoce (Chong, Wong et al. 2007), alors que la prise de vitamine A est associée à une diminution des anomalies pigmentaires (Morris, Jacques et al. 2007). La vitamine C est une vitamine essentielle à la vie, un puissant anti-oxydant, apporté uniquement par l'alimentation. Elle pourrait jouer un rôle dans la pathogenèse de la DMLA par sa

fonction anti-oxydante en diminuant les altérations créées par les radicaux libres oxygénés. Néanmoins, aucune donnée ne permet d'associer la prise de vitamine C avec l'incidence de la DMLA (Christen, Glynn et al. 2012). La vitamine D possède des propriétés anti-inflammatoires et anti-angiogéniques (Parekh, Chappell et al. 2007). La vitamine D provient, pour 10%, de notre alimentation et le reste est apporté par la synthèse endogène dans la peau. Il existe peu d'études révélant les associations avec la DMLA. Une association inverse entre les taux plasmatiques de 25-hydroxyvitamine D3 et l'incidence de la DMLA précoce a été révélée, alors que les résultats pour la supplémentation en vitamine D ne sont pas concluants (Parekh, Chappell et al. 2007; Millen, Volland et al. 2011). Enfin la vitamine E (ou tocophérols et tocotriénols) est une vitamine anti-oxydante qui protège la rétine des dommages causés par les radicaux libres. L'étude sur les Pathologies Oculaires Liées à l'Age (POLA) n'a pas trouvé d'association entre les taux plasmatiques d' α -tocophérols et la DMLA avancée ($P = 0.08$). En revanche, quand les taux plasmatiques d' α -tocophérols sont standardisés par rapport aux taux lipidiques plasmatiques (cholestérol et triglycérides), le ratio est négativement associé avec la DMLA avancée, ainsi qu'avec des signes de la DMLA précoce comme les drusens ou des changements pigmentaires (Delcourt, Cristol et al. 1999). En revanche, les supplémentations en α -tocophérols ne sont pas associés à une diminution de l'incidence de la DMLA (Evans and Lawrenson 2017).

Alors que l'étude initiale AREDS proposait des hautes doses de β -carotène, du zinc, des vitamines C et E pour retarder la progression de la DMLA des stades intermédiaires à avancés (Age-Related Eye Disease Study Research 2001), elle n'évaluait pas l'intérêt des AGPI oméga 3 dans la DMLA. Néanmoins, dans le rapport n°30 de l'étude prospective AREDS, les patients ayant eu la plus forte consommation d'AGPI-LC de type oméga 3 ont bénéficié d'une réduction de 30% du risque de développer une atrophie géographique ($OR=0,65$) ou une DMLA non vasculaire ($OR=0,68$), par rapport aux patients avec une plus faible consommation d'AGPI-LC de type oméga 3 (Sangiovanni, Agron et al. 2009), ce qui a par la suite été confirmé pour l'atrophie géographique dans une autre étude (Reynolds, Rosner et al. 2013).

La supplémentation AGPI oméga 3, la lutéine et la zéaxanthine ont été évalués dans l'étude AREDS-2 et les recommandations ont remplacé les β -carotène par la lutéine et la zéaxanthine (Age-Related Eye Disease Study 2 Research 2013). Un élément étonnant de l'étude AREDS-2 est l'absence d'efficacité observé pour les AGPI-LC oméga 3. Toutefois, bien que pertinente, AREDS-2 ne présentait pas de réel groupe contrôle puisque les personnes ayant

participé à AREDS-2 avaient déjà été supplémenté lors de la première étude d'AREDS et présentaient déjà une réduction du risque de 25 à 30%. L'ajout d'oméga 3 dans la formule n'a pas permis de diminuer le risque au-delà de la réduction déjà obtenue. Cette étude ne signifie pas que les AGPI-LC oméga 3 n'ont pas d'effets, elle ne permet pas de conclure sur l'efficacité des résultats, et permet au mieux d'indiquer que la prévention secondaire présente un seuil à partir duquel on ne peut plus réduire davantage les risques. Une autre étude interventionnelle, NAT-2, a montré que le risque de développer une DMLA exsudative était plus faible sur 3 ans, chez les patients ayant atteint les niveaux les plus élevés en oméga 3 dans les érythrocytes, après une supplémentation en DHA de 840 mg par jour et en EPA de 270 mg par jour (Souied, Delcourt et al. 2013).

De plus, de nombreuses études observationnelles menées chez l'Homme ont rapporté que la consommation de poisson et de nourriture riche en AGPI-LC de type oméga 3 permettrait de réduire le risque de développer une DMLA (Seddon, Rosner et al. 2001; Seddon, George et al. 2006; Chong, Kreis et al. 2008; Zerbib, Delcourt et al. 2014).

Compte tenu des facteurs de risque impliqués dans la DMLA, l'arrêt du tabac, le maintien d'un poids normal, l'augmentation de la prise alimentaire d'anti-oxydants et la diminution de la prise alimentaire riches en cholestérol ont été proposés comme modifications du mode de vie pouvant diminuer l'incidence de la DMLA.

Nutriment	DMLA précoce	DMLA tardive
Astaxanthine	ND	ND
β-Carotène	~	~
Lutéine/zéaxanthine	↘↘	↘↘
Vitamine A	~	~
Vitamine C	~	↘?
Vitamine D	↘?	↘?
Vitamine E	~	~
Zinc	↘?	↘↘

Tableau 7 : Nutriments et risque de Dégénérescence maculaire liée à l'âge

ND : Résultats non disponible. ↘↘ : Diminution. ↘? : Possible diminution. ~ : Controverse.

Adapté de Buitendijk et Claver, 2014.

Enfin, une notion émergente porte sur l'implication du microbiote intestinal sur la santé de la rétine (Oresic, Seppanen-Laakso et al. 2009). En effet, des souris soumises à un régime riche en carbohydrates développent des signes ressemblant à une DMLA atrophique, associés à des modifications du microbiote intestinal, qui modifient leur production de métabolites protecteurs de la DMLA comme la sérotonine. Le transfert de ces animaux à un régime à faible index glycémique, même tard après le développement de ces altérations rétiniennes, bloque le développement de la DMLA (Rowan, Jiang et al. 2017).

B. Lipides - Acides gras polyinsaturés

1. Définition

Les lipides représentent 34% de la prise alimentaire des Français (INCA3 2017). Dans l'alimentation, ces lipides sont principalement retrouvés sous forme de triglycérides (TG, 90-95%), mais peuvent également être sous forme de phospholipides (PL). La structure des triglycérides correspond à une structure de glycérol à laquelle se fixent 3 acides gras (AG), la structure des phospholipides correspond au même squelette excepté que l'AG en position 3 du glycérol est remplacé par une fonction alcool phosphorylée. Généralement, les triglycérides sont considérés comme la forme de stockage des lipides, tandis que les phospholipides sont considérés comme la forme mobilisable et active des acides gras.

Les AG peuvent appartenir à trois différentes familles, selon leur nombre de doubles liaisons. Il existe les acides gras saturés (AGS), qui ne disposent pas de double liaison, les AG monoinsaturés, disposant d'une seule double liaison (AGMI) et les AG polyinsaturés (AGPI), qui contiennent au moins 2 doubles liaisons. Les AG ont des fonctions variées, ils sont une source d'énergie pour les tissus, composent les membranes phospholipidiques, jouent un rôle structural, et peuvent également être mobilisés par les cellules comme précurseurs des médiateurs lipidiques impliqués dans de nombreux processus physiologiques, tels que l'inflammation et la neuroprotection (Laye, Nadjar et al. 2018). C'est notamment le cas pour les AGPI. Ces AGPI sont considérés comme indispensables pour le maintien d'une physiologie normale, et doivent être apportés par l'alimentation. Il existe 2 familles ou séries principales d'AGPI : la famille des oméga 3 (ω 3 ou n-3) et la famille des oméga 6 (ω 6 ou n-6). L'acide linoléique (18:2 n-6 ; LA) et l'acide α -linolénique (18:3 n-3 ; ALA) sont respectivement les précurseurs de ces deux séries. Ils sont appelés acides gras indispensables car ils ne peuvent pas être synthétisés par les mammifères et doivent donc être apportés par l'alimentation. Cependant, une fois absorbés, ils peuvent être métabolisés *in vivo* par des

étapes l'élongation, de désaturation, de β -oxydation, pour former des acides gras contenant plus d'insaturations ou plus d'atomes de carbone dont certains sont essentiels, comme l'acide arachidonique (AA, 20:4 n-6), l'acide eicosapentaénoïque (EPA, 20:5 n-3) ou l'acide docosahexaénoïque (DHA, 22:6 n-3), qui sont des AGPI à longue chaîne (AGPI-LC), possédant un nombre de carbone supérieur à 18. (Figure 22).

Ainsi, l'acide linoléique est retrouvé dans l'huile de pépins de raisin, l'huile de tournesol ou encore l'huile de soja et de maïs, alors que l'AA est principalement présent dans les graisses animales.

L'ALA se trouve dans les plantes vertes, les noix, l'huile de lin, l'huile de colza, tandis que les huiles de poissons apportent directement des AGPI contenant plus d'insaturations et de carbones comme l'EPA et le DHA.

a) Synthèse des AGPI-LC

Au niveau du foie, les principaux métabolites créés à partir de LA sont l'AA et l'acide docosapenténoïque (22:5 ω -6 ; DPA ω -6) pour la série des oméga 6, et l'EPA et le DHA à partir de l'ALA pour la série des oméga 3. Aussi, pour y parvenir, les précurseurs doivent subir une série d'élongations, de désaturations dans le réticulum endoplasmique et de β -oxydation au niveau du peroxysome.

Ces deux familles partagent le même équipement enzymatique pour la biosynthèse des AGPI-LC, induisant des phénomènes de compétitions pour la synthèse des métabolites terminaux (Simopoulos 2011).

Les niveaux de conversion de l'ALA en EPA et DHA sont très faibles : environ 8% pour la conversion en EPA, et seulement 1% pour la conversion en DHA (Demar, Ma et al. 2005; Igarashi, DeMar et al. 2007).

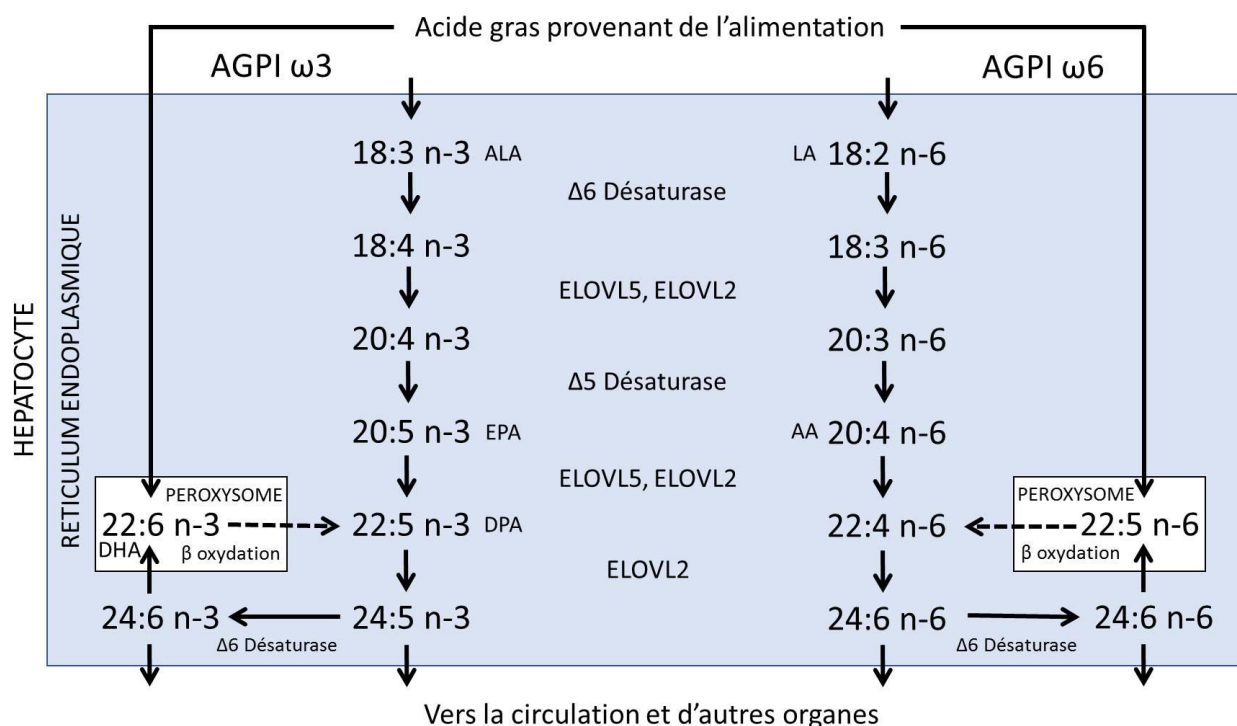


Figure 22 : Elongation et désaturation des acides gras polyinsaturés à longue chaîne de type oméga 3 et oméga 6

ALA : acide alpha linolénique. EPA : acide eicosapentaénoïque. DPA : acide docosapentaénoïque. DHA : acide docosahexaénoïque. LA : acide linoléique. AA : acide arachidonique.

Dans les tissus, l'AA et le DHA sont estérifiés en position sn-2 des phospholipides composant les membranes des cellules. Les cellules des tissus nerveux contiennent principalement des phosphatidylcholines (PC), des phosphatidyléthanolamines (PE), des phosphatidylsérines (PS), des phosphatidylinositides (PI) et des plasmalogènes (Pls). En cas de déficience, en oméga 3, l'expression des désaturases et des élongases est augmentée dans le foie pour compenser et apporter le DHA nécessaire au système nerveux (Igarashi, DeMar et al. 2007).

b) Voies de signalisations-médiateurs lipidiques

Dans les membranes, les AGPI sont libérés grâce à l'intervention de la phospholipase A2 (PLA2). Les AGPI, une fois libérés sont métabolisés en régulateurs spécifiques de l'inflammation, comme les eicosanoïdes, les résolvines, les endocannabinoïdes (Buckley, Gilroy et al. 2013; Serhan 2014; Di Marzo, Stella et al. 2015; Witkamp 2016). L'EPA, malgré son faible taux dans les tissus nerveux du fait de sa rapide β -oxydation (Chen and Bazinet 2015), possède un important rôle fonctionnel. La plupart des actions pro- ou anti-

inflammatoires des AGPI sont attribuées aux médiateurs lipidiques synthétisés par oxygénation, hydroxylation et peroxydation de l'AA, du DHA et de l'EPA, appelé les eicosanoïdes (de Roos, Mavrommatis et al. 2009; Arita 2012) ou autres dérivés comme les résolvines ou marésines (Chiurchiu, Leuti et al. 2016; Xian, Wu et al. 2016; Serhan 2017). Ainsi, les enzymes cyclo-oxygénases (COX) vont permettre la production des prostaglandines (PG), des prostacyclines (PGI), des thromboxanes (TX) et des résolvines (Rv) à partir des AGPI libres. La voie des lipoxygénases (LOX), va permettre la production des leucotriènes (LT), des Rv et des protectines (Phillis, Horrocks et al. 2006).

De manière générale, les dérivés de l'AA présentent des propriétés pro-inflammatoires tandis que les dérivés du DHA et de l'EPA présentent des propriétés anti-inflammatoires. L'EPA et l'AA peuvent être utilisés comme substrats aux mêmes enzymes permettant des phénomènes de compétitions, afin de limiter l'effet du métabolisme de la série opposée (Schmitz and Ecker 2008).

Les médiateurs dérivés de l'AA incluent la série 2 des PG, la série 4 des LT, la série 2 des TX et en acides gras hydroperoxydés puis peroxydés (5-HETE, 15-HETE).

Les principaux médiateurs dérivés de l'EPA incluent la série 3 des PG, la série 5 des LT, la série 3 des TX. De plus, les résolvines de la série E sont dérivées de l'EPA, alors que les résolvines de la série D, la neuroprotectine D1 (NPD1), et les marésines sont produites à partir du DHA (Bannenberg and Serhan 2010) (Figure 23). De plus, très récemment, un nouveau médiateur lipidique a été identifié, les élovanoïdes, provenant des AGPI à très longue chaîne (AGPI-VLC, nombre de carbones > 22), retrouvés pour le moment particulièrement dans la rétine. Les élovanoïdes auraient un rôle protecteur pour les photorécepteurs de la rétine (Jun, Mukherjee et al. 2017).

Les récepteurs aux eicosanoïdes sont présents dans de nombreux types cellulaires, incluant les muscles lisses, la muqueuse gastrique, le tissu adipeux, le système nerveux central, les cellules du système immunitaire. Les eicosanoïdes synthétisés à partir de l'EPA et ceux synthétisés à partir de l'AA partagent les mêmes récepteurs, et agissent donc en compétition. Cependant, les eicosanoïdes provenant de l'EPA sont biologiquement moins actifs que ceux provenant de l'AA (Calder 2002). Par exemple, le PGE3 est moins efficace que le PGE2 pour induire la production d'IL-6 dans les macrophages (Bagga, Wang et al. 2003). Ainsi, les eicosanoïdes provenant de l'EPA, sont antagonistes de ceux synthétisés à partir de l'AA. De plus, l'EPA possède la propriété d'inhiber la production d'eicosanoïdes à partir de l'AA, par

compétition envers les enzymes impliquées (Calder 2002). En effet, l'EPA a la capacité d'inhiber l'activité de la $\Delta 5$ -désaturase, qui convertit le 20:3 n-6 en AA. Il peut également inhiber l'activité de la PLA2 permettant la libération de l'AA, la libération des PG produites par la COX-2, la libération des TX (Obata, Nagakura et al. 1999), et la libération des LT générés par la 5-LOX (Sperling, Benincaso et al. 1993). Ainsi, l'EPA réduit à la fois la production d'AA mais aussi la production d'eicosanoïdes pro-inflammatoires dérivés de l'AA.

Les docosanoïdes (résolvines, NPD1 et marésines) synthétisés à partir de l'EPA et du DHA possèdent des propriétés anti-inflammatoires. Ils stimulent l'élimination des cellules apoptotiques et des débris inflammatoires par les macrophages et inhibent l'expression des cytokines pro-inflammatoires et bloquent l'infiltration des polynucléaires neutrophiles (Zhang and Spite 2012). La NPD1, produite par la LOX 15 dans l'EPR est à l'origine d'un important intérêt car elle présente d'importantes fonctions protectrices vis-à-vis d'un certain nombre de maladies neurodégénératives en étant impliquée dans les mécanismes ou zones altérées (Bazan, Calandria et al. 2010).

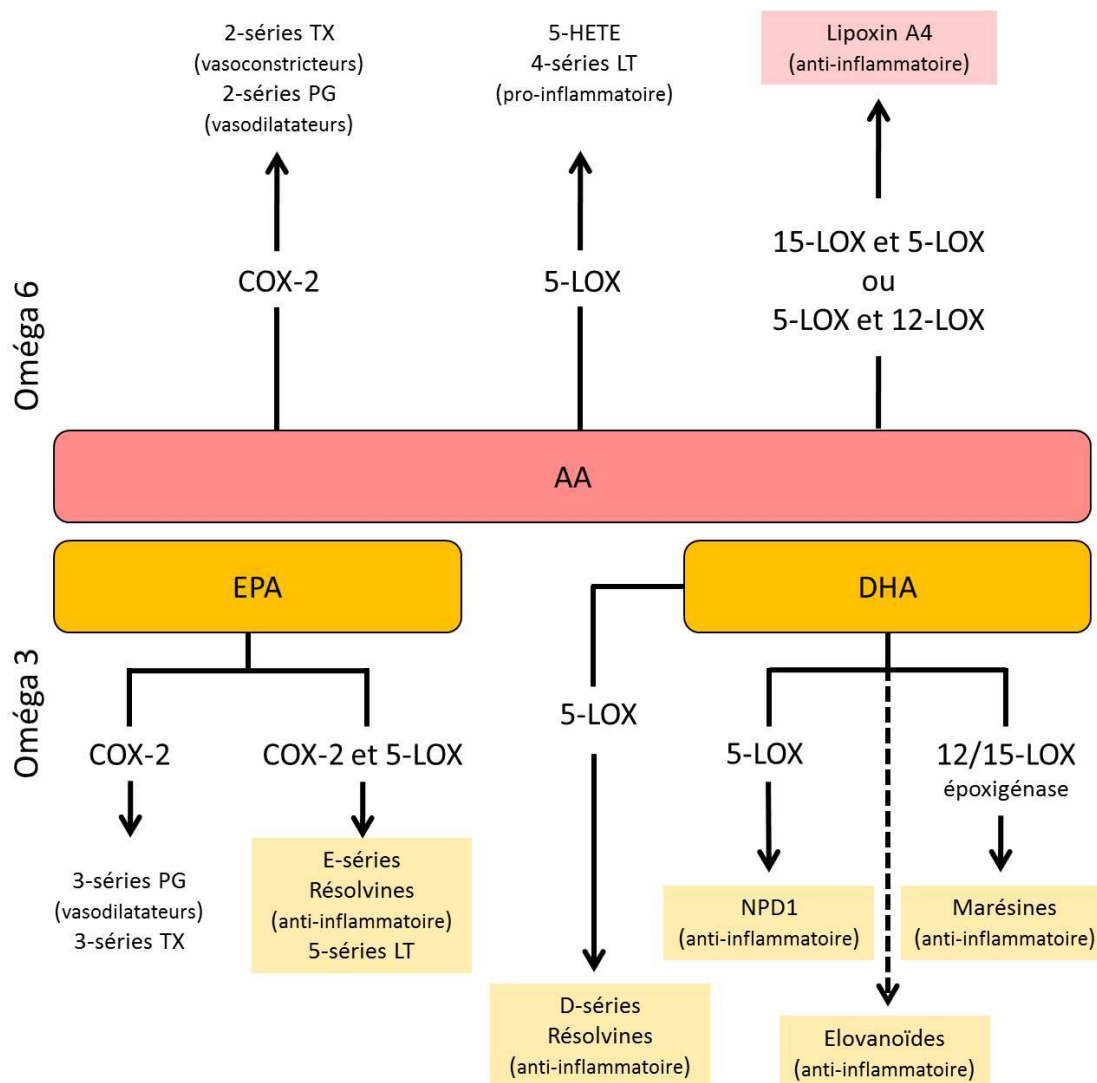


Figure 23 : Mécanismes de biosynthèse des eicosanoïdes et docosanoïdes

AA : acide arachidonique. EPA : acide eicosapentaénoïque. DHA : acide docosahexaénoïque. COX : cyclo-oxygénase. LOX : lipoxygénase. PG : prostaglandine. TX : thromboxane. LT : leucotriène. HETE : 5-hydroxyeicosatétraénoïque. NPD1 : neuroprotectine D1. Adapté de De Roos, 2009.

c) Intérêt des oméga 3 dans le SMet

Le SMet regroupe différents symptômes comme l'obésité, qui atteint plus d'1,5 billion d'adulte d'après l'OMS, mais également l'hypertension, la résistance à l'insuline et la dyslipidémie (Kahn 2008). L'inflammation à bas niveau apparaît alors comme base commune à ces désordres métaboliques (Das 2001). Dans ce contexte, il a souvent été proposé que l'augmentation de la consommation en AGPI-LC oméga 3, en ALA, EPA et DHA pourrait réduire le risque de pathologies cardiovasculaires en améliorant les caractéristiques du SMet

(Abete, Goyenechea et al. 2011). Toutefois, la plupart des effets attribués aux AGPI oméga 3, sont en réalité souvent attribués à l'EPA et au DHA, plutôt qu'à l'ALA.

La première étude à ce sujet, suggérait un rôle protecteur de la consommation de poissons gras dans les populations Inuites du Groenland, envers les pathologies cardiovasculaires (Bang, Dyerberg et al. 1976). A la suite de cette étude, de nombreuses études sont apparues pour étudier le potentiel effet des AGPI-LC oméga 3 dans les désordres métaboliques.

Ainsi, plusieurs études ont exploré les effets de la consommation d'AGPI-LC oméga 3 sur le poids et la masse grasse chez l'homme. Concernant les études prospectives, les conclusions ne sont pas claires. L'étude de Micallef et ses collaborateurs montrent une relation inverse entre les concentrations plasmatiques d'AGPI-LC oméga 3 et l'IMC, le tour de taille ou de hanche (Micallef, Munro et al. 2009). Néanmoins, une autre étude associe la consommation d'importantes quantités de poissons gras et d'AGPI-LC oméga 3 à une plus grande prévalence d'obésité (Iso, Rexrode et al. 2001). De même, les études cliniques randomisées présentent des résultats contradictoires quant à l'effet positif des AGPI-LC oméga 3 sur l'obésité. Couet, dans son étude, évalue la consommation de 6 g d'huile de poisson à la place de 6g lipides saturés, chez des adultes sains. Leur poids ne fut cependant pas affecté (Couet, Delarue et al. 1997). En revanche, les études de restriction calorique avec supplémentation en AGPI-LC ω 3 mettent en exergue un plus grand rassasiement en présence des AGPI-LC oméga 3 ainsi qu'une plus grande perte de poids par rapport aux patients en restriction calorique uniquement (Thorsdottir, Tomasson et al. 2007; Parra, Ramel et al. 2008), mais ces résultats ne sont pas répliqués dans toutes les études (Krebs, Browning et al. 2006). De plus, la perte de poids est également plus importante lorsque cette fois-ci, l'activité physique est associée à la prise d'AGPI-LC oméga 3 (Warner, Ullrich et al. 1989; Hill, Buckley et al. 2007). Cependant, certaines études n'obtiennent pas de perte de poids supplémentaire grâce à l'addition d'AGPI-LC oméga 3 lors d'un régime alimentaire pauvre en calories et des exercices physiques (DeFina, Marcoux et al. 2011; Munro and Garg 2012). Ainsi, les conclusions ne sont pas nettes concernant l'effet des AGPI-LC oméga 3 sur l'obésité, probablement due à la variabilité des caractéristiques phénotypiques des sujets inclus dans ces études.

La régulation de la sensibilité à l'insuline et plus généralement du diabète de type 2 apparaît également comme cible potentielle des AGPI-LC oméga 3. Ainsi, Mori et ses collaborateurs montrent un effet bénéfique de la consommation d'huile de poisson sur la sensibilité à l'insuline chez des femmes obèses (Mori, Bao et al. 1999). De même, une augmentation de la

sensibilité à l'insuline est survenue suite à 8 semaines de supplémentation en AGPI-LC oméga 3, associée à une diminution de la protéine C réactive et de l'IL-6 plasmatique (Tsitouras, Gucciardo et al. 2008). Ainsi, Feskens et ses collaborateurs proposent que la prise alimentaire d'huile de poisson retarde le développement de l'intolérance au glucose (Feskens, Bowles et al. 1991). D'autre part, chez les patients diabétiques de type 2, la supplémentation en AGPI-LC oméga 3 (3g d'EPA et de DHA), améliore la sensibilité à l'insuline (Popp-Snijders, Schouten et al. 1987). En revanche, certaines études ne partagent pas les mêmes résultats. Rivellese et ses collaborateurs ne trouvent pas d'amélioration de la sensibilité à l'insuline chez les patients diabétiques de type 2 supplémentés avec des doses équivalentes d'AGPI-LC oméga 3 à Popp-Snijders (Rivellese, Maffettone et al. 1996). Ces études sont renforcées par d'autres études qui ne montrent pas d'effet des AGPI-LC oméga 3 sur la sensibilité à l'insuline de femmes obèses et diabétiques de type 2 (Griffin, Sanders et al. 2006; Kabir, Skurnik et al. 2007).

En ce qui concerne le contrôle de la dyslipidémie, plusieurs études suggèrent une diminution de la concentration des TG et des VLDL plasmatiques induite par la supplémentation en huile de poisson (Nestel, Shige et al. 2002; Lopez-Alvarenga, Ebbesson et al. 2010). De plus, des études ont rapporté des augmentations en HDL-C après la supplémentation en AGPI-LC oméga 3 (1,4-4 g/jour), contribuant à la diminution du risque d'athérosclérose (Mori, Bao et al. 1999; Kabir, Skurnik et al. 2007; Micallef and Garg 2008). Une méta-analyse réalisée par Harris et ses collaborateurs indique que la supplémentation avec de l'huile de poisson (inférieure à 7 g/jour), pendant 7 à 10 semaines, diminue la concentration plasmatique de TG de 25% chez les sujets normolipémiques, et de 34% chez les sujets hyperlipémiques, par rapport à des sujets sous placebo (Harris 1997). Une autre méta-analyse a montré que la supplémentation avec 1,8 g/jour d'EPA et 1,2 g/jour de DHA est capable de diminuer la concentration des TG plasmatiques chez des sujets sains, mais également chez les sujets diabétiques, hypertendus, et présentant une dyslipidémie (Friedberg, Janssen et al. 1998). En revanche, d'autres études ne démontrent pas d'effet de la supplémentation en huile de poisson sur les concentrations d'HDL-C ou de cholestérol total (Kelley, Siegel et al. 2007; Hartweg, Perera et al. 2008).

Finalement, l'ensemble de la littérature publiée suggère que la supplémentation en AGPI-LC oméga 3 pourrait avoir des effets préventifs sur la prise de poids en modulant l'oxydation des lipides et la satiété, bien que des résultats conflictuels aient été obtenus sur la perte de poids. La comparaison entre les études est effectivement difficile à réaliser compte tenu de la

construction des différentes études, des critères d'inclusions des sujets et des différentes sources utilisées pour la supplémentation en AGPI-LC oméga 3. D'autre part, la supplémentation en AGPI-LC oméga 3 apparaît comme une stratégie intéressante dans le contrôle de la dyslipidémie. Cependant, les effets de ces AGPI-LC oméga 3 sur la sensibilité à l'insuline restent assez controversés.

2. AGPI LC et rétine

Un tiers du poids sec de la rétine est constituée de lipides.

a) Distribution et fonction dans la rétine

La rétine neurosensorielle humaine se compose très majoritairement de PL (87.3% des lipides totaux), de cholestérol libre (11%) et d'une faible proportion d'esters de cholestérol (EC, 1,7%). L'EPR et la choroïde sont composés de 58,3% de PL, 4% de TG, 19% d'EC, 14,6% de cholestérol libre, et 4.3% d'acides gras libres. Le DHA (C22:6 n-3), l'acide stéarique (C18:0) et l'acide palmitique (C16:0) sont les AG les plus répandus dans la rétine (Fliesler and Anderson 1983; Bretillon, Thuret et al. 2008). Aussi, la rétine contient environ 40% d'AGS, 21% d'AGMI et 35% d'AGPI (Bretillon, Thuret et al. 2008). En comparaison, le cerveau de rongeur contient 36-46 % d'AGS, 18-33% d'AGMI et 18-28% d'AGPI (Joffre, Gregoire et al. 2016). Les PL de la rétine sont estérifiés au niveau de la position sn-1 ou sn-2 du glycérol, et sont pour 47% d'entre eux sous la forme de phosphatidylcholine (PC), 31% sous la forme de phosphatidyléthanolamine (PE), 5-10% sous la forme de phosphatidylsérine (PS) et 3-6% sous la forme de phosphatidylinositide (PI).

Le DHA représente 15-20% des AG totaux de la rétine et constitue 60% des AG contenus dans les segments externes des photorécepteurs, formés par des disques (Fliesler and Anderson 1983; Gordon and Bazan 1990).

Il est représenté sur les phosphatidylcholine (PC) (20%), sur les phosphatidyléthanolamine (PE) et les phosphatidylsérine (PS) (30%) (Anderson 1970). La rétine contient des phospholipides particuliers appelés les plasmalogènes (PLs), qui ont un alcool gras au lieu d'un acide gras en position sn-1 du glycérol, lié par une liaison vinyl-ether. L'estérification des AGPI-LC en position sn-2 chez les PLs, leur confère un rôle de réservoir d'AGPI-LC dans la rétine (Ford and Gross 1989).

Le DHA détient un rôle essentiel dans la rétine qui a été profondément étudié par le groupe de Litman et Mitchel (Litman and Mitchell 1996; Litman, Niu et al. 2001; Mitchell, Niu et al.

2001; Niu, Mitchell et al. 2001; Mitchell, Niu et al. 2003) et décrit exhaustivement dans la revue de SanGiovanni (SanGiovanni and Chew 2005). Ces auteurs ont démontré que la quantité de DHA dans les membranes constituant les segments externes des PR, pouvait influencer la phototransduction en affectant les changements de conformation de la rhodopsine lors de l'absorption de la lumière. Ils ont particulièrement montré que l'activation de la rhodopsie en réponse à la lumière était facilitée avec l'augmentation des insaturations des AG dans les membranes des PL. La présence de DHA dans la rétine des mammifères semble être extrêmement constante entre les espèces et des mécanismes locaux et systémiques afin de conserver ce DHA rend le profil en AG de la rétine peu susceptible à des modifications induites par les changements alimentaires. En effet, alors que des régimes déficients en oméga 3 induisent des déplétions en AGPI dans certains organes, la rétine est peu affectée par cette diminution (Neuringer, Connor et al. 1984; Pawlosky, Denkins et al. 1997; Weisinger, Vingrys et al. 1999; Niu, Mitchell et al. 2001). Dans les cas de déplétion chronique en DHA, la diminution de DHA dans la rétine conduit à des déficits fonctionnels, évalués par ERG (Bourre, Francois et al. 1989; Weisinger, Vingrys et al. 1995), et à la diminution de l'acuité visuelle (Neuringer, Connor et al. 1986), due à des anomalies structurales de la rétine et notamment l'altération de la morphologie des disques des PR (Shindou, Koso et al. 2017).

De plus, le DHA présente un rôle métabolique en étant impliqué dans un certain nombre de mécanismes comme l'expression de génique, le stress oxydatif, l'inflammation, la signalisation cellulaire ou encore l'apoptose (SanGiovanni and Chew 2005).

En effet, la régulation de l'expression génique par les oméga-3 peut intervenir à différents niveaux. Le DHA peut intervenir au niveau de la transcription des gènes, en se liant à des ligands spécifiques (RXR ou PPAR par exemple) qui interagissent avec le promoteur du gène (Yu, Bayona et al. 1995; Lin, Ruuska et al. 1999; de Urquiza, Liu et al. 2000). Ils peuvent agir également au niveau post transcriptionnel en modifiant l'ARNm (Uauy, Hoffman et al. 2001).

Comme vu précédemment, le DHA joue un important rôle dans la régulation de l'inflammation (Calder 2001), via la production de médiateurs lipidiques actifs appelés eicosanoides donc la NPD1.

En effet, la NPD1 soutient la fonction neuronale, protège les synapses du cerveau (Bazan, Musto et al. 2011), et protège également la rétine via sa production par l'EPR (Lukiw, Cui et al. 2005; Bazan, Musto et al. 2011). La NPD1 est sécrétée depuis le DHA libre apporté par la

phagocytose des segments externes des PR par le RPE (Mukherjee, Marcheselli et al. 2004), via la LOX 15 (Calandria, Marcheselli et al. 2009). NPD1 est alors sécrété en réponse au stress oxydant induit dans un modèle d'ischémie-reperfusion cérébrale (Marcheselli, Hong et al. 2003). De plus, la NPD1 permettrait également de diminuer l'apoptose médiée par la lipofuscine induit par le stress oxydant et donc de restaurer l'EPR (Mukherjee, Marcheselli et al. 2007). La NPD1 présenterait aussi des effets anti-apoptotiques et anti-inflammatoires via la modulation de certains gènes induisant l'augmentation de la production de protéines protectrices comme Bcl-2, et la diminution de la production de protéines néfastes à la survie cellulaire (Bax, Bad, Bid, Bik) (Mukherjee, Marcheselli et al. 2004; Mukherjee, Marcheselli et al. 2007). Enfin, la NPD1 permettrait d'atténuer la néovascularisation choroïdienne (CNV) via l'activation des cellules microgliales, dans un modèle de CNV induite par laser (Sheets, Jun et al. 2013).

La rétine est donc riche en AGPI-LC (nombre de carbones entre 18 et 24), qui sont essentiels au maintien d'une rétine normale fonctionnelle. La rétine, comme le cerveau, le sperme et le thymus, contient également des AGPI à très longue chaîne (VLC, *very long chain*), dont le nombre de carbone est supérieur à 24. Au niveau de la rétine, ces AGPI-VLC sont synthétisés dans les PR au niveau du réticulum endoplasmique, par l'enzyme d'élongation des acides gras à très longue chaîne 4 (ELOVL4) (Figure 24). La fonction et la localisation des AGPI-VLC est peu connue, mais une mutation dans le gène ELOVL4 est trouvée chez les patients atteints de la maladie de Stargardt, une dystrophie maculaire (Agbaga, Mandal et al. 2010). Les AGPI-VLC, permettent également la synthèse de médiateurs lipidiques neuroprotecteurs récemment caractérisés : les élovanoïdes (Jun, Mukherjee et al. 2017).

b) Mécanisme d'entrée dans la rétine

La biodisponibilité des AGPI à court terme peut être mesurée dans le plasma et le sérum (Katan, Deslypere et al. 1997; Cao, Schwichtenberg et al. 2006), et reflète la prise alimentaire sur quelques jours. Le dosage plasmatique des AGPI permet de conclure sur le passage de la barrière intestinale, qui peut être influencé par différents facteurs comme la galénique ou la composition de l'alimentation. Toutefois, il ne reflète pas directement l'incorporation des AGPI dans les membranes des tissus cibles, où a lieu l'activité physiologique.

Le dosage en AGPI dans les érythrocytes semble un meilleur candidat que le plasma pour la mesure des AG circulants car il refléterait la disponibilité à plus long terme, compte tenu de leur durée de vie de 120 jours (Ebaugh, Emerson et al. 1953; Harris, Sands et al. 2004).

Effectivement, des études ont corrélé la quantité d'EPA et de DHA dans les membranes des érythrocytes avec la quantité d'AGPI $\omega 3$ dans certains tissus comme le cœur, le foie et les reins (Harris, Sands et al. 2004; Metcalf, James et al. 2007; Tu, Muhlhausler et al. 2013). Au niveau de la rétine, des corrélations sur des modèles en développement ont été réalisés (Carlson, Carver et al. 1986; Makrides, Neumann et al. 1994; Sarkadi-Nagy, Wijendran et al. 2004). Toutefois, ces modèles en développement sont caractérisés par leur importante intégration du DHA, et ne permettent donc pas d'extrapoler le taux du DHA dans la rétine adulte.

Une étude préliminaire réalisée dans notre équipe sur les érythrocytes a néanmoins identifié des potentiels biomarqueurs circulant du profil lipidique de la rétine. Ainsi, des analyses en chromatographie en phase liquide couplées à la spectrométrie de masse (LC-MS) ont permis une évaluation quantitative des différentes classes de PL. Les résultats obtenus dans cette étude permettent de faire des corrélations entre les concentrations de certaines classes de PE dans les érythrocytes et les PE contenant des AGPI-LC de la rétine (Acar, Berdeaux et al. 2012). Des études complémentaires sont nécessaires afin d'augmenter le nombre de sujets et améliorer le biomarqueur afin d'identifier le DHA.

De plus, la composition en AG du tissu adipeux reflète la composition de la prise alimentaire (London, Sacks et al. 1991; Leaf, Connor et al. 1995; Marckmann 1999). Ainsi, la comparaison du profil du tissu adipeux orbital avec le profil de la neurorétine et de l'EPR permet d'établir si la rétine est susceptible aux modifications de l'alimentation. Une étude réalisée dans notre équipe, a permis de mettre en évidence que la neurorétine était très peu susceptible de modifier son profil lipidique suite aux modifications de l'alimentation (Bretillon 2008). En effet, aucune corrélation n'a été établie entre les AG tissu adipeux et les AG contenus dans la neurorétine. En revanche, les AG trans présents dans le tissu adipeux (apportés par l'alimentation riche en AG trans), sont retrouvés au niveau de l'EPR associés au PL et aux esters de cholestérol (EC). De même, les concentrations d'acide linoléique dans le tissu adipeux et sur les esters de cholestérol de l'EPR sont très proches. Ces données permettent de suggérer que les EC contenant les AG trouvés dans l'EPR et la choroïde sont le reflet de la composition de la prise alimentaire. Or, les LDL sont pour 50%, formés d'EC (Teerlink, Scheffer et al. 2004), qui peuvent donc être considérés comme les transporteurs d'AGPI dans la rétine.

Ainsi, les LDL participent activement à l'apport des AGPI dans la rétine, à partir de la circulation sanguine (Gordiyenko, Campos et al. 2004; Tserentsoodol, Gordiyenko et al. 2006; Tserentsoodol, Sztejn et al. 2006), et particulièrement pour le DHA (Wang and Anderson 1993), après un remodelage actif dans l'EPR (Curcio, Presley et al. 2005; Li, Chung et al. 2005). La rétine, en contact étroit avec l'EPR, remodèle de manière majeure les lipides, participant à une absorption de certains AG, selon leur importance physiologique. Ainsi, depuis l'alimentation, via les LDL dans la circulation sanguine, les AG contenus dans les EC provenant de l'EPR/choroïde, pourraient être la source favorite des AG pour la rétine (Bretillon, Thuret et al. 2008). Ceci est renforcé par une étude qui met en avant l'augmentation de l'incorporation du DHA dans la rétine via l'augmentation de l'expression du récepteur au LDL dans la rétine, induit par une l'alimentation pauvre en oméga 6 (Simon, Bardet et al. 2011).

Ainsi, le DHA est dans un premier temps synthétisé dans le foie à partir des précurseurs apportés par l'alimentation, et est transféré à la circulation sanguine via les lipoprotéines. Par la suite, il est transféré à l'EPR, puis, via la matrice inter-photorécepteurs, et est capté par les segments internes grâce au récepteur 1 de l'adiponectine (AdipoR1) (Rice, Calandria et al. 2015). Il est ensuite utilisé et recyclé dans les segments externes des photorécepteurs (Gordon and Bazan 1997; Rodriguez de Turco, Parkins et al. 1999) (Figure 24).

Ainsi, la suppression de l'AdipoR1 induit une réduction de l'absorption du DHA, une altération du renouvellement des disques des segments externes, une diminution de la production des AGPI-VLC contenu dans les PC, et la fonction et la survie des PR est donc compromise (Rice, Calandria et al. 2015). L'AdipoR1 est également exprimé dans les cellules de l'EPR, permettant la rétention du DHA. Or, l'AdipoR1 est régulé par l'hormone adiponectine, sécrétée par les adipocytes. Elle améliore la sensibilité à l'insuline, est considérée comme un facteur de survie et présente des propriétés anti-inflammatoires (Yamauchi, Kamon et al. 2003; Yamauchi and Kadowaki 2013). De plus, chez les personnes et des modèles murins diabétique de type 1, l'AdipoR1 et l'adiponectine sont surexprimés dans la neurorétine et l'EPR (Lin, Qiu et al. 2013). Aussi, un polymorphisme du gène AdipoR1 a été associé à la DMLA (Kaarniranta, Paananen et al. 2012). L'activation de la voie de l'adiponectine par la supplémentation en AGPI-LC ω 3, inhiberait la métalloprotéinase matricielle (MMP9) et l'activation des cellules endothéliales choroïdiennes, dans deux modèles rongeurs de DMLA (Vldlr^{-/-} et impacts lasers dans la membrane de Bruch) (Fu, Liegl

et al. 2017). L'AdipoR1 est donc un excellent candidat permettant d'expliquer le mode d'action des AGPI-LC dans les pathologies rétiniennes.

Les données disponibles suggèrent que le DHA provenant de l'alimentation ne compterait que pour une part mineure dans la composition en DHA de la rétine (Bretillon, Thuret et al. 2008), même si le DHA provenant directement d'une source marine est plus efficace de 8% que l'administration de l'ALA pour l'incorporation de DHA dans le cerveau (Rapoport, Ramadan et al. 2011; Lacombe, Giuliano et al. 2017).

De plus, il semblerait que les photorécepteurs et les cellules gliales expriment la $\Delta 6$ désaturase, et aient la capacité de synthétiser le DHA à partir de l'EPA. Ce mécanisme leur permettrait de se protéger du stress oxydant, et de combler les besoins de manière rapide et locale (Simon, Agnolazza et al. 2016).

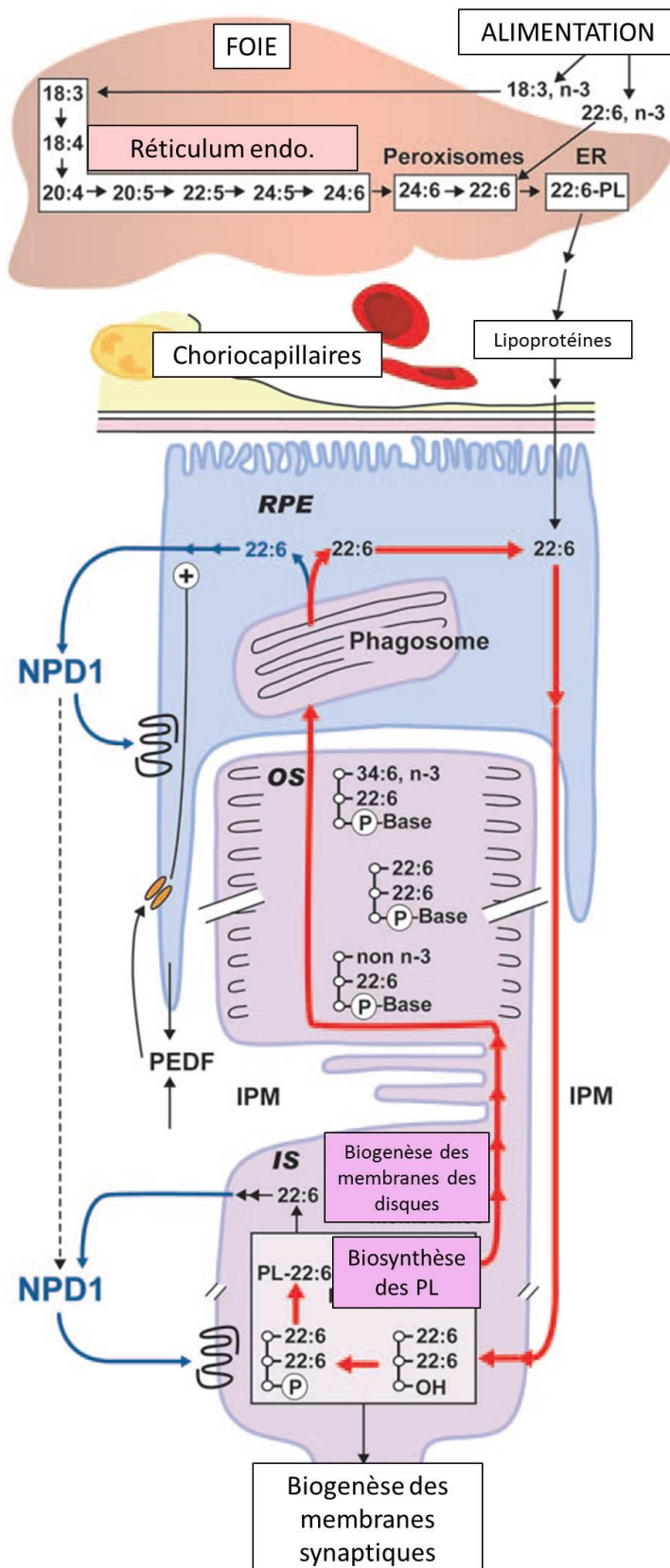


Figure 24 : Transport du DHA entre cellules et organes

RPE : Epithélium pigmentaire rétinien. NPD1 : Neuroprotectine D1. IS : segment interne. OS : Segment externe. IPM : Matrice interphotorécepteurs. PEDF : Facteur dérivé de l'épithélium pigmentaire. Adapté de Bazan, 2007

c) Rôle des AGPI LC ω 3 dans les pathologies rétinienne

Environ 20% du poids de la rétine sèche est composé de lipides, et plus de la moitié des acides gras qui la compose sont des AGPI. Le DHA notamment, est un acide-gras se trouvant dans le segment externe des photorécepteurs, indispensable à leur survie. L'importante concentration de cet acide gras dans la rétine et ses propriétés anti-inflammatoires, lui confère un rôle important dans les pathologies oculaires (Kishan, Modjtahedi et al. 2011).

En effet, une diminution du DPA (22:5 n-3), du DHA et de certains AGPI-VLC (24:5 n-3) a été observée dans les rétines atteintes de DMLA précoce et intermédiaire par rapport à des rétines saines du même âge (Liu, Chang et al. 2010), suggérant une vulnérabilité de la rétine associée à une diminution d'AGPI-LC n-3 et AGPI-VLC n-3.

De plus, la consommation d'AGPI ω 3, de poisson riche en ω 3 et de noix ont montré des effets protecteurs dans le développement de la DMLA précoce et tardive (Kishan, Modjtahedi et al. 2011), ainsi qu'une diminution des risques de la développer (Querques, Forte et al. 2011). Une méta-analyse a également montré un effet inverse entre une importante consommation d'AGPI de type oméga 3 et le développement de la DMLA tardive (OR 0,62 ;95% CI 0,48 à 0,82) (Chong, Kreis et al. 2008). D'autre part, la consommation de lipides trans peut potentiellement augmenter le risque de DMLA (Kishan, Modjtahedi et al. 2011).

Une étude a montré l'effet positif d'une importante consommation d'oméga-3 chez des personnes consommant de faibles quantités de LA, un oméga 6 (Seddon, Rosner et al. 2001). Pour que l'efficacité de la prise alimentaire des oméga 3 soit optimale, le ratio entre oméga 6 et oméga 3 doit être bien déterminé. Ainsi, le ratio idéal oméga 6/ oméga 3 serait de 3 : 1 ou 4 : 1, alors qu'il est aujourd'hui de 10-50:1 pour la plupart des Américains (Seddon, George et al. 2006).

De plus, un effet bénéfique de la prise alimentaire de DHA, d'EPA et d'autres ω 3 sur les gènes responsables de la DMLA (CFH Y402H, ARMS2 A69S) et a été révélé dans l'étude Rotterdam (Ho, van Leeuwen et al. 2011).

Toutefois, il existe peu de données démontrant les bénéfices d'une supplémentation en uniquement des AGPI de type oméga-3 pour la DMLA. L'ANSES recommande alors un apport journalier de 500 mg par jour d'EPA + DHA.

De plus, les APGPI-LC (DHA et AA), ont été suspectés avoir un rôle clé dans la pathogenèse du diabète, en influençant le métabolisme du glucose et des lipides (SanGiovanni and Chew

2005). En effet, les AGPI-LC ω 3, inhibent des mécanismes cellulaires et biochimiques impliqués dans la pathophysiologie de la RD, notamment la voie de la PKC, l'aldolase réductase, la production des produits de glycation avancés, mais également l'expression du VEGF, la perte des péricytes et l'agrégation plaquettaire (SanGiovanni and Chew 2005). De même, ils préviennent les altérations vasculaires induites par le diabète (Tikhonenko, Lydic et al. 2013). Des études ont associé la consommation de poisson, ou d'AGPI-LC ω 3, avec la diminution des altérations de la rétine, ou le développement de RD (Sasaki, Kawasaki et al. 2015; Sala-Vila, Diaz-Lopez et al. 2016; Chua, Chia et al. 2018).

En effet, les patients diabétiques et les modèles animaux de diabète présentent des modifications de leur composition en acides gras et en phospholipides (Min, Ghebremeskel et al. 2004; Tikhonenko, Lydic et al. 2010). Les personnes diabétiques de type 2 présentent notamment moins d'AGPI-LC ω 3 et ω 6, au sein des membranes des globules rouges, indépendamment du stade de leur RD (Koehrer, Saab et al. 2014).

Finalement, il semble que quel que soit la pathologie oculaire concernée, le sérum des patients présentent des taux d'AGPI-LC ω 3 plus faibles (Buhler, Bucher et al. 2016).

3. La biodisponibilité en AGPI-LC de type oméga 3

L'AA et le DHA proviennent principalement de l'alimentation, bien que les Humains puissent directement les synthétiser à partir du LA et de ALA. Le LA et l'ALA sont retrouvés dans les légumes, mais leur taux de conversion est très faible (<1%) chez l'adulte sain (Plourde and Cunnane 2007). L'alimentation des pays industrialisés est caractérisée par le déséquilibre du ratio ω 6/ ω 3, avec une alimentation 20 fois plus riche en ω 6 qu'en ω 3 (Simopoulos 2002; Simopoulos 2011). En effet, comme vu dans les chapitres précédents, les pays industrialisés ont modifié leur comportement alimentaire. La prise alimentaire est caractérisée par l'augmentation de la consommation de nombreuses sources de LA, retrouvé notamment dans de nombreux produits industrialisés, par exemple par l'ajout d'huile de tournesol (60%), ou encore contenant de l'AA, notamment dans la viande (5 à 10%). La consommation d'aliments contenant des sources d'ALA, (l'huile de colza (10%), les noix, ou encore l'EPA et le DHA contenus dans les poissons gras, comme le saumon, le hareng, le maquereau ou encore la sardine) est trop faible en proportion. Or, la société internationale sur l'étude des AG et des lipides (ISSFAL) recommande un ratio LA/ALA de 4 à 5 et une supplémentation de DHA et d'EPA d'environ 500 mg journaliers, pour atteindre les besoins de l'organisme et éviter les risques cardiovasculaires (Burdge 2004; Lucas, Asselin et al. 2009).

La supplémentation de l'alimentation ne dépend pas uniquement de la quantité de substance ingérée, mais également de sa biodisponibilité. La biodisponibilité réfère à la quantité de substance active qui atteint la circulation ou le site cible, c'est-à-dire où l'action physiologique a lieu. Cette quantité peut être très significativement inférieure à la quantité initialement absorbée (due au métabolisme et à l'excrétion). Ainsi, la disponibilité pour la rétine des $\omega 3$ ingérés dépend de nombreux facteurs tels que les propriétés physicochimiques (phospholipides ou triglycérides), l'effet de la matrice (composition des autres aliments ingérés en même temps), la métabolisation après ingestion, l'état de santé.

Ainsi, des études indiquent que la diminution de la prise alimentaire de sources riches en LA sont bénéfiques pour la biodisponibilité des AGPI-LC de type oméga 3 dans la rétine, concomitamment à l'augmentation de l'expression du récepteur aux LDL dans la neurorétine (Simon, Bardet et al. 2011), confirmé par des études cliniques et précliniques (Blanchard, Pedrono et al. 2013; Taha, Cheon et al. 2014). De plus, la prise alimentaire d'acide palmitique (C16:0), également retrouvé en quantité non négligeable dans l'alimentation industrielle, et produit par la lipogenèse *de novo*, inhiberait la synthèse des AGPI, en interférant avec l'enzyme $\Delta 6$ désaturase (Park, Kothapalli et al. 2016).

L'âge influence également l'intégration du DHA dans les membranes. En effet, une étude a comparé le plasma de jeunes personnes (24 ± 2 ans) à celui de personnes plus âgées (74 ± 4 ans), soumis pendant 3 semaines à 1g de DHA+EPA par jour. Les résultats indiquèrent que le plasma des personnes âgées contenait plus de DHA que celui des plus jeunes, mais il est néanmoins difficile de dire si ce niveau de DHA plasmatique reflète le DHA membranaire au niveau des tissus (Vandal, Freemantle et al. 2008).

La biodisponibilité de l'EPA ou du DHA dans la rétine, apportés par l'alimentation sous forme de phospholipides ou sous forme de triglycérides est actuellement au cœur du débat (Schuchardt, Schneider et al. 2011; Salem and Kuratko 2014; Ulven and Holven 2015; Yurko-Mauro, Kralovec et al. 2015). Effectivement, la biodisponibilité de l'EPA et du DHA est bien l'enjeu, au regard de leur propriétés anti-inflammatoires, et de leur rôle au niveau de la rétine.

Les sources d'AGPI-LC de type $\omega 3$ pour l'Homme sont principalement retrouvés dans les poissons d'eau froide, de type hareng, maquereau, thon, saumon, et dans le Krill (*Euphausia superba*) et les micro-algues. Ces différentes sources marines diffèrent par la quantité et la structure des AGPI qui les composent. Aussi, les huiles de poissons sont composées de

manière majoritaire de TG, tandis que l'huile de Krill est plus riche en PL. De plus, si les huiles naturelles contiennent moins de 20% d'EPA et de DHA, il est possible d'enrichir ces huiles par des méthodes de transestérification afin qu'elles atteignent aux alentours de 90% d'EPA et de DHA.

Aussi, de nombreuses études ont comparé l'absorption des AGPI apportés sous forme de PL, de TG, d'esters éthyliques (EE), mais les conclusions restent difficiles à établir compte tenu des variations entre les études sur les doses utilisées, la population étudiée, la durée de l'étude et les paramètres mesurés (Schuchardt and Hahn 2013). Ainsi les études mettent en évidence une meilleure biodisponibilité des TG-AGPI par rapport aux EE-AGPI. Les acides gras libres (AGL), même s'ils apparaissent plus biodisponibles, sont extrêmement sensibles à l'oxydation et ne sont donc pas utilisés pour les suppléments car ils induiraient à la fois une perte d'efficacité et des désagréments gastro-intestinaux (Lawson and Hughes 1988; Davidson, Johnson et al. 2012).

Les conclusions des études qui comparent la biodisponibilité des AGPI-PL et des AGPI-TG sont assez variables. En effet, Maki et ses collaborateurs mettent en évidence une meilleure biodisponibilité de l'huile de Krill (riche en PL) par rapport à l'huile de poisson (riche en TG) (Maki, Reeves et al. 2009), alors qu'Ulven ne relève pas de différence (Ulven, Kirkhus et al. 2011). Mais ici encore, les populations étudiées sont différentes (sujets obèses versus normopondéraux). D'autres études sont aujourd'hui nécessaires pour vérifier ces éléments et faire entrer des acteurs plus responsables écologiquement que sont les micro-algues.

Enfin, la galénique est un élément essentiel et très impactant dans la biodisponibilité des suppléments administrés (Davidson, Johnson et al. 2012). Par exemple, l'émulsion d'un apport d'AGPI augmente l'absorption dans le plasma par rapport à un apport classique. En effet, l'émulsion permet la formation de très fines gouttelettes, facilitant le clivage des liaisons TG-AGPI par la lipase pancréatique (Garaiova, Guschina et al. 2007).

Ainsi, la supplémentation en DHA et EPA apparaît comme une stratégie dans les pathologies oculaires comme la DMLA et la RD, mais également dans la résolution des désordres métaboliques, de par leurs propriétés anti-inflammatoires d'une part, et afin de compléter la perte de DHA dans la rétine d'autre part.

V. Objectifs et enjeux de thèse

Les déséquilibres de notre alimentation, associés à la sédentarité, sont à l'origine de l'installation du syndrome métabolique dont la prévalence est croissante dans les populations occidentales. Le syndrome métabolique est un état physiologique qui regroupe un ensemble de paramètres comme l'adiposité abdominale, la dyslipidémie, la résistance à l'insuline et l'hypertension. Les fonctions rénales, cardiaques et musculaires sont connues pour être les cibles privilégiées du syndrome métabolique et plus encore du diabète de type 2 dont le syndrome métabolique est un facteur de risque majeur. En revanche, peu de données sont disponibles sur les conséquences d'un syndrome métabolique sur la rétine, à l'exception de nos données qui montrent que le syndrome métabolique favorise de manière précoce l'altération de la fonction de la rétine et le développement de complications à long terme. Certains gènes impliqués dans le stress mitochondrial et dans les cascades de signalisations pour la survie cellulaire présentent des modifications d'expressions dans la rétine. Toutefois, ces données ne rendent pas compte des modifications du métabolisme général, des modifications ultrastructurales de la rétine, ainsi que de certaines modifications induites par l'inflammation. L'objectif de la thèse est de caractériser les mécanismes entraînant l'altération de la rétine et de proposer de nouvelles stratégies de prévention à partir d'acides gras poly-insaturés de type oméga-3. Pour ce faire et compte tenu des nouvelles sources d'oméga-3 disponibles sur le marché, nous avons étudié la biodisponibilité des acides gras poly-insaturés de type oméga-3 provenant de sources différentes et administrées dans l'alimentation d'un modèle animal rongeur.

La première étape du projet a consisté en l'induction d'un syndrome métabolique chez un modèle animal, le rat Brown Norway. Les animaux furent soumis à un régime alimentaire soit standard, soit riche en fructose (60%) et lipides saturés (10%) ou HFHF, connu pour induire un syndrome métabolique. Trois groupes d'animaux ont ainsi été formés, qui correspondaient à trois durées différentes de régime : huit jours, quatre semaines et douze semaines. Différentes procédures expérimentales furent exécutées à la fin de chaque durée de régime selon le schéma expérimental suivant afin d'évaluer certains paramètres métaboliques des animaux (glycémie, lipémie, insulinémie, tolérance au glucose, sensibilité à l'insuline) d'une part, la fonction de la rétine et l'évolution des complications de type néovasculaire d'autre part.

La deuxième étape du projet était d'évaluer la souche de rats la plus prompte à développer une dyslipidémie lors d'une alimentation HFHF. Pour ce faire, des rats Wistar et des rats Brown Norway ont été soumis à un régime HFHF pendant huit jours ou quatre semaines. A l'issue de ces durées, des tests de tolérance à l'insuline, des tests de tolérance au glucose, des analyses des lipides hépatiques et des lipides plasmatiques ont été réalisés.

Enfin, la dernière étape du projet de thèse avait pour but d'évaluer l'intégration d'acides gras de type oméga-3 dans différents tissus, dont la rétine. Pour ce faire, quatre formulations à base de différentes sources d'oméga 3 ont été déterminées, et comparées à un groupe contrôle, ne contenant pas d'oméga 3. Ces régimes contenaient 10% de lipides, dont la composition différait. Ainsi, sept groupes différents correspondant à sept variations de la partie lipidique des croquettes ont été utilisés :

- Phospholipides - EPA (PL-EPA)
- Phospholipides – DHA (PL-DHA)
- Triglycérides – EPA (TG-EPA)
- Triglycérides – DHA (PL-DHA)
- 100 % Phospholipides – DHA (oeuf)
- Mélange triglycérides et phospholipides liant EPA et DHA (hareng)
- Sans EPA ni DHA (Contrôle)

Etudes

I. Caractérisation dans le temps des changements systémiques induits par un régime diabétogène

A. Problématique

Le syndrome métabolique (SMet) constitue un facteur de risque de développement de la rétinopathie diabétique (RD) et de la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA), premières causes de déficiences visuelles dans les populations occidentales, avant et après 50 ans, respectivement (Klein and Klein 2013). L'incidence du SMet est en augmentation à travers le monde et le SMet touche 20 à 25 % de la population (Torgerson, Hauptman et al. 2004). Son développement serait dû aux changements de nos modes de vies qui se sédentarisent et à une dérégulation de la balance énergétique. Le SMet se caractérise par des anomalies métaboliques comme la dyslipidémie, l'hyperglycémie, la résistance à l'insuline, l'hypertriglycéridémie, l'hypertension et l'obésité abdominale (Alberti, Eckel et al. 2009).

La consommation d'importantes quantités de fructose et lipides saturés contenues dans les produits ultra-transformés est décrite comme induisant des altérations métaboliques comme la dyslipidémie et l'hyperglycémie (Stanhope, Schwarz et al. 2009; O'Connor, Imamura et al. 2015). Toutefois, en laboratoire, les résultats concernant les altérations métaboliques induites par une alimentation riche en fructose divergent entre les études. En effet, la multiplicité des protocoles concernant la souche de rat utilisée, la durée d'administration du régime, la manière d'administrer le fructose (dans l'eau de boisson ou l'alimentation) et sa composition, l'âge des animaux au départ des expériences, sont autant d'éléments qui entraînent des variabilités dans la réponse métabolique. Dans ce contexte, très peu d'études prennent en compte les conséquences de ce type d'alimentation sur la rétine. En effet, la plupart des études utilisent des outils génétiques ou pharmacologiques pour l'induction d'altérations microvasculaires dans la rétine en relation avec le diabète.

Seule une étude réalisée dans notre équipe montre les modifications précoces de la rétine de rats nourris avec 60% de fructose. Les causes des altérations précoces de la vision reportée dans les cas de syndrome métabolique sont néanmoins toujours débattues. Aucune autre étude utilisant du fructose uniquement, y compris celle de notre équipe, ne permet l'induction de l'ensemble des critères constituant le syndrome métabolique, dont la dyslipidémie et l'hyperglycémie, et les altérations au niveau de la rétine, simultanément.

Dans l'étude qui va suivre, notre hypothèse est qu'une alimentation riche en fructose, mais également en lipides saturés, est suffisante pour induire un syndrome métabolique et des altérations de la tétine chez le rat. Pour cela, nous avons caractérisé les conséquences d'une alimentation riche en fructose (60%) et lipides saturés (9%) (HFHF) chez le rat Brown Norway, sur le métabolisme du glucose et des lipides ainsi que sur la fonction et le développement d'altérations vasculaires dans la rétine, et ceci sur une échelle de temps de huit jours, cinq semaines et treize semaines de régime.

Ces résultats font l'objet d'une publication soumise dans le journal *Scientific reports*.

B. Article

Early impairments in the retina of rats fed with high fructose/high fat diet are associated with glucose metabolism deregulation but not dyslipidaemia

Elisa Vidal^{1, 2}, Elise Lalarme³, Marie-Annick Maire¹, Valérie Febvret¹, Stéphane Grégoire¹, Ségolène Gambert^{1, 4}, Niyazi Acar¹, Lionel Bretillon^{1*}

¹ Eye and Nutrition Research Group, Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation, AgroSup Dijon, INRA, CNRS, Université Bourgogne Franche-Comté, Dijon, France

² Horus Pharma Laboratories, Saint Laurent du Var, France

³ Animalerie Expérimentale, Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation, AgroSup Dijon, INRA, CNRS, Université Bourgogne Franche-Comté, Dijon, France

⁴ Clinical Biochemistry Department, University Hospital, Dijon, France

Corresponding Address: Lionel Bretillon, PhD, Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation, Centre INRA, 17 rue Sully, BP86510, F-21065 Dijon cedex, France. Phone: +33 (0)3 80 68 16 15, lionel.bretillon@inra.fr

Competing interests: Elisa Vidal is a PhD fellow from Horus Pharma Laboratories. The work has been funded by the Regional Council of Burgundy France (PARI Agral 1), FEDER (European Funding for Regional Economical Development), Association Nationale Recherche Technologie, Fondation de France, ANR-11-LABEX-0021.

Acknowledgements: Authors would like to thank Laurence Decocq, Alexia Mathou, and the CSGA animal facility for excellent animal care, and Vincent Cabaud Gibouin for his work.

Key words: Retina, metabolic syndrome, age-related macular degeneration, fructose, lipid

Author contributions: Conceived and designed experiments: EV, LB. Performed experiments: EV, EL, MAM, SG, VF, SG, LB. Analyzed data: EV, VF, NA, LB. Writing draft: EV, NA, LB. Supervision and funding acquisition: LB.

ABSTRACT

The prevalence of metabolic syndrome (MetS) is about 35% in the American population and is increasing, due to feeding behaviour and way of life changes. MetS is the main risk factor for diabetes mellitus, which is associated to vascular changes in the retina. However, the early consequences of MetS in the retina are not well described. We therefore aimed at characterizing the early effects of a high fructose and high fat diet (HFHF) on the function and structure of the rat retina, and evaluate the associations with metabolic changes. Brown Norway rats were fed for 8 days, 4 weeks or 12 weeks with HFHF diet, or a standard chow. After only 4 weeks of this diet, rats exhibited a loss in cone photoreceptor sensitivity to light. In the same time, we observed that MetS exacerbated laser-induced choroidal neovascularization. This decline in visual function and increased neovascularization were associated with deregulation of glucose metabolism but not lipid metabolism. These data show retinal modifications in HFHF-induced MetS in the rat, at very early stage of the disease. These findings are consistent with epidemiological data reporting MetS as a risk factor for neovascular age-related macular degeneration.

INTRODUCTION

Metabolic syndrome appears to be a risk factor for the development of Diabetic Retinopathy (DR) (Gao, Xin et al. 2016) and Age-related Macular Degeneration (AMD) (Ghaem Maralani, Tai et al. 2015), which are the leading causes of visual impairment in western populations before and after the age of 50 years, respectively (Klein and Klein 2013). Associated with lifestyle changes, i.e. low physical activity and high energy intake, the incidence of metabolic syndrome is increasing worldwide (Alberti, Eckel et al. 2009), reaching 20-25% of the adult population (Torgerson, Hauptman et al. 2004). Metabolic syndrome is characterized by a cluster of abnormalities like dyslipidaemia, hyperglycaemia, insulin resistance, hypertriglyceridaemia, hypertension, and an excess of abdominal fat (Alberti, Eckel et al. 2009). Consumption of fructose via processed food and as sweetener is now well described to trigger metabolic disturbances like dyslipidaemia and hyperglycaemia (Stanhope, Schwarz et al. 2009; O'Connor, Imamura et al. 2015). Metabolic disturbances observed in fructose fed rats are divergent from one study to another because differences in study design (Akram and Hamid 2013), animal strain (Montgomery, Fiveash et al. 2015), duration of the diet, route of fructose administration (de Moura, Ribeiro et al. 2009), age of the animals. Only few animal models take into account the consequences of poor food quality on retina (King 2012). Indeed, most studies use genetics or pharmacological drug administration to trigger microvascular alterations in the retina in connection to diabetes. To our knowledge, only one study showed that there are early modifications in the retina of rats fed with 60% of fructose (Thierry, Pasquis et al. 2014). The causes of the early consequences of visual impairment reported in metabolic syndrome are nevertheless still under debate (Poh, Mohamed Abdul et al. 2016).

It must be noticed that no study using fructose alone, including our (Thierry, Pasquis et al. 2014), recapitulated all the clinical features of metabolic syndrome, including dyslipidaemia and hyperglycaemia on the one hand, and retinal alterations on the other hand.

In the present study, we hypothesized that a high fructose plus high fat diet would be sufficient to trigger metabolic syndrome and retinal alterations in the rat. For that purpose, we characterized the consequences of feeding Brown Norway rats with a 60 % Fructose – 9 % saturated fat-diet in a time dependent manner on lipid and glucose metabolisms as well as on the functioning and development of vascular alterations in the retina.

RESULTS

HFHF diet induced an increase in body fat but not in body weight.

Food consumption and rat's body weight were recorded weekly during the entire experiment. A significantly higher food and water consumption was observed in rats fed with the standard diet compared to rats fed with HFHF diet ($P < 0.05$). But no difference in energy intake was reported between both groups (Supplementary Fig. 1). As shown in Fig. 1, standard fed rats had significantly higher body weight than HFHF fed rats from 8 weeks of diet until the end of the experiment ($P < 0.05$).

Body fat was measured by non-invasive EchoMRI. HFHF fed rats had larger body fat mass than rats from the standard diet at 4 weeks of diet ($P < 0.05$) but this effect was not persistent. Despite the percentage of lean mass did not significantly change between HFHF and Standard groups, the percentage of total water marginally decreased in the HFHF fed rats at 4 weeks ($P < 0.05$).

HFHF diet induced hyperglycaemia, glucose intolerance, insulin resistance, but not dyslipidaemia.

Plasma lipids were quantified at 8 days, 5 weeks, and 13 weeks of diet, shown in Fig.2 B, E, H. At 8 days of feeding, HFHF diet triggered a decrease in TC ($P < 0.001$), as well as in HDL-C ($P < 0.01$) and LDL-C ($P < 0.05$). No changes were observed for TG. After 5 weeks of feeding, there was a decrease in LDL-C ($P < 0.01$) and a significant increase in HDL-C ($P < 0.01$). On the contrary, no differences were observed between HFHF fed rats and standard fed rats at 13 weeks.

Cytokines in the plasma were also evaluated at each time-point, shown in Fig.2 C, F, I. There was no difference in the levels of insulin, leptin, IL1 β and TNF α at 8 days and 5 weeks of feeding between both diets. Insulinaemia was higher in HFHF rats at 13 weeks of diet ($P = 0.07$). Moreover, there was an increase of 170% TNF α plasma level ($P < 0.05$), and a decrease of 72.5% IL1 β level in HFHF rats compared to rats fed the standard diet at 13 weeks of diet ($P < 0.05$).

Fasted glycaemia was higher in HFHF fed rats vs Standard fed rats at 8 days ($P < 0.0001$), 4 weeks ($P < 0.001$) and 12 weeks ($P < 0.01$), shown in Fig.2 A, D, G. Intraperitoneal Glucose Tolerance Test (ipGTT) and intraperitoneal Insulin Tolerance Test (ipITT) were performed to

evaluate glucose metabolism, shown in Fig.3. HFHF induced glucose intolerance at 8 days ($P < 0.001$), 4 weeks ($P < 0.01$) and 12 weeks ($P < 0.05$) of diet, as exemplified by a significantly higher area under the curve (AUC) of plasma glucose in ipGTT. Moreover, HFHF fed rats during 12 weeks had higher insulin levels during ipGTT as compared to standard fed rats ($P < 0.05$). HFHF diet induced also insulin resistance as illustrated by higher blood glucose as compared to Standard fed rats in ipITT. Indeed, HFHF fed rats had a significant higher AUC at 8 days ($P < 0.001$), 4 weeks ($P < 0.001$) and 12 weeks ($P < 0.001$) compared to Standard fed rats.

HFHF diet induced liver steatosis

The hepatosomatic index was higher in HFHF fed rats at 5 weeks ($P < 0.05$) and 13 weeks ($P < 0.01$), shown in Fig.4. The increase of total lipids in the liver of HFHF fed rats during 5 weeks ($P < 0.0001$) suggested the development of liver steatosis. Regarding the quantification of fatty acids in the liver, 5 weeks of HFHF diet induced an increase of polyunsaturated fatty acids ($P < 0.01$) particularly omega-6 classes and on the contrary a decrease of monounsaturated fatty acids ($P < 0.01$). At 13 weeks of HFHF diet, we measured the accumulation of monounsaturated fatty acids ($P < 0.001$) and depletion in polyunsaturated fatty acids ($P < 0.01$), both omega-6 and omega-3 classes, hallmarks of liver steatosis.

HFHF diet induced a partial loss of cone sensitivity

ERG response

To assess the functional consequences of HFHF diet on the retina, electrical activity of the retina in response to light was measured by electroretinography (ERG) as described earlier (Thierry, Pasquis et al. 2014). ERG was recorded after 7 days, 4 weeks and 12 weeks of diet, under dark-adapted scotopic conditions, and light-adapted photopic conditions. Latencies and amplitudes of both a- and b-waves corresponding to the function of photoreceptors and inner retina respectively were measured. Those parameters were unchanged by HFHF diet at any time, neither in scotopic (Supplementary Table 1-3) nor in photopic conditions (Supplementary Table 4). Flicker ERG was used to record rod and cone photoreceptors sensitivity to light stimulus at fixed frequency of 8.02Hz. Our data showed no differences on the sensibility of rod and cone photoreceptors in rats fed during 8 days with the diets. However, we observed a shift to the right of the maximum response of cone photoreceptors in rats fed with HFHF diet compared to rats fed with standard diet ($\Delta = 0.5 \log(I)$), at 4 weeks

and 12 weeks, shown in Fig.5. Altogether, these data suggest a partial loss of cone sensitivity in rats fed with HFHF diet compared to standard diet.

HFHF diet promoted choroidal neovascularization in the retina

Retinal and choroidal vasculatures were evaluated using cSLO angiography after injection of fluorescein and indocyanin green dyes, respectively. Angiography was performed 1, 2 and 3 weeks after the induction of choroidal neovascularization with laser impacts in Bruch's membrane. Fluorescein angiography did not show differences between HFHF diet and standard diet. However, ICG angiography revealed an increase of choroidal neovascularization at 2 weeks (Fig.6, +64 %, $P = 0.06$) and 3 weeks (+72%, $P < 0.05$) after impacts in Bruch's membrane in rats fed with HFHF.

HFHF diet induced retinal gliosis

The activation of Müller cells was evaluated by semi-quantification of the immunolabeling against the glial fibrillary acidic protein (GFAP). Immunoreactivity was scored from "no stain" to "strong" using a standardized procedure, from retinas of HFHF fed rats and Standard fed rats. The results expressed the percentage of the 4 stages of activation of Müller cells in the retina. Blinding scoring revealed higher stain of GFAP cells in HFHF retinas compared to Standard retinas (Fig.7, $P < 0.01$). The retinas of HFHF fed rats were characterized by a higher effective in the high score suggesting that HFHF diet promoted a pro-inflammatory environment.

DISCUSSION

Diabetic retinopathy (DR) and Age-related Macular Degeneration (AMD) are different diseases. Nevertheless, they share common pathogenic pathways such as cellular inflammatory response and oxidative stress. A systematic review and meta-analysis of the literature revealed that diabetes would be a risk factor for the neovascular form of advanced AMD (OR=1.48 [1.44-1.51, 95% CI] from cross-sectional studies; OR=1.15 [1.11-1.21, 95% CI] from case-control studies). Interestingly no association was found with early AMD or the geographic atrophy form of advanced AMD (Chen, Rong et al. 2014). Data from the Blue Mountains Eye Study in Australia pointed that obesity, high glucose and high triglyceride were associated with the increased incidence of late AMD during a 10-year follow-up (Ghaem Maralani, Tai et al. 2015). The objective of the present work was to identify the early effects of the consumption of a pro-diabetogenic diet composed by high saturated fat and high

fructose on the retina. We observed that rats fed with HFHF during 13 weeks presented a greater body fat gain but not a body weight gain as compared to Standard fed rats. Moreover, calorie intake per week was similar in both groups meaning that HFHF diet leads to *de novo* lipogenesis (Woodie and Blythe 2017). The induction of lipogenesis probably resulted from insulin resistance and hepatic dyslipidaemia (Allen and Leahy 1966; Bar-On and Stein 1968). Adipose tissue also has a secretory role. The development of body fat is responsible for the secretion of pro-inflammatory cytokines such as tumor necrosis factor (TNF)- α and interleukin (IL)-6. This inflammation could contribute to insulin resistance (Hotamisligil, Peraldi et al. 1996). Our results showed an increase of TNF- α in the plasma of HFHF fed rats during 13 weeks, but not at earlier stages, while insulin resistance was already installed.

Fructose is known to induce a metabolic syndrome characterized by an increase of central fat, a dyslipidaemia, an insulin resistance in rodent models (Mamikutty, Thent et al. 2014; Toop and Gentili 2016), as well as in human (Tordoff and Alleva 1990; Bray, Nielsen et al. 2004; Faeh, Minehira et al. 2005), and particularly in young adults or children (Dennison, Rockwell et al. 1997; Ludwig, Peterson et al. 2001). Our results showed that HFHF diet induced fasted hyperglycaemia, glucose intolerance, insulin resistance, very early, i.e. as soon as 8 days after starting feeding. Moreover, our results showed an increase in insulin levels during GTT. However, HFHF diet did not induce hyperinsulinaemia and hyperleptinaemia, which is a feature of later stages of diabetes. Indeed, fructose does not trigger hyperinsulinaemia in bypassing the insulin system, since cells in the pancreas lack of the fructose transporter GLUT 5 (Curry 1989; Sato, Ito et al. 1996).

Furthermore, it seems that HFHF diet was not effective in inducing dyslipidaemia in our Brown Norway rats. HFHF fed rats have lower plasma levels of total-, LDL- and HDL-cholesterol at 8 days of diet. A higher level of HDL-Cholesterol and a lower level of LDL-Cholesterol were observed in HFHF fed rats at 5 weeks compared to Standard fed rats. This is not surprising because dyslipidaemia, that is characterized by an increase in triglycerides, total cholesterol and LDL-Cholesterol, commonly appears in men while hyperinsulinaemia is observed, that is not observed in our case (Hallfrisch, Reiser et al. 1983). Another study by Crapo and collaborators (Crapo, Kolterman et al. 1986) demonstrated that High-Fructose diet induces hypertriglyceridaemia in diabetics. These data suggest that a high intake of fructose can lead to an alteration of lipid metabolism when Diabetes is already installed.

We should point out that the efficacy of high fructose diet to trigger metabolic changes varies according to the rat strain (Toop and Gentili 2016) or genetic background of mice (Montgomery, Fiveash et al. 2015). Indeed the metabolic response to fructose diet depends on the liver ability to store lipids as a consequence of different enzymatic activities. Indeed, the liver is essential for the maintenance of glucose and lipid metabolisms because fructose is completely metabolized in the liver into fructose 1 phosphate, a precursor for triglycerides (Jurgens, Haass et al. 2005). Regarding these data, the dysregulation of metabolism of glucose seems to be an early phenomenon of the consequences of the HFHF diet in Brown Norway rats. Taken together, these results are consistent with the transient increase of total lipids in the liver at 5 weeks of HFHF diet. The hepatosomatic index is higher in HFHF fed rats during 5 and 13 weeks compared to Standard fed rats which is a hallmark for liver steatosis as described in many studies (Ackerman, Oron-Herman et al. 2005). The fatty acid profile of livers showed an increase in polyunsaturated fatty acid and a decrease of monounsaturated fatty acid in HFHF fed rats during 5 weeks compared to standard fed rats. Meanwhile, HFHF fed rats during 13 weeks presented an inverse pattern, characterized by an increase in MUFA and a decrease in PUFA concentrations in the liver. As described by Baena and collaborators (Baena, Sanguesa et al. 2016), fructose diet causes liver deposition of triglycerides enriched in MUFA, these features being specific to fructose.

On one hand, the function of inner retinal cells and rod photoreceptors was not altered by the HFHF diet as revealed by the lack of modification of a-wave and b-wave amplitudes and latencies in scotopic single-flash electroretinography. However, people who had type 1 Diabetes for less than 5 years had subtle impairment of vision, like a loss of blue sensitive color vision without visible abnormalities or retinal changes during a careful ophthalmoscopic examination (Daley, Watzke et al. 1987). Another more recent study reported a relationship in color vision impairment in diabetes without retinopathy (Gella, Raman et al. 2015). This loss of sensitivity of photoreceptors appears to be an early indicator of neurodegenerative symptoms and that neural damage precedes clinical diabetic retinopathy. Indeed, it has been reported that the thickness of the retinal photoreceptor layer and retinal sensitivity were decreased in patients with diabetes, although no microvascular changes were observed in the retina (Verma, Rani et al. 2009). From these studies in human, we wanted to evaluate the photoreceptors sensitivity in the rat retina at early stages of our conditions of hyperglycaemia, glucose intolerance, insulin resistance, hepatic steatosis. Thus, in the same rats, we performed 8.02 Hz flicker electroretinography to discriminate between the response of the rod and cone

photoreceptors and to measure the light intensity leading to the maximal response of each type of photoreceptors (Seeliger, Grimm et al. 2001). Interestingly, our results suggested a partial loss of cone sensitivity in fructose fed rats during 4 weeks and 12 weeks, because a shift to the right of the maximal response, meaning a need of a higher quantity of light to trigger a maximal electrical response. However the rod response was not affected. Previous study from our team demonstrated that the alteration in rod sensitivity appeared at 6 month of fructose fed rats (Thierry, Pasquis et al. 2014).

Altogether, these data show that dysregulation of glucose metabolism, and not dyslipidaemia induced by HFHF diet cause the first functional deregulation, at very early stages of diabetes. The debate is still open to find the origin of the functional changes in the retina during a metabolic syndrome. In our model, it seems that a dysregulation of glucose metabolism may be the first event in the onset of retinal abnormalities.

Our second cohort of rats was used to investigate the potential impact of HFHF diet the vascular status of the retina. Laser impacts on Bruch's membrane using laser photocoagulation triggers choroidal neovascularization (Grossniklaus, Kang et al. 2010; Thierry, Pasquis et al. 2014; Lambert, ElShelmani et al. 2016). Our results showed that HFHF diet during 4 weeks induced an exacerbation of choroidal neovascularization in the retina, 2 and 3 weeks after laser impact on the Bruch's membrane. This result indicates that HFHF diet promotes a favorable environment for neovascular events. This model of laser-induced neovascularization has been used extensively in studies related to exudative form of human advanced AMD (Lambert, ElShelmani et al. 2016). Numerous growth factors like VEGF, IGF-1, PDGF were associated with neovascularization events (Tarr, Kaul et al. 2013). Moreover, chronic hyperglycaemia triggers an early breakdown of the blood retinal barrier, due to RPE dysfunction, then contributing to edema formation, and neovascularization (Desjardins, Yates et al. 2016). Müller Glial cells in the retina are the principal glial cells of the retina. These cells are involved in the control of angiogenesis, in neurotrophic functions and by their activation, allows reducing neurotoxicity in destroying neural waste products (Bringmann, Pannicke et al. 2006). This is consistent with our model in which HFHF retinas presented a stronger expression of GFAP compared to standard retinas. This immunoreactivity throughout the retina results from an activation of Müller glial cells. GFAP is the most sensitive early indicator of the activation of glial cells, as soon as there is a retinal injury. Sustained injury induced by impact laser in the Bruch's membrane leads to Müller glial cells activation at the site of laser impact, in both HFHF retina and Standard retina.

However, HFHF diet leads to a propagation of this activation, not only at the site of laser impact but also on the rest of the retina, thus reflecting a global inflammation induced by the HFHF diet promoting gliosis and therefore neovascularization. Indeed, mechanisms of this gliosis can be partially explained by in vitro studies showing that hyperglycaemia leads to mitochondrial oxidative stress in Müller glial cells and induces radial GFAP expression (Devi, Somayajulu et al. 2017). Moreover, hyperglycaemia triggers secretion of VEGF by Müller cells implicating an endoplasmic reticulum stress (Zhong, Li et al. 2012). Further experiments are necessary to understand the mechanisms and timeframe of HFHF-induced gliosis related to microvascular events in the retina.

Hyperglycaemia regulates also the insulin receptor signaling (Ola 2014). The local management of hyperglycaemia will be interesting to investigate. Indeed, one study showed that retinal endothelial cells did not downregulate glucose transporters in high glucose conditions, thus creating an environment that is sensitive to the deleterious effects of hyperglycaemia (Rajah, Olson et al. 2001). Thus, our study associates the dysregulation of glucose metabolism induced by an HFHF diet with retinal alterations, in a time dependent manner.

One originality of our study concerns the animal model. We have chosen the Brown Norway strain because it is the most used in choroidal neovascularization models (Lambert, Lecomte et al. 2013). Nevertheless, its metabolic response to high fructose + high fat diet has never been studied before. Dyslipidaemia is an essential parameter in the definition of Metabolic Syndrome. Ninety percent of diabetic patients have both dysregulation of glucose and lipid metabolisms. Dyslipidaemia is associated with the development of diabetic retinopathy and patients with dyslipidaemia are at substantially at increased risk for developing macrovascular and microvascular complications (Mooradian 2009; Tremblay and Hamet 2015). Only few studies described the mechanisms by which dyslipidaemia impacts the development of microvascular events in the retina in type 2 Diabetes patients. Despite, it seems that dyslipidaemia have a direct correlation with the incidence and severity of diabetic retinopathy (Kowluru, Mishra et al. 2016), and is positively correlated with exudative AMD (Delcourt, Michel et al. 2001; Ulas, Balbaba et al. 2013). Our results highlight that despite Brown Norway is resistant to dyslipidaemia, it develops neovascularization. Our study therefore suggests that dysregulation of glucose metabolism but not dyslipidaemia is sufficient to favour vascular changes in the retina.

Our study suggests to pay attention not only to diabetic stages but also to metabolic syndrome, accounting that dysglycaemia has negative consequences in the retina. Our study contributes also to the current debate on the role of the diet on the onset of metabolic diseases and vision alterations.

MATERIALS ET METHODS

a. Animals

All animal experiments were conducted in accordance with the ARVO Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research. The ethics committee of our institution (Comité d’Ethique de l’Expérimentation Animale 105, Dijon, France) approved all interventions and animal care procedures. Male Brown Norway rats (6 weeks of age, n=80) were purchased from Charles River (L’Arbresle, France). They were housed in a controlled environment at 23°C ± 1°C, 55-60% humidity, under a 12-hour light/12-hour dark cycle, 780 lux in light phase, had free access to food and tap water. The rats were acclimatized 2 weeks before they were fed on either a standard rodent chow (SDS diets, UK) or a chow with 60% Fructose and 9% pork lard (HFHF) for 1 week (n=32), 4 weeks (n=16) or 12 weeks (n=16). At each time point, animals were submitted to intraperitoneal glucose tolerance test (ipGTT) and intraperitoneal insulin tolerance test (ipITT), electroretinography (ERGs) and body composition analysis by EchoMRI (EchoMRI 500, Houston, Texas; Plateforme de phénotypage du petit animal, Dijon, France).

Male Brown Norway rats from one other group of animals (6 weeks of age, n=16) were fed during 3 weeks with the standard diet or the HFHF diet and submitted to argon-laser choroidal neovascularization experiments (see below).

b. Measurement of intra peritoneal glucose Tolerance Test (ipGTT) and intra peritoneal insulin tolerance test (ipITT)

Rats were placed in individual cages and had free access to tap water. ipGTT and ipITT were performed in 5-h-fasted rats by measuring blood glucose from the tail vein with an automatic blood glucose analyzer (mylife Pura, Ypsomed) before and at 15, 30, 45, 60, 120 minutes after intra peritoneal injection of glucose (2 g/kg) or intraperitoneal injection of insulin (0.5 units/kg). Blood samples were collected for insulin measurements during the ipGTT by using a bead-based AlphaLISA Human Insulin Detection Kit according to manufacturer’s instructions (PerkinElmer).

c. Electroretinography

ERGs were recorded after 8 days (n=32), 4 weeks (n=16) and 12 weeks (n=16) of diet, according to ISCEV (International Society for Clinical Electrophysiology of Vision) procedures and using a setup described previously (Thierry, Pasquis et al. 2014). Rats were dark-adapted ($\lambda < 650\text{nm}$) overnight before the experiments and prepared for the ERGs under dim red light. Rats were anesthetized by intraperitoneal injection of ketamine (70 mg/kg body weight; Imalgene 1000, Merial, Lyon, France) and xylazine (14 mg/kg body weight; Rompun 2%, Bayer, Lyon, France) and their pupils were dilated with 1% tropicamide (Mydriaticum, Laboratoire Théa, Clermont-Ferrand, France). Rats were kept on a heat pad during the entire procedure to maintain body temperature at 37°C. Silver needle electrodes served as reference (forehead) and ground (tail) electrodes, and gold-wire ring electrodes (3 mm) as active electrodes were positioned on the corneal surface of both eyes. Single-flash recordings were obtained under dark-adapted (scotopic) conditions from both eyes simultaneously, after the rats were placed in the Ganzfeld bowl. Stimuli were presented with increasing intensities, reaching from 0.001 cd.s/m² to 10 cd.s/m² divided into 6 steps (0.001, 0.01, 0.1, 1.0, 3.0, 10.0 cd.s/m²) with an inter-stimulus interval of 5 seconds and 17 seconds up to 1.0 cd.s/m². The pass-band filter width was 1-300 Hz. Then, light adaptation was performed with a background illumination of 30 cd/m² presented 10 min before recording to obtain cone response after rod saturation and to stabilize photopic responses. Stimuli under light-adapted photopic conditions were presented with increasing intensities, reaching from 0.3 cd.s/m² to 10 cd.s/m², divided into 4 steps (0.3, 1.0, 3.0, 10.0 cd.s/m²) with an inter-stimulus interval of 5 seconds and 17 seconds up to 1.0 cd.s/m². The pass-band filter width was 100-500 Hz.

After amplification, the signal was digitized and processed. The amplitudes and latencies of the a- and b-waves were analyzed.

The Flicker ERG examination consisted in fixed frequency 8.02 Hz light stimulation, (n=8 rats per group). The responses were recorded using ten increasing intensities from 0.0003 cd.s/m² to 10 cd.s/m², with an inter-stimulus interval of 0.126 seconds. The band-pass width was 0.1-3,000 Hz. Recordings were obtained in the morning and early afternoon, and rats from different groups were randomly assigned to avoid bias from circadian variations in responses.

d. Argon laser-induced choroidal neovascularization (CNV).

Rats were fed 3 weeks before laser treatment with HFHF diet or Standard diet, and submitted to the procedure of CNV as previously described (Thierry, Pasquis et al. 2014).

e. Funduscopy and angiography

Angiographies were performed 7 days, 14 days and 21 days after laser injury, by confocal scanning laser ophthalmoscopy (cSLO, Heidelberg Engineering, Germany) as previously described (Thierry, Pasquis et al. 2014).

f. Quantification of neovascularization

The analysis of CNV pictures was performed in a double-masked manner by two independent investigators using ImageJ Software as described previously (Thierry, Pasquis et al. 2014).

g. Echo MRI

Body composition was analyzed by quantitative magnetic resonance imaging (EchoMRI 500, EchoMRI Houston, Texas, Plateforme de phénotypage du petit animal, Université de Bourgogne, AgroSup Dijon, France) as described previously (Thierry, Pasquis et al. 2014), ($n=8$ rats per group).

h. Collection of samples

Animals were fasted overnight before being euthanized by an intraperitoneal injection of pentobarbital (Ceva, Santé animale, Libourne, France) at lethal dose (150 mg/kg body weight) and exsanguination by intracardiac puncture after 8 days, 5 weeks and 13 weeks of diet, or after 8 weeks of diet in rats with CNV. Plasma was prepared by centrifugation (3000 rpm during 20 min, 4°C) and kept at -80°C until further analyses. Liver was weighed, frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C. Eyes and brains were collected for further analyses.

i. Plasma analyses

Plasma levels of total cholesterol (TC); high density lipoprotein cholesterol (HDL-C), low density lipoprotein cholesterol (LDL-C), triglycerides (TG) were evaluated by standard automatic analyzers at the Clinical Biochemistry Department of the Dijon University Hospital (Dijon, France). Plasma levels of insulin, leptin, interleukin 1 beta (IL-1 β), tumor necrosis factor alpha (TNF- α) were quantified using an adipokine magnetic bead panel (milliplex kit, EMD Millipore Corporation) and assessed by Luminex technology (Biorad Bioplex 200

system, Life Sciences, Marnes-la-Coquette, France) according to the manufacturer's instructions.

j. Liver analyses

Frozen hepatic tissue samples (300 mg) were homogenized in 0.73% of sodium chloride and lipids were extracted following the method of Folch (Folch, Lees et al. 1957). Fatty acid were converted into methyl esters according to Morrison and Smith (Morrison and Smith 1964) and analyzed as previously described (Thierry, Pasquis et al. 2014).

k. Immunohistochemical labeling and counting of GFAP in the retina

Eyeballs were embedded in Optimal Cutting Temperature (OCT) resin according to the manufacturer's instructions. Transverse retinal sections (8 μ m) were sliced using a cryostat (LEICA 3050S, Nanterre, France) (n=6 per group). All retinal sections were blocked for 2 h in a solution containing 10% normal goat serum and 0.1% Triton X-100 in phosphate Buffered Saline (PBS). Primary anti GFAP antibody (sc-6171-R, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California) was diluted in blocking solution (1:500) and incubated at 4°C overnight. After several washes in PBS, retinal sections were incubated with Alexa fluor goat anti rabbit (1:500; Jackson Labs, West Grove, PA, United States) diluted in blocking solution for 2h at room temperature. Sections were also counterstained with DAPI (1:5000) during 2 min. After being washed, tissues were mounted using Vecta Shield (Vector Labs, Burlingame, CA, United States) then analyzed on a Nikon Eclipse E600 upright microscope coupled to a Nikon DS-Ri2 digital camera (NIKON, Champigny sur Marne, France). All the images were obtained in the same conditions of contrast and brightness. Some figures obtained from double-labelling immunofluorescence experiments were processed with ImageJ software. Results from fifteen sections containing the optic nerve were averaged and considered as a single eye result. We analyzed six eyes from six different rats from each group, receiving laser impact. The category of labeling was estimated in double-blind by two different investigators using a score determination.

l. Statistical analysis

Data were analyzed using the unpaired Mann Whitney test or two way ANOVA was performed followed by a Bonferroni post-hoc test when appropriate. The level of significance was set at $P \leq 0.05$. All results were analyzed using GraphPad Prism version 7.00 for Windows

(GraphPad Software, San Diego, CA, United States). Data are presented as mean $\pm$ standard deviation (SD) or standard error of the mean (SEM) when appropriate.

REFERENCES

- 1 Gao, L. *et al.* High Prevalence of Diabetic Retinopathy in Diabetic Patients Concomitant with Metabolic Syndrome. *PLoS One* **11**, e0145293, doi:10.1371/journal.pone.0145293 (2016).
- 2 Ghaem Maralani, H. *et al.* Metabolic syndrome and risk of age-related macular degeneration. *Retina* **35**, 459-466, doi:10.1097/IAE.0000000000000338 (2015).
- 3 Klein, R. & Klein, B. E. K. The Prevalence of Age-Related Eye Diseases and Visual Impairment in Aging: Current Estimates. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **54**, ORSF5-ORSF13, doi:10.1167/iovs.13-12789 (2013).
- 4 Alberti, K. G. *et al.* Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation* **120**, 1640-1645, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.109.192644 (2009).
- 5 Torgerson, J. S., Hauptman, J., Boldrin, M. N. & Sjostrom, L. XENical in the prevention of diabetes in obese subjects (XENDOS) study: a randomized study of orlistat as an adjunct to lifestyle changes for the prevention of type 2 diabetes in obese patients. *Diabetes Care* **27**, 155-161 (2004).
- 6 Stanhope, K. L. *et al.* Consuming fructose-sweetened, not glucose-sweetened, beverages increases visceral adiposity and lipids and decreases insulin sensitivity in overweight/obese humans. *J Clin Invest* **119**, 1322-1334, doi:10.1172/JCI37385 (2009).
- 7 O'Connor, L. *et al.* Prospective associations and population impact of sweet beverage intake and type 2 diabetes, and effects of substitutions with alternative beverages. *Diabetologia* **58**, 1474-1483, doi:10.1007/s00125-015-3572-1 (2015).
- 8 Akram, M. & Hamid, A. Mini review on fructose metabolism. *Obes Res Clin Pract* **7**, e89-e94, doi:10.1016/j.orcp.2012.11.002 (2013).
- 9 Montgomery, M. K. *et al.* Disparate metabolic response to fructose feeding between different mouse strains. *Sci Rep* **5**, 18474, doi:10.1038/srep18474 (2015).
- 10 de Moura, R. F., Ribeiro, C., de Oliveira, J. A., Stevanato, E. & de Mello, M. A. Metabolic syndrome signs in Wistar rats submitted to different high-fructose ingestion protocols. *Br J Nutr* **101**, 1178-1184, doi:10.1017/S0007114508066774 (2009).
- 11 King, A. J. The use of animal models in diabetes research. *Br J Pharmacol* **166**, 877-894, doi:10.1111/j.1476-5381.2012.01911.x (2012).
- 12 Thierry, M. *et al.* Metabolic syndrome triggered by high-fructose diet favors choroidal neovascularization and impairs retinal light sensitivity in the rat. *PLoS One* **9**, e112450, doi:10.1371/journal.pone.0112450 (2014).
- 13 Poh, S., Mohamed Abdul, R. B., Lamoureux, E. L., Wong, T. Y. & Sabanayagam, C. Metabolic syndrome and eye diseases. *Diabetes Res Clin Pract* **113**, 86-100, doi:10.1016/j.diabres.2016.01.016 (2016).
- 14 Folch, J., Lees, M. & Sloane Stanley, G. H. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem* **226**, 497-509 (1957).
- 15 Morrison, W. R. & Smith, L. M. Preparation of Fatty Acid Methyl Esters and Dimethylacetals from Lipids with Boron Fluoride--Methanol. *J Lipid Res* **5**, 600-608 (1964).
- 16 Chen, X. *et al.* Diabetes mellitus and risk of age-related macular degeneration: a systematic review and meta-analysis. *PLoS ONE* **9**, e108196, doi:10.1371/journal.pone.0108196 (2014).

- 17 Woodie, L. & Blythe, S. The differential effects of high-fat and high-fructose diets on physiology and behavior in male rats. *Nutr Neurosci*, 1-9, doi:10.1080/1028415X.2017.1287834 (2017).
- 18 Allen, R. J. & Leahy, J. S. Some effects of dietary dextrose, fructose, liquid glucose and sucrose in the adult male rat. *Br J Nutr* **20**, 339-347 (1966).
- 19 Bar-On, H. & Stein, Y. Effect of glucose and fructose administration on lipid metabolism in the rat. *J Nutr* **94**, 95-105, doi:10.1093/jn/94.1.95 (1968).
- 20 Hotamisligil, G. S. *et al.* IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF-alpha- and obesity-induced insulin resistance. *Science* **271**, 665-668 (1996).
- 21 Mamikutty, N. *et al.* The establishment of metabolic syndrome model by induction of fructose drinking water in male Wistar rats. *BioMed research international* **2014**, 263897, doi:10.1155/2014/263897 (2014).
- 22 Toop, C. R. & Gentili, S. Fructose Beverage Consumption Induces a Metabolic Syndrome Phenotype in the Rat: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Nutrients* **8**, doi:10.3390/nu8090577 (2016).
- 23 Tordoff, M. G. & Alleva, A. M. Effect of drinking soda sweetened with aspartame or high-fructose corn syrup on food intake and body weight. *Am J Clin Nutr* **51**, 963-969, doi:10.1093/ajcn/51.6.963 (1990).
- 24 Bray, G. A., Nielsen, S. J. & Popkin, B. M. Consumption of high-fructose corn syrup in beverages may play a role in the epidemic of obesity. *Am J Clin Nutr* **79**, 537-543, doi:10.1093/ajcn/79.4.537 (2004).
- 25 Faeh, D. *et al.* Effect of fructose overfeeding and fish oil administration on hepatic de novo lipogenesis and insulin sensitivity in healthy men. *Diabetes* **54**, 1907-1913 (2005).
- 26 Dennison, B. A., Rockwell, H. L. & Baker, S. L. Excess fruit juice consumption by preschool-aged children is associated with short stature and obesity. *Pediatrics* **99**, 15-22 (1997).
- 27 Ludwig, D. S., Peterson, K. E. & Gortmaker, S. L. Relation between consumption of sugar-sweetened drinks and childhood obesity: a prospective, observational analysis. *Lancet* **357**, 505-508, doi:10.1016/S0140-6736(00)04041-1 (2001).
- 28 Curry, D. L. Effects of mannose and fructose on the synthesis and secretion of insulin. *Pancreas* **4**, 2-9 (1989).
- 29 Sato, Y. *et al.* Immunohistochemical localization of facilitated-diffusion glucose transporters in rat pancreatic islets. *Tissue Cell* **28**, 637-643 (1996).
- 30 Hallfrisch, J., Reiser, S. & Prather, E. S. Blood lipid distribution of hyperinsulinemic men consuming three levels of fructose. *Am J Clin Nutr* **37**, 740-748, doi:10.1093/ajcn/37.5.740 (1983).
- 31 Crapo, P. A., Kolterman, O. G. & Henry, R. R. Metabolic consequence of two-week fructose feeding in diabetic subjects. *Diabetes Care* **9**, 111-119 (1986).
- 32 Jurgens, H. *et al.* Consuming fructose-sweetened beverages increases body adiposity in mice. *Obesity research* **13**, 1146-1156, doi:10.1038/oby.2005.136 (2005).
- 33 Ackerman, Z. *et al.* Fructose-induced fatty liver disease: hepatic effects of blood pressure and plasma triglyceride reduction. *Hypertension* **45**, 1012-1018, doi:10.1161/01.HYP.0000164570.20420.67 (2005).
- 34 Baena, M. *et al.* Fructose, but not glucose, impairs insulin signaling in the three major insulin-sensitive tissues. *Sci Rep* **6**, 26149, doi:10.1038/srep26149 (2016).
- 35 Daley, M. L., Watzke, R. C. & Riddle, M. C. Early loss of blue-sensitive color vision in patients with type I diabetes. *Diabetes Care* **10**, 777-781 (1987).

- 36 Gella, L. *et al.* Impairment of Colour Vision in Diabetes with No Retinopathy: Sankara Nethralaya Diabetic Retinopathy Epidemiology and Molecular Genetics Study (SNDREAMS- II, Report 3). *PLoS One* **10**, e0129391, doi:10.1371/journal.pone.0129391 (2015).
- 37 Verma, A. *et al.* Is neuronal dysfunction an early sign of diabetic retinopathy? Microperimetry and spectral domain optical coherence tomography (SD-OCT) study in individuals with diabetes, but no diabetic retinopathy. *Eye (Lond)* **23**, 1824-1830, doi:10.1038/eye.2009.184 (2009).
- 38 Seeliger, M. W. *et al.* New views on RPE65 deficiency: the rod system is the source of vision in a mouse model of Leber congenital amaurosis. *Nat Genet* **29**, 70-74 (2001).
- 39 Grossniklaus, H. E., Kang, S. J. & Berglin, L. Animal models of choroidal and retinal neovascularization. *Prog Retin Eye Res* **29**, 500-519, doi:10.1016/j.preteyeres.2010.05.003 (2010).
- 40 Lambert, N. G. *et al.* Risk factors and biomarkers of age-related macular degeneration. *Prog Retin Eye Res* **54**, 64-102, doi:10.1016/j.preteyeres.2016.04.003 (2016).
- 41 Tarr, J. M., Kaul, K., Chopra, M., Kohner, E. M. & Chibber, R. Pathophysiology of diabetic retinopathy. *ISRN Ophthalmol* **2013**, 343560, doi:10.1155/2013/343560 (2013).
- 42 Desjardins, D. M. *et al.* Progressive Early Breakdown of Retinal Pigment Epithelium Function in Hyperglycemic Rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **57**, 2706-2713, doi:10.1167/iovs.15-18397 (2016).
- 43 Bringmann, A. *et al.* Müller cells in the healthy and diseased retina. *Prog Retin Eye Res* **25**, 397-424, doi:10.1016/j.preteyeres.2006.05.003 (2006).
- 44 Devi, T. S., Somayajulu, M., Kowluru, R. A. & Singh, L. P. TXNIP regulates mitophagy in retinal Müller cells under high-glucose conditions: implications for diabetic retinopathy. *Cell Death Dis* **8**, e2777, doi:10.1038/cddis.2017.190 (2017).
- 45 Zhong, Y. *et al.* Activation of endoplasmic reticulum stress by hyperglycaemia is essential for Müller cell-derived inflammatory cytokine production in diabetes. *Diabetes* **61**, 492-504, doi:10.2337/db11-0315 (2012).
- 46 Ola, M. S. Effect of hyperglycaemia on insulin receptor signaling in the cultured retinal Müller glial cells. *Biochem Biophys Res Commun* **444**, 264-269, doi:10.1016/j.bbrc.2014.01.052 (2014).
- 47 Rajah, T. T., Olson, A. L. & Grammas, P. Differential glucose uptake in retina- and brain-derived endothelial cells. *Microvasc Res* **62**, 236-242, doi:10.1006/mvre.2001.2337 (2001).
- 48 Lambert, V. *et al.* Laser-induced choroidal neovascularization model to study age-related macular degeneration in mice. *Nat Protoc* **8**, 2197-2211, doi:10.1038/nprot.2013.135 (2013).
- 49 Mooradian, A. D. Dyslipidaemia in type 2 diabetes mellitus. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* **5**, 150-159, doi:10.1038/ncpendmet1066 (2009).
- 50 Tremblay, J. & Hamet, P. Biomarkers of vascular complications in type 2 diabetes. *Metabolism* **64**, S28-32, doi:10.1016/j.metabol.2014.10.032 (2015).
- 51 Kowluru, R. A., Mishra, M., Kowluru, A. & Kumar, B. Hyperlipidemia and the development of diabetic retinopathy: Comparison between type 1 and type 2 animal models. *Metabolism* **65**, 1570-1581, doi:10.1016/j.metabol.2016.07.012 (2016).
- 52 Ulas, F., Balbaba, M., Ozmen, S., Celebi, S. & Dogan, U. Association of dehydroepiandrosterone sulfate, serum lipids, C-reactive protein and body mass index with age-related macular degeneration. *Int Ophthalmol* **33**, 485-491, doi:10.1007/s10792-013-9728-4 (2013).

- 53 Delcourt, C. *et al.* Associations of cardiovascular disease and its risk factors with age-related macular degeneration: the POLA study. *Ophthalmic Epidemiol* **8**, 237-249 (2001).

FIGURES

Figure 1. Effect of HFHF diet on body weight gain and tissues. (A) Body weight (grams) evolution during the 13 weeks of nutritional experiments. Food (B) and water (C) consumption (grams) per rat during the 13 weeks of nutritional experiments. (D) Percentage of total body fat per rat. (E) Percentage of lean mass per rat. (F) Percentage of total water per rat. Figures A, B and C: Values are means $\pm$ SEM. ANOVA followed by Bonferroni test is performed. Figures D to F: Values are means $\pm$ SD (n=8). Mann-Whitney test was performed. Data with different * are significantly different at $P < 0.05$; ** at $P < 0.01$; *** at $P < 0.001$.

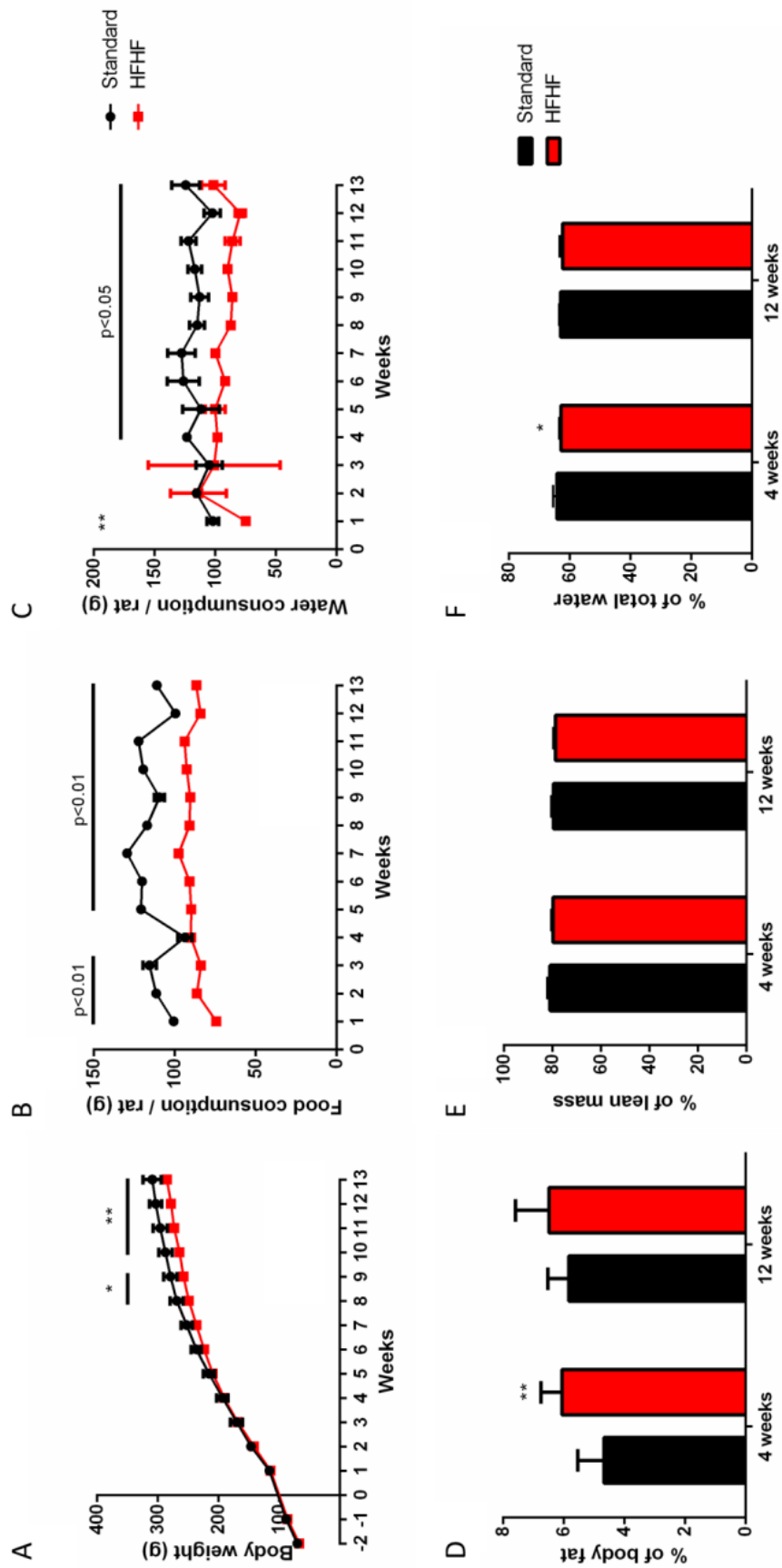


Figure 2. Effect of HFHF diet on plasma analytes. Fasted glycaemia (A, for 8 days of diet; D, for 5 weeks of diet and G, for 12 weeks of diet), fasted lipids (mmol/L) (B, for 8 days of diet; E, for 5 weeks of diet and H, for 12 weeks of diet) and fasted cytokines (C, for 8 days of diet; F, for 5 weeks of diet and I, for 12 weeks of diet). Values are means $\pm$ SD (n=16 for 8 days group, and n=8 for 5 weeks and 12 weeks). Mann-Whitney test was performed. Data with different * are significantly different at $P < 0.05$; ** at $P < 0.01$; *** at $P < 0.001$; **** at $P < 0.0001$.

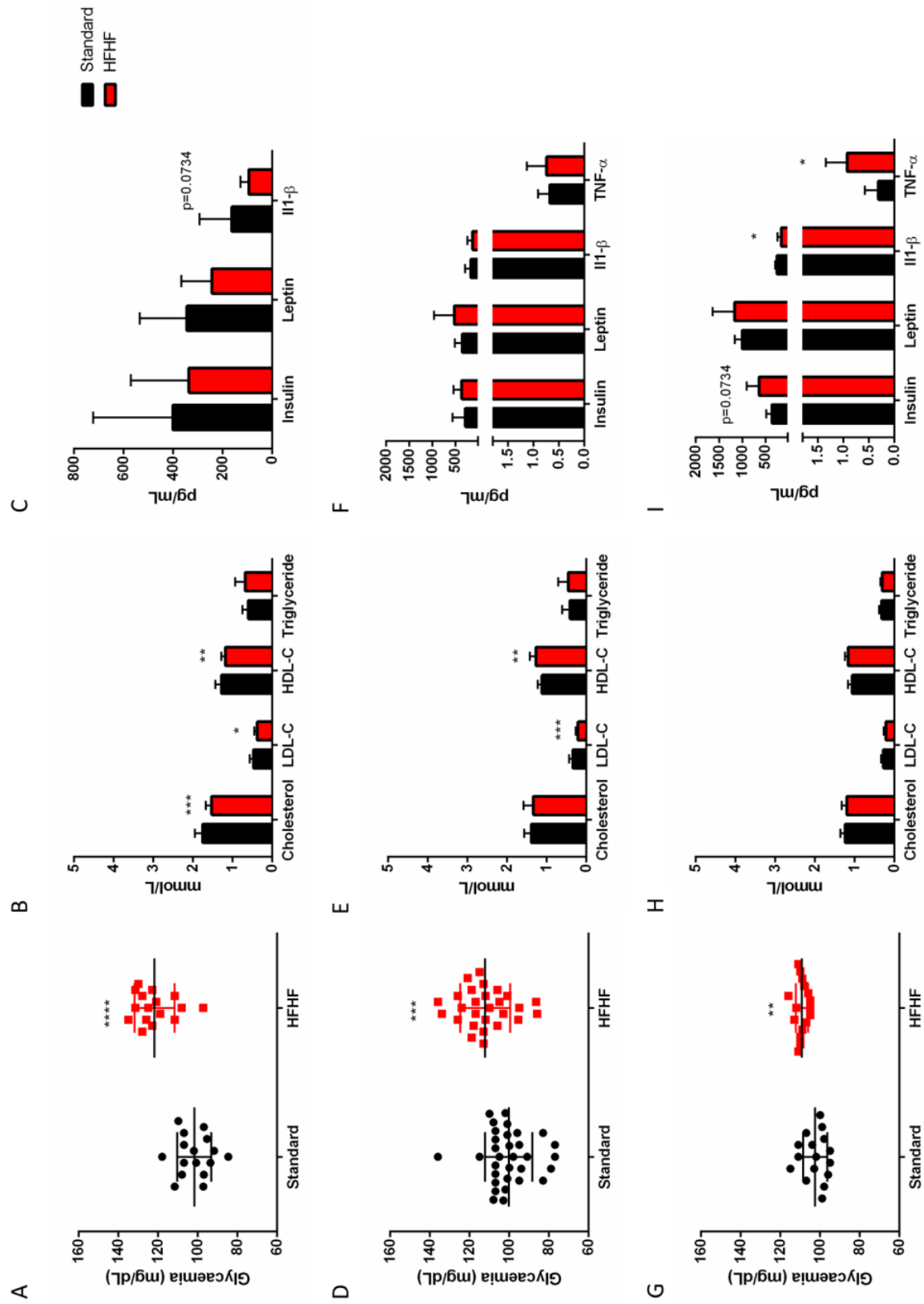


Figure 3. Glucose metabolism is impaired after 8 days of HFHF diet. Blood glucose (A1, for 8 days of diet; B1, for 4 weeks of diet and C1, for 12 weeks of diet) and plasma insulin values (A3, for 8 days of diet; B3, for 4 weeks of diet and C3, for 12 weeks of diet) at different times after intraperitoneal administration of glucose solution (2g/kg body weight). Area under the curve (AUC) values for glucose (A2, for 8 days of diet; B2, for 4 weeks of diet and C2, for 12 weeks of diet) and insulin (A4, for 8 days of diet; B4, for 4 weeks of diet and C4, for 12 weeks of diet) concentrations. Blood glucose (A5, for 8 days of diet; B5, for 4 weeks of diet and C5, for 12 weeks of diet) values at different times after intraperitoneal administration of an insulin solution (0.5 U/kg body weight). Area under the curve (AUC) values for glucose concentrations (A6, for 8 days of diet; B6, for 4 weeks of diet and C6, for 12 weeks of diet). Results are the mean $\pm$ SD (n= 8 animals per group). *: P < 0.05; **: P < 0.01; ***: P < 0.001 after Mann-Whitney test.

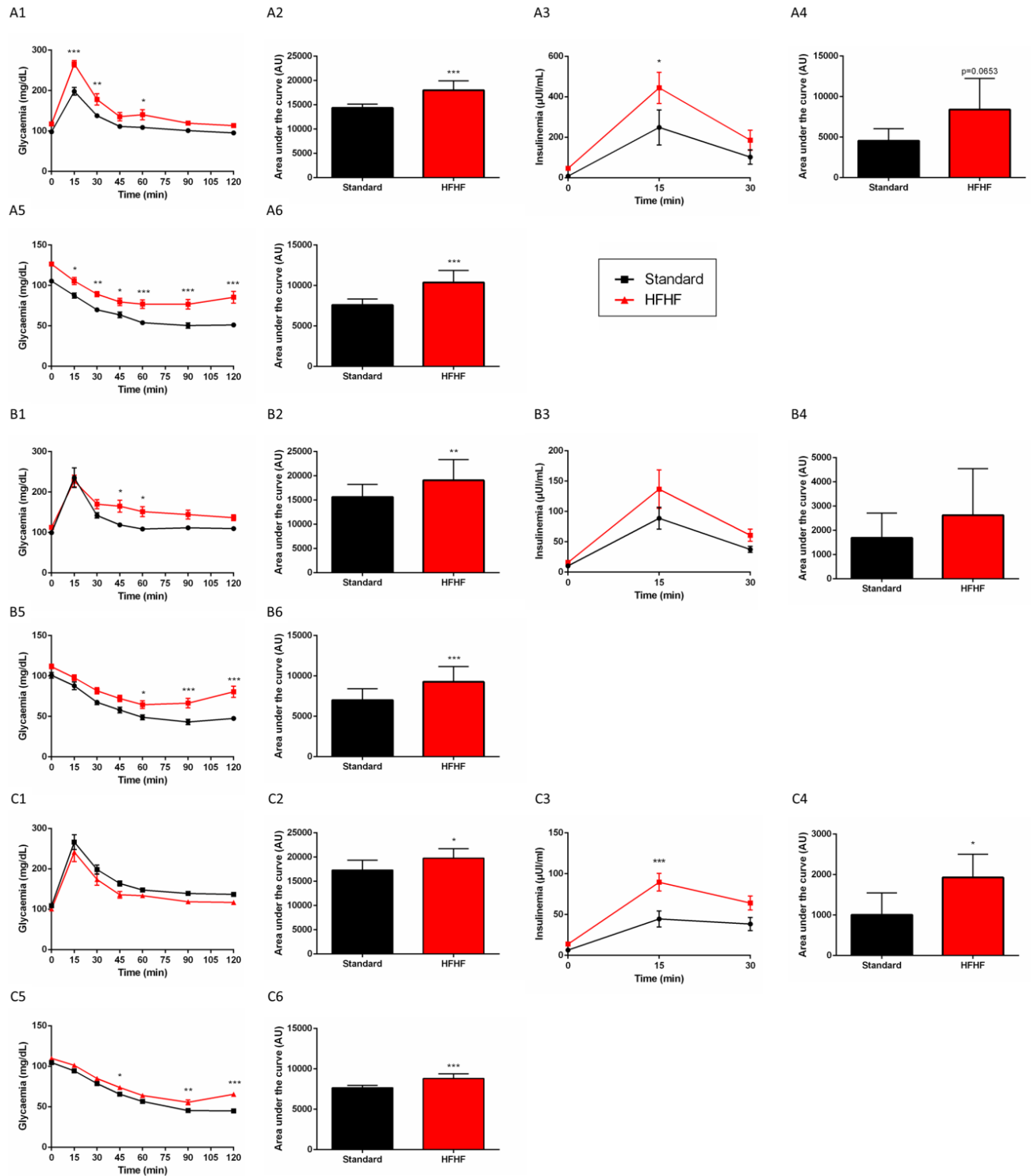


Figure 4. HFHF diet induces liver steatosis. (A) Hepatosomatic index. (B) Amount of lipids in the liver (milligrams) per gram of liver. Amount of different classes of fatty acids, saturated fatty acids, monounsaturated fatty acids and polyunsaturated fatty acids (micrograms) per milligram of liver of rats fed during 8 days (C), 5 weeks (D) and 13weeks (E) with HFHF or standard diet. Bars represent the mean $\pm$ SD of values obtained from n = 8 (5 weeks and 13 weeks) and n = 16 (8 days). *: P < 0.05; **: P < 0.01; ***: P < 0.001; ****: P < 0.0001 after Mann-Whitney test.

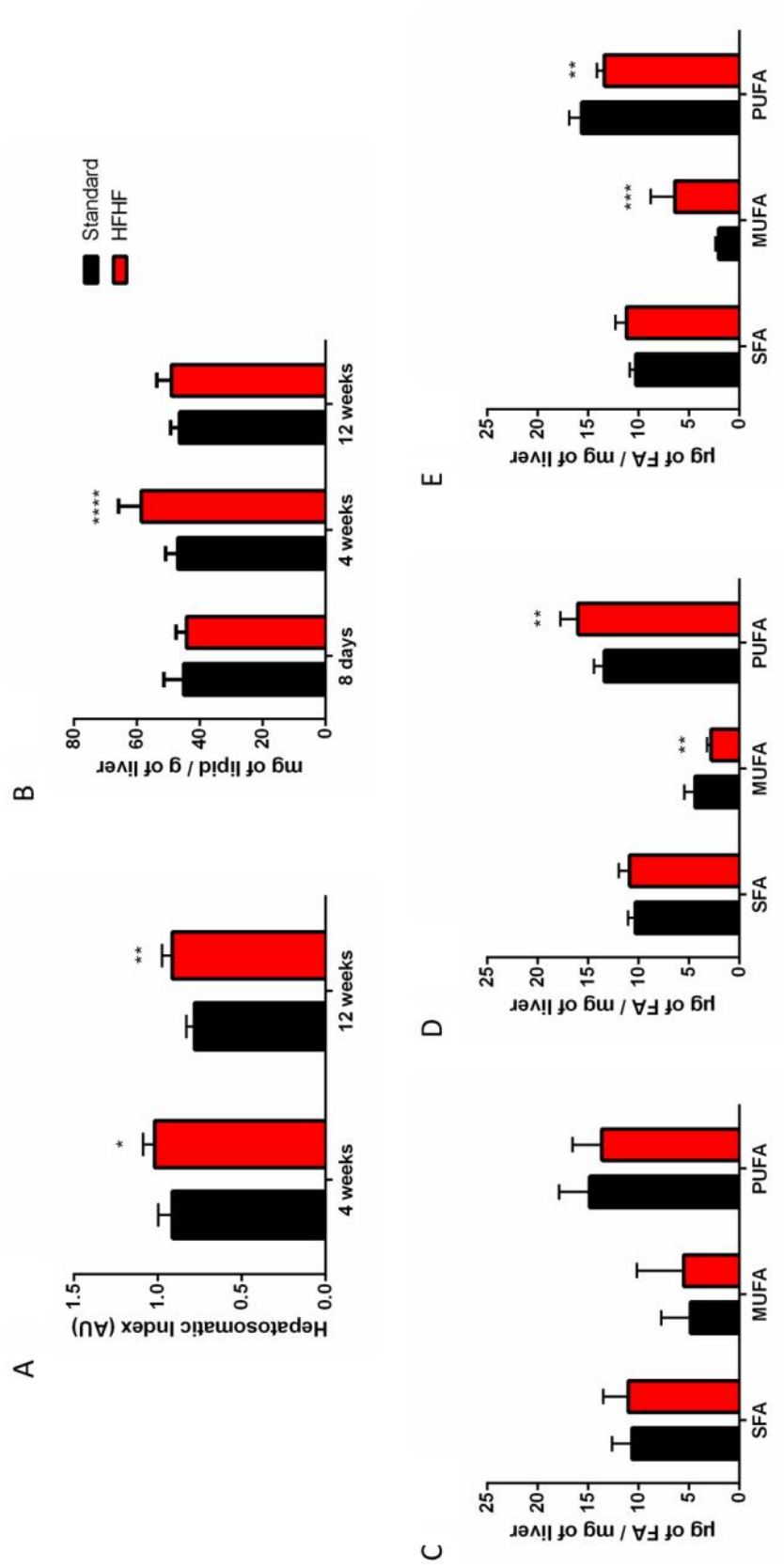


Figure 5. HFHF diet triggers a decrease in cone photoreceptor sensitivity. 8.02 Hz Flicker electroretinographic data of HFHF or Standard fed rats during 8 days (A), 4 weeks (B) and 12 weeks (C). Data of the amplitude (μV) of the electroretinographic response as a function of the light stimulus intensity ($\log(I)$), ($n=8$ per group). The first peak corresponds to the maximal response of rods and the second peak to the maximal response of cones.

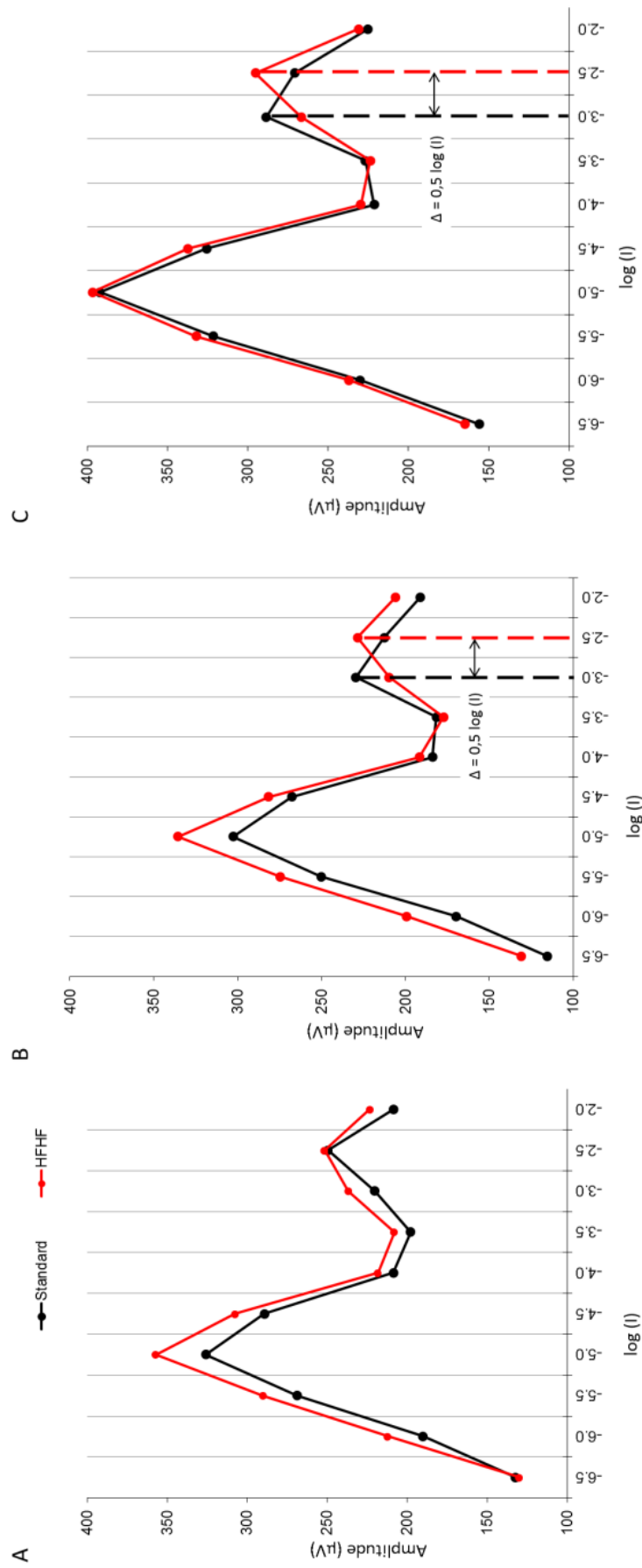


Figure 6. HFHF diet emphasizes laser-induced choroidal neovascularization (CNV). Representative images of fluorescein (A1) and indocyanine green (B1) angiographies taken after 1, 2 and 3 weeks post laser impacts in standard or HFHF Bruch's membrane. CNV correspond to the filling of the new vessels. Semi-quantification of CNV (ratio between area of fluorescein (A2) or indocyanine green (B2) and optic disc area) at 1, 2 and 3 weeks after laser-induced CNV in rats fed during 5 weeks with either the standard or HFHF diets. Bars represent the mean $\pm$ SD of values obtained from n = 6. *: P < 0.05; Standard versus HFHF (Mann-Whitney test).

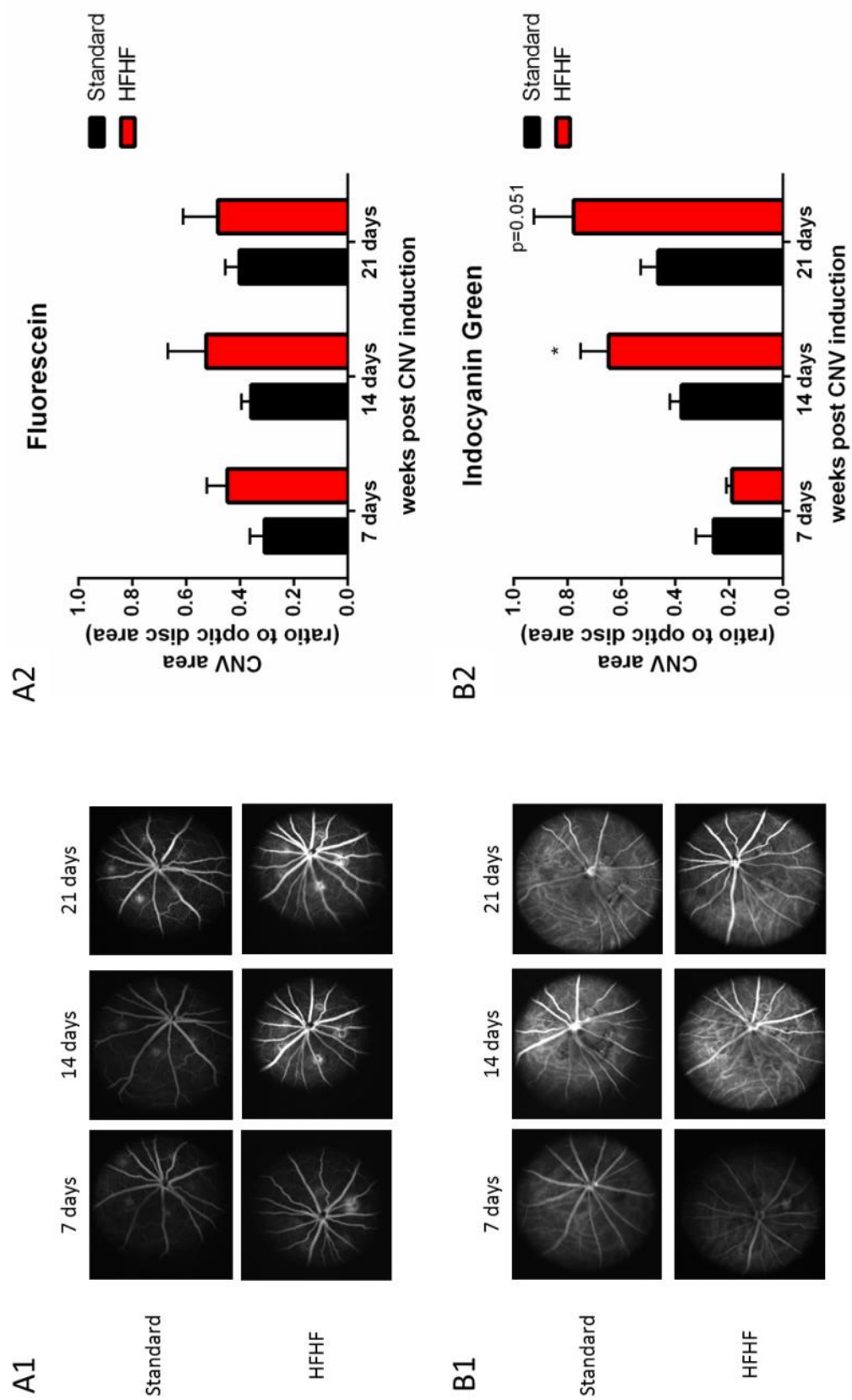
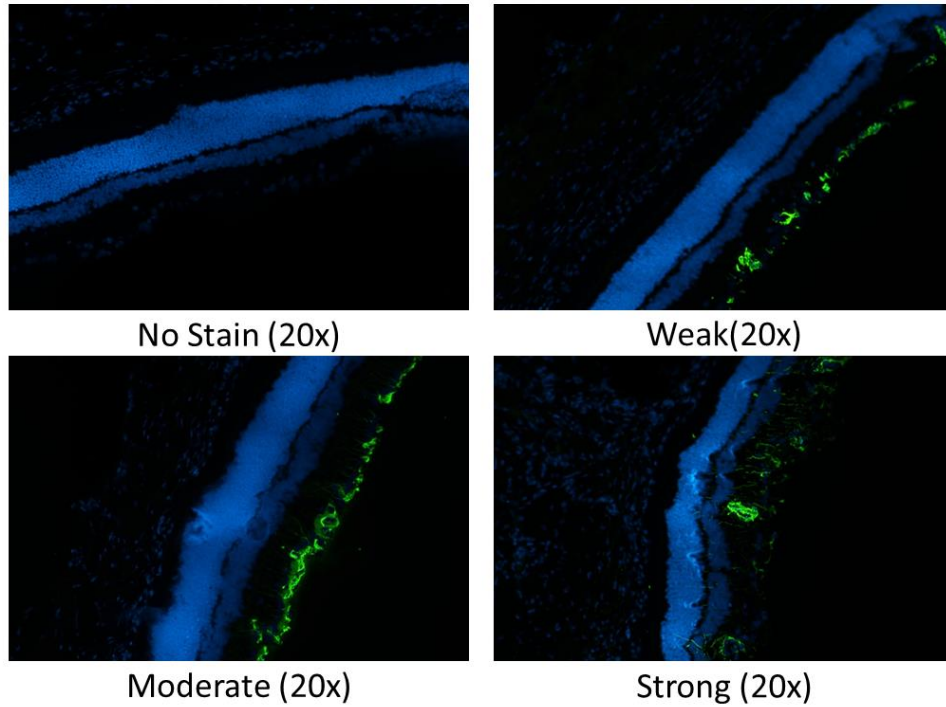


Figure 7. HFHF diet increases retinal gliosis. (A) Reading table. (B) Representative images of the GFAP IHC signals at 20x magnification. (C) Scoring of IHC signals associated with GFAP expression in Müller glial cells from strong to no signal. Statistical analysis; ** means $P < 0.01$ (Contingency Table).

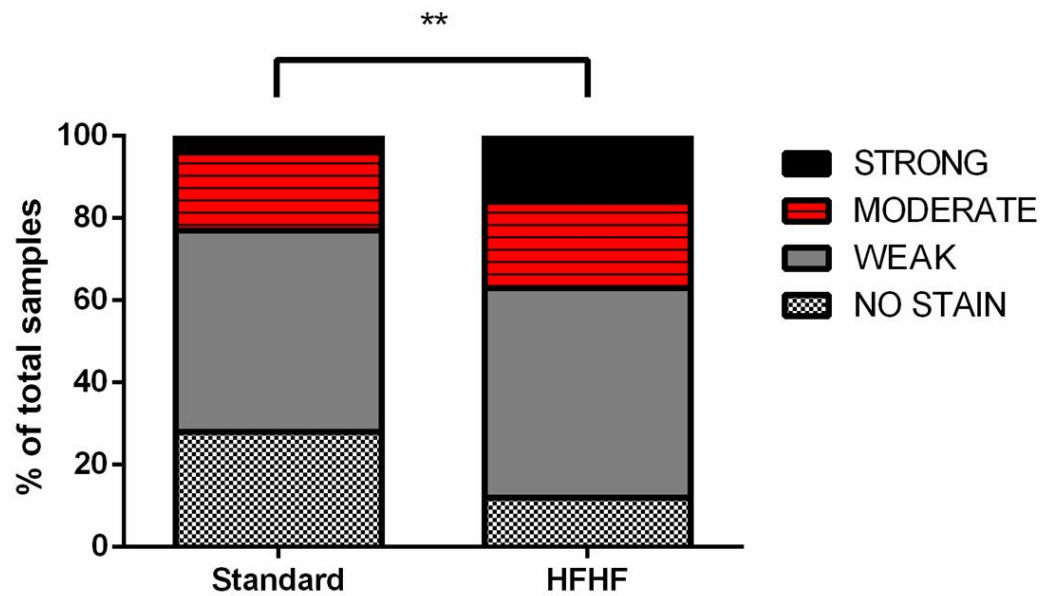
A

No stain	No cell stained in the retina
Weak	Only few cells stained in the ganglion cell layer
Moderate	Cells stained in the ganglion cell layer and some extensions in the inner retina
Strong	Extensions through the thickness of the retina strongly stained

B



C



C. Résultats principaux et conclusions

L'objectif de cette étude était d'identifier les conséquences précoces de la consommation d'une alimentation diabétogène composée de fructose et de lipides saturés (HFHF) sur la rétine, et d'associer ces changements aux changements métaboliques.

Les rats nourris avec le régime HFHF pendant 13 semaines ont présenté une augmentation de la masse grasse, non associée à la prise de poids, ainsi qu'une augmentation plasmatique de TNF- α , en accord avec le rôle sécrétoire du tissu adipeux. Nos résultats indiquent chez les rats nourris au régime HFHF, de manière précoce, dès huit jours, une dérégulation du métabolisme du glucose caractérisée par une hyperglycémie à jeun, une intolérance au glucose, une résistance à l'insuline, sans hyperinsulinémie ni d'hyperleptinémie, qui sont des caractéristiques apparaissant à des stades tardifs de diabète. De plus, les rats sous régime HFHF ont développé une stéatose hépatique à cinq et treize semaines alors qu'ils n'ont pas développé de dyslipidémie. En effet, ces données sont en accord avec des études démontrant la nécessité d'une hyperinsulinémie pour le développement de dyslipidémie (Hallfrisch, Reiser et al. 1983; Crapo, Kolterman et al. 1986).

Au regard de ces données, il semblerait que la dérégulation du métabolisme du glucose soit une des premières altérations induite par le régime HFHF chez le rat Brown Norway.

Les analyses électrorétinographiques menées en conditions scotopiques et photopiques simple flash n'ont pas révélé d'altérations fonctionnelles significatives. En revanche, l'analyse Flicker 8Hz a mis en évidence une diminution de la sensibilité des cônes à quatre et douze semaines de régime. Ces résultats sont en accord avec des données cliniques sur les diabétiques détectés depuis moins de cinq ans, qui présentent une diminution de la vision de couleur, sans anomalies structurales de la rétine (Daley, Watzke et al. 1987; Verma, Rani et al. 2009; Gella, Raman et al. 2015). La perte de sensibilité des cônes semble être un indicateur précoce de mécanismes neurodégénératifs induits par le SMet.

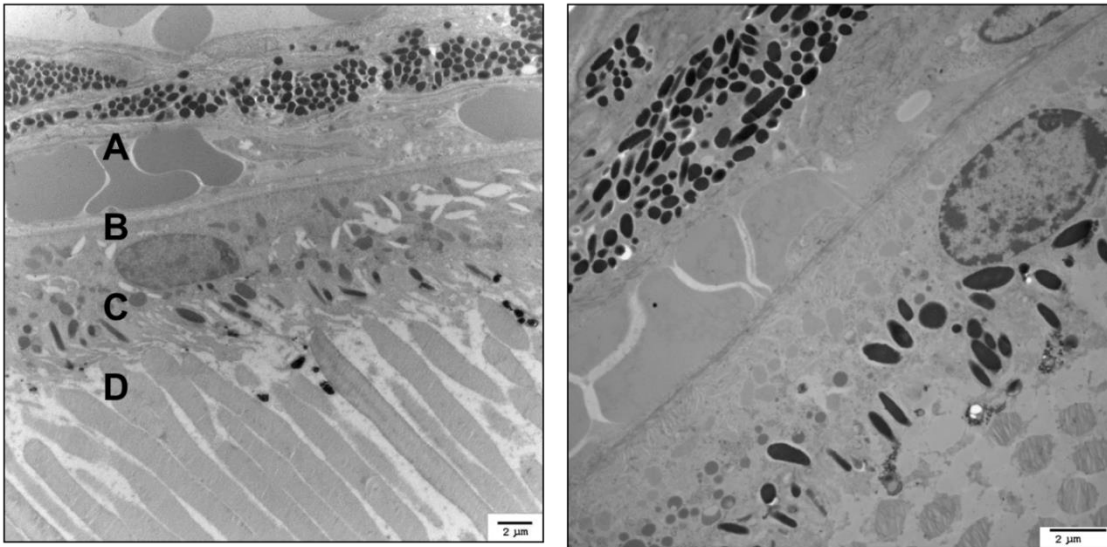
De plus, quatre semaines de régime HFHF suffirent à créer un terrain favorable à la néovascularisation choroïdienne induite par impacts laser dans la membrane de Bruch. La néovascularisation est également associée à une activation des cellules gliales de Müller. Ce résultat traduit l'implication de la dérégulation du métabolisme du glucose dans le développement de la néovascularisation. Les cellules de Müller activées pourraient être impliquées dans les phénomènes de néovascularisation via la sécrétion de VEGF.

D'autre part, des analyses en microscopie électronique à transmission ont été réalisées. Les échantillons ont été préparés par fixation en glutaraldéhyde 3% et paraformaldéhyde 2% dans un tampon cacodylate, puis après post-fixation osmotique et déshydratation, ont été imprégnés dans une résine époxy. Les observations ont été réalisées sur des sections de 86 nm d'épaisseur après contraste à l'acétate d'uranyle et citrate de plomb. Ces observations, non incluses dans l'article, ont permis de découvrir à 12 semaines de régime HFHF, le dépôt de matériel amorphe, correspondant probablement à des lipides, au niveau de la membrane de Bruch (figure ci-après). Ces observations témoignent d'une altération probable de la membrane de Bruch. Ces données sont en accord avec les études montrant que l'hyperglycémie chronique entraîne une dysfonction de l'EPR, la formation d'œdème, l'altération de la barrière hémato-rétinienne (Desjardins, Yates et al. 2016). Des observations complémentaires seraient nécessaires pour confirmer ces résultats.

Enfin, notre étude met en exergue l'effet précoce et néfaste du régime HFHF sur la rétine. Bien que les rats Brown Norway soient résistants à la dérégulation du métabolisme des lipides, il semblerait que la dérégulation du métabolisme du glucose soit suffisante pour induire des altérations de la rétine.

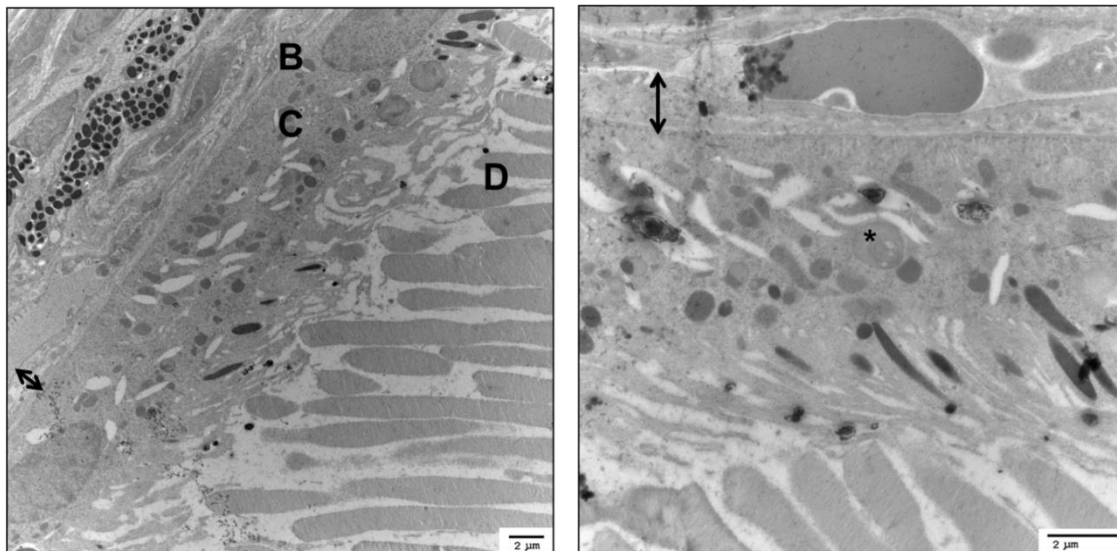
Ces résultats, surprenants, à propos de la dyslipidémie nous ont conduits à nous questionner sur l'efficacité du régime, ou sur la résistance des rats Brown Norway à développer des altérations du métabolisme des lipides. Or, il semblerait que l'efficacité du régime HFHF varie selon la souche de rat utilisée (Toop and Gentili 2016), ou le fond génétique des souris utilisées (Montgomery, Fiveash et al. 2015). Nous avons donc réalisé l'étude qui va suivre afin d'éclaircir ce point.

Régime standard 12 semaines



(A) Choroïde, (B) Membrane de Bruch, (C) Epithélium Pigmentaire Rétinien, (D) Segments externes des photorécepteurs

Régime HFHF 12 semaines



↔ Matériel amorphe dans la membrane de Bruch

* Phagosome

II. Différences métaboliques entre des rats Brown Norway et Wistar nourris par un régime diabétogène

A. Problématique

Le syndrome métabolique (SMet) présente d'importants enjeux sociaux et économiques. Les causes du SMet présentent des composantes génétiques et environnementales. En effet, l'ethnie, le genre, l'histoire familiale du diabète et l'âge participent à la pathogenèse du SMet (Das, Pal et al. 2012; Rampal, Mahadeva et al. 2012).

De plus, un régime alimentaire déséquilibré et un mode de vie sédentaire participent au développement du SMet (van der Berg, Stehouwer et al. 2016; Mozaffarian 2017). Compte tenu de la complexité du syndrome, la recherche d'un modèle pertinent partageant les mêmes caractéristiques qu'un SMet développé chez l'homme apparaît comme un véritable challenge.

Les rongeurs sont des modèles communément utilisés pour l'induction du SMet, via des modifications génétiques et des inductions pharmacologiques (Wong, Chin et al. 2016). Dans un de ces modèles, le SMet est induit par une alimentation riche en fructose seul, ou combinée à des lipides saturés. Toutefois, la réponse métabolique suite à un régime gras (Montgomery, Hallahan et al. 2013) ou riche en fructose (Montgomery, Fiveash et al. 2015) est différente selon une souche de souris à une autre. Dans l'étude précédente, le rat Brown Norway fut utilisé car il constitue une souche de rat communément utilisée pour l'étude de la néovascularisation choroïdienne, afin de mimer les mécanismes de la DMLA exsudative (Tobe, Takahashi et al. 1995; Ogata, Matsushima et al. 1996; Jiao, Mo et al. 2013). L'idée émergente que le SMet pourrait être un facteur de risque pour la DMLA (Ghaem Maralani, Tai et al. 2015) questionne sur la capacité des rats Brown Norway à développer un SMet par rapport à d'autres souches de rat, en réponse à un régime diabétogène, dans la mesure où ils ne développent pas de dyslipidémie.

Ainsi, l'étude qui va suivre, soumise dans le journal *Plos One*, s'est concentrée sur la comparaison de la réponse métabolique des rats Brown Norway et Wistar, une souche de rat communément utilisée en laboratoire, après huit et vingt-huit jours de régime composé de 60% de fructose et 9% de lard (HFHF).

B. Article

Metabolic differences between Brown Norway rats and Wistar rats fed with high fructose high fat diet.

Elisa Vidal^{1, 2}, Marie-Annick Maire¹, Stéphane Grégoire¹, Ségolène Gamber^{1, 3}, Lionel Bretillon^{1*}

¹ Eye and Nutrition Research Group, Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation, AgroSup Dijon, INRA, CNRS, Université Bourgogne Franche-Comté, Dijon, France

² Horus Pharma Laboratories, Saint Laurent du Var, France

³ Department of Clinical Biochemistry, University Hospital, Dijon, France

*Corresponding author

E-mail: lionel.bretillon@inra.fr

ABSTRACT

The worldwide prevalence of metabolic syndrome varies from less than 10% to 84%, according to the origin and ethnicity of the populations and the criteria used to define metabolic syndrome. Metabolic syndrome increases the risk for cardiovascular disease and type 2 diabetes, and represents a global burden with high social and economic impacts. Numerous studies tried to reproduce metabolic syndrome in rodent models but they showed conflicting results regarding not only the different parameters of metabolic syndrome but also the environmental factors, study design, animal species and strains. In the present study, we investigated whether two strains of rats: Wistar and Brown Norway rats equally developed metabolic syndrome on a high fructose + high fat diet, based on lipid profile, glucose and insulin tolerance, and liver steatosis. Our study reveals strong differences between both strains. Brown Norway rats developed deregulation of glucose metabolism while Wistar rats preferentially developed dyslipidemia.

INTRODUCTION

Metabolic Syndrome (MetS) is characterized by a recognizable complex of symptoms including obesity, insulin resistance, dyslipidemia and hypertension (Alberti, Zimmet et al. 2005). The prevalence of MetS is around 20-25% in the adult population worldwide (Alberti, Zimmet et al. 2005). Its prevalence is particularly heterogeneous, depending on country, ethnicity, gender and age (Kaur 2014; O'Neill and O'Driscoll 2015). MetS is a risk factor of type II Diabetes, cardiovascular disease (CVD), age-related macular degeneration (AMD) (Chopra, Chander et al. 2012; Ghaem Maralani, Tai et al. 2015), non-alcoholic fatty liver disease, kidney dysfunction and increases total risks of mortality (Ford 2005). Thus, MetS is a global health problem which has important economic and social impacts. The causes of MetS are both hereditary and environmental. Indeed ethnicity, gender, family history of diabetes, and age participate to the pathogenesis of MetS (Das, Pal et al. 2012; Rampal, Mahadeva et al. 2012). Moreover, unbalanced diet and sedentary lifestyle participate to the development of MetS (van der Berg, Stehouwer et al. 2016; Mozaffarian 2017). Given the complexity of the syndrome, the research for the most human-relevant model is challenging. Numerous models exist to understand the pathogenesis of this disease, replicating more or less the symptoms and physical or biochemical findings in humans. Rat and mouse are commonly used in models recapitulating MetS by using genetically modifications, dietary manipulations or drugs, as reviewed by Wong (Wong, Chin et al. 2016). In one of these models, MetS is induced by feeding with a high fructose diet alone or in combination with saturated fats. However as pointed out by Montgomery, the metabolic response to high fat- (Montgomery, Hallahan et al. 2013) or high fructose diet (Montgomery, Fiveash et al. 2015) differs in one mouse strain from another, depending on their capacity to develop liver steatosis. In studies on the exudative form of age-related macular degeneration (AMD), laser impact in Bruch's membrane is commonly used to trigger choroidal neovascularization and therefore mimic the

neovascular form of AMD. As a pigmented strain Brown Norway rat has historically been considered as the standard model in studies on choroidal neovascularization (Tobe, Takahashi et al. 1995; Ogata, Matsushima et al. 1996; Jiao, Mo et al. 2013). The emergent idea that MetS would be a risk factor for AMD (Ghaem Maralani, Tai et al. 2015) questioned on whether Brown Norway rats would develop MetS in response to a diabetogenic diet. To our knowledge, only one study reported the metabolic adaptation to high fructose diet in Brown Norway rats. In this work, several parameters of MetS but no hyperlipidemia were recapitulated (Thierry, Pasquis et al. 2014). By comparison, Wistar rats develop hypertriglyceridemia when fed on a diet rich in fructose (Toop and Gentili 2016).

We therefore aimed at comparing Brown Norway rats and Wistar rats on their metabolic response to 8 days and 28 days feeding on a 60% fructose and 9% pork lard diet.

MATERIALS AND METHODS

Animals

The ethics committee of our institution (Comité d’Ethique de l’Expérimentation Animale 105, Dijon, France) approved all interventions and animal care procedures.

Male Brown Norway rats (4 weeks of age, n=32) and male Wistar rats (4 weeks of age, n=32) were purchased from Charles River (L’Arbresle, France) and Janvier Labs (Le Genest Saint Isle, France) respectively. They were housed in a controlled environment at 23°C ± 1°C, 55-60% humidity, under a 12-hour light/12-hour dark cycle, 780 lux in light phase, had free access to food and tap water. The rats were acclimatized 2 weeks before they were fed on either a standard rodent chow (SDS diets, UK) or a chow with 60% Fructose and 9% pork lard (HFHF) for 8 days (n=16 per group) or 28 days (n=16 per group). At each time point, animals were proceed to intraperitoneal glucose tolerance test (ipGTT) and intraperitoneal insulin tolerance test (ipITT).

Measurement of intra peritoneal glucose Tolerance Test (ipGTT) and intra peritoneal insulin tolerance test (ipITT)

Rats were placed in individual cages and had free access to tap water. ipGTT and ipITT were performed in 5-h-fasted rats by measuring blood glucose from the tail vein with an automatic blood glucose analyzer (mylife Pura, Ypsomed) before (0 time) and at 15, 30, 45, 60, 120 minutes after intra peritoneal injection of 20% glucose (2 g/kg) or intraperitoneal injection of insulin (0.5 units/kg).

Collection of samples

Animals were fasted overnight, they were weighed, then euthanized by an intraperitoneal injection of a lethal dose of pentobarbital (150 mg/kg body weight, Ceva, Santé animale, Libourne, France) at and exsanguination by intracardiac puncture after 8 days and 28 days of diet. Plasma was prepared by centrifugation (3000 rpm during 20 min, 4°C) and kept at -80°C until further analyses. Liver was weighed, frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C.

Plasma analyses

Plasma levels of total cholesterol (TC), high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C), low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C), triglycerides (TG) were evaluated by standard automatic analyzers at the Clinical Biochemistry Department of the Dijon University Hospital (Dijon, France). Plasma levels of insulin were quantified using a Rat Insulin ELISA kit (ALPCO, Salem, New Hampshire) according to the manufacturer's instructions.

Liver analyses

Frozen hepatic tissue samples (300 mg) were homogenized in 0.73% sodium chloride and lipids were extracted following the method of Folch (Folch, Lees et al. 1957). Fatty acids were converted into methyl esters using boron trifluoride in methanol according to Morrison and Smith (Morrison and Smith 1964). Fatty acid methyl esters were extracted with hexane and analyzed 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 (FID). Hydrogen was used as the carrier gas (inlet pressure, 210 kPa). The injection volume was 1 µL. 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. The data were processed using the EZChrom Elite software (Agilent Technologies, Massy, France) and reported as percentages of the total fatty acids.

Statistical analysis

When appropriate, data were statistically analyzed using the unpaired Mann Whitney test or a two way ANOVA followed by Fisher's LSD post-hoc test. The level of significance was set at $P \leq 0.05$. All results were analyzed using GraphPad Prism version 6.01 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, United States). Data are presented as mean ± standard error of the mean (SEM).

RESULTS

Body weight and circulating factors

Body weight was unchanged in HFHF-fed BN and W rats when compared to standard diet fed control rats (Fig 1.a). In BN rats, plasma cholesterol was significantly decreased in HFHF-fed rats during 8 days, but was unchanged in HFHF-fed rats during 28 days. There was no change in plasma triglycerides of BN rats fed with HFHF diet, when compared to standard diet, at all time points of the study. In W rats, plasma cholesterol was significantly increased in HFHF-fed rats for 8 days ($P < 0.001$) and 28 days ($P < 0.05$) and a similar trend was observed for plasma triglycerides. HDL-cholesterol was significantly decreased in BN rats fed with HFHF diet during 8 days ($P < 0.01$), but was increased in BN rats fed with HFHF diet during 28 days ($P < 0.01$). No change in plasma HDL-C was revealed in W. In BN rats, LDL-cholesterol was significantly decreased in HFHF-fed rats during 8 days ($P < 0.05$) and 28 days ($P < 0.001$).

On the contrary, in W rats, LDL-cholesterol was increased in HFHF fed rats during 8 days ($P < 0.01$), but unchanged at 28 days, compared to standard diet-fed rats (Fig 1.b and c). Fasting blood glucose significantly increased with HFHF-feeding during 8 days in BN rats ($P < 0.0001$, Fig 1.d), and in both strains at 28 days of the study (Fig 1.e). Fasting insulinemia was similar in HFHF fed BN rats compared to standard-fed rats for 8 days and 28 days (Fig 1.f and g). HFHF-fed W rats presented a non-significant increase in fasting insulin levels at 8 days ($P = 0.0827$) and 28 days ($P = 0.0718$).

Glucose and Insulin tolerance

Intraperitoneal glucose tolerance test (GTT) was carried out at 8 days and 28 days of feeding to evaluate the whole body glucose clearance in both strains. HFHF-fed BN and W rats during 8 days (Fig 2.a and b) and 28 days (Fig 2.c and d) exhibited an impairment in glucose tolerance compared to standard diet-fed rats, as revealed by a significant increase in the area under curve (AUC) of plasma glucose concentration (+25% in HFHF-fed BN at 8 days, $P < 0.001$; +22% in HFHF-fed BN at 28 days, $P < 0.01$; +10% in HFHF-fed W at 8 days, $P < 0.01$; +14% in HFHF-fed BN at 28 days, $P < 0.05$). An intraperitoneal insulin tolerance test (ITT) was performed at 8 days (Fig 3.a and b) and 28 days (Fig 3.c and d) of diet. HFHF-fed BN rats developed insulin resistance, as revealed by a significantly increase in the AUC of plasma glucose concentration during ITT (+36.6% at 8 days of feeding, $P < 0.001$; +32.4% at 28 days feeding, $P < 0.001$). Blood glucose during ITT was unchanged in HFHF-fed W rats when compared to the control group.

Lipid accumulation in the liver

In both strains, the hepatosomatic index was higher in HFHF-fed rats compared to standard diet-fed rats at 28 days (Fig 4.a). Similarly, total lipids in the liver of HFHF-fed BN and W rats were significantly increased at 28 days (Fig 4.c), while in contrast there was no change after 8 days of feeding (Fig 4.b). In addition, we observed striking differences in fatty acid

composition of the liver between BN and W rats. Saturated fatty acids (SFA) remained unaffected in HFHF-fed BN's liver, meanwhile SFA significantly increased in HFHF-fed W rats fed during both 8 days (Fig 4.d, $P < 0.05$) and 28 days (Fig 4.e, $P < 0.01$). In the liver of W rats, monounsaturated fatty acids (MUFA) significantly increased in rats fed 8 days ($P < 0.01$) and 28 days ($P < 0.001$) while there was no change in BN rats at 8 days of HFHF-feeding, and a significant decrease at 28 days ($P < 0.01$). Polyunsaturated fatty acids (PUFA) significantly decreased in the liver of HFHF-fed W rats at 8 days ($P < 0.001$) and 28 days ($P < 0.001$), whereas PUFA significantly increased in the liver of BN rats fed with HFHF diet during 28 days ($P < 0.01$) compared to control rats. More precisely, both omega-3 and omega-6 fatty acids decreased in HFHF-fed W rats at 8 days (Fig 4.f, $P < 0.01$) and 28 days (Fig 4.g, $P < 0.001$), meanwhile omega-6 significantly increased in the liver of BN rats fed with HFHF during 28 days (Fig 4.g, $P < 0.01$).

DISCUSSION

This study highlights strain differences in the metabolic response of rats fed on a diet with high fructose and high saturated fat. High fructose diet is commonly used to induce MetS. MetS is characterized by a cluster of metabolic deteriorations like hyperglycemia, insulin resistance, dyslipidemia and fatty liver (Alberti, Zimmet et al. 2005). Fructose may be a major responsible factor of the global epidemics of diabetes (Johnson, Segal et al. 2007), particularly in USA where the increased consumption of high fructose corn syrup is associated to the prevalence of obesity and MetS (Bray, Nielsen et al. 2004; Schulze, Manson et al. 2004). Unambiguously from the literature, metabolic alterations triggered by a high fructose and high fat diet are heterogeneous and are linked to differences in study design. Indeed, among the studies, variation may be due to differences in duration of diet administration from few days to months (Thierry, Pasquis et al. 2014; Cigliano, Spagnuolo et al. 2018), age of animals when they start the diet (de Castro, dos Santos et al. 2013; Dupas,

Goanvec et al. 2016), form of administration, i.e. liquid or solid (de Moura, Ribeiro et al. 2009), or concentration of fructose (Sulis, Motta et al. 2017).

The most relevant animal models for MetS are those that appropriately combine endogenous and environmental interventions leading to metabolic disturbances that are observed in humans. Our study highlights two different phenotypes following HFHF diet at 8 days and 28 days. Wistar (W) rats developed early alteration in lipid metabolism, such as elevation of plasma triglycerides and total cholesterol after 8 days of HFHF diet, while Brown Norway (BN) rats did not exhibit such lipid alterations. However, BN rats developed glucose alteration, and particularly early insulin resistance, that was not observed in W rats.

In our study, both strains did not become overweight after 28 days of HFHF diet. It should be noted that overweight and obesity are usually observed at long-term, even in W rats. The only measurement available shows no obesity in BN rats following at least 6 months of high fructose diet (Thierry, Pasquis et al. 2014). Conversely, W rats develop obesity after 12 weeks (Rabie, Heeba et al. 2015) of HFHF diet. However, some studies highlighted the lean quality of BN rats and its weak propensity to develop obesity and metabolic alterations (van Den Brandt, Kovacs et al. 2000; Hohsfield, Ehrlich et al. 2013; Gordon, Phillips et al. 2016).

In addition, the effect of HFHF diet on glucose metabolism was different between W and BN rats. In our study, we observed a higher sensitivity of BN rats to early develop insulin resistance as compared to W rats. Indeed, we showed that BN rats early developed hyperglycemia, glucose intolerance, and were resistant to insulin after 8 days of HFHF diet. W rats have impaired glucose tolerance from 8 days, developed hyperglycemia after 28 days but did not develop insulin resistance even after 28 days of HFHF diet only. This finding is consistent with the data reported by Rabie and coworkers who showed that developing a

complete MetS phenotype with insulin resistance in W rats took at least 12 weeks of HFHF diet (Rabie, Heeba et al. 2015).

One other important parameter to consider in MetS is dyslipidemia. W rats presented elevated levels of total cholesterol and triglycerides and an increase in LDL-C after 8 days, which persisted after 4 weeks of HFHF diet. Surprisingly, BN rats did not develop dyslipidemia even after 28 days of HFHF diet, despite they have developed insulin resistance, meaning that insulin resistance is also induced by other mechanisms. Thus, W rats develop preferentially alteration of lipid than glucose metabolism upon HFHF feeding.

Fructose diet has the ability to activate de novo lipogenesis in the liver (Basciano, Federico et al. 2005; Abdelmalek, Suzuki et al. 2010). Indeed, both strains of rats fed with HFHF developed liver steatosis, as illustrated by a higher hepatosomatic index and lipids accumulating in the liver. Consistently with the greater tendency of W compared to BN to develop dyslipidemia, the effects were of greater level of magnitude in W than in BN. However, the fatty acid profiles were different between the strains. Livers of HFHF-fed W rats accumulated SFA and MUFA while the levels of PUFA decreased, which is consistent with the dyslipidemia observed in this strain (Rosqvist, Iggman et al. 2014), and the development of PUFA deficiency upon liver steatosis (Moon, Hammer et al. 2009). Surprisingly, livers of HFHF-fed BN rats presented an accumulation of omega-6 PUFA, and a decrease of MUFA content. This feature is consistent with the lipoprotein profile observed in BN with higher levels of HDL-C and lower LDL-C (fig 1 c).

The only difference between the two groups in this study is the strain. BN are inbred rats whereas W are outbred animals. Inbred colonies are recognized to provide more power and require fewer animals per experiment by limiting the noise caused by allele variability at each genetic locus and phenotypic variation in outbred stocks. Outbred animals are genetically ill

defined and considered genetically more labile, and to present more diverse response upon experimental challenges. In our hands, one should notice the greater inter-individual variability in body weight, plasma triglycerides and insulinemia (fig 1), and liver steatosis (fig 4) in W than in BN rats. Nonetheless we clearly reported two different patterns in BN and W rats, i.e. the former being sensitive to deregulation in glucose metabolism, the latter in lipid metabolism.

The only fact known about genetic background of BN is that the distal half of chromosome 1, containing hundreds of genes, protects from some phenotypes of type 2 Diabetes (Warden, Slupsky et al. 2014; Warden, Bettaieb et al. 2017). Indeed, chromosome 1 presents some genes which interact with leptin gene, that could explain BN metabolism, but these genes are not fully identified. Moreover, the total number of disease causal genes in this distal half of chromosome 1 is unknown. Genetic study has demonstrated the polygenic control of diabetes-related phenotypes (Galli, Li et al. 1996). Thus, it seems that BN rats are characterized by a specific genotype, resistant enough to lipid and liver metabolism alterations induced by HFHF diet as compared to W rats.

Another element to investigate should be the gut microbiota of this strain. Indeed, BN rats present a strain metabolic signature leading to a lower plasma lipid level (total-cholesterol, VLDL, LDL), a lower expression of betaine and a choline deficiency due to reduced recycling of phosphatidylcholine in choline, leading changes in liver cells activity, as compared to other strains. Moreover, BN rats present specific changes in gut microbiota activity (Pontoizeau, Fearnside et al. 2011). Yet, gut microflora is largely impacted by the dietary habits, and particularly by fructose diet, inducing liver steatosis (Spruss, Kanuri et al. 2009). Microbiota can modulate liver function (Shobharani, Muthukumar et al. 2018), regulate fat storage (Backhed, Ding et al. 2004) and more generally is implicated in the development of MetS (Festi, Schiumerini et al. 2014).

Surprisingly, to our knowledge, there are no study showing the effect of HFHF diet in BN rats while most studies used W rats (de Moura, Ribeiro et al. 2009; Rabie, Heeba et al. 2015; Wong, Chin et al. 2016). We chose to characterize the metabolic adaptation of BN rats to HFHF diet. It was relevant to our need for better understanding the process of retinal neovascularization upon dietary changes, accounting that MetS may be a risk factor for AMD, especially in its neovascular form (Ghaem Maralani, Tai et al. 2015), and that BN rats are considered as privileged standards in studies of retinal neovascularization (Tobe, Takahashi et al. 1995; Ogata, Matsushima et al. 1996; Jiao, Mo et al. 2013; Thierry, Pasquis et al. 2014; Thierry, Pasquis et al. 2015). No clear consensus can be established on the role of plasma lipids in AMD. We reported that dietary high fructose (Thierry, Pasquis et al. 2014) favored the development of neovascular complications in the retina. Our present findings prone in favor for the role of dysregulations in glucose metabolism, but not dyslipidemia, in those side effects.

CONCLUSION

To conclude, a large amount of data demonstrates that fructose intake may be responsible for metabolic disturbances and increased risk for developing MetS. These results indicate that there is substantial strain dependency. This study shows for the first time that Brown Norway and Wistar rats develop differently metabolic alterations due to HFHF diet, i.e. Brown Norway shows greater susceptibility to modifications in glucose metabolism, Wistar rats in lipid metabolism.

FIGURES

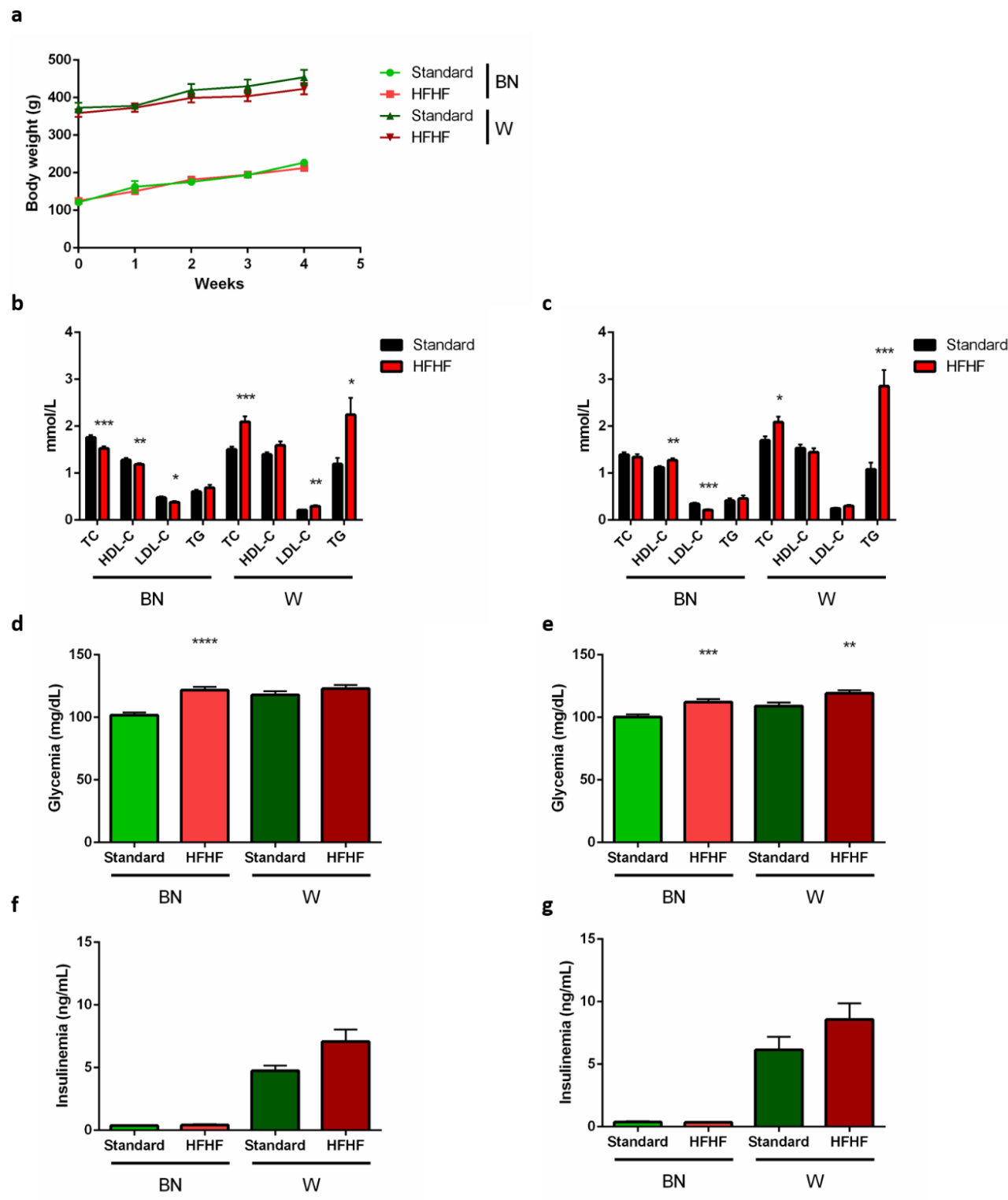


Fig 1. Body weight and circulating factors in standard and high fructose+high fat (HFHF)-fed Brown Norway (BN) and Wistar (W) rats. Body weight (a), plasma lipids at 8 days (b) and 4 weeks (c) of diet, fasted glycemia at 8 days (d) and 4 weeks (e) of diet, fasted insulinemia at 8 days (f) and 4 weeks (g) of diet. Data are the mean $\pm$ SEM, n=8-16 for each measure. Comparisons are between standard group versus HFHF group for each strain. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$; ****: $P < 0.0001$.

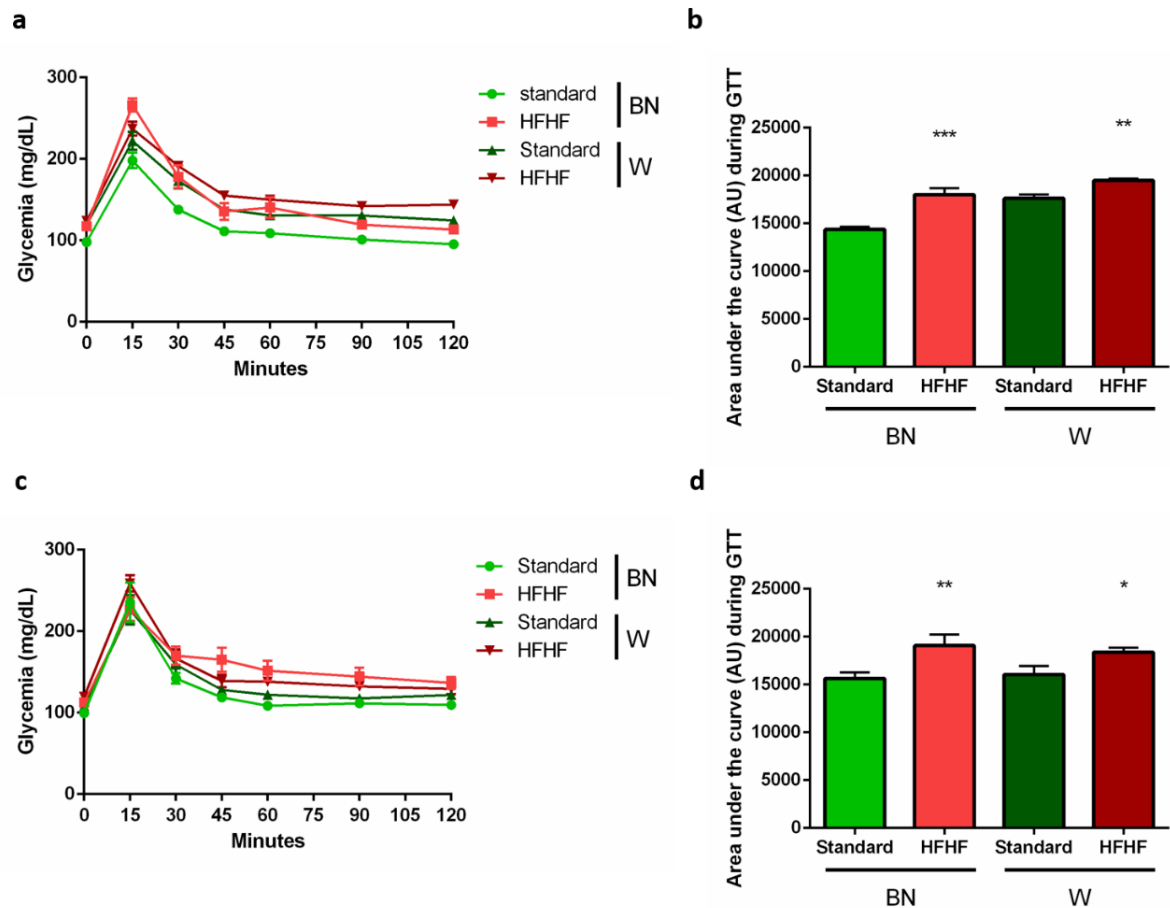


Fig 2. Glucose tolerance test (GTT) in standard and high fructose+high fat (HFHF)-fed Brown Norway (BN) and Wistar (W) rats. Plasma glucose was measured during GTT after 8 days (a, b) and 4 weeks (c, d) of feeding, and expressed as a function of time (a, c) and area under the curve (AUC) (b, d) during the 120 min-duration of GTT (ip injection of insulin 0.5 U/kg) in BN and W rats. Data are the mean $\pm$ SEM, $n=8$ for each measurement. Comparisons were done between standard group versus HFHF group for each strain. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$.

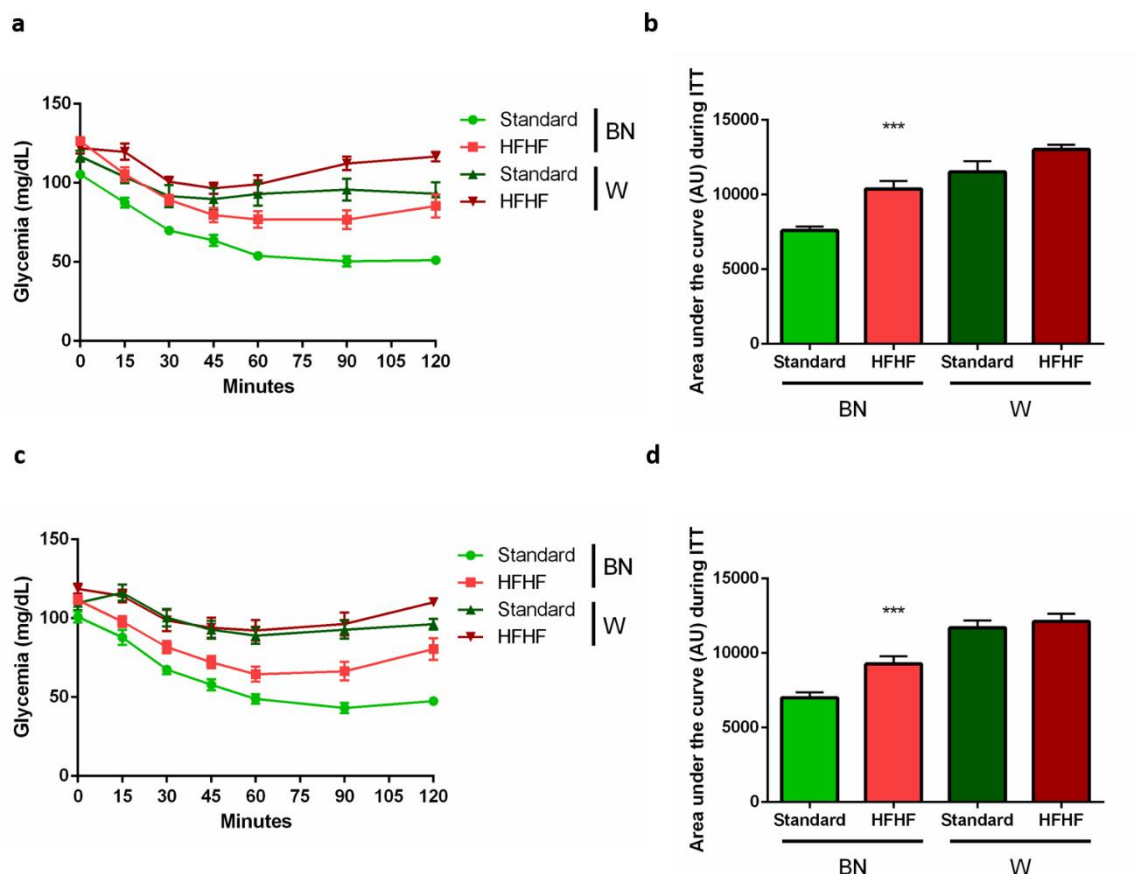


Fig 3. Insulin tolerance test (ITT) in standard and high fructose+high fat (HFHF)-fed Brown Norway (BN) and Wistar (W) rats. Plasma glucose was measured during ITT after 8 days (a, b) and 4 weeks (c, d) of feeding, and expressed as a function of time (a, c) and area under the curve (AUC) (b, d) during the 120 min-duration of GTT (ip injection of 20% glucose 2g/kg) in BN and W rats. Data are the mean $\pm$ SEM, n=8 for each measure. Comparisons are between standard group versus HFHF group for each strain. ***: $P < 0.001$.

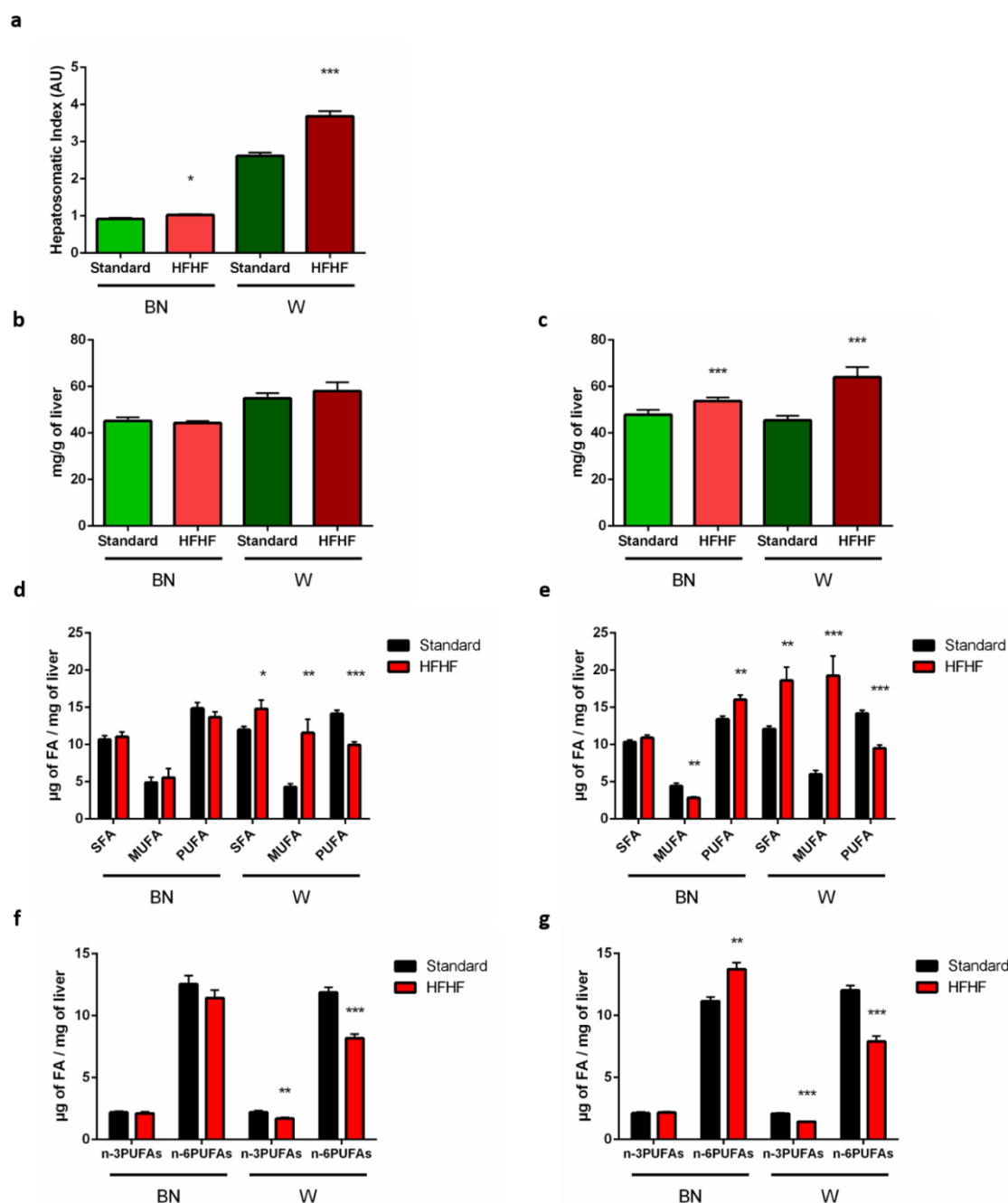


Fig 4. Hepatic characteristics and hepatic lipid accumulation in standard and fructose-fed Brown Norway and Wistar rats. Hepatosomatic index at 4 weeks of diet(a), total lipid content in the liver at 8 days (b) and 4 weeks (c) of diet, as well as hepatic content of saturated fatty acid (SFA), monounsaturated fatty acid (MUFA) and polyunsaturated fatty acid (PUFA) at 8 days (d) and 4 weeks (e) of diet, and hepatic content of omega-3 and omega-6 fatty acids at 8 days (f) and 4 weeks (g) of diet. Data are the mean $\pm$ SEM, $n=8$ for each measure. Comparisons are between standard group versus HFHF group for each strain. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$.

ACKNOWLEDGEMENTS

Authors would like to thank Laurence Decocq, Alexia Mathou, and the CSGA animal facility for excellent animal care.

REFERENCES

1. Alberti KG, Zimmet P, Shaw J. The metabolic syndrome--a new worldwide definition. *Lancet*. 2005;366(9491):1059-62.
2. Kaur J. A comprehensive review on metabolic syndrome. *Cardiol Res Pract*. 2014;2014:943162.
3. O'Neill S, O'Driscoll L. Metabolic syndrome: a closer look at the growing epidemic and its associated pathologies. *Obes Rev*. 2015;16(1):1-12.
4. Ghaem Maralani H, Tai BC, Wong TY, Tai ES, Li J, Wang JJ, et al. Metabolic syndrome and risk of age-related macular degeneration. *Retina*. 2015;35(3):459-66.
5. Chopra R, Chander A, Jacob JJ. Ocular associations of metabolic syndrome. *Indian J Endocrinol Metab*. 2012;16 Suppl 1:S6-S11.
6. Ford ES. Risks for all-cause mortality, cardiovascular disease, and diabetes associated with the metabolic syndrome: a summary of the evidence. *Diabetes Care*. 2005;28(7):1769-78.
7. Rampal S, Mahadeva S, Guallar E, Bulgiba A, Mohamed R, Rahmat R, et al. Ethnic differences in the prevalence of metabolic syndrome: results from a multi-ethnic population-based survey in Malaysia. *PLoS One*. 2012;7(9):e46365.
8. Das M, Pal S, Ghosh A. Family history of type 2 diabetes and prevalence of metabolic syndrome in adult Asian Indians. *J Cardiovasc Dis Res*. 2012;3(2):104-8.
9. van der Berg JD, Stehouwer CD, Bosma H, van der Velde JH, Willems PJ, Savelberg HH, et al. Associations of total amount and patterns of sedentary behaviour with type 2

- diabetes and the metabolic syndrome: The Maastricht Study. *Diabetologia*. 2016;59(4):709-18.
10. Mozaffarian D. Foods, obesity, and diabetes-are all calories created equal? *Nutr Rev*. 2017;75(suppl 1):19-31.
11. Wong SK, Chin KY, Suhaimi FH, Fairus A, Ima-Nirwana S. Animal models of metabolic syndrome: a review. *Nutr Metab (Lond)*. 2016;13:65.
12. Montgomery MK, Hallahan NL, Brown SH, Liu M, Mitchell TW, Cooney GJ, et al. Mouse strain-dependent variation in obesity and glucose homeostasis in response to high-fat feeding. *Diabetologia*. 2013;56(5):1129-39.
13. Montgomery MK, Fiveash CE, Braude JP, Osborne B, Brown SH, Mitchell TW, et al. Disparate metabolic response to fructose feeding between different mouse strains. *Sci Rep*. 2015;5:18474.
14. Jiao J, Mo B, Wei H, Jiang YR. Comparative study of laser-induced choroidal neovascularization in rats by paraffin sections, frozen sections and high-resolution optical coherence tomography. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2013;251(1):301-7.
15. Ogata N, Matsushima M, Takada Y, Tobe T, Takahashi K, Yi X, et al. Expression of basic fibroblast growth factor mRNA in developing choroidal neovascularization. *Curr Eye Res*. 1996;15(10):1008-18.
16. Tobe T, Takahashi K, Ohkuma H, Uyama M. [A long-term course of experimentally produced choroidal neovascularization in the rat]. *Nippon Ganka Gakkai Zasshi*. 1995;99(7):784-91.
17. Thierry M, Pasquis B, Acar N, Gregoire S, Febvret V, Buteau B, et al. Metabolic syndrome triggered by high-fructose diet favors choroidal neovascularization and impairs retinal light sensitivity in the rat. *PLoS One*. 2014;9(11):e112450.

18. Toop CR, Gentili S. Fructose Beverage Consumption Induces a Metabolic Syndrome Phenotype in the Rat: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Nutrients*. 2016;8(9).
19. Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem*. 1957;226(1):497-509.
20. 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.
21. Johnson RJ, Segal MS, Sautin Y, Nakagawa T, Feig DI, Kang DH, et al. Potential role of sugar (fructose) in the epidemic of hypertension, obesity and the metabolic syndrome, diabetes, kidney disease, and cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr*. 2007;86(4):899-906.
22. Bray GA, Nielsen SJ, Popkin BM. Consumption of high-fructose corn syrup in beverages may play a role in the epidemic of obesity. *Am J Clin Nutr*. 2004;79(4):537-43.
23. Schulze MB, Manson JE, Ludwig DS, Colditz GA, Stampfer MJ, Willett WC, et al. Sugar-sweetened beverages, weight gain, and incidence of type 2 diabetes in young and middle-aged women. *JAMA*. 2004;292(8):927-34.
24. Cigliano L, Spagnuolo MS, Crescenzo R, Cancelliere R, Iannotta L, Mazzoli A, et al. Short-Term Fructose Feeding Induces Inflammation and Oxidative Stress in the Hippocampus of Young and Adult Rats. *Mol Neurobiol*. 2018;55(4):2869-83.
25. de Castro UG, dos Santos RA, Silva ME, de Lima WG, Campagnole-Santos MJ, Alzamora AC. Age-dependent effect of high-fructose and high-fat diets on lipid metabolism and lipid accumulation in liver and kidney of rats. *Lipids Health Dis*. 2013;12:136.
26. Dupas J, Goanvec C, Feray A, Guernec A, Alain C, Guerrero F, et al. Progressive Induction of Type 2 Diabetes: Effects of a Reality-Like Fructose Enriched Diet in Young Wistar Rats. *PLoS One*. 2016;11(1):e0146821.

27. de Moura RF, Ribeiro C, de Oliveira JA, Stevanato E, de Mello MA. Metabolic syndrome signs in Wistar rats submitted to different high-fructose ingestion protocols. *Br J Nutr.* 2009;101(8):1178-84.
28. Sulis PM, Motta K, Barbosa AM, Besen MH, da Silva JS, Nunes EA, et al. Impact of Fish Oil Supplementation and Interruption of Fructose Ingestion on Glucose and Lipid Homeostasis of Rats Drinking Different Concentrations of Fructose. *Biomed Res Int.* 2017;2017:4378328.
29. Rabie EM, Heeba GH, Abouzied MM, Khalifa MM. Comparative effects of Aliskiren and Telmisartan in high fructose diet-induced metabolic syndrome in rats. *Eur J Pharmacol.* 2015;760:145-53.
30. Gordon CJ, Phillips PM, Johnstone AF, Beasley TE, Ledbetter AD, Schladweiler MC, et al. Effect of high-fructose and high-fat diets on pulmonary sensitivity, motor activity, and body composition of brown Norway rats exposed to ozone. *Inhal Toxicol.* 2016;28(5):203-15.
31. Hohsfield LA, Ehrlich D, Humpel C. Cholesterol diet counteracts repeated anesthesia/infusion-induced cognitive deficits in male Brown Norway rats. *Neurobiol Learn Mem.* 2013;106:154-62.
32. van Den Brandt J, Kovacs P, Kloting I. Metabolic variability among disease-resistant inbred rat strains and in comparison with wild rats (*Rattus norvegicus*). *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2000;27(10):793-5.
33. Abdelmalek MF, Suzuki A, Guy C, Unalp-Arida A, Colvin R, Johnson RJ, et al. Increased fructose consumption is associated with fibrosis severity in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology.* 2010;51(6):1961-71.
34. Basciano H, Federico L, Adeli K. Fructose, insulin resistance, and metabolic dyslipidemia. *Nutr Metab (Lond).* 2005;2(1):5.

35. Rosqvist F, Iggman D, Kullberg J, Cedernaes J, Johansson HE, Larsson A, et al. Overfeeding polyunsaturated and saturated fat causes distinct effects on liver and visceral fat accumulation in humans. *Diabetes*. 2014;63(7):2356-68.
36. Moon YA, Hammer RE, Horton JD. Deletion of ELOVL5 leads to fatty liver through activation of SREBP-1c in mice. *J Lipid Res*. 2009;50(3):412-23.
37. Warden CH, Bettaieb A, Min E, Fisler JS, Haj FG, Stern JS. Chow fed UC Davis strain female Lepr fatty Zucker rats exhibit mild glucose intolerance, hypertriglyceridemia, and increased urine volume, all reduced by a Brown Norway strain chromosome 1 congenic donor region. *PLoS One*. 2017;12(12):e0188175.
38. Warden CH, Slupsky C, Griffey SM, Bettaieb A, Min E, Le A, et al. Brown Norway chromosome 1 congenic reduces symptoms of renal disease in fatty Zucker rats. *PLoS One*. 2014;9(1):e87770.
39. Galli J, Li LS, Glaser A, Ostenson CG, Jiao H, Fakhrai-Rad H, et al. Genetic analysis of non-insulin dependent diabetes mellitus in the GK rat. *Nat Genet*. 1996;12(1):31-7.
40. Pontoizeau C, Fearnside JF, Navratil V, Domange C, Cazier JB, Fernandez-Santamaria C, et al. Broad-ranging natural metabotype variation drives physiological plasticity in healthy control inbred rat strains. *J Proteome Res*. 2011;10(4):1675-89.
41. Spruss A, Kanuri G, Wagnerberger S, Haub S, Bischoff SC, Bergheim I. Toll-like receptor 4 is involved in the development of fructose-induced hepatic steatosis in mice. *Hepatology*. 2009;50(4):1094-104.
42. Shobharani P, Muthukumar SP, Kizhakayil D, Halami PM. Strain-Specific Quantification of Native Probiotic *Bacillus* spp. and Their Effect on Liver Function and Gut Microflora of Experimental Rats. *Probiotics Antimicrob Proteins*. 2018.

43. Backhed F, Ding H, Wang T, Hooper LV, Koh GY, Nagy A, et al. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(44):15718-23.
44. Festi D, Schiumerini R, Eusebi LH, Marasco G, Taddia M, Colecchia A. Gut microbiota and metabolic syndrome. *World J Gastroenterol*. 2014;20(43):16079-94.
45. Thierry M, Pasquis B, Buteau B, Fourgeux C, Dembele D, Leclerc L, et al. Early adaptive response of the retina to a pro-diabetogenic diet: Impairment of cone response and gene expression changes in high-fructose fed rats. *Experimental eye research*. 2015;135:37-46.

C. Résultats principaux et conclusions

Dans la littérature, les réponses métaboliques observées à la suite de l'administration d'un régime riche en fructose et lipides sont hétérogènes compte tenu de la multiplicité des méthodes expérimentales. Le modèle de SMet le plus pertinent serait celui qui regroupe l'ensemble des altérations métaboliques retrouvées chez l'homme. Notre étude révèle deux phénotypes différents induits par un régime HFHF pendant huit et vingt-huit jours. Les rats Wistar développent de manière précoce des altérations du métabolisme des lipides, telles qu'une élévation des triglycérides et du cholestérol total, dès huit jours de régime, alors que les rats Brown Norway ne révèlent pas d'altérations de ce type. Toutefois, les rats Brown Norway développent des altérations dès huit jours du métabolisme du glucose, telles qu'une hyperglycémie, une intolérance au glucose et particulièrement une résistance à l'insuline, qui n'est pas observée chez le rat Wistar, même à vingt-huit jours de régime. Les deux souches de rats développent une stéatose hépatique révélée par un index hépato somatique plus important que les rats sous régime standard, alors que leurs profils en acides gras sont différents. Les rats Brown Norway accumulent préférentiellement des acides gras polyinsaturés de type oméga 6 alors que les rats Wistar des acides gras saturés et monoinsaturés. Ces caractéristiques hépatiques sont cohérentes avec les résultats des lipoprotéines plasmatiques.

Ces deux phénotypes différents proviendraient du patrimoine particulier des Brown Norway, qui serait protecteur vis-à-vis de certains phénotypes du diabète de type 2 (Warden, Slupsky et al. 2014; Warden, Bettaieb et al. 2017).

Ainsi, cette étude a permis de valider l'efficacité de notre régime HFHF à induire un SMet présentant des altérations du métabolisme des lipides et du glucose, de manière dépendante de la souche. Ces résultats confirment la résistance des rats Brown Norway à développer des altérations du métabolisme des lipides, par rapport aux rats Wistar.

III. Biodisponibilité des acides gras polyinsaturés à longue chaîne pour la rétine : Incorporation et localisation dans la rétine

A. Problématique

La rétine est un tissu riche en lipides, puisqu'ils constituent un tiers de son poids sec. Les acides gras polyinsaturés sont particulièrement présents, notamment l'acide docosahexaénoïque (DHA), qui joue un rôle clé dans la phototransduction (Brown 1994; Litman, Niu et al. 2001; Mitchell, Niu et al. 2001; Niu, Mitchell et al. 2001; Gawrisc, Soubias et al. 2008). Dans la rétine, l'acide eicosapentaénoïque (EPA) et DHA sont capables de produire des médiateurs lipidiques, comme les docosanoïdes (résolvines), la neuroprotectine D1 (Bazan 2005), et via leur élongation en acides gras polyinsaturés à très longue chaîne, les élovanoïdes (Jun, Mukherjee et al. 2017). Ces médiateurs apparaissent comme protecteurs de l'inflammation et du stress oxydant. La rétine est alors sensible aux dérégulations du métabolisme, et les changements de la rétine associés à l'âge peuvent contribuer au développement de pathologies comme la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA). La DMLA est une des principales causes de cécité dans les pays occidentaux, après l'âge de 55 ans. Or, une étude a mis en évidence une diminution du contenu en DHA dans les rétines atteintes de DMLA (Liu, Chang et al. 2010). De plus, la supplémentation en acides gras polyinsaturés à longue chaîne (AGPI-LC) de type oméga 3 est associée à une diminution des risques de développer une DMLA (Querques, Forte et al. 2011; Reynolds, Rosner et al. 2013), et pourrait réduire sa progression (Kishan, Modjtahedi et al. 2011). Les recommandations en EPA et DHA fournis par les organisations de santé ne précisent pas la forme chimique sous laquelle les AGPI doivent être apportés (phospholipides ou triglycérides). Pourtant, les résultats sont assez hétérogènes concernant la biodisponibilité de ces deux formes pour la rétine (Schuchardt and Hahn 2013). Compte tenu de la consommation toujours croissante de poissons et la diminution des réserves marines, il apparait essentiel de définir la source d'oméga 3 permettant la meilleure incorporation du DHA dans la rétine.

L'étude qui va suivre est la première étude qui propose quatre formulations différentes, ou les différents acides gras qui pourraient influencer l'incorporation du DHA dans la rétine sont équilibrés. C'est également la première étude à notre connaissance qui apporte EPA et DHA spécifiquement liés à des phospholipides ou des triglycérides, et ce en quantité équivalente. Après huit semaines de régime supplémenté, les profils lipidiques ont été déterminés dans le plasma, les érythrocytes et la rétine, en chromatographie en phase gazeuse. Les profils des

acides gras estérifiés sur les phosphatidylcholine ont été évalués par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC/MS) Enfin, les changements de localisation des acides gras estérifiés sur les PC induits par la supplémentation ont été évalués dans la rétine par désorption-ionisation laser assistée par matrice (MALDI) et spectrométrie de masse couplée à l'imagerie (IMS).

B. Article

Bioavailability of diet long chain-PUFAs in the rat retina: GC-MS, quantitative LC/MS and MALDI-Imaging Mass Spectrometry approaches

Elisa Vidal^{1,2}, Bokkyoo Jun⁴, William C. Gordon⁴, Marie-Annick Maire¹, Lucy Martine¹, Stéphane Grégoire¹, Spiro Khoury³, Stephanie Cabaret³, Olivier Berdeaux³, Niyazi Acar¹, Lionel Bretillon¹, Nicolas G. Bazan⁴

1 Eye and Nutrition Research Group, Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation, AgroSup Dijon, INRA, CNRS, Université Bourgogne Franche-Comté, 18 rue Sully, 21065 Dijon, France

2 Horus Pharma Laboratories, 148 Avenue Georges Guynemer, 06700 Saint Laurent du Var, France

3 Chemosens Group, Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation, AgroSup Dijon, CNRS, INRA, Université Bourgogne Franche-Comté, 18 rue Sully, 21065 Dijon, France

4 Neuroscience Center of Excellence, School of Medicine, Louisiana State University Health New Orleans, 2020 Gravier St, New Orleans, LA 70112, USA.

Contact information for corresponding author:

Lionel Bretillon, Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation, 9^E Boulevard Jeanne d'Arc, F-21000 Dijon. Phone: +33 (0)3 80 68 16 15, Fax: 03 80 69 32 23, E-mail: lionel.bretillon@inra.fr

Running title: Incorporation of DHA in the retina provided by diet containing different chemical forms of long chain-PUFAs

Abbreviations : AA, arachidonic acid; LA, linoleic acid; ALA, alpha-linolenic acid; PC, phosphatidylcholine; AMD, age-related macular degeneration; LC-PUFA, long chain PUFA; VLC-PUFA, very long chain PUFA; PL, phospholipids; PR, photoreceptor; NPD1, neuroprotectine D 1; ELOVL, elongation of very long chain fatty-acids; CAN, acetonitrile; HILIC, hydrophilic interaction liquid chromatography; CID, collision-induced dissociation; H&E, hematoxylin and eosin; DHB, 2,5-dihydroxybenzoic acid; IMS, imaging mass spectrometry; DPA, docosapentaenoic acid; FADS, fatty acid desaturase.

ABSTRACT

Retina is very rich in lipids and contains high level of long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids (LC n-3 PUFA). Eicosapentenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA) are protectors against age effects in the retina and the development of age-related macular degeneration (AMD). Because of their essential roles, an oral dietary intake of LC n-3 PUFA is needed. However, conflicting results are available about the better bioavailability depending on the biochemical forms on which they are provided. In this study, we fed rats with equivalent doses of EPA-containing PL, EPA-containing TG, DHA-containing PL and DHA-containing TG incorporating in their diets. We present here qualitative changes in fatty acids composition in plasma, red blood cells and retina, quantitative and spatial organization changes concerning phosphatidylcholine species (PC) in retina, following the different dietary intakes. We found an increase in DHA content in the retina, particularly double DHA-containing PC (PC44:12) following PL-EPA, TG-DHA and PL-DHA diets, and an increase in very long chain-PUFAs (VLC-PUFAs) for PL-EPA and TG-DHA rich diets. VLC-PUFAs-containing PC were detected in the photoreceptor (PR) layer, not completely colocalized with PC44:12. All supplemented diets triggers spatial organisation changes of DHA, in the PR layer around the optic nerve.

Keywords

Docosahexaenoic acid, Eicosapentaenoic acid, Incorporation, Plasma, Red blood cell, omega-3, lipid spatial organisation, lipid characterization, lipid localization, very long chain polyunsaturated fatty acids, phospholipids, triglycerides, phosphatidylcholine

INTRODUCTION

The retina is a lipid-rich tissue. Docosahexaenoic acid (DHA, 22:6 n-3) is the major n-3 long chain polyunsaturated fatty acids (LC-PUFAs) within the retina. Its concentration is greater than 15% of the total fatty acids (FAs) of the human retina (Fliesler and Anderson 1983; Breillon, Thuret et al. 2008). DHA plays a key role in vision. It constitutes 50% of the Gas in the discs of photoreceptor outer segments where it provides fluidity that favors conformational changes of rhodopsin during phototransduction (Brown 1994; Litman, Niu et al. 2001; Mitchell, Niu et al. 2001; Niu, Mitchell et al. 2001; Gawrisch, Soubias et al. 2008). In the retina, eicosapentaenoic acid (EPA, 20:5 n-3) and DHA are substrates of elongases for the synthesis of very long chain PUFAs (VLC-PUFAs). LC-PUFAs and VLC-PUFAs are able to produce lipid mediators named resolvins (Bannenberg and Serhan 2010), protectins (Bazan 2005) from LC-PUFAs or elovanoids from VLC-PUFAs (Jun, Mukherjee et al. 2017) that show protective effects against inflammation and oxidative stress. Age-related macular degeneration (AMD) is the most common cause of blindness, after the age of 55, in Western populations, and the third most common cause of severe visual impairment worldwide (Klaver, Wolfs et al. 1998; Flaxman, Bourne et al. 2017). Dietary intake of n-3 LC-PUFAs is associated with a lower risk to develop AMD (Querques, Forte et al. 2011). Indeed, in the Blue Mountains Eye Study population, participants with the highest versus lowest quantiles of omega-3 polyunsaturated fat intake had lower risk of incident early age related maculopathy (OR: 0.41), whereas fish consumption at least 3 times per week could reduce the incidence of late age-related maculopathy (OR: 0.25). Moreover, higher intake of EPA and DHA were protective against progression of AMD (Kishan, Modjtahedi et al. 2011). A study revealed that during early and middle AMD, DHA content of the retina is reduced (Liu, Chang et al. 2010).

Despite the endogenous capacity of human cells to synthesize EPA and DHA from its parent FA, alpha-linoleic acid (ALA, 18:3 n-3), the extent to which it is converted to EPA and DHA is very weak, i.e. around 8% into EPA and 1% into DHA (Pawlosky, Hibbeln et al. 2001; Burdge and Wootton 2002; Burdge and Calder 2005; Plourde and Cunnane 2007).

Experts and governmental agencies in some western countries have raised dietary recommendations for EPA and DHA intake to 500 mg/day to reduce the risk of developing AMD (Harris 2007). EPA and DHA can either be provided by increasing consumption of seafood, or via supplements.

Many dietary supplements are composed by variable marine sources of n-3 LC-PUFAs oils. In natural fish oil, EPA and DHA are bound in triacylglycerol (TG), in Antarctic krill oil, EPA and DHA are mostly bound in phospholipids (PL).

The recommendations do not precise the chemical forms of EPA and DHA for the supplementation and they assume that this different chemical forms have the same bioavailability. However, the supply of nutrients depends not only on the amount of active substance intake but also on the bioavailability. Bioavailability corresponds to the extent by which an active substance can be absorbed and transported to systemic circulation or the site of biological activity. A greater bioavailability assumes a greater incorporation of EPA and DHA in the retina, and should result in a greater health benefit for the target.

The bioavailability of PUFAs, including n-3 LC-PUFAs, depends on numerous factors, including a matrix effect, i.e. whether the composition of food in macronutrients modifies the bioavailability of fatty acids (Schuchardt and Hahn 2013). Among the various factors affecting n-3 LC-PUFA incorporation, one important factor to consider is the dietary intake of linoleic acid (LA, 18:2 n-6), from the omega-6 series, since the incorporation of n-3 LC-PUFA is inversely associated to intake of LA, particularly in the retina (Simon, Bardet et al.

2011). DHA bioavailability also depends on the chemical form of intake: free fatty acids, esters, TG or PL (Salem and Kuratko 2014). Moreover, the efficiency of EPA or DHA intake to increase the incorporation of DHA in the retina has not been identified.

The present study aims to compare the incorporation of different formulations in plasma, erythrocytes and retina, and determines potential modifications of lipid distribution in the retina. Thus, we specifically want to localize the site of incorporation of EPA and DHA originating from formulations in which EPA or DHA were loaded on PL or on TG, into the retina.

MATERIALS AND METHODS

Animals

The ethics committee of our institution (Comité d’Ethique de l’Expérimentation Animale 105, Dijon, France) approved all interventions and animal care procedures.

Male Wistar rats (4 weeks of age, n=55) were purchased from Janvier Labs (Le Genest-Saint-Isle, France). They were housed in a controlled environment at 23°C ± 1°C, 55-60% humidity, under a 12-hour light/12-hour dark cycle, 780 lux in light phase, had free access to food and tap water. The rats were acclimatized 2 weeks, fed on a standard rodent chow (SDS diets, UK) before they were fed on a chow describe on the paragraph “experimental diets” for 8 weeks. The rats were then randomly divided into seven groups of eleven rats each (four cages of two rats and 1 cage of three rats per group). During the height weeks, the rats, food and water consumption were weighted once a week.

Experimental diets

Commercial high-oleic sunflower oil, sunflower oil, palm oil, rapeseed oil, linseed oil, fish oil (Polaris, Quimper, France), herring roe oil (Novastell, Etrépagny, France), krill oil (AkerBiomarine), egg powder (Novastell, Etrépagny, France) were mixed in various proportions to prepare the five following blends: EPA-rich phospholipids (PL EPA), DHA-rich phospholipids (PL-DHA), EPA-rich triglycerides (TG-EPA), DHA-rich triglycerides (TG-DHA), and no DHA and EPA (Control). The lipid blends were used to prepare rodent diets (SAFE diets, Augy, France). The five experimental diets were designed to be isoproteinic, isolipidic (10% of lipids) (table 1) and to contain 7% of EPA+DHA for the diets PL-EPA, PL-DHA, TG-EPA and TG-DHA. The five diets are designed to contain 21% of C16:0, and a ratio LA/ALA between 4 and 5 as shown in table 2. The different classes of

lipids were determined using Iatroscan (Ackman 1981). Diet formulas are presented in table 3.

Collection of samples

At the end of the 8-weeks feeding period, animals were fasted overnight, they were weighed, then euthanized by an intraperitoneal injection of pentobarbital (Ceva, Santé animale, Libourne, France) at lethal dose (150 mg/kg body weight) and exsanguination by intracardiac puncture. Plasma was separated from red blood cells by centrifugation at 3000 rpm during 20 min, 4°C) and both were kept at -80°C until fatty acid analyses. Retinas from 8 rats per group were collected and frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C for fatty acid analyses. Rat eyeballs from 3 rats per group were fast frozen in liquid nitrogen before to be stocked at -80°C, for MALDI-imaging mass spectrometry (IMS) analyses.

Lipid analysis

Standards and Chemicals

Chloroform (CHCl₃) and methanol (CH₃OH) were purchased from Carlo Erba Reactifs SDS (Peypin, France). Ammonium acetate, acetonitrile (ACN), CH₃OH and H₂O of LC-MS grade were all obtained from Fisher Scientific (Illkirch, France). Commercially available PL and GG standards were obtained from Avanti Polar Lipids Inc. (Alabaster, AL, USA) and Matreya LLC (State College, PA, USA). Other chemical reagents were purchased from Sigma-Aldrich (St Quentin Fallavier, France)

Lipid extraction

Lipids were extracted from the retinas and experimental diets following the Folch's method (Folch, Lees et al. 1957) whereas they were isolated from erythrocytes and plasma according to the method of Moilanen and Nikkari (Moilanen and Nikkari 1981).

Lipid classes determination in the experimental diets

The distribution of lipid classes was determined using a combination of thin-layer chromatography on silica gel-coated quartz rods and flame ionization detection (Iatroscan system, Iatron, Tokyo, Japan) according to Ackman's technique (Ackman 1981) and as published by our group (Bretillon, Thuret et al. 2008). The values obtained for each compound were corrected according to their response factor using specific calibration curves, as previously published (Sebedio, Astorg et al. 1987). Data were reported as percentages of the total lipids in the samples.

Preparation of PL and TG concerning the experimental diets

Total lipids from each diet were submitted to a thin-layer chromatography separation on precoated silica gel plates (Merck, Darmstadt, Germany) using a solvent mixture of hexane/diethyl ether/acetic acid (80:20:1, v/v/v). The silica gel plates were visualized under UV light (360 nm) after spraying with 2',7'-dichlorofluorescein. The spots corresponding to PL and TG were scraped off the plate and the samples were transesterified following the fatty acid analysis procedure.

Analysis of fatty acids in plasma, red blood cell and retina samples by gas chromatography

Fatty acid were converted into methyl esters according to Morrison and Smith (Morrison and Smith 1964) and analyzed as previously described (Bretillon, Thuret et al. 2008). Fatty acid methyl esters were 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 (FID). Hydrogen was used as the carrier gas (inlet pressure, 210 kPa). The injection volume was 1 µL. 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. The data were processed using the EZChrom Elite software (Agilent Technologies, Massy, France). Fatty acid results are expressed as a percentage of the area of each peak relative to the sum of the areas of all the peaks.

Chromatographic separation of phospholipids

PL classes were separated by liquid chromatography under Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography (HILIC) conditions using an AccucoreTM HILIC LC column (150 x 2.1 mm, 2.6 µm, Thermo Scientific, USA). HPLC separation was performed using an UltiMateTM 3000 LC pump equipped with a dual-gradient pump and an UltiMateTM 3000 Autosampler from Thermo Scientific (USA). The mobile phase consisted of (A) ACN/H₂O (95:5, v/v) containing 5 mM ammonium acetate and (B) ACN/H₂O (50:50, v/v) containing 10 mM ammonium acetate. The solvent-gradient system of the analytical pump was as follows: 0 min 100% A, 1 min 95% A, 20 min 80% A, 23 min 65% A, 24 min 100% A and 24–39 min 100% A. The flow rate was 800 µL*min⁻¹, the injection volume was 10 µL and the column was maintained at 40°C. The liquid chromatography system was controlled by Standard Instrument Integration (SII) software based on Dionex Chromeleon^{TN} 7.

Separation and quantification of phospholipid classes by liquid chromatography coupled to charged aerosol detector

The phosphorus content of the total lipid extract was determined according to the method developed by Bartlett and Lewis (Bartlett and Lewis 1970). The samples were then diluted to the appropriate concentration of 25 µg PL/mL in CHCl₃/CH₃OH (1:1, v/v).

PLs were first separated by liquid chromatography under HILIC conditions and then detected using a CoronaTM Ultra RS Charged Aerosol DetectorTM (CCAD, Thermo Scientific, USA).

HPLC was performed using a Dionex UltiMate™ 3000 LC pump from Thermo Scientific (USA) equipped with a dual-gradient pump, which allows for a post-separation inverse gradient approach to compensate for solvent gradient effects in CCAD detection. In this approach, a secondary stream of solvent is mixed with the column effluent such that the mixture of aqueous–organic eluent introduced into the detector inlet remains in equal proportions throughout the run. Separation of phosphatidylinositol (PI), phosphatidylethanolamine (PE), phosphatidylserine (PS), phosphatidylcholine (PC), sphingomyelin (SM) and lysophosphatidylcholine (LPC) standards was achieved under HILIC conditions as mentioned above, in the inverse gradient. In the inverse gradient approach, the composition of the secondary solvent-gradient system must be maintained exactly opposite that of the column effluent. Therefore, a delay time of the inverse gradient program was used so that throughout the gradient segment, the composition of the secondary stream arriving at the mixing tee-piece remained exactly opposite that of the column effluent. Solvent gradient compensation was performed using the following inverse gradient program “minimize flow”, at a flow rate 280 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$: 0–1.786 min 100% B, 2.786 min 85.7% B, 21.786 min 42.9% B, 24.786 min 0% B, 25.786 min 100% B, 25.786–40.786 min 100% B. Eluate from the HPLC system was introduced into a CCAD for detection of the PLs. The settings for the CCAD were as follows: gas inlet pressure (nitrogen) 35 psi; gas flow rate and flow ratio 1.11 L/min and 0.95, respectively; corona voltage 2.9 kV; corona current and current range 1.0 μA and 100 pA, respectively; ion trapping voltage 20.4; filter “3” data collection rate 10 Hz; power function 1.5; and nebulizer temperature 25 °C. The liquid chromatography and the CCAD were controlled by Chromeleon 7.2 (Thermo Scientific Dionex).

Characterization of phospholipid species (Orbitrap FUSION™)

The Orbitrap Fusion™ Tribrid mass spectrometer (Thermo Scientific, USA) was used for high-resolution analyses. This instrument was equipped with an EASY-MAX NGTM Ion Source (Heated Electrospray Ionization H-ESI) and was controlled by Xcalibur™ 4.1 software. Positive and negative ions were monitored alternatively by switching polarity approach with a spray voltage set to 3500 (v) in positive and negative ion modes. The Orbitrap mass analyzer was employed to obtain all mass spectra in full scan mode with the normal mass range and a resolution set value 240000. A dynamic exclusion filter was applied with an exclusion duration of 15 (s) and a mass tolerance of 5 (ppm). For tandem mass spectrometry (MS/MS) analyses, data-dependent mode was used for the characterization of PL species. Precursor isolation was performed in the Quadrupole analyzer with an isolation window of 1.6 (m/z). Higher-energy Collisional Dissociation (HCD) was employed for the fragmentation of PL with an optimized collisional energy of 30 and a stepped collision energy of 5%. The linear ion trap was used to acquire spectra for fragment ions in data-dependent mode. The Automatic Gain control Target was set to 2.0×10^4 with a maximum injection time of 50 (ms). The identification of all PL species was performed, using the data of high accuracy, with the help of LipidSearch™ software.

Preparation of retinas for MALDI-IMS

The eyeball were cryosectioned using a cryostat (LEICA) to obtain 15 μ m-thick transversal sections showing all layers of the retina, choroid, optic nerve, and sclera. Sections were attached to a glass coverslips and stored in a desiccator until needed for MALDI imaging. Alternate sections were kept on slides and stained with hematoxylin and eosin (H&E) for orientation purpose. For this study, in total, more than 10 individual sections per group were analyzed in positive ion mode by MALDI IMS.

Matrix application for MALDI-IMS

The glass coverslips containing the retina sections were placed on the MALDI plate inserts using tape, and the 2,5-dihydroxybenzoic acid (DHB) matrix was deposited by sublimation (Hankin, Barkley et al. 2007). The MALDI plate was attached to the condenser using tape. The conditions during sublimation of the DHB matrix were a pressure of 0.05 Torr, condenser temperature of 15°C, and 300 mg DHB in the sublimator. The heat was applied progressively until 130°C in 11 minutes.

Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometric imaging (MALDI-MSI) analysis

A quadrupole-TOF tandem mass spectrometer with an orthogonal MALDI source (MALDI Synapt G2-Si, Waters; Mildford, Massachusetts) was used to acquire mass spectral data from which images were constructed. MALDI mass spectra were obtained using a solid state laser (355 nm) at an energy of 7.4 J and a pulse rate of 200 Hz for positive ion MALDI imaging. The energy and pulse rate of the laser were selected to maximize the lipid signal from the tissue slice. The positive ion MALDI imaging experiments had an accumulation time of 243 ms per image spot. The MALDI plate was moved at a rate of 12.75 mm/min and after each horizontal line was completed the plate was moved vertically to 30 µm. The lateral resolution of this MALDI IMS technique has been estimated to be approximately 30 µm. The mass spectrometric data were processed using a specialized script for Analyst software (Waters) at a mass resolution of 0.1 amu. The lipids observed in positive ion mode [PC, SM, and TG] were identified to the lipid species level by ion mobility separation (DriftScope, Waters) used in conjunction with ToF. MALDI Images were visualized using Biomap software.

Statistical analysis

Data were analyzed using the Kruskal Wallis test followed by the Dunn's post-hoc test when appropriate. The level of significance was set at $P \leq 0.05$. All results were analyzed using GraphPad Prism version 7.00 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, United States). Data are presented as mean $\pm$ standard deviation (SD).

RESULTS

We wanted to quantify the incorporation of DHA and EPA in plasma, erythrocytes and retina, from 4 different formulations. Indeed, despite minor differences between the diets, PL-EPA and TG-EPA diets contained around 5% of EPA and 2% of DHA esterified on TG (Table 3). Similarly, PL-DHA and TG-DHA diets contained around 5% of DHA and 2% of EPA esterified mainly on PL. Moreover, all diets contain the same LA (18:2 n-6)/ALA (18:3 n-3) ratio of 5, 22% of palmitic acid (C16:0) (Table 1 and 2)

Body weight did not differ between groups during the 8 weeks of experiment.

LC n-3 PUFA in plasma

In plasma, DHA levels were significantly higher in DHA-supplemented groups compared to animal from the control group ($P < 0.001$), there was no significant difference between PL-DHA and TG-DHA groups ($P > 0.05$). There was no statistically significant difference between EPA-supplemented groups compared to controls for DHA levels in plasma. EPA level in plasma was higher in PL-EPA and TG-EPA-diet groups compared to control-diet group ($P < 0.001$). Moreover, DPA n-3 (24:5 n-3) was higher in the plasma of both PL-EPA and TG-EPA-diet groups. In plasma, ALA (18:3 n-3) was higher only in the PL-DHA-diet group compared to control-diet group ($P < 0.01$). Concerning the levels of n-6 fatty acids, LA was significantly higher for all formulations except for PL-DHA-diet group compared to control-diet group (PL-EPA vs Control : $P < 0.001$; TG-EPA vs Control : $P < 0.05$; TG-DHA vs Control : $P < 0.001$). However, level of AA in plasma (20:4 n-6) was significantly lower in PL-EPA ($P < 0.001$) and TG-DHA-diet ($P < 0.01$) groups compared to control-diet group. This result is in accordance with plasma levels of 22:4 n-6 which are lower in PL-EPA ($P < 0.001$), TG-EPA ($P < 0.05$), and TG-DHA-diet ($P < 0.01$) groups compared to control-diet group. There was no

difference in fatty acids composition between PL-EPA and TG-EPA or PL-DHA and TG-DHA-diet groups (Figure 1.a).

LC n-3 in erythrocyte

In red blood cells, DHA level was significantly higher in both PL-DHA and TG-DHA-diet groups ($P<0.001$) and in a lesser extent, in PL-EPA-diet group ($P<0.05$) compared to control-diet group. Docosapentenoic acid (DPA) n-3 (22:5 n-3) level was significantly higher in all the four formulations compared to control-diet group ($P<0.001$). Meanwhile EPA level in erythrocytes was higher only in PL-EPA and TG-EPA groups ($P<0.001$). Concerning the n-6 fatty acids, LA (18:2 n-6) level was higher in PL-EPA and TG-DHA-diet groups compared to control-diet group ($P<0.001$). AA (20:4 n-6) level was significantly lower in all groups ($P<0.01$ and $P<0.001$ for PL-EPA) excepted in PL-DHA-diet group compared to control-diet group. The same result was obtained for 22:4 n-6 levels. There was no difference for any fatty acids between PL-EPA and TG-EPA or PL-DHA and TG-DHA-diet groups (Figure 1.b).

LC n-3 in retina

EPA levels in retina were higher in all supplemented-groups except for PL-DHA group compared to control-diet group (PL-EPA vs control: $P<0.05$, TG-EPA vs Control: $P<0.01$, TG-DHA vs control: $P<0.001$), and there was no difference between supplemented-diet groups. DHA level was significantly increased in the retina for all diet-groups except TG-EPA-diet group compared to control-diet group (PL-EPA vs control: $P<0.001$, PL-DHA vs control: $P<0.05$, TG-DHA vs control: $P<0.001$). DPA n-3 (22:5 n-3) level was increased in EPA-rich diet groups ($P<0.001$), but there was no difference between these both groups. Concerning n-6 fatty acids, AA is less abundant in retina of groups fed with TG-diets ($P<0.001$). There was no difference for any fatty acid between PL-EPA and TG-EPA or PL-DHA and TG-DHA-diet groups (Figure 1.c and Table 4).

Characterization and quantification of FAs in retinal PC

In retina, PC has a large amount of di-saturated FAs (32:00, 16:0/16:0), saturated/monounsaturated FAs (34:01, 16:0/18:1) and saturated/polyunsaturated FAs (40:6, 18:0/22:6). Retinal PC is the only class that contained detectable levels of VLC-PUFAs (more than 24 carbons in length). Our results demonstrated that the sum of VLC-PUFAs in the retina is significantly higher in PL-EPA and TG-DHA-diet groups compared to control group. This increase concerned particularly PC54:12 (32:6/22:6) and PC54:11 (32:5/22:6). There was a statistically significant increase in PC 44:12 (22:6/22:6) in retina of PL-EPA, PL-DHA and TG-DHA-diet groups, and a significant increase of PC40:6 (18:0/22:6) in TG-DHA-diet group (Figure 2).

Spatial distribution of PUFA-containing PC in the retina

Regions of interest in the eye, such as connective tissue, sclera, optic nerve, RPE, choroid, and retinal layers, are labeled in an H&E-stained section which represents a typical tissue sample (figure 3). The localization of lipid molecular species was determined using MALDI-IMS in coronal sections of the ocular globes. Ion mobility separation was used coupled with ToF to determine lipid/PC molecular species. The positive ion mass spectra obtained was contained in the mass range of 450-1100 m/z. The shape of spectrums were different according to particular areas of the eye tissue (inner retina, outer retina and orbital fat), that demonstrate the variation of lipid molecular species within different region of eye tissue. Positive ion data obtained for the MALDI MS experiments revealed the distribution of PC and TG lipids in the ocular tissue. We excluded ions which could originate from the classic embedding compound using a protein-rich embedding compound.

In the region of interest of the inner retina, the positive ion MALDI mass spectrum indicated a unique molecular species profile with the most intense ion at m/z 782.6 consistent with

PC[M+Na]⁺, specifically a PC(34:1) (figure 4.a and d). The positive ion MALDI image of m/z 782.6 suggested that this ion was present within the inner retina composed by ganglion cells, nerve fiber layer, optic nerve and a thin region behind outer retina (Figure 4.g), previously identified as the lumen of blood vessel (Zemski Berry, Gordon et al. 2014). The positive ion MALDI mass spectrum of this area revealed the presence of less intense other lipids, in this region, such as m/z 756.6, that was not unique to this location. These molecular species m/z 756.6 correspond to a PC(32:0), and the presence of this ion is intense in all retinal layers, including outer retina, as shown by the MALDI MS image of this molecular species.

The MALDI mass spectrum of the region of interest of outer retina, including mainly outer segment of photoreceptor, indicated a molecular species profile with the most intense ions at m/z 756.6 PC(32:0). As previously said this ion is present in the entire retina and is not specific to the outer retina (Figure 4.b and e). The spectrum of the outer retina reveals also two molecular species such as m/z 856.6 and m/z 900.6. The positive ion MALDI image of m/z 856.6 and m/z 900.6 indicated that these lipids were uniquely localized in the photoreceptor layer (Figure 4.h). The identification of m/z 856.6 in this area could correspond to a sodiated PC lipid, corresponding to PC(40:6) meanwhile m/z 900.6 corresponding to sodiated PC(44:12).

The area corresponding to orbital fat reveals a MALDI mass spectrum with the most intense ion at m/z 881.8 (Figure 4.c and f). The positive ion MALDI image of m/z 881.8 suggested that the ion was present within a tissue surrounding the optic nerve, behind the sclera, according to the orbital fat (figure 4.i). The black areas within this structure could correspond to cross-sectioned blood vessels. The specie m/z 881.8 as previously identified as TG[M+Na]⁺ denoted as TG(52:2). Additionally, other sodiated TAG lipids were found with similar regional distributions to m/z 881.8, including m/z 853.8 TG(52:2).

The merged images of the lipid ions at m/z 782.6 [PC(34:1)+Na], m/z 856.6 [PC(40:6)+Na] and m/z 881.8 [TG(52:)+Na], demonstrated the spatial organization of these particular lipids within the eye (Figure 4.j).

The merged images of the lipid ions at m/z 856.6 [PC(40:6)+Na] (Figure 5.a) and m/z 900.6 [PC(44:12)+Na] (Figure 5.b) demonstrated that these both species were co-localized in the outer part of photoreceptor layer. Meanwhile m/z 856.6 [PC(40:6)+Na] extends more inward (Figure 5.c), meaning that each of this LC-PUFA-containing PC presents their own spatial distribution, even if its share same PUFA in their composition.

The retina is characterized by its content in VLC-PUFAs-containing PC having 24 to 36 carbons and up to four double bounds in the mass range of m/z 900-1100. Within the photoreceptor layer, we identified in the positive ion MALDI spectrum molecular species such as m/z 1018.7, m/z 1040.7 and 1068.7 with a lower signal than other species previously identified (Figure 6.a). These molecular species were previously identified as VLC-PUFAs. Using ion mobility, we have confirmed that m/z 1018.7, m/z 1040.7 and 1068.7 corresponded to VLC-PUFA-containing PC as [PC(52:9)+Na], [PC(54:12)+Na] and [PC(56:12)+Na].

The merge of MALDI images of both m/z 900.6 [PC(44:12)+Na] (Figure 6.b) and m/z 1018.7 [PC(52:9)+Na] (Figure 6.c) demonstrated that there were located in the area corresponded to photoreceptor layer, but no co-localization of these two species. PC(44:12) is localized in an inner area compared to the location of PC(52:9) within the photoreceptor layer (Figure 6.d). Because the signal is too low to determine a strong and clear MALDI image, this result cannot be representative to other VLC-PUFAs.

The aim of this study was to localize the site of incorporation of DHA within the retina, following 8 weeks of PUFA-rich diet. The MALDI image of the m/z 900.6 [PC(44:12)+Na] indicated the presence of this species with a varied intensity throughout the retina, in all

supplemented groups compared to control group. The most intense signal for m/z 900.6 in the retina was observed in the photoreceptor layer surrounding the optic nerve. The intensity of m/z 900.6 signal outside this area was very similar between groups. Moreover, the intensity of the ion m/z 881.8 is higher in the supplemented-diet group compared to the retina of control diet.

The merged images of the lipid molecular ions at m/z 782.6 [PC(34:1)+Na], m/z 900.6 [PC(44:12)+Na] and m/z 881.8 [TG(52:)+Na] nicely demonstrated the particular spatial organization of m/z 900.6 within the retina (Figure 7).

DISCUSSION

DHA and some VLC-PUFAs in AMD retina and RPE/choroid were significantly decreased (Liu, Chang et al. 2010; Gorusupudi, Liu et al. 2016). Moreover, consumption of foods rich in omega-3 LC-PUFAs is associated with a lower risk of developing AMD (Cho, Hung et al. 2001; Seddon, Rosner et al. 2001; SanGiovanni, Chew et al. 2007). The high influence of dietary intake on retinal levels and visual health remain, however controversial (Bretillon, Thuret et al. 2008; Acar, Berdeaux et al. 2012), even if a recent study showed that dietary intake of LC-PUFA and VLC-PUFA precursors clearly influence retinal lipid profiles in retina (Gorusupudi, Liu et al. 2016). Nevertheless, bioavailability of omega-3 FAs from diet depends on their chemical form (Schuchardt and Hahn 2013), with a few studies suggesting that the phospholipid form is better absorbed than the triglyceride form (Schuchardt, Schneider et al. 2011; Ulven, Kirkhus et al. 2011; Ramprasath, Eyal et al. 2013). Yet, these studies did not match the doses of PL and TG or doses of EPA and DHA (Salem and Kuratko 2014), excepted one indicating no difference between omega-3 provide under TG or PL forms, into the plasma (Yurko-Mauro, Kralovec et al. 2015). Moreover, plasma was validated as biomarker of short (weeks), dietary intake, leading to a high degree of uncertainty about the incorporation of omega-3 into the retina.

The goal of this study was to provide a novel molecular characterization of the retina of rats fed with different omega-3-rich diets. Moreover, we wanted to provide qualitative and quantitative information about changes in the FA composition in plasma, red blood cells and FA-containing PC in retina.

The strength of the work done is that long chain omega-3, EPA and DHA, were esterified either in PL, either in TG. Moreover, these ingenious formulations were balanced in some FAs, that could influence incorporation of EPA or DHA into the retina. Despite some

variabilities in amount of FAs into the different diets due to the manufacturing, the five diets were composed by the same amount of palmitic acid (C16:0), the same ratio of LA/ALA, the same amount of DHA + EPA (provided either by PL or TG). Palmitic acid, as LA and ALA, are the substrates of the fatty acid desaturase 2 which mediates $\Delta 6$ desaturation. Thus, palmitic acid, LA and ALA can enter in competition for the synthesis of its products, and modify the efficiency of FADS2 in the production of PUFAs (Park, Kothapalli et al. 2016). The international society for the study of fatty acids and lipids recommends a LA/ALA ratio of 5 to prevent metabolic, cardiovascular diseases and AMD. In this study, we followed this recommendation for all diets. Meanwhile western countries are characterized by a dietary intake twenty times more rich in omega-6 than in omega-3 (Simopoulos 2002). The rationale for considering a fixed ratio between omega-6 and omega-3 FAs was based on the incorporation of DHA in the retina that depends on the LA/ALA ratio. Indeed, studies have shown that the decrease of LA intake benefits to the omega-3 incorporation into the retina in the rat (Simon, Bardet et al. 2011), and to other tissues and human plasma (Blanchard, Pedrono et al. 2013; Taha, Cheon et al. 2014). Low-density lipoprotein (LDL) has been reported to significantly participate in the retina's lipid supply (Gordiyenko, Campos et al. 2004). The reduction of LA intake could promote the expression of LDL receptor in neuroretina, improving DHA uptake (Wang and Anderson 1993; Simon, Bardet et al. 2011).

Bioavailability of omega-3 could depend of the form in which they are provided (phospholipids or triglycerides), even if no clear evidence identifies the better source (Salem and Kuratko 2014; Yurko-Mauro, Kralovec et al. 2015). We fed during 8 weeks Wistar rats with one of the four omega-3-enriched diets containing mostly EPA or DHA, as mainly PL or TG.

In plasma, our gas chromatographic analyses reported that EPA and DPA n-3 were increased in rats fed with EPA-rich diets compared to control diet. Meanwhile, DHA was increased in

DHA-rich diets compared to control, without significant difference between PL or TG forms. This result is consistent with the study on humans showing no difference in the increase of DHA levels in the plasma when it was provided at the same dose, esterified on PL or TG (Yurko-Mauro, Kralovec et al. 2015). Supplementation with higher amounts of DHA than EPA triggered higher level of DHA in plasma, even if all diets induced an important increase of DHA precursors (EPA and DPA), particularly following the EPA-rich diets. For these diets, there was only a trend towards an increase in plasma DHA, confirming the low conversion of precursors of DHA in DHA (Plourde and Cunnane 2007). These plasma variations in n-3 levels were counterbalanced by a decrease in AA for PL-EPA and TG-DHA-rich diets, an increase in ALA for PL-EPA-rich diet and an increase in LA for all groups except for PL-DHA rich diet compared to control group.

In RBCs, EPA was increased in all groups compared to control group, but particularly in EPA-rich groups. For all groups, there was an increase in DPA n-3, the DHA precursor, compared to control groups. DHA in RBCs was increased in groups fed with PL-EPA, PL-DHA and TG-DHA diets, similar to the retina. Effectively, erythrocytes appears to be better biomarkers of n-3 FAs in the retina than plasma (Acar, Berdeaux et al. 2012), because they are less prone to environmental influence due to a life span of 120 days (Ebaugh, Emerson et al. 1953).

Interestingly, even if TG-EPA-rich diet favored high incorporation in DPA n-3 in the retina, this precursor was not converted into DHA, whereas PL-EPA-rich diet triggered an increase of DHA in the retina. Yet, these both diets contained similar concentrations in DHA, meaning that PL-EPA favored conversion into DHA compared to TG-EPA diet. Our results are consistent with earlier findings showing that Krill oil (PL-rich containing mostly EPA), favors β -oxidation and tissue deposition compared to fish oil (TG-rich diet) (Ghasemifard, Hermon et al. 2015).

Concerning the DHA-rich diets, our results reported that the form under which DHA is esterified, did not influence its bioavailability for the retina, even if the increase in DHA is higher in retina of rats fed with TG-DHA-rich diet compared to PL-DHA-rich diet. A previous study suggested that the content in diacylglycerols (DAG) and monoacylglycerols (MAG) molecules may facilitate micellar formations and thus enhance the LC omega-3 FA absorption into the enterocyte (Dyerberg, Madsen et al. 2010), that is consistent with our diets which PL-DHA contained less MAG and DAG than TG-DHA.

Moreover, our results demonstrated that PL-EPA and TG-DHA-rich diets enhanced the incorporation of LA n-6 into plasma and erythrocytes and favored the decrease in AA into plasma and erythrocytes, and these changes could be associated with an enhanced bioavailability of DHA into the retina.

Our quantitative LC/MS analyses reported here revealed that the incorporation of DHA into the retina was particularly realized in DHA/DHA-containing PC (PC44:12). Another relevant DHA-containing PC (PC40:6, 18:0/22:6) was significantly increased in the retina of TG-DHA-rich diet group.

Moreover, the diets which increased DHA, triggered the increase of VLC-PUFAs-containing PC into the retina. VLC-PUFA-containing glycerophospholipids are highly enriched in the retina (Avelano 1988), but function and details regarding their synthesis are still unclear. ELOVL4 has been identified as a fatty acid elongase protein that is involved in the synthesis of VLC-PUFAs (Agbaga, Brush et al. 2008). Its mutation leads to the most common hereditary form of macular dystrophy: the Stargardt disease (Zhang, Kniazeva et al. 2001). VLC-PUFA are mainly esterified on PC species found in the retina, in the sn-1 position of these PCs with DHA at the sn-2 position of glycerol (Avelano and Sprecher 1987; Harkewicz, Du et al. 2012).

Even if TG-EPA rich diet did not allow a greater incorporation of DHA into the retina, it favored the incorporation of a VLC-PUFA, the PC54:11 into the retina. This result is consistent with a previous study demonstrating that AA and EPA are the major precursors of VLC-PUFAs (Agbaga, Logan et al. 2014) and in a lesser extent DHA (Suh and Clandinin 2005). We are uncertain if the FAs changes observed in retina followed by supplemented-diets are due to a higher conversion because a larger amount of precursors are available, or because of a higher intake of precursor by the retina. Further experiments will be required to explore the possible changes in expression of ELOVL4 or adiponectine receptor 1 (Rice, Calandria et al. 2015).

The lipid composition of the retina is remarkable because a molecular blueprint characterizes each particular layer. MALDI IMS revealed the location of DHA-containing PC into the photoreceptor layer of the retina. More precisely, double DHA esterified on PC (44:12) are colocalized with PC40:6 (18:0/22:6), but the latter extends more in the inner part of the photoreceptor layer. Moreover, this study provides for the first time, a high level of details concerning the localization of VLC-PUFAs relative to the localization of LC-PUFA-containing PC, and particularly PC44:12 in the retina, because the resolution used for MALDI was only 30µm. Our MALDI images revealed that VLC-PUFAs seem to be localized in the external part of the retina as PC44:12. This localization seems to be crucial. Indeed in Stadgardt disease, mislocalization of the mutant protein may be at the origin of retinal degeneration, and the deletion of ELOVL4 leads to lipid and proteins accumulation into the RPE (Agbaga, Logan et al. 2014).

VLC-PUFAs contribute to synaptic vesicle size, and thus synaptic transmission (Bennett, Hopiavuori et al. 2014), and could be important for rod but not cone function (Bennett, Hopiavuori et al. 2014; Schori, Agbaga et al. 2018). Gaining details on VLC-PUFAs location is essential for a better understanding of their function, because VLC-PUFAs are thought to

be essential for the maintenance of the highly curved membrane disks of the PR outer segments (Suh, Wierzbicki et al. 2000). Rhodopsin is contained in outer segments, and the highest rhodopsin content is found in the retina of rats fed diets containing AA and/or DHA. Small manipulations of the dietary levels of AA and DHA are important determinants of FA composition of membrane lipid and visual pigment content (Suh, Wierzbicki et al. 2000).

MALDI-IMS results confirmed results obtained with gas chromatography and LC-MS: enriched diets and particularly PL-EPA, TG-DHA and in a lesser extent PL-DHA favored the incorporation of DHA into the retina. Our results depicted in the figure 7, indicate that this incorporation takes place in the photoreceptor layer, and particularly in an area around the optic nerve. MALDI image did not provide quantitative information, but deliver changes in localization. Thus, there was an area near the optic nerve where the intensity of PC44:12 is extremely high in all supplemented diet compared to control group. This area was previously described in a Study of Cortina, as the area that is most sensitive to oxidative stress induced by bright light treatment in rats (Cortina, Gordon et al. 2005). In this study, light-induced oxidative stress compromised photoreceptor integrity, particularly in an area next to the optic nerve, in the superior and nasal quadrant, suggesting that PR are most sensitive in this area. This particular response could mean that the outer segments may contain higher amount of disc and thus higher PUFA levels, leading to a higher sensitivity to oxidative stress. If this area contains more discs, it can incorporate more DHA from dietary intake. The high incorporation of the DHA and the other PUFAs in the retina may result in more plastic membranes, allowing a better phototransduction and a better synaptic function (Litman, Niu et al. 2001; Mitchell, Niu et al. 2001; Niu, Mitchell et al. 2001; Mitchell, Niu et al. 2003).

To our knowledge, for the first time, a study provides quantitative data on VLC-PUFA changes following different omega-3 rich diets. The main and most consistent findings in this study were that both EPA and DHA enhanced DHA incorporation into the retina and that FAs

provided by diet can trigger changes in spatial lipid organization of the retina. The significance of the work done is that it provides a high level of qualitative and quantitative details regarding every detectable molecular species and FA in the plasma, RBCs and retina, in a single source. Our study confirms that consuming foods rich in omega-3 are incorporated into retina, depending on the chemical form under which they are brought, to favor EPA esterified on PL and DHA on both PL and TG forms.

ACKNOWLEDGMENTS: Authors would like to thank the CSGA animal facility for excellent animal care. We want to thank AkerBiomarine and Novastell for having supplied us raw materials.

GRANT SUPPORT: Elisa Vidal is a PhD fellow from Horus Pharma Laboratories. The work has been funded by the Regional Council of Burgundy France (PARI Agral 1), FEDER (European Funding for Regional Economical Development), Association Nationale Recherche Technologie, Fondation de France, ANR-11-LABEX-0021.

REFERENCES

- Acar, N., O. Berdeaux, S. Gregoire, S. Cabaret, L. Martine, P. Gain, G. Thuret, C. P. Creuzot-Garcher, A. M. Bron and L. Bretilon (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.
- Ackman, R. G. (1981). "Flame ionization detection applied to thin-layer chromatography on coated quartz rods." Methods Enzymol **72**: 205-252.
- Agbaga, M. P., R. S. Brush, M. N. Mandal, K. Henry, M. H. Elliott and R. E. Anderson (2008). "Role of Stargardt-3 macular dystrophy protein (ELOVL4) in the biosynthesis of very long chain fatty acids." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(35): 12843-12848.
- Agbaga, M. P., S. Logan, R. S. Brush and R. E. Anderson (2014). "Biosynthesis of very long-chain polyunsaturated fatty acids in hepatocytes expressing ELOVL4." Adv Exp Med Biol **801**: 631-636.
- Aveldano, M. I. (1988). "Phospholipid species containing long and very long polyenoic fatty acids remain with rhodopsin after hexane extraction of photoreceptor membranes." Biochemistry **27**(4): 1229-1239.
- Aveldano, M. I. and H. Sprecher (1987). "Very long chain (C24 to C36) polyenoic fatty acids of the n-3 and n-6 series in dipolyunsaturated phosphatidylcholines from bovine retina." J Biol Chem **262**(3): 1180-1186.
- Bannenberg, G. and C. N. Serhan (2010). "Specialized pro-resolving lipid mediators in the inflammatory response: An update." Biochim Biophys Acta **1801**(12): 1260-1273.
- Bartlett, E. M. and D. H. Lewis (1970). "Spectrophotometric determination of phosphate esters in the presence and absence of orthophosphate." Anal Biochem **36**(1): 159-167.
- Bazan, N. G. (2005). "Neuroprotectin D1 (NPD1): a DHA-derived mediator that protects brain and retina against cell injury-induced oxidative stress." Brain Pathol **15**(2): 159-166.

- Bennett, L. D., B. R. Hopiavuori, R. S. Brush, M. Chan, M. J. Van Hook, W. B. Thoreson and R. E. Anderson (2014). "Examination of VLC-PUFA-deficient photoreceptor terminals." Invest Ophthalmol Vis Sci **55**(7): 4063-4072.
- Berdeaux, O., P. Juaneda, L. Martine, S. Cabaret, L. Bretillon and N. Acar (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.
- Blanchard, H., F. Pedrono, N. Boulrier-Monthean, D. Catheline, V. Rioux and P. Legrand (2013). "Comparative effects of well-balanced diets enriched in alpha-linolenic or linoleic acids on LC-PUFA metabolism in rat tissues." Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids **88**(5): 383-389.
- Bretillon, L., G. Thuret, S. Gregoire, N. Acar, C. Joffre, A. M. Bron, P. Gain and C. P. Creuzot-Garcher (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.
- Brown, M. F. (1994). "Modulation of rhodopsin function by properties of the membrane bilayer." Chem Phys Lipids **73**(1-2): 159-180.
- Burdge, G. C. and P. C. Calder (2005). "Conversion of alpha-linolenic acid to longer-chain polyunsaturated fatty acids in human adults." Reprod Nutr Dev **45**(5): 581-597.
- Burdge, G. C. and S. A. Wootton (2002). "Conversion of alpha-linolenic acid to eicosapentaenoic, docosapentaenoic and docosahexaenoic acids in young women." Br J Nutr **88**(4): 411-420.
- Cho, E., S. Hung, W. C. Willett, D. Spiegelman, E. B. Rimm, J. M. Seddon, G. A. Colditz and S. E. Hankinson (2001). "Prospective study of dietary fat and the risk of age-related macular degeneration." Am J Clin Nutr **73**(2): 209-218.

Cortina, M. S., W. C. Gordon, W. J. Lukiw and N. G. Bazan (2005). "Oxidative stress-induced retinal damage up-regulates DNA polymerase gamma and 8-oxoguanine-DNA-glycosylase in photoreceptor synaptic mitochondria." Exp Eye Res **81**(6): 742-750.

Dyerberg, J., P. Madsen, J. M. Moller, I. Aardestrup and E. B. Schmidt (2010). "Bioavailability of marine n-3 fatty acid formulations." Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids **83**(3): 137-141.

Ebaugh, F. G., Jr., C. P. Emerson and J. F. Ross (1953). "The use of radioactive chromium 51 as an erythrocyte tagging agent for the determination or red cell survival in vivo." J Clin Invest **32**(12): 1260-1276.

Flaxman, S. R., R. R. A. Bourne, S. Resnikoff, P. Ackland, T. Braithwaite, M. V. Cicinelli, A. Das, J. B. Jonas, J. Keeffe, J. H. Kempen, J. Leasher, H. Limburg, K. Naidoo, K. Pesudovs, A. Silvester, G. A. Stevens, N. Tahhan, T. Y. Wong, H. R. Taylor and S. Vision Loss Expert Group of the Global Burden of Disease (2017). "Global causes of blindness and distance vision impairment 1990-2020: a systematic review and meta-analysis." Lancet Glob Health **5**(12): e1221-e1234.

Fliesler, S. J. and R. E. Anderson (1983). "Chemistry and metabolism of lipids in the vertebrate retina." Prog Lipid Res **22**(2): 79-131.

Folch, J., M. Lees and G. H. Sloane Stanley (1957). "A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues." J Biol Chem **226**(1): 497-509.

Gawrisch, K., O. Soubias and M. Mihailescu (2008). "Insights from biophysical studies on the role of polyunsaturated fatty acids for function of G-protein coupled membrane receptors." Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids **79**(3-5): 131-134.

Ghasemifard, S., K. Hermon, G. M. Turchini and A. J. Sinclair (2015). "Metabolic fate (absorption, beta-oxidation and deposition) of long-chain n-3 fatty acids is affected by sex and by the oil source (krill oil or fish oil) in the rat." Br J Nutr **114**(5): 684-692.

Gorusupudi, A., A. Liu, G. S. Hageman and P. S. Bernstein (2016). "Associations of human retinal very long-chain polyunsaturated fatty acids with dietary lipid biomarkers." J Lipid Res **57**(3): 499-508.

Hankin, J. A., R. M. Barkley and R. C. Murphy (2007). "Sublimation as a method of matrix application for mass spectrometric imaging." J Am Soc Mass Spectrom **18**(9): 1646-1652.

Harkewicz, R., H. Du, Z. Tong, H. Alkuraya, M. Bedell, W. Sun, X. Wang, Y. H. Hsu, J. Esteve-Rudd, G. Hughes, Z. Su, M. Zhang, V. S. Lopes, R. S. Molday, D. S. Williams, E. A. Dennis and K. Zhang (2012). "Essential role of ELOVL4 protein in very long chain fatty acid synthesis and retinal function." J Biol Chem **287**(14): 11469-11480.

Harris, W. S. (2007). "International recommendations for consumption of long-chain omega-3 fatty acids." J Cardiovasc Med (Hagerstown) **8 Suppl 1**: S50-52.

Hopiavuori, B. R., M. P. Agbaga, R. S. Brush, M. T. Sullivan, W. E. Sonntag and R. E. Anderson (2017). "Regional changes in CNS and retinal glycerophospholipid profiles with age: a molecular blueprint." J Lipid Res **58**(4): 668-680.

Igarashi, M., J. C. DeMar, Jr., K. Ma, L. Chang, J. M. Bell and S. I. Rapoport (2007). "Docosahexaenoic acid synthesis from alpha-linolenic acid by rat brain is unaffected by dietary n-3 PUFA deprivation." J Lipid Res **48**(5): 1150-1158.

Jun, B., P. K. Mukherjee, A. Asatryan, M. A. Kautzmann, J. Heap, W. C. Gordon, S. Bhattacharjee, R. Yang, N. A. Petasis and N. G. Bazan (2017). "Elovanoids are novel cell-specific lipid mediators necessary for neuroprotective signaling for photoreceptor cell integrity." Sci Rep **7**(1): 5279.

Kishan, A. U., B. S. Modjtahedi, E. N. Martins, S. P. Modjtahedi and L. S. Morse (2011). "Lipids and age-related macular degeneration." Surv Ophthalmol **56**(3): 195-213.

Klaver, C. C., R. C. Wolfs, J. R. Vingerling, A. Hofman and P. T. de Jong (1998). "Age-specific prevalence and causes of blindness and visual impairment in an older population: the Rotterdam Study." Arch Ophthalmol **116**(5): 653-658.

Litman, B. J., S. L. Niu, A. Polozova and D. C. Mitchell (2001). "The role of docosahexaenoic acid containing phospholipids in modulating G protein-coupled signaling pathways: visual transduction." J Mol Neurosci **16**(2-3): 237-242; discussion 279-284.

Liu, A., J. Chang, Y. Lin, Z. Shen and P. S. Bernstein (2010). "Long-chain and very long-chain polyunsaturated fatty acids in ocular aging and age-related macular degeneration." J Lipid Res **51**(11): 3217-3229.

Mitchell, D. C., S. L. Niu and B. J. Litman (2001). "Optimization of receptor-G protein coupling by bilayer lipid composition I: kinetics of rhodopsin-transducin binding." J Biol Chem **276**(46): 42801-42806.

Mitchell, D. C., S. L. Niu and B. J. Litman (2003). "Enhancement of G protein-coupled signaling by DHA phospholipids." Lipids **38**(4): 437-443.

Moilanen, T. and T. Nikkari (1981). "The effect of storage on the fatty acid composition of human serum." Clin Chim Acta **114**(1): 111-116.

Morrison, W. R. and L. M. Smith (1964). "Preparation of Fatty Acid Methyl Esters and Dimethylacetals from Lipids with Boron Fluoride--Methanol." J Lipid Res **5**: 600-608.

Niu, S. L., D. C. Mitchell and B. J. Litman (2001). "Optimization of receptor-G protein coupling by bilayer lipid composition II: formation of metarhodopsin II-transducin complex." J Biol Chem **276**(46): 42807-42811.

Park, H. G., K. S. D. Kothapalli, W. J. Park, C. DeAllie, L. Liu, A. Liang, P. Lawrence and J. T. Brenna (2016). "Palmitic acid (16:0) competes with omega-6 linoleic and omega-3 alpha-linolenic acids for FADS2 mediated Delta6-desaturation." Biochim Biophys Acta **1861**(2): 91-97.

Pawlosky, R. J., J. R. Hibbeln, J. A. Novotny and N. Salem, Jr. (2001). "Physiological compartmental analysis of alpha-linolenic acid metabolism in adult humans." J Lipid Res **42**(8): 1257-1265.

Plourde, M. and S. C. Cunnane (2007). "Extremely limited synthesis of long chain polyunsaturates in adults: implications for their dietary essentiality and use as supplements." Appl Physiol Nutr Metab **32**(4): 619-634.

Querques, G., R. Forte and E. H. Souied (2011). "Retina and omega-3." J Nutr Metab **2011**: 748361.

Ramprasath, V. R., I. Eyal, S. Zchut and P. J. Jones (2013). "Enhanced increase of omega-3 index in healthy individuals with response to 4-week n-3 fatty acid supplementation from krill oil versus fish oil." Lipids Health Dis **12**: 178.

Rice, D. S., J. M. Calandria, W. C. Gordon, B. Jun, Y. Zhou, C. M. Gelfman, S. Li, M. Jin, E. J. Knott, B. Chang, A. Abuin, T. Issa, D. Potter, K. A. Platt and N. G. Bazan (2015). "Adiponectin receptor 1 conserves docosahexaenoic acid and promotes photoreceptor cell survival." Nat Commun **6**: 6228.

Salem, N., Jr. and C. N. Kuratko (2014). "A reexamination of krill oil bioavailability studies." Lipids Health Dis **13**: 137.

SanGiovanni, J. P., E. Y. Chew, T. E. Clemons, M. D. Davis, F. L. Ferris, 3rd, G. R. Gensler, N. Kurinij, A. S. Lindblad, R. C. Milton, J. M. Seddon, R. D. Sperduto and G. Age-Related Eye Disease Study Research (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.

Schori, C., M. P. Agbaga, R. S. Brush, R. Ayyagari, C. Grimm and M. Samardzija (2018). "Elov14 5-bp deletion does not accelerate cone photoreceptor degeneration in an all-cone mouse." PLoS One **13**(1): e0190514.

Schuchardt, J. P. and A. Hahn (2013). "Bioavailability of long-chain omega-3 fatty acids." Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids **89**(1): 1-8.

Schuchardt, J. P., I. Schneider, H. Meyer, J. Neubronner, C. von Schacky and A. Hahn (2011). "Incorporation of EPA and DHA into plasma phospholipids in response to different omega-3 fatty acid formulations--a comparative bioavailability study of fish oil vs. krill oil." Lipids Health Dis **10**: 145.

Sebedio, J. L., P. O. Astorg, C. Septier and A. Grandgirard (1987). "Quantitative analyses of polar components in frying oils by the iatroscan thin-layer chromatography-flame ionization detection technique." J Chromatogr **405**: 371-378.

Seddon, J. M., S. George and B. Rosner (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, R. D. Sperduto, L. Yannuzzi, J. A. Haller, N. P. Blair and W. Willett (2001). "Dietary fat and risk for advanced age-related macular degeneration." Arch Ophthalmol **119**(8): 1191-1199.

Simon, E., B. Bardet, S. Gregoire, N. Acar, A. M. Bron, C. P. Creuzot-Garcher and L. Breuille (2011). "Decreasing dietary linoleic acid promotes long chain omega-3 fatty acid incorporation into rat retina and modifies gene expression." Exp Eye Res **93**(5): 628-635.

Simopoulos, A. P. (2002). "The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids." Biomed Pharmacother **56**(8): 365-379.

Suh, M. and M. T. Clandinin (2005). "20:5n-3 but not 22:6n-3 is a preferred substrate for synthesis of n-3 very-long- chain fatty acids (C24-C36) in retina." Curr Eye Res **30**(11): 959-968.

Suh, M., A. A. Wierzbicki, E. L. Lien and M. T. Clandinin (2000). "Dietary 20:4n-6 and 22:6n-3 modulates the profile of long- and very-long-chain fatty acids, rhodopsin content, and kinetics in developing photoreceptor cells." Pediatr Res **48**(4): 524-530.

Taha, A. Y., Y. Cheon, K. F. Faurot, B. Macintosh, S. F. Majchrzak-Hong, J. D. Mann, J. R. Hibbeln, A. Ringel and C. E. Ramsden (2014). "Dietary omega-6 fatty acid lowering increases bioavailability of omega-3 polyunsaturated fatty acids in human plasma lipid pools." Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids **90**(5): 151-157.

Ulven, S. M., B. Kirkhus, A. Lamglait, S. Basu, E. Elind, T. Haider, K. Berge, H. Vik and J. I. Pedersen (2011). "Metabolic effects of krill oil are essentially similar to those of fish oil but at lower dose of EPA and DHA, in healthy volunteers." Lipids **46**(1): 37-46.

Wang, N. and R. E. Anderson (1993). "Transport of 22:6n-3 in the plasma and uptake into retinal pigment epithelium and retina." Exp Eye Res **57**(2): 225-233.

Yurko-Mauro, K., J. Kralovec, E. Bailey-Hall, V. Smeberg, J. G. Stark and N. Salem, Jr. (2015). "Similar eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid plasma levels achieved with fish oil or krill oil in a randomized double-blind four-week bioavailability study." Lipids Health Dis **14**: 99.

Zemski Berry, K. A., W. C. Gordon, R. C. Murphy and N. G. Bazan (2014). "Spatial organization of lipids in the human retina and optic nerve by MALDI imaging mass spectrometry." J Lipid Res **55**(3): 504-515.

Zhang, K., M. Kniazeva, M. Han, W. Li, Z. Yu, Z. Yang, Y. Li, M. L. Metzker, R. Allikmets, D. J. Zack, L. E. Kakuk, P. S. Lagali, P. W. Wong, I. M. MacDonald, P. A. Sieving, D. J. Figueroa, C. P. Austin, R. J. Gould, R. Ayyagari and K. Petrukhin (2001). "A 5-bp deletion in ELOVL4 is associated with two related forms of autosomal dominant macular dystrophy." Nat Genet **27**(1): 89-93.

TABLES

Table 1: Diet composition. The ingredient compositions of the diets were provided by the diet suppliers. The fatty acid compositions were determined by our group using gas chromatography and flame ionization detection.

Ingredients	Control	PL EPA	PL DHA	TG EPA	TG DHA
Mix Oil (%)	10	10	10	10	10
Casein (%)	18	18	18	18	18
Corn Starch (%)	38,25	38,25	38,25	38,25	38,25
Dextrose (%)	18	18	18	18	18
Sucrose (%)	6	6	6	6	6
Cellulose (%)	5	5	5	5	5
Minerals and vitamins (%)	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5
Bitartrate choline (%)	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25

Table 2: Diet Composition. The fatty acid compositions were determined by our group using gas chromatography and flame ionization detection.

% of total fatty acids					
12:0	0,13	0,14	0,04	0,09	0,11
14:0	0,62	1,86	0,82	0,60	0,57
15:0	0,05	0,11	0,16	0,06	0,04
dma16:0	-	-	0,13	-	-
16:0	21,35	21,16	20,64	22,00	21,85
16:1n-9	0,04	0,05	0,08	-	-
16:1n-7	0,18	1,20	1,01	0,16	0,18
17:0	0,08	0,09	0,22	0,07	0,07
dma18:0	-	-	0,15	-	-
dma18:1n-9	-	-	0,12	-	-
18:0	3,82	3,44	7,47	3,84	3,72
18:1 t	1,20	0,51	0,65	0,60	0,42
18:1n-9	56,49	44,68	42,54	46,65	47,03
18:1n-7	1,88	3,02	2,31	1,69	1,67
18:2 tc	0,15	0,14	0,08	0,15	0,15
18:2 ct	0,14	0,12	0,06	0,13	0,13
18:2n-6 (LA)	10,67	12,61	10,96	11,74	12,37
20:0	0,32	0,27	0,15	0,33	0,30
18:3n-6	-	-	0,07	0,10	0,10
20:1n-9	0,19	0,26	0,15	0,43	0,30
18:3n-3 (ALA)	2,19	2,60	2,36	2,46	2,58
20:2n-6	0,05	0,05	0,09	0,07	0,07
22:0	0,31	0,24	0,30	0,29	0,30
20:3n-6	-	-	0,10	0,06	0,03
22:1n-9	-	0,14	0,05	-	-
20:4n-6 (AA)	-	0,15	1,03	0,35	0,21
20:5n-3 (EPA)	-	4,48	2,18	5,44	2,70
24:0	0,13	0,22	0,14	0,20	0,18
22:4n-6	-	-	0,06	-	0,04
22:5n-6	-	-	0,13	0,14	0,25
22:5n-3 (DPA)	-	0,11	0,20	0,14	0,26
22:6n-3 (DHA)	-	2,28	5,55	2,14	4,27
24:1n-9	0,01	0,07	-	0,07	0,10
LA/ALA	4,87	4,85	4,64	4,77	4,79

Table 3: EPA and DHA containing triglycerides and phospholipids in diets.

Lipid classes content (%)	Control	PL EPA	PL DHA	TG EPA	TG DHA
Triglyceride	90,5	73,3	48,4	89,6	87,7
DHA	-	0	0	0,62	1,59
EPA	-	0,08	0	2,31	1
Phospholipid	0	21,4	49,7	0	0
DHA	-	11,78	9,75	-	-
EPA	-	23,3	3,93	-	-
Cholesterol	0	0,5	0,4	0	0
Diglyacylcerol	6,8	4,8	1,5	6,2	5,8
Monoacylglycerol	2,7	0	0	4,2	6,5

Table 4: Fatty acids composition of total lipids from rat retina tissue, following supplemented diet

% of total fatty acids	Control	PL-EPA	PL-DHA	TG-EPA	TG-DHA
14:0	0,16 ± 0.03	0,07 ± 0.01	0,10 ± 0.05	0,16 ± 0.05	0,07 ± 0.02
15:0	0,08 ± 0.02	0,05 ± 0.01	0,07 ± 0.02	0,08 ± 0.02	0,05 ± 0.01
dma 16:0	0,88 ± 0.08	0,85 ± 0.08	0,86 ± 0.09	0,86 ± 0.1	0,83 ± 0.04
		16,47 ±	17,78 ±		
16:0	20,18 ± 0.58	0.53	2.01	18,65 ± 2.02	16,86 ± 0.86
16:1n-9	0,21 ± 0.02	0,15 ± 0.01	0,17 ± 0.03	0,19 ± 0.03	0,15 ± 0.01
16:1n-7	0,37 ± 0.06	0,30 ± 0.05	0,36 ± 0.07	0,40 ± 0.12	0,26 ± 0.02
17:0	0,15 ± 0.01	0,14 ± 0.01	0,17 ± 0.02	0,15 ± 0.01	0,13 ± 0.01
dma 18:0	2,75 ± 0.08	2,83 ± 0.12	2,72 ± 0.11	2,76 ± 0.14	2,83 ± 0.11
dma 18:1n-9	0,41 ± 0.04	0,37 ± 0.04	0,37 ± 0.03	0,38 ± 0.03	0,36 ± 0.02
dma 18:1n-7	0,21 ± 0.03	0,22 ± 0.05	0,21 ± 0.04	0,19 ± 0.03	0,17 ± 0.02
		24,80 ±	24,94 ±		
18:0	25,35 ± 0.56	0.45	0.91	26,06 ± 0.86	25,46 ± 0.65
18:1t	0,05 ± 0.01	0,04 ± 0.01	0,06 ± 0.01	0,05 ± 0.01	0,04 ± 0.0
18:1n-9	9,16 ± 0.29	8,55 ± 0.46	8,48 ± 0.44	9,05 ± 0.47	8,43 ± 0.35
18:1n-7	2,48 ± 0.16	2,27 ± 0.18	2,23 ± 0.17	2,21 ± 0.15	1,90 ± 0.12
18:2n-6	0,76 ± 0.11	0,87 ± 0.09	0,74 ± 0.1	0,92 ± 0.12	0,8 ± 0.06
20:0	0,11 ± 0.02	0,09 ± 0.02	0,09 ± 0.02	0,14 ± 0.02	0,09 ± 0.01
20:1n-9	0,17 ± 0.01	0,13 ± 0.01	0,14 ± 0.02	0,16 ± 0.03	0,17 ± 0.02
20:1n-7	0,04 ± 0.0	0,03 ± 0.01	0,04 ± 0.02	0,06 ± 0.02	0,05 ± 0.02
20:2n-6	0,09 ± 0.01	0,09 ± 0.01	0,09 ± 0.01	0,09 ± 0.01	0,09 ± 0.01
20:3n-9	0,05 ± 0.01	0,05 ± 0.03	0,06 ± 0.04	0,08 ± 0.04	0,04 ± 0.01
20:3n-6	0,13 ± 0.01	0,17 ± 0.01	0,13 ± 0.01	0,15 ± 0.02	0,15 ± 0.01
20:4n-6	8,72 ± 0.31	8,10 ± 0.49	8,33 ± 0.23	7,86 ± 0.52	7,85 ± 0.31
20:5n-3	0,07 ± 0.02	0,42 ± 0.05	0,27 ± 0.04	0,35 ± 0.04	0,33 ± 0.05
24:0	0,04 ± 0.01	0,05 ± 0.02	0,06 ± 0.01	0,09 ± 0.02	0,04 ± 0.01
22:4n-6	1,24 ± 0.06	0,91 ± 0.06	1,01 ± 0.08	0,90 ± 0.08	0,90 ± 0.05
22:5n-6	0,59 ± 0.1	0,10 ± 0.01	0,14 ± 0.01	0,13 ± 0.02	0,15 ± 0.02
22:5n-3	0,34 ± 0.03	0,89 ± 0.06	0,62 ± 0.05	0,88 ± 0.04	0,67 ± 0.07
		30,87 ±	29,77 ±		
22:6n-3	25,09 ± 0.5	1.28	1.65	27,02 ± 1.61	31,15 ± 1.18

Values are mean ± standard deviation (n=8 rats per group)

DMAAs: dimethyl acetals

FIGURES

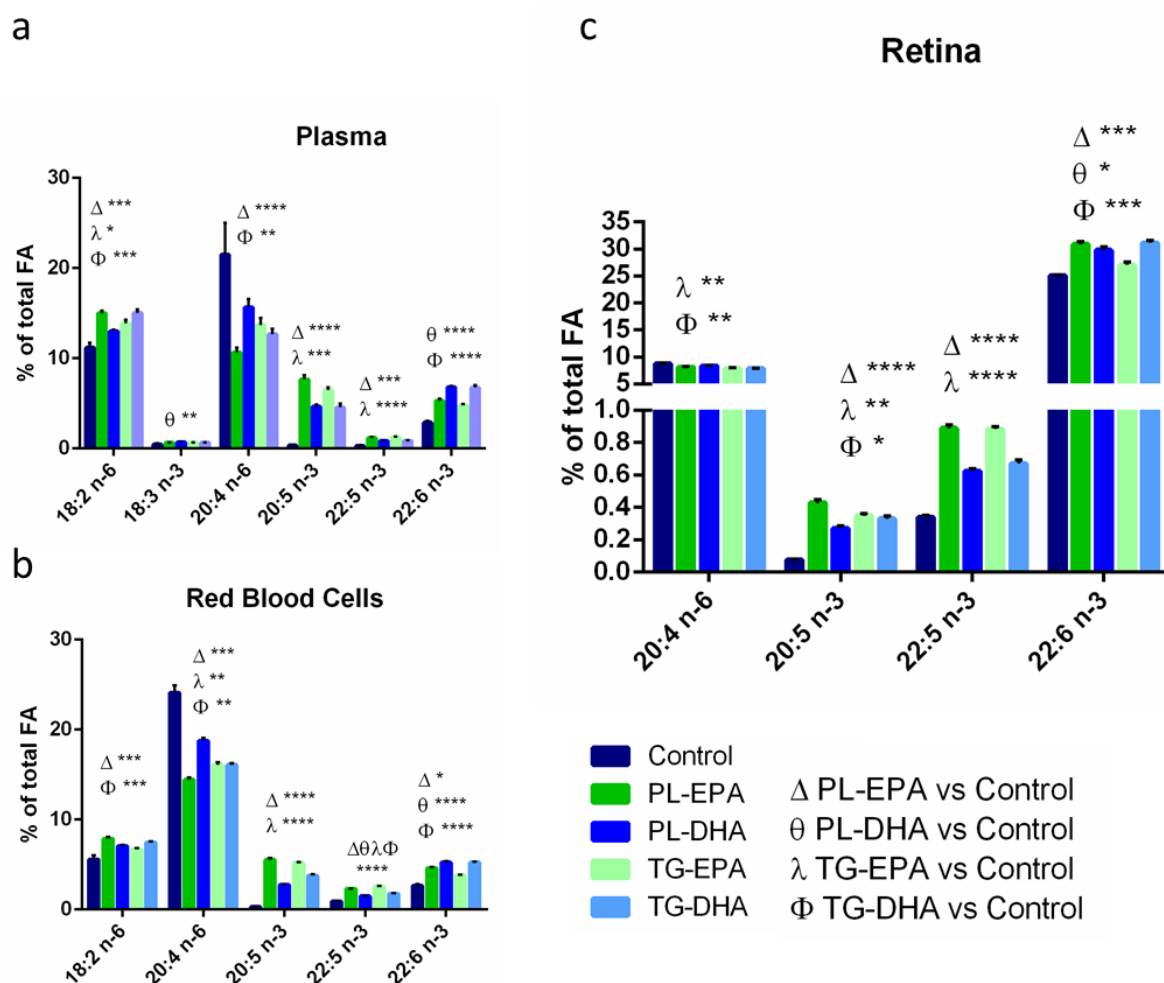


Figure 1: Levels of relevant fatty acids (FA) in the plasma (a), erythrocytes (b) and retina (c) performed by gas chromatography followed by flame ionization detector. Bars represent the mean + standard deviation. *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$, ****: $P < 0.0001$.

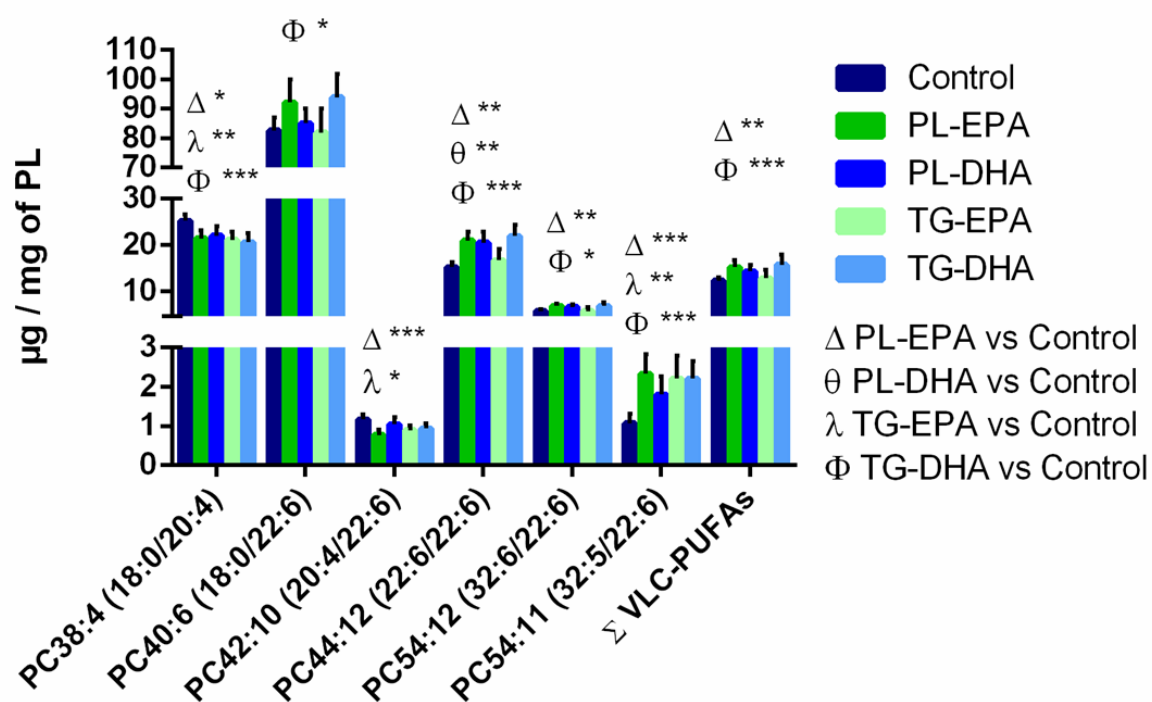


Figure 2: Quantitative amount of relevant species contained within PC. VLC-PUFA: very long chain-polyunsaturated fatty acids. Bars represent the mean + standard deviation. *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$.

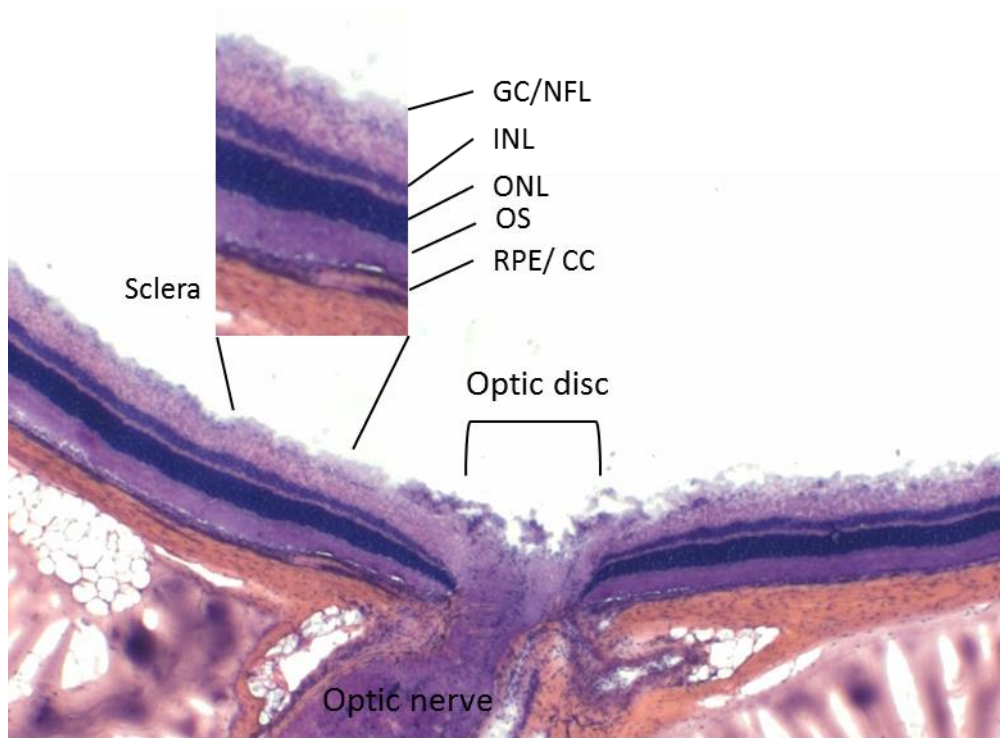


Figure 3: Hematoxylin and Eosin stain of ocular tissue section. GCNFL: Ganglion Cell/Nerve fiber layer. INL: Inner Nuclear Layer. ONL: Outer Nuclear Layer. OS: Outer Segment. RPE/CC: Retinal Pigment Epithelium/choriocapillaris.

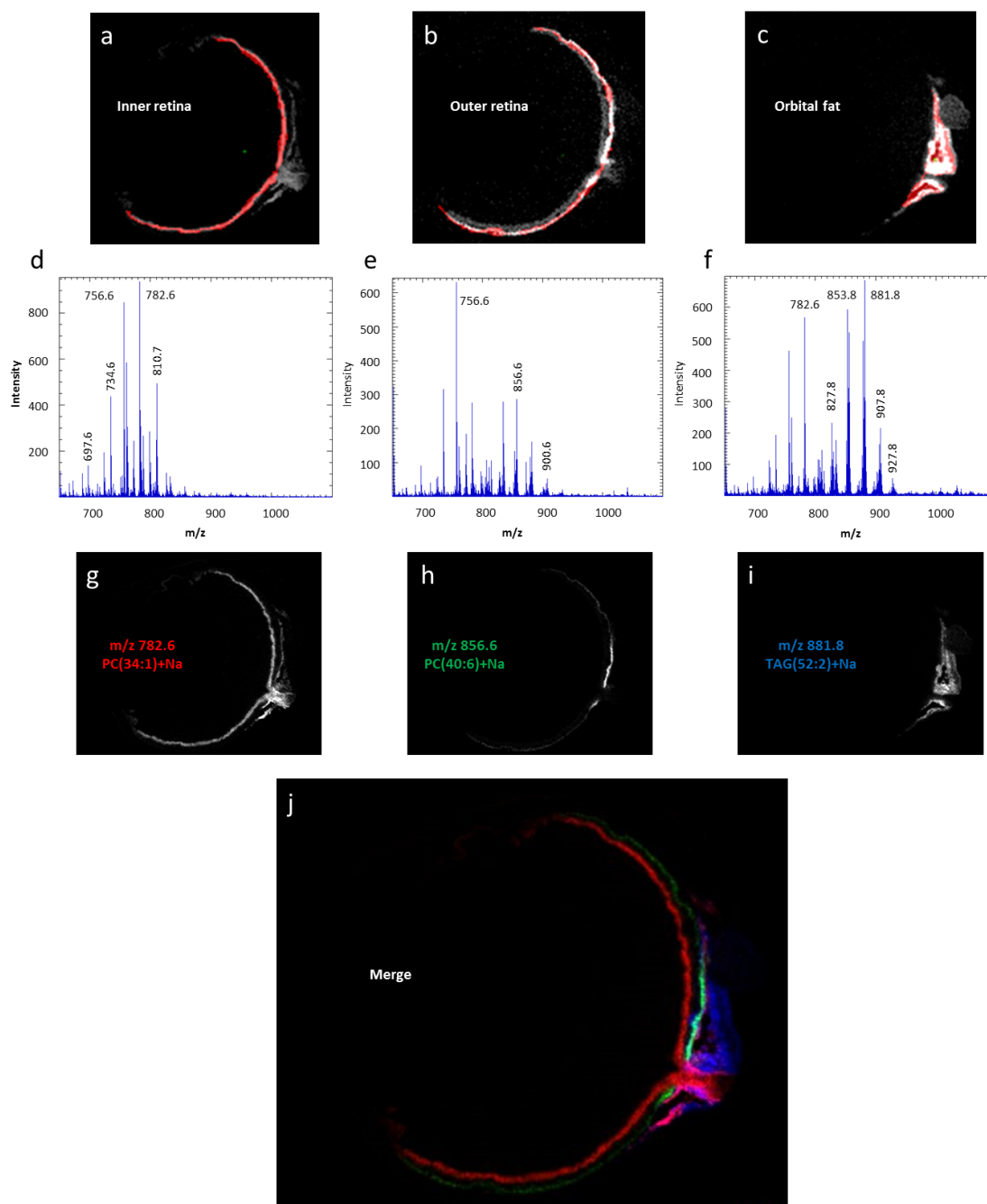


Figure 4: Positive ion MALDI IMS in rat ocular tissue. Region of interest (ROI) were selected as inner retina (a), outer retina (b) and orbital fat (c), corresponding to total positive ion MALDI mass spectra of inner retina (d), outer retina (e) and orbital fat (f). Extracted positive ion MALDI images of the $[M+Na]^+$ of PC(34:1) (m/z 782.6) (g), PC(40:6) (856.6) (h) and TAG(52:2) (m/z 881.8) (i). (j): Merged positive ion MALDI image of PC(34:1) (red), PC(40:6) (green) and TAG(52:2) (blue).

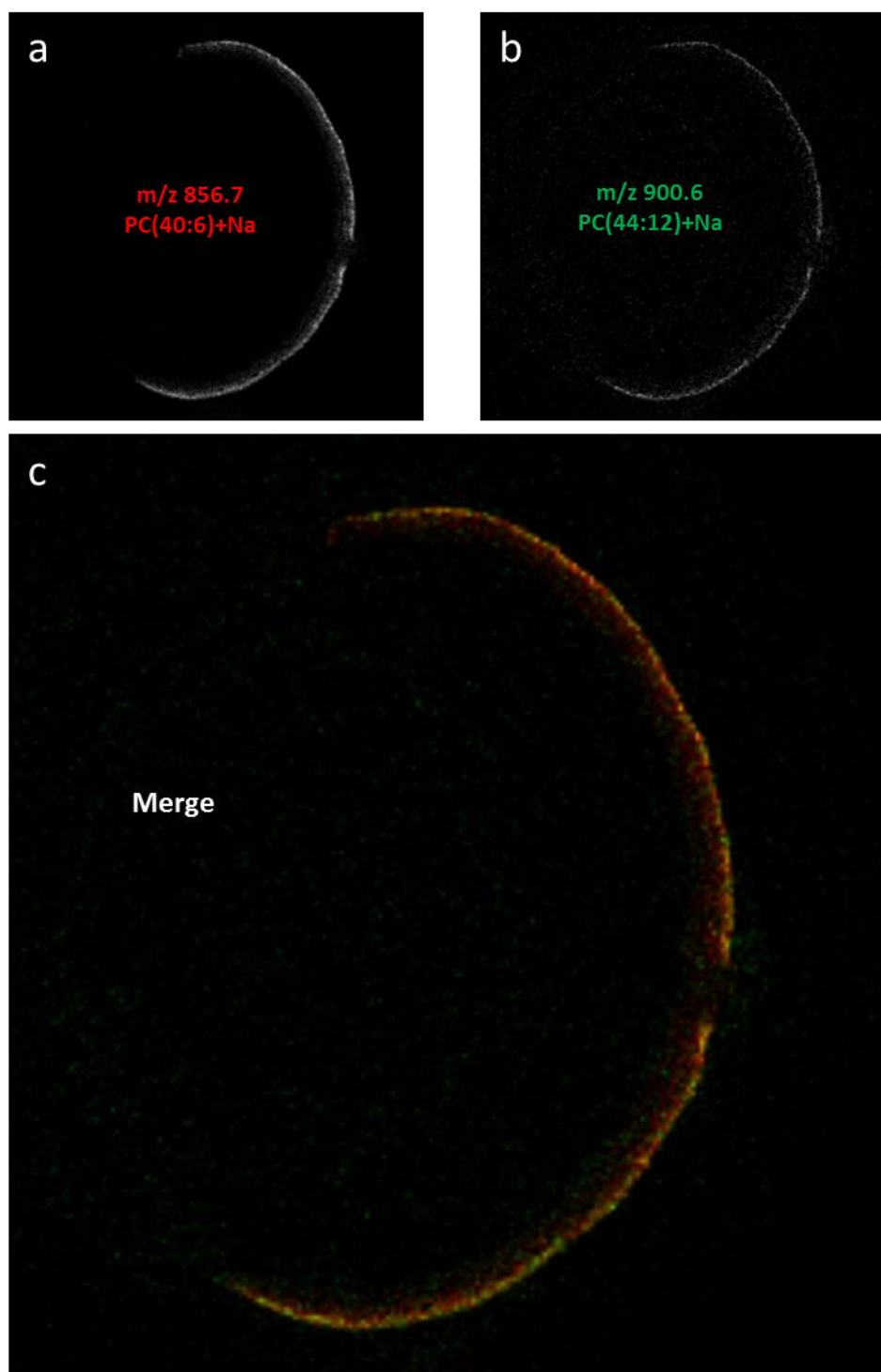


Figure 5: Extracted positive ion MALDI images of the $[M+Na]^+$ of PC(40:6) (m/z 856.7) (a) and PC(44:12) (900.6) (b). Merged positive ion MALDI image of PC(40:6) (red) and PC(44:12) (green).

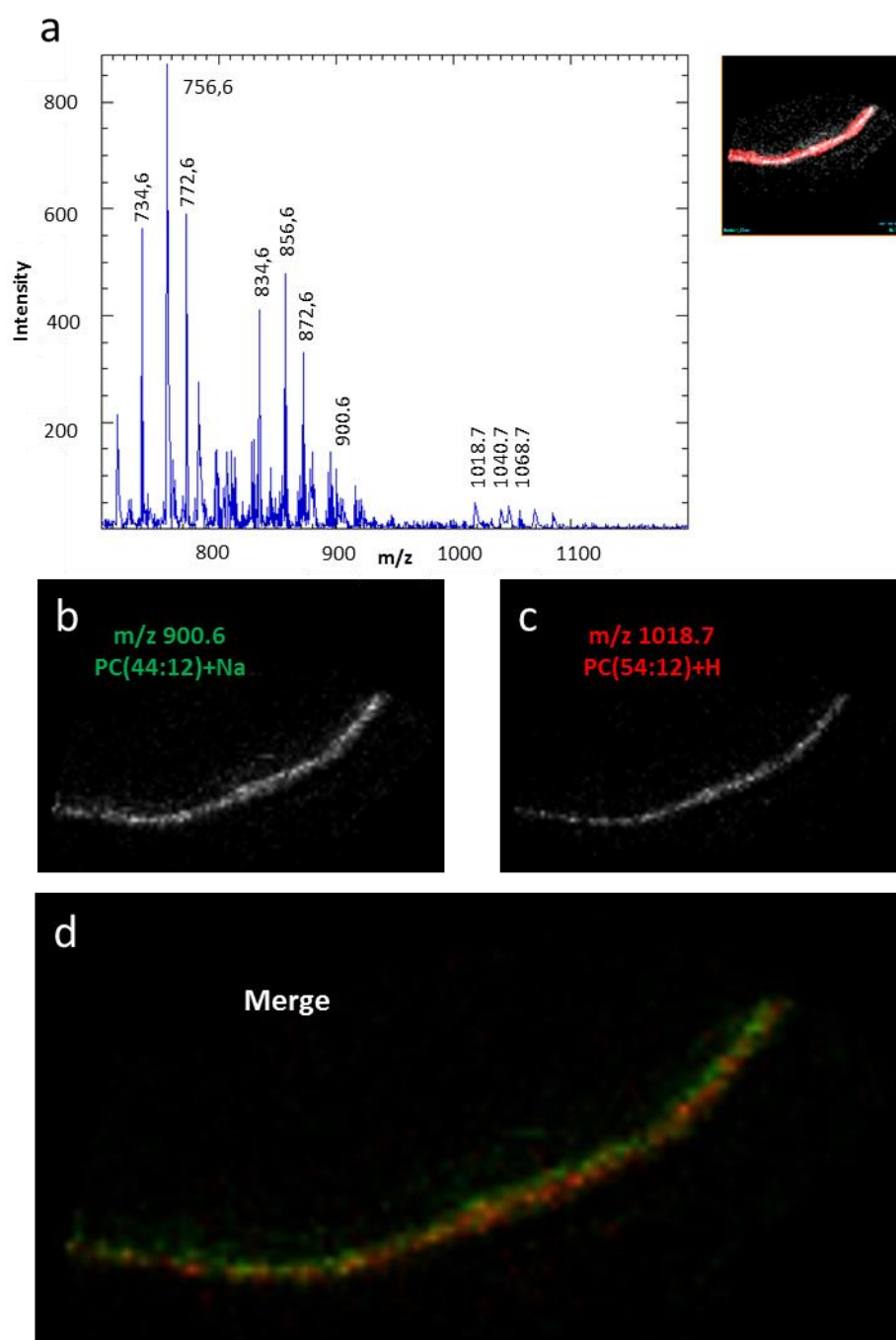


Figure 6: Outer retina was selected as region of interest (ROI), corresponding to total positive ion MALDI mass spectra (a). Extracted positive ion MALDI images of the $[M+Na]^+$ of PC(44:12) (m/z 900.6) (b), and of the $[M+H]^+$ of PC(54:12) (1018.7) (c). (d): Merged positive ion MALDI image of PC(54:12) (red), PC(44:12) (green).

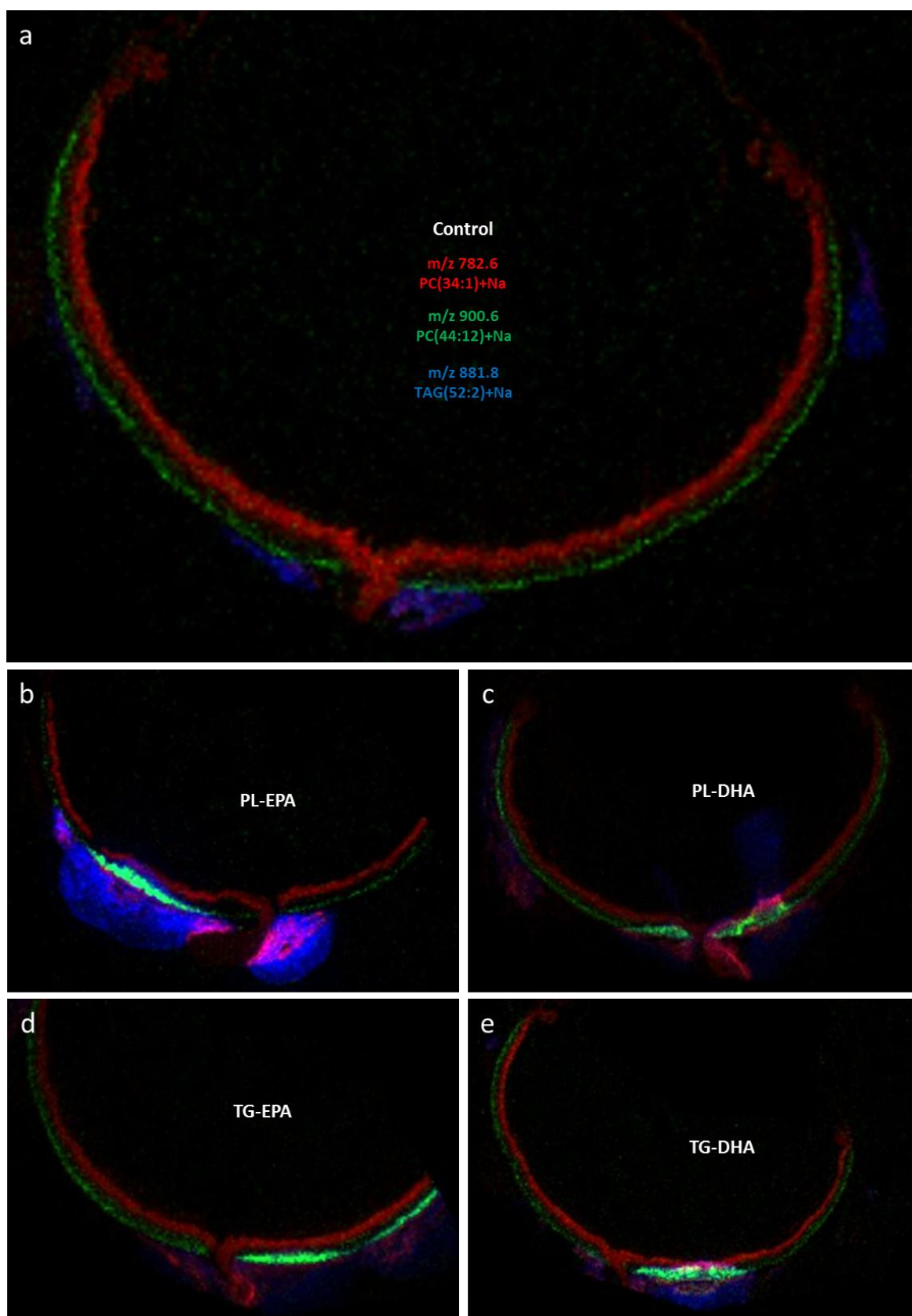


Figure 7: Merged positive ion MALDI image of PC(34:1) (red), PC(44:12) (green) and TAG(52:2) for the group control (a), PL-EPA (b), PL-DHA (c), TG-EPA (d), TG-DHA (e).

C. Résultats principaux et conclusions

Les résultats obtenus dans cette étude ont permis de montrer une augmentation de DHA dans la rétine induite par les régimes supplémentés en TG-DHA, PL-DHA et TG-EPA. Dans le plasma, l'EPA est augmenté dans les groupes nourris avec les régimes enrichis en EPA, alors que le DHA est augmenté dans le plasma des groupes nourris avec les régimes enrichis en DHA, sans qu'il y ait de différences entre les formes phospholipides et triglycérides. Dans les globules rouges, l'EPA est augmenté dans tous les groupes, alors que le DHA est augmenté dans les groupes TG-DHA, PL-DHA et TG-EPA, comme dans la rétine. Cette donnée est en accord avec des études précédentes qui indiquent que les globules rouges sont de meilleurs biomarqueurs de la prise alimentaire que le plasma (Acar, Berdeaux et al. 2012), par leur durée de vie de 120 jours (Ebaugh, Emerson et al. 1953). De plus, nos données quantitatives obtenues en LC/MS ont révélé que l'incorporation de DHA dans la rétine était principalement due à une augmentation des phosphatidylcholine estérifiés par deux DHA (PC44 :12). L'ensemble des régimes permettent l'augmentation des AGPI-VLC dans la rétine. Les AGPI-VLC estérifiés sur des PC dans la rétine, sont synthétisés par une enzyme l'ELOVL4, dont la mutation est responsable de la maculopathie juvénile de Stargardt (Zhang, Kniazeva et al. 2001). Nos résultats ont également permis d'apporter des détails sur la localisation des acides gras dans la rétine. En effet, le PC (DHA/DHA) apparait en colocalisation partielle avec le PC (DHA/Acide stéarique), qui s'étend en interne de la couche de photorécepteurs. De plus, le PC (DHA/DHA) et AGPI-VLC semblent ne pas être colocalisés, les AGPI-VLC se situant dans la partie la plus externe de la couche des photorécepteurs. Ces détails montrent l'importance de la localisation des lipides au sein de la rétine. Enfin, l'ensemble des suppléments entraînent une augmentation du signal associé au PC (DHA/DHA) dans la couche des photorécepteurs, particulièrement au niveau d'une zone proche du nerf optique. Cette zone a précédemment été décrite comme une zone sensible au stress oxydant induit par la lumière (Cortina, Gordon et al. 2005).

Pour conclure, c'est la première fois qu'une étude révèle une augmentation des AGPI-VLC induite par la supplémentation de l'alimentation en AGPI-LC, et précise le lieu d'intégration du DHA dans la rétine. D'autre part, nos données indiquent un réel intérêt pour le régime PL-EPA par rapport au régime TG-EPA dans l'intégration du DHA dans la rétine. Le régime TG-DHA serait également plus favorable que le régime riche en PL-DHA à l'intégration du DHA dans la rétine.

Nous avons également utilisé deux autres régimes, non présentés dans l'article. Ces régimes sont constitués, pour la partie lipidique :

- de poudre d'œuf enrichie en DHA (régime oeuf), constitué de 100% de PL contenant exclusivement du DHA et des traces d'EPA
- d'huile de hareng, dont la formule correspond à une formule utilisée chez l'homme, où EPA et DHA sont estérifiés sur PL et TG à la fois.

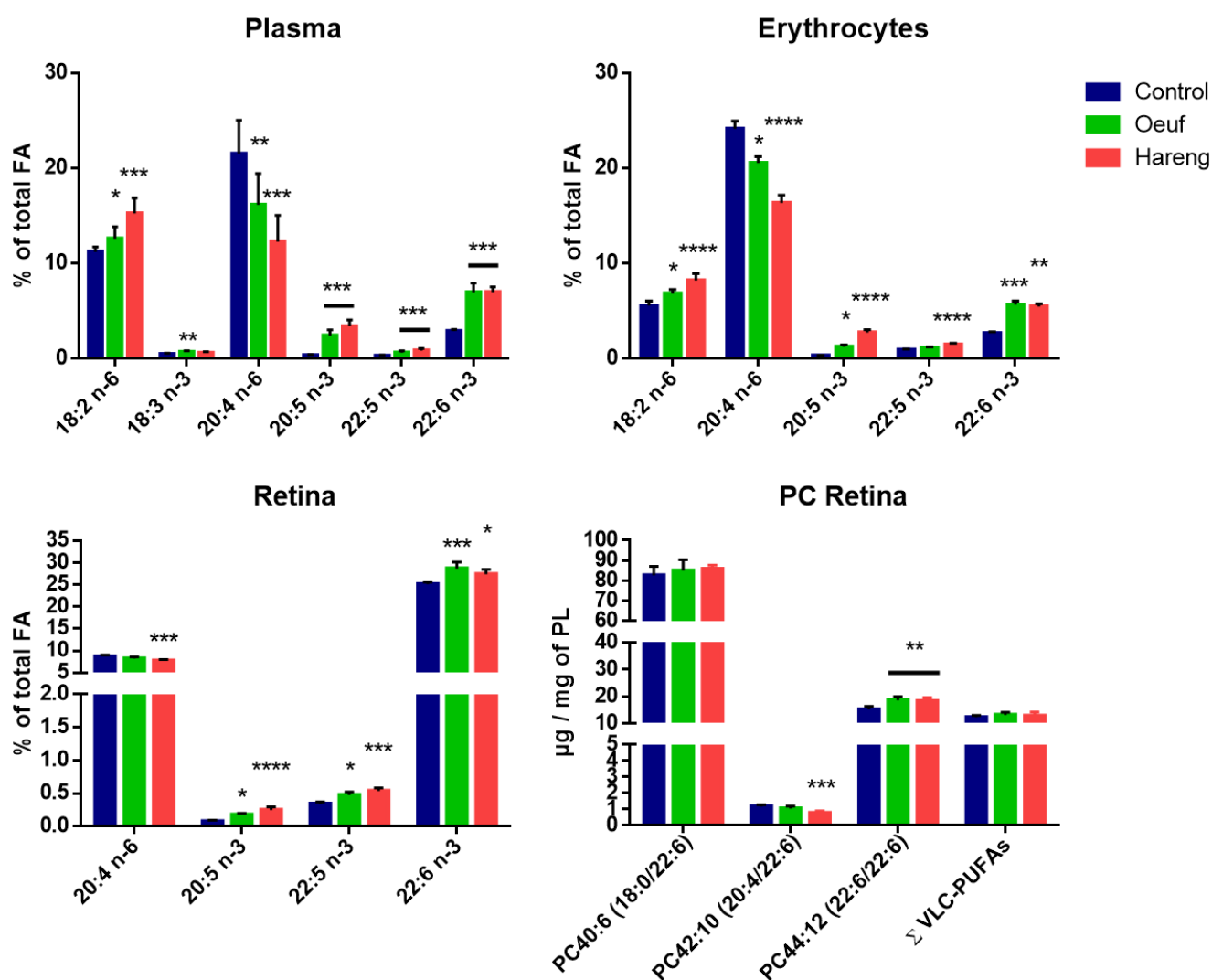
Les compositions des régimes et les résultats sont présentés dans les figures suivantes. Pour ces régimes également, les acides gras C16:0 et le ratio LA/ALA sont semblables entre les groupes. Ainsi, les deux régimes induisent l'augmentation du DHA dans la rétine, notamment les PC(DHA/DHA), mais ne permettent pas l'augmentation de la somme des AGPI-VLC.

Contenu en AG (%)	Control	Œuf	Hareng
12:0	0,13	-	0,11
14:0	0,62	0,26	0,77
15:0	0,05	0,13	0,06
dma16:0	-	0,12	-
16:0	21,35	20,75	23,27
16:1n-9	0,04	0,08	0,05
16:1n-7	0,18	0,66	0,32
17:0	0,08	0,23	0,08
dma18:0	-	0,17	-
dma18:1n-9	-	0,12	-
18:0	3,82	7,97	3,55
18:1 t	1,2	0,63	0,73
18:1n-9	56,49	45,82	47,45
18:1n-7	1,88	1,96	2,03
18:2 tc	0,15	0,07	0,17
18:2 ct	0,14	0,05	0,15
18:2n-6 (LA)	10,67	10,78	12,29
20:0	0,32	0,15	0,34
18:3n-6	-	-	0,11
20:1n-9	0,19	0,15	0,31
18:3n-3 (ALA)	2,19	2,51	2,57
20:2n-6	0,05	0,09	0,06
22:0	0,31	0,25	0,52
22:1n-9	-	-	0,03
20:3n-6	-	0,09	-
20:4n-6 (AA)	-	1,09	0,05
20:5n-3 (EPA)	-	0,48	1
24:0	0,13	0,1	0,16
24:1n-9	0,01	-	0,1
22:4n-6	-	0,07	0,03
22:5n-6	-	0,13	0,09
22:5n-3 (DPA)	-	0,17	0,34
22:6n-3 (DHA)	-	4,92	3,26
LA/ALA	4,87	4,29	4,78

Composition des régimes Œuf et Hareng en acides gras.

	Control	Oeuf	Hareng
Triglyceride	90.5	34.2	87.3
DHA	0	-	1.31
EPA	0	-	0.36
Phospholipid	0	63.7	8.4
DHA	-	9.93	24.06
EPA	-	0.6	10.02
Cholesterol	0	1.2	0
Diglyceride	6.8	0.9	4.3
Monoglyceride	2.7	0	0

Composition des régimes Oeuf et Hareng



Changements en acides gras dans le plasma, les globules rouges et la rétine.

Discussion générale et perspectives

Le SMet est considéré aujourd'hui comme la maladie du siècle par le nombre toujours croissant de personnes qu'il touche. Il est un facteur de risque de développer un diabète de type 2 et des pathologies cardiovasculaires. Les complications du diabète sur la rétine sont bien connues dans le cas de la rétinopathie diabétique, mais les effets du SMet sur la rétine sont peu étudiés. Nous formulons l'hypothèse qu'une prise en charge précoce du SMet pourrait diminuer les conséquences à long terme. Une alimentation riche en AGPI-LC de type oméga-3, comme le DHA et l'EPA et pauvre en oméga-6 participerait à prévenir l'insulinorésistance, une composante du SMet, et serait protectrice du vieillissement de la rétine et des premiers stades de la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA). Les données de biodisponibilité des AGPI-LC oméga 3 dans la rétine sont peu nombreuses et controversées. Ainsi, nos travaux avaient pour objectifs d'évaluer l'effet d'un régime pro-diabéto-gène sur le métabolisme glucidique et lipidique chez le rat pour, de manière concomitante, étudier les conséquences fonctionnelles et structurales sur la rétine. Nous souhaitons ainsi associer les dysfonctions métaboliques aux altérations de la rétine. Notre second objectif était de déterminer si la forme d'apport des acides gras avait un impact sur leur degré d'intégration dans la rétine, en particulier au sein de la couche cellulaire qui en contient la plus grande proportion, à savoir la couche des photorécepteurs.

Le régime HFHF induit principalement des altérations du métabolisme glucidique.

Pendant de nombreuses années, la définition du SMet a évolué jusqu'à faire l'objet d'un consensus. Le SMet est caractérisé par la présence d'une obésité abdominale dont les critères dépendent de l'ethnie à laquelle on appartient, d'une hyperglycémie à jeun, d'une hypertension artérielle, d'une hypertriglycéridémie et de faibles quantités de cholestérol HDL. Dans notre première étude, nous considérons le SMet, non pas au sens strict puisque la tension artérielle n'a pas été mesurée, mais dans l'objectif d'étudier les conséquences de plusieurs altérations métaboliques liées au SMet sur la rétine.

Nous avons souhaité induire les symptômes d'un SMet humain sur un modèle rongeur. Contrairement aux études dont le but est d'étudier la fonction d'un gène intervenant dans le développement d'altérations métaboliques, les conditions expérimentales recherchées dans notre étude ont été celles qui, de manière optimale, ont permis d'induire un

phénotype ressemblant au SMet retrouvé chez l'homme. Notre choix s'est donc porté sur l'induction du SMet via des manipulations de l'alimentation.

Dans notre première étude, le SMet fut induit en nourrissant des rats Brown Norway pendant de courtes périodes avec un régime composé de 60% de fructose et 10% de lipides saturés (HFHF). Le métabolisme du glucose est le principal élément altéré de manière importante dans notre modèle. L'altération de ce paramètre paraît comme essentielle. En effet, certaines études dont celle de Naveed Sattar et ses collaborateurs (Sattar, McConnachie et al. 2008) démontrent sur une cohorte de patients âgés, qu'en présence de SMet, l'hyperglycémie à jeun ($\geq 6,1$ mM) est le critère qui contribue le plus à augmenter le risque de diabète par rapport à un IMC élevé (≥ 30 kg/m²), à l'hypertriglycéridémie ($\geq 1,69$ mM), au faible taux de cholestérol-HDL ($\leq 1,04$ mM chez les hommes et $\leq 1,29$ mM chez les femmes) et à une tension artérielle élevée ($\geq 130/85$ mmHg) qui, même si c'est dans une moindre mesure, contribuent également à augmenter le risque de diabète. Par ailleurs, dans notre étude chez le rat Brown Norway (BN), le régime HFHF ne permet pas d'induire une dyslipidémie dans les 3 mois, ce qui est en accord avec les données montrant que la dyslipidémie apparaît uniquement après une hyper insulïnémie ou une fois un diabète installé (Hallfrisch, Reiser et al. 1983; Crapo, Kolterman et al. 1986). Nos résultats suggèrent alors que, de manière très précoce, l'altération du métabolisme du glucose semble être le dysfonctionnement à l'origine des autres symptômes composant le SMet.

Le régime HFHF induit une diminution de la sensibilité des cônes.

A l'aune de ces données, les analyses fonctionnelles de la rétine des rats BN par électrorétinographie ont révélé une diminution de la sensibilité des photorécepteurs de type cône après 4 semaines de régime HFHF, sans que d'autres atteintes fonctionnelles aient été mises en évidence. Cette donnée est primordiale car observer une perte de sensibilité des cônes chez un animal, le rongeur, qui en possède très peu (de 2 à 5% de la totalité des photorécepteurs) suggère une importance du métabolisme du glucose dans la fonction de ces cellules. Plusieurs arguments plaident en faveur du rôle clé du glucose dans les cônes. D'une part, les cônes ont une trophicité qui dépend d'un facteur de viabilité dérivé des bâtonnets (RdCVF, *rod-derived cone viability factor*) (Leveillard, Mohand-Said et al. 2004). Le RdCVF induit l'entrée de glucose dans les cônes via le

transporteur au glucose GLUT1 (Ait-Ali, Fridlich et al. 2015), son rôle protecteur des cônes semblant s'exprimer essentiellement en conditions de stress, dont le stress oxydatif (Cronin, Raffelsberger et al. 2010). D'autre part, il a été montré par l'équipe de Punzo que l'activation de la cible de la rapamycine chez les mammifères (mTORC1, *mammalian target of rapamycin complex 1*) augmente la survie des cônes par l'augmentation de l'absorption de glucose par les cônes (Venkatesh, Ma et al. 2015), suggérant que le métabolisme du glucose dans les cônes est un élément à considérer dans leur survie. Notre étude rapporte que la diminution de sensibilité concerne spécifiquement les cônes et non les bâtonnets. L'origine de la dysfonction des cônes est inconnue, mais ne semblerait donc pas liée à une dysfonction de bâtonnets. Les PR de type cônes pourraient être altérés à cause d'une dysfonction de l'EPR. En effet, l'EPR se situe entre les PR et le réseau vasculaire fenestré choroïdien (Strauss 2005). L'EPR remplit de nombreuses fonctions pour la rétine, comme l'absorption du DHA, la phagocytose des segments externes des PR, ou encore l'apport de nutriments depuis la choroïde vers les PR. Ainsi, l'ensemble de ces fonctions sont consommatrices de beaucoup d'énergie, et entraînent un métabolisme important au niveau des cellules de l'EPR. Il a été rapporté que l'EPR dysfonctionne précocement dans des cas de diabète de type 1 et de type 2, avant que des signes cliniques apparaissent (Samuels, Bell et al. 2015). De plus, il semblerait que le secrétome de l'EPR joue également un rôle important dans le développement de la RD, notamment lors des premiers stades par la sécrétion de facteurs pro-inflammatoires et de facteurs pro- et anti-angiogéniques (Ponnalagu, Subramani et al. 2017). De même, l'autophagie dans l'EPR est un élément central pour le développement de la DMLA (Kaarniranta, Tokarz et al. 2017), et l'hyperglycémie chronique et l'inflammation altèrent ce processus, même si les mécanismes sont à peine abordés aujourd'hui (Jing and Lim 2012).

Notre étude permet de mettre en exergue les conséquences sur la rétine d'une dysfonction du métabolisme du glucose, premières altérations qui se développent à la suite d'un régime HFHF. Ces données appuient de manière intéressante des données cliniques démontrant la diminution de la vision des couleurs lors des premiers stades du diabète, avant même de développer une RD (Daley, Watzke et al. 1987; Abcouwer and Gardner 2014). Nos résultats et notre modèle permettent alors de souligner le lien entre altération du métabolisme du glucose et fonction des PR de type cônes.

Compte tenu de nos résultats et des caractéristiques anatomiques des rongeurs, des perspectives expérimentales pour la suite de ce projet sont à envisager afin de comprendre cette diminution précoce de sensibilité des PR de type cône. Etant donné que chez le rat, les PR ne sont pas regroupés dans une seule zone comme chez l'homme, il serait intéressant de pouvoir isoler ces cellules afin de réaliser des dosages protéiques et géniques sur de faibles quantités de cellules, voire sur cellule unique (Wahlin, Lim et al. 2004; Morris, Singh et al. 2011). De même, l'isolement des PR, ou des PR et de l'EPR, comme récemment réalisé (Hazim and Williams 2018), appliqué à notre modèle de SMet permettrait spécifiquement d'identifier les mécanismes cellulaires modifiés dans les cônes par un régime HFHF, ou une hyperglycémie. La fonction des PR de type cônes pourra sinon être étudiée, soit chez des rongeur diurne comme par exemple *Arvicanthis niloticus*, qui développe d'importantes altérations métaboliques à la suite de régimes pro diabétogène (Subramaniam, Landstrom et al. 2018).

Le régime HFHF favorise la néovascularisation choroïdienne.

Notre étude s'est également intéressée à l'effet de la dérégulation du métabolisme du glucose sur la progression de la néovascularisation, cause principale de cécité dans la RD et la DMLA. Dans notre étude, nous avons utilisé un modèle de néovascularisation choroïdienne induite par des impacts laser dans la membrane de Bruch, afin d'identifier l'effet du régime HFHF sur la néovascularisation choroïdienne. Nos résultats révèlent que le régime HFHF constitue un terrain favorable au développement de néovaisseaux dans la rétine, de manière concomitante à une exacerbation de l'activation des cellules de Müller, et ceci dès les stades de la résistance à l'insuline. Ces résultats importants amènent à suggérer une mise en place de la prévention de manière précoce, c'est-à-dire dès lors qu'une hyperglycémie ou une résistance à l'insuline sont présentes, afin d'éviter toute conséquence néfaste pour la rétine.

Nos résultats montrent un effet de la dérégulation du métabolisme du glucose sur la néovascularisation choroïdienne et l'activation de cellules de Müller. Il serait alors intéressant dans la suite de ce projet d'étudier le rôle plus précis des cellules de Müller dans ce modèle. En effet, les cellules de Müller sont très impliquées dans les mécanismes associés aux altérations de la rétine induites par l'hyperglycémie. Les cellules gliales sont impactées lors des premiers stades du diabète avant que des dommages vasculaires

apparaissent (Lieth, Barber et al. 1998). Or, les cellules de Müller jouent un rôle métabolique important en apportant glucose, lactate et autres nutriments aux PR. Elles maintiennent également la neurotransmission grâce à leur rôle dans le recyclage du glutamate. Lors de diabète, la régulation de la glycémie par les mécanismes liés à l'insuline est altérée. Or, l'insuline est une hormone neuroactive indispensable au développement et au maintien d'une rétine fonctionnelle (Adamo, Raizada et al. 1989), et la dérégulation de la signalisation de l'insuline dans la rétine conduit à des dysfonctions mitochondriales et une augmentation de la mitophagie (Bonora, Wieckowski et al. 2015) puis à l'apoptose des cellules de Müller (Jiang, Pagadala et al. 2013). De plus, les cellules de Müller sont impliquées dans la néovascularisation et l'hyperperméabilité vasculaires en produisant le VEGF et des cytokines pro-inflammatoires (Le 2017). Le VEGF produit par les cellules de Müller lorsque la rétine est en condition hypoxique, comme c'est le cas lors de DMLA, de RD ou encore de rétinopathie du prématuré, apparaît comme le responsable de la néovascularisation conduisant à la cécité, d'où la production de nombreuses thérapies anti-VEGF pour ces pathologies. L'hyperglycémie, dans les premières phases du diabète, conduit également à la diminution de facteurs neurotrophiques comme le facteur neurotrophique dérivé du cerveau (BDNF, *brain derived neurotrophic factor*) au niveau de la rétine, dans les cellules de Müller mais aussi dans les photorécepteurs (Di Polo, Cheng et al. 2000; Wang and Xia 2015), suggérant que la perte de ce facteur neurotrophique serait associée aux dysfonctions neuronales observées.

Pour conclure, cette première étude a montré une altération de la rétine, à la fois fonctionnelle par la diminution spécifique de la sensibilité des PR de type cône, mais aussi vasculaire par l'augmentation de la néovascularisation choroïdienne. Induire en laboratoire un SMet est peu réalisé pour la simple raison que le SMet est une pathologie multifactorielle, et mimer chez un animal l'ensemble des anomalies pouvant l'initier est complexe. Aussi, nous avons utilisé dans notre étude des modifications drastiques de l'alimentation pour induire un SMet. Même si les quantités de fructose utilisées dans notre modèle (60%) sont très supérieures aux quantités qui sont consommées chez l'homme (20%), l'utilisation d'une importante concentration de fructose pour induire le SMet, permettrait uniquement d'accélérer le processus, mais ne modifierait pas le processus de développement des altérations métaboliques (de Moura, Ribeiro et al. 2009).

D'autre part, plus de 90% des personnes diabétiques ont à la fois une dérégulation du métabolisme du glucose et une dérégulation du métabolisme des lipides. Une des forces de l'étude est d'avoir mis en avant les effets de l'altération du métabolisme du glucose, sans dérégulation du métabolisme des lipides. La dyslipidémie est associée au développement de la RD et les patients avec dyslipidémie ont un risque augmenté de développer des complications macrovasculaires et microvasculaires (Mooradian 2009; Tremblay and Hamet 2015), ce qui est confirmé dans des modèles animaux (Kowluru, Mishra et al. 2016). Or, il n'existe pas d'études qui décrivent le mécanisme par lequel la dyslipidémie agit sur le développement de la RD chez les patients diabétiques de type 2. Ces données ouvrent alors des perspectives intéressantes pour étudier, de façon analogue, si l'effet d'une dérégulation du métabolisme des lipides peut être à l'origine d'altérations au niveau de la rétine, ou si la dyslipidémie doit être accompagnée d'altérations du métabolisme du glucose pour avoir des effets. Une étude récente réalisée par Joyal et ses collaborateurs (Joyal, Sun et al. 2016) peut appuyer cette perspective. Cette étude suggère que le transporteur au lipide, Ffar1, participe de manière majeure à la très importante consommation d'énergie des photorécepteurs.

Les altérations du métabolisme induites par le régime HFHF sont dépendantes de la souche de rat.

Compte tenu de la résistance des rats BN à développer de manière précoce des altérations d'un mécanisme clé du SMet comme la dyslipidémie, et compte tenu de l'absence de données à ce sujet dans la littérature scientifique, nous avons réalisé une étude comparative entre rats Brown Norway (BN) et Wistar (W) soumis à 8 jours et 4 semaines de régime HFHF. Le but de cette étude était de vérifier si cette résistance était due à l'inefficacité de notre régime HFHF ou bien à la résistance de la souche de rat utilisée. Cette étude a révélé que les rats W développaient des altérations du métabolisme des lipides et du glucose, alors que les rats BN présentent une résistance à développer des dérégulations du métabolisme des lipides. Ces différences seraient dues au fond génétique, impliquant un polymorphisme à la leptine et des différences dans le microbiote intestinal particulier chez les rats BN (Pontoizeau, Fearnside et al. 2011). Elles témoignent également de l'importance de caractériser le modèle, avant de pouvoir conclure sur des conséquences qui surviennent dans la rétine ou dans d'autres organes.

Pour nos besoins, l'utilisation de rats dont les yeux sont pigmentés est nécessaire pour étudier les conséquences d'un régime pro-diabétogène sur la vascularisation choroïdienne. Or, la souche de rat Brown Norway est la souche de référence pour l'induction de la néovascularisation (Tobe, Takahashi et al. 1995; Ogata, Matsushima et al. 1996; Jiao, Mo et al. 2013; Thierry, Pasquis et al. 2014; Thierry, Pasquis et al. 2015). Alors que le SMet est un facteur de risque pour la DMLA, cette étude nous indique que les altérations du métabolisme glucidique est suffisant pour induire des altérations fonctionnelles et vasculaires dans la rétine. Cette étude nous a également permis de choisir une souche de rats albinos, le rat Wistar, pour la troisième étude réalisée sur la biodisponibilité des AGPI-LC oméga 3.

La supplémentation en AGPI-LC permet l'augmentation de la teneur en DHA/DHA contenu sur les PC, de la couche des photorécepteurs.

Les AGPI-LC oméga 3 peuvent intervenir à deux niveaux : au niveau du métabolisme général, pour diminuer les symptômes du SMet, et au niveau de la rétine, via la production de médiateurs lipidiques anti-inflammatoires. En effet, il a été montré dans d'autres études que l'apport dans l'alimentation d'huile de poisson pouvait réduire la stéatose hépatique induite par la consommation de fructose (Oishi, Konishi et al. 2018). De même, la sensibilité à l'insuline est positivement corrélée au contenu plasmatique en DPA et DHA chez les rats nourris avec un régime HFHF (Huang, Cheng et al. 2017). L'alimentation HFHF favorise le développement de la néovascularisation dans la rétine, une composante retrouvée dans la DMLA. Or, la supplémentation de l'alimentation en EPA et DHA est conseillée dans les premiers stades de DMLA. Au-delà des effets positifs et protecteurs sur la rétine, la biodisponibilité du DHA pour la rétine dépend de nombreux facteurs.

C'est pourquoi, dans notre troisième étude, nous souhaitons alors observer l'intégration du DHA dans la rétine apporté par 4 formules différentes de lipides intégrées dans l'alimentation de rats Wistar. L'originalité de ce travail résidait dans un apport principalement en EPA ou en DHA, apportés soit sous forme de phospholipides, soit sous forme de triglycérides, soit d'un mélange des deux. L'équilibre de l'apport en oméga-6/oméga-3 et des autres acides gras a été contrôlé, compte tenu qu'ils peuvent influencer l'intégration des oméga-3 dans les tissus, en agissant par compétition sur les enzymes de

conversion des courtes chaînes en plus longues chaînes. Nos données qualitatives mettent principalement en évidence un enrichissement de la rétine en DHA, et notamment de la couche des photorécepteurs. La zone des PR autour du nerf optique est particulièrement enrichie en DHA, ceci quelle que soit la formule lipidique considérée lorsqu'elle contenait des oméga-3. Cette zone a déjà été identifiée comme une zone plus sensible au stress oxydant induit (Cortina, Gordon et al. 2005). La longueur des PR pourrait être plus longue dans cette zone, et donc contenir plus d'AGPI sensible à l'oxydation.). Dans notre cas, le DHA provenant de la supplémentation pourrait alors s'intégrer de manière préférentielle dans cette zone. Nos données quantitatives révèlent une meilleure intégration du DHA (particulièrement le double DHA estérifié sur le phosphatidylcholine : PC44 :12) dans la rétine lorsque l'EPA est apporté sous forme de PL et que le DHA est apporté sous la forme de TG, et dans une moindre mesure sous la forme de PL.

De plus, les images générées à partir du MALDI nous ont permis de mettre en évidence des détails dans l'organisation spatiale des PC-DHA/DHA (PC22:6+22:6) par rapport au AGPI-VLC estérifié sur les PC. Il semblerait que les AGPI-VLC et le PC22 :6+22 :6 ne soient pas complètement co-localisés, les VLC-PUFA se situant plus en externe. Les raisons de cette organisation spatiale sont obscures, alors que les VLC-PUFA seraient impliqués dans la morphologie des disques en permettant de former l'extrémité des disques. Le protocole utilisé est connu pour être à ce jour le protocole le plus optimal (Ly, Schone et al. 2015) nous a permis d'obtenir une résolution spatiale de 30 μm , qui nous permet d'obtenir d'importants détails.

Un autre point intéressant à relever dans notre étude est l'effet de l'EPA. En effet, l'EPA est présent sous forme de traces dans la rétine de rongeur, mais s'y accumule lors de supplémentation en EPA. Son rôle est important en tant que précurseur du DHA, et permet également la synthèse de produits anti-inflammatoires. De plus, il semblerait qu'au niveau de la rétine, lorsqu'on supplémente en régime contenant uniquement du DHA, comme le régime « EGG », que nous n'avons pas présenté dans l'article, non seulement le DHA augmente dans la rétine, mais également l'EPA, suggérant une rétroconversion du DHA en EPA. Ainsi, l'EPA pourrait jouer un rôle de réservoir, lorsque le DHA est apporté en trop grande quantité, comme une forme de stockage du DHA. Cette donnée a par ailleurs déjà été suggérée au laboratoire, sur différents modèles animaux. En effet, la supplémentation en DHA, via son apport par l'intermédiaire de

micro-algues, permet l'augmentation modérée de DHA dans la rétine de caille, mais permet surtout l'augmentation de l'EPA dans la rétine (Schnebelen-Berthier, Acar et al. 2015), de même chez le rat (Simon, Bardet et al. 2011) ou le mini-porc (Bretillon, données non publiées). De plus, une prise alimentaire faible en oméga-6 et importante en oméga-3 favorise majoritairement l'incorporation de l'EPA, et de manière plus modérée l'incorporation du DHA (Simon, Bardet et al. 2011). Or, l'EPA réduit l'activation gliale dans certains modèles de rétinopathie (Schnebelen, Fourgeux et al. 2011) et peut être converti en DHA au niveau de la rétine directement pour combattre le stress oxydant induit au niveau des PR (Simon, Agnolazza et al. 2016). Aussi, une perspective intéressante à notre troisième étude serait d'identifier le rôle de l'EPA au niveau de la rétine. D'autre part, afin d'identifier les personnes à risque de DMLA, il serait intéressant de trouver un biomarqueur sanguin de la teneur en DHA dans la rétine, et ainsi, chez l'homme supplémenté, confirmer nos résultats.

Enfin, de manière générale et à l'instar d'autres, nos travaux se sont exemptés de données de genre, en choisissant des rongeurs de sexe masculin. Or, plusieurs composantes de l'homéostasie du glucose et de la balance énergétique sont régulées de manière différente entre les sexes (Mauvais-Jarvis 2017). Ainsi, les femmes ont une glycémie à jeun plus faible que les hommes, et une élévation de la glycémie plus élevée lors du test de tolérance au glucose, suggérant une régulation de la glycémie affectée par le genre (Sicree, Zimmet et al. 2008). Les hormones gonadiques pourraient être responsables de cette différence entre genre pour le métabolisme du glucose, puisque la thérapie aux œstrogènes lors de la ménopause est responsable du développement de l'intolérance au glucose et d'une diminution de la glycémie à jeun (van Genugten, Utzschneider et al. 2006; Mauvais-Jarvis, Manson et al. 2017). Ces différences de métabolisme conduisent à une prévalence mondiale de l'obésité plus élevée chez les femmes que chez les hommes (Kelly, Yang et al. 2008), avec par exemple 50,8% des américaines contre 41,1% des américains (Mozumdar and Liguori 2011), 17,8% des chinoises versus 9,8% des chinois (Gu, Reynolds et al. 2005) ou encore 44% des indiennes contre 25,6% d'indiens (Gupta, Deedwania et al. 2004) sont affectés par l'obésité. En utilisant les données fournis par le NHANES, une étude rapporte que la prévalence du SMet en 2012 était significativement plus importante chez les femmes (35,6%) que chez les hommes (30,3%) (Aguilar, Bhuket et al. 2015).

Ces différences spécifiques liées au genre représentent une source importante de facteur qui peuvent être étudiés plus en détail pour la compréhension du développement des pathologies métaboliques, mais également dans le développement plus personnalisé de stratégies thérapeutiques à visée diabète et syndrome métabolique.

Pour conclure, nos travaux suggèrent des altérations précoces de la rétine, concomitantes à des désordres majoritairement glucidiques induits par de faibles durées d'une alimentation riche en fructose et lipides. Ces altérations neuronales, impactant la sensibilité des cônes, et favorisant la néovascularisation choroïdienne, font de ce modèle un modèle original. Par ailleurs, nos travaux attirent également l'attention sur le choix du modèle utilisé, pouvant présenter des spécificités à prendre en compte afin de tirer des conclusions. Enfin, nos résultats permettent de certifier pour la première fois qu'un apport en AGPI-LC de type oméga-3 par l'alimentation permet l'intégration de DHA au niveau de la couche des PR qui est la couche qui est composée largement de DHA. L'apport en EPA sous forme de PL et de DHA sous forme de triglycérides permettrait d'améliorer l'incorporation des oméga-3 dans la rétine, facteur à prendre en compte dans la prévention des pathologies oculaires par les oméga-3. L'ensemble de ces résultats soulignent l'importance de la correction d'une alimentation pro-diabétogène, afin de diminuer l'impact néfaste qu'un SMet peut avoir sur la rétine.

Références bibliographiques

- Abcouwer, S. F. and T. W. Gardner (2014). "Diabetic retinopathy: loss of neuroretinal adaptation to the diabetic metabolic environment." Ann N Y Acad Sci **1311**: 174-190.
- Abdelmalek, M. F., A. Suzuki, et al. (2010). "Increased fructose consumption is associated with fibrosis severity in patients with nonalcoholic fatty liver disease." Hepatology **51**(6): 1961-1971.
- Abdul-Ghani, M., G. Nawaf, et al. (2006). "Increased prevalence of microvascular complications in type 2 diabetes patients with the metabolic syndrome." Isr Med Assoc J **8**(6): 378-382.
- Abete, I., E. Goyenechea, et al. (2011). "Obesity and metabolic syndrome: potential benefit from specific nutritional components." Nutr Metab Cardiovasc Dis **21 Suppl 2**: B1-15.
- Abu-El-Asrar, A. M., L. Dralands, et al. (2004). "Expression of apoptosis markers in the retinas of human subjects with diabetes." Invest Ophthalmol Vis Sci **45**(8): 2760-2766.
- 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.
- Ackerman, Z., M. Oron-Herman, et al. (2005). "Fructose-induced fatty liver disease: hepatic effects of blood pressure and plasma triglyceride reduction." Hypertension **45**(5): 1012-1018.
- Ackman, R. G. (1981). "Flame ionization detection applied to thin-layer chromatography on coated quartz rods." Methods Enzymol **72**: 205-252.
- Adamo, M., M. K. Raizada, et al. (1989). "Insulin and insulin-like growth factor receptors in the nervous system." Mol Neurobiol **3**(1-2): 71-100.
- Agbaga, M. P., R. S. Brush, et al. (2008). "Role of Stargardt-3 macular dystrophy protein (ELOVL4) in the biosynthesis of very long chain fatty acids." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(35): 12843-12848.
- Agbaga, M. P., S. Logan, et al. (2014). "Biosynthesis of very long-chain polyunsaturated fatty acids in hepatocytes expressing ELOVL4." Adv Exp Med Biol **801**: 631-636.
- Agbaga, M. P., M. N. Mandal, et al. (2010). "Retinal very long-chain PUFAs: new insights from studies on ELOVL4 protein." J Lipid Res **51**(7): 1624-1642.
- Age-Related Eye Disease Study 2 Research, G. (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.
- Age-Related Eye Disease Study Research, G. (2001). "A randomized, placebo-controlled, clinical trial of high-dose supplementation with vitamins C and E and beta carotene for age-related cataract and vision loss: AREDS report no. 9." Arch Ophthalmol **119**(10): 1439-1452.
- Age-Related Eye Disease Study Research, G. (2001). "A randomized, placebo-controlled, clinical trial of high-dose supplementation with vitamins C and E, beta carotene, and zinc for age-related macular degeneration and vision loss: AREDS report no. 8." Arch Ophthalmol **119**(10): 1417-1436.
- Aguilar, M., T. Bhuket, et al. (2015). "Prevalence of the metabolic syndrome in the United States, 2003-2012." JAMA **313**(19): 1973-1974.
- Aguilera, A. A., G. H. Diaz, et al. (2004). "Effects of fish oil on hypertension, plasma lipids, and tumor necrosis factor-alpha in rats with sucrose-induced metabolic syndrome." J Nutr Biochem **15**(6): 350-357.
- Aiello, L. P., S. E. Bursell, et al. (1997). "Vascular endothelial growth factor-induced retinal permeability is mediated by protein kinase C in vivo and suppressed by an orally effective beta-isoform-selective inhibitor." Diabetes **46**(9): 1473-1480.

- Aiello, L. P., A. Clermont, et al. (2006). "Inhibition of PKC beta by oral administration of ruboxistaurin is well tolerated and ameliorates diabetes-induced retinal hemodynamic abnormalities in patients." Invest Ophthalmol Vis Sci **47**(1): 86-92.
- Ait-Ali, N., R. Fridlich, et al. (2015). "Rod-derived cone viability factor promotes cone survival by stimulating aerobic glycolysis." Cell **161**(4): 817-832.
- Akram, M. and A. Hamid (2013). "Mini review on fructose metabolism." Obes Res Clin Pract **7**(2): e89-e94.
- Albert, A. D. and K. Boesze-Battaglia (2005). "The role of cholesterol in rod outer segment membranes." Prog Lipid Res **44**(2-3): 99-124.
- Albert, D. M., E. A. Scheef, et al. (2007). "Calcitriol is a potent inhibitor of retinal neovascularization." Invest Ophthalmol Vis Sci **48**(5): 2327-2334.
- Alberti, K. G., R. H. Eckel, et al. (2009). "Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity." Circulation **120**(16): 1640-1645.
- Alberti, K. G., P. Zimmet, et al. (2005). "The metabolic syndrome--a new worldwide definition." Lancet **366**(9491): 1059-1062.
- Alberti, K. G. and P. Z. Zimmet (1998). "Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation." Diabet Med **15**(7): 539-553.
- Allen, R. J. and J. S. Leahy (1966). "Some effects of dietary dextrose, fructose, liquid glucose and sucrose in the adult male rat." Br J Nutr **20**(2): 339-347.
- Altimimi, H. F., R. T. Szerencsei, et al. (2013). "Functional and structural properties of the NCKX2 Na(+)-Ca (2+)/K (+) exchanger: a comparison with the NCX1 Na (+)/Ca (2+) exchanger." Adv Exp Med Biol **961**: 81-94.
- Ambati, J., A. Anand, et al. (2003). "An animal model of age-related macular degeneration in senescent Ccl-2- or Ccr-2-deficient mice." Nat Med **9**(11): 1390-1397.
- Anderson, D. H., R. F. Mullins, et al. (2002). "A role for local inflammation in the formation of drusen in the aging eye." Am J Ophthalmol **134**(3): 411-431.
- Anderson, D. R., W. F. Hoyt, et al. (1967). "The fine structure of the astroglia in the human optic nerve and optic nerve head." Trans Am Ophthalmol Soc **65**: 275-305.
- Anderson, R. E. (1970). "Lipids of ocular tissues. IV. A comparison of the phospholipids from the retina of six mammalian species." Exp Eye Res **10**(2): 339-344.
- Anderson, R. E., F. L. Kretzer, et al. (1994). "Free radicals and ocular disease." Adv Exp Med Biol **366**: 73-86.
- Antonetti, D. A., R. Klein, et al. (2012). "Diabetic retinopathy." N Engl J Med **366**(13): 1227-1239.
- Arita, M. (2012). "Mediator lipidomics in acute inflammation and resolution." J Biochem **152**(4): 313-319.
- Armstrong, R. A. and M. Mousavi (2015). "Overview of Risk Factors for Age-Related Macular Degeneration (AMD)." J Stem Cells **10**(3): 171-191.
- Arshavsky, V. (2002). "Like night and day: rods and cones have different pigment regeneration pathways." Neuron **36**(1): 1-3.
- Attane, C., C. Foussal, et al. (2012). "Apelin treatment increases complete Fatty Acid oxidation, mitochondrial oxidative capacity, and biogenesis in muscle of insulin-resistant mice." Diabetes **61**(2): 310-320.
- Aveland, M. I. (1988). "Phospholipid species containing long and very long polyenoic fatty acids remain with rhodopsin after hexane extraction of photoreceptor membranes." Biochemistry **27**(4): 1229-1239.

- Aveldano, M. I. and H. Sprecher (1987). "Very long chain (C24 to C36) polyenoic fatty acids of the n-3 and n-6 series in dipolyunsaturated phosphatidylcholines from bovine retina." *J Biol Chem* **262**(3): 1180-1186.
- Azais-Braesco, V., D. Sluik, et al. (2017). "A review of total & added sugar intakes and dietary sources in Europe." *Nutr J* **16**(1): 6.
- Backhed, F., H. Ding, et al. (2004). "The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(44): 15718-15723.
- Baena, M., G. Sanguesa, et al. (2016). "Fructose, but not glucose, impairs insulin signaling in the three major insulin-sensitive tissues." *Sci Rep* **6**: 26149.
- Bagga, D., L. Wang, et al. (2003). "Differential effects of prostaglandin derived from omega-6 and omega-3 polyunsaturated fatty acids on COX-2 expression and IL-6 secretion." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(4): 1751-1756.
- Balkau, B. and M. A. Charles (1999). "Comment on the provisional report from the WHO consultation. European Group for the Study of Insulin Resistance (EGIR)." *Diabet Med* **16**(5): 442-443.
- Balthasar, N., L. T. Dalgaard, et al. (2005). "Divergence of melanocortin pathways in the control of food intake and energy expenditure." *Cell* **123**(3): 493-505.
- Bandello, F., R. Lattanzio, et al. (2013). "Pathophysiology and treatment of diabetic retinopathy." *Acta Diabetol* **50**(1): 1-20.
- Bang, H. O., J. Dyerberg, et al. (1976). "The composition of food consumed by Greenland Eskimos." *Acta Med Scand* **200**(1-2): 69-73.
- Bannenberg, G. and C. N. Serhan (2010). "Specialized pro-resolving lipid mediators in the inflammatory response: An update." *Biochim Biophys Acta* **1801**(12): 1260-1273.
- Bar-On, H. and Y. Stein (1968). "Effect of glucose and fructose administration on lipid metabolism in the rat." *J Nutr* **94**(1): 95-105.
- Barber, A. J. (2015). "Diabetic retinopathy: recent advances towards understanding neurodegeneration and vision loss." *Sci China Life Sci* **58**(6): 541-549.
- Barbosa, C. R., E. M. Albuquerque, et al. (2007). "Opposite lipemic response of Wistar rats and C57BL/6 mice to dietary glucose or fructose supplementation." *Braz J Med Biol Res* **40**(3): 323-331.
- Bartlett, E. M. and D. H. Lewis (1970). "Spectrophotometric determination of phosphate esters in the presence and absence of orthophosphate." *Anal Biochem* **36**(1): 159-167.
- Basciano, H., L. Federico, et al. (2005). "Fructose, insulin resistance, and metabolic dyslipidemia." *Nutr Metab (Lond)* **2**(1): 5.
- Baylor, D. A., T. D. Lamb, et al. (1979). "The membrane current of single rod outer segments." *J Physiol* **288**: 589-611.
- Bazan, N. G. (2005). "Neuroprotectin D1 (NPD1): a DHA-derived mediator that protects brain and retina against cell injury-induced oxidative stress." *Brain Pathol* **15**(2): 159-166.
- Bazan, N. G., J. M. Calandria, et al. (2010). "Rescue and repair during photoreceptor cell renewal mediated by docosahexaenoic acid-derived neuroprotectin D1." *J Lipid Res* **51**(8): 2018-2031.
- Bazan, N. G., A. E. Musto, et al. (2011). "Endogenous signaling by omega-3 docosahexaenoic acid-derived mediators sustains homeostatic synaptic and circuitry integrity." *Mol Neurobiol* **44**(2): 216-222.
- Beatty, S., H. Koh, et al. (2000). "The role of oxidative stress in the pathogenesis of age-related macular degeneration." *Surv Ophthalmol* **45**(2): 115-134.
- Behar-Cohen, F., L. Kowalczyk, et al. (2009). *Anatomie de la rétine*. Paris.
- Bellisle, F. (2005). "Faim et satiété, contrôle de la prise alimentaire." *EMC-Endocrinologie*: 179-197.

- Bennett, L. D., B. R. Hopiavuori, et al. (2014). "Examination of VLC-PUFA-deficient photoreceptor terminals." Invest Ophthalmol Vis Sci **55**(7): 4063-4072.
- Bernard, C. (1856). Introduction à l'étude de la médecine expérimentale. Paris.
- Besharse, J. C., J. G. Hollyfield, et al. (1977). "Photoreceptor outer segments: accelerated membrane renewal in rods after exposure to light." Science **196**(4289): 536-538.
- Biedermann, B., A. Bringmann, et al. (2002). "High-affinity GABA uptake in retinal glial (Muller) cells of the guinea pig: electrophysiological characterization, immunohistochemical localization, and modeling of efficiency." Glia **39**(3): 217-228.
- Bignami, A., L. F. Eng, et al. (1972). "Localization of the glial fibrillary acidic protein in astrocytes by immunofluorescence." Brain Res **43**(2): 429-435.
- Blanchard, H., F. Pedrono, et al. (2013). "Comparative effects of well-balanced diets enriched in alpha-linolenic or linoleic acids on LC-PUFA metabolism in rat tissues." Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids **88**(5): 383-389.
- 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.
- Bocarsly, M. E., E. S. Powell, et al. (2010). "High-fructose corn syrup causes characteristics of obesity in rats: increased body weight, body fat and triglyceride levels." Pharmacol Biochem Behav **97**(1): 101-106.
- Boesze-Battaglia, K. and A. F. Goldberg (2002). "Photoreceptor renewal: a role for peripherin/rds." Int Rev Cytol **217**: 183-225.
- Boije, H., S. Shirazi Fard, et al. (2016). "Horizontal Cells, the Odd Ones Out in the Retina, Give Insights into Development and Disease." Front Neuroanat **10**: 77.
- Bonora, M., M. R. Wieckowski, et al. (2015). "Molecular mechanisms of cell death: central implication of ATP synthase in mitochondrial permeability transition." Oncogene **34**(12): 1608.
- Boucher, B. J., N. Mannan, et al. (1995). "Glucose intolerance and impairment of insulin secretion in relation to vitamin D deficiency in east London Asians." Diabetologia **38**(10): 1239-1245.
- Bourne, R. R., G. A. Stevens, et al. (2013). "Causes of vision loss worldwide, 1990-2010: a systematic analysis." Lancet Glob Health **1**(6): e339-349.
- Bourre, J. M., M. Francois, et al. (1989). "The effects of dietary alpha-linolenic acid on the composition of nerve membranes, enzymatic activity, amplitude of electrophysiological parameters, resistance to poisons and performance of learning tasks in rats." J Nutr **119**(12): 1880-1892.
- Bray, G. A., S. J. Nielsen, et al. (2004). "Consumption of high-fructose corn syrup in beverages may play a role in the epidemic of obesity." Am J Clin Nutr **79**(4): 537-543.
- Breslow, D. K. and M. V. Nachury (2011). "Primary cilia: how to keep the riff-raff in the plasma membrane." Curr Biol **21**(11): R434-436.
- 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.
- Brew, H. and D. Attwell (1987). "Electrogenic glutamate uptake is a major current carrier in the membrane of axolotl retinal glial cells." Nature **327**(6124): 707-709.
- Bringmann, A., T. Pannicke, et al. (2006). "Muller cells in the healthy and diseased retina." Prog Retin Eye Res **25**(4): 397-424.
- Brown, M. F. (1994). "Modulation of rhodopsin function by properties of the membrane bilayer." Chem Phys Lipids **73**(1-2): 159-180.
- Brown, R. L. and A. E. Barrett (2011). "Visual impairment and quality of life among older adults: an examination of explanations for the relationship." J Gerontol B Psychol Sci Soc Sci **66**(3): 364-373.

- Brownlee, M. (2001). "Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications." Nature **414**(6865): 813-820.
- Buckley, C. D., D. W. Gilroy, et al. (2013). "The resolution of inflammation." Nat Rev Immunol **13**(1): 59-66.
- Buettner, R., J. Scholmerich, et al. (2007). "High-fat diets: modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents." Obesity (Silver Spring) **15**(4): 798-808.
- Buhler, A. D., F. Bucher, et al. (2016). "Systemic confounders affecting serum measurements of omega-3 and -6 polyunsaturated fatty acids in patients with retinal disease." BMC Ophthalmol **16**(1): 159.
- Burdge, G. (2004). "Alpha-linolenic acid metabolism in men and women: nutritional and biological implications." Curr Opin Clin Nutr Metab Care **7**(2): 137-144.
- Burdge, G. C. and P. C. Calder (2005). "Conversion of alpha-linolenic acid to longer-chain polyunsaturated fatty acids in human adults." Reprod Nutr Dev **45**(5): 581-597.
- Burdge, G. C. and S. A. Wootton (2002). "Conversion of alpha-linolenic acid to eicosapentaenoic, docosapentaenoic and docosahexaenoic acids in young women." Br J Nutr **88**(4): 411-420.
- Bush, R. A., A. Malnoe, et al. (1994). "Dietary deficiency of N-3 fatty acids alters rhodopsin content and function in the rat retina." Invest Ophthalmol Vis Sci **35**(1): 91-100.
- Calandria, J. M., V. L. Marcheselli, et al. (2009). "Selective survival rescue in 15-lipoxygenase-1-deficient retinal pigment epithelial cells by the novel docosahexaenoic acid-derived mediator, neuroprotectin D1." J Biol Chem **284**(26): 17877-17882.
- Calder, P. C. (2001). "Polyunsaturated fatty acids, inflammation, and immunity." Lipids **36**(9): 1007-1024.
- Calder, P. C. (2002). "Dietary modification of inflammation with lipids." Proc Nutr Soc **61**(3): 345-358.
- Cameron, A. J., J. E. Shaw, et al. (2004). "The metabolic syndrome: prevalence in worldwide populations." Endocrinol Metab Clin North Am **33**(2): 351-375, table of contents.
- Campochiaro, P. A. (2015). "Molecular pathogenesis of retinal and choroidal vascular diseases." Prog Retin Eye Res **49**: 67-81.
- Campochiaro, P. A. and S. F. Hackett (2003). "Ocular neovascularization: a valuable model system." Oncogene **22**(42): 6537-6548.
- Cao, J., K. A. Schwichtenberg, et al. (2006). "Incorporation and clearance of omega-3 fatty acids in erythrocyte membranes and plasma phospholipids." Clin Chem **52**(12): 2265-2272.
- 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.
- Carson, M. J., J. M. Doose, et al. (2006). "CNS immune privilege: hiding in plain sight." Immunol Rev **213**: 48-65.
- Chakravarthy, U., T. Y. Wong, et al. (2010). "Clinical risk factors for age-related macular degeneration: a systematic review and meta-analysis." BMC Ophthalmol **10**: 31.
- Chen, C. T. and R. P. Bazinet (2015). "beta-oxidation and rapid metabolism, but not uptake regulate brain eicosapentaenoic acid levels." Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids **92**: 33-40.
- Chen, L., P. Yang, et al. (2002). "Distribution, markers, and functions of retinal microglia." Ocul Immunol Inflamm **10**(1): 27-39.
- Chen, P., T. D. Lee, et al. (2001). "Interaction of 11-cis-retinol dehydrogenase with the chromophore of retinal g protein-coupled receptor opsin." J Biol Chem **276**(24): 21098-21104.

- Chen, X., S. S. Rong, et al. (2014). "Diabetes mellitus and risk of age-related macular degeneration: a systematic review and meta-analysis." *PLoS One* **9**(9): e108196.
- Cheung, N. and T. Y. Wong (2007). "Obesity and eye diseases." *Surv Ophthalmol* **52**(2): 180-195.
- Chew, E. Y., M. D. Davis, et al. (2014). "The effects of medical management on the progression of diabetic retinopathy in persons with type 2 diabetes: the Action to Control Cardiovascular Risk in Diabetes (ACCORD) Eye Study." *Ophthalmology* **121**(12): 2443-2451.
- Chiurchiu, V., A. Leuti, et al. (2016). "Proresolving lipid mediators resolvin D1, resolvin D2, and maresin 1 are critical in modulating T cell responses." *Sci Transl Med* **8**(353): 353ra111.
- 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., T. Y. Wong, et al. (2007). "Dietary antioxidants and primary prevention of age related macular degeneration: systematic review and meta-analysis." *BMJ* **335**(7623): 755.
- Chopra, R., A. Chander, et al. (2012). "Ocular associations of metabolic syndrome." *Indian J Endocrinol Metab* **16 Suppl 1**: S6-S11.
- Christen, W. G., R. J. Glynn, et al. (2012). "Vitamins E and C and medical record-confirmed age-related macular degeneration in a randomized trial of male physicians." *Ophthalmology* **119**(8): 1642-1649.
- Chua, J., A. R. Chia, et al. (2018). "The relationship of dietary fish intake to diabetic retinopathy and retinal vascular caliber in patients with type 2 diabetes." *Sci Rep* **8**(1): 730.
- Cigliano, L., M. S. Spagnuolo, et al. (2018). "Short-Term Fructose Feeding Induces Inflammation and Oxidative Stress in the Hippocampus of Young and Adult Rats." *Mol Neurobiol* **55**(4): 2869-2883.
- Coleman, J. A., M. C. Kwok, et al. (2009). "Localization, purification, and functional reconstitution of the P4-ATPase Atp8a2, a phosphatidylserine flippase in photoreceptor disc membranes." *J Biol Chem* **284**(47): 32670-32679.
- Collaborators, G. B. D. O., A. Afshin, et al. (2017). "Health Effects of Overweight and Obesity in 195 Countries over 25 Years." *N Engl J Med* **377**(1): 13-27.
- Combadiere, C., K. Salzwedel, et al. (1998). "Identification of CX3CR1. A chemotactic receptor for the human CX3C chemokine fractalkine and a fusion coreceptor for HIV-1." *J Biol Chem* **273**(37): 23799-23804.
- Comuzzie, A. G., T. Funahashi, et al. (2001). "The genetic basis of plasma variation in adiponectin, a global endophenotype for obesity and the metabolic syndrome." *J Clin Endocrinol Metab* **86**(9): 4321-4325.
- Cordain, L., S. B. Eaton, et al. (2005). "Origins and evolution of the Western diet: health implications for the 21st century." *Am J Clin Nutr* **81**(2): 341-354.
- Cortina, M. S., W. C. Gordon, et al. (2005). "Oxidative stress-induced retinal damage up-regulates DNA polymerase gamma and 8-oxoguanine-DNA-glycosylase in photoreceptor synaptic mitochondria." *Exp Eye Res* **81**(6): 742-750.
- Costa, L. A., L. H. Canani, et al. (2004). "Aggregation of features of the metabolic syndrome is associated with increased prevalence of chronic complications in Type 2 diabetes." *Diabet Med* **21**(3): 252-255.

- Couet, C., J. Delarue, et al. (1997). "Effect of dietary fish oil on body fat mass and basal fat oxidation in healthy adults." Int J Obes Relat Metab Disord **21**(8): 637-643.
- Coughlin, B. A., D. J. Feenstra, et al. (2017). "Muller cells and diabetic retinopathy." Vision Res **139**: 93-100.
- Crapo, P. A., O. G. Kolterman, et al. (1986). "Metabolic consequence of two-week fructose feeding in diabetic subjects." Diabetes Care **9**(2): 111-119.
- Cronin, T., W. Raffelsberger, et al. (2010). "The disruption of the rod-derived cone viability gene leads to photoreceptor dysfunction and susceptibility to oxidative stress." Cell Death Differ **17**(7): 1199-1210.
- Cruess, A. F., G. Zlateva, et al. (2008). "Economic burden of bilateral neovascular age-related macular degeneration: multi-country observational study." Pharmacoeconomics **26**(1): 57-73.
- Cui, Y., X. Xu, et al. (2006). "Expression modification of uncoupling proteins and MnSOD in retinal endothelial cells and pericytes induced by high glucose: the role of reactive oxygen species in diabetic retinopathy." Exp Eye Res **83**(4): 807-816.
- Cundiff, D. K. and C. R. Nigg (2005). "Diet and diabetic retinopathy: insights from the Diabetes Control and Complications Trial (DCCT)." MedGenMed **7**(1): 3.
- Cunha-Vaz, J. G. (2004). "The blood-retinal barriers system. Basic concepts and clinical evaluation." Exp Eye Res **78**(3): 715-721.
- Curcio, C. A., N. E. Medeiros, et al. (1996). "Photoreceptor loss in age-related macular degeneration." Invest Ophthalmol Vis Sci **37**(7): 1236-1249.
- Curcio, C. A., C. L. Millican, et al. (1993). "Aging of the human photoreceptor mosaic: evidence for selective vulnerability of rods in central retina." Invest Ophthalmol Vis Sci **34**(12): 3278-3296.
- Curcio, C. A., J. B. Presley, et al. (2005). "Esterified and unesterified cholesterol in drusen and basal deposits of eyes with age-related maculopathy." Exp Eye Res **81**(6): 731-741.
- Curry, D. L. (1989). "Effects of mannose and fructose on the synthesis and secretion of insulin." Pancreas **4**(1): 2-9.
- Daemen, F. J. (1973). "Vertebrate rod outer segment membranes." Biochim Biophys Acta **300**(3): 255-288.
- Daley, M. L., R. C. Watzke, et al. (1987). "Early loss of blue-sensitive color vision in patients with type I diabetes." Diabetes Care **10**(6): 777-781.
- Das, A., P. G. McGuire, et al. (2015). "Diabetic Macular Edema: Pathophysiology and Novel Therapeutic Targets." Ophthalmology **122**(7): 1375-1394.
- Das, M., S. Pal, et al. (2012). "Family history of type 2 diabetes and prevalence of metabolic syndrome in adult Asian Indians." J Cardiovasc Dis Res **3**(2): 104-108.
- Das, S. R., N. Bhardwaj, et al. (1992). "Muller cells of chicken retina synthesize 11-cis-retinol." Biochem J **285** (Pt 3): 907-913.
- Das, U. N. (2001). "Is obesity an inflammatory condition?" Nutrition **17**(11-12): 953-966.
- Das, U. N. (2013). "Lipoxins, resolvins, and protectins in the prevention and treatment of diabetic macular edema and retinopathy." Nutrition **29**(1): 1-7.
- Das, U. N. (2016). "Diabetic macular edema, retinopathy and age-related macular degeneration as inflammatory conditions." Arch Med Sci **12**(5): 1142-1157.
- Dasari, B., J. R. Prasanthi, et al. (2011). "Cholesterol-enriched diet causes age-related macular degeneration-like pathology in rabbit retina." BMC Ophthalmol **11**: 22.
- Davidson, M. H., J. Johnson, et al. (2012). "A novel omega-3 free fatty acid formulation has dramatically improved bioavailability during a low-fat diet compared with omega-3-acid ethyl esters: the ECLIPSE (Epanova((R)) compared to Lovaza((R)) in a pharmacokinetic single-dose evaluation) study." J Clin Lipidol **6**(6): 573-584.

- Davies, S., M. H. Elliott, et al. (2001). "Photocytotoxicity of lipofuscin in human retinal pigment epithelial cells." Free Radic Biol Med **31**(2): 256-265.
- de Castro, U. G., R. A. dos Santos, et al. (2013). "Age-dependent effect of high-fructose and high-fat diets on lipid metabolism and lipid accumulation in liver and kidney of rats." Lipids Health Dis **12**: 136.
- de Moura, R. F., C. Ribeiro, et al. (2009). "Metabolic syndrome signs in Wistar rats submitted to different high-fructose ingestion protocols." Br J Nutr **101**(8): 1178-1184.
- de Roos, B., Y. Mavrommatis, et al. (2009). "Long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids: new insights into mechanisms relating to inflammation and coronary heart disease." Br J Pharmacol **158**(2): 413-428.
- de Urquiza, A. M., S. Liu, et al. (2000). "Docosahexaenoic acid, a ligand for the retinoid X receptor in mouse brain." Science **290**(5499): 2140-2144.
- DeFina, L. F., L. G. Marcoux, et al. (2011). "Effects of omega-3 supplementation in combination with diet and exercise on weight loss and body composition." Am J Clin Nutr **93**(2): 455-462.
- Delavari, A., M. H. Forouzanfar, et al. (2009). "First nationwide study of the prevalence of the metabolic syndrome and optimal cutoff points of waist circumference in the Middle East: the national survey of risk factors for noncommunicable diseases of Iran." Diabetes Care **32**(6): 1092-1097.
- Delcourt, C., J. P. Cristol, et al. (1999). "Age-related macular degeneration and antioxidant status in the POLA study. POLA Study Group. Pathologies Oculaires Liees a l'Age." Arch Ophthalmol **117**(10): 1384-1390.
- Delcourt, C., F. Michel, et al. (2001). "Associations of cardiovascular disease and its risk factors with age-related macular degeneration: the POLA study." Ophthalmic Epidemiol **8**(4): 237-249.
- Delcourt, C., B. Villatte-Cathelineau, et al. (1995). "Visual impairment in type 2 diabetic patients. A multicentre study in France. CODIAB-INSERM-ZENECAR Pharma Study Group." Acta Ophthalmol Scand **73**(4): 293-298.
- Delori, F. C., D. G. Goger, et al. (2001). "Age-related accumulation and spatial distribution of lipofuscin in RPE of normal subjects." Invest Ophthalmol Vis Sci **42**(8): 1855-1866.
- Demar, J. C., Jr., K. Ma, et al. (2005). "alpha-Linolenic acid does not contribute appreciably to docosahexaenoic acid within brain phospholipids of adult rats fed a diet enriched in docosahexaenoic acid." J Neurochem **94**(4): 1063-1076.
- DeMarco, V. G., M. S. Johnson, et al. (2010). "Cytokine abnormalities in the etiology of the cardiometabolic syndrome." Curr Hypertens Rep **12**(2): 93-98.
- Demontis, G. C., A. Moroni, et al. (2002). "Functional characterisation and subcellular localisation of HCN1 channels in rabbit retinal rod photoreceptors." J Physiol **542**(Pt 1): 89-97.
- Dennison, B. A., H. L. Rockwell, et al. (1997). "Excess fruit juice consumption by preschool-aged children is associated with short stature and obesity." Pediatrics **99**(1): 15-22.
- Desjardins, D. M., P. W. Yates, et al. (2016). "Progressive Early Breakdown of Retinal Pigment Epithelium Function in Hyperglycemic Rats." Invest Ophthalmol Vis Sci **57**(6): 2706-2713.
- Desroches, S. and B. Lamarche (2007). "The evolving definitions and increasing prevalence of the metabolic syndrome." Appl Physiol Nutr Metab **32**(1): 23-32.
- Devi, T. S., M. Somayajulu, et al. (2017). "TXNIP regulates mitophagy in retinal Muller cells under high-glucose conditions: implications for diabetic retinopathy." Cell Death Dis **8**(5): e2777.
- Di Marzo, V., N. Stella, et al. (2015). "Endocannabinoid signalling and the deteriorating brain." Nat Rev Neurosci **16**(1): 30-42.

- Di Polo, A., L. Cheng, et al. (2000). "Colocalization of TrkB and brain-derived neurotrophic factor proteins in green-red-sensitive cone outer segments." Invest Ophthalmol Vis Sci **41**(12): 4014-4021.
- Diamond, J. S. (2017). "Inhibitory Interneurons in the Retina: Types, Circuitry, and Function." Annu Rev Vis Sci **3**: 1-24.
- Diaz-Lopez, A., N. Babio, et al. (2015). "Mediterranean Diet, Retinopathy, Nephropathy, and Microvascular Diabetes Complications: A Post Hoc Analysis of a Randomized Trial." Diabetes Care **38**(11): 2134-2141.
- DiNicolantonio, J. J., J. H. O'Keefe, et al. (2015). "Added fructose: a principal driver of type 2 diabetes mellitus and its consequences." Mayo Clin Proc **90**(3): 372-381.
- Dray, C., C. Knauf, et al. (2008). "Apelin stimulates glucose utilization in normal and obese insulin-resistant mice." Cell Metab **8**(5): 437-445.
- Ducasse, A. and A. Segal (1885). Anatomie de la rétine. Encycl. Médico-chirurgicale: Ophtalmologie. Elsevier. Paris: 1-8.
- Dupas, J., C. Goanvec, et al. (2016). "Progressive Induction of Type 2 Diabetes: Effects of a Reality-Like Fructose Enriched Diet in Young Wistar Rats." PLoS One **11**(1): e0146821.
- Duvnjak, L. (2007). "Hypertension and the Metabolic Syndrome." EJIFCC **18**(1): 55-60.
- Dyerberg, J., P. Madsen, et al. (2010). "Bioavailability of marine n-3 fatty acid formulations." Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids **83**(3): 137-141.
- Ebaugh, F. G., Jr., C. P. Emerson, et al. (1953). "The use of radioactive chromium 51 as an erythrocyte tagging agent for the determination or red cell survival in vivo." J Clin Invest **32**(12): 1260-1276.
- Eckmiller, R. (1997). "Learning retina implants with epiretinal contacts." Ophthalmic Res **29**(5): 281-289.
- Edwards, A. O., L. A. Donoso, et al. (2001). "A novel gene for autosomal dominant Stargardt-like macular dystrophy with homology to the SUR4 protein family." Invest Ophthalmol Vis Sci **42**(11): 2652-2663.
- Edwards, A. O., R. Ritter, 3rd, et al. (2005). "Complement factor H polymorphism and age-related macular degeneration." Science **308**(5720): 421-424.
- Eichler, W., H. Kuhrt, et al. (2000). "VEGF release by retinal glia depends on both oxygen and glucose supply." Neuroreport **11**(16): 3533-3537.
- Einhorn, D., G. M. Reaven, et al. (2003). "American College of Endocrinology position statement on the insulin resistance syndrome." Endocr Pract **9**(3): 237-252.
- Einthoven, W. and W. Jolly (1908). "The form and magnitude of the electrical response of the eye to stimulation by light at various intensities." Experimental Physiology **1**(4): 373-416.
- Eldred, G. E. (1993). "Age pigment structure." Nature **364**(6436): 396.
- Erke, M. G., G. Bertelsen, et al. (2014). "Cardiovascular risk factors associated with age-related macular degeneration: the Tromso Study." Acta Ophthalmol **92**(7): 662-669.
- Evans, J. R. and J. G. Lawrenson (2017). "Antioxidant vitamin and mineral supplements for preventing age-related macular degeneration." Cochrane Database Syst Rev **7**: CD000253.
- Expert Panel on Detection, E. and A. Treatment of High Blood Cholesterol in (2001). "Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III)." JAMA **285**(19): 2486-2497.
- Faeh, D., K. Minehira, et al. (2005). "Effect of fructose overfeeding and fish oil administration on hepatic de novo lipogenesis and insulin sensitivity in healthy men." Diabetes **54**(7): 1907-1913.

- Farber, D. B. (1995). "From mice to men: the cyclic GMP phosphodiesterase gene in vision and disease. The Proctor Lecture." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **36**(2): 263-275.
- Feeney-Burns, L. and M. R. Ellersieck (1985). "Age-related changes in the ultrastructure of Bruch's membrane." *Am J Ophthalmol* **100**(5): 686-697.
- Ferrara, N. (2010). "Vascular endothelial growth factor and age-related macular degeneration: from basic science to therapy." *Nat Med* **16**(10): 1107-1111.
- Ferris, F. L., 3rd, C. P. Wilkinson, et al. (2013). "Clinical classification of age-related macular degeneration." *Ophthalmology* **120**(4): 844-851.
- Ferris, F. L., M. D. Davis, et al. (2005). "A simplified severity scale for age-related macular degeneration: AREDS Report No. 18." *Arch Ophthalmol* **123**(11): 1570-1574.
- Feskens, E. J., C. H. Bowles, et al. (1991). "Inverse association between fish intake and risk of glucose intolerance in normoglycemic elderly men and women." *Diabetes Care* **14**(11): 935-941.
- Festi, D., R. Schiumerini, et al. (2014). "Gut microbiota and metabolic syndrome." *World J Gastroenterol* **20**(43): 16079-16094.
- Fintz, A. C., I. Audo, et al. (2003). "Partial characterization of retina-derived cone neuroprotection in two culture models of photoreceptor degeneration." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **44**(2): 818-825.
- Fitzgerald, P. J. (2013). "Elevated norepinephrine may be an etiological factor in a wide range of diseases: age-related macular degeneration, systemic lupus erythematosus, atrial fibrillation, metabolic syndrome." *Med Hypotheses* **80**(5): 558-563.
- Flaxman, S. R., R. R. A. Bourne, et al. (2017). "Global causes of blindness and distance vision impairment 1990-2020: a systematic review and meta-analysis." *Lancet Glob Health* **5**(12): e1221-e1234.
- Fliesler, S. J. and R. E. Anderson (1983). "Chemistry and metabolism of lipids in the vertebrate retina." *Prog Lipid Res* **22**(2): 79-131.
- 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.
- Ford, D. A. and R. W. Gross (1989). "Plasmenylethanolamine 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.
- Ford, E. S. (2005). "Risks for all-cause mortality, cardiovascular disease, and diabetes associated with the metabolic syndrome: a summary of the evidence." *Diabetes Care* **28**(7): 1769-1778.
- Ford, E. S., W. H. Giles, et al. (2002). "Prevalence of the metabolic syndrome among US adults: findings from the third National Health and Nutrition Examination Survey." *JAMA* **287**(3): 356-359.
- Ford, E. S., C. Li, et al. (2008). "Metabolic syndrome and incident diabetes: current state of the evidence." *Diabetes Care* **31**(9): 1898-1904.
- Frank, R. N., R. H. Amin, et al. (1996). "Basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor are present in epiretinal and choroidal neovascular membranes." *Am J Ophthalmol* **122**(3): 393-403.
- 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.
- Friedberg, C. E., M. J. Janssen, et al. (1998). "Fish oil and glycemic control in diabetes. A meta-analysis." *Diabetes Care* **21**(4): 494-500.
- Friedman, D. S., B. J. O'Colmain, et al. (2004). "Prevalence of age-related macular degeneration in the United States." *Arch Ophthalmol* **122**(4): 564-572.

- Fu, Z., R. Liegl, et al. (2017). "Adiponectin Mediates Dietary Omega-3 Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acid Protection Against Choroidal Neovascularization in Mice." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **58**(10): 3862-3870.
- Fyk-Kolodziej, B. and R. G. Pourcho (2007). "Differential distribution of hyperpolarization-activated and cyclic nucleotide-gated channels in cone bipolar cells of the rat retina." *J Comp Neurol* **501**(6): 891-903.
- Galli, J., L. S. Li, et al. (1996). "Genetic analysis of non-insulin dependent diabetes mellitus in the GK rat." *Nat Genet* **12**(1): 31-37.
- Gao, L., Z. Xin, et al. (2016). "High Prevalence of Diabetic Retinopathy in Diabetic Patients Concomitant with Metabolic Syndrome." *PLoS One* **11**(1): e0145293.
- Garaiova, I., I. A. Guschina, et al. (2007). "A randomised cross-over trial in healthy adults indicating improved absorption of omega-3 fatty acids by pre-emulsification." *Nutr J* **6**: 4.
- Gawrisch, K., O. Soubias, et al. (2008). "Insights from biophysical studies on the role of polyunsaturated fatty acids for function of G-protein coupled membrane receptors." *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **79**(3-5): 131-134.
- Gella, L., R. Raman, et al. (2015). "Impairment of Colour Vision in Diabetes with No Retinopathy: Sankara Nethralaya Diabetic Retinopathy Epidemiology and Molecular Genetics Study (SNDREAMS- II, Report 3)." *PLoS One* **10**(6): e0129391.
- Ghaem Maralani, H., B. C. Tai, et al. (2013). "Metabolic syndrome and risk of age-related cataract over time: an analysis of interval-censored data using a random-effects model." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **54**(1): 641-646.
- Ghaem Maralani, H., B. C. Tai, et al. (2015). "Metabolic syndrome and risk of age-related macular degeneration." *Retina* **35**(3): 459-466.
- Ghasemifard, S., K. Hermon, et al. (2015). "Metabolic fate (absorption, beta-oxidation and deposition) of long-chain n-3 fatty acids is affected by sex and by the oil source (krill oil or fish oil) in the rat." *Br J Nutr* **114**(5): 684-692.
- Gill, H., M. Mugo, et al. (2005). "The key role of insulin resistance in the cardiometabolic syndrome." *Am J Med Sci* **330**(6): 290-294.
- Gilliam, J. C., J. T. Chang, et al. (2012). "Three-dimensional architecture of the rod sensory cilium and its disruption in retinal neurodegeneration." *Cell* **151**(5): 1029-1041.
- Ginsberg, H. N., Y. L. Zhang, et al. (2005). "Regulation of plasma triglycerides in insulin resistance and diabetes." *Arch Med Res* **36**(3): 232-240.
- Goldberg, J., G. Flowerdew, et al. (1988). "Factors associated with age-related macular degeneration. An analysis of data from the first National Health and Nutrition Examination Survey." *Am J Epidemiol* **128**(4): 700-710.
- Gonzalez-Fernandez, F. (2002). "Evolution of the visual cycle: the role of retinoid-binding proteins." *J Endocrinol* **175**(1): 75-88.
- Goran, M. I., S. J. Ulijaszek, et al. (2013). "High fructose corn syrup and diabetes prevalence: a global perspective." *Glob Public Health* **8**(1): 55-64.
- Gordiyenko, N., M. Campos, et al. (2004). "RPE cells internalize low-density lipoprotein (LDL) and oxidized LDL (oxLDL) in large quantities in vitro and in vivo." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **45**(8): 2822-2829.
- Gordon, C. J., P. M. Phillips, et al. (2016). "Effect of high-fructose and high-fat diets on pulmonary sensitivity, motor activity, and body composition of brown Norway rats exposed to ozone." *Inhal Toxicol* **28**(5): 203-215.
- Gordon, W. C. and N. G. Bazan (1990). "Docosahexaenoic acid utilization during rod photoreceptor cell renewal." *J Neurosci* **10**(7): 2190-2202.
- Gordon, W. C. and N. G. Bazan (1997). *Retina. Biochemistry of the eye*. C. H. Medical. London.

- Gorusupudi, A., A. Liu, et al. (2016). "Associations of human retinal very long-chain polyunsaturated fatty acids with dietary lipid biomarkers." *J Lipid Res* **57**(3): 499-508.
- Gospe, S. M., 3rd, S. A. Baker, et al. (2010). "Facilitative glucose transporter Glut1 is actively excluded from rod outer segments." *J Cell Sci* **123**(Pt 21): 3639-3644.
- Gourdy, P., L. Cazals, et al. (2018). "Apelin administration improves insulin sensitivity in overweight men during hyperinsulinaemic-euglycaemic clamp." *Diabetes Obes Metab* **20**(1): 157-164.
- Graeber, M. B. (2010). "Changing face of microglia." *Science* **330**(6005): 783-788.
- Griffin, M. D., T. A. Sanders, et al. (2006). "Effects of altering the ratio of dietary n-6 to n-3 fatty acids on insulin sensitivity, lipoprotein size, and postprandial lipemia in men and postmenopausal women aged 45-70 y: the OPTILIP Study." *Am J Clin Nutr* **84**(6): 1290-1298.
- Gropp, E., M. Shanabrough, et al. (2005). "Agouti-related peptide-expressing neurons are mandatory for feeding." *Nat Neurosci* **8**(10): 1289-1291.
- Grossniklaus, H. E., S. J. Kang, et al. (2010). "Animal models of choroidal and retinal neovascularization." *Prog Retin Eye Res* **29**(6): 500-519.
- Group, D. C. a. C. T. R. (1994). "Effect of intensive diabetes treatment on the development and progression of long-term complications in adolescents with insulin-dependent diabetes mellitus: Diabetes Control and Complications Trial. Diabetes Control and Complications Trial Research Group." *J Pediatr* **125**(2): 177-188.
- Gu, D., K. Reynolds, et al. (2005). "Prevalence of the metabolic syndrome and overweight among adults in China." *Lancet* **365**(9468): 1398-1405.
- Gupta, R., P. C. Deedwania, et al. (2004). "Prevalence of metabolic syndrome in an Indian urban population." *Int J Cardiol* **97**(2): 257-261.
- Haffner, S. M., R. A. Valdez, et al. (1992). "Prospective analysis of the insulin-resistance syndrome (syndrome X)." *Diabetes* **41**(6): 715-722.
- Hageman, G. S. and L. V. Johnson (1987). "Chondroitin 6-sulfate glycosaminoglycan is a major constituent of primate cone photoreceptor matrix sheaths." *Curr Eye Res* **6**(4): 639-646.
- Hajiluan, G., M. Abbasalizad Farhangi, et al. (2017). "Mediterranean dietary pattern and VEGF +405 G/C gene polymorphisms in patients with metabolic syndrome: An aspect of gene-nutrient interaction." *PLoS One* **12**(2): e0171637.
- Halberg, N., I. Wernstedt-Asterholm, et al. (2008). "The adipocyte as an endocrine cell." *Endocrinol Metab Clin North Am* **37**(3): 753-768, x-xi.
- Halford, J. C., S. C. Wanninayake, et al. (1998). "Behavioral satiety sequence (BSS) for the diagnosis of drug action on food intake." *Pharmacol Biochem Behav* **61**(2): 159-168.
- Hallfrisch, J., S. Reiser, et al. (1983). "Blood lipid distribution of hyperinsulinemic men consuming three levels of fructose." *Am J Clin Nutr* **37**(5): 740-748.
- Hangai, M., T. Murata, et al. (2001). "Angiopoietin-1 upregulation by vascular endothelial growth factor in human retinal pigment epithelial cells." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **42**(7): 1617-1625.
- Hankin, J. A., R. M. Barkley, et al. (2007). "Sublimation as a method of matrix application for mass spectrometric imaging." *J Am Soc Mass Spectrom* **18**(9): 1646-1652.
- Harkewicz, R., H. Du, et al. (2012). "Essential role of ELOVL4 protein in very long chain fatty acid synthesis and retinal function." *J Biol Chem* **287**(14): 11469-11480.
- Harris, W. S. (1997). "n-3 fatty acids and serum lipoproteins: human studies." *Am J Clin Nutr* **65**(5 Suppl): 1645S-1654S.
- Harris, W. S. (2007). "International recommendations for consumption of long-chain omega-3 fatty acids." *J Cardiovasc Med (Hagerstown)* **8** Suppl 1: S50-52.

- Harris, W. S., S. A. Sands, et al. (2004). "Omega-3 fatty acids in cardiac biopsies from heart transplantation patients: correlation with erythrocytes and response to supplementation." Circulation **110**(12): 1645-1649.
- Harrold, J. A., T. M. Dovey, et al. (2012). "CNS regulation of appetite." Neuropharmacology **63**(1): 3-17.
- Hartweg, J., R. Perera, et al. (2008). "Omega-3 polyunsaturated fatty acids (PUFA) for type 2 diabetes mellitus." Cochrane Database Syst Rev(1): CD003205.
- Havel, P. J. (2001). "Peripheral signals conveying metabolic information to the brain: short-term and long-term regulation of food intake and energy homeostasis." Exp Biol Med (Maywood) **226**(11): 963-977.
- Hazim, R. A. and D. S. Williams (2018). "Cell Culture Analysis of the Phagocytosis of Photoreceptor Outer Segments by Primary Mouse RPE Cells." Methods Mol Biol **1753**: 63-71.
- Henkind, P., R. I. Hansen, et al. (1979). Ocular circulation. Physiology of the human eye and visual system. H. Row. New York: 98-155.
- Henricsson, M., L. Nystrom, et al. (2003). "The incidence of retinopathy 10 years after diagnosis in young adult people with diabetes: results from the nationwide population-based Diabetes Incidence Study in Sweden (DISS)." Diabetes Care **26**(2): 349-354.
- Hernandez, M., J. H. Urcola, et al. (2008). "Retinal ganglion cell neuroprotection in a rat model of glaucoma following brimonidine, latanoprost or combined treatments." Exp Eye Res **86**(5): 798-806.
- 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.
- Hill, A. M., J. D. Buckley, et al. (2007). "Combining fish-oil supplements with regular aerobic exercise improves body composition and cardiovascular disease risk factors." Am J Clin Nutr **85**(5): 1267-1274.
- Hisatomi, O. and F. Tokunaga (2002). "Molecular evolution of proteins involved in vertebrate phototransduction." Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol **133**(4): 509-522.
- Ho, L., R. van Leeuwen, et al. (2011). "Reducing the genetic risk of age-related macular degeneration with dietary antioxidants, zinc, and omega-3 fatty acids: the Rotterdam study." Arch Ophthalmol **129**(6): 758-766.
- Hohsfield, L. A., D. Ehrlich, et al. (2013). "Cholesterol diet counteracts repeated anesthesia/infusion-induced cognitive deficits in male Brown Norway rats." Neurobiol Learn Mem **106**: 154-162.
- Holekamp, N. M., N. Bouck, et al. (2002). "Pigment epithelium-derived factor is deficient in the vitreous of patients with choroidal neovascularization due to age-related macular degeneration." Am J Ophthalmol **134**(2): 220-227.
- Holz, F. G., F. Schutt, et al. (1999). "Inhibition of lysosomal degradative functions in RPE cells by a retinoid component of lipofuscin." Invest Ophthalmol Vis Sci **40**(3): 737-743.
- Hong, T., P. Mitchell, et al. (2014). "Visual impairment and the incidence of falls and fractures among older people: longitudinal findings from the Blue Mountains Eye Study." Invest Ophthalmol Vis Sci **55**(11): 7589-7593.
- Hori, S., S. Ohtsuki, et al. (2004). "A pericyte-derived angiopoietin-1 multimeric complex induces occludin gene expression in brain capillary endothelial cells through Tie-2 activation in vitro." J Neurochem **89**(2): 503-513.
- Hotamisligil, G. S., P. Peraldi, et al. (1996). "IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF-alpha- and obesity-induced insulin resistance." Science **271**(5249): 665-668.

- Howard, K. P., B. E. Klein, et al. (2014). "Measures of body shape and adiposity as related to incidence of age-related eye diseases: observations from the Beaver Dam Eye Study." Invest Ophthalmol Vis Sci **55**(4): 2592-2598.
- Huang, J. P., M. L. Cheng, et al. (2017). "Docosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid are positively associated with insulin sensitivity in rats fed high-fat and high-fructose diets." J Diabetes **9**(10): 936-946.
- Hughes, V. (2012). "Microglia: The constant gardeners." Nature **485**(7400): 570-572.
- Igarashi, M., J. C. DeMar, Jr., et al. (2007). "Docosahexaenoic acid synthesis from alpha-linolenic acid by rat brain is unaffected by dietary n-3 PUFA deprivation." J Lipid Res **48**(5): 1150-1158.
- Ikeda, T., Y. Homma, et al. (1998). "Expression of transforming growth factor-beta s and their receptors by human retinal glial cells." Curr Eye Res **17**(5): 546-550.
- INCA3 (2017). Etude individuelle nationale des consommations alimentaires (INCA 3) (2014-2015). A. f. d. s. s. d. aliments. Maison-Alfort.
- international, A. A. (2010). The Global Economic Cost of Visual Impairment.
- Ishikawa, M., Y. Sawada, et al. (2015). "Structure and function of the interphotoreceptor matrix surrounding retinal photoreceptor cells." Exp Eye Res **133**: 3-18.
- Iso, H., K. M. Rexrode, et al. (2001). "Intake of fish and omega-3 fatty acids and risk of stroke in women." JAMA **285**(3): 304-312.
- Jacobs, M., M. M. van Greevenbroek, et al. (2009). "Low-grade inflammation can partly explain the association between the metabolic syndrome and either coronary artery disease or severity of peripheral arterial disease: the CODAM study." Eur J Clin Invest **39**(6): 437-444.
- Janket, S. J., J. E. Manson, et al. (2003). "A prospective study of sugar intake and risk of type 2 diabetes in women." Diabetes Care **26**(4): 1008-1015.
- Jiang, X., L. Yang, et al. (2015). "Animal Models of Diabetic Retinopathy." Curr Eye Res **40**(8): 761-771.
- Jiang, Y., J. Pagadala, et al. (2013). "Reduced insulin receptor signaling in retinal Muller cells cultured in high glucose." Mol Vis **19**: 804-811.
- Jiao, J., B. Mo, et al. (2013). "Comparative study of laser-induced choroidal neovascularization in rats by paraffin sections, frozen sections and high-resolution optical coherence tomography." Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol **251**(1): 301-307.
- Jing, K. and K. Lim (2012). "Why is autophagy important in human diseases?" Exp Mol Med **44**(2): 69-72.
- Joffre, C., S. Gregoire, et al. (2016). "Modulation of brain PUFA content in different experimental models of mice." Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids **114**: 1-10.
- Johnson, L. V., W. P. Leitner, et al. (2001). "Complement activation and inflammatory processes in Drusen formation and age related macular degeneration." Exp Eye Res **73**(6): 887-896.
- Johnson, R. J., M. S. Segal, et al. (2007). "Potential role of sugar (fructose) in the epidemic of hypertension, obesity and the metabolic syndrome, diabetes, kidney disease, and cardiovascular disease." Am J Clin Nutr **86**(4): 899-906.
- Jones, C. A., N. R. London, et al. (2008). "Robo4 stabilizes the vascular network by inhibiting pathologic angiogenesis and endothelial hyperpermeability." Nat Med **14**(4): 448-453.
- Joyal, J. S., Y. Sun, et al. (2016). "Retinal lipid and glucose metabolism dictates angiogenesis through the lipid sensor Ffar1." Nat Med **22**(4): 439-445.
- Joyeux-Faure, M., E. Rossini, et al. (2006). "Fructose-fed rat hearts are protected against ischemia-reperfusion injury." Exp Biol Med (Maywood) **231**(4): 456-462.

- Jun, B., P. K. Mukherjee, et al. (2017). "Elovanoids are novel cell-specific lipid mediators necessary for neuroprotective signaling for photoreceptor cell integrity." Sci Rep **7**(1): 5279.
- Jurgens, H., W. Haass, et al. (2005). "Consuming fructose-sweetened beverages increases body adiposity in mice." Obes Res **13**(7): 1146-1156.
- Kaarniranta, K., J. Paananen, et al. (2012). "Adiponectin receptor 1 gene (ADIPOR1) variant is associated with advanced age-related macular degeneration in Finnish population." Neurosci Lett **513**(2): 233-237.
- Kaarniranta, K., P. Tokarz, et al. (2017). "Autophagy regulates death of retinal pigment epithelium cells in age-related macular degeneration." Cell Biol Toxicol **33**(2): 113-128.
- Kabir, M., G. Skurnik, et al. (2007). "Treatment for 2 mo with n 3 polyunsaturated fatty acids reduces adiposity and some atherogenic factors but does not improve insulin sensitivity in women with type 2 diabetes: a randomized controlled study." Am J Clin Nutr **86**(6): 1670-1679.
- Kahn, R. (2008). "Metabolic syndrome--what is the clinical usefulness?" Lancet **371**(9628): 1892-1893.
- Kang, K., P. J. Bauer, et al. (2003). "Assembly of retinal rod or cone Na(+)/Ca(2+)-K(+) exchanger oligomers with cGMP-gated channel subunits as probed with heterologously expressed cDNAs." Biochemistry **42**(15): 4593-4600.
- Katan, M. B., J. P. Deslypere, et al. (1997). "Kinetics of the incorporation of dietary fatty acids into serum cholesteryl esters, erythrocyte membranes, and adipose tissue: an 18-month controlled study." J Lipid Res **38**(10): 2012-2022.
- Kaur, J. (2014). "A comprehensive review on metabolic syndrome." Cardiol Res Pract **2014**: 943162.
- Kawamura, S. (1995). Phototransduction, excitation and adaptation. Neurobiology and clinical aspects of the outer retina C. Hall. London; New York.: 105.
- Kawasaki, T., K. Igarashi, et al. (2009). "Rats fed fructose-enriched diets have characteristics of nonalcoholic hepatic steatosis." J Nutr **139**(11): 2067-2071.
- Kelley, D. S., D. Siegel, et al. (2007). "Docosahexaenoic acid supplementation improves fasting and postprandial lipid profiles in hypertriglyceridemic men." Am J Clin Nutr **86**(2): 324-333.
- Kelly, T., W. Yang, et al. (2008). "Global burden of obesity in 2005 and projections to 2030." Int J Obes (Lond) **32**(9): 1431-1437.
- Kennedy, G. C. (1953). "The role of depot fat in the hypothalamic control of food intake in the rat." Proc R Soc Lond B Biol Sci **140**(901): 578-596.
- Kettenmann, H., U. K. Hanisch, et al. (2011). "Physiology of microglia." Physiol Rev **91**(2): 461-553.
- Kevany, B. M. and K. Palczewski (2010). "Phagocytosis of retinal rod and cone photoreceptors." Physiology (Bethesda) **25**(1): 8-15.
- Kilpatrick, E. S., A. S. Rigby, et al. (2007). "Insulin resistance, the metabolic syndrome, and complication risk in type 1 diabetes: "double diabetes" in the Diabetes Control and Complications Trial." Diabetes Care **30**(3): 707-712.
- Kim, J. H., J. H. Kim, et al. (2006). "Blood-neural barrier: intercellular communication at glio-vascular interface." J Biochem Mol Biol **39**(4): 339-345.
- King, A. J. (2012). "The use of animal models in diabetes research." Br J Pharmacol **166**(3): 877-894.
- Kishan, A. U., B. S. Modjtahedi, et al. (2011). "Lipids and age-related macular degeneration." Surv Ophthalmol **56**(3): 195-213.

- Klaver, C. C., R. C. Wolfs, et al. (1998). "Age-specific prevalence and causes of blindness and visual impairment in an older population: the Rotterdam Study." Arch Ophthalmol **116**(5): 653-658.
- Klein, B. E., R. Klein, et al. (1994). "Open-angle glaucoma and older-onset diabetes. The Beaver Dam Eye Study." Ophthalmology **101**(7): 1173-1177.
- Klein, R., B. E. Klein, et al. (1996). "Relation of glycemic control to diabetic microvascular complications in diabetes mellitus." Ann Intern Med **124**(1 Pt 2): 90-96.
- Klein, R., B. E. Klein, et al. (1984). "The Wisconsin epidemiologic study of diabetic retinopathy. II. Prevalence and risk of diabetic retinopathy when age at diagnosis is less than 30 years." Arch Ophthalmol **102**(4): 520-526.
- Klein, R. and B. E. K. Klein (2013). "The Prevalence of Age-Related Eye Diseases and Visual Impairment in Aging: Current Estimates." Invest Ophthalmol Vis Sci **54**(14): ORSF5-ORSF13.
- Klein, R., C. E. Myers, et al. (2014). "Lipids, lipid genes, and incident age-related macular degeneration: the three continent age-related macular degeneration consortium." Am J Ophthalmol **158**(3): 513-524 e513.
- Klein, R. J., C. Zeiss, et al. (2005). "Complement factor H polymorphism in age-related macular degeneration." Science **308**(5720): 385-389.
- Koehrer, P., S. Saab, et al. (2014). "Erythrocyte phospholipid and polyunsaturated fatty acid composition in diabetic retinopathy." PLoS One **9**(9): e106912.
- Kolovou, G. D., K. K. Anagnostopoulou, et al. (2007). "The prevalence of metabolic syndrome in various populations." Am J Med Sci **333**(6): 362-371.
- Kowluru, R. A., A. Kowluru, et al. (2015). "Oxidative stress and epigenetic modifications in the pathogenesis of diabetic retinopathy." Prog Retin Eye Res **48**: 40-61.
- Kowluru, R. A., M. Mishra, et al. (2016). "Hyperlipidemia and the development of diabetic retinopathy: Comparison between type 1 and type 2 animal models." Metabolism **65**(10): 1570-1581.
- Kowluru, R. A., Q. Zhong, et al. (2012). "Matrix metalloproteinases in diabetic retinopathy: potential role of MMP-9." Expert Opin Investig Drugs **21**(6): 797-805.
- Krebs, J. D., L. M. Browning, et al. (2006). "Additive benefits of long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids and weight-loss in the management of cardiovascular disease risk in overweight hyperinsulinaemic women." Int J Obes (Lond) **30**(10): 1535-1544.
- Kumar, S., M. Davies, et al. (1994). "Improvement in glucose tolerance and beta-cell function in a patient with vitamin D deficiency during treatment with vitamin D." Postgrad Med J **70**(824): 440-443.
- Kuwabara, T. and D. Cogan (1961). "Retinal glycogen." Trans Am Ophthalmol Soc **59**: 106-110.
- Labin, A. M. and E. N. Ribak (2010). "Retinal glial cells enhance human vision acuity." Phys Rev Lett **104**(15): 158102.
- Lacombe, R. J. S., V. Giuliano, et al. (2017). "Compound-specific isotope analysis resolves the dietary origin of docosahexaenoic acid in the mouse brain." J Lipid Res **58**(10): 2071-2081.
- Lafuma, A., A. Brezin, et al. (2006). "Nonmedical economic consequences attributable to visual impairment: a nation-wide approach in France." Eur J Health Econ **7**(3): 158-164.
- Laharrague, P. and L. Casteilla (2010). "The emergence of adipocytes." Endocr Dev **19**: 21-30.
- Lamb, T. D. and E. N. Pugh, Jr. (2006). "Phototransduction, dark adaptation, and rhodopsin regeneration the proctor lecture." Invest Ophthalmol Vis Sci **47**(12): 5137-5152.

- Lambert, N. G., H. ElShelmani, et al. (2016). "Risk factors and biomarkers of age-related macular degeneration." Prog Retin Eye Res **54**: 64-102.
- Lambert, V., J. Lecomte, et al. (2013). "Laser-induced choroidal neovascularization model to study age-related macular degeneration in mice." Nat Protoc **8**(11): 2197-2211.
- Lau, D. C., B. Dhillon, et al. (2005). "Adipokines: molecular links between obesity and atherosclerosis." Am J Physiol Heart Circ Physiol **288**(5): H2031-2041.
- Lawson, L. D. and B. G. Hughes (1988). "Human absorption of fish oil fatty acids as triacylglycerols, free acids, or ethyl esters." Biochem Biophys Res Commun **152**(1): 328-335.
- Laye, S., A. Nadjar, et al. (2018). "Anti-Inflammatory Effects of Omega-3 Fatty Acids in the Brain: Physiological Mechanisms and Relevance to Pharmacology." Pharmacol Rev **70**(1): 12-38.
- Le, K. A. and L. Tappy (2006). "Metabolic effects of fructose." Curr Opin Clin Nutr Metab Care **9**(4): 469-475.
- Le Magnen, J. (1982). Neurobiology of feeding and nutrition. San Diego, Academic Press.
- Le, Y. Z. (2017). "VEGF production and signaling in Muller glia are critical to modulating vascular function and neuronal integrity in diabetic retinopathy and hypoxic retinal vascular diseases." Vision Res **139**: 108-114.
- Leaf, D. A., W. E. Connor, et al. (1995). "Incorporation of dietary n-3 fatty acids into the fatty acids of human adipose tissue and plasma lipid classes." Am J Clin Nutr **62**(1): 68-73.
- Lee, A. Y. and S. S. Chung (1999). "Contributions of polyol pathway to oxidative stress in diabetic cataract." FASEB J **13**(1): 23-30.
- Lee, C. T., E. L. Gayton, et al. (2010). "Micronutrients and diabetic retinopathy a systematic review." Ophthalmology **117**(1): 71-78.
- Lee, R. H., B. S. Lieberman, et al. (1992). "A third form of the G protein beta subunit. 1. Immunochemical identification and localization to cone photoreceptors." J Biol Chem **267**(34): 24776-24781.
- Lee, Y. C., Y. H. Ko, et al. (2006). "Plasma leptin response to oral glucose tolerance and fasting/re-feeding tests in rats with fructose-induced metabolic derangements." Life Sci **78**(11): 1155-1162.
- Lemire, J. M. (1995). "Immunomodulatory actions of 1,25-dihydroxyvitamin D3." J Steroid Biochem Mol Biol **53**(1-6): 599-602.
- Lenzen, S. (2008). "The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes." Diabetologia **51**(2): 216-226.
- Leveillard, T., S. Mohand-Said, et al. (2004). "Identification and characterization of rod-derived cone viability factor." Nat Genet **36**(7): 755-759.
- 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.
- Li, L., N. Eter, et al. (2015). "The microglia in healthy and diseased retina." Exp Eye Res **136**: 116-130.
- Li, S., H. J. Shin, et al. (2009). "Adiponectin levels and risk of type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis." JAMA **302**(2): 179-188.
- Li, X., Y. Cai, et al. (2012). "Hyperglycaemia exacerbates choroidal neovascularisation in mice via the oxidative stress-induced activation of STAT3 signalling in RPE cells." PLoS One **7**(10): e47600.
- Liang, Y., D. Fotiadis, et al. (2003). "Organization of the G protein-coupled receptors rhodopsin and opsin in native membranes." J Biol Chem **278**(24): 21655-21662.

- Lieth, E., A. J. Barber, et al. (1998). "Glial reactivity and impaired glutamate metabolism in short-term experimental diabetic retinopathy. Penn State Retina Research Group." Diabetes **47**(5): 815-820.
- Lim, L. S., P. Mitchell, et al. (2012). "Age-related macular degeneration." Lancet **379**(9827): 1728-1738.
- Lin, H. C., C. W. Chien, et al. (2010). "Comparison of comorbid conditions between open-angle glaucoma patients and a control cohort: a case-control study." Ophthalmology **117**(11): 2088-2095.
- Lin, Q., S. E. Ruuska, et al. (1999). "Ligand selectivity of the peroxisome proliferator-activated receptor alpha." Biochemistry **38**(1): 185-190.
- Lin, T., Y. Qiu, et al. (2013). "Expression of adiponectin and its receptors in type 1 diabetes mellitus in human and mouse retinas." Mol Vis **19**: 1769-1778.
- Linser, P. and A. A. Moscona (1979). "Induction of glutamine synthetase in embryonic neural retina: localization in Muller fibers and dependence on cell interactions." Proc Natl Acad Sci U S A **76**(12): 6476-6480.
- Litman, B. J. and D. C. Mitchell (1996). "A role for phospholipid polyunsaturation in modulating membrane protein function." Lipids **31 Suppl**: S193-197.
- Litman, B. J., S. L. Niu, et al. (2001). "The role of docosahexaenoic acid containing phospholipids in modulating G protein-coupled signaling pathways: visual transduction." J Mol Neurosci **16**(2-3): 237-242; discussion 279-284.
- Liu, A., J. Chang, et al. (2010). "Long-chain and very long-chain polyunsaturated fatty acids in ocular aging and age-related macular degeneration." J Lipid Res **51**(11): 3217-3229.
- London, S. J., F. M. Sacks, et al. (1991). "Fatty acid composition of subcutaneous adipose tissue and diet in postmenopausal US women." Am J Clin Nutr **54**(2): 340-345.
- Lopez-Alvarenga, J. C., S. O. Ebbesson, et al. (2010). "Polyunsaturated fatty acids effect on serum triglycerides concentration in the presence of metabolic syndrome components. The Alaska-Siberia Project." Metabolism **59**(1): 86-92.
- Lucas, M., G. Asselin, et al. (2009). "Validation of an FFQ for evaluation of EPA and DHA intake." Public Health Nutr **12**(10): 1783-1790.
- Ludwig, D. S., K. E. Peterson, et al. (2001). "Relation between consumption of sugar-sweetened drinks and childhood obesity: a prospective, observational analysis." Lancet **357**(9255): 505-508.
- Lukiw, W. J., J. G. Cui, et al. (2005). "A role for docosahexaenoic acid-derived neuroprotectin D1 in neural cell survival and Alzheimer disease." J Clin Invest **115**(10): 2774-2783.
- Luo, B. A., F. Gao, et al. (2017). "The Association between Vitamin D Deficiency and Diabetic Retinopathy in Type 2 Diabetes: A Meta-Analysis of Observational Studies." Nutrients **9**(3).
- Luo, X., S. Gu, et al. (2018). "Kinsenoside Ameliorates Oxidative Stress-Induced RPE Cell Apoptosis and Inhibits Angiogenesis via Erk/p38/NF-kappaB/VEGF Signaling." Front Pharmacol **9**: 240.
- Luong, K., L. T. Nguyen, et al. (2005). "The role of vitamin D in protecting type 1 diabetes mellitus." Diabetes Metab Res Rev **21**(4): 338-346.
- Ly, A., C. Schone, et al. (2015). "High-resolution MALDI mass spectrometric imaging of lipids in the mammalian retina." Histochem Cell Biol **143**(5): 453-462.
- Ma, Q., J. H. Shen, et al. (2014). "Bioactive lipids in pathological retinopathy." Crit Rev Food Sci Nutr **54**(1): 1-16.
- Madeira, M. H., R. Boia, et al. (2015). "Contribution of microglia-mediated neuroinflammation to retinal degenerative diseases." Mediators Inflamm **2015**: 673090.

- Maki, K. C., M. S. Reeves, et al. (2009). "Krill oil supplementation increases plasma concentrations of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids in overweight and obese men and women." *Nutr Res* **29**(9): 609-615.
- 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.
- Mamikutty, N., Z. C. Thent, et al. (2014). "The establishment of metabolic syndrome model by induction of fructose drinking water in male Wistar rats." *Biomed Res Int* **2014**: 263897.
- Marcheselli, V. L., S. Hong, et al. (2003). "Novel docosanoids inhibit brain ischemia-reperfusion-mediated leukocyte infiltration and pro-inflammatory gene expression." *J Biol Chem* **278**(44): 43807-43817.
- Marckmann, P. (1999). "Footprint of fish: docosahexaenoic acid (DHA) in adipose tissue." *Nutrition* **15**(5): 407-408.
- Marmor, M. F., G. E. Holder, et al. (2004). "Standard for clinical electroretinography (2004 update)." *Doc Ophthalmol* **108**(2): 107-114.
- Martemyanov, K. A. and A. P. Sampath (2017). "The Transduction Cascade in Retinal ON-Bipolar Cells: Signal Processing and Disease." *Annu Rev Vis Sci* **3**: 25-51.
- Mathers, C. D. and D. Loncar (2006). "Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030." *PLoS Med* **3**(11): e442.
- Mauvais-Jarvis, F. (2017). "Epidemiology of Gender Differences in Diabetes and Obesity." *Adv Exp Med Biol* **1043**: 3-8.
- Mauvais-Jarvis, F., J. E. Manson, et al. (2017). "Menopausal Hormone Therapy and Type 2 Diabetes Prevention: Evidence, Mechanisms, and Clinical Implications." *Endocr Rev* **38**(3): 173-188.
- Mayer, J. (1953). "Glucostatic mechanism of regulation of food intake." *N Engl J Med* **249**(1): 13-16.
- Mei, N. (1998). *La sensibilité viscérale*. Paris, Broché.
- Metcalf, R. G., M. J. James, et al. (2007). "Effects of fish-oil supplementation on myocardial fatty acids in humans." *Am J Clin Nutr* **85**(5): 1222-1228.
- Micallef, M., I. Munro, et al. (2009). "Plasma n-3 Polyunsaturated Fatty Acids are negatively associated with obesity." *Br J Nutr* **102**(9): 1370-1374.
- Micallef, M. A. and M. L. Garg (2008). "The lipid-lowering effects of phytosterols and (n-3) polyunsaturated fatty acids are synergistic and complementary in hyperlipidemic men and women." *J Nutr* **138**(6): 1086-1090.
- Millen, A. E., M. W. Sahli, et al. (2016). "Adequate vitamin D status is associated with the reduced odds of prevalent diabetic retinopathy in African Americans and Caucasians." *Cardiovasc Diabetol* **15**(1): 128.
- Millen, A. E., R. Volland, et al. (2011). "Vitamin D status and early age-related macular degeneration in postmenopausal women." *Arch Ophthalmol* **129**(4): 481-489.
- Miller, J. W., J. Le Couter, et al. (2013). "Vascular endothelial growth factor a in intraocular vascular disease." *Ophthalmology* **120**(1): 106-114.
- Min, Y., K. Ghebremeskel, et al. (2004). "Adverse effect of obesity on red cell membrane arachidonic and docosahexaenoic acids in gestational diabetes." *Diabetologia* **47**(1): 75-81.
- Mitchell, D. C., S. L. Niu, et al. (2001). "Optimization of receptor-G protein coupling by bilayer lipid composition I: kinetics of rhodopsin-transducin binding." *J Biol Chem* **276**(46): 42801-42806.
- Mitchell, D. C., S. L. Niu, et al. (2003). "Enhancement of G protein-coupled signaling by DHA phospholipids." *Lipids* **38**(4): 437-443.

- Mohand-Said, S., D. Hicks, et al. (2000). "Selective transplantation of rods delays cone loss in a retinitis pigmentosa model." *Arch Ophthalmol* **118**(6): 807-811.
- Mohand-Said, S., D. Hicks, et al. (2001). "Rod-cone interactions: developmental and clinical significance." *Prog Retin Eye Res* **20**(4): 451-467.
- Moilanen, T. and T. Nikkari (1981). "The effect of storage on the fatty acid composition of human serum." *Clin Chim Acta* **114**(1): 111-116.
- Montgomery, M. K., C. E. Fiveash, et al. (2015). "Disparate metabolic response to fructose feeding between different mouse strains." *Sci Rep* **5**: 18474.
- Montgomery, M. K., N. L. Hallahan, et al. (2013). "Mouse strain-dependent variation in obesity and glucose homeostasis in response to high-fat feeding." *Diabetologia* **56**(5): 1129-1139.
- Moon, B. G., S. G. Joe, et al. (2012). "Prevalence and risk factors of early-stage age-related macular degeneration in patients examined at a health promotion center in Korea." *J Korean Med Sci* **27**(5): 537-541.
- Moon, Y. A., R. E. Hammer, et al. (2009). "Deletion of ELOVL5 leads to fatty liver through activation of SREBP-1c in mice." *J Lipid Res* **50**(3): 412-423.
- Mooradian, A. D. (2009). "Dyslipidemia in type 2 diabetes mellitus." *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* **5**(3): 150-159.
- Mora, J. R., M. Iwata, et al. (2008). "Vitamin effects on the immune system: vitamins A and D take centre stage." *Nat Rev Immunol* **8**(9): 685-698.
- Mora, M., V. Adam, et al. (2015). "Ghrelin Gene Variants Influence on Metabolic Syndrome Components in Aged Spanish Population." *PLoS One* **10**(9): e0136931.
- Mori, T. A., D. Q. Bao, et al. (1999). "Dietary fish as a major component of a weight-loss diet: effect on serum lipids, glucose, and insulin metabolism in overweight hypertensive subjects." *Am J Clin Nutr* **70**(5): 817-825.
- Morris, J., J. M. Singh, et al. (2011). "Transcriptome analysis of single cells." *J Vis Exp*(50).
- Morris, M. S., P. F. Jacques, et al. (2007). "Intake of zinc and antioxidant micronutrients and early age-related maculopathy lesions." *Ophthalmic Epidemiol* **14**(5): 288-298.
- Morrison, W. R. and L. M. Smith (1964). "Preparation of Fatty Acid Methyl Esters and Dimethylacetals from Lipids with Boron Fluoride--Methanol." *J Lipid Res* **5**: 600-608.
- Mozaffarian, D. (2017). "Foods, obesity, and diabetes-are all calories created equal?" *Nutr Rev* **75**(suppl 1): 19-31.
- Mozumdar, A. and G. Liguori (2011). "Persistent increase of prevalence of metabolic syndrome among U.S. adults: NHANES III to NHANES 1999-2006." *Diabetes Care* **34**(1): 216-219.
- Mukherjee, P. K., V. L. Marcheselli, et al. (2007). "Photoreceptor outer segment phagocytosis attenuates oxidative stress-induced apoptosis with concomitant neuroprotectin D1 synthesis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(32): 13158-13163.
- Mukherjee, P. K., V. L. Marcheselli, et al. (2004). "Neuroprotectin D1: a docosahexaenoic acid-derived docosatriene protects human retinal pigment epithelial cells from oxidative stress." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(22): 8491-8496.
- Muniz, A., E. T. Villazana-Espinoza, et al. (2007). "A novel cone visual cycle in the cone-dominated retina." *Exp Eye Res* **85**(2): 175-184.
- Munro, I. A. and M. L. Garg (2012). "Dietary supplementation with n-3 PUFA does not promote weight loss when combined with a very-low-energy diet." *Br J Nutr* **108**(8): 1466-1474.
- Myers, C. E., B. E. Klein, et al. (2014). "Cigarette smoking and the natural history of age-related macular degeneration: the Beaver Dam Eye Study." *Ophthalmology* **121**(10): 1949-1955.

- 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.
- Nath, M., N. Halder, et al. (2017). "Circulating biomarkers in glaucoma, age-related macular degeneration, and diabetic retinopathy." *Indian J Ophthalmol* **65**(3): 191-197.
- Natoli, R., N. Fernando, et al. (2018). "Obesity-induced metabolic disturbance drives oxidative stress and complement activation in the retinal environment." *Mol Vis* **24**: 201-217.
- Nestel, P., H. Shige, et al. (2002). "The n-3 fatty acids eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid increase systemic arterial compliance in humans." *Am J Clin Nutr* **76**(2): 326-330.
- Neuringer, M., W. E. Connor, et al. (1986). "Biochemical and functional effects of prenatal and postnatal omega 3 fatty acid deficiency on retina and brain in rhesus monkeys." *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**(11): 4021-4025.
- Neuringer, M., W. E. Connor, et al. (1984). "Dietary omega-3 fatty acid deficiency and visual loss in infant rhesus monkeys." *J Clin Invest* **73**(1): 272-276.
- Newman-Casey, P. A., N. Talwar, et al. (2011). "The relationship between components of metabolic syndrome and open-angle glaucoma." *Ophthalmology* **118**(7): 1318-1326.
- Newman, E. A. (1985). "Membrane physiology of retinal glial (Muller) cells." *J Neurosci* **5**(8): 2225-2239.
- Newman, E. A. (2003). "Glial cell inhibition of neurons by release of ATP." *J Neurosci* **23**(5): 1659-1666.
- Newman, E. A. and K. R. Zahs (1998). "Modulation of neuronal activity by glial cells in the retina." *J Neurosci* **18**(11): 4022-4028.
- Ni Dhubhghaill, S. S., M. T. Cahill, et al. (2010). "The pathophysiology of cigarette smoking and age-related macular degeneration." *Adv Exp Med Biol* **664**: 437-446.
- Nickell, S., P. S. Park, et al. (2007). "Three-dimensional architecture of murine rod outer segments determined by cryoelectron tomography." *J Cell Biol* **177**(5): 917-925.
- Nimmerjahn, A., F. Kirchhoff, et al. (2005). "Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo." *Science* **308**(5726): 1314-1318.
- Niu, S. L., D. C. Mitchell, et al. (2001). "Optimization of receptor-G protein coupling by bilayer lipid composition II: formation of metarhodopsin II-transducin complex." *J Biol Chem* **276**(46): 42807-42811.
- Norman, A. W., J. B. Frankel, et al. (1980). "Vitamin D deficiency inhibits pancreatic secretion of insulin." *Science* **209**(4458): 823-825.
- O'Connor, L., F. Imamura, et al. (2015). "Prospective associations and population impact of sweet beverage intake and type 2 diabetes, and effects of substitutions with alternative beverages." *Diabetologia* **58**(7): 1474-1483.
- O'Neill, S. and L. O'Driscoll (2015). "Metabolic syndrome: a closer look at the growing epidemic and its associated pathologies." *Obes Rev* **16**(1): 1-12.
- O'Rahilly, S. (2002). "Leptin: defining its role in humans by the clinical study of genetic disorders." *Nutr Rev* **60**(10 Pt 2): S30-34; discussion S68-84, 85-37.
- Obata, T., T. Nagakura, et al. (1999). "Eicosapentaenoic acid inhibits prostaglandin D2 generation by inhibiting cyclo-oxygenase-2 in cultured human mast cells." *Clin Exp Allergy* **29**(8): 1129-1135.
- Ogata, N., M. Matsushima, et al. (1996). "Expression of basic fibroblast growth factor mRNA in developing choroidal neovascularization." *Curr Eye Res* **15**(10): 1008-1018.
- Oishi, K., T. Konishi, et al. (2018). "Dietary fish oil differentially ameliorates high-fructose diet-induced hepatic steatosis and hyperlipidemia in mice depending on time of feeding." *J Nutr Biochem* **52**: 45-53.

- Ola, M. S. (2014). "Effect of hyperglycemia on insulin receptor signaling in the cultured retinal Muller glial cells." Biochem Biophys Res Commun **444**(2): 264-269.
- Olafsdottir, E., D. K. Andersson, et al. (2012). "The prevalence of cataract in a population with and without type 2 diabetes mellitus." Acta Ophthalmol **90**(4): 334-340.
- Oresic, M., T. Seppanen-Laakso, et al. (2009). "Gut microbiota affects lens and retinal lipid composition." Exp Eye Res **89**(5): 604-607.
- Owsley, C., G. R. Jackson, et al. (2000). "Psychophysical evidence for rod vulnerability in age-related macular degeneration." Invest Ophthalmol Vis Sci **41**(1): 267-273.
- Oyster, C. (1999). Blood supply and drainage. The Human Eye – Structure and Function. S. Associates. Sunderland, Massachusetts 247-289.
- Ozaki, H., M. S. Seo, et al. (2000). "Blockade of vascular endothelial cell growth factor receptor signaling is sufficient to completely prevent retinal neovascularization." Am J Pathol **156**(2): 697-707.
- Palaniappan, L., M. R. Carnethon, et al. (2004). "Predictors of the incident metabolic syndrome in adults: the Insulin Resistance Atherosclerosis Study." Diabetes Care **27**(3): 788-793.
- Panchal, S. K. and L. Brown (2011). "Rodent models for metabolic syndrome research." J Biomed Biotechnol **2011**: 351982.
- Panda-Jonas, S., J. B. Jonas, et al. (1996). "Retinal pigment epithelial cell count, distribution, and correlations in normal human eyes." Am J Ophthalmol **121**(2): 181-189.
- Pang, C., L. Jia, et al. (2012). "Determination of diabetic retinopathy prevalence and associated risk factors in Chinese diabetic and pre-diabetic subjects: Shanghai diabetic complications study." Diabetes Metab Res Rev **28**(3): 276-283.
- Paolicelli, R. C., G. Bolasco, et al. (2011). "Synaptic pruning by microglia is necessary for normal brain development." Science **333**(6048): 1456-1458.
- Papermaster, D. S. and W. J. Dreyer (1974). "Rhodopsin content in the outer segment membranes of bovine and frog retinal rods." Biochemistry **13**(11): 2438-2444.
- Parekh, N., R. J. Chappell, et al. (2007). "Association between vitamin D and age-related macular degeneration in the Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988 through 1994." Arch Ophthalmol **125**(5): 661-669.
- Park, H. G., K. S. D. Kothapalli, et al. (2016). "Palmitic acid (16:0) competes with omega-6 linoleic and omega-3 a-linolenic acids for FADS2 mediated Delta6-desaturation." Biochim Biophys Acta **1861**(2): 91-97.
- Park, Y. W., S. Zhu, et al. (2003). "The metabolic syndrome: prevalence and associated risk factor findings in the US population from the Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1994." Arch Intern Med **163**(4): 427-436.
- Parra, D., A. Ramel, et al. (2008). "A diet rich in long chain omega-3 fatty acids modulates satiety in overweight and obese volunteers during weight loss." Appetite **51**(3): 676-680.
- Pascolini, D. and S. P. Mariotti (2012). "Global estimates of visual impairment: 2010." Br J Ophthalmol **96**(5): 614-618.
- Patel, J., A. Iyer, et al. (2009). "Evaluation of the chronic complications of diabetes in a high fructose diet in rats." Indian J Biochem Biophys **46**(1): 66-72.
- Pawlosky, R. J., Y. Denkins, et al. (1997). "Retinal and brain accretion of long-chain polyunsaturated fatty acids in developing felines: the effects of corn oil-based maternal diets." Am J Clin Nutr **65**(2): 465-472.
- Pawlosky, R. J., J. R. Hibbeln, et al. (2001). "Physiological compartmental analysis of alpha-linolenic acid metabolism in adult humans." J Lipid Res **42**(8): 1257-1265.
- Penicaud, L., S. Meillon, et al. (2012). "Leptin and the central control of feeding behavior." Biochimie **94**(10): 2069-2074.

- Pennington, K. L. and M. M. DeAngelis (2016). "Epidemiology of age-related macular degeneration (AMD): associations with cardiovascular disease phenotypes and lipid factors." Eye Vis (Lond) **3**: 34.
- Pepe, I. M. (2001). "Recent advances in our understanding of rhodopsin and phototransduction." Prog Retin Eye Res **20**(6): 733-759.
- Pfriege, F. W. and B. A. Barres (1996). "New views on synapse-glia interactions." Curr Opin Neurobiol **6**(5): 615-621.
- Phillis, J. W., L. A. Horrocks, et al. (2006). "Cyclooxygenases, lipoxygenases, and epoxygenases in CNS: their role and involvement in neurological disorders." Brain Res Rev **52**(2): 201-243.
- Pinto, S., A. G. Roseberry, et al. (2004). "Rapid rewiring of arcuate nucleus feeding circuits by leptin." Science **304**(5667): 110-115.
- Plourde, M. and S. C. Cunnane (2007). "Extremely limited synthesis of long chain polyunsaturates in adults: implications for their dietary essentiality and use as supplements." Appl Physiol Nutr Metab **32**(4): 619-634.
- Poh, S., R. B. Mohamed Abdul, et al. (2016). "Metabolic syndrome and eye diseases." Diabetes Res Clin Pract **113**: 86-100.
- Poity-Yamate, C. L., S. Poity, et al. (1995). "Lactate released by Muller glial cells is metabolized by photoreceptors from mammalian retina." J Neurosci **15**(7 Pt 2): 5179-5191.
- Ponnalagu, M., M. Subramani, et al. (2017). "Retinal pigment epithelium-secretome: A diabetic retinopathy perspective." Cytokine **95**: 126-135.
- Pontoizeau, C., J. F. Fearnside, et al. (2011). "Broad-ranging natural metabotype variation drives physiological plasticity in healthy control inbred rat strains." J Proteome Res **10**(4): 1675-1689.
- Popp-Snijders, C., J. A. Schouten, et al. (1987). "Dietary supplementation of omega-3 polyunsaturated fatty acids improves insulin sensitivity in non-insulin-dependent diabetes." Diabetes Res **4**(3): 141-147.
- Pow, D. V. and S. R. Robinson (1994). "Glutamate in some retinal neurons is derived solely from glia." Neuroscience **60**(2): 355-366.
- Preece, S. J. and E. Claridge (2002). "Monte Carlo modelling of the spectral reflectance of the human eye." Phys Med Biol **47**(16): 2863-2877.
- Provis, J. M., C. M. Diaz, et al. (1996). "Microglia in human retina: a heterogeneous population with distinct ontogenies." Perspect Dev Neurobiol **3**(3): 213-222.
- Provis, J. M. and A. E. Hendrickson (2008). "The foveal avascular region of developing human retina." Arch Ophthalmol **126**(4): 507-511.
- Qian, H., R. P. Malchow, et al. (1993). "The effects of lowered extracellular sodium on gamma-aminobutyric acid (GABA)-induced currents of Muller (glial) cells of the skate retina." Cell Mol Neurobiol **13**(2): 147-158.
- Quazi, F., S. Lenevich, et al. (2012). "ABCA4 is an N-retinylidene-phosphatidylethanolamine and phosphatidylethanolamine importer." Nat Commun **3**: 925.
- Querques, G., R. Forte, et al. (2011). "Retina and omega-3." J Nutr Metab **2011**: 748361.
- Rabie, E. M., G. H. Heeba, et al. (2015). "Comparative effects of Aliskiren and Telmisartan in high fructose diet-induced metabolic syndrome in rats." Eur J Pharmacol **760**: 145-153.
- Rajah, T. T., A. L. Olson, et al. (2001). "Differential glucose uptake in retina- and brain-derived endothelial cells." Microvasc Res **62**(3): 236-242.
- Rama, N., A. Dubrac, et al. (2015). "Slit2 signaling through Robo1 and Robo2 is required for retinal neovascularization." Nat Med **21**(5): 483-491.

- Raman, R., A. Gupta, et al. (2010). "Prevalence of Metabolic Syndrome and its influence on microvascular complications in the Indian population with Type 2 Diabetes Mellitus. Sankara Nethralaya Diabetic Retinopathy Epidemiology And Molecular Genetic Study (SN-DREAMS, report 14)." Diabetol Metab Syndr **2**: 67.
- Rampal, S., S. Mahadeva, et al. (2012). "Ethnic differences in the prevalence of metabolic syndrome: results from a multi-ethnic population-based survey in Malaysia." PLoS One **7**(9): e46365.
- Ramprasath, V. R., I. Eyal, et al. (2013). "Enhanced increase of omega-3 index in healthy individuals with response to 4-week n-3 fatty acid supplementation from krill oil versus fish oil." Lipids Health Dis **12**: 178.
- Raoul, W., C. Auvynet, et al. (2010). "CCL2/CCR2 and CX3CL1/CX3CR1 chemokine axes and their possible involvement in age-related macular degeneration." J Neuroinflammation **7**: 87.
- Rapoport, S. I., E. Ramadan, et al. (2011). "Docosahexaenoic acid (DHA) incorporation into the brain from plasma, as an in vivo biomarker of brain DHA metabolism and neurotransmission." Prostaglandins Other Lipid Mediat **96**(1-4): 109-113.
- Rauen, T., W. R. Taylor, et al. (1998). "High-affinity glutamate transporters in the rat retina: a major role of the glial glutamate transporter GLAST-1 in transmitter clearance." Cell Tissue Res **291**(1): 19-31.
- Reaven, G. M. (1994). "Syndrome X: is one enough?" Am Heart J **127**(5): 1439-1442.
- Reichenbach, A. and A. Bringmann (2013). "New functions of Muller cells." Glia **61**(5): 651-678.
- Reichenbach, A., A. Siegel, et al. (1995). "Distribution of Bergmann glial somata and processes: implications for function." J Hirnforsch **36**(4): 509-517.
- Reilly, M. P. and D. J. Rader (2003). "The metabolic syndrome: more than the sum of its parts?" Circulation **108**(13): 1546-1551.
- Reynolds, R., B. Rosner, et al. (2013). "Dietary omega-3 fatty acids, other fat intake, genetic susceptibility, and progression to incident geographic atrophy." Ophthalmology **120**(5): 1020-1028.
- Rice, D. S., J. M. Calandria, et al. (2015). "Adiponectin receptor 1 conserves docosahexaenoic acid and promotes photoreceptor cell survival." Nat Commun **6**: 6228.
- Richter, G. M., F. Choudhury, et al. (2012). "Risk factors for incident cortical, nuclear, posterior subcapsular, and mixed lens opacities: the Los Angeles Latino eye study." Ophthalmology **119**(10): 2040-2047.
- Rivellese, A. A., A. Maffettone, et al. (1996). "Long-term effects of fish oil on insulin resistance and plasma lipoproteins in NIDDM patients with hypertriglyceridemia." Diabetes Care **19**(11): 1207-1213.
- Rodriguez-Fontal, M., J. B. Kerrison, et al. (2009). "Metabolic control and diabetic retinopathy." Curr Diabetes Rev **5**(1): 3-7.
- Rodriguez de Turco, E. B., N. Parkins, et al. (1999). "Selective retinal pigment epithelial cell lipid metabolism and remodeling conserves photoreceptor docosahexaenoic acid following phagocytosis." J Neurosci Res **57**(4): 479-486.
- Roorda, A., A. B. Metha, et al. (2001). "Packing arrangement of the three cone classes in primate retina." Vision Res **41**(10-11): 1291-1306.
- Rosqvist, F., D. Iggman, et al. (2014). "Overfeeding polyunsaturated and saturated fat causes distinct effects on liver and visceral fat accumulation in humans." Diabetes **63**(7): 2356-2368.
- Rotstein, N. P. and M. I. Aveladano (1987). "Labeling of phosphatidylcholines of retina subcellular fractions by [1-14C]eicosatetraenoate (20:4(n-6)), docosapentaenoate

- (22:5(n-3)) and docosahexaenoate (22:6(n-3))." Biochim Biophys Acta **921**(2): 235-244.
- Rowan, S., S. Jiang, et al. (2017). "Involvement of a gut-retina axis in protection against dietary glycemia-induced age-related macular degeneration." Proc Natl Acad Sci U S A **114**(22): E4472-E4481.
- Roy, M. S. and M. N. Janal (2010). "High caloric and sodium intakes as risk factors for progression of retinopathy in type 1 diabetes mellitus." Arch Ophthalmol **128**(1): 33-39.
- Rudnicka, A. R., Z. Jarrar, et al. (2012). "Age and gender variations in age-related macular degeneration prevalence in populations of European ancestry: a meta-analysis." Ophthalmology **119**(3): 571-580.
- Saaddine, J. B., A. A. Honeycutt, et al. (2008). "Projection of diabetic retinopathy and other major eye diseases among people with diabetes mellitus: United States, 2005-2050." Arch Ophthalmol **126**(12): 1740-1747.
- Sabanayagam, C., J. J. Wang, et al. (2011). "Metabolic syndrome components and age-related cataract: the Singapore Malay eye study." Invest Ophthalmol Vis Sci **52**(5): 2397-2404.
- Sala-Vila, A., A. Diaz-Lopez, et al. (2016). "Dietary Marine omega-3 Fatty Acids and Incident Sight-Threatening Retinopathy in Middle-Aged and Older Individuals With Type 2 Diabetes: Prospective Investigation From the PREDIMED Trial." JAMA Ophthalmol **134**(10): 1142-1149.
- Saleem, U., M. Khaleghi, et al. (2009). "Plasma carboxy-terminal provasopressin (copeptin): a novel marker of insulin resistance and metabolic syndrome." J Clin Endocrinol Metab **94**(7): 2558-2564.
- Salem, N., Jr. and C. N. Kuratko (2014). "A reexamination of krill oil bioavailability studies." Lipids Health Dis **13**: 137.
- Sam, A. H., R. C. Troke, et al. (2012). "The role of the gut/brain axis in modulating food intake." Neuropharmacology **63**(1): 46-56.
- Samuels, I. S., B. A. Bell, et al. (2015). "Early retinal pigment epithelium dysfunction is concomitant with hyperglycemia in mouse models of type 1 and type 2 diabetes." J Neurophysiol **113**(4): 1085-1099.
- Sanchez-Lozada, L. G., E. Tapia, et al. (2007). "Fructose-induced metabolic syndrome is associated with glomerular hypertension and renal microvascular damage in rats." Am J Physiol Renal Physiol **292**(1): F423-429.
- 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. (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.
- 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.
- Sarthy, V. P. (2000). "Muller cells in retinal health and disease." Arch Soc Esp Oftalmol **75**(6): 367-368.

- Sasaki, M., R. Kawasaki, et al. (2015). "The Associations of Dietary Intake of Polyunsaturated Fatty Acids With Diabetic Retinopathy in Well-Controlled Diabetes." Invest Ophthalmol Vis Sci **56**(12): 7473-7479.
- Sato, Y., T. Ito, et al. (1996). "Immunohistochemical localization of facilitated-diffusion glucose transporters in rat pancreatic islets." Tissue Cell **28**(6): 637-643.
- Sattar, N., A. McConnachie, et al. (2008). "Can metabolic syndrome usefully predict cardiovascular disease and diabetes? Outcome data from two prospective studies." Lancet **371**(9628): 1927-1935.
- Saunier, V., B. M. J. Merle, et al. (2018). "Incidence of and Risk Factors Associated With Age-Related Macular Degeneration: Four-Year Follow-up From the ALIENOR Study." JAMA Ophthalmol.
- Schafer, D. P., E. K. Lehrman, et al. (2013). "The "quad-partite" synapse: microglia-synapse interactions in the developing and mature CNS." Glia **61**(1): 24-36.
- Schiller, P. H. (1992). "The ON and OFF channels of the visual system." Trends Neurosci **15**(3): 86-92.
- Schiller, P. H., J. H. Sandell, et al. (1986). "Functions of the ON and OFF channels of the visual system." Nature **322**(6082): 824-825.
- Schmitz, G. and J. Ecker (2008). "The opposing effects of n-3 and n-6 fatty acids." Prog Lipid Res **47**(2): 147-155.
- Schnebelen-Berthier, C., N. Acar, et al. (2015). "Incorporation of lutein and docosahexaenoic acid from dietary microalgae into the retina in quail." Int J Food Sci Nutr **66**(2): 222-229.
- 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.
- Schneider, B. G., A. W. Shyjan, et al. (1991). "Co-localization and polarized distribution of Na,K-ATPase alpha 3 and beta 2 subunits in photoreceptor cells." J Histochem Cytochem **39**(4): 507-517.
- Schori, C., M. P. Agbaga, et al. (2018). "Elovl4 5-bp deletion does not accelerate cone photoreceptor degeneration in an all-cone mouse." PLoS One **13**(1): e0190514.
- Schuchardt, J. P. and A. Hahn (2013). "Bioavailability of long-chain omega-3 fatty acids." Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids **89**(1): 1-8.
- Schuchardt, J. P., I. Schneider, et al. (2011). "Incorporation of EPA and DHA into plasma phospholipids in response to different omega-3 fatty acid formulations--a comparative bioavailability study of fish oil vs. krill oil." Lipids Health Dis **10**: 145.
- Schultz, Z. D. (2011). "Raman Spectroscopic Imaging of Cholesterol and Docosahexaenoic Acid Distribution in the Retinal Rod Outer Segment." Aust J Chem **64**(5): 611-616.
- Schulze, M. B., J. E. Manson, et al. (2004). "Sugar-sweetened beverages, weight gain, and incidence of type 2 diabetes in young and middle-aged women." JAMA **292**(8): 927-934.
- Schutt, F., S. Davies, et al. (2000). "Photodamage to human RPE cells by A2-E, a retinoid component of lipofuscin." Invest Ophthalmol Vis Sci **41**(8): 2303-2308.
- Schutte, M. and P. Werner (1998). "Redistribution of glutathione in the ischemic rat retina." Neurosci Lett **246**(1): 53-56.
- Sebedio, J. L., P. O. Astorg, et al. (1987). "Quantitative analyses of polar components in frying oils by the iatrosan thin-layer chromatography-flame ionization detection technique." J Chromatogr **405**: 371-378.
- 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.
- 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.
- Seeliger, M. W., C. Grimm, et al. (2001). "New views on RPE65 deficiency: the rod system is the source of vision in a mouse model of Leber congenital amaurosis." Nat Genet **29**(1): 70-74.
- Sennlaub, F. and C. Combadiere (2008). "[Macular degeneration: retinal microglial cells are guilty]." Med Sci (Paris) **24**(4): 365-367.
- Serhan, C. N. (2014). "Pro-resolving lipid mediators are leads for resolution physiology." Nature **510**(7503): 92-101.
- Serhan, C. N. (2017). "Discovery of specialized pro-resolving mediators marks the dawn of resolution physiology and pharmacology." Mol Aspects Med **58**: 1-11.
- Sharma, A. K. and B. P. Srinivasan (2009). "Triple verses glimepiride plus metformin therapy on cardiovascular risk biomarkers and diabetic cardiomyopathy in insulin resistance type 2 diabetes mellitus rats." Eur J Pharm Sci **38**(5): 433-444.
- Sharma, R. K. and B. E. J. Ehinger (2003). Development and structure of the retina. Adler's Physiology of the Eye. Elsevier. Mosby, St Louis 319–347.
- Sheets, K. G., B. Jun, et al. (2013). "Microglial ramification and redistribution concomitant with the attenuation of choroidal neovascularization by neuroprotectin D1." Mol Vis **19**: 1747-1759.
- Shimizu, N., Y. Oomura, et al. (1987). "Hyperphagia and obesity in rats with bilateral ibotenic acid-induced lesions of the ventromedial hypothalamic nucleus." Brain Res **416**(1): 153-156.
- Shindou, H., H. Koso, et al. (2017). "Docosahexaenoic acid preserves visual function by maintaining correct disc morphology in retinal photoreceptor cells." J Biol Chem **292**(29): 12054-12064.
- Shobharani, P., S. P. Muthukumar, et al. (2018). "Strain-Specific Quantification of Native Probiotic Bacillus spp. and Their Effect on Liver Function and Gut Microflora of Experimental Rats." Probiotics Antimicrob Proteins.
- Sicree, R. A., P. Z. Zimmet, et al. (2008). "Differences in height explain gender differences in the response to the oral glucose tolerance test- the AusDiab study." Diabet Med **25**(3): 296-302.
- Simon, E., B. Bardet, et al. (2011). "Decreasing dietary linoleic acid promotes long chain omega-3 fatty acid incorporation into rat retina and modifies gene expression." Exp Eye Res **93**(5): 628-635.
- Simon, M. V., D. L. Agnolazza, et al. (2016). "Synthesis of docosahexaenoic acid from eicosapentaenoic acid in retina neurons protects photoreceptors from oxidative stress." J Neurochem **136**(5): 931-946.
- Simopoulos, A. P. (2002). "The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids." Biomed Pharmacother **56**(8): 365-379.
- Simopoulos, A. P. (2008). "The importance of the omega-6/omega-3 fatty acid ratio in cardiovascular disease and other chronic diseases." Exp Biol Med (Maywood) **233**(6): 674-688.
- Simopoulos, A. P. (2011). "Evolutionary aspects of diet: the omega-6/omega-3 ratio and the brain." Mol Neurobiol **44**(2): 203-215.
- Sinzato, Y. K., P. H. Lima, et al. (2009). "Neonatally-induced diabetes: lipid profile outcomes and oxidative stress status in adult rats." Rev Assoc Med Bras (1992) **55**(4): 384-388.

- Sjolie, A. K., J. Stephenson, et al. (1997). "Retinopathy and vision loss in insulin-dependent diabetes in Europe. The EURODIAB IDDM Complications Study." Ophthalmology **104**(2): 252-260.
- Skrha, J., M. Kunesova, et al. (2005). "Short-term very low calorie diet reduces oxidative stress in obese type 2 diabetic patients." Physiol Res **54**(1): 33-39.
- Sobrado-Calvo, P., M. Vidal-Sanz, et al. (2007). "Rat retinal microglial cells under normal conditions, after optic nerve section, and after optic nerve section and intravitreal injection of trophic factors or macrophage inhibitory factor." J Comp Neurol **501**(6): 866-878.
- Song, S. H. and T. A. Gray (2011). "Early-onset type 2 diabetes: high risk for premature diabetic retinopathy." Diabetes Res Clin Pract **94**(2): 207-211.
- 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.
- Sperling, R. I., A. I. Benincaso, et al. (1993). "Dietary omega-3 polyunsaturated fatty acids inhibit phosphoinositide formation and chemotaxis in neutrophils." J Clin Invest **91**(2): 651-660.
- Spruss, A., G. Kanuri, et al. (2009). "Toll-like receptor 4 is involved in the development of fructose-induced hepatic steatosis in mice." Hepatology **50**(4): 1094-1104.
- Stamer, W. D., D. Bok, et al. (2003). "Aquaporin-1 channels in human retinal pigment epithelium: role in transepithelial water movement." Invest Ophthalmol Vis Sci **44**(6): 2803-2808.
- Stanhope, K. L., J. M. Schwarz, et al. (2009). "Consuming fructose-sweetened, not glucose-sweetened, beverages increases visceral adiposity and lipids and decreases insulin sensitivity in overweight/obese humans." J Clin Invest **119**(5): 1322-1334.
- Steinberg, R. H. (1985). "Interactions between the retinal pigment epithelium and the neural retina." Doc Ophthalmol **60**(4): 327-346.
- Steppan, C. M., S. T. Bailey, et al. (2001). "The hormone resistin links obesity to diabetes." Nature **409**(6818): 307-312.
- Stevens, E. R., M. Esguerra, et al. (2003). "D-serine and serine racemase are present in the vertebrate retina and contribute to the physiological activation of NMDA receptors." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(11): 6789-6794.
- Stillwell, W. and S. R. Wassall (2003). "Docosahexaenoic acid: membrane properties of a unique fatty acid." Chem Phys Lipids **126**(1): 1-27.
- Stone, J., A. Itin, et al. (1995). "Development of retinal vasculature is mediated by hypoxia-induced vascular endothelial growth factor (VEGF) expression by neuroglia." J Neurosci **15**(7 Pt 1): 4738-4747.
- Strauss, O. (2005). "The retinal pigment epithelium in visual function." Physiol Rev **85**(3): 845-881.
- Streit, W. J. (2002). "Microglia as neuroprotective, immunocompetent cells of the CNS." Glia **40**(2): 133-139.
- Subramaniam, A., M. Landstrom, et al. (2018). "The Nile Rat (*Arvicanthis niloticus*) as a Superior Carbohydrate-Sensitive Model for Type 2 Diabetes Mellitus (T2DM)." Nutrients **10**(2).
- Suh, M. and M. T. Clandinin (2005). "20:5n-3 but not 22:6n-3 is a preferred substrate for synthesis of n-3 very-long-chain fatty acids (C24-C36) in retina." Curr Eye Res **30**(11): 959-968.
- Suh, M., A. A. Wierzbicki, et al. (2000). "Dietary 20:4n-6 and 22:6n-3 modulates the profile of long- and very-long-chain fatty acids, rhodopsin content, and kinetics in developing photoreceptor cells." Pediatr Res **48**(4): 524-530.

- Sulis, P. M., K. Motta, et al. (2017). "Impact of Fish Oil Supplementation and Interruption of Fructose Ingestion on Glucose and Lipid Homeostasis of Rats Drinking Different Concentrations of Fructose." Biomed Res Int **2017**: 4378328.
- Szendroedi, J. and M. Roden (2009). "Ectopic lipids and organ function." Curr Opin Lipidol **20**(1): 50-56.
- Tachibanaki, S., Y. Shimauchi-Matsukawa, et al. (2007). "Molecular mechanisms characterizing cone photoresponses." Photochem Photobiol **83**(1): 19-26.
- Taha, A. Y., Y. Cheon, et al. (2014). "Dietary omega-6 fatty acid lowering increases bioavailability of omega-3 polyunsaturated fatty acids in human plasma lipid pools." Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids **90**(5): 151-157.
- Tanaka, S., Y. Yoshimura, et al. (2013). "Fruit intake and incident diabetic retinopathy with type 2 diabetes." Epidemiology **24**(2): 204-211.
- Tappy, L. and K. A. Le (2010). "Metabolic effects of fructose and the worldwide increase in obesity." Physiol Rev **90**(1): 23-46.
- Tarr, J. M., K. Kaul, et al. (2013). "Pathophysiology of diabetic retinopathy." ISRN Ophthalmol **2013**: 343560.
- Teerlink, T., P. G. Scheffer, et al. (2004). "Combined data from LDL composition and size measurement are compatible with a discoid particle shape." J Lipid Res **45**(5): 954-966.
- Thakkestian, A., P. Han, et al. (2006). "Systematic review and meta-analysis of the association between complement factor H Y402H polymorphisms and age-related macular degeneration." Hum Mol Genet **15**(18): 2784-2790.
- Thierry, M., B. Pasquis, et al. (2014). "Metabolic syndrome triggered by high-fructose diet favors choroidal neovascularization and impairs retinal light sensitivity in the rat." PLoS One **9**(11): e112450.
- Thierry, M., B. Pasquis, et al. (2015). "Early adaptive response of the retina to a pro-diabetogenic diet: Impairment of cone response and gene expression changes in high-fructose fed rats." Exp Eye Res **135**: 37-46.
- Thirunavukkarasu, V., A. T. Anitha Nandhini, et al. (2004). "Lipoic acid attenuates hypertension and improves insulin sensitivity, kallikrein activity and nitrite levels in high fructose-fed rats." J Comp Physiol B **174**(8): 587-592.
- Thorsdottir, I., H. Tomasson, et al. (2007). "Randomized trial of weight-loss-diets for young adults varying in fish and fish oil content." Int J Obes (Lond) **31**(10): 1560-1566.
- Tikhonenko, M., T. A. Lydic, et al. (2013). "N-3 polyunsaturated Fatty acids prevent diabetic retinopathy by inhibition of retinal vascular damage and enhanced endothelial progenitor cell reparative function." PLoS One **8**(1): e55177.
- 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.
- Tobe, T., K. Takahashi, et al. (1995). "[A long-term course of experimentally produced choroidal neovascularization in the rat]." Nippon Ganka Gakkai Zasshi **99**(7): 784-791.
- Toop, C. R. and S. Gentili (2016). "Fructose Beverage Consumption Induces a Metabolic Syndrome Phenotype in the Rat: A Systematic Review and Meta-Analysis." Nutrients **8**(9).
- Tordoff, M. G. and A. M. Alleva (1990). "Effect of drinking soda sweetened with aspartame or high-fructose corn syrup on food intake and body weight." Am J Clin Nutr **51**(6): 963-969.
- Torgerson, J. S., J. Hauptman, et al. (2004). "XENical in the prevention of diabetes in obese subjects (XENDOS) study: a randomized study of orlistat as an adjunct to lifestyle

- changes for the prevention of type 2 diabetes in obese patients." Diabetes Care **27**(1): 155-161.
- Tran, L. T., V. G. Yuen, et al. (2009). "The fructose-fed rat: a review on the mechanisms of fructose-induced insulin resistance and hypertension." Mol Cell Biochem **332**(1-2): 145-159.
- Tremblay, J. and P. Hamet (2015). "Biomarkers of vascular complications in type 2 diabetes." Metabolism **64**(3 Suppl 1): S28-32.
- Tremblay, M. E., R. L. Lowery, et al. (2010). "Microglial interactions with synapses are modulated by visual experience." PLoS Biol **8**(11): e1000527.
- Tserentsoodol, N., N. V. Gordiyenko, et al. (2006). "Intraretinal lipid transport is dependent on high density lipoprotein-like particles and class B scavenger receptors." Mol Vis **12**: 1319-1333.
- Tserentsoodol, N., J. Sztein, et al. (2006). "Uptake of cholesterol by the retina occurs primarily via a low density lipoprotein receptor-mediated process." Mol Vis **12**: 1306-1318.
- Tsitouras, P. D., F. Gucciardo, et al. (2008). "High omega-3 fat intake improves insulin sensitivity and reduces CRP and IL6, but does not affect other endocrine axes in healthy older adults." Horm Metab Res **40**(3): 199-205.
- Tu, W. C., B. S. Muhlhausler, et al. (2013). "Correlations between blood and tissue omega-3 LCPUFA status following dietary ALA intervention in rats." Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids **88**(1): 53-60.
- Tuo, J., B. C. Smith, et al. (2004). "The involvement of sequence variation and expression of CX3CR1 in the pathogenesis of age-related macular degeneration." FASEB J **18**(11): 1297-1299.
- Tyree, S. M. and L. de Lecea (2017). "Lateral Hypothalamic Control of the Ventral Tegmental Area: Reward Evaluation and the Driving of Motivated Behavior." Front Syst Neurosci **11**: 50.
- Uauy, R., D. R. Hoffman, et al. (2001). "Essential fatty acids in visual and brain development." Lipids **36**(9): 885-895.
- Ugarte, M. and N. N. Osborne (2001). "Zinc in the retina." Prog Neurobiol **64**(3): 219-249.
- UKPDS38 (1998). "Tight blood pressure control and risk of macrovascular and microvascular complications in type 2 diabetes: UKPDS 38. UK Prospective Diabetes Study Group." BMJ **317**(7160): 703-713.
- Ulas, F., M. Balbaba, et al. (2013). "Association of dehydroepiandrosterone sulfate, serum lipids, C-reactive protein and body mass index with age-related macular degeneration." Int Ophthalmol **33**(5): 485-491.
- Ulven, S. M. and K. B. Holven (2015). "Comparison of bioavailability of krill oil versus fish oil and health effect." Vasc Health Risk Manag **11**: 511-524.
- Ulven, S. M., B. Kirkhus, et al. (2011). "Metabolic effects of krill oil are essentially similar to those of fish oil but at lower dose of EPA and DHA, in healthy volunteers." Lipids **46**(1): 37-46.
- van Den Brandt, J., P. Kovacs, et al. (2000). "Metabolic variability among disease-resistant inbred rat strains and in comparison with wild rats (*Rattus norvegicus*)." Clin Exp Pharmacol Physiol **27**(10): 793-795.
- van der Berg, J. D., C. D. Stehouwer, et al. (2016). "Associations of total amount and patterns of sedentary behaviour with type 2 diabetes and the metabolic syndrome: The Maastricht Study." Diabetologia **59**(4): 709-718.
- van Genugten, R. E., K. M. Utzschneider, et al. (2006). "Effects of sex and hormone replacement therapy use on the prevalence of isolated impaired fasting glucose and

- isolated impaired glucose tolerance in subjects with a family history of type 2 diabetes." *Diabetes* **55**(12): 3529-3535.
- Vandal, M., E. Freemantle, et al. (2008). "Plasma omega-3 fatty acid response to a fish oil supplement in the healthy elderly." *Lipids* **43**(11): 1085-1089.
- VandenLangenberg, G. M., J. A. Mares-Perlman, et al. (1998). "Associations between antioxidant and zinc intake and the 5-year incidence of early age-related maculopathy in the Beaver Dam Eye Study." *Am J Epidemiol* **148**(2): 204-214.
- Vassilev, Z. P., A. Ruigomez, et al. (2015). "Diabetes, cardiovascular morbidity, and risk of age-related macular degeneration in a primary care population." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **56**(3): 1585-1592.
- Velilla, S., J. J. Garcia-Medina, et al. (2013). "Smoking and age-related macular degeneration: review and update." *J Ophthalmol* **2013**: 895147.
- Venkatesh, A., S. Ma, et al. (2015). "Activated mTORC1 promotes long-term cone survival in retinitis pigmentosa mice." *J Clin Invest* **125**(4): 1446-1458.
- Verma, A., P. K. Rani, et al. (2009). "Is neuronal dysfunction an early sign of diabetic retinopathy? Microperimetry and spectral domain optical coherence tomography (SD-OCT) study in individuals with diabetes, but no diabetic retinopathy." *Eye (Lond)* **23**(9): 1824-1830.
- Vijay-Kumar, M., J. D. Aitken, et al. (2010). "Metabolic syndrome and altered gut microbiota in mice lacking Toll-like receptor 5." *Science* **328**(5975): 228-231.
- Viswanathan, S., L. J. Frishman, et al. (2002). "Inner-retinal contributions to the photopic sinusoidal flicker electroretinogram of macaques. Macaque photopic sinusoidal flicker ERG." *Doc Ophthalmol* **105**(2): 223-242.
- Wahlin, K. J., L. Lim, et al. (2004). "A method for analysis of gene expression in isolated mouse photoreceptor and Muller cells." *Mol Vis* **10**: 366-375.
- Wake, H., A. J. Moorhouse, et al. (2009). "Resting microglia directly monitor the functional state of synapses in vivo and determine the fate of ischemic terminals." *J Neurosci* **29**(13): 3974-3980.
- Wald, G. (1968). "The molecular basis of visual excitation." *Nature* **219**(5156): 800-807.
- Wang, J. S. and V. J. Kefalov (2009). "An alternative pathway mediates the mouse and human cone visual cycle." *Curr Biol* **19**(19): 1665-1669.
- Wang, N. and R. E. Anderson (1993). "Transport of 22:6n-3 in the plasma and uptake into retinal pigment epithelium and retina." *Exp Eye Res* **57**(2): 225-233.
- Wang, P. and F. Xia (2015). "EPO protects Muller cell under high glucose state through BDNF/TrkB pathway." *Int J Clin Exp Pathol* **8**(7): 8083-8090.
- Wang, Q., H. S. Zhao, et al. (2016). "Association between complement factor I gene polymorphisms and the risk of age-related macular degeneration: a Meta-analysis of literature." *Int J Ophthalmol* **9**(2): 298-305.
- Wang, Y., J. Mi, et al. (2007). "Is China facing an obesity epidemic and the consequences? The trends in obesity and chronic disease in China." *Int J Obes (Lond)* **31**(1): 177-188.
- Warden, C. H., A. Bettaieb, et al. (2017). "Chow fed UC Davis strain female Lepr fatty Zucker rats exhibit mild glucose intolerance, hypertriglyceridemia, and increased urine volume, all reduced by a Brown Norway strain chromosome 1 congenic donor region." *PLoS One* **12**(12): e0188175.
- Warden, C. H., C. Slupsky, et al. (2014). "Brown Norway chromosome 1 congenic reduces symptoms of renal disease in fatty Zucker rats." *PLoS One* **9**(1): e87770.
- Warner, J. G., Jr., I. H. Ullrich, et al. (1989). "Combined effects of aerobic exercise and omega-3 fatty acids in hyperlipidemic persons." *Med Sci Sports Exerc* **21**(5): 498-505.
- Weindruch, R., K. P. Keenan, et al. (2001). "Caloric restriction mimetics: metabolic interventions." *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **56 Spec No 1**: 20-33.

- Weisinger, H. S., A. J. Vingrys, et al. (1999). "Effects of dietary n-3 fatty acid deficiency and repletion in the guinea pig retina." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **40**(2): 327-338.
- Weisinger, H. S., A. J. Vingrys, et al. (1995). "Dietary manipulation of long-chain polyunsaturated fatty acids in the retina and brain of guinea pigs." *Lipids* **30**(5): 471-473.
- Weitz, D., N. Ficek, et al. (2002). "Subunit stoichiometry of the CNG channel of rod photoreceptors." *Neuron* **36**(5): 881-889.
- Wells, F. W. and J. C. Busby (2008). Dietary assessment of major trends in US food consumption, 1970–2005, ERS report.
- Wilson, P. W., R. B. D'Agostino, et al. (2005). "Metabolic syndrome as a precursor of cardiovascular disease and type 2 diabetes mellitus." *Circulation* **112**(20): 3066-3072.
- Wimmers, S. and O. Strauss (2007). "Basal calcium entry in retinal pigment epithelial cells is mediated by TRPC channels." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **48**(12): 5767-5772.
- Witkamp, R. (2016). "Fatty acids, endocannabinoids and inflammation." *Eur J Pharmacol* **785**: 96-107.
- Witkovsky, P. (2004). "Dopamine and retinal function." *Doc Ophthalmol* **108**(1): 17-40.
- Wong, M. Y. Z., R. E. K. Man, et al. (2018). "Dietary intake and diabetic retinopathy: A systematic review." *PLoS One* **13**(1): e0186582.
- Wong, S. K., K. Y. Chin, et al. (2016). "Animal models of metabolic syndrome: a review." *Nutr Metab (Lond)* **13**: 65.
- Wong, W. L., X. Su, et al. (2014). "Global prevalence of age-related macular degeneration and disease burden projection for 2020 and 2040: a systematic review and meta-analysis." *Lancet Glob Health* **2**(2): e106-116.
- Woodie, L. and S. Blythe (2017). "The differential effects of high-fat and high-fructose diets on physiology and behavior in male rats." *Nutr Neurosci*: 1-9.
- Wu, M., Y. Guo, et al. (2016). "Association of Two Polymorphisms, rs1061170 and rs1410996, in Complement Factor H with Age-Related Macular Degeneration in an Asian Population: A Meta-Analysis." *Ophthalmic Res* **55**(3): 135-144.
- Xian, W., Y. Wu, et al. (2016). "The pro-resolving lipid mediator Maresin 1 protects against cerebral ischemia/reperfusion injury by attenuating the pro-inflammatory response." *Biochem Biophys Res Commun* **472**(1): 175-181.
- Yamauchi, T. and T. Kadowaki (2013). "Adiponectin receptor as a key player in healthy longevity and obesity-related diseases." *Cell Metab* **17**(2): 185-196.
- Yamauchi, T., J. Kamon, et al. (2003). "Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects." *Nature* **423**(6941): 762-769.
- Yang, Y. H., Y. Q. Liu, et al. (2015). "Genetic polymorphisms of the TNF-alpha-308G/A are associated with metabolic syndrome in asthmatic patients from Hebei province, China." *Int J Clin Exp Pathol* **8**(10): 13739-13746.
- Yonemura, D., Y. Masuda, et al. (1963). "The oscillatory potential in the electroretinogram." *Jpn J Physiol* **13**: 129-137.
- Young, R. W. (1967). "The renewal of photoreceptor cell outer segments." *J Cell Biol* **33**(1): 61-72.
- Young, R. W. (1971). "The renewal of rod and cone outer segments in the rhesus monkey." *J Cell Biol* **49**(2): 303-318.
- Yu, K., W. Bayona, et al. (1995). "Differential activation of peroxisome proliferator-activated receptors by eicosanoids." *J Biol Chem* **270**(41): 23975-23983.
- Yudkin, A. M. (1931). "The Presence of Vitamin A in the Retina." *Trans Am Ophthalmol Soc* **29**: 263-272.

- Yurko-Mauro, K., J. Kralovec, et al. (2015). "Similar eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid plasma levels achieved with fish oil or krill oil in a randomized double-blind four-week bioavailability study." Lipids Health Dis **14**: 99.
- Zemski Berry, K. A., W. C. Gordon, et al. (2014). "Spatial organization of lipids in the human retina and optic nerve by MALDI imaging mass spectrometry." J Lipid Res **55**(3): 504-515.
- 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, H. Y., J. Y. Wang, et al. (2013). "Serum lipids and other risk factors for diabetic retinopathy in Chinese type 2 diabetic patients." J Zhejiang Univ Sci B **14**(5): 392-399.
- Zhang, J., S. Upala, et al. (2017). "Relationship between vitamin D deficiency and diabetic retinopathy: a meta-analysis." Can J Ophthalmol **52**(2): 219-224.
- Zhang, K., M. Kniazeva, et al. (2001). "A 5-bp deletion in ELOVL4 is associated with two related forms of autosomal dominant macular dystrophy." Nat Genet **27**(1): 89-93.
- Zhang, M. J. and M. Spite (2012). "Resolvins: anti-inflammatory and proresolving mediators derived from omega-3 polyunsaturated fatty acids." Annu Rev Nutr **32**: 203-227.
- Zhang, X., J. B. Saaddine, et al. (2010). "Prevalence of diabetic retinopathy in the United States, 2005-2008." JAMA **304**(6): 649-656.
- Zhang, Y., R. Proenca, et al. (1994). "Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue." Nature **372**(6505): 425-432.
- Zhong, Y., J. Li, et al. (2012). "Activation of endoplasmic reticulum stress by hyperglycemia is essential for Muller cell-derived inflammatory cytokine production in diabetes." Diabetes **61**(2): 492-504.
- Zhou, W., W. Yu, et al. (2011). "The role of SLIT-ROBO signaling in proliferative diabetic retinopathy and retinal pigment epithelial cells." Mol Vis **17**: 1526-1536.