Université de Bourgogne Franche-Comté

Ecole Doctorale Environnement – Santé

Thèse de doctorat

Pour l'obtention du grade de :

Docteur de l'Université de Bourgogne Franche-Comté

Discipline : Biochimie – Biologie moléculaire

Régulation nutritionnelle du métabolisme des plasmalogènes dans les cellules gliales rétiniennes : impact sur le développement vasculaire rétinien au cours de la rétinopathie du prématuré.

Rémi Karadayi

Directeur de thèse : **Niyazi Acar**

Présentée et soutenue publiquement le 25 mai 2021

Devant un jury composé de :

Mme Sophie Layé	Directrice de Recherche, INRAE, Nutrineuro, Bordeaux	Rapportrice
M. Florian Sennlaub	Directeur de Recherche, INSERM, UMR968, Institut de la Vision, Paris	Rapporteur
Mme Nathalie Rouach	Directrice de Recherche, INSERM U1050, Collège de France, Paris	Examinatrice
M. Pascal Degrace	Professeur d'Université, INSERM, UMR1231 LNC, Dijon	Examinateur
M. Alain M. Bron	Professeur d'Université-Praticien Hospitalier, CHU Dijon	Examinateur
M. Xavier Fioramonti	Chargé de Recherche, INRAE, Nutrineuro, Bordeaux	Invité
M. Niyazi Acar	Directeur de Recherche, INRAE, CSGA, Dijon	Directeur de thèse

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury pour avoir accepté d'évaluer cette thèse de doctorat. Les Dr. Sophie Layé et Florian Sennlaub, pour avoir accepté d'être rapporteurs. Les Dr. Nathalie Rouach, Xavier Fioramonti, les Pr. Alain Bron et Pascal Degrace pour avoir accepté d'en être examinateurs. C'est un véritable honneur d'avoir la chance de présenter les résultats de mes travaux devant un jury d'experts reconnus dans chacun de vos domaines respectifs.

Je souhaite tout particulièrement remercier le Dr. Niyazi Acar pour avoir accepté d'encadrer cette thèse. Merci à toi Niyazi, sincèrement. Merci d'avoir su m'accompagner dans cette aventure que représente la thèse, d'avoir été toujours présent lorsque c'était nécessaire. Merci de m'avoir laissé la liberté d'explorer ce sujet au gré de mes hypothèses, tout en ayant su me maintenir dans le cadre de l'objectif initial (ce qui ne fut peut-être pas de tout repos, je le reconnais...). Merci pour tes conseils, scientifiques comme personnels. Merci pour ta confiance depuis le début de ce projet. J'espère te l'avoir rendue tout au long de notre collaboration. Si cette thèse a pu aboutir, c'est aussi grâce à toi.

J'adresse également des remerciements particuliers à Michel Narce et à Xavier Fioramonti, qui ont toujours été encourageants et de bon conseil au cours de mes comités de suivi de thèse.

Merci à toute l'équipe 6 « Œil, nutrition et signalisation cellulaire ». Merci de m'avoir accueilli et intégré à cette petite famille. Difficile de rêver meilleur environnement pour réaliser sa thèse. Merci à Bénédicte (Culbuto) et à Laurent (Général Leclère) de m'avoir épaulé sur les cultures cellulaires (les grosses Müller s'en souviendront), dissections, western-blots et qPCR à rallonge... Merci à Stéphane (petit père Grégoire) et Lucy (Dame Lucy) de m'avoir aidé sur les analyses de lipides, en plus d'être les maitres incontestés du café. Merci à Elisabeth (Elise pas bête) de m'avoir formé et aidé à l'immunohistochimie. Grâce à toi je peux désormais ajouter de super images à mes publis ! Merci à toi Marie-Agnès, qui a toujours accepté avec enthousiasme de répondre à mes interrogations lorsque mes travaux sortaient de mon champ de compétence. Merci également à Elodie et à Ségolène, aussi bien pour votre bonne-humeur que vos encouragements respectifs. Merci à Alain pour ton expertise, ton expérience, tes conseils avisés et ton aide sur la relecture du manuscrit de thèse comme des articles scientifiques.

Un grand merci à tous les doctorants de l'équipe, passés comme présents. Merci à Elisa, Elise et Mayssa d'avoir accueilli un tel intrus dans ce bureau originalement féminin. Vous êtes finalement parties chacune votre tour avec votre doctorat en poche et n'avons pas pu poursuivre la cohabitation dans ce si charmant bureau des thésards (RIP les poissons), mais ce n'est pas la longueur du temps partagé qui en fait la qualité. Bien qu'étant désormais chacune tournée vers de nouveaux horizons, j'espère que l'on aura l'occasion de se retrouver, pour boire une bière ou même collaborer, qui sait ? Merci également aux nouveaux thésards Glenda (Geuveu) et Jean-Baptiste (Yeubeu) (déjà en 2e année maintenant...). Merci de nous faire rire au quotidien, d'avoir partagé les DAPAT pour J-B et de nous apprendre l'albanais pour Glenda ! Merci aux intrus Maria (De l'impasse), Clément (Nini) et Marine (Biloute) de nous suivre dans nos bêtises. Bon courage pour la suite, je suis convaincu que vous réaliserez tous de superbes thèses. Avec un peu de chance on aura même l'occasion de fêter ça si Monsieur Covid le veut bien...

Merci à l'équipe Chemosens, avec qui nous partageons le couloir. Merci à toi Olivier pour ton aide sur les divers projets où nous avons eu l'occasion de collaborer. Merci à Géraldine de me supporter depuis le Master 2 (ça commencerait presque à faire loin...). On aura peut-être même la chance de se recroiser au Hellfest s'il est de nouveau autorisé un jour. Merci à Stéphanie, Karine et Isabelle d'avoir été mes principales fournisseuses d'azote liquide pendant cette thèse et de vous joindre à nous aux pauses café chaque fois que vous le pouvez.

Je remercie chaleureusement Loïc et Christine, qui nous ont permis de mettre en place certaines expériences grâce à leur expertise scientifique et technique. Merci également à Fabrice, qui est toujours de bon conseil. Et plus généralement merci à tous les résidents de l'étage du dessous : Lucie, Marine, Mathilde, Franck et Véronique pour votre sympathie et tous les échanges que nous avons pu avoir au cours de ces 3 ans demi maintenant. Merci au néo-bureau de la perdition pour tous les moments de convivialité et les débats : Manon (la twitcheuse), Jeanne (au secours), Margot (schtroumpfette), Elodie (Dora) et Rémy (la némésis qui ne figure pas dans le calendrier). Bon courage pour la suite de vos thèses et carrières respectives, on aura peut-être l'occasion de se recroiser en congrès... ou autour d'un verre (ou plus) !

Mille mercis à l'équipe PADYS : Pascal Degrace, Tony Jourdan, Julia Leemput et Chloé Buch. Votre aide m'a été très précieuse, et ce fut un véritable plaisir de travailler avec vous sur ce beau projet. Avec un peu de chance nous aurons l'occasion de poursuivre cette collaboration prometteuse.

Merci à toute l'animalerie, et plus particulièrement à Laurence, Anne et Patrick pour votre aide tout au long de ces trois ans et demi. La tâche n'a pas toujours été facile et je vous en suis d'autant plus reconnaissant.

Un énorme merci à toute la fine équipe des autres thésards déjà docteurs (ou presque) : Aline, Karen, Laurie, Thomas et Tristan. Merci pour tous les moments que nous avons partagés : les sorties, les restaus, les soirées, les soutenances... Bref tous ces trucs cools dont on ne peut actuellement plus profiter. J'espère qu'on aura l'occasion de se retrouver pour fêter ça comme il se doit une fois cette période dernière nous.

Je souhaite maintenant remercier ma famille et mes amis.

Je vais tout d'abord profiter de ces quelques lignes pour remercier mes parents comme il se doit. Maman, papa, si j'ai pu arriver jusque-là, c'est surtout à vous que je le dois. Vous m'avez toujours soutenu et encouragé dans mes choix, quels qu'en soit le prix ou les conséquences. Cette thèse, c'est aussi le fruit de vos investissements, et j'espère vous en rendre fiers. Merci infiniment, merci pour tout.

Merci également à mes grands-parents. Mamie, papy, j'ai toujours pu compter sur votre soutien inconditionnel, et c'est aussi grâce à vous si j'ai pu mener à bien mon cursus secondaire. Je ne saurai suffisamment vous remercier pour vous témoigner toute ma gratitude. C'est que l'INRA serait presque devenu une affaire de famille !

Comment ne pas remercier mon frère. Denis, j'ai toujours pu compter sur toi et ton soutien, et pour cela je t'en serai toujours reconnaissant. Je suis par ailleurs heureux que tu aies arrêté STAPS pour te rediriger dans la filière des sciences de la biologie (j'ai toujours su que j'étais ton modèle caché). Vadrouillant parmi les terres scandinaves depuis l'an dernier, j'ai hâte que tu nous reviennes et que l'on puisse se retrouver plus régulièrement (pour te poutrer à Warhammer notamment). Tu es promis à un avenir brillant et j'espère pouvoir te transmettre le flambeau de la thèse. Qui sait, nos compétences s'avéreront peut-être complémentaires et nous aurons même l'occasion de collaborer.

Un immense merci à toute l'équipe du G4. Allan et Elo les kanaks qui m'ont abandonné à Dijon, Antoine et Océane les néo-colons, Méven et Youna (Captain et You), Antoine et Charlène (ou Bouliche et Chax) les sudistes, Nathan mon plus fidèle coéquipier aka le Kid, Anne-So la cousine du bled (Bachar pour les intimes), Margot et Jérôme nos alsaciens préférés (malgré le crossfit), Anaïs la présidente, Arnaud le lyonnais du Nord, sans oublier Samuel et les autres bébés à venir. Plus que des amis, vous êtes une véritable deuxième famille, et si j'ai pu aller bout avec (presque) toute ma tête,

c’est aussi grâce à vous et à tous les moments que nous avons pu passer ensemble, malgré les départs successifs du QG Dijonnais (traitres). J’ai hâte que cette parenthèse covid soit passée pour que l’on puisse à nouveau se retrouver et fêter ça dignement. Ne changez surtout jamais.

Remerciements particuliers à toi Mehdi, ainsi qu’à Linda. En tant que fan de la première heure, tu as toi aussi droit à une place de choix dans ma considération. J’ai toujours pu compter sur toi, et j’espère pouvoir te le rendre. Merci à tous les deux pour votre accueil, c’est toujours un immense plaisir de vous retrouver. On devrait maintenant avoir l’occasion de renouveler ça plus souvent, que ce soit pour un café ou un nouveau concert (en fosse) !

Merci à Vince et Flo. Il est déjà loin le temps de la VGA, mais nous avons réussi à rester en contact et vous avez toujours su me témoigner votre confiance. Maintenant que je reviens dans le berceau parisien, on pourra enfin se voir plus de deux fois par an...

Merci à Jean (Monsieur Brick) et Fred (Fwed). Plus que des compères d’entrainement, vous êtes de véritables amis et l’une des raisons pour lesquelles j’ai tant apprécié mon séjour dijonnais. J’espère vous retrouver aussi souvent que possible, à Dijon ou ailleurs (au Japon à tout hasard ?).

Je tiens à adresser quelques mots à M. Renard. Je ne sais pas si j’aurai la chance de vous compter parmi le public de la soutenance, mais je vous serai éternellement reconnaissant d’avoir formé le jeune padawan que je fus, et d’avoir finalement presque été un mentor. Vous pouvez considérer votre tâche accomplie, et nous voilà donc désormais quittes Martial !

Merci à Games Wokshop, Sony, CD Projekt Red et Sabaton d’avoir su me distraire et me maintenir à flots pendant cette thèse. On sous-estime trop souvent les bienfaits que peuvent avoir quelques heures de hobby.

Je voudrais également remercier Xavier Guillonneau. Merci de m’avoir permis de réaliser des manips complémentaires en m’accueillant au sein de ton équipe, et surtout merci de me faire confiance pour le post-doctorat. J’ai hâte de poursuivre sur ce beau projet à l’Institut de la Vision.

Petite mention spéciale au pangolin, à la chauve-souris ou à n’importe quelle bestiole que ce fut pour avoir tenté de mettre le bazar dans toutes les thèses en cours. Nous sommes nombreux à ne pas avoir pu profiter d’une soutenance en bonne et due forme, et je souhaite que cette parenthèse se referme le plus vite possible pour que tous les thésards, et à plus large échelle, que tous les laboratoires puissent reprendre une activité normale.

Enfin, je remercie l'INRAE et la Région Bourgogne Franche-Comté pour avoir financé cette thèse.

Table des matières

Remerciements 3
Liste des figures 10
Liste des abréviations 13
Introduction 16
Chapitre 1 : Bibliographie 18
I. L'Œil, un organe particulier 18
A. Présentation et anatomie générale de l'œil 18
B. Les milieux transparents 21
C. Les tuniques 22
II. La rétine 24
A. Origine embryologique, développement et organisation structurale 24
B. Types cellulaires 30
1. L'épithélium pigmentaire rétinien 30
2. Les cellules neurales 31
3. Les cellules gliales 33
C. Vascularisation et angiogenèse 48
1. Mécanismes physiologiques 49
2. Mécanismes pathologiques 55
3. La rétinopathie du prématuré (ROP) 59
III. Plasmalogènes 73
A. Propriétés générales et classification 73
B. Distribution biologique, rétinienne et cellulaire 74
C. Métabolisme 74
1. Biosynthèse 74
2. Régulation et turnover 77
D. Rôles fonctionnels des plasmalogènes 79
1. Propriétés antioxydantes 79
2. Structure et dynamique membranaire 80
3. Signalisation cellulaire 81
4. Autres rôles 86
E. Régulation du développement vasculaire rétinien et implications dans la ROP 86
IV. La communication intercellulaire par jonction gap 89

A. Définition, structure et organisation 89
B. La connexine 43 91
1. Synthèse et adressage membranaire 92
2. Régulation du turnover 92
C. La communication intercellulaire par voie calcique 94
1. Génération du message 94
2. Propagation du message 97
3. Rôles physiologiques et régulation en contexte pathologique 100
Objectifs et enjeux de la thèse 102
Chapitre 2 : Rôle des plasmalogènes dans la physiologie des cellules de Müller 103
Chapitre 3 : Rôle des plasmalogènes dans le développement vasculaire rétinien – intérêt potentiel d'un apport nutritionnel en précurseurs de plasmalogènes 141
Chapitre 4 : Rôle des plasmalogènes dans le développement vasculaire rétinien – le système endocannabinoïde, un nouvel acteur ? 163
Chapitre 5 : Plasmalogènes, AGPIs et ROP – l'étude OmegaROP 179
Chapitre 6 : Discussion générale et perspectives de la thèse 199
Références bibliographiques 208
Résumé - Abstract 251

Liste des figures

Figure 1 : Représentation théorique du développement et de la complexification de l'œil au cours de l'évolution 18

Figure 2 : Représentation schématique de l'œil humain et de ses structures 19

Figure 3 : Développement embryonnaire de la rétine 23

Figure 4 : Représentation schématique de l'ordre d'apparition temporel des cellules rétiniennes 25

Figure 5 : Illustration de la mosaïque rétinienne chez la souris 26

Figure 6 : Organisation laminaire de la rétine et répartition des types cellulaires au sein des différentes couches rétiniennes 27

Figure 7 : Représentation schématique de la rétine et de ses principales composantes macroscopiques 28

Figure 8 : Distribution et morphologie des cellules microgliales rétiniennes 34

Figure 9 : Représentation schématique des mécanismes de l'activation des cellules microgliales 35

Figure 10 : Morphologie et localisation rétinienne des cellules de Müller 37

Figure 11 : Marquages immunohistochimiques des cellules de Müller au cours du développement de la rétine 37

Figure 12 : Morphologie des cellules de Müller en fonction de leur localisation topographique et de l'espèce animale 39

Figure 13 : Représentation schématique du métabolisme glycolytique de la cellule de Müller et des échanges avec les neurones 41

Figure 14 : Représentation schématique du recyclage du glutamate neuronal par les cellules de Müller 42

Figure 15 : Morphologie astrocytaire 43

Figure 16 : Migration des astrocytes au cours du développement de la rétine et mise en place du réseau astrocytaire 45

Figure 17 : Caractéristiques et variations morphologiques des astrocytes selon l'espèce animale 46

Figure 18 : Représentation schématique du réseau vasculaire hyaloïdien 48

Figure 19 : Structure vasculaire rétinienne 50

Figure 20 : Développement centrifuge du réseau vasculaire rétinien de la souris 52

Figure 21 : Rôle de la trame astrocytaire dans le développement vasculaire rétinien 53

Figure 22 : Représentation schématique de l'implication des cellules de Müller dans les mécanismes pathologiques de néovascularisation et de perturbation de la barrière hémato-rétinienne 55

Figure 23 : Représentation schématique de la régulation de HIF 57

Figure 24 : Caractérisation des anomalies vasculaires rétiniennes au cours de la ROP 61

Figure 25 : Influence de l'âge gestationnel et du poids de naissance sur la probabilité de développer la ROP 63

Figure 26 : Probabilité de développer la ROP en fonction des taux d'IGF-1 et du sepsis néonatal..... 66

Figure 27 : Représentation schématique de la pathogenèse de la ROP 71

Figure 28 : Structure moléculaire des glycérophospholipides et de leurs sous-catégories à liaison éther et vinyl-éther 72

Figure 29 : Représentation schématique de la voie de biosynthèse des plasmalogènes de type éthanolamine (pPE) et choline (pPC) au sein du peroxysome et du réticulum endoplasmique (RE) ... 75

Figure 30 : Impact des plasmalogènes dans l'organisation moléculaire de la bicouche lipidique 80

Figure 31 : Représentation schématique du mécanisme d'action de la signalisation cellulaire liée à la libération du DHA depuis les plasmalogènes (PLS) 82

Figure 32 : Caractérisation des anomalies des réseaux vasculaires rétinien et astrocytaire de la souris déficiente en plasmalogènes (DAPAT$^{-/-}$) 86

Figure 33 : Structure des jonctions gap et de leurs unités constitutives, les connexines..... 89

Figure 34 : Représentation schématique du turnover de la connexine 43 (Cx43) 92

Figure 35 : Représentation schématique des mécanismes de génération d'une réponse calcique en fonction des stimuli, et de l'activation consécutive des voies de signalisation intracellulaire..... 94

Figure 36 : Enregistrement expérimental d'une vague calcique astrocytaire. 97

Figure 37 : Importance de différents paramètres sur la propagation de la vague calcique..... 98

Figure 38 : Stimulation expérimentale de la communication intercellulaire par voie calcique (GJIC) des cellules de Müller 98

Figure 39 : Représentation schématique des différents modes de propagation du signal calcique au sein des cellules gliales de la rétine..... 99

Figure 40 : Expression relative des gènes codant pour les protéines du cytosquelette des cellules de Müller 136

Figure 41 : Expression relative des gènes codant pour les différentes connexines dans les cellules de Müller 137

Figure 42 : Cinétique de phosphorylation des voies de signalisation intracellulaire dans les cellules de Müller à la suite d'un stimulus ATP 138

Figure 43 : Impact de la transfection et de la supplémentation en AKG sur le statut en AGPIs des cellules de Müller in vitro 139

Figure 44 : Impact de la déplétion en plasmalogène des cellules de Müller sur l'expression de gènes impliqués dans les mécanismes de l'angiogenèse pathologique suite à un stimulus pro-inflammatoire induit par l'IL-1β 160

Figure 45 : Validation de la méthode d'extraction et de quantification relative des endocannabinoïdes dans la rétine de souris 177

Figure 46 : Comparaison préliminaire du niveau des principaux endocannabinoïdes dans la rétine et le cerveau de la souris DAPAT 177

Figure 47 : Schéma général : rôle des plasmalogènes dans la physiologie des cellules gliales rétiniennes et implications pour le développement vasculaire rétinien 205

Liste des abréviations

2-AG : 2-arachidonoylglycérol

α-ClFALD : aldehyde gras alpha-chloré (alpha-chlorinated fatty aldehyde)

AA : acide arachidonique

ADAPS : alkyldihydroxyacetonephosphate synthase

AEA : anandamide (N-arachidonoylethanolamide)

AKG : alkylglycérol

AGPI : acide gras polyinsaturé

ANGPT1 : angiopoïétine 1

ANGPT2 : angiopoïétine 2

ANGPTL4 : angiopoietin-like 4

AQP4 : aquaporine 4

ATP : adénosine triphosphate

bFGF : basic fibroblast growth factor

CRALBP : C-retinaldehyde binding protein

DHA : acide docosahexaenoïque

DHAPAT : dihydroxyacetonephosphate acyltransferase

EPR : epithélium pigmentaire rétinien

CaMKII : calmoduline kinase 2

Cav-1 : cavéoline 1

CB1R : récepteur-1 aux cannabinoïdes (cannabinoid receptor type 1)

CB2R : récepteur-2 aux cannabinoïdes (cannabinoid receptor type 2)

CK1 : créatine kinase 1

COX-2 : cyclooxygénase-2

Cx : connexine

DAG : diacylglycérol

EAAT : transporteur des acides aminés excitateurs (excitatory amino acid transporter)

ERG : électrorétinogramme

ET-1 : endothéline-1

FAR-1 : fatty acyl-coa réductase 1

GLUT : transporteur du glucose

HIF-1α : hypoxia inducible factor-1α

HIF-2α : hypoxia inducible factor-2α

Iba1 : ionized calcium-binding adapter molecule 1

GABA : acide gamma-amino butyrique

GFAP : protéine fibrillaire acide de la neuroglie (glial fibrillary acidic protein)

GJIC : communication intercellulaire par junction gap (gap junction intercellular communication)

GS : glutamine synthetase

IGF-1 : insulin-like growth factor-1

IL-1β : interleukine-1β

IL-6 : interluekine-6

ILB4 : isolectine B4

INL : couche nucléaire interne de la rétine

IP3 : inositol triphosphate

IP3R : récépteur à l'inositol triphosphate

IPL : couche plexiforme interne de la rétine

Kir4.1 : inwardly Rectifying Potassium Channel

LC-MS/MS : spectrométrie de masse en tandem

MAPK : mitogen-associated protein kinase

MCP-1 : monocyte chemoattractant protein-1

MMP : matrix metalloprotéinase

NFkB : nuclear factor-kappa B

ONL : couche nucléaire externe de la rétine

OPL : couche plexiforme externe de la rétine

$iPLA_2$: phospholipase A2 calcium-indépendante

PLA_2 : phospholipase A2

pPC : plasménylcholine

pPE : plasménylléthanolamine

P2YR : récepteur P2Y

PAX2 : paired Box 2

PDGF : facteur de croissanceplatelet-derived growth factor

PEDF : pigment epithelium-derived factor

PGE-2 : prostaglandine E-2

PIP2 : phosphatidylinositol biphosphate

PKA : protéine kinase A

PKB : protéine kinase B (Akt)

PKC : protéine kinase C

PLC : phospholipase C

PPAR : peroxisome proliferator-activated receptor

rhIGF : IGF-1 recombinant humain

rhIGFBP : recombinant humain de la protéine de liaison de l'IGF-1

RCPG : pécepteur couple aux proteins G

RGC : cellules ganglionnaires rétiniennes

ROP : rétinopathie du prématuré

ROS : espèces réactives de l'oxygène

RPC : cellules progénitrices rétiniennes

RTK : récepteur à tyrosine kinase

RXR : retinoid X receptor

sEC : système endocannabinoïde

SOX2 : SRY (sex determining region Y)-box 2

TGF-β : transforming growth factor-beta

TNF-α : tumor-necrosis factor-alpha

TSP-1 : thrombosporin-1

VEGF : vascular endothelial growth factor

VPC : cellules progénitrices vasculaires

ZO-1 : zonula occludens-1

Introduction

Depuis l'antiquité, l'Homme s'interroge sur la vision, cette capacité singulière qui lui permet d'apprécier et d'interagir avec son environnement. De Platon à Euclide, en passant par Galien et Avicenne, les plus grands penseurs et scientifiques de chaque civilisation n'ont eu de cesse de tenter de percer les mystères de l'œil et de ses capacités. Ce n'est qu'au 11ème puis au 17 ème siècle qu'Alhacen et Kepler théorisèrent respectivement les bases modernes de l'optique. Il aura ensuite fallu attendre le 19ème siècle pour que les avancées scientifiques mettent en lumière la nature intrinsèque de l'œil et son organisation tissulaire, avec comme point d'orgue la théorisation de l'évolution des espèces par Charles Darwin. Nous savons aujourd'hui que c'est la rétine qui est responsable de l'intégration de l'information lumineuse en signal électrique (phototransduction), qui sera ensuite véhiculé jusqu'au cerveau par le nerf optique et interprété dans les aires cérébrales en charge du traitement de l'information visuelle. Fruit d'une aventure évolutive de plusieurs centaines de millions d'années, la rétine est un tissu neurosensoriel complexe hautement spécialisé, dont les atteintes pathologiques peuvent altérer les capacités visuelles de l'individu, voire conduire à la cécité. Parmi ces dernières, figurent notamment les rétinopathies à composante vasculaire comme la rétinopathie du prématuré (ROP). Selon les études et les régions du globe concernées, la prévalence de la ROP est estimée entre 10 et 30% des naissances prématurées, et constitue la première cause de cécité infantile. Si certains facteurs de risque comme l'hyperoxygénation, un faible poids de naissance ou le degré de prématurité sont bien décrits, la persistance de la pathologie malgré l'amélioration de sa prise en charge suggère l'existence d'autres mécanismes physiopathologiques.

Afin d'étendre notre compréhension de la pathologie, de nombreuses études sont menées sur les mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans la régulation de l'angiogenèse rétinienne. Parmi ces derniers, les études montrent que les cellules gliales de la rétine, les astrocytes et les cellules de Müller, jouent un rôle de premier plan. Véritables piliers de la physiologie rétinienne, ces dernières sont notamment virtuellement impliquées dans toutes les fonctions de la rétine : maintien de l'homéostasie, organisation de la structure et de l'architecture rétinienne, régulation de la neurotransmission, recyclage des déchets métaboliques, ou encore leur activité pro- et anti-inflammatoires en fonction des stimuli qui leur parviennent. S'il est difficile d'évaluer directement chez le prématuré l'implication exacte de ces cellules dans la physiopathologie de la ROP, les modèles animaux de ROP nous apportent un éclairage crucial quant à leurs rôles respectifs. Les astrocytes sont ainsi capables de moduler directement le réseau vasculaire rétinien par leur

étroite interaction avec les cellules endothéliales vasculaires, tandis que les cellules de Müller apparaissent comme les chefs d'orchestre de la symphonie inflammatoire et pro-angiogénique de la rétine. Par ailleurs, les études récentes suggèrent que les cellules de Müller seraient la plaque tournante du métabolisme des lipides dans la rétine, y compris celui lié aux plasmalogènes. Les plasmalogènes sont une sous-catégorie particulière de phospholipides membranaires appartenant à la famille des éther-lipides, et sont impliqués dans de nombreuses fonctions cellulaires, notamment par leur rôle de réservoir d'acides gras polyinsaturés (AGPIs). Or, les modèles animaux de déficience en plasmalogènes, comme la souris DAPAT$^{-/-}$, montrent des anomalies majeures du développement et de la fonction oculaire, dont une altération du développement vasculaire rétinien présentant des similitudes avec la ROP.

Partant de ce constat, nous avons souhaité étudier à travers cette thèse l'implication du métabolisme des plasmalogènes dans les cellules et nous avons tenté d'en évaluer les conséquences pour la physiopathologie de la ROP. En conséquence, nous avons tout d'abord travaillé sur des modèles cellulaires *in vitro* afin de déterminer les fonctions régulées par les plasmalogènes dans les cellules gliales (chapitre 2). Dans un deuxième temps, nous avons souhaité étendre notre compréhension des mécanismes impliqués dans la mise en place des anomalies du développement vasculaire rétinien de la souris DAPAT$^{-/-}$, tout en cherchant à établir une stratégie de prévention nutritionnelle par une supplémentation nutritionnelle orale en précurseurs de plasmalogènes (alkylglycérols) (chapitre 3 et 4). Enfin, fort de nos résultats réaffirmant l'hypothèse d'un rôle des plasmalogènes dans le contrôle des altérations pathologiques du développement vasculaire rétinien, nous avons décidé de valoriser ce travail par l'évaluation du profil érythrocytaire de prématurés humains en plasmalogènes ainsi qu'en AGPIs, dont les plasmalogènes constituent le réservoir biologique, afin de vérifier l'existence de possibles corrélations avec le développement de la ROP (chapitre 5).

L'intégralité de ces résultats et leurs perspectives font finalement l'objet d'une discussion générale dans la dernière partie de cette thèse (chapitre 6).

Chapitre 1 : Bibliographie

I. L'Œil, un organe particulier

A. Présentation et anatomie générale de l'œil

- Vision, œil et évolution - Introduction

La vision se définit comme étant la capacité à percevoir des signaux lumineux et à les intégrer. Cette faculté constitue un sens à part entière, et l'œil en est un des éléments médiateurs. Bien que possédant une fonction commune, l'œil a évolué sous de nombreuses formes et possède une grande hétérogénéité au sein du règne animal, avec des caractéristiques morphologiques et fonctionnelles propres à chaque espèce. Ainsi, si certaines espèces sont tout juste capables de distinguer lumière et obscurité, d'autres sont à même de déceler des couleurs, de percevoir des spectres lumineux tels que les ultraviolets et les infrarouges, ou encore d'avoir une vision en trois dimensions du monde environnant. Si cette capacité est apparue et a perduré, c'est qu'elle représentait un avantage évolutif. En effet, la possibilité de voir et donc d'analyser son environnement direct est un atout certain et ce à bien des égards, puisque cela permet d'influencer de nombreuses fonctions essentielles pour la survie de l'espèce, telles que la recherche de nourriture ou encore d'un partenaire pour la reproduction. Dans le règne animal, on estime ainsi que 95% des espèces sont dotées de capacités visuelles (de Queiroz, 1999; Fernald, 2004). Mais comment définir l'œil, cet organe si particulier ? Selon certains auteurs, la présence d'au moins une cellule photoréceptrice interagissant avec des cellules pigmentaires (ou une cellule possédant elle-même ces deux caractéristiques), permettant la détection d'une source lumineuse peut suffire pour parler d'œil (Arendt and Wittbrodt, 2001). Pour d'autres, la capacité à détecter une source de lumière ne peut suffire, et l'organe doit être capable de produire une image, quelle qu'en soit la précision, afin de définir un œil à proprement parler (Piatigorsky, 2008; Land and Nilsson, 2012). Si cette définition fait toujours débat au sein de la communauté scientifique, cette dernière semble mieux s'accorder quant à son origine temporelle. En effet, les capacités visuelles découlent notamment de l'apparition d'une opsine, protéine photosensible, chez un ancêtre commun il y a plus de 700 millions d'années (Lamb, 2013), tandis que les premières ébauches d'organes luminosensibles fonctionnels seraient apparues il y a un peu plus de 500 millions d'années au cours du Cambrien, période aussi connue sous le terme de « big bang de l'évolution » (Lamb, 2013; Nilsson, 2013). Les prémices de cette période furent notamment marquées par une augmentation significative de la quantité de lumière parvenant à la

surface terrestre (Parker, 2003). Ces phénomènes ont ainsi conduit à introduire la théorie du « light switch » dans l'évolution de l'œil, proposant ainsi la lumière comme facteur central de l'apparition de cet organe (Parker, 2003). Au cours du temps, les premières ébauches d'organes photosensibles, qui n'étaient capables de distinguer uniquement l'absence ou la présence de lumière (niveau de complexité I), ont évolué en acquérant de nouveaux caractères morphologiques, permettant d'ajouter de nouveaux degrés de complexification à l'information visuelle **(Figure 1)**. Sont ainsi apparues successivement la capacité de distinguer la direction de la source lumineuse grâce aux pigments filtrants et aux premiers repliements membranaires (niveau de complexité II), puis la vision directionnelle à faible résolution (niveau de complexité III) avec le repliement structural des organes oculaires. L'apparition d'éléments convergents (tels que la cornée et le cristallin chez l'Homme par exemple) a enfin permis l'émergence de la vision à haute résolution (niveau de complexité IV).

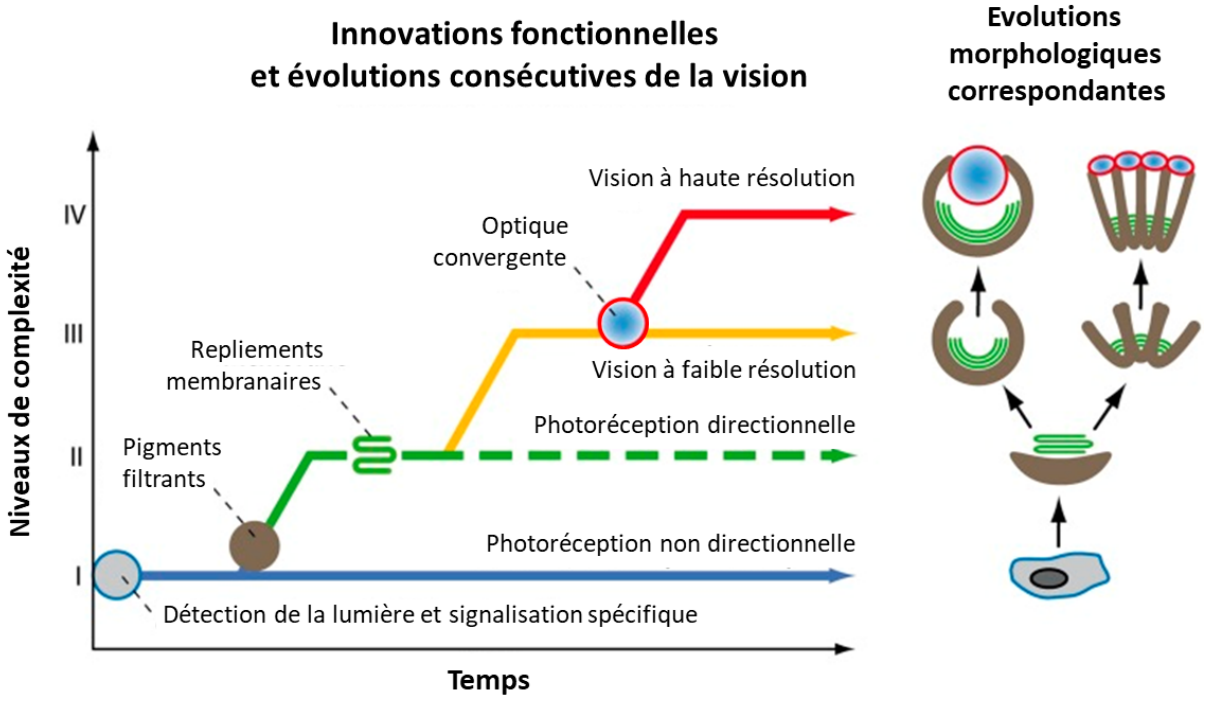

Figure 1 : Représentation théorique du développement et de la complexification de l'œil au cours de l'évolution. L'apparition de nouvelles structures oculaires au cours de l'évolution des espèces a permis une complexification graduelle des fonctions visuelles, classées en quatre catégories : la photoréception non directionnelle (niveau de complexité I), la photoréception directionnelle (niveau de complexité II), la vision à faible résolution (niveau de complexité III), et enfin la vision à haute résolution (niveau de complexité IV). Adapté de Nilsson (2013).

- Chez l'Homme (*Homo sapiens sapiens*)

Comme pour toutes les espèces vertébrées, l'être humain possède une paire d'yeux, distribués de manière symétrique sur le crâne dans un plan sagittal. Ils sont logés au sein d'une cavité osseuse de la boite crânienne appelée orbite, et protégés par les paupières. La mobilité de l'œil est possible par l'intermédiaire de muscles dits oculomoteurs, et la présence de glandes lacrymales lui assure une hydratation constante. Il est constitué de trois enveloppes -ou tuniques- opaques et hétérogènes, isolant ainsi le globe oculaire du milieu extérieur : l'enveloppe externe (ou sclérotique ; également appelée sclère), l'enveloppe moyenne (ou tunique uvéale) et interne (ou nerveuse) **(Figure 2)**. Le passage des rayons lumineux jusqu'à la rétine est garanti par la présence de milieux transparents et homogènes, dans un axe antéro-postérieur : la cornée, l'humeur aqueuse, le cristallin et le corps vitré. Ainsi, selon cet axe antéro-postérieur, on peut diviser le globe oculaire en 2 segments distincts :

- le segment antérieur ; constitué de la cornée, de la chambre antérieure (située en avant de l'iris), de l'iris, de la chambre postérieure (à l'arrière de l'iris), du cristallin et des corps ciliaires. Il est rempli d'un liquide transparent produit par les corps ciliaires, l'humeur aqueuse. Ce liquide circule de manière permanente entre les deux chambres du segment antérieur par la pupille, et permet de pourvoir aux besoins métaboliques de la cornée tout en maintenant la pression intraoculaire. L'humeur aqueuse est éliminée dans l'angle iridocornéen par le trabeculum ;

- le segment postérieur : situé à l'arrière du cristallin, il comprend la sclère, la choroïde, la rétine et contient le corps vitré, un autre milieu transparent.

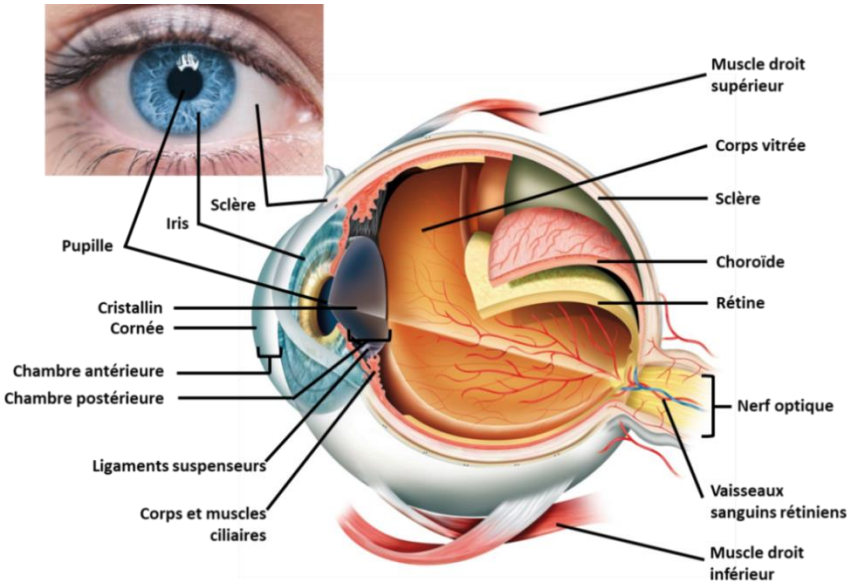

Figure 2 : Représentation schématique de l'œil humain et de ses structures. Adapté de Retina group of New York https://rgony.com/retina-diseases/eye-anatomy-illustration_92433742

B. Les milieux transparents

- **L'humeur aqueuse**

Liquide transparent à faible viscosité, l'humeur aqueuse se situe dans la chambre antérieure de l'œil, maintenant ainsi la pression intraoculaire en avant du cristallin. Elle permet également de pourvoir aux besoins nutritifs cellulaires de la cornée, en apportant notamment du glucose, de l'acide ascorbique ou encore des ions.

- **La cornée**

La cornée est une membrane solide et transparente dont la principale fonction réside dans sa capacité de réfraction : il s'agit en effet du principal élément convergent de l'œil, qui assure les 2/3 de la puissance optique de l'œil (dioptre). Il s'agit d'un des rares tissus avasculaires de l'organisme, ce qui lui permet de conserver sa transparence, limitant ainsi toute interférence de l'information lumineuse. Du fait de son caractère avasculaire, elle est alimentée par l'humeur aqueuse afin de subvenir à ses besoins physiologiques. La cornée est constituée à plus de 80 % d'eau.

- **Le cristallin**

Situé à l'arrière de l'iris, le cristallin est une lentille biconvexe, convergente et avasculaire. Il est maintenu en place par la présence d'un ligament suspenseur, constitué de fibres dites zonulaires, qui relient le cristallin aux procès ciliaires, qui sont l'extrémité antérieure du corps ciliaire. On retrouve au sein de ce dernier le muscle ciliaire (fibres musculaires lisses qui, par leur contraction, permettent les phénomènes d'accommodation). L'ensemble de ces fibres forme un anneau entourant le cristallin : la zonule de Zinn. Au niveau cellulaire, le cristallin est un empilement de plusieurs couches de fibres cellulaires, constituées de cellules anucléées encapsulées dans une membrane conjonctive fine : la cristalloïde. Au niveau fonctionnel chez l'homme, le rôle du cristallin, grâce à ses propriétés de convergence des rayons lumineux (il représente 1/3 de la puissance optique de l'oeil), est de focaliser la lumière sur la zone la plus sensible à la lumière de la rétine : la *fovea*.

- **Le corps vitré**

Il s'agit d'une substance gélatineuse et transparente située dans la cavité postérieure de l'œil. Elle occupe environ 90% du volume de l'œil, maintenant ainsi la pression intraoculaire en arrière du cristallin. Majoritairement composée d'eau (98-99%), elle contient également divers éléments nutritifs tels que du glucose et des ions, mais aussi du collagène et de l'acide hyaluronique qui lui confèrent sa viscosité (Bishop, 2000).

C. Les tuniques

- **Enveloppe externe - Sclère**

Il s'agit d'un tissu conjonctif dense, faiblement vascularisé, qui joue essentiellement un rôle de soutien et de protection mécanique de l'œil, lui conférant notamment sa forme et sa rigidité. De couleur blanche, elle est recouverte en avant et jusqu'au limbe (la jonction entre la sclère et la cornée) par une muqueuse, la conjonctive que l'on désigne couramment par le terme « blanc de l'œil ». La cornée permet, d'une part, l'entré des rayons lumineux dans le globe oculaire grâce à sa transparence, et d'autre part, leur convergence grâce à sa forme sphérique et convexe en avant. La cornée est constituée de cinq couches cellulaires qui sont respectivement selon l'axe antéro-postérieur : l'épithélium, la membrane de Bowman, le stroma, la membrane de Descemet et l'endothélium. Sur sa face postérieure, la sclère présente un orifice où la tête du nerf optique, l'artère et la veine centrales de la rétine quittent l'œil.

- **Enveloppe moyenne - Uvée**

Il s'agit d'une membrane pigmentée par des mélanocytes, ce qui permet aux rayons lumineux de pénétrer exclusivement par la pupille, jouant ainsi un rôle de chambre noire. La tunique uvéale est composée de plusieurs éléments distincts : l'iris et le corps ciliaire sur sa partie antérieure, et la choroïde sur sa partie postérieure. Situé dans l'humeur aqueuse, entre la cornée et le cristallin, l'iris est une membrane circulaire et contractile, percée en son centre par un orifice : la pupille. Son ouverture est contrôlée par l'action de deux muscles lisses antagonistes, permettant de s'adapter à l'intensité lumineuse extérieure : le sphincter pupillaire et le muscle dilatateur de la pupille. Le rôle de l'iris s'apparente donc à celui d'un diaphragme. Enfin, l'iris est possède un pigment, la mélanine, dont la concentration propre à chaque individu confère à la partie visible depuis l'extérieur de l'œil sa couleur unique.

Cette tunique moyenne comprend également le corps ciliaire, qui en plus de sécréter l'humeur aqueuse, est formé d'un réseau de muscles lisses, permettant de modifier la forme et la courbure du cristallin afin d'obtenir une vision nette. C'est le principe de l'accommodation.

- **Enveloppe interne - Rétine**

C'est une membrane relativement fine (environ 0,5 mm d'épaisseur chez l'Homme) située entre le corps vitré et la choroïde et observable par un examen ophtalmologique appelé « fond d'œil ». Elle couvre environ 72 % de la surface interne du globe oculaire, et s'étend de l'*ora serrata* en avant jusqu'au nerf optique dans la partie postérieure du globe oculaire (Figure 2). L'*ora serrata* est la zone où la limite antérieure de la rétine se trouve être en continuité avec l'épithélium non pigmenté de la *pars plana*, une portion du corps ciliaire. Mais surtout, la rétine est le tissu photosensible de l'œil, et revêt à ce titre une importance capitale dans la fonction oculaire.

II. La rétine

A. Origine embryologique, développement et organisation structurale

- Origine embryologique et formation de la rétine

Chez l'Homme, le développement de l'œil et de la rétine commence au stade embryonnaire, au début de la 3ème semaine de gestation. A J22, alors que le tube neural commence à s'organiser à partir de la plaque neurale, des diverticules apparaissent sur sa face interne, marquant des évaginations latérales du neuro-ectoderme vers la surface, qui formeront les vésicules optiques (Fuhrmann, 2010). A mesure que la morphogenèse de la vésicule optique gagne en sophistication, la tige optique s'allonge. La lumière de la tige optique maintient une continuité entre la cavité de la vésicule optique, qui donne l'espace sous-rétinien. A la fin de la 4ème semaine de développement, la vésicule optique est globalement sphéroïde **(Figure 3A)**. La vasculature précoce (dite hyaloïde) pénètre dans l'œil par le sillon optique, qui se refermera à l'issue de la 6ème semaine de gestation (Eckert et al., 2019).

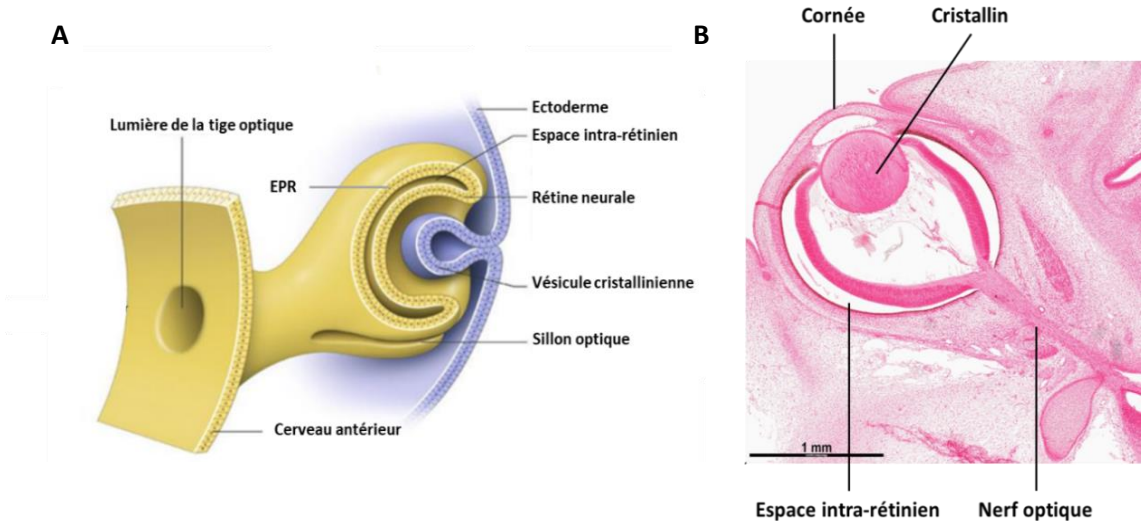

Figure 3 : Développement embryonnaire de la rétine. A : Représentation schématique de la cupule optique, permettant de révéler son organisation intrinsèque. Adapté de Hassimi O. (2018). **B :** Coupe histologique d'embryon humain à la fin de la 8e semaine de gestation, colorée à l'hématoxyline + éosine. Adapté de : https://embryology.med.unsw.edu.au/embryology/index.php/File:Stage_22_image_008-eye.jpg

A la fin de la 8ème semaine de développement, la rétine est clairement structurée en 2 composantes distinctes. A l'extérieur, la couche mince de la cupule optique forme l'épithélium pigmentaire rétinien (EPR), tandis que la couche interne, beaucoup plus épaisse, forme la rétine neurale **(Figure 3B)**. La rétine neurale primitive contient des cellules souches pluripotentes à l'origine de toutes les

futures cellules neuronales matures. C'est également au cours de cette 8ème et dernière semaine embryonnaire que les axones issus de cellules neurales particulières, les cellules ganglionnaires, progressent vers la tige optique. Ces axones s'allongent à l'intérieur de la tige puis vers le cerveau, formant ainsi le nerf optique (Rosen and Mahabadi, 2021).

Ainsi, à l'issue de la période embryonnaire, l'œil et la rétine ont globalement acquis leurs caractéristiques structurelles et morphologiques. La maturation se poursuivra lors de la période fœtale, avec l'orientation et le positionnement facial de l'œil, de même que l'acquisition des muscles et tissus conjonctifs définitifs qui permettront de le maintenir dans l'orbite tout en lui conférant sa mobilité (Tawfik and Dutton, 2018).

- Neurogenèse

La différenciation des cellules neurales rétiniennes débute autour de la 7ème semaine de développement. Les cellules progénitrices commencent par subir des divisions prolifératives symétriques afin de s'étendre sur la surface du tissu rétinien, avant de se différencier (Agathocleous and Harris, 2009). Des approches complémentaires menées dans les années 1980 ont permis de montrer que tous les types rétiniens de cellules neurales sont issus d'un unique pool de cellules progénitrices rétiniennes pluripotentes (RPC) (Turner and Cepko, 1987; Holt et al., 1988; Wetts and Fraser, 1988; Turner et al., 1990; Fekete et al., 1994). Tous les types cellulaires apparaissent selon un ordre spatio-temporel précis et relativement bien conservé au sein des vertébrés : cellules ganglionnaires, cellules horizontales, photorécepteurs de type cône, cellules amacrines, photorécepteurs de type bâtonnet, cellules bipolaires et enfin cellules de Müller **(Figure 4)** (Nawrocki et al., 1985; Young, 1985a, b; La Vail et al., 1991; Belecky-Adams et al., 1996; Rapaport et al., 2004; Wong and Rapaport, 2009; Hoon et al., 2014). S'il est évidemment compliqué d'étudier ces phénomènes chez l'Homme pour des raisons éthiques, les modèles animaux, et notamment les rongeurs tels que la souris, sont particulièrement intéressants dans la mesure où ces mécanismes, conservés chez les vertébrés et donc similaires à l'Homme, se mettent en place autour de la naissance, se poursuivant même jusqu'à 10 jours après.

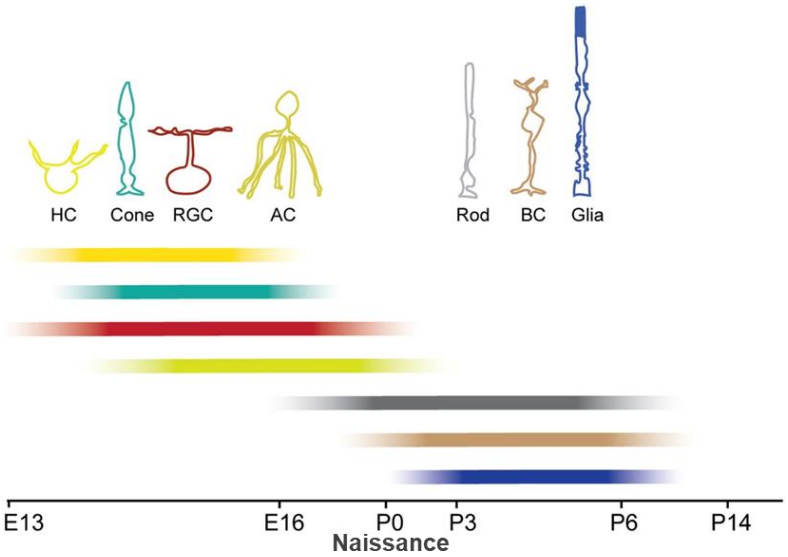

Figure 4 : Représentation schématique de l'ordre d'apparition temporel des cellules rétiniennes. Séquence précise de la genèse des cellules rétiniennes chez la souris. Les cellules ganglionnaires (RGC) sont les premières à apparaitre au 13e jour du développement embryonnaire (E13). Les photorécepteurs de type cône, les cellules bipolaires et les cellules de Müller terminent leur différenciation environ 10 jours après la naissance (P10). PR, Photoreceptors; HC, horizontal cells; BC, bipolar cells; AC, amacrine cells; RGC, retinal ganglion cells. Adapté de Hoon et al., (2014).

La rétine adulte fonctionnelle est cependant caractérisée par une organisation spatiale complexe, notamment organisée en plusieurs couches cellulaires distinctes. Ainsi, conjointement à leur différenciation, les cellules neurales rétiniennes migrent au sein de la rétine dans un processus appelé lamination.

- Organisation laminaire et spatiale de la rétine

L'organisation laminaire de la rétine requiert non seulement que les bons types cellulaires soient générés au bon moment, mais aussi qu'ils migrent à un endroit précis. Cette dernière caractéristique est désignée sous le terme de lamination neuronale. Ce processus est commun au système nerveux des vertébrés, et constitue l'une des stratégies de traitement de l'information. Les neurones sont capables d'emprunter des voies de migration complexes, notamment grâce à leur cytosquelette ou *via* des modes de migration spécifiques (Kriegstein and Noctor, 2004; Cooper, 2013; Icha et al., 2016). Par ailleurs, chez les vertébrés, la distribution spatiale des cellules d'un même type répond au principe de la « mosaïque non aléatoire » (Wassle and Riemann, 1978; Reese, 2012). Chaque type cellulaire forme une mosaïque indépendante de la mosaïque des autres types cellulaires, de sorte que les distributions spatiales des différents types cellulaires ne sont pas corrélés (Rockhill et al., 2000). Ces arrangements en mosaïque ont lieu dans chaque couche de la rétine, conférant une couverture uniforme du champ visuel par chaque type de neurone **(Figure 5)**. Cette indépendance

des mosaïques est préservée même chez des types cellulaires qui sont pourtant connectés entre eux par des synapses (Galli-Resta et al., 2000; Rockhill et al., 2000). En effet, au cours du développement, les mosaïques de chaque type cellulaire se mettent en place avant la formation des synapses (Galli-Resta et al., 2000).

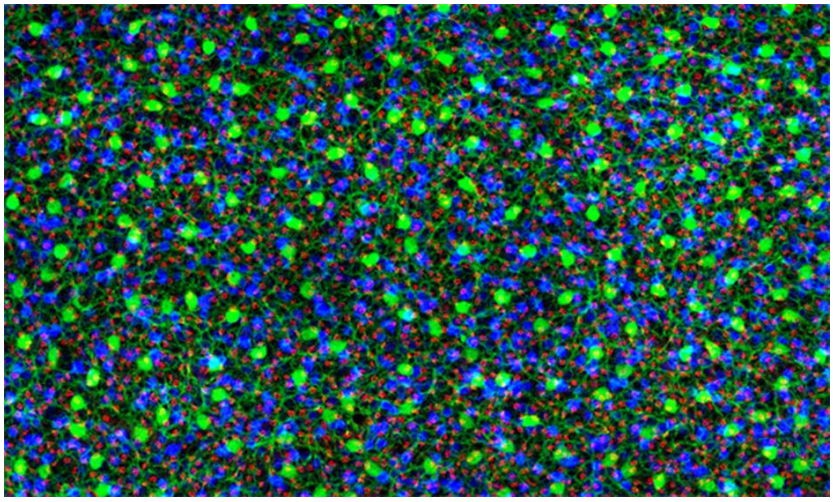

Figure 5 : Illustration de la mosaïque rétinienne par immunomarquage des différents types cellulaires identifiables au sein de la couche plexiforme externe chez la souris. Les cellules horizontales (vert), les extrémités des photorécepteurs de type cône (rouge) et les cellules bipolaires (bleu) sont identifiables. https://webvision.med.utah.edu/2012/02/retinal-half-mosaic/

Lorsque tous les RPC ont achevé leur différenciation, que les cellules matures se sont positionnées à leur emplacement de destination et ont correctement établi leurs liaisons synaptiques, la rétine est considérée comme pleinement fonctionnelle. Sa structure n'évoluera plus (mis à part les remodelages physiologiques en relation avec son activité), et on peut alors identifier huit couches fonctionnelles distinctes, qui sont respectivement depuis le pôle basal vers le pôle apical **(Figure 6)** :

-la membrane limitante interne, qui délimite la face interne de la rétine

-la couche des cellules ganglionnaires

-la couche plexiforme interne, qui contient des cellules amacrines et les synapses entre l'arbre dentritique des cellules ganglionnaires et les axones des cellules bipolaires ;

-la couche nucléaire interne, qui contient les corps cellulaires des cellules bipolaires et des cellules de Müller

-la couche plexiforme externe, qui contient les cellules horizontales

-la couche nucléaire externe, qui regroupe les noyaux des photorécepteurs

-la membrane limitante externe, qui constitue la jonction entre segment interne et externe des photorécepteurs

-la couche des segments externes des photorécepteurs, dernière structure de la rétine avant l'EPR.

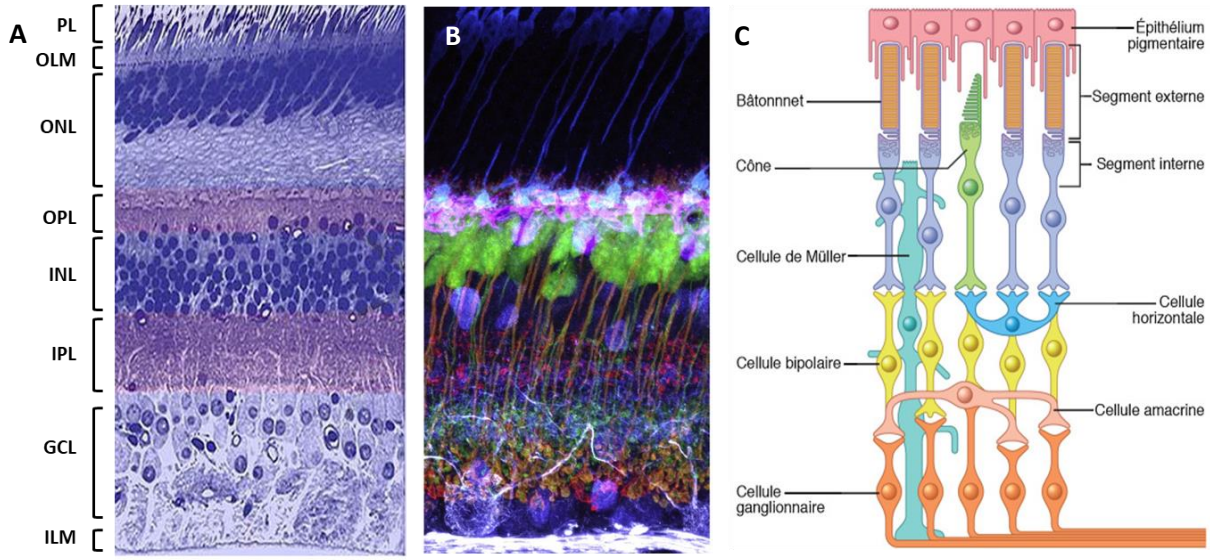

Figure 6 : Organisation laminaire de la rétine et répartition des types cellulaires au sein des différentes couches rétiniennes. A : coupe histologique de rétine humaine mature laissant apparaitre les différentes couches. PL : couche des segments externes des photorécepteurs, OLM : membrane limitante externe, ONL : couche nucléaire externe, OPL : couche plexiforme externe, INL : couche nucléaire interne, IPL : couche plexiforme interne, GCL : couche des cellules ganglionnaires, ILM : membrane limitante interne. Adapté de https://webvision.med.utah.edu. **B :** Coupe transversale de rétine immunomarquée, permettant de distinguer les différents types neuro-cellulaires : photorécepteurs de type cônes (bleu), cellules horizontales (rose), cellules bipolaires (extrémités en rouge et soma en jaune), cellules amacrines (violet), cellules ganglionnaires (blanc). Adapté de Hoon et al., (2014). **C :** Représentation schématique de l'organisation laminaire des différents types cellulaires au sein de la rétine. Adapté de Salesse (2017).

- Aires fonctionnelles de la rétine

Cette organisation laminaire n'est cependant pas homogène sur l'intégralité de la surface rétinienne. Plusieurs zones fonctionnelles particulières existent en effet dans la rétine **(Figure 7)**. Ces structures macroscopiques sont notamment observables lors d'un examen ophtalmologique appelé « fond d'œil ».

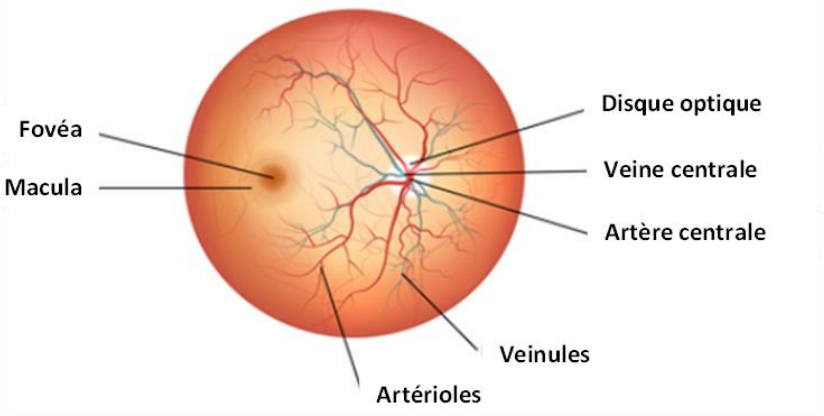

Figure 7 : Représentation schématique de la rétine et de ses principales composantes macroscopiques telles qu'observées lors d'un examen de type « fond d'œil ». Adapté de http://www.nandaneyehospital.com/retina-clinic.html.

***Disque optique* :** Également appelé papille, il apparait à l'observation sous la forme d'une tache circulaire de couleur claire, de diamètre légèrement inférieur à 2mm. Il s'agit du point de convergence des axones des cellules ganglionnaires et de sortie du globe oculaire du nerf optique. Dépourvu de cellules photoréceptrices, il est associé à l'existence d'une tache aveugle dans le champ visuel, aussi appelée tache de Mariotte. Il constitue également l'émergence des artères et veines rétiniennes.

***Macula* :** Située à proximité de la papille, la macula se trouve en position quasi centrale de la rétine, entre l'artère temporale supérieure et l'artère temporale inférieure. Elle apparait à l'observation comme une tache jaunâtre. Ceci est dû à la présence de pigments xanthophylles composés de lutéine, zéaxanthine et méso-zéaxanthine, qui appartiennent à la famille des caroténoïdes. Ces pigments permettent de filtrer la lumière bleue et de neutraliser les radicaux libres oxygénés délétères. Le centre de la macula, plus sombre, est appelé *fovea*. On y trouve une petite fossette (ou dépression) centrale : la fovéola. Environ 75% de la lumière perçue converge sur cette zone. C'est donc elle qui confère l'acuité visuelle maximale. C'est également elle qui répond aux intensités lumineuses maximales puisque c'est la région qui détient la concentration maximale de cônes.

Fovea : D'un diamètre de 150µm et d'une épaisseur de 130µm chez l'homme, cette zone est totalement avasculaire. Elle ne possède qu'une seule couche cellulaire et ne contient exclusivement que des cônes (150000 cônes par mm2). Les premiers bâtonnets sont observables à partir de 500µm d'excentricité de la fovéola, pour atteindre leur concentration maximale à environ 5-6 mm du centre de la fovéola. C'est le point de la rétine qui dispose de la meilleure acuité visuelle en raison d'une concentration importante de photorécepteurs, exclusivement de type cône.

B. Types cellulaires

1. L'épithélium pigmentaire rétinien

L'épithélium pigmentaire rétinien (EPR) tient son nom du fait de la présence dans ses cellules de mélanine, qui lui confère sa couleur foncée caractéristique. Situé entre la neurorétine et la choroïde **(Figure 6)**, il s'agit de la couche la plus externe de la rétine. Il s'étend de la papille à l'*ora serrata*, se prolongeant jusqu'à l'épithélium pigmentaire du corps ciliaire. A son pôle basal, il adhère à la membrane de Bruch, tandis qu'à son pôle apical, il englobe une partie des segments externes des photorécepteurs. Il s'agit d'un épithélium simple et avasculaire, et est en ce sens constitué d'une monocouche de cellules cubiques liées par des jonctions serrées. Les cellules de l'EPR jouent un rôle dans de nombreuses fonctions essentielles de la rétine :

-absorption lumineuse : sa forte teneur en pigments de mélanine lui permet de capter les photons n'ayant pas réagi avec les autres couches de la rétine évitant ainsi leur diffusion, ce qui confère à la rétine cette fonction de « chambre noire » (Strauss, 2005) ;

-transduction visuelle : l'EPR intervient dans la régénération du photopigment des photorécepteurs, la rhodopsine, à travers différentes réactions enzymatiques permettant de resynthétiser le 11-cis-rétinal après son isomérisation en trans-rétinal (Strauss, 2005; Salesse, 2017) ;

-barrière hémato-rétinienne : la présence de très nombreuses jonctions serrées permet de bloquer le passage de molécules dans les deux sens, depuis la circulation sanguine vers la neurorétine ou depuis cette dernière vers la circulation sanguine (Cunha-Vaz et al., 2011). Ceci permet notamment d'éviter d'éventuelles diffusions indésirables et/ou incontrôlées ;

-homéostasie : l'EPR intervient dans les échanges d'électrolytes, d'oxygène et de nutriments tels que le glucose entre la circulation sanguine et la neurorétine (Strauss, 2005; Sparrow et al., 2010). Les échanges hydriques sont rendus possibles par la présence d'aquaporines dans les cellules de l'EPR (Sparrow et al., 2010), ce qui permet notamment d'éviter l'accumulation d'eau, prévenant ainsi l'apparition d'œdèmes. Par ailleurs, l'EPR sert de tampon entre la circulation sanguine et la neurorétine : il possède la capacité de transmettre des informations métaboliques de part et d'autre de la barrière hémato-rétinienne. Il est ainsi capable de réagir à de nombreuses variations et stimuli en sécrétant des molécules comme des ions, de l'ATP, mais aussi des facteurs de croissance (Strauss, 2005; Li et al., 2007; Sparrow et al.,

2010; Hirsch et al., 2015), comme le facteur dérivé de l'épithélium pigmentaire (PEDF) ou encore le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) qui sont notamment impliqués dans les mécanismes de l'angiogenèse physiologique comme pathologique (Marneros et al., 2005; Ford et al., 2011; Wang et al., 2016). L'EPR sécrète également des cytokines telles que les interleukines, permettant de réguler l'activité des cellules immunitaires (Knickelbein et al., 2016).

2. Les cellules neurales

a. Les photorécepteurs

Chez l'Homme, on en compte deux types distincts : les cônes, au nombre de 4 à 7 millions, et les bâtonnets, qui seraient de 110 à 130 millions (Masland, 2012a).

Les cônes, principalement localisés dans la *fovea* (Figure 7), permettent la vision des couleurs et des détails : c'est la vision photopique. Il existe trois types de cônes, chacun responsable de l'absorption d'un spectre lumineux différent, en raison de variations de leur pigment, la iodopsine. On distingue ainsi : les cônes bleus, rouges et verts, dont les absorptions maximales sont respectivement à 445nm, 535nm et 575nm.

Les bâtonnets, répartis dans toute la rétine (sauf la *fovea* et la papille), sont quant à eux très sensibles à la lumière et peuvent détecter un unique photon (Baylor et al., 1979). Ils sont donc impliqués dans la vision des contrastes et dans la vision nocturne : c'est la vision scotopique.

Malgré ces différents phénotypes, les photorécepteurs possèdent néanmoins certaines caractéristiques communes, notamment la présence de 5 compartiments spécifiques : le segment externe, le segment interne, le noyau (ou soma), un axone et enfin une terminaison synaptique. C'est dans le segment externe que l'on trouve les photopigments. Il est donc à cet égard la partie photosensible des photorécepteurs. Il est constitué d'un empilement de disques (environ 1000 à 2000 par photorécepteur) qui sont en réalité des replis de la membrane plasmique, ce qui lui confère son apparence singulière. Il s'agit d'une structure dynamique en renouvellement constant : les nouveaux disques sont formés à la base du segment externe, tandis que les disques plus anciens sont dégradés au pôle apical par les cellules de l'EPR *via* un mécanisme de phagocytose (Strauss, 2005).

b. *Les cellules bipolaires*

Situées au niveau de la couche nucléaire interne, les cellules bipolaires correspondent à des « interneurones » : elles permettent la transmission du signal depuis l'extrémité des photorécepteurs dans la couche plexiforme externe vers les cellules ganglionnaires, au niveau de la couche plexiforme interne **(Figure 6)**. Elles sont spécifiques d'un type de photorécepteur, c'est-à-dire qu'une cellule bipolaire communique soit avec des cônes soit avec des bâtonnets (Bloomfield and Dacheux, 2001). Bien qu'une dizaine de sous-types aient été récemment identifiés (Shekhar et al., 2016), les cellules bipolaires peuvent globalement être classées en deux catégories selon leur polarité : ON et OFF (Euler et al., 2014). Les cellules bipolaires ON possèdent des synapses électriques constituées de jonctions gap, tandis que les cellules bipolaires OFF possèdent des synapses chimiques dites « conventionnelles » (avec la glycine comme neurotransmetteur) (Tsukamoto and Omi, 2017). Par ailleurs, l'activité des cellules bipolaires est modulée par un autre type cellulaire, les cellules amacrines, au niveau de la couche plexiforme interne **(Figure 6)**.

c. *Les cellules amacrines*

Les cellules amacrines font également partie des « interneurones » puisqu'elles relient les cellules bipolaires aux cellules ganglionnaires. Leurs corps cellulaires sont situés dans la couche nucléaire interne, tandis que leurs terminaisons synaptiques se trouvent dans la couche plexiforme interne **(Figure 6)**. Les cellules amacrines sont notamment caractérisées par l'absence d'axones. Il s'agit d'ailleurs de la raison de leur découverte et de l'origine de leur nom (« αμακρινε » : *amakrin*- signifiant littéralement en grec ancien « absence de longue fibre »). Leur rôle est d'intégrer et de moduler le message transmis aux cellules ganglionnaires (Masland, 2012b). Il en existe de nombreux sous-types (potentiellement jusqu'à 30), différenciables en fonction de leur forme ou encore du type de neurotransmetteurs qu'elles utilisent (GABA, Acétylcholine, Glycine…) (Balasubramanian and Gan, 2014). Les différences réelles en termes de fonctionnalités ne sont cependant pas toutes connues à l'heure actuelle.

d. *Les cellules horizontales*

Les cellules horizontales sont des cellules neuronales situées dans la couche nucléaire interne **(Figure 6)** qui peuvent se lier à plusieurs cônes et bâtonnets, ainsi qu'à plusieurs cellules bipolaires au niveau de la couche plexiforme externe. Leur activité principale réside dans l'inhibition des autres cellules environnantes, désignée sous le terme d'inhibition latérale (Masland, 2012a; Thoreson and Mangel, 2012; Demb and Singer, 2015). L'inhibition sélective de signaux de faible intensité permet ainsi d'accroitre le contraste et la définition du stimulus visuel. Les cellules horizontales communiquent entre elles par essentiellement par l'intermédiaire de jonctions gap (Klaassen et al., 2011).

e. Les cellules ganglionnaires

Situées dans la partie la plus interne de la rétine, les cellules ganglionnaires sont les dernières actrices de la chaine de transmission de l'information visuelle des photorécepteurs vers le corps genouillé latéral. Elles reçoivent l'information des cellules bipolaires et amacrines, et leurs axones, au nombre d'environ 1,2 million chez l'homme, se rejoignent au niveau de la papille optique pour former la tête du nerf optique, qui transmettra l'information visuelle au corps genouillé latéral (Erskine and Herrera, 2014). Il existe de nombreux types de ces cellules ganglionnaires mais trois types principaux correspondent à des fonctions relativement bien cataractérisées (Rodieck et al., 1985; Dacey, 1994) :

-les cellules ganglionnaires naines, de type P pour Parvo (P1 ou P2). Elles représentent environ 80-90 % de la population totale des cellules ganglionnaires, et seraient spécialisées dans l'intégration de la forme, des détails et des couleurs (Watson, 2014) ;

-les cellules ganglionnaires de grande taille, de type M pour Magno (ou parasols). Elles représentent environ 5-10 % de la population totale des cellules ganglionnaires, et seraient impliquées dans la détection du mouvement (Marshak, 2009) ;

-Les cellules bistratifiées, qui représentent moins de 10% de la population totale des cellules ganglionnaires. Mal caractérisées, elles semblent néanmoins jouer un rôle important dans le traitement des formes et des contrastes et le traitement de l'axe bleu jaune dans la vision des couleurs (Field et al., 2007).

A l'heure actuelle, au moins une dizaine d'autres sous-types de cellules ganglionnaires ont été identifiés (Rockhill et al., 2002; Masland, 2012b). Parmi elles, des cellules ganglionnaires particulières dites luminosensibles : elles expriment un pigment particulier, la mélanopsine, qui jouerait notamment un rôle dans la régulation du rythme circadien et le réflexe pupillaire (Schmidt et al., 2011; Ait-Hmyed Hakkari et al., 2016).

3. Les cellules gliales

S'ils représentent les acteurs clés de la vision grâce à leur capacité à générer et à transmettre l'information visuelle, les neurones, ne sont cependant pas capables à eux seuls de créer et de maintenir une certaine architecture, de réguler l'homéostasie du milieu extracellulaire, de communiquer avec les cellules extra-rétiniennes ou de gérer une inflammation. Ils doivent donc nécessairement être épaulés dans ces tâches par d'autres cellules : les cellules gliales. Initialement découvertes en 1865 par Rudolf Virchow dans le cerveau, les cellules gliales tirent leur nom du grec ancien « *gloios* » (γλοιός), littéralement : gluant. Virchow les a effectivement décrites comme étant

une sorte de tissu conjonctif du cerveau, une « colle gluante » permettant d'en maintenir la structure. Les recherches consécutives à cette découverte ont permis d'identifier plusieurs familles de cellules gliales, chacune ayant une morphologie et des fonctions propres. La rétine étant elle aussi un tissu neural, des cellules gliales y ont également été mises en évidence, avec toutefois quelques différences par rapport au cerveau, certaines cellules gliales étant spécifiques à la rétine.

On dénombre aujourd'hui trois types de cellules gliales dans la rétine des mammifères : les cellules microgliales, les cellules de Müller et les astrocytes, ces deux derniers formant le groupe des cellules dites macrogliales.

a. Les cellules microgliales

Nous avons évoqué précédemment que la rétine était isolée de la circulation sanguine générale par la barrière hémato-rétinienne, et se trouve de ce fait dépourvue des cellules habituelles du système immunitaire (leucocytes). En effet, la rétine (et d'une manière plus générale, l'œil) fait partie de ce que l'on appelle communément un « privilège immun », c'est-à-dire que cette région est capable de supporter la présence d'antigènes sans déclencher la réaction immunitaire qui aurait normalement lieu (Zhou and Caspi, 2010). Deux mécanismes sont ici à l'œuvre : l'isolement de la rétine par la barrière épithéliale et la capacité de l'épithélium pigmentaire à moduler le système immunitaire par la sécrétion de différentes cytokines comme le facteur de croissance transformant (TGF-β) (Ma et al., 2019). Néanmoins, en cas d'infection, d'altération ou de stress métabolique particulier, il doit exister un système de réponse intrinsèque. Ce rôle est joué dans la rétine par les cellules microgliales.

Découvertes dans les années 1920 par Pío del Río-Hortega, disciple de Santiago Ramón y Cajal, les cellules microgliales ont d'abord été identifiées dans le cerveau, notamment au niveau de lésions cérébrales, avant que leurs fonctions ne commencent à y être décrites plus précisément dans les années 1930 (del Rio-Hortega, 1932). Les études portant sur la microglie rétinienne n'ont connu un intérêt qu'à partir des années 1990. C'est à cette période qu'il a été découvert que la microglie rétinienne possède la même origine ontogénétique que la microglie du système nerveux central, à partir duquel elle migrerait dans la rétine au cours du développement (Diaz-Araya et al., 1995a). Les cellules microgliales sont identifiables dans la rétine dès le 11ème jour de vie embryonnaire chez la souris (Santos et al., 2008) et après 10 semaines de gestation chez l'Homme (Diaz-Araya et al., 1995b). Elles émergent par la tête du nerf optique, à partir duquel elles migrent dans un plan horizontal vers la rétine périphérique (Marin-Teva et al., 1998; Marin-Teva et al., 1999b), avant de migrer plus en profondeur vers les couches externes de la rétine, probablement par le guidage physique des cellules de Müller (Sanchez-Lopez et al., 2004). Il est ici intéressant de noter que les régions les plus externes de la rétine, comprises entre la couche nucléaire externe et l'EPR, sont

cependant dépourvues de cellules microgliales, formant une « zone d'exclusion », c'est-à-dire que la microglie y est absente en conditions physiologiques **(Figure 8A-B)** (Li et al., 2019a). Elles développent ensuite une polarisation ainsi que des ramifications. Ces cellules microgliales prolifèrent ensuite jusqu'à atteindre une densité cellulaire finale (Marin-Teva et al., 1999a). Leur distribution dans le plan horizontal s'effectue selon une configuration dite « en mosaïque » **(Figure 8C)** (Santos et al., 2008).

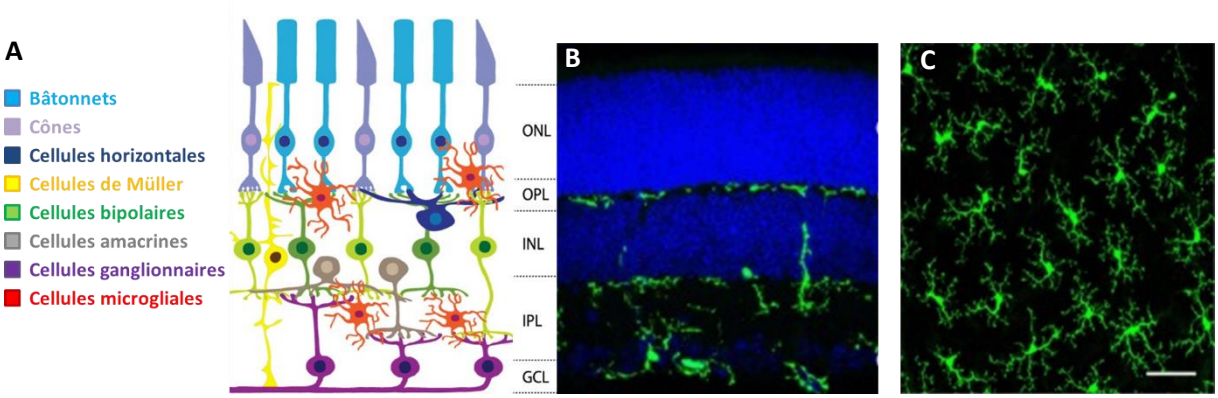

Figure 8 : Distribution et morphologie des cellules microgliales rétiniennes. A : Représentation schématique des cellules microgliales au sein des couches de la rétine. **B :** Répartition des cellules microgliales (vert) dans une coupe de rétine de souris transgénique exprimant une GFP spécifiquement dans les cellules microgliales. **C :** Morphologie et distribution des cellules microgliales (exprimant la GFP, en vert) au sein de la couche plexiforme interne. Echelle = 50µm. ONL : couche nucléaire externe, OPL : couche plexiforme externe, INL : couche nucléaire interne, IPL : couche plexiforme interne, GCL : couche des cellules ganglionnaires. Adapté de Li et al., (2019).

- Conditions physiologiques

En conditions physiologiques, la microglie forme une population cellulaire isolée et auto-suffisante. Son taux de renouvellement est plutôt faible, puisqu'on estime que dans le cerveau, il peut s'étaler sur une période de 3 à 41 mois (Askew et al., 2017; Tay et al., 2017), voire plus d'une dizaine d'années (Reu et al., 2017). On ne dispose cependant pas encore de données précises concernant son renouvellement dans la rétine même s'il a été démontré que la survie de la microglie dépend, entre autres, de cytokines sécrétées par les neurones comme l'IL-34 (Hilla et al., 2017). Peu active dans ces conditions physiologiques, la microglie se maintient alors dans un état dit « dormant », où son activité se résume à la phagocytose de débris cellulaires ainsi qu'à la sécrétion de facteurs neuroprotecteurs et anti-inflammatoires (Kierdorf and Prinz, 2017). Véritables sentinelles immunitaires de la rétine, les cellules microgliales sont capables de passer à un état dit « activé » lorsqu'elles y détectent des signaux pathologiques.

- Conditions pathologiques

En cas de perturbation, comme une rupture de l'homéostasie, un désordre métabolique, une infection ou une inflammation, la microglie est capable de s'activer (Kierdorf and Prinz, 2013). Cette activation engendre notamment un changement de morphologie (Saijo and Glass, 2011), les cellules microgliales passant d'une forme ramifiée à une forme dite amiboïde **(Figure 9)** et migrent vers le lieu de la perturbation (Langmann, 2007). Contrairement aux cellules immunitaires classiques comme les neutrophiles qui prolifèrent massivement afin d'induire leur réponse fonctionnelle, ce phénomène ne semble pas s'accompagner d'une prolifération microgliale, puisque seule leur activation est impliquée dans les processus de réaction (Rogove et al., 2002) et de néovascularisation dans les modèles de rétinopathie (Fischer et al., 2011). Une fois activées, les cellules microgliales surexpriment une protéine particulière. Cette modification morphologique s'accompagne également de modifications physiologiques, avec notamment la surexpression de la protéine Iba1 (Ionized calcium binding adaptor molecule 1) (Ito et al., 1998), marqueur spécifique de la microglie, une augmentation de la phagocytose et de la sécrétion de nombreux facteurs de réponse. Ces derniers peuvent être de nature très diverse : cytokines, neurotransmetteurs, espèces moléculaires oxydatives... (Langmann, 2007).

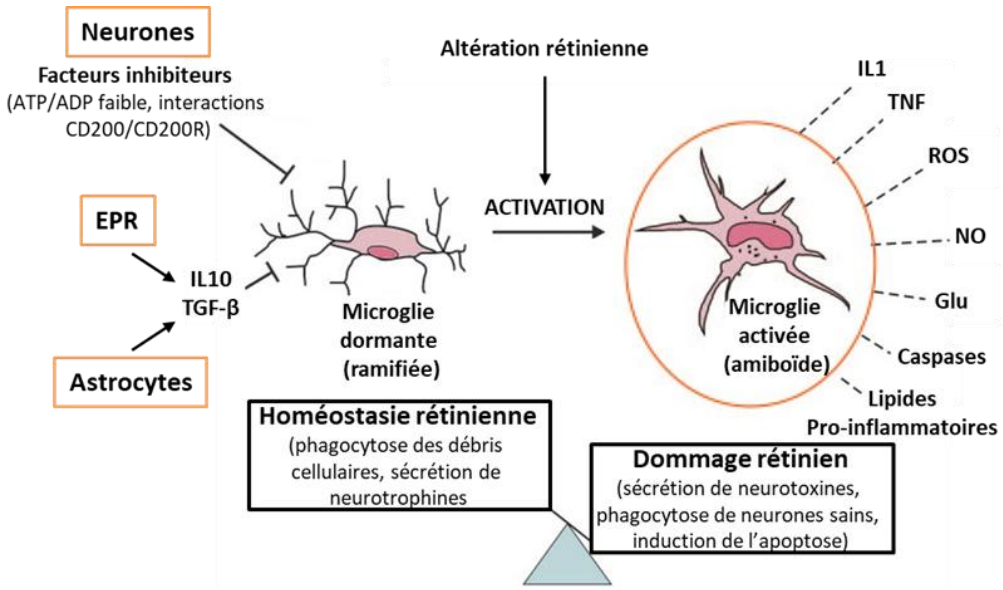

Figure 9 : Représentation schématique des mécanismes de l'activation des cellules microgliales. L'apparition d'un stimulus pro-inflammatoire induit l'activation des cellules microgliales : on observe alors un changement de morphologie pour passer à une forme amiboïde, qui s'accompagne d'une sécrétion de cytokines. Adapté de Langmann (2007).

Cependant, l'activité des cellules microgliales est également régulée par les échanges bidirectionnels avec un autre type cellulaire majeur de la rétine : les cellules macrogliales. Ce groupe se compose de deux types cellulaires proches mais distincts : les cellules de Müller et les astrocytes.

b. Les cellules de Müller

Les cellules de Müller sont les cellules macrogliales majoritaires de la rétine, où elles peuvent représenter jusqu'à 90% des cellules gliales (Bringmann et al., 2006). Chez les mammifères, il y aurait une densité moyenne de 8000-11000 cellules de Müller par mm² de rétine (Chao et al., 1997). Chez l'Homme, on dénombre 8-10 millions de cellules de Müller par rétine. Identifiées dès 1851 par Heinrich Müller, il s'agit de cellules radiales, c'est-à-dire qu'elles traversent la rétine de part en part, depuis sa face interne jusqu'à sa face externe au niveau de la couche nucléaire externe, en contact avec les segments internes des photorécepteurs.

- Origine embryologique et développement morphologique

Les cellules de Müller seraient issues de cellules progénitrices des crêtes neurales (Turner and Cepko, 1987; Liu et al., 2014), partageant ainsi des origines communes avec les neurones. Pourtant, l'apparition de cellules de Müller matures dans la rétine est postérieure à ces derniers, puisqu'il s'agit en réalité du dernier type cellulaire rétinien à acquérir son phénotype définitif (Cepko, 1993). Les cellules de Müller en cours de différenciation se caractérisent d'abord par un arrêt de leur prolifération, puis par des modifications morphologiques et biochimiques. Au niveau morphologique, deux extensions (process) s'étendent depuis leurs noyaux au niveau de la couche nucléaire interne vers des directions opposées. La cellule de Müller émet des microvillosités apicales vers l'espace sous-rétinien entre les segments internes des photorécepteurs (Uga and Smelser, 1973b). La longueur et le nombre de ces dernières peut varier selon les espèces, probablement en relation avec le niveau de vascularisation de la rétine (Uga and Smelser, 1973a). Dans la direction opposée, le process interne s'approche de la surface du vitré en s'étendant jusqu'à la membrane limitante interne, où prennent forme les « pieds » des cellules de Müller (**Figure 10A, B**), conférant aux cellules de Müller une forme de colonne au sein de la rétine (Reichenbach et al., 1993; Vecino et al., 2016). Au niveau biochimique, le protéome des cellules de Müller évolue au cours des 3 premières semaines post-natales chez la souris, jusqu'à l'acquisition d'un phénotype mature (Nelson et al., 2011). Les cellules de Müller matures sont ainsi identifiables en immunohistochimie par des marqueurs spécifiques comme la glutamine synthétase (GS) (Germer et al., 1997), la protéine de liaison du rétinaldéhyde cellulaire (CRALBP) (Saari et al., 1997) ou encore la cavéoline-1 (Cav-1) (Gu et al., 2014) **(Figure 11)**.

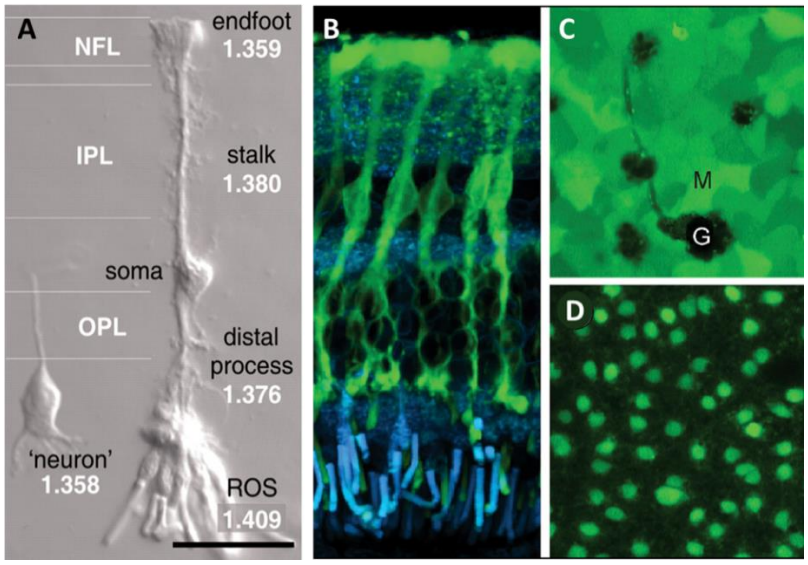

Figure 10 : Morphologie et localisation rétinienne des cellules de Müller. **A :** Microphotographie d'une cellule de Müller (cobaye) en microscopie à contraste interférentiel. **B :** Cellules de Müller (vert) dans une coupe radiale de rétine (cobaye) en imagerie confocale. **C :** Pieds des cellules de Müller (vert, « M ») dans la couche des cellules ganglionnaires (noir, « G »). **D :** Motif de répartition des cellules de Müller (vert) au niveau de la couche plexiforme interne de la rétine. Coupe transversale issue d'un montage à plat en imagerie confocale. NFL : couche des fibres nerveuses, IPL : couche plexiforme interne, OPL : couche plexiforme externe, ROS : segment externe des photorécepteurs. Adapté de (Franze et al., 2007).

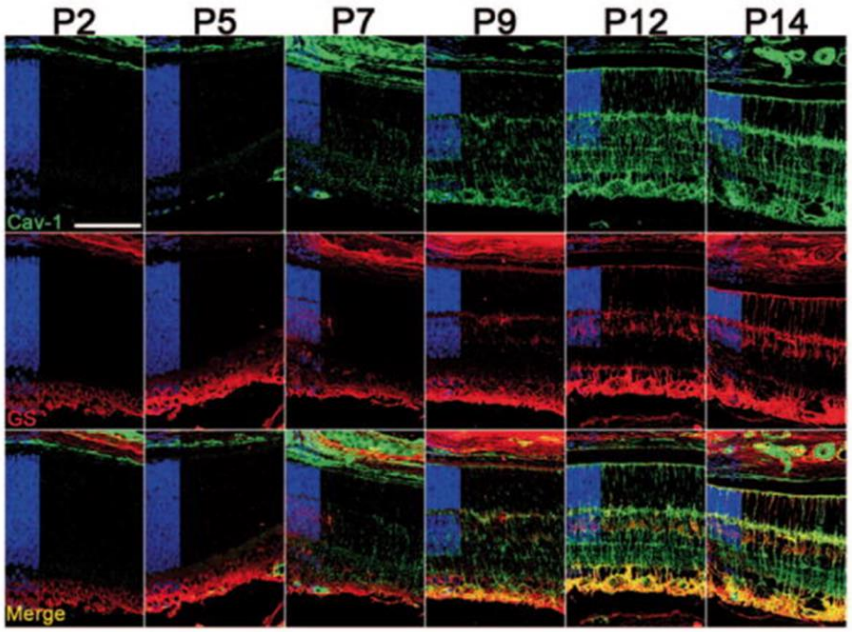

Figure 11 : Marquages immunohistochimiques des cellules de Müller au cours du développement de la rétine. La cavéoline-1 (Cav-1 ; vert) et la glutamine synthétase (GS ; rouge) ont été immunomarquées dans des coupes radiales de rétines de souris lors des différentes étapes du développement rétinien. La colocalisation à partir de P7 de la Cav-1 avec la GS dans les cellules radiales suggère une accumulation de cette dernière dans les cellules de Müller au cours de leur maturation. Adapté de Gu et al., (2014).

- Rôle structural

Grace à leur morphologie particulière, les cellules de Müller participent à la structure et à l'orientation de la migration des neurones néoformés ainsi que leurs dendrites (Willbold et al., 1997; Stier and Schlosshauer, 1998). Ce rôle est notamment étayé par le fait qu'au cours de dégénérescences rétiniennes, telle que la dégénérescence maculaire liée à l'âge, certains neurones migrent hors de la rétine pour atteindre la choroïde en suivant le remodelage des processus des cellules de Müller, qui s'étendent à travers les espaces de la membrane de Bruch (Sullivan et al., 2003). La population globale des cellules de Müller forme un motif dense et régulier où chaque cellule de Müller constitue une colonne, soutenant ainsi l'architecture globale de la rétine **(Figure 10C, D)**.

Toutefois, la morphologie des cellules de Müller n'est pas exactement identique dans les différentes régions de la rétine : en effet, ces dernières adoptent des formes diverses selon qu'elles soient localisées dans la rétine périphérique ou centrale : on parle de morphologie spécialisée. En l'occurrence, les cellules de Müller de la rétine périphérique sont plutôt courtes et épaisses, avec des pieds relativement larges, tandis que les cellules de Müller de la rétine centrale sont plutôt longues avec des pieds relativement fins **(Figure 12A)** (Reichenbach and Wohlrab, 1986; Reichenbach et al., 1989). De plus, il semblerait que leurs process s'adaptent à la structure des couches environnantes, et ce indépendamment de leur localisation topographique (Reichenbach et al., 1989). Dans les couches nucléaires internes et externes, leurs process étendent de fines bulles cytoplasmiques, enveloppant les somas neuronaux. Dans la couche plexiforme, elles projettent de nombreuses microvillosités comparables à des branches, tandis que dans la couche des fibres nerveuses, leurs process semblent plutôt lisses, avant de donner naissances à leurs pieds **(Figure 12B)**. Les microenvironnements neuronaux seraient donc déterminants quant à la morphologie adoptée par les cellules de Müller et leurs process.

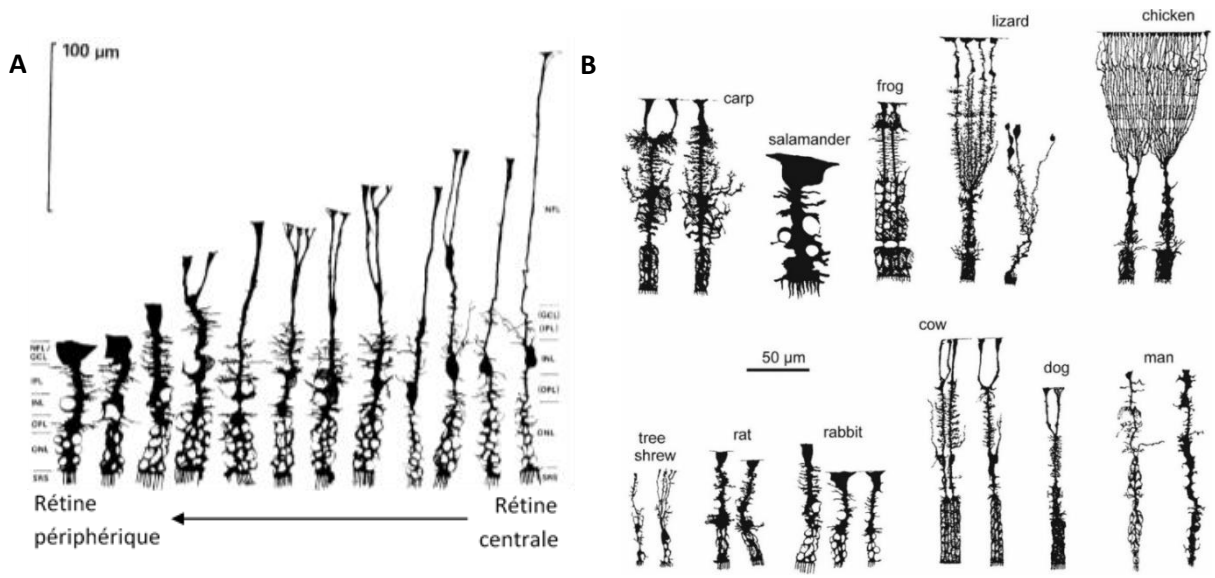

Figure 12 : Morphologie des cellules de Müller en fonction de leur localisation topographique et de l'espèce animale. A : Cellules de Müller marquées selon la méthode de Pappenheim. Adapté de Reichenbach et al., (1989). **B :** Morphologie des cellules de Müller dans différentes espèces animales. Les cellules de Müller présentent globalement les mêmes caractéristiques morphologiques, à savoir la présence de pieds et de microvillosités à leurs extrémités respectives. Cependant, la longueur et les proportions de ces éléments varient cependant en fonction de l'espèce concernée. Adapté de Ramon y Cajal (1892).

Ainsi, bien qu'exprimant quelques différences morphologiques spécifiques à chaque espèce, les cellules de Müller conservent systématiquement leurs caractéristiques propres, à savoir la présence de pieds, de microvillosités et leur positionnement radial à travers les différentes couches de la rétine. Le fait qu'elles aient été conservées selon ce schéma spécifique lors de l'évolution chez toutes les espèces vertébrées pourvues de rétine, du poisson au mammifère, en passant par les reptiles et les volatiles suggère une importance cruciale dans la fonction rétinienne. Cette hypothèse est notamment appuyée par le fait que leur délétion génétique sélective induit une dégénérescence de la rétine traduite par apoptose des photorécepteurs, une dysplasie de la rétine et une prolifération de l'EPR (Dubois-Dauphin et al., 2000). De telles conséquences ne peuvent s'expliquer par le seul rôle structural de ces cellules, qui possèdent en réalité un spectre de fonctionnalités très large, les plaçant au cœur de la physiologie rétinienne.

- Rôles physiologiques des cellules de Müller

La rétine est un tissu complexe, dont la physiologie dépend de nombreux mécanismes d'échanges et de régulations. Les cellules de Müller interviennent directement ou indirectement dans la majorité de ces fonctions.

-Homéostasie osmotique : en conditions physiologiques, de l'eau s'accumule dans la rétine consécutivement à plusieurs mécanismes : comme coproduit de la synthèse d'ATP, par

pénétration depuis les vaisseaux sanguins, permettant notamment de capter divers nutriments tels que le glucose, et enfin en relation avec le maintien de la pression intraoculaire (Marmor, 1999). L'eau est évacuée de la rétine en continu par l'action conjointe de l'EPR (Pederson, 2006), qui l'évacue de l'espace sous-rétinien, et des cellules de Müller, qui l'évacuent du liquide interstitiel rétinien (Bringmann et al., 2004). Cette évacuation trans-cellulaire, couplée à une évacuation d'osmolytes (des ions notamment), est possible grâce à l'expression de protéines membranaires telles que les aquaporines (AQP), dont l'aquaporine 4 (AQP4) est la forme majoritaire. L'expression conjointe des canaux à potassium Kir (K^+ inwardly rectifying) tels que Kir4.1 et de l'AQP4 dans des régions différentes de la membrane des cellules de Müller a introduit l'hypothèse, depuis confirmée, que le transport de l'eau à travers la cellule de Müller est étroitement lié à celui des ions K^+ (Nagelhus et al., 1998; Nagelhus et al., 1999; Kofuji et al., 2002; Jo et al., 2015). Cette co-expression spécifique des canaux Kir4.1 et de l'AQP4 suggère que les écarts osmotiques entre le tissu rétinien, la circulation sanguine et le vitré sont compensés par l'entrée ou la sortie des ions K^+ et d'eau par les cellules de Müller.

-Métabolisme énergétique et soutien de l'activité neuronale : le métabolisme des cellules de Müller est orienté vers l'utilisation du glucose comme substrat énergétique pour la production d'ATP. Cette dernière repose quasi exclusivement sur la génération de lactate par la glycolyse (Poitry-Yamate and Tsacopoulos, 1991; Winkler et al., 2000). Cette particularité métabolique à fonctionner indépendamment des niveaux d'oxygène est désignée par l'effet Warburg. Il a notamment été proposé que cela soit un mécanisme d'épargne de l'oxygène pour les neurones environnants (Winkler et al., 2000). Si le lactate est généralement considéré comme un déchet métabolique de la glycolyse anaérobie, il semblerait que dans la rétine, le lactate produit par les cellules de Müller serve en réalité de substrat énergétique pour les neurones. En effet, les neurones sont des cellules énergivores, dont la production d'énergie dépend uniquement du métabolisme du glucose. Or, les neurones n'étant pas directement en contact avec les vaisseaux sanguins alimentant la rétine, ces derniers doivent nécessairement recevoir leurs substrats par l'intermédiaire d'autres types cellulaires. Les cellules de Müller étant directement reliées aux vaisseaux sanguins d'une part, et aux neurones d'autre part, en sont les pourvoyeurs désignés. Les cellules de Müller sont en effet capables de capter le glucose des vaisseaux sanguins grâce à la présence de transporteurs de la famille GLUT (Kumagai et al., 1994). Le lactate ainsi produit par les cellules de Müller est exporté à l'extérieur de la cellule par l'intermédiaire du transporteur MCT4

(Monocarboxylate Transporter 4) (Chidlow et al., 2005) avant d'être incorporé au sein d'un neurone où il sera converti en ATP par voie aérobie grâce au cycle de Krebs **(Figure 13)** (Poitry-Yamate et al., 1995; Winkler et al., 2000).

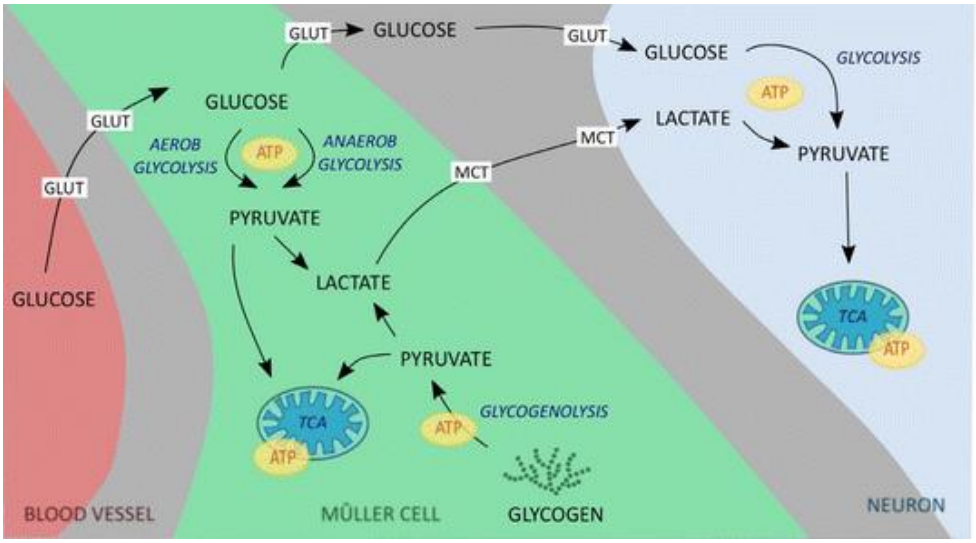

Figure 13 : Représentation schématique du métabolisme glycolytique de la cellule de Müller et des échanges avec les neurones. Les cellules de Müller absorbent le glucose de la circulation sanguine et le convertissent en lactate. Ce dernier sera ensuite exporté vers les neurones qui pourront l'utiliser comme substrat énergétique. Adapté de Toft-Kehler et al., (2018).

-Neurotransmission : dans la rétine, la transmission de l'information nerveuse au niveau des synapses passe notamment par la sécrétion de glutamate, qui est un neurotransmetteur excitateur. Bien qu'indispensable au traitement de l'information visuelle, le glutamate présente une certaine excitotoxicité, et doit de ce fait être évacué des fentes synaptiques. Les extensions des cellules de Müller enveloppant les synapses possèdent justement des transporteurs spécifiques des acides aminés excitateurs (EAAT), capables de capter le glutamate présent dans la fente synaptique et de le transporter à l'intérieur de la cellule de Müller (Rauen et al., 1996; Rauen et al., 1998; Kanai and Hediger, 2004). Une fois absorbé par la cellule de Müller, le glutamate est converti en glutamine par l'action de la glutamine synthétase (GS) (Derouiche and Rauen, 1995; Danbolt, 2001), enzyme spécifiquement exprimée dans la rétine par les cellules de Müller (Riepe and Norenburg, 1977). La glutamine néo-synthétisée pourra alors être envoyée vers le neurone présynaptique et convertie en glutamate, qui sera de nouveau libéré lors de la réception d'un potentiel d'action **(Figure 14)**.

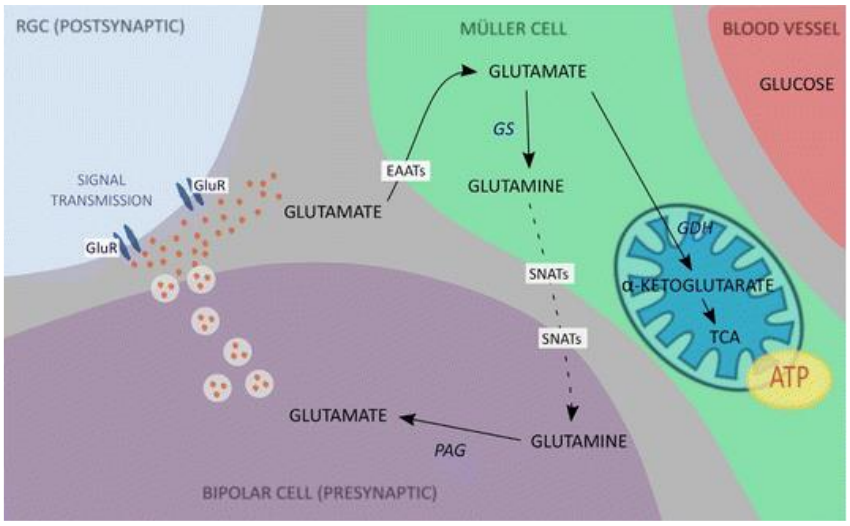

Figure 14 : Représentation schématique du recyclage du glutamate neuronal par les cellules de Müller. Les cellules de Müller absorbent le glutamate des fentes synaptiques et le convertissent en glutamine afin limiter son excitotoxicité. La glutamine est ensuite transportée dans les neurones qui pourront la convertir en glutamate afin de générer un nouveau message nerveux. Adapté de Toft-Kehler et al., (2018).

-Guidage et transmission de l'information lumineuse : chez les mammifères, l'organisation structurale de la rétine implique que la lumière traverse l'intégralité des couches rétiniennes avant d'atteindre les photorécepteurs, qui eux-mêmes génèrent un signal nerveux par le mécanisme de la phototransduction. Or, les cellules n'étant ni vides ni transparentes, elles constituent un obstacle naturel à la propagation de la lumière, qu'elles dispersent (Zernike, 1955; Tuchin, 2015). L'existence de structures permettant de limiter la dispersion lumineuse au sein de la rétine a ainsi été suggérée. Les études ont par la suite montré que ce rôle est joué par les cellules de Müller : un rayon lumineux atteignant le pied d'une cellule de Müller sera transporté à travers la rétine en ne subissant que peu de dispersion, notamment grâce à son faible indice de réfraction (Enoch and Tobey, 1981), tandis qu'un rayon lumineux atteignant l'espace adjacent entre deux pieds de cellules de Müller subira une dispersion beaucoup plus importante, générant par la même occasion un signal de moindre amplitude par le photorécepteur (Agte et al., 2011). Les cellules de Müller joueraient ainsi un rôle de fibre optique dans la rétine (Franze et al., 2007; Agte et al., 2011), guidant la lumière depuis la rétine interne jusqu'à la rétine externe (Figure 19 D).

-Barrière hémato-rétinienne et rôles vasculaires : dans la rétine, les vaisseaux sanguins sont étroitement liés aux cellules de Müller, qui les enveloppent. Elles ont ainsi une position privilégiée pour jouer un rôle dans la régulation des échanges bidirectionnels avec la circulation. Par leur capacité à sécréter de nombreux facteurs, elles sont à même de renforcer le rôle de barrière des cellules endothéliales (Tout et al., 1993; Tretiach et al., 2005). En condition physiologiques et chez

l'adulte, elles joueraient un rôle angiostatique, inhibant la néovascularisation pathologique en fournissant un environnement antiprolifératif (Eichler et al., 2004a; Yafai et al., 2014), notamment par la sécrétion du Facteur de croissance transformant (TGF-β2), du Facteur dérivé de l'épithélium pigmentaire (PEDF) et de la Thrombospondine-1 (TSP-1) (Eichler et al., 2004a; Yafai et al., 2007; Yafai et al., 2014).

Véritables pierres angulaires de la rétine, les cellules de Müller ne sont pourtant pas les seules cellules macrogliales à participer à sa physiologie. Elles sont notamment accompagnées par d'autres cellules macrogliales : les astrocytes.

c. Les astrocytes

Le terme astrocyte, introduit pour la première fois en 1895 par Michael von Lenhossek, provient des mots issus du grec ancien « astron » (« αστρον » - étoile) et « kytos » (« κυθοσ » - cellule), se traduisant littéralement par « cellule étoilée ». Identifiés par Ramon y Cajal à la fin du XIXe siècle grâce à sa méthode de marquage à l'or et au chloride de mercure, les astrocytes possèdent en effet de nombreuses ramifications (dendrites) qui leur confèrent cette forme étoilée si particulière et caractéristique **(Figure 15)**. Bien qu'encore non caractérisés lors de leur découverte, Ramon y Cajal les a mis en évidence dans le cerveau puis la rétine (Ramón y Cajal, 1893). Si leur origine dans la rétine est longtemps restée controversée, elle a été pu être résolue grâce à des études *in vitro* menées sur le nerf optique du rat dans les années 1980 (Raff et al., 1983; Raff et al., 1984; Miller et al., 1989).

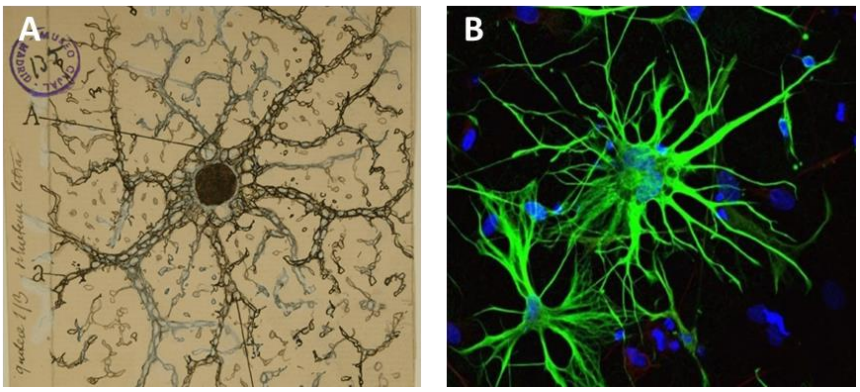

Figure 15 : Morphologie astrocytaire. A : Dessin d'observation d'un astrocyte par Ramon y Cajal **; B :** Astrocyte marqué par une protéine fluorescente (GFP) en microscopie confocale. Adapté de https://www.axolbio.com/page/human-ipsc-derived-astrocytes

En effet, les cellules progénitrices et astrocytes immatures sont originaires du système nerveux central, d'où ils migrent vers la rétine par le nerf optique (Stone and Dreher, 1987; Watanabe and Raff, 1988). Au cours de cette phase de migration, les différentes cellules progénitrices et immatures subissent plusieurs étapes de différenciation. Les astrocytes immatures, caractérisés par l'expression de Pax2 (Paired-box gene 2), cessent progressivement d'exprimer la vimentine, une protéine du cytosquelette, au profit de la GFAP (Glial Fibrillar Acid Protein), une protéine des filaments intermédiaire. Enfin, les astrocytes cessent d'exprimer Pax2. Les astrocytes matures ne sont alors plus caractérisés que par une forte expression de GFAP **(Figure 16B)**.

Des études menées sur des rétines de rat ont montré que les astrocytes immatures sont caractérisés par une grande capacité de prolifération, tandis que les cellules progénitrices sont plutôt caractérisées par une forte capacité de migration (Miller et al., 1985; Orentas and Miller, 1996; Chu et al., 2001; Chan-Ling et al., 2009). Ces particularités permettent ainsi la mise en place d'un motif de distribution spatiale où la majorité des astrocytes GFAP-positifs sont concentrés dans la rétine centrale, à proximité de la tête du nerf optique, tandis que les cellules progénitrices diffusent vers la rétine périphérique en créant un front de migration **(Figure 16B)**. Par ailleurs, la migration des astrocytes au sein de la rétine repose notamment sur les cellules ganglionnaires : les astrocytes immatures migrent en suivant les axones de ces dernières, qui leur confèrent un support fonctionnel d'orientation et de dispersion centrifuge depuis le centre de la rétine (O'Sullivan et al., 2017). En conséquence, le réseau astrocytaire présente de nombreuses irrégularités dans les modèles murins déficients en cellules ganglionnaires (Edwards et al., 2012). Cette interaction reposerait notamment sur le PDGF -A (Platelet-Derived Growth Factor A), un facteur de croissance sécrété par les cellules ganglionnaires (Mudhar et al., 1993; Fruttiger et al., 1996; Fruttiger et al., 2000; Tao and Zhang, 2016).

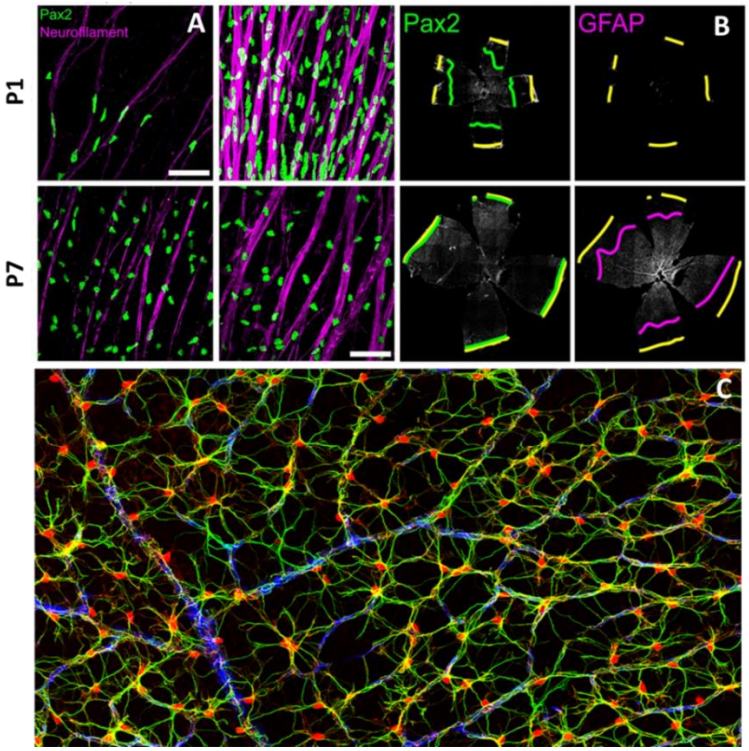

Figure 16 : Migration des astrocytes au cours du développement de la rétine et mise en place du réseau astrocytaire. A : Marquages immunohistochimiques de rétines montées à plat. Les astrocytes immatures (Pax2, vert) migrent le long des axones des cellules ganglionnaires (neurofilaments, violet) au cours du développement de la rétine (P1 *vs* P7). **B** : Montage à plat (flatmount) de rétines de souris à différentes étapes du développement rétinien post natal (P1,P7). Les astrocytes en cours de maturation expriment progressivement la GFAP (violet). Adapté de O'Sullivan et al. (2017). **C :** Réseau astrocytaire rétinien. Microphotographie d'une rétine de souris montée à plat (flatmount) en microscopie confocale après immunomarquage. Les astrocytes apparaissent en vert, leur noyau cellulaire en rouge, et le réseau vasculaire rétinien en bleu. Adapté de « 2017 Wellcome Image Award » (http://www.wellcomeimageawards.org/2017/)

La présence des astrocytes dans la rétine se limite aux couches les plus superficielles de la rétine, à savoir la couche des fibres nerveuses. Ils y forment un réseau réticulé sur un seul plan, dit en « nids d'abeille ». Le nombre d'astrocytes et leur distribution dépendent notamment de la densité des fibres nerveuses qu'ils enveloppent (Rungger-Brandle et al., 1993). Les astrocytes sont également plus nombreux et plus gros autour des veines que des artères (Jammalamadaka et al., 2015). Ceci serait notamment dû au fait que les astrocytes au contact des veines sont chargés d'évacuer les déchets métaboliques et cytotoxiques, ce qui représenterait une tâche physiologique de première importance, nécessitant ainsi de plus gros corps cellulaires afin d'assurer une évacuation plus importante de ces derniers. Enfin, il est intéressant de noter que les différences inter-espèces entre les astrocytes peuvent être importantes au niveau morphologique. Les astrocytes humains sont ainsi par exemple beaucoup plus larges avec un nombre de ramifications significativement plus conséquent que ceux des rongeurs **(Figure 17)**. Ces particularités ont notamment conduit à

l'hypothèse selon laquelle l'augmentation des capacités fonctionnelles et cognitives de l'être humain a été possible grâce à la complexification de ses astrocytes (Oberheim et al., 2009).

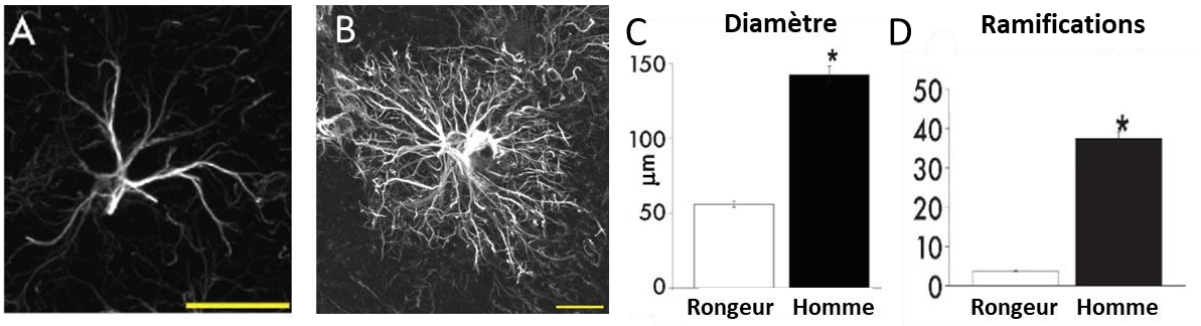

Figure 17 : Caractéristiques et variations morphologiques des astrocytes selon l'espèce animale. Microphotographies confocales d'astrocytes de souris (A) et humains (B) marqués avec un anticorps anti-GFAP. Le diamètre (C) et le nombre de ramifications (D) des astrocytes humains sont significativement supérieurs à ceux de la souris. Echelle : 20µm. Adapté de Oberheim et al., (2009).

Au niveau fonctionnel, les astrocytes exercent globalement des fonctions similaires aux cellules de Müller dans la rétine. Ils sont ainsi impliqués :

-dans l'homéostasie osmotique, notamment *via* la présence de canaux AQP4 (Nagelhus and Ottersen, 2013);

-dans la neurotransmission : les astrocytes enveloppent en effet les synapses de la même façon que les cellules de Müller. Cette observation a d'ailleurs donné naissance au concept de synapse tripartie (Araque et al., 1999; Halassa et al., 2007; Perea et al., 2009), stipulant que la synapse ne peut être considérée seulement en fonction des neurones pré et post-synaptiques, mais en incluant nécessairement la cellule gliale du fait de ses échanges bidirectionnels avec les deux autres parties et de l'influence directe qu'elle exerce sur l'activité synaptique. Dans cette configuration, les astrocytes possèdent un rôle ambivalent : d'un côté ils sont sensibles aux signaux en provenance de la synapse grâce à la présence de nombreux récepteurs, et de l'autre, ils sont capables de moduler directement l'activité synaptique en produisant divers transmetteurs tels que le glutamate, l'acide gamma-aminobutyrique (GABA), l'ATP ou encore de la D-sérine (Stevens et al., 2003; Papouin et al., 2012; Li et al., 2018), capable d'augmenter la réponse des cellules ganglionnaires induite par la réception d'un message lumineux (Stevens et al., 2003) ;

-dans le métabolisme énergétique des neurones. En captant le glucose de la circulation, les astrocytes, comme les cellules de Müller, vont produire du lactate qui servira de substrat énergétique aux neurones (Tsacopoulos and Magistretti, 1996) ;

-dans la barrière hémato-rétinienne : de façon similaire aux cellules de Müller, les prolongements des astrocytes entourent les vaisseaux sanguins et sont en contact direct avec les cellules endothéliales, créant ainsi un premier niveau de filtration depuis la circulation sanguine (Yao et al., 2014). La mise en place de cette barrière implique des mécanismes complexes ainsi qu'une coordination particulière entre les cellules endothéliales et les astrocytes (Yao H. et al. 2014). Ces derniers sont capables de réguler la perméabilité endothéliale (Dehouck et al., 1990; Choi and Kim, 2008; Yao et al., 2014), notamment par la production de cytokines telles que la zonula occludens-1 (ZO-1), les claudines et les occludines (Smith et al., 2016), ou encore l'angiopoïétine 1 (ANGPT1) (Thurston et al., 1999).

Enfin, il a été montré que les astrocytes jouent également un rôle crucial dans le développement et la mise en place du réseau vasculaire rétinien à travers notamment le guidage de la croissance vasculaire (Fruttiger et al., 1996; Uemura et al., 2006; Gnanaguru et al., 2013; Tao and Zhang, 2016; O'Sullivan et al., 2017).

C. Vascularisation et angiogenèse

La rétine est un tissu doublement isolé : isolée de l'environnement extérieur par les structures de l'œil d'un côté, mais également isolée de la circulation générale interne de l'organisme de l'autre côté. Afin d'assurer les apports vitaux en nutriments et de permettre l'évacuation des déchets métaboliques, plusieurs réseaux vasculaires se mettent ainsi en place au cours du développement de l'individu. Le réseau vasculaire hyaloïdien se développe au cours de la gestation, permettant ainsi la croissance et la maturation fœtale de la rétine, avant de laisser place au réseau vasculaire rétinien mature. Ce réseau vasculaire de la rétine interne est épaulé dans sa fonction par la vasculature choroïdienne, située à la périphérie basale de l'EPR. Ce double réseau permet ainsi d'assurer les échanges bidirectionnels rétine/circulation sanguine aux deux pôles de la rétine. Le réseau vasculaire rétinien n'est cependant pas complètement figé et peut-être amené à évoluer, notamment en contexte pathologique. Les altérations du réseau vasculaire rétinien consécutifs à certaines pathologies peuvent alors conduire à des troubles de la vision, voir à la cécité dans les cas les plus graves.

1. Mécanismes physiologiques

Au cours du développement embryonnaire, l'artère ophtalmique, issue de l'artère carotide interne, va se ramifier pour donner naissance à l'artère hyaloïde, qui émerge de la tige optique *via* la fissure optique. L'artère hyaloïde va ensuite elle aussi se ramifier, créant un réseau d'artères traversant le vitré primitif jusqu'à l'avant de l'œil, au niveau de la face postérieuer du cristallin, couvrant ainsi l'espace lentoretinien dans un axe antéro-postérieur **(Figure 18)**. Ces artères sont ensuite drainées dans les veines vortiqueuses de la choroïde (Saint-Geniez and D'Amore, 2004; Selvam et al., 2018).

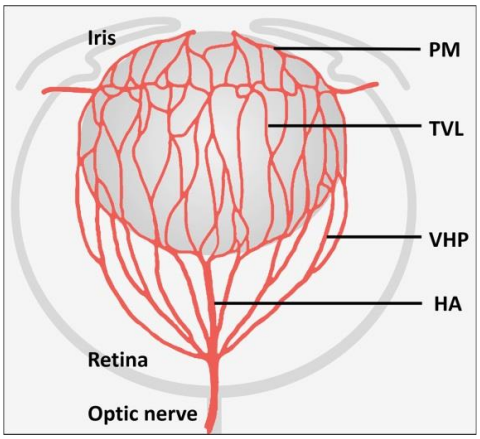

Figure 18 : Représentation schématique du réseau vasculaire hyaloïdien chez l'Homme au cours de l'embryogenèse. L'artère hyaloïde (HA) émerge depuis la tête du nerf optique, forme des ramifications au niveau de la face postérieure du cristallin pour forme la tunique vasculaire du cristallin (*Tunica Vasculosa Lentis* - TVL) et se projette à l'avant de l'œil pour former la membrane pupillaire (PM). La *Vasa Hyaloidea Propria* (VHP) s'anastomose avec le TVL depuis l'artère hyaloïde pour traverser le vitré et alimenter en nutriments le cristallin. Adapté de Selvam et al., (2018).

Chez l'Homme, la régression du réseau vasculaire hyaloïdien débute à environ 13 semaines de gestation (Zhu et al., 2000), afin de laisser place à la formation du réseau vasculaire rétinien, dont l'initiation démarre à partir de la tête du nerf optique à environ 15 semaines de gestation (Provis, 2001), pour atteindre la rétine périphérique à 40 semaines (Provis, 2001; Gariano, 2003). La formation du réseau vasculaire rétinien est ainsi achevée à la naissance ou dans les jours qui suivent chez les nouveau-nés à terme (Hughes et al., 2000). Cette vascularisation repose sur deux mécanismes distincts : la vasculogenèse et l'angiogenèse (Hughes et al., 2000; McLeod et al., 2006). La vasculogenèse correspond à la formation *de novo* des vaisseaux. Ces derniers se forment à partir de l'agrégation de cellules progénitrices vasculaires (VPCs, Vascular Precursor Cells) en cordes vasculaires, et se différencient afin de former les tubes endothéliaux primitifs. L'angiogenèse correspond quant à elle à la formation de nouveaux vaisseaux à partir de vaisseaux préexistants. Ce processus met en jeu la migration et la prolifération cellules vasculaires endothéliales (Chan-Ling et al., 1990).

La vasculogenèse est le premier phénomène à intervenir dans le développement de la vascularisation rétinienne ; elle est détectable dans la rétine humaine dès 12 semaines de gestation (Hughes et al., 2000). Les VPCs migrent de manière centrifuge depuis la tête du nerf optique vers la périphérie dès les 14ème -15ème semaines de gestation. Les cordes primitives forment alors progressivement un réseau vasculaire primitif, progressant selon un schéma à quatre lobes, qui deviendront les quatre paires majeures artère-veine observées dans la rétine adulte. Le processus de vasculogenèse s'achève lors de la 21ème semaine de gestation, avec la mise en place du plexus vasculaire primaire (ou superficiel). Vient ensuite le développement du réseau capillaire par angiogenèse. Elle démarre dans les régions autour de la *fovea* entre la 25ème et 26ème semaine (Hughes et al., 2000; Provis, 2001; Fruttiger, 2007), avec l'apparition de bourgeons néovasculaires et des premières ramifications du plexus superficiel, qui apparaissent au niveau de la jonction entre la couche nucléaire interne et la couche plexiforme externe. Cette étape coïncide avec la période d'ouverture de l'œil. Les bourgeons néovasculaires pénètrent ensuite dans la rétine, établissant le plexus profond créant ainsi deux réseaux parallèles de part et d'autre de la couche nucléaire interne **(Figure 19)** (Gariano et al., 1994; Dorrell and Friedlander, 2006). L'émergence de ce dernier s'effectue, comme pour le plexus primaire, de manière centrifuge, à savoir depuis le centre vers la périphérie.

La formation du plexus externe (profond) coïncide avec la progression de la maturation de la neurorétine, suggérant ainsi que la demande métabolique croissante des neurones produirait une sorte de message local d'hypoxie physiologique, non délétère mais suffisante pour indiquer une augmentation des besoins métaboliques et en oxygène, capable d'induire la croissance vasculaire dans ces zones (Chan-Ling et al., 1995). Dès le milieu du siècle dernier, il a été suspecté que la demande en oxygène d'un tissu déclenche la formation de vaisseaux sanguins, et qu'un facteur de croissance vasculaire hypoxie-dépendant en serait à l'origine (Michaelson et al., 1954). Le rôle central de l'oxygène dans le contrôle du développement vasculaire rétinien a ensuite été démontré par les travaux de Patz et Ashton (Ashton and Cook, 1954; Ashton et al., 1954; Patz and Eastham, 1957; Ashton, 1966), suivi par de nouvelles études identifiant l'implication du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) dans la rétine (Chen and Chen, 1984, 1987; Phillips et al., 1994), caractérisant le rôle de l'oxygène dans ces mécanismes (Phelps, 1990), et suggérant que le schéma du développement vasculaire imite celui du développement des neurones rétiniens (Chan-Ling et al., 1990; Hughes et al., 2000; O'Sullivan et al., 2017). Ces observations ont amené à proposer ce modèle d'hypoxie physiologique comme stimulus de l'angiogenèse rétinienne (Chan-Ling et al., 1995). Ce concept fut notamment étayé par l'expression du facteur inductible par l'hypoxie, HIF-1a (Semenza and Wang, 1992), qui entraine l'expression du VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) (Forsythe

et al., 1996; Stone and Maslim, 1997). Or, il s'avère que l'angiogenèse rétinienne est justement concomitante non seulement de l'augmentation de la demande métabolique, mais aussi de l'expression croissante du VEGF, notamment par les cellules gliales (Stone et al., 1995; Provis et al., 1997).

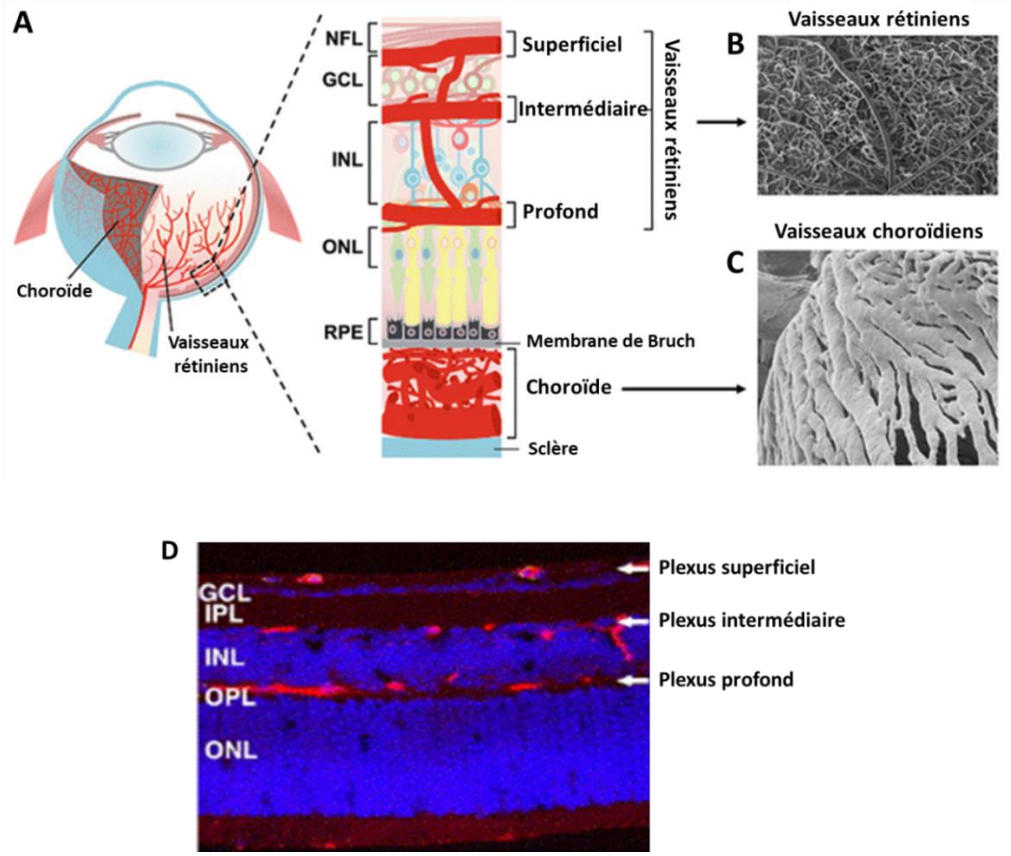

Figure 19 : Structure vasculaire rétinienne. A : Représentation schématique d'une coupe transversale de rétine. Les vaisseaux du plexus superficiel sont situés à l'interface de la couche des fibres nerveuses (NFL) et des cellules ganglionnaire (GCL). Le plexus intermédiaire est situé entre la couche des cellules ganglionnaires et la couche nucléaire interne (INL), tandis que le plexus profond est situé entre les couches nucléaire interne (INL) et externe (ONL). Les vaisseaux choroïdiens alimentant la rétine externe sont quant à eux situés à l'interface de la membrane de Bruch dans la choroïde, entre l'épithélium pigmentaire rétinien (RPE) et la sclère **B :** microphotographie des vaisseaux du réseau vasculaire interne de la rétine chez la souris. **C :** microphotographie des vaisseaux du réseau vasculaire choroïdien de la souris. Adapté de Chen, Liu and Sapieha (2016). **D :** Marquage immunohistochimique du réseau vasculaire rétinien à l'isolectin-B4 (ILB4) (en rouge) sur une coupe transversale de rétine de souris adulte. Les noyaux cellulaires sont marqués au DAPI et apparaissent en bleu. Adapté de Dorell and Friedlander (2006). GCL : couche des cellules ganglionnaires, INL : couche nucléaire interne, NFL : couche des fibres nerveuses, ONL : couche nucléaire externe, RPE : épithélium pigmentaire rétinien.

Chez les espèces de mammifères dont la rétine est avasculaire (cobaye, lapin, échidnés), la distribution de l'oxygène dans la rétine se fait uniquement par l'intermédiaire des vaisseaux choroïdiens, adjacents à la rétine. La présence de vaisseaux internes à la rétine est ainsi corrélée avec l'épaisseur de cette dernière, puisque les rétines vascularisées sont en moyenne 60% plus épaisses que leurs homologues avasculaires (Chase, 1982; Buttery et al., 1991; Dreher et al., 1992). La mise en place du réseau vasculaire rétinien selon ce schéma de plexus primaires et profonds apparait bien conservée chez les mammifères à rétine vasculaire, tels les primates et la souris, et s'effectue selon un même schéma temporel (Gariano and Gardner, 2005). Le réseau vasculaire rétinien de la souris présente toutefois la particularité de se développer après la naissance. Combiné aux similitudes avec l'Homme dans les mécanismes cellulaires de ce développement, la souris constitue à cet égard un bon modèle d'étude du développement vasculaire rétinien. En effet, chez la souris les premiers vaisseaux émergent de la tête du nerf optique dans les jours suivant la naissance (3ème jour, P3). De la même manière que chez l'Homme, les vaisseaux vont suivre la trame établie par le réseau astrocytaire (Sapieha, 2012; O'Sullivan et al., 2017) et former le plexus primaire (superficiel) qui atteindra la rétine périphérique environ 7 à 10 jours après la naissance (P7-P10) **(Figure 20)** (Dorrell and Friedlander, 2006; Fruttiger, 2007; Stahl et al., 2010). Les capillaires commencent alors à se diriger plus en profondeur dans la rétine à partir des bourgeons du plexus primaire, jusqu'à établir le plexus profond de part et d'autre de la couche nucléaire interne entre P8 et P12 (Stahl et al., 2010). Le plexus intermédiaire, situé entre la couche des cellules ganglionnaires et la couche nucléaire interne **(Figure 19)** s'établit entre P14 et P20 (Dorrell and Friedlander, 2006) et est donc le dernier à prendre forme. Le réseau vasculaire rétinien est ainsi complètement achevé à la 3ème semaine de vie post-natale (P21) (Dorrell and Friedlander, 2006; Stahl et al., 2010).

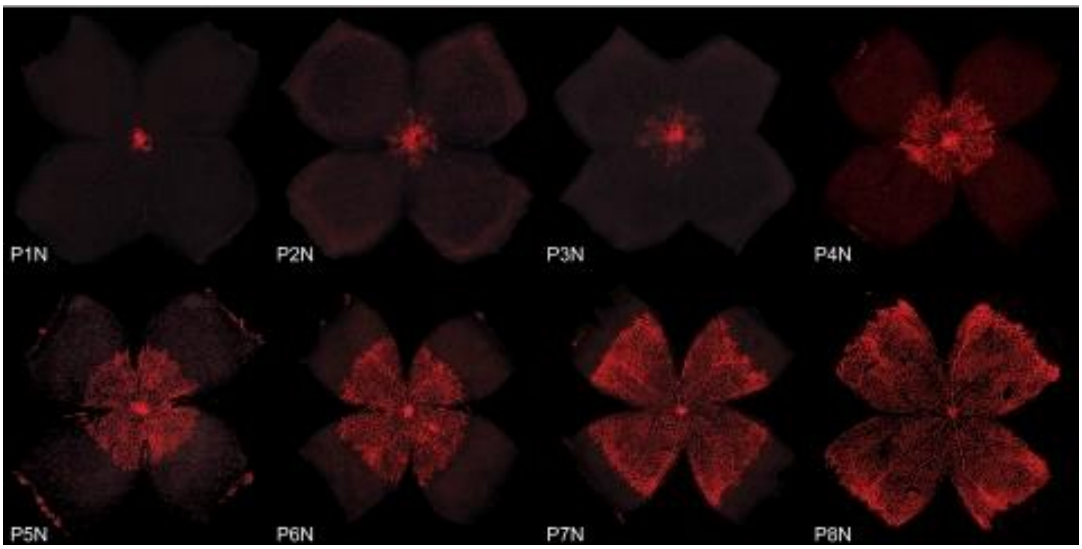

Figure 20 : Développement centrifuge du réseau vasculaire rétinien de la souris. Le réseau vasculaire rétinien superficiel est immunomarqué par des anticorps anti-ILB4 (rouge) entre le premier (P1N) et le 8e jour de vie (P8N). Adapté de Stahl et al., (2010).

Par ailleurs, le réseau astrocytaire entretient des liens étroits avec le réseau vasculaire rétinien. Il est en effet connu depuis la fin des années 1980 que les astrocytes co-localisent avec les vaisseaux sanguins : les régions fortement vascularisées sont ainsi riches en astrocytes et inversement. Ainsi, chez les espèces possédant une rétine avasculaire, comme le lapin par exemple, la présence d'astrocytes reste confinée à la région médullaire de la couche des fibres nerveuses, seule zone où sont détectables des vaisseaux sanguins (Trivino et al., 1997). Sachant que la présence des astrocytes dans la rétine est antérieure à celles des cellules endothéliales, il a été proposé que le réseau astrocytaire forme une trame à partir de laquelle se formera le réseau vasculaire rétinien. Cette hypothèse a depuis été vérifiée par de nombreuses études qui montrent que les astrocytes jouent un rôle critique dans l'angiogenèse rétinienne (Fruttiger et al., 1996; Uemura et al., 2006; Gnanaguru et al., 2013; Duan et al., 2014; Tao and Zhang, 2016; O'Sullivan et al., 2017), notamment *via* la production de VEGF, facteur de croissance vasculaire dont ils sont un pourvoyeur majeur dans la rétine (Stone et al., 1995; Ozaki et al., 2000). Le guidage du réseau vasculaire ne dépendrait cependant pas uniquement de la production de VEGF. En effet, l'inhibition spécifique de la sécrétion de VEGF par les astrocytes n'est pas suffisante pour altérer le développement vasculaire normal. Cela s'explique par le fait que, d'une part, d'autres cellules sont également capables de produire le VEGF (notamment les cellules de Müller), et par le fait que d'autre part, les astrocytes confèrent un support physique au contact duquel les cellules endothéliales peuvent effectuer leur migration. De nombreuses protéines de la membrane des astrocytes semblent ainsi impliquées dans ce rôle de guidage physique, telles que les laminines (Kitajewski, 2011; Gnanaguru et al., 2013), les intégrines (Hirota et al., 2011; Samarelli et al., 2014), les dystrophines (Giocanti-Auregan et al. 2016), les

protéoglycanes (Stenzel et al., 2011) ou encore la R-Cadhérine **(Figure 21)** (Dorrell et al., 2002; Fruttiger, 2007). On ignore encore cependant s'il existe une protéine spécifique des astrocytes permettant l'interaction protéine-protéine entre ces derniers et les cellules endothéliales, ou si un ensemble particulier de ces protéines est nécessaire.

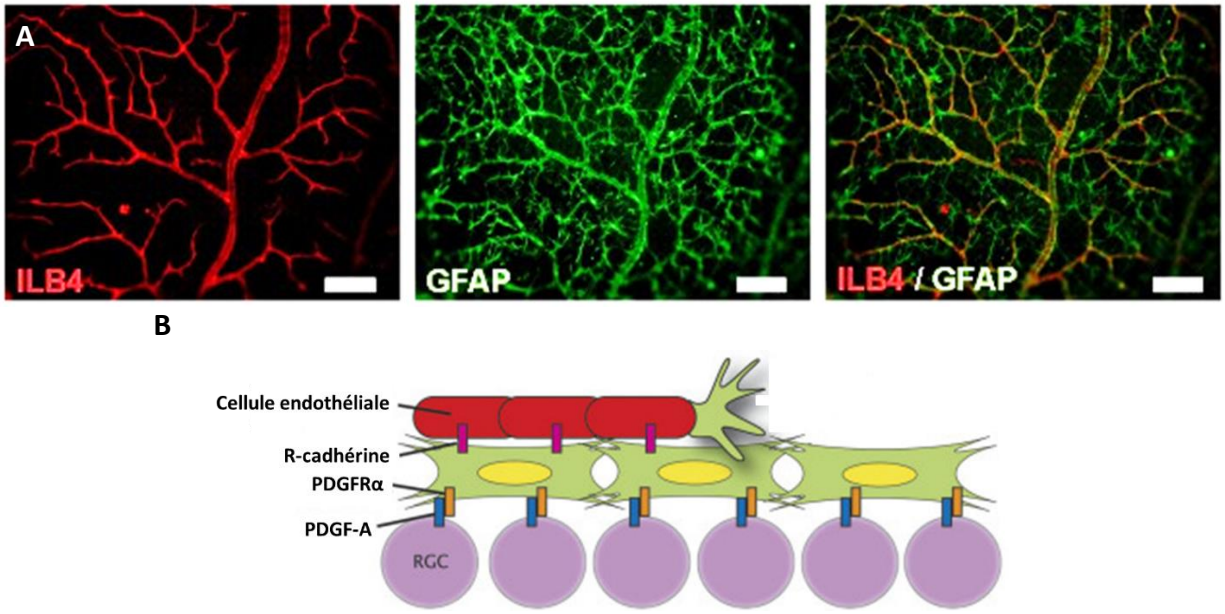

Figure 21 : Rôle de la trame astrocytaire dans le développement vasculaire rétinien. A : Réseaux vasculaires et astrocytaires rétiniens respectivement immunomarqués à l'ILB4 (rouge) et à la GFAP (vert). Microphotographies obtenues sur des rétines de souris montées à plat (flat-mount). Adapté de Saab et al., (2014). **B :** Représentation schématique du modèle de mise en place du réseau vasculaire rétinien sur la trame astrocytaire à partir du motif de distribution des cellules ganglionnaires (RGC). Adapté de Sapieha (2012).

Par ailleurs, la mise en place du réseau vasculaire ne peut se faire qu'au contact d'astrocytes matures. La délétion spécifique dans les astrocytes de Sox2, un facteur de transcription, impacte négativement leur maturation en induisant un retard dans l'expression de la GFAP, ce qui a pour effet d'entrainer un retard de l'angiogenèse centro-périphérique de la rétine, dont certaines anomalies subsistent encore à l'âge adulte (Kautzman et al., 2018).

Si la vasculature rétinienne n'évolue globalement plus une fois sa structure adulte acquise, elle peut toutefois faire l'objet de diverses altérations et remodelages en contexte pathologique inflammatoire, comme au cours de certaines rétinopathies telles que la rétinopathie diabétique ou la rétinopathie du prématuré.

2. Mécanismes pathologiques

Certains contextes physiopathologiques entrainent des altérations structurales et fonctionnelles du réseau vasculaire rétinien. On pourra ainsi mentionner certaines rétinopathies, comme la rétinopathie diabétique ou la rétinopathie du prématuré (ROP), qui se caractérisent par des phénomènes d'hypoxie et de néovascularisation. Bien que d'étiologies distinctes, ces pathologies présentent certains mécanismes cellulaires et moléculaires communs, et les cellules gliales semblent y jouer des rôles prépondérants.

a Mécanismes cellulaires et rôle des cellules gliales dans les altérations pathologiques de la vascularisation rétinienne

- Cellules de Müller

De nombreuses études se sont penchées sur le rôle joué par les cellules de Müller dans la physiopathologie rétinienne. Il a par exemple été montré que l'ablation spécifique et conditionnelle des cellules de Müller dans la rétine conduit à une disruption de la barrière hémato-rétinienne et à une néovascularisation importante, entrainant ainsi des fuites vasculaires, notamment en raison d'une moindre expression de la Claudine-5, protéine des jonctions serrées (Shen et al., 2012). De plus, les cellules de Müller peuvent sécréter différents facteurs pro-angiogéniques tels que le VEGF, le TNF-α ou la netrine-4, qui entrainent une néovascularisation et une augmentation de la perméabilité vasculaire (Eichler et al., 2004b; Yafai et al., 2004; Lange and Bainbridge, 2012; Kociok et al., 2016; Le, 2017). Il a par ailleurs été montré *via* un modèle de déficience spécifique inductible (Cre/lox) que le VEGF produit par les cellules de Müller est indispensable à la néovascularisation ainsi qu'aux diverses altérations vasculaires pathologiques induites par l'hypoxie (Bai et al., 2009; Le, 2017), ceci notamment en raison d'une influence directe sur les cellules endothéliales (Rodrigues et al., 2013; Li et al., 2019b). D'une manière assez similaire, l'inflammation et l'hypoxie entrainent la sécrétion d'interleukine-6 (IL-6) par les cellules de Müller, dont le rôle pro-angiogénique dans les phénomènes de néovascularisation a été démontré (Yoshida et al., 2001; Rojas et al., 2010; Liu et al., 2015). Les cellules de Müller produisent par ailleurs des protéines particulières, les matrix metalloproteinases (MMP) (Behzadian et al., 2001; Noda et al., 2005; Rodrigues et al., 2013), qui participent à l'altération de la perméabilité vasculaire en dégradant les protéines des jonctions serrées des cellules endothéliales comme l'occludine **(Figure 22)** (Giebel et al., 2005). Ces dernières sont encore affaiblies par l'angiopoïétine-like 4 (ANGPTL4), protéine elle aussi sécrétée par les cellules de Müller au cours de l'hypoxie (Xin et al., 2013) et capable d'inhiber la liaison entre les

claudine-5 et VE-cadhérines (Huang et al., 2011; Xin et al., 2013). Les cellules de Müller peuvent ainsi aggraver le phénotype pathologique, comme le montre l'étude de Tretiach et collaborateurs, où la mise en co-culture de cellules endothéliales avec des cellules de Müller altère significativement leur capacité de barrière en condition hypoxique (Tretiach et al., 2005).

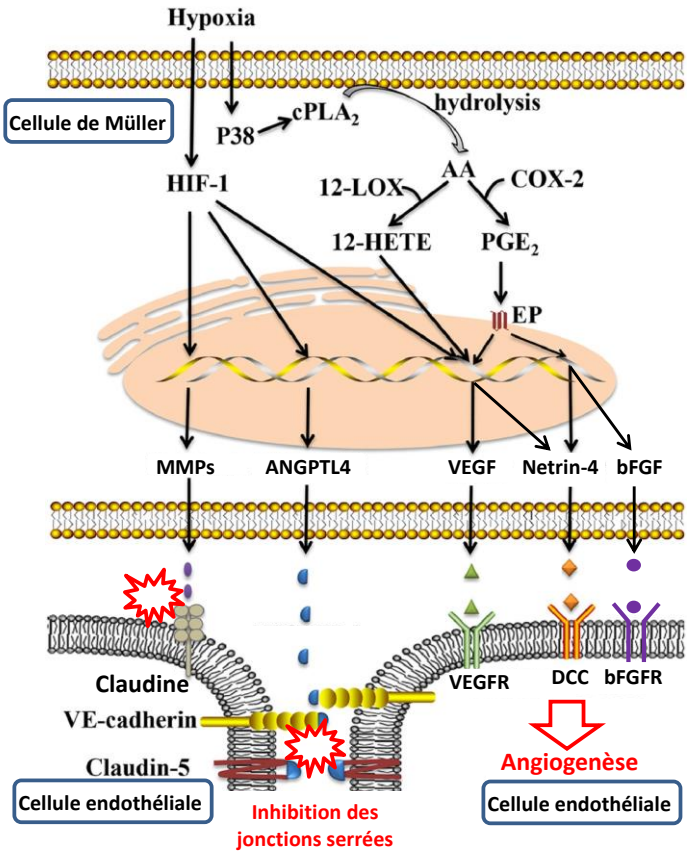

Figure 22 : Représentation schématique de l'implication des cellules de Müller dans les mécanismes pathologiques de néovascularisation et de perturbation de la barrière hémato-rétinienne. Adapté de Li et al., (2019).

- Astrocytes

Le rôle des astrocytes dans les altérations vasculaires associées aux rétinopathies semble quant à lui plus contrasté. Comme les cellules de Müller, les astrocytes sont capables de s'activer et de sécréter de nombreux facteurs en réponse à l'inflammation. Parmi ces mécanismes, la sécrétion de prostaglandine E2 (PGE2) consécutive de l'activation précoce de la cyclooxygénase-2 (COX-2) dans les astrocytes stimule l'expression du VEGF et favorise la néovascularisation en contexte ischémique (Sennlaub et al., 2003). Cependant, des études menées sur des modèles murins de rétinopathie diabétique et de rétinopathie induite par l'oxygène (OIR), présentant toutes deux une composante ischémique, ont montré une réduction de la densité astrocytaire préalable à l'apparition de la néovascularisation (Dorrell et al., 2010; Yu et al., 2015). La préservation des astrocytes en contexte ischémique est ainsi associée à une inhibition de la néovascularisation pathologique, suggérant un rôle protecteur des astrocytes vis-à-vis des rétinopathies à composante néovasculaire (Dorrell et al., 2010). Ceci pourrait notamment être dû à la capacité des astrocytes de sécréter des facteurs anti-angiogéniques (Hajrasouliha et al., 2013).

b Acteurs moléculaires

La néovascularisation associée aux rétinopathies à composante ischémique met en jeu un acteur moléculaire crucial : le facteur induit par l'hypoxie HIF. HIF est un hétérodimère de sous unités α et β (Wang and Semenza, 1995). HIF-1β en est la sous-unité constitutive, tandis que HIF-1α et HIF-2α sont des sous-unités fugaces, dont la durée de vie n'excède pas 5 minutes en conditions normoxiques (Salceda and Caro, 1997; Yu et al., 1998). Cette brève durée de vie est due à leur poly-ubiquitination par la protéine Von Hippel-Lindau (pVHL), qui les rend reconnaissables par le protéasome qui va alors les dégrader **(Figure 23A)**. En cas d'hypoxie, HIF-1α et HIF-2 α ne sont plus hydroxylés par les prolyl-hydroxylases oxygène-dépendantes. Ils vont alors subir une translocation nucléaire, où ils vont s'hétérodimériser avec HIF-1β, initiant la transcription de nombreux gènes en se liant à leur domaine de réponse à l'hypoxie : HRE (Hypoxia Response Element) **(Figure 23B)**. Différentes études ont montré que le blocage de la voie HIF-1α est capable d'inhiber la néovascularisation rétinienne, prouvant par là même le rôle central de ce facteur dans la régulation des mécanismes de l'angiogenèse (Xia et al., 2008; Jiang et al., 2009; Lin et al., 2011; Park et al., 2014). Bien que le rôle de HIF-1α soit le plus étudié et le plus décrit, il semblerait que HIF-2α soit lui aussi impliqué dans ces mécanismes de réponse à l'hypoxie puisque la délétion spécifique de ce dernier dans les astrocytes induit un développement partiel du réseau astrocytaire, ainsi qu'une réduction significative du réseau vasculaire rétinien et de la régression de la vasculature hyaloïdienne (Duan et al., 2014). De

récentes études suggèrent également que l'activation de HIF-2α jouerait un rôle prépondérant dans la réponse des cellules de Müller à l'hypoxie (Mowat et al., 2010).

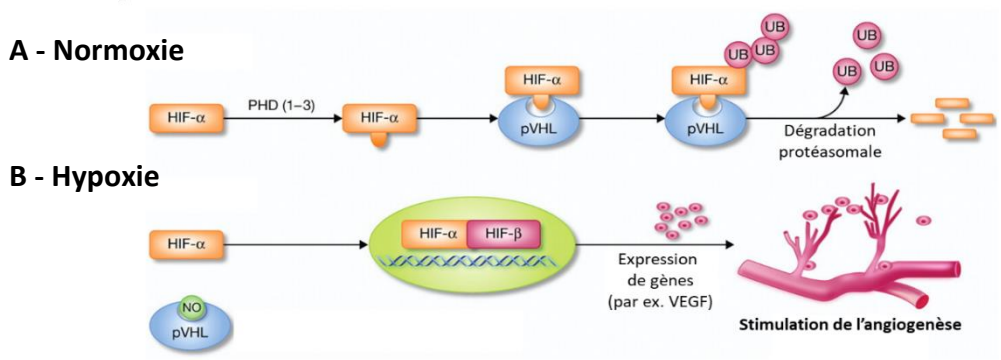

Figure 23 : Représentation schématique de la régulation de HIF. En conditions normoxiques (A), la sous-unité HIF-1α est reconnue par le pVHL et ubiquitinée, ce qui conduit à la dégradation. Rn confitions hypoxiques (B), HIF-1α n'est plus dégradé et peut alors être transloqué dans le noyau cellulaire où il va réguler l'expression de nombreux gènes, notamment de l'angiogenèse. Adapté de Rahimi. (2012).

Parmi les nombreux gènes ainsi régulés par HIF figure notamment le VEGF, qui fait l'objet d'une régulation positive (Forsythe et al., 1996). Initialement découvert comme facteur de perméabilité vasculaire dans le contexte tumoral (Senger et al., 1983), son rôle de mitogène des cellules endothéliales vasculaires a rapidement été identifié (Leung et al., 1989). Par la suite, plusieurs isoformes de VEGF ont été caractérisées (VEGF-A, B, C, D) (Park et al., 1993; Vempati et al., 2014). La néovascularisation pathologique repose essentiellement sur le VEGF-A, qui possède une affinité pour les récepteurs VEGFR-1 et 2, ce dernier étant responsable de la majorité des effets du VEGF-A. L'activation du récepteur VEGFR2 entraine ainsi l'activation de nombreuses voies de signalisation intracellulaire, comme la voie PI3K-Akt-mTOR, cruciale pour les mécanismes de survie, de vasodilatation et de régulation des jonctions intercellulaires, ou encore la voie PLCγ (Phospholipase C isoforme γ) – ERK 1/2 (Extracellular signal Regulated Kinases), qui contribue aux mécanismes de prolifération cellulaire (Hong et al., 2006; Wang et al., 2008; Eichmann and Simons, 2012; Simons et al., 2016).

Récemment, quelques études ont évoqué un nouvel acteur potentiel dans les mécanismes de néovascularisation rétinienne : le système endocannabinoïde. Le système endocannabinoïde repose d'un côté essentiellement sur deux ligands issus de l'acide arachidonique (un acide gras polyinsaturé ou AGPI de la série n-6), le N-arachidonoylethanolamide (anandamide, AEA) et le 2-arachidonoylglycérol (2-AG), et de l'autre côté sur leurs récepteurs principaux, les récepteurs aux

endocannabinoïdes 1 et 2 (CB1R, CB2R) (Schwitzer et al., 2016). Si son rôle dans la régulation de la neurotransmission est désormais bien décrit (Szabo and Schlicker, 2005; Zou and Kumar, 2018), une étude a montré que le récepteur CB1R serait impliqué dans la néovascularisation rétinienne observé chez un modèle murin de rétinopathie induite par l'oxygène (OIR) (Pisanti et al., 2011). Par la suite, d'autres études ont montré que l'administration d'analogues des endocannabinoïdes tel que le palmitoylethanolamide (PEA) était capable de moduler les altérations du développement vasculaire rétinien tout en exerçant un effet protecteur vis-à-vis de l'hypoxie et de la gliose (Holubiec et al., 2018; Portavella et al., 2018; Ye et al., 2020), renforçant ainsi l'idée que le système endocannabinoïde pourrait jouer un rôle dans l'apparition et/ou la sévérité des composantes néovasculaires observées dans les rétinopathies.

Enfin, si les mécanismes physiopathologiques conduisant aux altérations du réseau vasculaire rétinien se mettent en place au sein de la rétine, ces anomalies peuvent également être corrélées avec des modifications systémiques. Ainsi, on pourra mentionner l'exemple de la ROP, dont les concentrations sériques et dans le vitré de cytokines comme le VEGF, bFGF, l'IL-6, le TNF-a ou encore MCP-1 est associée à la probabilité de développer la pathologie (Sato et al., 2009a, b; Silveira et al., 2011; Yu et al., 2014; Hellgren et al., 2018).

3. La rétinopathie du prématuré (ROP)

Les premiers écrits mentionnant la ROP remontent aux années 1940. Theodore L. Terry a relevé l'existence d'une pathologie oculaire touchant les enfants prématurés, qu'il nomme alors fibroplasie rétrolentale (*retrolental fibroplasia*) (Terry, 1942). Bien qu'ayant établi un lien avec la prématurité, la cause précise de la pathologie n'était pas connue. Cependant, dès le début des années 1950, les travaux de Campbell, Crosse, Patz et Ashton (Campbell, 1951; Crosse and Evans, 1952; Patz et al., 1952; Ashton, 1954) suggèrent un lien avec l'hyperoxygénation. En effet, l'avancée de la médecine et des techniques de réanimation permettent alors de prendre en charge les prématurés et d'améliorer leur survie par une administration importante d'oxygène. Les travaux entrepris sur des modèles animaux ont montré que le placement des nouveau-nés en milieu hyperoxique (70-80% d'0_2) entraine une vaso-oblitération des capillaires, et que leur passage consécutif en atmosphère normoxique entraine un effet vaso-prolifératif. C'est ainsi que fut proposée pour la première fois l'hypothèse d'une pathogenèse en deux phases distinctes (Ashton, 1954). L'étude et la prise en charge de la ROP n'ont ensuite pas connu de réelle évolution jusque dans les années 80, date à laquelle la cryothérapie et la photocoagulation par laser ont fait leur apparition. Bien que ces techniques permettent de diminuer d'environ 25% l'incidence des cas de cécité infantile, la ROP reste encore à l'heure actuelle la première cause de cécité chez l'enfant.

Données épidémiologiques

A l'échelle mondiale, on estime que chaque année plus de 20000 enfants sont atteints de cécité consécutivement à la ROP, et que 12300 gardent des troubles modérés de la vue à l'âge adulte (Blencowe et al., 2013), tels qu'une diminution de la sensibilité des contrastes, des défauts du champ visuel ou de la vision des couleurs, le strabisme ou des défauts de réfraction. Les données épidémiologiques à notre disposition nous indiquent qu'il existe d'importantes disparités géographiques dans la prévalence de la ROP : les pays en voie de développement et à plus faible revenus sont beaucoup plus touchés que les pays dits développés, puisque la prévalence peut y atteindre jusqu'à 40% contre une prévalence inférieure à 10% pour les premiers (Quinn, 2016; Quinn et al., 2016). En effet, les unités de néonatalité y font souvent défaut, que ce soit en termes humains ou matériels, ce qui rend la prise en charge des prématurés beaucoup plus compliquée. Là où on observe une diminution de l'incidence des cas sévères de ROP chez les prématurés de 28 semaines d'aménorrhée ou moins, on observe même l'apparition de ROP chez les prématurés proches de la maturité (34 semaines d'aménorrhée) (Gilbert et al., 2005). Considérant l'augmentation du nombre de naissances prématurées ainsi que l'amélioration de la prise en charge et de la survie des grands prématurés (<26 semaines post menstruation), il faut s'attendre à une augmentation globale du nombre d'enfants atteints de ROP, tous degrés de sévérité confondus (Austeng et al., 2009; Costeloe et al., 2012; Painter et al., 2015). Toutefois, malgré une nette amélioration dans la prise en charge et la gestion de l'oxygénation *post-partum*, la persistance de la pathologie suggère l'existence d'autres mécanismes physiopathologiques.

Pathogenèse

Suite aux travaux de Patz et collaborateurs en 1952 et dans la foulée de ceux d'Ashton, la ROP a rapidement été associée à l'hyperoxygénation et caractérisée avec ses deux phases d'évolution. Si l'explication peut paraître simple à l'échelle phénotypique, des mécanismes moléculaires d'une complexité et d'une interdépendance remarquables sont en réalité à l'œuvre. En nous basant sur les connaissances à notre disposition, nous allons développer la succession d'évènements menant à la ROP et à son évolution jusqu'aux degrés les plus sévères.

Dans les études animales comme humaines, l'hyperoxie joue le rôle de facteur déclenchant. La pression intra-utérine en O_2 étant relativement faible lors de la deuxième partie de grossesse (< 50mm Hg), même une exposition à l'air ambiant peut constituer une pression hyperoxique pour le prématuré. Néanmoins, à la naissance les prématurés sont tout de même généralement placés en milieu hyper oxygéné afin d'assurer une oxygénation normale de l'organisme et la survie du

nouveau-né. Cet apport supplémentaire en oxygène inhibe la sécrétion physiologique de facteurs angiogéniques comme le VEGF ou l'érythropoïétine (EPO) (Chen et al., 2008; Chen et al., 2009), conduisant à une inhibition de la formation des vaisseaux, voir à une régression par apoptose des vaisseaux déjà formés, résultant en un arrêt du front de croissance vasculaire appelé vaso-oblitération (phase 1 de la ROP). La conséquence directe est l'apparition d'une zone avasculaire au niveau de la rétine centrale. Le retour à un environnement extérieur normoxique, conjugué à l'accroissement des besoins métaboliques de la rétine alors faiblement vascularisée peuvent conduire à l'apparition d'une hypoxie relative de la rétine. L'hypoxie active de nombreuses voies de survie et d'angiogenèse, mettant notamment en jeu les facteurs clés que sont HIF-1α et VEGF. S'ensuit alors une néovascularisation importante, caractérisant l'entrée en phase 2 de la ROP. Les vaisseaux néoformés sont immatures et poreux, n'assurant que partiellement leurs fonctions. Les fuites vasculaires qui en résultent peuvent conduire à la formation de tissu fibreux, qui peut s'étendre de la rétine au vitré et mènera éventuellement, dans les cas les plus sévères, à un décollement de la rétine dans les cas les plus graves (Hellström et al., 2013).

Classification et dépistage

Afin d'évaluer les degrés de sévérité, de suivre l'évolution de la pathologie et de standardiser les protocoles thérapeutiques, une classification des différents stades a été nécessaire. L'intégralité des recommandations figure dans l'ouvrage « International Classification of Retinopathy of Prematurity » (ICROP (2005)). La rétine y est ainsi divisée en trois zones concentriques, chacune d'elle correspondant à un degré de sévérité **(Figure 24A)**. En parallèle, cinq stades d'évolution ont été définis **(Figure 24B)**. Les stades 1 et 2 se caractérisent par la présence d'une ligne de démarcation entre les zones vascularisées et avasculaires de la rétine. Des bourgeons néovasculaires peuvent apparaitre à l'examen visuel au stade 2 **(Figures 24B, C)**. Ces stades sont néanmoins plutôt modérés, avec une certaine probabilité de régression spontanée. Au 3ème stade, on observe la formation de tissu fibrovasculaire, pouvant s'étendre au vitré **(Figure 24B C)**. Au-delà du 3ème stade, la néovascularisation peut devenir si dramatique qu'elle entraine un décollement partiel (stade 4) ou complet de la rétine (stade 5) **(Figures 24B, C)**. Une dilatation importante et la présence de nombreuses tortuosités dans les vaisseaux postérieurs de la rétine sont un signe de progression de la pathologie. L'étude ETROP (Early Treatment for Retinopathy of Prematurity) (Good, 2004) a défini deux types de prise en charge de la ROP : type 1, nécessitant un traitement, et type 2, ne requérant qu'un suivi en l'état.

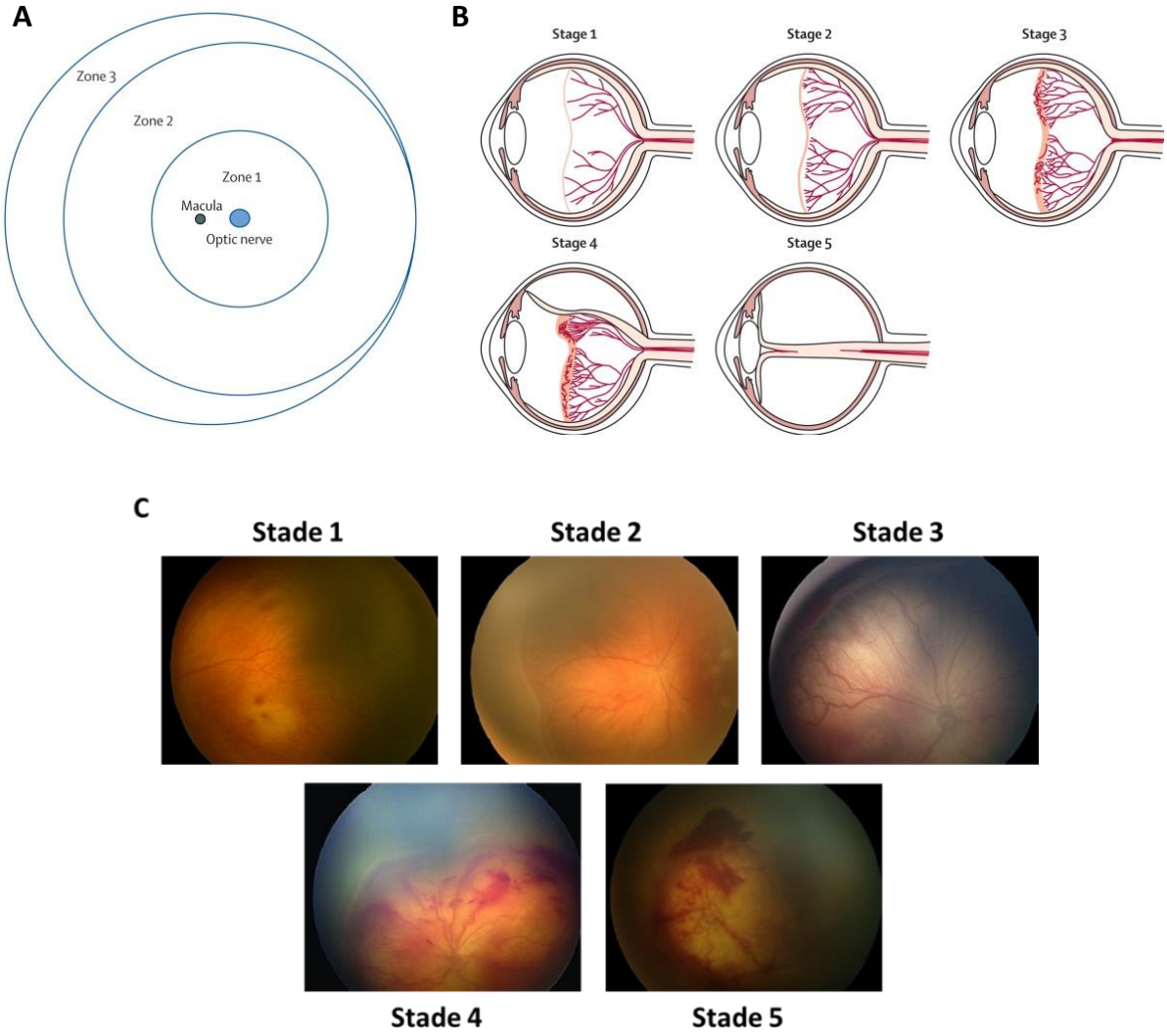

Figure 24 : Caractérisation des anomalies vasculaires rétiniennes au cours de la ROP. A : Répartition des 3 zones permettant d'évaluer le degré de sévérité de la ROP. **B :** Représentation schématique des altérations vasculaires rétiniennes en fonction des différents stades de progression de la ROP. Adaptés de Hellström et al., (2013). **C :** Photographies d'examens du fond d'œil illustrant les différents stades de progression de la ROP. Adapté de Wilkinson et al., (2008).

Les dépistages à la naissance sont systématiques jusqu'à 30-35 semaines d'aménorrhée et pour des poids de naissance jusqu'à 1500-2000g en fonction des services et des régions concernées. Afin d'identifier le maximum de prématurés nécessitant le recours à un traitement, des examens par ophtalmoscopie sont répétés jusqu'au développement vasculaire rétinien complet. Ces examens sont pratiqués en deux temps : une première étape de dilatation de la pupille, suivie d'une ophtalmoscopie.

Toujours dans l'objectif de faciliter la détection et la prise en charge précoce de la pathologie, plusieurs équipes ont travaillé sur la réalisation d'algorithmes prenant en compte différents facteurs

prédictifs. Parmi ces derniers, on peut notamment citer l'algorithme WINROP (Weight, IGF-1 levels, Neonatal, ROP) (Lofqvist et al., 2006; Lofqvist et al., 2009a; Wu et al., 2010; Wu et al., 2012). Ce dernier prend en compte différents paramètres morphologiques et métaboliques, tels que l'évolution hebdomadaire du poids ou les taux d'IGF-1, un facteur de croissance, jusqu'à un âge de naissance correspondant à 32 semaines d'aménorrhée. Il a ainsi été utilisé dans plusieurs études menées dans des régions différentes du globe, incluant plus de 10000 prématurés, et son efficacité suggère qu'il est pertinent d'y avoir recours en plus des examens classiques habituellement pratiqués (Lofqvist et al., 2006; Lofqvist et al., 2009a; Hard et al., 2010; Wu et al., 2010; Fluckiger et al., 2011; Wu et al., 2012; Zepeda-Romero et al., 2012). Bien qu'ayant été utilisés sur un plus petit nombre de patients, les algorithmes ROPscore (Eckert et al., 2012) et CHOP ROP (Binenbaum et al., 2012) semblent toutefois au moins aussi prometteurs. Ils ont en effet permis d'identifier l'intégralité des cas de ROP, dont les ROP de type 1, avec une durée moyenne entre la détection et le recours au traitement respectivement de de 9,1 semaine et de 5,1 semaines pour CHOPROP et ROPscore, contre 11,1 semaine pour WINROP (Piermarocchi et al., 2017).

Facteurs de risque

Un grand nombre de facteurs de risques pour le développement de la ROP ont déjà été identifiés ou sont actuellement suspectés. Nous développerons ici les principaux facteurs de risques connus à ce jour.

-L'oxygénothérapie

L'hyperoxygénation constitue l'un des facteurs clés d'apparition de la ROP. Comme évoqué en introduction, les prématurés sont généralement placés en milieu hyper-oxygéné, notamment pour assurer une saturation en oxygène adéquate en réponse à l'immaturité de leurs fonctions pulmonaires. Tin et collaborateurs (Tin and Gupta, 2007) ont notamment montré que les prématurés de moins de 28 semaines d'aménorrhée avec un objectif de saturation en oxygène de 88 à 98% pendant les 8 premières semaines de vie avaient quatre fois plus de risque de recourir à un traitement que ceux avec un objectif de 70 à 90%. Dans une étude portant sur 1544 prématurés avec un poids de naissance inférieur à 1000g, Sun et collaborateurs (2002) ont observé que ceux qui avaient une saturation partielle en O_2 (Sp02) inférieure à 95% présentaient moins de ROP sévère (10% *versus* 29%), de chirurgie rétinienne (4% *versus* 12%) et même de pathologie pulmonaire (27% *versus* 53%). De la même façon, dans l'étude SUPPORT réalisée sur 1316 prématurés de 24 à 27 semaines d'aménorrhée, les enfants ayant reçu une moindre hyperoxygénation présentaient significativement moins de ROP sévères (9% *versus* 18%), mais avec un taux de mortalité plus

important (20% *versus* 16%) (Lantos, 2013). Compte tenu du caractère biphasique de la pathologie, il apparaitrait sensé d'adapter l'apport en oxygène au stade de prématurité. Si des apports importants lors de la 2ème phase devraient théoriquement inhiber le développement vasculaire pathologique, les études menées dans cette optique n'ont pas permis de mettre en évidence de bénéfice. L'étude STOP-ROP (2000) n'a rapporté aucun changement dans l'évolution de la ROP vers des degrés plus sévères en augmentant la saturation à 96-99% au lieu des 89-94% habituellement appliqués. Ils ont même noté une augmentation des complications pulmonaires. L'étude BOOST (Askie et al., 2003) a quant à elle évalué les conséquences de plusieurs concentrations en oxygène (entre 91 et 98%) pendant la 2ème phase de la ROP sur une période de 12 mois. Les auteurs n'ont pu noter aucune différence dans l'évolution de la ROP.

-Age/poids de naissance

Toutes les études menées sur la ROP montrent que ces deux paramètres sont très fortement corrélés à l'apparition de la pathologie ainsi qu'à son degré de sévérité. Si toutes les causes de cette association ne sont pas élucidées, des mécanismes directs et indirects pourraient être en jeu. En effet, une naissance avant terme prive l'enfant de nombreux facteurs fournis par l'environnement intra-utérin et qui ne peuvent être remplacés par le nouveau-né lui-même. Dans le même temps, plus le degré de prématurité est élevé et plus la durée d'exposition à des facteurs susceptibles d'être délétères est importante. Les études ont ainsi mis en évidence qu'un prématuré avec un poids de naissance inférieur à la moyenne de son âge était particulièrement à risque de développer une ROP **(Figure 25)** (Bardin et al., 1997; Allegaert et al., 2003; Regev et al., 2003; Darlow et al., 2005; Dhaliwal et al., 2009).

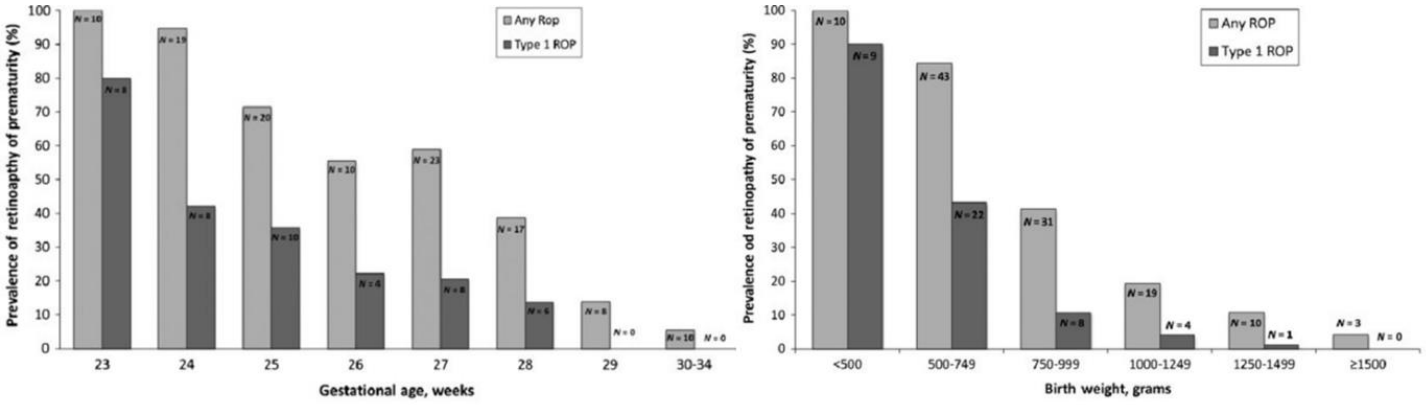

Figure 25 : Influence de l'âge gestationnel et du poids de naissance sur la probabilité de développer la ROP. Adapté de Piermarocchi et al., (2017).

-Infection/inflammation

Si l'oxygénothérapie et l'âge/poids de naissance sont les deux facteurs principalement connus, de nouveaux paramètres font l'objet d'une attention particulière depuis le début des années 2000, dont le rôle joué par les infections et le statut inflammatoire. Ainsi, de nombreux travaux suggèrent désormais que les infections néonatales sont des facteurs de risque à considérer pleinement dans l'apparition de la ROP, avec une multiplication du risque accru d'un facteur deux à quatre (Klinger et al., 2010; Tolsma et al., 2011; Wang et al., 2019b). Le risque accru lié à l'infection pourrait être dû à l'inflammation systémique qui en résulte, qui agirait de concert avec l'hyperoxie (Dammann et al., 2009; Dammann, 2010; Sood et al., 2010; Chen et al., 2011; Lee and Dammann, 2012). Par ailleurs, les infections considérées ne concernent pas seulement les infections d'origine bactérienne, puisqu' il semblerait que les infections néonatales d'origine fongique soient également associées de manière significative à l'apparition de la ROP ainsi qu'à son degré de sévérité (Mittal et al., 1998; Manzoni et al., 2006).

Parallèlement au sepsis néonatal, les chercheurs se sont intéressés aux infections/inflammations chez la mère. Par exemple, il semblerait que les enfants naissants de mère atteintes d'une chorioamniotite avérée cliniquement ou d'une hyperleucocytose ont une probabilité plus élevée d'apparition de la ROP (Lee and Dammann, 2012). L'infection maternelle ou néonatale et l'inflammation qui en résulte pourrait alors constituer une sorte de pré-phase anténatale, dite « de sensibilisation » à la ROP. Une partie de l'élévation du risque de développer une ROP à la suite d'une infection pourrait alors s'expliquer par la présence de facteurs pro-inflammatoires. En effet, les études réalisées ont montré d'importantes différences au niveau des cytokines circulantes chez les prématurés développant une ROP, avec notamment une élévation des taux plasmatiques d'IL-6, IL-8, TNF-α, IL-7, MCP1 (Monocyte Chemoattractant Protein 1), MIP1-α et MIP1-β (Macrophage Inflammatory Protein 1) dans les premiers jours de vie (Silveira et al., 2011; Yu et al., 2014). De manière intéressante, il a également été montré que les modèles murins de rétinopathie induite par l'oxygène (OIR) déficients en TNF-α ont une plus faible probabilité de présenter des anomalies du développement vasculaire rétinien, ce qui tendrait à justifier la piste inflammatoire, au moins en tant que contributeur. Ces observations témoignent du caractère multifactoriel et des interrelations entre les différents paramètres associés au développement de la ROP, d'où la complexité de sa physiopathologie.

-IGF-1

Le fait que la prématurité soit un paramètre crucial de la ROP suppose que les facteurs impliqués dans la croissance et le développement pourraient être perturbés. Aussi, les recherches se sont rapidement penchées vers les facteurs de croissance tels que l'IGF-1 (Insulin-like Growth Factor-1). L'IGF-1 est une hormone protéique de 70 acides aminés, présentant des similitudes structurales avec l'insuline. Produite par le foie, sa sécrétion est stimulée par l'hormone de croissance (GH), une autre hormone protéique d'origine hypophysaire. Les premières hypothèses reliant cet axe aux pathologies oculaires ont émergé à la suite d'observations faisant état d'une amélioration de la rétinopathie diabétique proliférante après ablation de l'hypophyse (Speakman et al., 1966; Joplin et al., 1967; Fraser, 1971). L'IGF-1 est un facteur de régulation crucial de la croissance fœtale à travers toutes les étapes du développement (Langford et al., 1998), et est notamment corrélé avec la taille du fœtus (Lassarre et al., 1991; Reece et al., 1994). Les niveaux d'IGF-1 augmentent tout au long de la gestation et plus particulièrement au cours du troisième trimestre (Gluckman and Harding, 1997), avant de diminuer progressivement en raison de la perte des apports assurés par le placenta et le liquide amniotique (Langford et al., 1998). Les études menées chez la souris ont montré que l'absence d'IGF-1 empêchait le développement vasculaire rétinien, malgré une présence normale de VEGF. Ceci s'explique par le fait qu'une certaine concentration d'IGF-1 est nécessaire afin que la signalisation induite par VEGF puisse prendre place (Smith et al., 1999; Hellstrom et al., 2001). Différentes études cliniques ont permis de mettre en évidence qu'un faible taux d'IGF-1 sérique à la naissance est très fortement corrélé avec le risque d'apparition de la ROP et son degré de sévérité **(Figure 26)** (Hellstrom et al., 2001; Hellstrom et al., 2003; Smith, 2004; Lofqvist et al., 2006; Beardsall et al., 2014; Liegl et al., 2016). En réalité, la corrélation est si forte que la mesure de l'IGF-1 sérique serait un indicateur aussi prédictif que l'âge et le poids de naissance. Cette piste semble d'autant plus intéressante que les études animales ont montré que l'administration d'IGF-1 recombinant humain (rhIGF-1) permettait d'atténuer la rétinopathie induite par l'oxygène chez la souris (Vanhaesebrouck et al., 2009). Une étude clinique (phase 2) a récemment été lancée chez l'Homme afin de vérifier si l'injection continue de rhIGF1 permettrait de limiter l'apparition de la ROP. Enfin, il est intéressant d'ajouter que les taux d'IGF-1 semblent modulés par l'existence d'un état inflammatoire. En effet, l'administration d'endotoxines diminue les concentrations d'IGF-1 chez l'animal (Elsasser et al., 1995), et les analyses menées dans les cas humains de sepsis révèlent de faibles taux d'IGF-1 sérique (Ashare et al., 2008). Or, les taux d'IGF1 ombilicaux sont positivement corrélés avec les taux d'IGF-1 du plasma maternel (Pathmaperuma et al., 2007). Cette donnée témoigne une nouvelle fois du caractère interrelationnel des différents paramètres de la ROP, et suggère ainsi que la présence

d'une inflammation maternelle agirait (au moins de manière indirecte) en diminuant les concentrations fœtales d'IGF-1, en plus de l'exposition aux molécules pro-inflammatoires. Cette synergie entre inflammation et taux d'IGF-1 se traduit d'ailleurs par une élévation significative d'environ 20% de développer la ROP chez les prématurés de moins de 40 semaines d'aménorrhée **(Figure 26)** (Perez-Munuzuri et al., 2014).

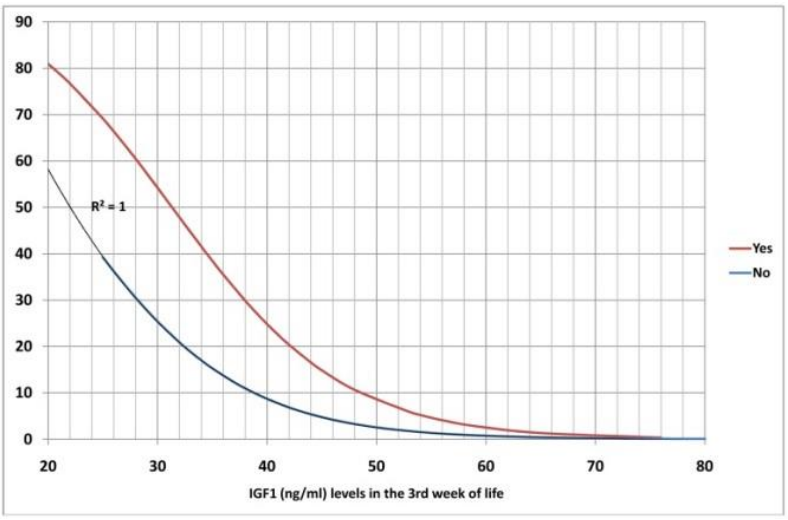

Figure 26 : Probabilité de développer la ROP en fonction des taux d'IGF-1 et de la présence (rouge) ou non (bleu) d'un sepsis néonatal. Adapté de Pérez-Muñuzuri et al., (2014).

-Hyperglycémie

Les études semblent montrer l'existence d'un lien entre la glycémie et la ROP. En effet, le risque d'apparition de la ROP serait plus élevé chez les prématurés hyperglycémiques (Garg et al., 2003; Ertl et al., 2006; Mohamed et al., 2013; Ahmadpour-Kacho et al., 2014; Mohsen et al., 2014). Si les causes exactes ne sont pas totalement comprises, des études récentes chez le rongeur montrent que l'hyperglycémie induit de nombreuses altérations de la rétine, comme une réduction de la capacité de transport de l'EPR (Desjardins et al., 2016) ou une activation des cellules de Müller, qui sécrètent alors du VEGF (Kida et al., 2021).

Traitements

Si les mécanismes en jeu au cours de la ROP sont désormais bien décrits, tous les tenants et aboutissants ne sont cependant pas encore compris, si bien qu'il n'existe à l'heure actuelle aucun traitement de référence permettant de prévenir l'apparition ou de stopper l'évolution de la ROP. De nombreuses approches ont déjà été utilisées, chirurgicales ou médicamenteuses, tandis que de nouvelles stratégies font régulièrement leur apparition.

Approches chirurgicales

- Cryothérapie

La cryothérapie fut la première méthode d'intervention chirurgicale clairement définie et cadrée utilisée contre la ROP. Cette méthode consiste à appliquer une sonde métallique cryogénisée à l'azote liquide au niveau de la zone de néovascularisation, en position trasnsclérale. L'exposition des zones d'intérêt au froid intense provoque des brûlures, qui vont entrainer l'apparition de tissu cicatriciel, stoppant ainsi la propagation de la néovascularisation par destruction de la rétine ischémique. Bien que les zones brûlées de la rétine périphérique soient rendues non fonctionnelles, la rétine centrale sera préservée, permettant une acuité visuelle quasi-normale. L'étude CRYO-ROP a ainsi montré que la cryothérapie permet de réduire significativement le nombre de cécités et de perturbations visuelles à long terme, avec une réduction de 17% de la cécité et de 20% des décollements de la rétine après 10 ans (Group, 2001) ainsi qu'une diminution de 18% du nombre déficits d'acuité visuelle après 15 ans (Palmer et al., 2005). Cette méthode présente néanmoins de nombreux inconvénients. Elle nécessite en effet le recours à une anesthésie générale, n'est pas d'une grande précision et de nombreux effets secondaires et complications sont possibles, comme l'apparition d'œdèmes, des altérations de la conjonctive ou des hémorragies rétiniennes voir une phtyse oculaire. Afin de limiter ces risques tout en simplifiant l'intervention, de nouvelles méthodes ont été développées, comme la photocoagulation laser.

- Photocoagulation laser

La photocoagulation laser repose sur le même principe que la cryothérapie, à savoir la destruction de la rétine ischémique. A l'aide d'un faisceau laser, l'opérateur va pouvoir cibler précisément les régions d'intérêt, qui peuvent atteindre jusqu'à 1°500 à 1°800 points par rétine. Cette technique a progressivement remplacé la cryothérapie car elle est au moins aussi efficace, beaucoup moins invasive et entraine moins de complications (Tsitsis et al., 1997; Sahni et al., 2005; McLoone et al., 2006; Simpson et al., 2012).

Approches pharmacologiques

- Les anti-VEGF

Compte tenu de la forte composante néovasculaire de la ROP, c'est tout naturellement que certains chercheurs se sont intéressés au VEGF, son médiateur moléculaire principal. La stratégie repose sur l'administration d'agents anti-VEGF. Plusieurs anticorps monoclonaux ont ainsi été développés

(Pegaptanib, bevacizumab, ranibizumab, aflibercept), et un certain nombre d'études cliniques randomisées de petite taille réalisées (Mintz-Hittner et al., 2011; Harder et al., 2014; Moran et al., 2014; Karkhaneh et al., 2016). L'étude BEAT-ROP (Bevacizumab Eliminates the Angiogenic Threat of Retinopathy of Prematurity), réalisée sur 150 enfants, constitue à ce jour l'étude la plus importante sur le sujet (Mintz-Hittner et al., 2011; Mintz-Hittner et al., 2016).). Elle a notamment permis de montrer un bénéfice significatif par rapport au traitement par photocoagulation laser. Des critiques ont toutefois été formulées quant à l'absence de données relatives à la toxicité systémique. En effet, l'injection intra-vitréenne de bevacizumab diffuse dans la circulation générale, et ce de manière largement supérieure aux autres anticorps anti-VEGF (Tolentino, 2011), entrainant une diminution significative des concentrations de VEGF circulant (Sato et al., 2012), ce qui pourrait affecter la vascularisation physiologique d'autres organes et mener à de potentiels effets secondaires (Hard and Hellstrom, 2011). Des études complémentaires sont ainsi nécessaires afin de définir les traitements anti-VEGF à des doses optimales (Hard and Hellstrom, 2011; Darlow et al., 2013).

- IGF-1

Considérant la forte corrélation entre ROP et IGF-1, les chercheurs se sont penchés sur la possibilité de supplémenter les prématurés afin de retrouver des taux sanguins équivalents à ceux dont ils auraient bénéficié au cours des dernières semaines de gestation. Le problème principal auquel on peut faire face est alors la courte durée de vie de l'IGF-1 dans l'organisme. Afin de passer outre, l'IGF-1 a été administrée par injection intraveineuse en mélange équimolaire avec un recombinant de sa protéine de liaison (rhIGFBP-3) (Lofqvist et al., 2009b). Cette préparation permet d'élever significativement les taux plasmatiques d'IGF-1 et de retrouver des concentrations similaires à celles observées *in utero*, mais la demi-vie n'est que de 0,86 heure (Hellstrom et al., 2016). Néanmoins, si une unique injection 3 jours après la naissance permet effectivement d'augmenter les concentrations d'IGF-1, ces dernières diminuent rapidement et reviennent au niveau pré-injection après quelques jours. Afin de permettre une augmentation plus consistante dans le temps, une étude clinique de phase II a été lancée sur une supplémentation de 7 jours (Ley et al., 2013). Bien qu'ayant rétabli avec succès les taux d'IGF-1 sur une durée plus importante, cette étude n'a pas permis de mettre en évidence une amélioration de la survenue ou de la sévérité de la ROP (Ley et al., 2019). On note toutefois une réduction de la sévérité des dysplasies broncho-pulmonaires, pathologie associée à la prématurité et considérée comme facteur de risque de la ROP.

- β-bloquant (Propranolol)

L'utilisation du propanolol dans la prévention de la ROP tire son origine des résultats d'une étude réalisée sur le traitement infantile de maladies cardiaques, qui montre par la même occasion une régression des hémangiomes (Leaute-Labreze et al., 2008). Or, différents travaux font justement état d'une association entre la présence d'hémangiomes et la ROP (Praveen et al., 2009; Hyland et al., 2013). Le propranolol, un β-bloquant, a alors été proposé comme traitement potentiel (Filippi et al., 2010; Buhrer and Bassler, 2015). Une première étude clinique pilote a été conduite avec une administration orale du propranolol (Filippi et al., 2013). Cette dernière montre bien une réduction de 48% du risque relatif de développer une ROP évoluant au stade 3, mais 5 des 26 nouveau-nés traités au propranolol ont développé des effets secondaires importants (hypotension, bradycardie). De plus, les récepteurs adrénergiques semblent jouer un rôle important dans la fonction cérébrale, et les effets de leur inhibition par un β-bloquant sur le développement cérébral du prématuré ne sont pas connus à ce jour, soulevant ainsi la question de la sécurité du traitement et de son rapport bénéfice/risque (Hard and Hellstrom, 2011). D'autant plus que les résultats des études animales semblent très contradictoires (Martini et al., 2011; Ristori et al., 2011; Chen et al., 2012; Yun et al., 2018). En ce sens, une nouvelle étude a été réalisée avec une administration de microgouttes ophtalmiques contenant 0,2% de propranolol, et montre une réduction significative de la ROP, sans entrainer d'effets secondaires (Filippi et al., 2019). Le timing du traitement semble toutefois important, puisqu'un traitement trop précoce entraine l'apparition d'une ROP particulièrement agressive, nécessitant le recours à la photocoagulation laser. Le traitement ne serait ainsi utile que pendant la phase proliférative de la ROP (phase 2).

Approche nutritionnelle

- Lait maternel

Un certain nombre d'études ont suggéré que la consommation exclusive de lait maternel par le nouveau-né permettrait de diminuer le risque de développer la ROP, y compris les formes sévères (Hylander et al., 2001; Heller et al., 2007; Okamoto et al., 2007; Manzoni et al., 2013; Spiegler et al., 2016), contrairement aux préparations infantiles utilisées, qui sont associées à l'apparition de la ROP ainsi qu'à d'autres pathologies associées à la prématurité (dysplasie broncho-pulmonaire etc.) Ces données sont notamment confirmées par une revue systématique récente portant sur 9 études observationnelles (Bharwani et al., 2016). Le lait maternel contient des caroténoïdes (lutéine, zéaxanthine, β-carotène), des acides gras polyinsaturés (AGPIs), de la vitamine E, de l'inositol, de la

lactoferrine et des enzymes antioxydantes. Si tous ces composés sont susceptibles de jouer un rôle dans la prévention de la ROP, les AGPIs y jouent vraisemblablement un rôle de premier ordre.

- Acides gras polyinsaturés (AGPIs)

La maturation de la rétine prend place lors du troisième trimestre de la grossesse et repose essentiellement sur l'accumulation d'AGPI, et notamment ceux de la famille oméga-3. En cas de naissance prématurée, cette maturation est incomplète et le nouveau-né ne reçoit plus les AGPIs indispensables à cette dernière, qui étaient jusqu'alors fournis par la circulation maternelle (Crawford et al., 2003). Or, il s'avère que les AGPIs oméga-3, et principalement l'acide docosahexaénoïque (DHA), jouent un rôle crucial dans la régulation de l'angiogenèse, et notamment rétinienne (Connor et al., 2007). En effet, cette étude menée chez l'animal a permis de montrer qu'une élévation tissulaire des concentrations en AGPI oméga-3 à travers une supplémentation alimentaire permettait de diminuer significativement l'apparition de la zone avasculaire de la rétine suite à un stimulus hypoxique, réduisant par la même la néovascularisation subséquente. L'effet des AGPIs oméga-3 serait dû, au moins en partie, à la réduction des taux de TNF-α, un médiateur de l'inflammation produit par les cellules microgliales. A partir de ce constat, un nombre croissant d'études se sont penchées sur la relation entre prématurité, AGPIs et ROP. Il en ressort ainsi que suite à la naissance, les taux plasmatiques d'AGPIs oméga-3 comme le DHA et d'AGPIs oméga-6 comme l'acide arachidonique (AA) diminuent rapidement au cours de la première semaine, et que cette diminution est notamment compensée par une augmentation de l'acide linoléique (LA) (Martin et al., 2011), essentiellement dans deux groupes de phospholipides : les phosphatidylcholines (PC) et les phosphatidyléthanolamines (PE) (Bernhard et al., 2014). L'augmentation des ratios LA/DHA et LA/AA est ainsi corrélée à une augmentation du risque de développer plusieurs pathologies liées à la prématurité, comme la maladie pulmonaire chronique et la survenue d'un sepsis, mais pas la ROP (Martin et al., 2011). L'enrichissement de l'alimentation du prématuré en DHA permet néanmoins d'augmenter significativement les concentrations de DHA dans les phospholipides des globules rouges (Hoffman et al., 2006; Billeaud et al., 2018), et ce de manière dose-dépendante (Collins et al., 2015). Les premières études de supplémentation en AGPIs oméga-3 ne semblent toutefois pas unanimes quant à la prévention de la ROP (Pawlik et al., 2014; Najm et al., 2017; Vayalthrikkovil et al., 2017). Parallèlement, l'AGPI oméga-6 AA, généralement considéré comme pro-inflammatoire et cytotoxique, semble constituer un marqueur plus pertinent que le DHA. En effet, tout comme pour le DHA, on observe une diminution post-natale des taux d'AA, et l'augmentation du ratio LA/AA est elle aussi corrélée à une augmentation du risque de développer une maladie pulmonaire chronique et la survenue d'un sepsis (Martin et al., 2011). De plus, un faible taux d'AA est fortement corrélé avec le

développement d'une ROP (Lofqvist et al., 2018). L'étude OMEGAROP réalisée par notre équipe a par ailleurs montré que l'accumulation d'AA dans les globules rouges chez les prématurés développant la ROP était corrélée à une diminution de l'AA dans les globules rouges chez la mère, suggérant ainsi une augmentation du transfert materno-fœtal des AGPIs oméga-6 (Pallot et al., 2019).

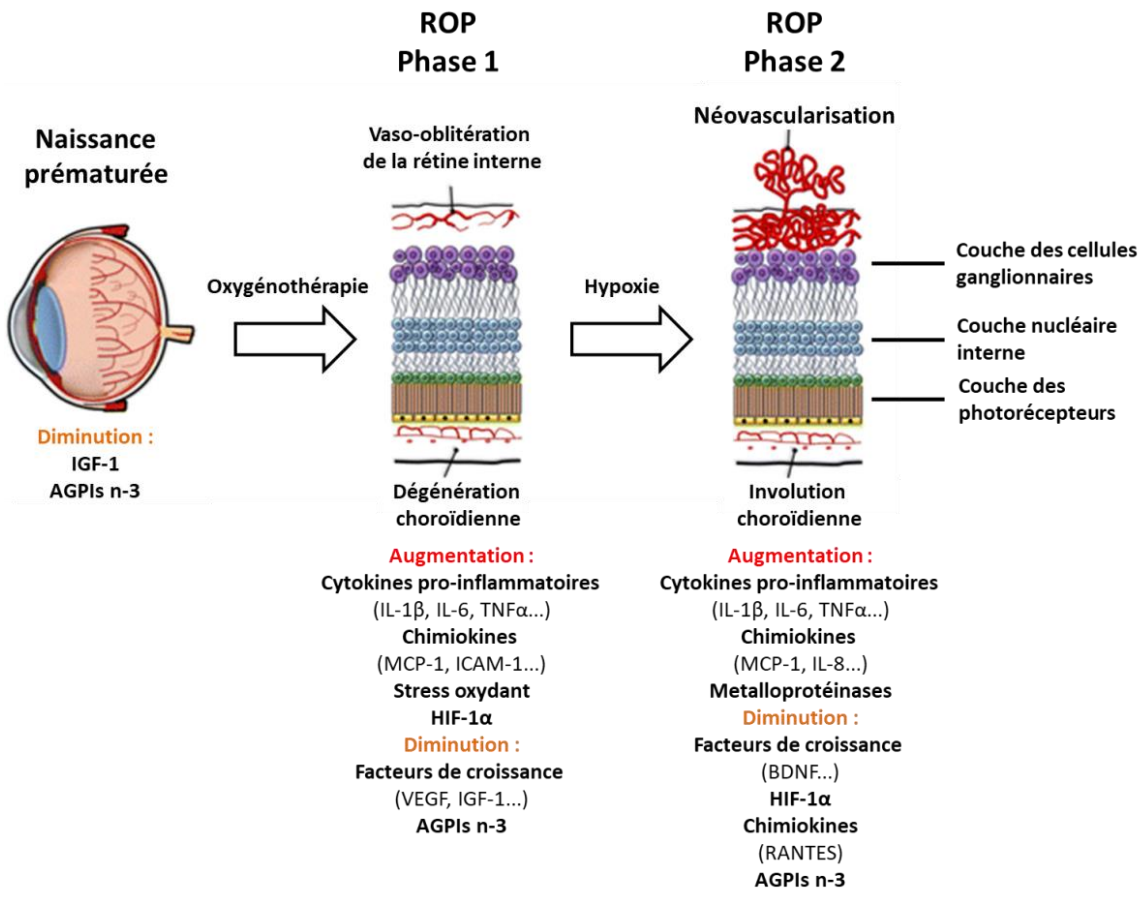

Figure 27 : Représentation schématique de la pathogenèse de la ROP. La naissance prématurée est généralement suivie de la mise en place d'une oxygénothérapie, qui entraine une hyper oxygénation, laquelle entraine un arrêt de la croissance des vaisseaux de la rétine centrale (vaso-oblitération – phase 1). Cette dernière est associée à une augmentation de la sécrétion de facteurs pro-inflammatoires, tandis que les facteurs de croissances sont quant à eux sous-exprimés. Dans un deuxième temps, la rétine n'étant pas suffisamment alimentée, s'installe une hypoxie relative caractérisée par une néovascularisation hyperproliférative (phase 2), associée à une surexpression de facteurs pro-inflammatoires et impliqués dans le remodelage vasculaire et l'angiogenèse. Adapté de Rivera et al., (2017).

Curieusement, le modèle de souris déficiente en plasmalogènes (souris DAPAT$^{-/-}$), qui sont des phospholipides considérés comme étant des réservoirs d'AGPIs, présente des altérations du développement vasculaire dont certaines caractéristiques évoquent celles observées au cours de la ROP, suggérant un rôle des plasmalogènes dans la physiopathologie de la ROP.

III. Plasmalogènes

A. Propriétés générales et classification

Découverts par hasard sur des colorations histochimiques en 1924 (Feulgen and Voit, 1924), les plasmalogènes appartiennent à la famille des glycérophospholipides, lipides constitutifs des membranes cellulaires, dont ils forment une sous-catégorie. Ils sont caractérisés par la présence en position 1 (*sn*-1) du squelette de glycérol d'un dérivé de la liaison éther : la liaison vinyl-éther. Cette dernière résulte de la présence d'une insaturation supplémentaire sur le premier carbone de la chaine en *sn*-1 **(Figure 28)**. A ce titre, ils appartiennent également à la famille des lipides contenant une liaison éther (éther-lipide). En conséquence, et contrairement aux phospholipides classiques, on ne trouvera pas un acide gras lié en *sn*-1 au glycérol, mais un alcool gras. On retrouve classiquement un acide gras estérifié en position 2 (*sn*-2) comme pour les autres groupes de phospholipides, et une fonction polaire liée en position 3 (*sn*-3) par une liaison phosphodiester. Parmi ces groupements polaires, on trouve les fonctions éthanolamine, choline, sérine et inositol. Afin de les distinguer de leurs homologues phospholipidiques diacylés, les espèces moléculaires de plasmalogènes sont désignées par le préfixe « plasmény l » suivi du groupement polaire de tête, formant ainsi respectivement des plasménylethanolamines (pPE), plasménylcholines (pPC), plasménylsérines (pPS) et plasménylinositols (pPI). Ils se distinguent ainsi des autres éther-lipides qui, en raison de l'absence d'insaturation, sont quant à eux désignés par le préfixe « plasmanyl » (**Figure 29)**.

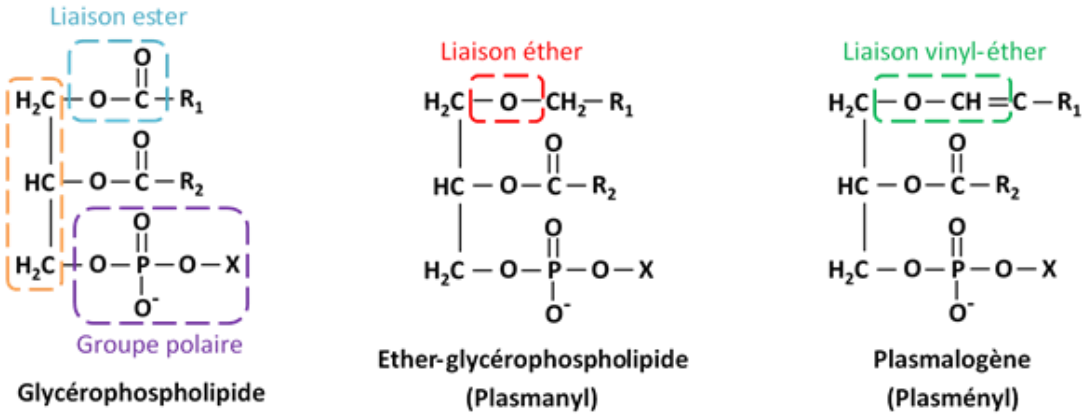

Figure 28 : Structure moléculaire des glycérophospholipides et de leurs sous-catégories à liaison éther et vinyl-éther. Les glycérophospholipides se caractérisent par un squelette de glycérol (orange), sur lequel se lient deux acides gras en position 1 et 2 par l'intermédiaire d'une liaison ester (bleue), tandis qu'un groupe polaire hydrophile se lie en position 3 du squelette de glycérol (violet). Les éther-lipides se distinguent par une liaison éther en position 1 (rouge), tandis que les plasmalogènes se caractérisent quant à eux par une liaison vinyl-éther (vert).

B. Distribution biologique, rétinienne et cellulaire

Présents dans la quasi-intégralité des espèces animales et bactériennes anaérobies, les plasmalogènes représentent environ 10 à 18% de la masse phospholipidique totale chez l'Homme (Nagan and Zoeller, 2001). On les trouve dans la membrane plasmique, les organites intracellulaires et les vésicules d'endo/exocytose. S'ils sont présents dans tous les tissus de l'organisme où ils ne sont cependant pas uniformément distribués. On estime ainsi qu'ils représentent, en pourcentage de la masse phospholipidique : environ 5% dans les lipoprotéines (Engelmann, 2004), environ 11% dans la myéline (Nagan and Zoeller, 2001) et la rétine (Acar et al., 2007), de 20 à 50% dans le cœur et le cerveau et jusqu'à 55% dans les spermatozoïdes (Lessig and Fuchs, 2009). Les pPE sont l'espèce de plasmalogènes la plus abondante dans l'organisme, où ils peuvent représenter jusqu'à 29% des PE dans la rétine (Acar et al., 2007) et 58% dans le cerveau. Les pPC sont quant à eux particulièrement abondants dans le cœur, où ils peuvent représenter 26% des PC (Gottfried and Rapport, 1962; Han et al., 2001), alors qu'ils ne représentent que 2% des espèces de PC dans la rétine (Acar et al., 2007). Les plasmalogènes sont également présents au sein des phospholipides à inositol (PI) et sérine (PS), où ils sont néanmoins minoritaires et ne représentent que moins de 2% du total de ces espèces (Acar et al., 2007; Nagy et al., 2012). Au niveau de leur répartition rétinienne, les pPE sont particulièrement abondants dans rétine neurale et l'EPR, tandis que les pPC sont les plus abondants dans le nerf optique. Les pPE les plus présents dans la couche nerveuse de la rétine sont les espèces estérifiées avec un AGPI en position *sn*-2, notamment l'AA ou le DHA, alors que dans le nerf optique, les espèces de pPC les plus présentes sont plutôt saturées (Nagy et al., 2012).

C. Métabolisme

1. Biosynthèse

La biosynthèse des plasmalogènes suit une voie commune à la synthèse de tous les éther-lipides, impliquant successivement les peroxysomes et le réticulum endoplasmique.

- Etapes peroxysomales

Les peroxysomes sont de petits organites sphériques intracellulaires (0,1 à 1 µm de diamètre) délimités par une membrane en forme de bicouche lipidique, dont le nombre, la taille et la fonction sont étroitement corrélés aux variations de l'activité cellulaire (Smith and Aitchison, 2013; Wanders, 2014). En premier lieu, un acide gras est converti en alcool gras par la FAR (Fatty Alcool Reductase), une enzyme située au niveau de la membrane du peroxysome **(Etape 1, Figure 29)**. Deux isoformes ont pu être identifiées chez l'Homme et la souris : la FAR1 et la FAR2 (Cheng and Russell, 2004). FAR1 réduit préférentiellement les chaines insaturées et saturées de 16 ou 18 carbones, tandis que FAR2

réduirait uniquement les chaines saturées de 16 ou 18 carbones (Cheng and Russell, 2004). Les plasmalogènes se caractérisent ainsi par quatre chaines possibles en *sn*-1 : l'acide palmitique (C16:0), l'acide stéarique (C18:0), l'acide oléique (C18:1 n-9) et plus rarement l'acide vaccenique (C18:1 n-7). Parallèlement à l'action de la FAR1/2, une autre enzyme de la membrane du peroxysome, la DHAPAT (DiHydroxy Acetone Phosphate Acyl Transferase ; également appelée GnPAT pour Glycerone Phosphate Acyl Transferase) réalise l'acylation d'une molécule de DHAP en 1-acyl-DHAP **(Etape 2, Figure 29)**. L'ADAPS (Alkyl DHAP Synthase ; ou AGPS), autre enzyme membranaire peroxysomale, va ensuite échanger le groupement acyl en *sn*-1 avec l'alcool gras (groupement alkyl) synthétisé par la FAR, pour former un 1-O-alkyl-DHAP **(Etape 3, Figure 29)**. L'1-O-alkyl-DHAP ainsi synthétisé est ensuite réduit en 1-O-alkyl-2-hydroxy-sn-glyceronephosphate par une acyl/alkyl-DHAP réductase (ADHAPR), enzyme localisée à la fois dans la membrane des peroxysomes et celle du réticulum endoplasmique (RE) (Dean and Lodhi, 2018).

Il est important de préciser que l'ADAPS est en étroite interaction avec la DHAPAT. En effet, ces deux enzymes forment un complexe dont l'activité dépend des deux protéines, si bien qu'une déficience ou une altération fonctionnelle de l'ADAPS inhibe l'activité de la DHAPAT (de Vet et al., 1999; Itzkovitz et al., 2012). Par ailleurs, chacune des étapes peroxysomales constitue une étape clé qui ne peut être compensée. Ainsi, une déficience enzymatique en FAR1, en DHAPAT ou en ADAPS conduisent toutes à une déficience totale en plasmalogènes (Sztriha et al., 2000; Wanders and Waterham, 2006; Buchert et al., 2014). De la même manière, une déficience physique ou fonctionnelle du peroxysome atteint directement la capacité de biosynthèse des plasmalogènes. Par exemple, une altération du gène PEX7, codant pour une protéine impliquée dans la formation de cet organite, conduit également à une déficience totale de l'organisme en plasmalogènes (Purdue et al., 1997; Braverman et al., 2010; Brites et al., 2011).

- Etapes endoplasmiques

Le peroxysome est capable d'interagir avec le RE en se fixant sur sa membrane (Schrader et al., 2020). Ceci permet notamment le transfert de l'1-O-alkyl-2-hydroxy-sn-glyceronephosphate depuis le peroxysome vers le RE (étape 4, **Figure 30)**. Ce dernier va alors suivre une succession d'étapes d'acylation (étape 5), de déphosphorylation (étape 6), d'estérification (étape 7) et de réduction (étape 8), pour aboutir à la formation d'un plasmalogène de type éthanolamine (pPE) (Braverman and Moser, 2012; Honsho and Fujiki, 2017; Messias et al., 2018). Il est important de mentionner que le 1-O-alkylglycérol (AKG) peut entrer directement dans la voie de biosynthèse à l'étape 4, court-circuitant ainsi les étapes péroxysomales. Cette propriété importante en fait un précurseur de

plasmalogène particulièrement intéressant, puisqu'il permet de restaurer les taux de plasmalogènes en cas de déficience enzymatique péroxysomale (Brites et al., 2011).

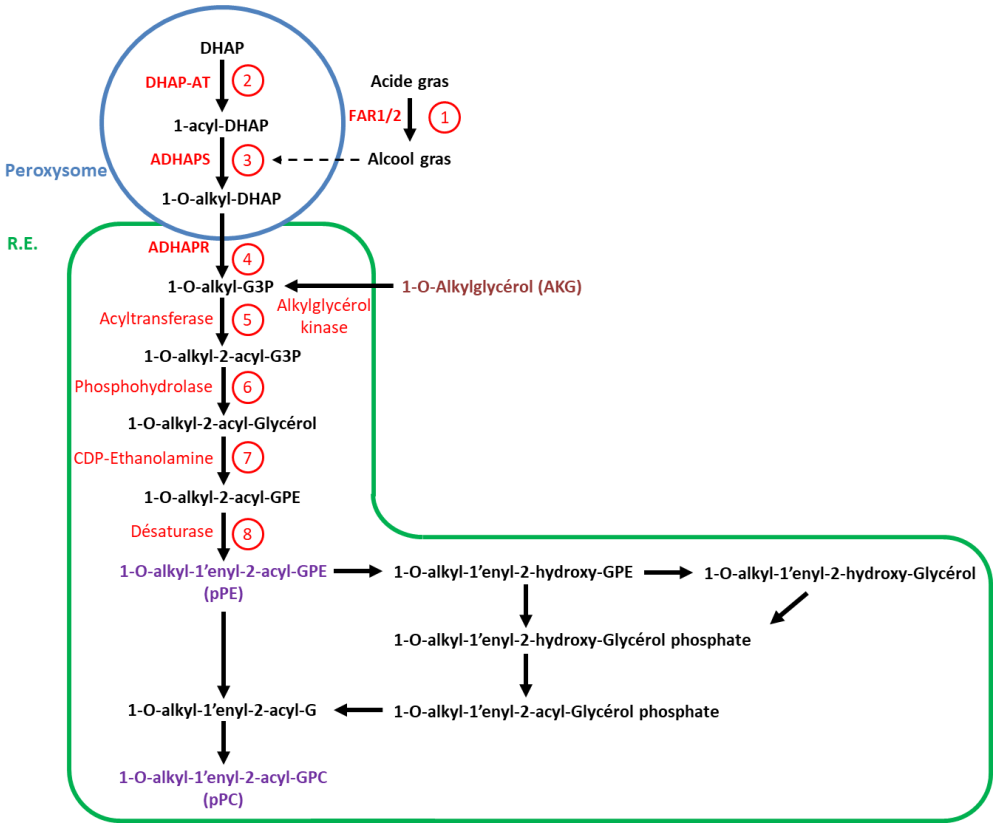

Figure 29 : Représentation schématique et simplifiée de la voie de biosynthèse des plasmalogènes de type éthanolamine (pPE) et choline (pPC) au sein du peroxysome et du réticulum endoplasmique (RE). La synthèse des plasmalogènes se déroule selon 8 étapes communes quelle que soit la classe de phospholipide : 3 étapes péroxysomales et 5 étapes dans le RE. Différentes voies sont ensuite impliquées selon que le plasmalogène néosynthétisé appartienne à la catégorie des plasménylcholines ou des plasménylléthanolamines. Adapté de (Kimura et al., 2019).

Par ailleurs, les plasmalogènes de type choline (pPC) ne sont pas directement néo-synthétisés, mais produits à partir des pPE. En effet, puisqu'il n'existe pas de plasmenylcholine désaturase, ils ne peuvent être synthétisés qu'après une hydrolyse préalable du groupement éthanolamine des pPE **(Figure 29)** (Lee, 1998).

Une fois synthétisés, les plasmalogènes sont ensuite adressés vers la membrane plasmique soit par l'intermédiaire de vésicules, en impliquant les systèmes de Golgi et endosomaux, soit par une voie non vésiculaire impliquant des protéines de transport de lipides (Lev, 2012; Cockcroft and Raghu, 2018).

2. Régulation et turnover

- Maintien des niveaux cellulaires

Les niveaux de plasmalogènes sont étroitement contrôlés par la cellule. En effet, la supplémentation *in vitro* de cultures cellulaires en précurseurs de plasmalogènes sous la forme d'AKG permet de restaurer les concentrations de cellules déficientes (Schrakamp et al., 1985; van den Bosch et al., 1988; James et al., 1997), mais pas au-delà des concentrations physiologiques (Cabot and Synder, 1980). Ainsi, la supplémentation de cellules contrôle en AKG n'a aucun impact sur leurs niveaux de plasmalogènes. Le même constat a pu être effectué *in vivo* : la supplémentation nutritionnelle en AKG de rongeurs déficients en plasmalogène restore leurs niveaux tissulaires au niveau des animaux contrôle, mais la supplémentation d'animaux contrôles n'induit aucune augmentation de la concentration tissulaire en plasmalogènes (Das and Hajra, 1988). L'introduction artificielle d'un ADNc codant pour la DHAPAT dans une lignée cellulaire déficiente pour cette enzyme induit une augmentation de l'activité de la DHAPAT jusqu'à six fois supérieure à celle des cellules contrôles (Liu et al., 2005). Pourtant, les concentrations cellulaires de plasmalogènes sont uniquement restaurées au même niveau que celui des cellules contrôles. La question de la régulation endogène des niveaux de plasmalogènes est ainsi restée longtemps sans réponse. Récemment, une étude semble toutefois avoir déterminé un acteur majeur dans cette régulation : la FAR1 (Honsho et al., 2010). Cette étude montre en effet que l'activité de la FAR1 augmente suite à une diminution des niveaux de plasmalogènes et inversement, diminue lorsque les niveaux de plasmalogènes sont restaurés. Ce résultat est notamment appuyé par le fait que l'on observe une accumulation d'alcool gras dans les fibroblastes de patients atteints de RCDP et déficients en plasmalogènes (Rizzo et al., 1993). La restauration des niveaux de plasmalogènes entraine une diminution de l'expression de la protéine, sans que sa traduction soit affectée, suggérant une régulation post-traductionnelle. Le turn-over de la FAR1 est ainsi accéléré spécifiquement par la présence des plasmalogènes, puisque l'ajout d'équivalents PE ou de 2-acyl-GPE restent sans effet sur la dégradation de la protéine. La liaison vinyl-éther en *sn*-1 est donc cruciale dans la détection et la régulation de FAR1, mais les mécanismes exacts restent à déterminer.

Par ailleurs, la cellule est capable de réguler sa production de phospholipides en fonction des niveaux de plasmalogènes dans un groupe de phospholipides donné. En l'occurrence, pour le groupe des phospholipides à éthanolamine par exemple, une diminution de la concentration de pPE sera compensée par une augmentation des autres espèces de PE (Zoeller and Raetz, 1986; Dorninger et al., 2015). Ceci permet notamment à la cellule de maintenir un niveau constant de l'espèce de

phospholipide en question, indépendamment des variations au sein des sous-groupes de phospholipides.

- Contexte pathologique

Si l'on a vu que l'activité de la DHAPAT n'était pas le facteur permettant de réguler les niveaux cellulaires de plasmalogènes, elle est toutefois la cible de certaines conditions particulières. En effet, lors d'une inflammation ou d'un stress important, la cellule surexprime le facteur de transcription NFκB, qui va réguler l'expression de nombreux gènes dont ceux de la DHAPAT et de l'ADAPS, dont il inhibe l'expression (Youssef et al., 2019). Ces contextes inflammatoires sont également associés à une augmentation de l'activité des phospholipases A_2 calcium-indépendantes ($iPLA_2$), qui sont capables de dégrader spécifiquement les plasmalogènes (Sun et al., 2010; Shanshan et al., 2017). Si la conséquence directe sur les niveaux cellulaires de plasmalogènes n'a pas été déterminée dans cette étude, cela pourrait faire partie des mécanismes expliquant la baisse de la concentration en plasmalogène observée au cours des pathologies neurodégénératives, notamment caractérisées par un phénotype inflammatoire important (Senanayake and Goodenowe, 2019).

- Plasmalogènes et alimentation

Contrairement à la majorité des lipides, notre métabolisme des plasmalogènes ne repose pas sur les apports alimentaires. Toutefois, puisqu'on en trouve dans toutes les membranes cellulaires (animales), l'alimentation humaine apporte bien des plasmalogènes. Si les aliments les plus « classiques » ne représentent pas des sources susceptibles d'être d'un intérêt physiologique quelconque, certains fruits de mer semblent contenir des quantités significatives de pPE, notamment estérifiés avec des AGPIs oméga-3 (Yamashita et al., 2016). Pourtant, des études nutritionnelles montrent qu'une supplémentation en plasmalogènes permet d'accroitre significativement la quantité de plasmalogènes contenus dans les globules rouges (Nishimukai et al., 2003; Mawatari et al., 2012), et pourrait même s'avérer être une stratégie de prévention contre les troubles cognitifs chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer (Fujino et al., 2017; Yamashita et al., 2017; Hossain et al., 2018). Le métabolisme intestinal des plasmalogènes reste cependant peu étudié et mal connu. Une étude a toutefois montré qu'ils sont capables d'élever significativement les concentrations sériques d'AGPIs suite à leur ingestion (Wang et al., 2019a). Lors de la digestion, l'acide gras en *sn*-2 est libéré par l'action des lipases, et le lysoplasmalogène est absorbé tel quel au niveau des entérocytes (Hara et al., 2003; Wang et al., 2019a). Le lysoplasmalogène serait ensuite ré-estérifié avant d'être envoyé dans la circulation lymphatique, majoritairement avec un AA en *sn*-2

(Nishimukai et al., 2011). Par ailleurs, les plasmalogènes de type choline seraient nettement mieux absorbés que les plasmalogènes de type éthanolamine (Nishimukai et al., 2011).

Cependant, les études de supplémentation se sont majoritairement penchées sur les précurseurs de plasmalogènes, à savoir les AKG. Leur administration dans le contexte d'une déficience en plasmalogènes a été largement étudiée, et l'efficacité d'une telle supplémentation, a montré son efficacité *in vitro* comme *in vivo*. Toutefois, dans le contexte d'une déficience congénitale, les études montrent qu'il n'y aurait pas de transfert materno-fœtal des AKG au cours de la gestation, et que le transfert ne débute qu'à partir de l'allaitement (Das et al., 1992; Brites et al., 2011). Si elle permet de prévenir l'apparition de certaines anomalies, notamment oculaires, la supplémentation au cours de l'allaitement ne serait pas suffisante pour rétablir un phénotype contrôle, puisque les nouveau-nés n'auraient alors récupéré que 45 à 65% des niveaux tissulaires de plasmalogènes. Afin d'atteindre une restauration tissulaire complète, deux mois sont au moins nécessaires (Brites et al., 2011).

D. Rôles fonctionnels des plasmalogènes

1. Propriétés antioxydantes

Les plasmalogènes ont toujours été étroitement lié à l'oxygène, et ce tout au cours de l'évolution. En effet, leur présence n'est pas uniforme dans le monde vivant : ils sont fortement représentés chez les animaux, vertébrés comme invertébrés, et chez les bactéries anaérobies strictes, tandis qu'ils sont absents chez les plantes, chez les espèces fongiques (sauf exceptions) ainsi que chez les bactéries aérobies et anaérobies facultatives (Goldfine, 2010). Cette disparité possède une origine évolutive : les plasmalogènes seraient apparus deux fois au cours de l'évolution (Goldfine, 2010). Les premières formes de vie, qui étaient anaérobies, ont en effet développé une première voie de biosynthèse des plasmalogènes, qui n'a pas été conservée par les premiers organismes aérobies, apparus à la suite de la concentration du dioxygène dans l'atmosphère il y a un peu plus de 2 milliards d'années. Ceci s'expliquerait notamment par la sensibilité des plasmalogènes à l'oxydation et aux espèces réactives oxygénées (ROS), qui dégradent la liaison vinyl-éther (*sn*-1) (Morand et al., 1988). L'accumulation des produits de dégradation des plasmalogènes pourrait en effet endommager la cellule. Partant de ce constat, il peut paraitre étonnant d'observer la présence de plasmalogènes dans les cellules animales aérobies, fortes productrices de ROS. L'hypothèse avancée est qu'ils pourraient justement permettre de limiter les atteintes oxydatives de la cellule, leur conférant un rôle d'antioxydant (Morand et al., 1988; Zoeller et al., 1988; Nagan et al., 1998). Il a ainsi été montré que des cellules déficientes en plasmalogènes sont plus sensibles à l'oxydation induite par les ROS et aux rayons UV, entrainant une mortalité cellulaire plus importante (Zoeller et al., 1988). Ce paramètre étant notamment restauré

par une supplémentation en précurseurs de plasmalogènes (Zoeller et al., 1999), l'implication des plasmalogènes dans ces mécanismes de défense semble certaine.

2. Structure et dynamique membranaire

La particularité des plasmalogènes ne s'arrête pas à l'oxydation. En effet, les études de spectroscopie par résonnance magnétique nucléaire (RMN) ont suggéré dès les années 1990 que la liaison vinyl-éther en position *sn*-1 provoque un changement de conformation du squelette de glycérol (Han and Gross, 1990; Paltauf, 1994). Elle induirait un rapprochement quasi parallèle des chaines *sn*-1 et *sn*-2, qui sont normalement beaucoup plus écartées dans leur équivalent phospholipidique diacylé. Ainsi, l'augmentation de la longueur et la diminution de l'espace occupé résultent en une réduction de la fluidité membranaire, favorisant un arrangement membranaire ordonné, de même que les phénomènes de fusion et de fission, notamment impliqués dans les mécanismes d'endocytose et d'exocytose. En effet, des études de biophysique montrent que les vésicules contenant 45-50% de pPE fusionnent plus rapidement que celles ne contenant que les formes diacyl. De plus, les cellules déficientes en plasmalogènes montrent une diminution significative de la capacité à exporter le cholestérol vers les particules HDL (Mandel et al., 1998), ainsi qu'une diminution significative du niveau d'ordre membranaire (Hermetter et al., 1989). Par ailleurs, la liaison vinyl-éther en *sn*-1 accroit l'hydrophobicité des plasmalogènes, ce qui les rend particulièrement adaptés à l'incorporation dans les radeaux lipidiques (lipid rafts). Ces micro-domaines membranaires, enrichis en cholestérol et en sphingomyéline, forment une phase dite de « liquide ordonné », caractérisée par la stabilité, l'ordre et des températures de fusion similaires aux solides, tout en ayant la mobilité d'un liquide. Différentes études ont à ce titre montré un enrichissement des lipid rafts en plasmalogènes de 30 à 70% (Pike et al., 2002; Honsho et al., 2008). De plus, des études ont rapporté que le contenu en cholestérol membranaire est étroitement lié à celui des plasmalogènes, notamment les pPE (Mankidy et al., 2010; Honsho et al., 2015; Honsho and Fujiki, 2017; Honsho et al., 2019) ce qui tend à confirmer l'existence d'un lien direct entre les plasmalogènes et la composition membranaire. Ces prédictions ont pu être récemment confirmées par de nouveaux modèles de dynamique moléculaire membranaire, qui montrent notamment l'impact de la présence de plasmalogènes dans la configuration et l'organisation spatiale d'une membrane **(Figure 30)** (Rog and Koivuniemi, 2016).

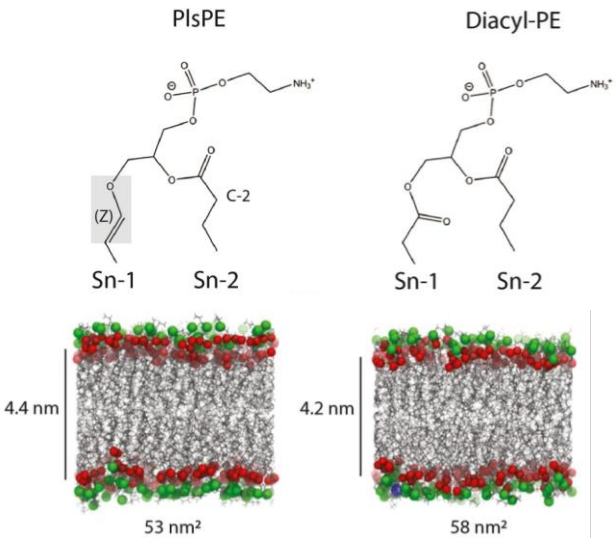

Figure 30 : Impact des plasmalogènes dans l'organisation moléculaire de la bicouche lipidique. Représentation d'une membrane en fonction de sa composition phospholipidique. Une membrane composée par des plasmalogènes à éthanolamine (PlsPE) sera plus compacte en largeur mais plus espacée en hauteur qu'une membrane composée par leur équivalent diacylé (diacyl-PE). Adapté de Rog and Koivuniemi (2016).

3. Signalisation cellulaire

Le rôle des plasmalogènes ne se limite cependant pas à leurs fonctions structurales et aux propriétés physiques qu'ils apportent au sein des membranes cellulaires. Les recherches menées sur les plasmalogènes montrent en effet qu'ils semblent également jouer un rôle important dans les mécanismes de signalisation intracellulaire. Ces mécanismes peuvent être décomposés selon deux composantes distinctes : la libération de l'acide gras à partir de la position *sn*-2, et la génération du lysoplasmalogène qui en découle.

- Signalisation liée à l'acide gras en position *sn*-2

Comme pour tous les glycérophospholipides, la position *sn*-2 des plasmalogènes est estérifiée avec un acide gras. Cette liaison est la cible d'enzymes intracellulaires particulières, les phospholipases A_2 (PLA_2). Suite à un stimulus donné, comme par exemple la fixation d'un récepteur à son ligand, un stress oxydant ou l'augmentation du calcium intracellulaire, ces PLA_2 vont être recrutées au niveau de la membrane plasmique, où elles vont hydrolyser la liaison ester en *sn*-2, libérant ainsi l'acide gras du plasmalogène, qui est alors requalifié en lysoplasmalogène. Cependant, compte-tenu de la spécificité fonctionnelle des plasmalogènes vis-à-vis des autres phospholipides, il apparaitrait logique que la cellule dispose d'un contrôle spécifique aux plasmalogènes. A ce jour, 3 PLA_2 spécifiques des plasmalogènes ont pu être identifiées, respectivement de 28, 39 et 40 kDa (Wolf and Gross, 1985; Hazen et al., 1990; Hazen et al., 1991a; Portilla and Dai, 1996; Yang et al., 1996; Portilla et al., 1998).

De plus, ces PLA_2 spécifiques des plasmalogènes partagent une caractéristique commune, à savoir leur indépendance vis à vis du calcium (Ford et al., 1991; Hazen et al., 1991b; Hazen and Gross, 1992; McHowat et al., 1998). On parle ainsi de PLA_2 calcium-indépendante ($iPLA_2$). Les $iPLA_2$ constituent le groupe VI de la vaste famille des PLA_2 (Kudo and Murakami, 2002).

Les acides gras estérifiés en *sn*-2 sur les plasmalogènes sont majoritairement des AGPIs, tels que l'AA qui appartient à la série des oméga-6, et le DHA (acide docosahexaénoïque), qui appartient à la série des oméga-3. Les plasmalogènes contiennent en effet des niveaux significativement plus élevés d'AGPIs que leurs homologues phospholipidiques (Blank et al., 1973; Sugiura et al., 1983; Gross, 1984; Sugiura et al., 1985; Ford and Gross, 1989b; Akoh and Chapkin, 1990), si bien qu'ils sont considérés comme des réservoirs cellulaires d'AGPIs (Nagan and Zoeller, 2001). Ces AGPIs, une fois libérés, constituent des messagers secondaires importants dans les voies de signalisation intracellulaire. Ils modulent en effet l'action de facteurs de transcription cruciaux pour l'activité cellulaire, tels que NFκB, SREBP (Sterol Response Element Binding Protein) et les PPAR (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor) (Schmitz and Ecker, 2008). Si leurs mécanismes d'action sont communs, les AGPIs oméga-6 et oméga-3 ont pourtant des rôles antagonistes dans les voies qu'ils régulent.

L'AA est le principal précurseur d'une famille de molécules pro-inflammatoires : les eicosanoïdes. Une fois libéré, l'AA est métabolisé par différentes enzymes, telles que les cyclooxygénases (COX), les lipoxygénases (LOX) ou le cytochrome P450. Ces enzymes vont alors produire divers métabolites, que sont respectivement les prostaglandines (PG) et les thromboxanes (TX) de la série 2, les leucotriènes (LT) de la série 4, ainsi que les dérivés hydroxylés (HETE) ou hydroperoxydés (HPETE) (Harizi et al., 2008; Schmitz and Ecker, 2008). Ces eicosanoïdes sont impliqués dans de nombreuses pathologies inflammatoires dont ils constituent par ailleurs des marqueurs, y compris dans les pathologies de la rétine et de ses vaisseaux (Kulkarni, 1991; Hardy et al., 2005; Gubitosi-Klug et al., 2008; Talahalli et al., 2010; Ryskamp et al., 2014; Elmasry et al., 2019). A forte concentration, l'AA libre possède également un caractère cytotoxique (Chen et al., 1997; Pompeia et al., 2003).

Contrairement à l'AA, le DHA possède des propriétés anti-inflammatoires. Suite à sa libération du plasmalogène par la $iPLA_2$, le DHA exerce son action selon deux voies distinctes mais complémentaires. Le DHA libre constitue en effet un ligand pour le RXR (Retinoid X Receptor), dont l'hétérodimérisation avec les PPARs entraine la translocation nucléaire du facteur de transcription et la régulation consécutive des gènes de l'inflammation **(Figure 31)** (Bordoni et al., 2006). Il serait également impliqué dans la régulation de la réponse calcique à un stress cellulaire (Sergeeva et al.,

2005; Begum et al., 2012). Parallèlement, le DHA est métabolisé en docosanoïdes par les mêmes familles d'enzymes que l'AA (COX, LOX et cyt P450). Parmi les dérivés métaboliques ainsi synthétisés figurent principalement la famille des SPM (Specialized Pro-resolving Mediators) : les protectines, les résolvines et les marésines. La neuroprotectine D1 (NPD1) et la résolvine D1 (RvD1) étant probablement les deux médiateurs les plus étudiés et les plus actifs. Ces dérivés oxydés du DHA activent eux aussi la voie des PPARs (Itoh and Yamamoto, 2008), notamment dans les cellules gliales et neurales *via* PPARγ (Zhao et al., 2011). Ils inhibent également la production de facteurs pro-inflammatoires **(Figure 31)** (Serhan, 2002; Ariel and Serhan, 2007; Bazan, 2009a, b; Calandria et al., 2009; Dalli et al., 2013; Hong and Lu, 2013; Joffre et al., 2016; Laye et al., 2018) tels que le TNF-α, l'IL-1β et l'IL-6, en limitant notamment l'activation de la voie des MAPK telles que p38 et ERK 1/2 (Bagga et al., 2003; Pan et al., 2009; Abdelmoaty et al., 2013; Heras-Sandoval et al., 2016). A l'échelle tissulaire, il a ainsi été montré que le DHA et ses dérivés permettent de prévenir les altérations observées au cours des rétinopathies (SanGiovanni and Chew, 2005), notamment la néovascularisation pathologique telle qu'observée chez un modèle animal de la ROP (Connor et al., 2007).

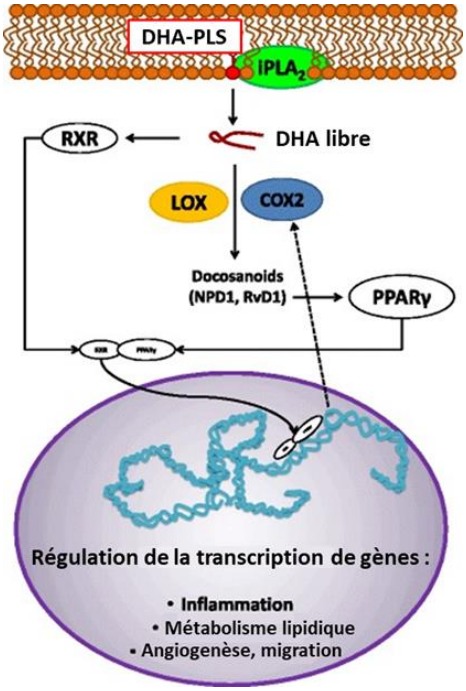

Figure 31 : Représentation schématique du mécanisme d'action de la signalisation cellulaire liée à la libération du DHA depuis les plasmalogènes (PLS). Adapté de Heras-Sandoval et al., (2016).

La signalisation induite par les plasmalogènes ne se limite cependant pas à la libération des AGPIs. En effet, les plasmalogènes sont susceptibles d'être dégradés par d'autres types d'enzymes, générant chacune des produits de dégradation spécifique, responsables d'effets divers sur la régulation des voies de signalisation.

- Signalisation liée aux autres produits de la dégradation des plasmalogènes

-Lysoplasmalogènes

Suite à la libération de l'acide gras en *sn*-2 par la $iPLA_2$, le plasmalogène devient un lysoplasmalogène. Il a ainsi été montré que les lysoplasmalogènes à éthanolamine peuvent jouer un rôle d'antigène dans la stimulation et la maturation des cellules NK (Facciotti et al., 2012), tandis que les lysoplasmalogènes à choline seraient impliqués dans l'adhérence des neutrophiles aux cellules endothéliales (White et al., 2007), probablement *via* une kinase cAMP-dépendante spécifique pour ces derniers (Williams and Ford, 1997). Le plasmenyl-lysophosphatidate a également pu être identifié en tant que possible facteur de croissance cellulaire (Fischer et al., 1998). Au niveau fonctionnel, il a récemment été montré que des niveaux élevés de lysoplasmalogènes, témoignant d'une activité importante de la $iPLA_2$, sont associés à des perturbations électrophysiologiques, à une inhibition de la Na^+/K^+ ATPase ainsi qu'à une activation de la PKA (Wu et al., 2011). Les lysoplasmalogènes font également l'objet d'une régulation par les lysoplasmalogénases. Ces enzymes sont spécifiques de la forme désacylée en *sn*-2 des plasmalogènes, et catalysent l'hydrolyse de la liaison vinyl-ether en *sn*-1, libérant ainsi un aldéhyde gras (Wu et al., 2011), qui pourra ensuite être oxydé en acide gras ou réduit en alcool gras (Rizzo et al., 2000; Rizzo, 2014). L'activité de la lysoplasmalogénase est inversement corrélée aux niveaux constitutifs en plasmalogènes des différents tissus. Elle est ainsi minimale dans le cerveau et le cœur, qui sont particulièrement riches en plasmalogènes, tandis qu'elle est maximale au niveau du foie et de la muqueuse intestinale (Wu et al., 2011). Enfin, le groupement polaire des lysoplasmalogènes peut également être hydrolysé par une phospholipase D (PLD) spécifique (Matsumoto et al., 2016; Sakasegawa et al., 2020).

-Alkenylacyl-glycérides

De nombreux stimuli cellulaires impliquent l'activation de récepteurs couplés aux protéines G (RCPG), qui entrainent l'activation d'une phospholipase C (PLC), ce qui clive un glycérophospholipide en diacylglycérol (DAG) et en inositol triphosphate (IP_3). La libération d'un DAG entraine dans un deuxième temps le recrutement d'une protéine kinase C (PKC) au niveau de la membrane plasmique, qui active alors des voies de signalisation telle que la voie des MAPK. Les plasmalogènes (et les éther-

glycérophospholipides) n'y font pas exception et génèrent des alkenylacyl-glycérides (1-alkenyl-2acyl-glycérol) suite à un stimulus induisant l'activation d'une PLC (Daniel et al., 1986; Rider et al., 1988). L'accumulation spécifique de ces espèces moléculaires a notamment pu être mise en évidence *in vitro* lors d'un stress ischémique (Ford and Gross, 1989a) ou après avoir exposé des cellules à l'IL-1α (Musial et al., 1995). Cependant, contrairement au DAG, il a été montré que les alkenylacyl-glycérides n'induisent pas d'activation de la PKC (Cabot and Jaken, 1984; Ganong et al., 1986; Heymans et al., 1987; Daniel et al., 1988). Au contraire, ils seraient des compétiteurs du DAG et constitueraient un mécanisme d'inhibition (Daniel et al., 1988; Mandal et al., 1997). Ceci est notamment appuyé par le fait que la restauration *in vitro* des taux de plasmalogènes dans des cellules initialement déficientes induise une inhibition de la translocation membranaire de la PKC-α (Clark and Murray, 1995). Cette inhibition serait toutefois dépendante du type cellulaire et des isoformes de PKC (Ford et al., 1989; Clark and Murray, 1995).

-Lipides α-chlorés

Certains contextes inflammatoires se caractérisent par l'activation et le recrutement de leucocytes de type polynucléaires neutrophiles qui contiennent une enzyme particulière, la myéloperoxydase (MPO). Suite à un stimulus entrainant leur activation, la MPO est surexprimée par les leucocytes, qui pourront alors la libérer dans l'espace extracellulaire par un processus appelé « dégranulation ». Il a été montré que l'action de la MPO est directement impliquée dans la diminution de la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique (Ullen et al., 2013), que l'on sait comparable à la barrière hémato-rétinienne notamment. Or, le recrutement de neutrophiles au niveau de la rétine et leur implication dans les dégénérescences vasculaires associées ont été clairement identifiés (Zhou et al., 2010; Dursun et al., 2015). Ils sont ainsi associés aux lésions vasculaires de la rétinopathie diabétique (Kim et al., 2005; Veenstra et al., 2013) et à la forme néovasculaire de la DMLA (Lechner et al., 2015), dont ils constitueraient un facteur de prédiction indépendant (Kurtul and Ozer, 2019). Par ailleurs, comme cela a pu être montré précédemment, la rétine est un tissu plutôt riche en plasmalogènes. Or, la MPO est capable d'attaquer spécifiquement la liaison vinyl-éther des plasmalogènes : les plasmalogènes sont clivés en un lysophospholipide et un aldéhyde gras α-chloré (α-ClFALD = α-Chlorinated Fatty Aldehyde). Ces α-ClFALD jouent un rôle dans la chimiotaxie des neutrophiles, favorisant notamment leur recrutement. Si leurs rôles cellulaires ne sont pas encore totalement identifiés, plusieurs études ont néanmoins montré une accumulation au cours de l'inflammation (Ullen et al., 2010) ainsi que des perturbations de la barrière endothéliale (Ullen et al., 2013; Nusshold et al., 2016). De manière intéressante, un nombre croissant d'études montre justement

une surexpression de la MPO dans les rétinopathies à composante néovasculaire (Augustin et al., 1993; Augustin et al., 1995).

4. Autres rôles

Depuis quelques années, les plasmalogènes sont également considérés comme de potentiels biomarqueurs pour certaines pathologies, telles que certaines dysfonctions mitochondriales (Ruiz et al., 2019), le glaucome (Acar et al., 2009) ou encore la maladie d'Alzheimer (Wong et al., 2017). Ainsi, les premiers signes de la maladie d'Alzheimer seraient observables dans la rétine, ce qui pourrait constituer un marqueur précoce de la pathologie (Koronyo et al., 2012; Moschos et al., 2012; Krantic and Torriglia, 2014).

E. Régulation du développement vasculaire rétinien et implications dans la ROP

Afin d'étudier les rôles biologiques des plasmalogènes, de nombreuses approches ont été envisagées et sont aujourd'hui à notre disposition. L'utilisation de lignées cellulaires ou d'animaux déficients en plasmalogènes représente probablement l'approche la plus utilisée à l'heure actuelle. Si les études menées *in vitro* sur des lignées cellulaires nous permettent de déchiffrer les mécanismes moléculaires dans lesquels sont impliqués les plasmalogènes, l'observation d'animaux déficients en plasmalogènes nous permet de vérifier leurs rôles physiologiques à l'échelle des tissus et de l'organisme. Il existe plusieurs souches murines dont la déficience en plasmalogènes est causée par une altération génétique propre. Ainsi, chez les souris mutantes pour le gène Pex7 par exemple, la déficience en plasmalogènes est consécutive de la déficience en peroxysomes (Brites et al., 2003). Chez la souris DAPAT$^{-/-}$, les peroxysomes sont normalement formés, mais la délétion des exons 5 à 7 du gène codant pour la DHAPAT induit une déficience totale en plasmalogènes (Rodemer et al., 2003). Cette déficience en plasmalogènes induit une surmortalité et se traduit par un phénotype singulier, caractérisé par de nombreuses altérations, telles qu'un faible poids et une altération de la croissance, une infertilité chez les mâles, mais surtout des anomalies majeures du développement oculaire. Ces anomalies sont multiples et touchent l'œil à tous les niveaux : microphtalmie (réduction d'environ 20% du diamètre de l'œil), malformation de la chambre antérieure de l'œil, mauvaise différenciation et structuration cellulaire du cristallin, résultant en l'apparition d'une cataracte. La rétine n'est pas épargnée par la déficience en plasmalogènes, avec des altérations dans la structure et la pigmentation de l'EPR, une accumulation des produits de dégradation des photorécepteurs, une hypoplasie doublée d'une hypomyélyination du nerf optique (Rodemer et al., 2003). S'ajoutent également la persistance des vaisseaux hyaloïdiens et des anomalies du développement vasculaire rétinien (Saab et al., 2014). Ces dernières se manifestent notamment par un retard initial du développement centrifuge des vaisseaux **(Figure 32A**), qui se mettent en place selon deux phases :

une première phase de retard de croissance des vaisseaux, suivie par une deuxième phase de néovascularisation, entrainant un développement anarchique des vaisseaux néoformés, caractérisés notamment par une dilatation des artères principales, une tortuosité accrue et des lésions provoquant des fuites vasculaires **(Figures 32B et 32C)** (Saab et al., 2014). Au niveau fonctionnel, cela se traduit par la disparition de l'onde b à l'électrorétinogramme (ERG) résultant en un ERG dit « négatif » chez les souris déficientes en plasmalogènes (Saab et al., 2014), ce qui est caractéristique d'une hypoxie de la rétine centrale (Kang Derwent and Linsenmeier, 2000; Beck et al., 2017). Au niveau cellulaire et moléculaire, ce développement pathologique est notamment corrélé à une perturbation du réseau astrocytaire, marqué par une suractivation des astrocytes **(Figure 32D)** et par la surexpression de facteurs liés à l'angiogenèse comme les angiopoïétines 1 et 2 (ANGPT1, 2), rapprochant ainsi ce modèle des anomalies observées au cours de la ROP.

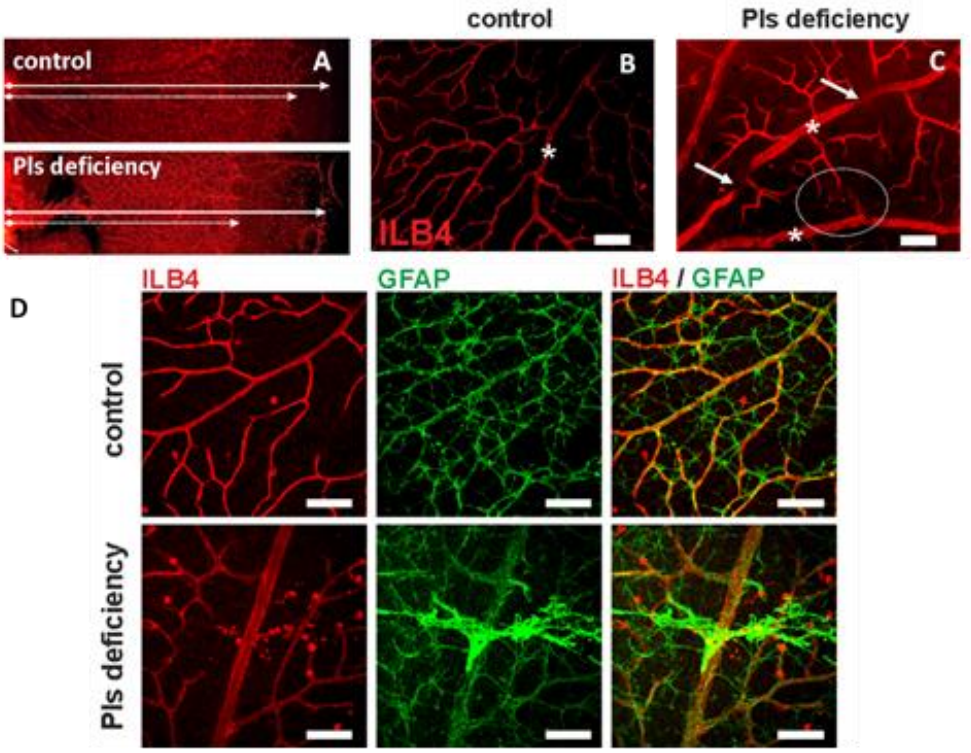

Figure 32 : Caractérisation des anomalies des réseaux vasculaires rétiniens et astrocytaire de la souris déficiente en plasmalogènes (DAPAT$^{-/-}$). A : Retard de croissance centrifuge des vaisseaux. **B-C :** Anomalies morphologiques des vaisseaux chez la souris adulte déficiente en plasmalogènes (C) par rapport à une souris contrôle (B), les vaisseaux présentent une dilatation importante (étoiles), des tortuosités (flèches) et des lésions (cercle). Images obtenues en microscopie confocale sur des rétines montées à plat après marquage des cellules endothéliales (ILB4). **D :** Les anomalies du développement vasculaires sont corrélées à une altération du réseau astrocytaire, due à une suractivation des astrocytes. Images obtenues en microscopie confocale sur des rétines montées à plat après marquage des cellules endothéliales (ILB4) et des astrocytes (GFAP). Adapté de Saab et al., (2014).

Compte tenu de leur importance dans la mise en place et la régulation du développement vasculaire rétinien, l'altération morphologique et fonctionnelle du réseau astrocytaire laisse à penser que les astrocytes pourraient jouer un rôle de premier ordre dans le phénotype vasculaire rétinien de la souris DAPAT$^{-/-}$. Pourtant, les astrocytes ne sont pas connus pour jouer un rôle prépondérant dans le métabolisme rétinien des plasmalogènes, contrairement aux cellules de Müller, les cellules gliales majoritaires de la rétine. Les cellules de Müller sont capables de communiquer directement entre elles ainsi qu'avec les astrocytes par des jonctions cellulaires particulières : les jonctions gap. Ces jonctions sont constituées de connexines, dont la connexine 43 (Cx43), qui représente la connexine majoritaire des jonctions gap des cellules gliales. Or, il s'avère que la déficience en plasmalogènes de la souris DAPAT $^{-/-}$ est associée à une sous-expression de la Cx43 (Rodemer et al., 2003) (Rodemer et al 2003). Il est ainsi possible d'envisager que des anomalies de la communication intercellulaire par jonction gap (GJIC) participent aux altérations du développement vasculaire rétinien chez la souris DAPAT$^{-/-}$.

IV. La communication intercellulaire par jonction gap

A. Définition, structure et organisation

Depuis l'avènement des formes de vie multicellulaires, de nombreux mécanismes de communication intercellulaire sont apparus, permettant le maintien de l'homéostasie et la réponse à divers stimuli au moyen de l'échange de molécules dites « messagers ». Parmi ces mécanismes figure la communication par voie dite calcique, qui permet la diffusion directe d'une information depuis le cytosol d'une cellule vers le cytosol de cellules adjacentes. Cette communication est notamment rendue possible par la présence de jonctions intercellulaires particulières : les jonctions gap **(Figure 33)**. Elles sont constituées par l'assemblage d'hémi-canaux transmembranaires de deux cellules en contact, les connexons, et permettent le passage de petites molécules telles des ions (comme le Ca^{2+}), des métabolites ou des messagers secondaires (comme l'IP_3) jusqu'à un poids d'1 kDa (Evans and Martin, 2002). Les jonctions gap existent généralement sous forme de plaques, observables en microscopie électronique. Les connexons, éléments primaires de ces jonctions, forment des structures semblables à des pores au sein de la membrane. Ils sont eux-mêmes constitués de 6 sous-unités disposées en hexamère de protéines spécifiques, les connexines (Cx). Il existe une certaine diversité dans les types de connexines, dont l'expression semble être dépendante du tissu. Les connexons peuvent être constitués d'un unique type de connexines ou d'un arrangement de différents types. On parlera alors respectivement de connexon homomérique ou hétéromérique. Si les deux connexons se faisant face sont identiques, ils donneront naissance à un canal homotypique, tandis que si les deux connexons sont différents, ils donneront un canal dit hétérotypique. A l'heure actuelle, au moins 21 gènes codant pour une connexine ont pu être identifiés chez l'Homme, chacun donnant lieu à l'expression d'une connexine spécifique, dont les poids moléculaires varient de 21 à 62kDa (Sohl and Willecke, 2003). Dans l'œil, on trouve essentiellement des connexines dans le cristallin et la rétine. Les jonctions gap du cristallin sont majoritairement composées des Cx43, Cx46 et Cx50, et il a été montré qu'une mutation de la Cx46 peut favoriser l'apparition d'une cataracte (Berthoud et al., 2014), ce qui souligne leur importance dans la physiologie et la fonction oculaire. Dans la rétine, les Cx26, Cx30, Cx36, Cx37, Cx40 Cx43, Cx45, Cx50 et Cx57 ont pu être identifiées. Elles ne sont cependant pas toutes exprimées par les mêmes types cellulaires **(Tableau 1)**, et il semblerait par ailleurs que leur expression évolue au cours du développement post-natal (Kihara et al., 2006) et du vieillissement (Mansour et al., 2013).

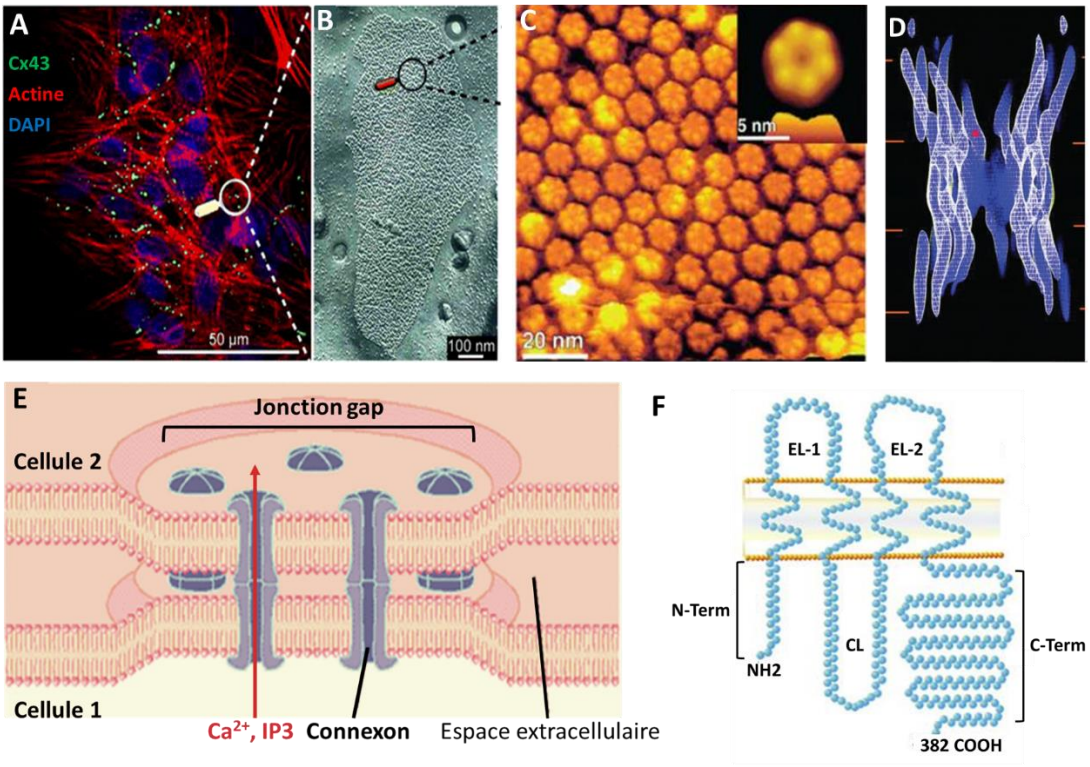

Figure 33 : Structure des jonctions gap et de leurs unités constitutives, les connexines. A : Immunomarquage de la Cx43 (vert) dans des cellules *in vitro*, montrant sa localisation au niveau des jonctions intercellulaires. Adapté de Herve and Derangeon (2013). **B** : Photographie d'une jonction gap en microscopie électronique à transmission selon le principe de fracture par congélation (freeze fracture) ; **C** : Photographie prise en microscopie de force atomique des connexons au sein d'une plaque de jonction gap. **D** : Structure de la connexine 43 obtenue par cristallographie électronique. Adapté de Nielsen et al., (2012). **E** : Représentation schématique de l'organisation des canaux intercellulaires au sein d'une jonction gap. Adapté de McLachlan et al., (2013) ; **F** : Représentation schématique de la structure polypeptidique de la Cx43 au sein de la membrane plasmique. On peut y distinguer 3 domaines cytoplasmiques : l'extrémité N-terminale (N-Term), une boucle cytoplasmique (CL) et l'extrémité C-terminale (C-Term). Deux boucles extracellulaires (EL) émergent quant à elles de l'autre côté de la membrane plasmique. Adapté de Laird (2006).

Au sein des cellules macrogliales, les Cx26, Cx30, Cx43 et Cx45 sont exprimées dans les astrocytes (chez le rat) (Zahs K.R. et al. 2003 ; Mansour H. et al. 2013), tandis que seules les Cx43 et Cx45 seraient exprimées par les cellules de Müller (l'expression de la Cx45, bien que minoritaire, reste discutée) (Zahs et al., 2003). Entre les cellules macrogliales de la rétine, les jonctions GAP sont majoritairement constituées par la Cx43 (Zahs and Ceelen, 2006; Kerr et al., 2010). Elles sont observables entre cellules macrogliales du même type (astrocyte/astrocyte et cellule de Müller/cellule de Müller) ainsi qu'entre les deux types (astrocyte/cellule de Müller) (Johansson et al., 1999; Newman, 2001). On parle alors respectivement de jonctions homologues et hétérologues. Compte tenu du rôle majoritaire tenu par la Cx43, nous nous arrêterons ici uniquement à sa description.

Tableau 1 – Expression des connexines dans la rétine de la souris

Connexines	Gènes	Types cellulaires rétiniens	Références
Cx26	*Gjb2*	Cellules gliales	Zahs *et al*. 2003 ; Mansour *et al*. 2013 ;
Cx30	*Gjb6*	Cellules gliales et neurales	Zahs *et al*. 2003 ; Mansour *et al*. 2013 ;
Cx36	*Gjd2*	Cellules gliales et neurales	Kothmann *et al*. 2007 ; Feigenspan *et al*. 2004 ; Kihara *et al*. 2006 ; Frank *et al*. 2010 ; Jin *et al*. 2020 ;
Cx37	*Gja4*	Cellules endothéliales	Söhl *et al*. 2000 ;
Cx40	*Gja5*	Cellules endothéliales	Haefliger *et al*. 2017 ;
Cx43	*Gja1*	Cellules gliales	Zahs *et al*. 2003 ; Mansour *et al*. 2013 ; Zahs KR, Ceelen PW. 2006 ; Kerr *et al*. 2010 ;
Cx45	*Gja7*	Cellules gliales et neurales	Zahs *et al*. 2003 ; Kihara *et al.* 2006 ; Mansour *et al*. 2013 ; Frank *et al*. 2010 ;
Cx50	*Gja8*	Cellules horizontales	Dorgau *et al*. 2015 ;
Cx57	*Gja10*	Cellules horizontales	Hombach *et al*. 2004 ;

B. La connexine 43

La Cx43 est la plus répandue à l'échelle de l'organisme. Il s'agit donc de la connexine la plus étudiée et la mieux caractérisée. Chez l'Homme, elle est codée par le gène *GJA1* (Gap Junction A1), situé sur le chromosome 6. On la trouve ainsi parfois sous la dénomination GJA1 protein. Il s'agit d'une protéine de 382 acides aminés (aa) à 4 domaines transmembranaires. Elle possède toutefois la particularité d'avoir une chaine C-terminale particulièrement longue, puisqu'elle comprendrait les 150 derniers aa, soit 39% de la séquence totale. La demi-vie de la Cx43 au sein de la membrane plasmique est inférieure à 5 heures (Fallon and Goodenough, 1981; Darrow et al., 1995; Laird, 2006), ce qui est particulièrement court pour une protéine transmembranaire, pour lesquelles la demi-vie dépasse généralement 75 heures (Hare, 1990; Hare and Taylor, 1991). Ce turn-over constant entraine la génération d'un flux continu de synthèse/dégradation.

1. Synthèse et adressage membranaire

La synthèse de la Cx43 suit la voie classique de synthèse des protéines, à savoir des étapes de traduction et maturation dans le RE puis l'appareil de Golgi, où elles sont oligomérisées en hexamères, formant alors un connexon (Musil and Goodenough, 1991). Les connexons sont ensuite adressés à la membrane *via* des vésicules de transport, migrant le long des éléments du cytosquelette, notamment les microtubules (Lauf et al., 2002). Les connexines ont tendance à s'accumuler préférentiellement dans les micro-domaines membranaires enrichis en cholestérol, phospholipides et plasmalogènes que sont les radeaux lipidiques (lipid rafts) et les cavéoles (Schubert et al., 2002; Defamie and Mesnil, 2012). Ceci est notamment permis par l'existence d'un site de fixation sur la chaine C-terminale de la Cx43 pour la cavéoline-1 (Schubert et al., 2002; Langlois et al., 2008), protéine essentielle et constitutive de ces domaines. Cette interaction pourrait même avoir lieu dès leur passage dans l'appareil de Golgi, puisqu'il semblerait que la Cx43 et la Cav-1 soient exportées conjointement par celui-ci vers la membrane plasmique (Langlois et al., 2008).

Une fois adressés à la membrane, les connexons commencent à y former de petits agrégats là où les distances intercellulaires sont particulièrement faibles (Bukauskas et al., 2000). A mesure que les connexons continuent d'arriver au niveau de la membrane plasmique, les agrégats de canaux se densifient, jusqu'à former des plaques **(Figure 34)** (Johnson et al., 2012). Pour être fonctionnelles, les plaques en formation doivent atteindre un minimum de 200 à 400 canaux (Bukauskas et al., 2000), et peuvent ensuite dépasser les 2000. Il est intéressant de noter qu'il semble exister au sein des plaques de jonctions gap un roulement en fonction de l'ancienneté de synthèse. Les jonctions gap à connexines les plus récentes entrent dans la plaque à la périphérie par diffusion latérale, tandis que les connexines les plus anciennes se déplacent vers le centre de la plaque, avant d'être internalisées puis dégradées (Gaietta et al., 2002; Lauf et al., 2002). Cette dégradation peut également être déclenchée par divers stimuli, tels que l'inflammation ou certains facteurs de croissance.

2. Régulation du turnover

Comme mentionné plus tôt, la chaine C-terminale de la Cx43 est particulièrement longue. Elle contient ainsi des sites de fixation pour de nombreuses enzymes capables de réguler sa fonction mais aussi sa dégradation par des mécanismes de phosphorylation, comme PKC, les MAPKs, la protéine kinase A (PKA), la protéine kinase B (PKB ou Akt) la calmoduline kinase 2 (CaMKII) ou encore la caséine kinase 1 (CK1)... (Leithe et al., 2018; Sorgen et al., 2018). La dégradation de la Cx43 peut s'effectuer selon plusieurs mécanismes, qui requièrent l'implication des protéasomes et des lysosomes. Notamment, la phosphorylation de la Cx43 par les MAPKs (Ser279/282), Src (Tyr 265) ou

la PKC (Ser368) provoque l'ubiquitination de la CX43, qui entraine sa reconnaissance et sa dégradation par le protéasome. Il a ainsi été montré que la communication intercellulaire par jonction gap (Gap Junction Intercellular Communication ou GJIC) était directement régulée par la phosphorylation de la Cx43 sur ses différents sites (Laing and Beyer, 1995; Lampe and Lau, 2000; Giepmans et al., 2001; Leithe and Rivedal, 2004; Solan and Lampe, 2007; Kimura and Nishida, 2010). L'acétylation et la nitrosylation font également partie des mécanismes capables d'induire une dégradation de la Cx43 et une inhibition de la GJIC (Retamal et al., 2006; Colussi et al., 2011; Straub et al., 2011; Meraviglia et al., 2015).

Les jonctions gap peuvent aussi être endocytées sous la forme de structures organisées en double membrane, les connexosomes (ou jonctions annulaires) (Jordan et al., 2001; Piehl et al., 2007), qui peuvent alors être dégradées par les endosomes ou les phagophores avant d'être éliminées par le lysosome (Figure 32) (Leithe et al., 2018).

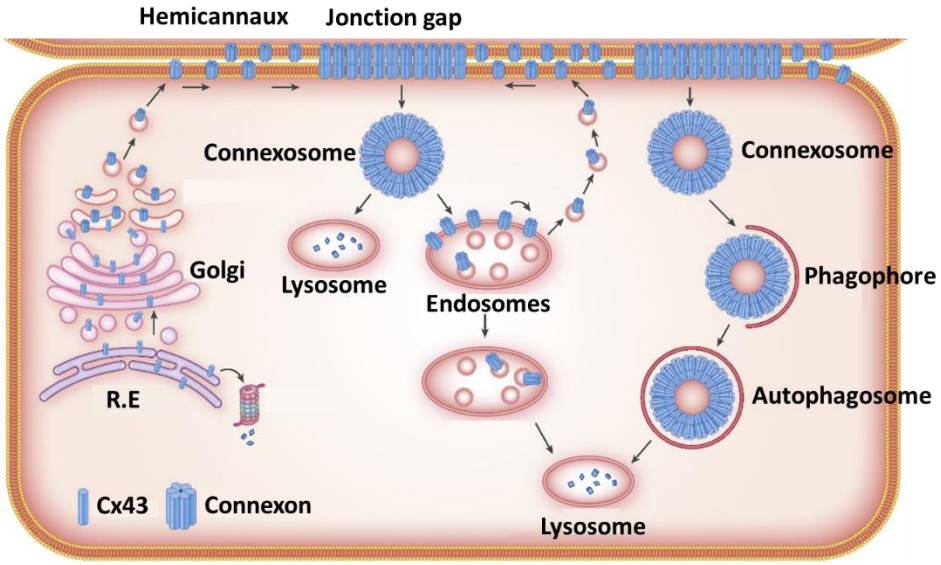

Figure 34 : Représentation schématique du cycle de synthèse et de dégradation de la connexine 43 (Cx43). Suite à sa synthèse, la Cx43 est exportée à la membrane sous la forme de connexons (ou hémicanaux), qui s'assembleront pour former une jonction gap. Les connexons les plus anciens seront ensuite internalisés sous la forme de connexosomes, qui seront alors dégradés directement ou après plusieurs étapes intermédiaires au sein des lysosomes. Adapté de Leithe et al., (2018).

En couplant plusieurs cellules directement entre elles, les jonctions gap permettent la formation de compartiments communicants, ce qui représente un aspect essentiel, sinon indispensable, de la régulation fonctionnelle des tissus et de leur homéostasie. C'est notamment le cas de tissus dits excitables, comme le cœur (qui est particulièrement riche en jonctions gap), où le couplage électrique des cellules permet une diffusion de l'information et une synchronisation cellulaire

efficaces. Leur perméabilité permet la diffusion de nombreuses molécules, comme des ions, des nucléotides, du glucose et ses métabolites, ou encore des messagers secondaires comme l'IP_3. La capacité à diffuser de tels signaux d'une cellule initiale aux cellules adjacentes permet ainsi la diffusion rapide d'un message, qui peut se transmettre potentiellement à un grand nombre de cellules. Parmi ces échanges intercellulaires par jonction gap, la communication par voie calcique représente le mécanisme le plus important et le plus étudié.

C. La communication intercellulaire par voie calcique

Cette voie de communication repose sur la stimulation d'une cellule initiale par un facteur (qui peut être de nature diverse), qui va alors générer une réponse calcique de la cellule, et qui elle-même se propagera aux cellules adjacentes, qui pourront à leur tour stimuler les cellules environnantes. La communication intercellulaire par voie calcique est ainsi généralement résumée sous le terme de communication intercellulaire par jonction gap ou GJIC. Cette capacité représente l'une des caractéristiques fondamentales des cellules macrogliales de la rétine.

1. Génération du message

La première étape nécessite la fixation d'une molécule signal à son ligand. Ce signal peut être de nature moléculaire diverse : hormone, facteur de croissance, base purique. Les récepteurs susceptibles de déclencher un signal calcique sont deux types : les récepteurs couplés aux protéines G (GPCR) et les récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK) **(Figure 35)**. S'il existe bien entendu des spécificités moléculaires propres à chacun des récepteurs, les mécanismes qu'ils impliquent en aval restent néanmoins similaires. Ainsi, la fixation du ligand entraine un changement conformationnel du récepteur, ce qui va permettre le recrutement d'une protéine G. Cette dernière provoque l'activation d'une PLC, qui va hydrolyser un phospholipide membranaire particulier, le PIP2, et libérer un DAG et un IP_3 (Harden et al., 2011; Gresset et al., 2012). Il est ici important de préciser l'existence de plusieurs types de PLC. Ainsi, les GPCR impliquent l'activation d'une PLC-β (Waldo and Harden, 2004; Lyon and Tesmer, 2013), tandis que les RTK impliquent quant à eux l'activation d'une PLC-γ (Poulin et al., 2005; Gresset et al., 2012). Si le DAG nouvellement formé reste dans le feuillet interne de la membrane plasmique, l'IP_3 va quant à lui être libéré dans le cytosol, où il pourra alors se fixer sur un récepteur (IP3R) situé dans la membrane du RE. Ce couplage entraine l'ouverture du récepteur, qui est en réalité un canal transmembranaire, et entraine la libération d'ions Ca^{2+} depuis les réserves du RE vers le cytosol (Mikoshiba, 2007; Taylor and Tovey, 2010; Hamada et al., 2017). La libération de Ca^{2+} permet également l'ouverture d'un deuxième canal de la membrane du RE, le récepteur à la ryanodine (RyR), qui va seconder l'IP3R et amplifier le relargage de Ca^{2+} **(Figure 35)**. Cette libération massive de Ca^{2+} provoque une augmentation importante de la concentration calcique intracellulaire,

qui peut notamment être mesurée par des techniques d'imagerie par fluorescence grâce à l'utilisation de sondes calciques fixant le calcium intracellulaire libre, comme le Fura-2 ou le Fluo-4. A l'échelle cellulaire, cette augmentation du calcium intracellulaire a de nombreuses conséquences, dont l'activation de protéines impliquées dans les voies de signalisation intracellulaires, telles que la calmoduline et les PKC (Clapham, 2007; Newton, 2009). Suite à la fixation du Ca^{2+} sur son site, les PKC vont alors être recrutées au niveau de la membrane plasmique, où leur fixation est facilitée par la présence du DAG précédemment généré (Guerrero-Valero et al., 2009; Lucic et al., 2016; Schuhmacher et al., 2020). Une fois ancrée au niveau membranaire, la PKC entraine par une cascade de phosphorylation l'activation de nombreuses voies de signalisation, dont la voie des MAPKs (Bhat, 1995; Schonwasser et al., 1998; Faria et al., 2017). Ces protéines régulent l'activation et la translocation nucléaire de nombreux facteurs de transcription, et notamment ceux associés à la différenciation cellulaire, la croissance, la migration, mais aussi l'inflammation etc.

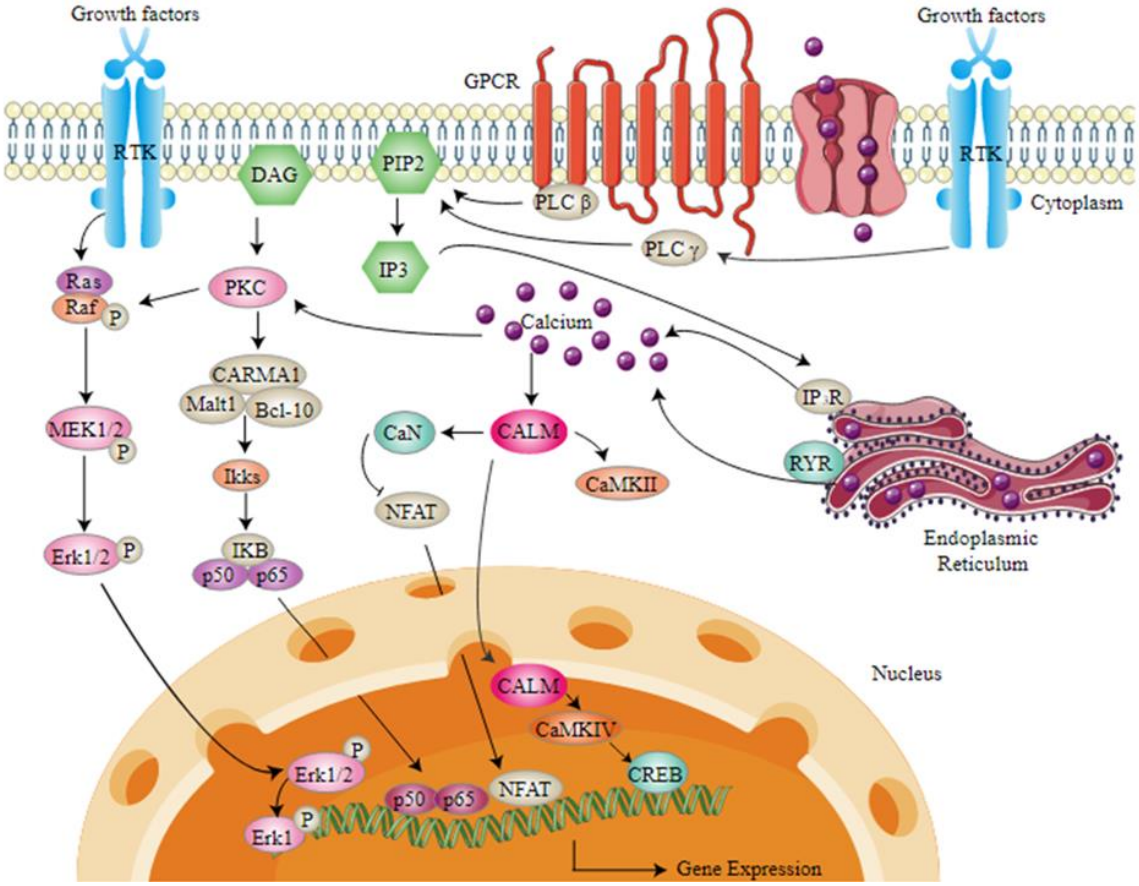

Figure 35 : Représentation schématique des mécanismes de génération d'une réponse calcique en fonction des stimuli, et de l'activation consécutive des voies de signalisation intracellulaire. Adapté de https://www.creative-diagnostics.com/calcium-signaling-pathway.htm

Si cette description générale permet d'expliquer les mécanismes régissant la signalisation calcique des cellules, des particularités existent cependant entre les astrocytes et les cellules de Müller.

En effet, au sein de la rétine comme du cerveau, les astrocytes possèdent des récepteurs pour de nombreuses molécules capables d'induire une réponse calcique : des neurotransmetteurs tels que le glutamate (Cornell-Bell and Finkbeiner, 1991; Newman, 2001), le GABA (Kimelberg, 1995; Porter and McCarthy, 1997; Martinez-Delgado et al., 2011), l'acétylcholine (Araque et al., 2002) ou la sérotonine (Kimelberg and Katz, 1985; Miyazaki and Asanuma, 2016), mais également des récepteurs aux bases puriques (Newman, 2001; Fiacco and McCarthy, 2006) et à l'endothéline 1 (ET-1) (Hofer et al., 2002). Ces agonistes entrainent toutefois des réponses d'intensité variable, avec par exemple une réponse relativement faible pour l'acétylcholine et les catécholamines, tandis qu'elle est particulièrement importante pour le glutamate et l'ET-1. Cette différence s'explique notamment par la faible expression des récepteurs muscariniques et adrénergiques, mais aussi par la différence dans les isoenzymes de PLC recrutées selon le récepteur impliqué (Hofer et al., 2002).

La découverte de l'expression et la fonctionnalité des récepteurs aux neurotransmetteurs dans les astrocytes, et notamment au glutamate, a permis l'émergence du concept de la synapse tripartite mentionné précédemment dans ce manuscrit. Grâce à ces récepteurs, les astrocytes réagissent à l'activation synaptique au moyen d'une réponse calcique intracellulaire qui déclenche la libération de neurorégulateurs dans la synapse, permettant de moduler en retour l'activité synaptique neuronale, constituant ainsi un mécanisme de rétrocontrôle. Par ailleurs, il semble important d'ajouter que les astrocytes possèdent également une activité calcique intrinsèque, même en l'absence neurones ou de neurotransmetteurs (Parri et al., 2001; Nett et al., 2002; Shigetomi et al., 2010). Cette activité caractéristique peut se limiter à des micro-domaines cellulaires ou à certaines ramifications et ne se propage pas nécessairement au reste de la cellule ni aux astrocytes environnants (Nett et al., 2002; Fiacco and McCarthy, 2006; Di Castro et al., 2011).

Les cellules de Müller ne sont quant à elles pas sensibles aux mêmes signaux que les astrocytes. En effet, si les neurotransmetteurs tels que le glutamate caractérisent le stimulus principal de la réponse calcique astrocytaire, il semblerait que les cellules de Müller soient insensibles à ces derniers (Newman and Zahs, 1997; Bringmann et al., 2002). A la place, les cellules de Müller réagissent essentiellement aux bases puriques (ATP, ADP, UTP, UDP…) (Li et al., 2001; Newman, 2001, 2005; Yu et al., 2009). Les cellules de Müller expriment en effet des récepteurs purinergiques de la famille des P2YR (Reifel Saltzberg et al., 2003; Fries et al., 2005; Wurm et al., 2011; Reichenbach and Bringmann, 2016). Il existe de nombreux sous-types de P2YR, et leur expression dépend notamment des espèces

considérées. Ainsi, des transcrits pour les récepteurs P2Y1, P2Y2, P2Y4 et P2Y6 ont été identifiés dans les cellules de Müller chez l'Homme et le rat (Bringmann et al., 2001; Li et al., 2001; Pannicke et al., 2001; Bringmann et al., 2002; Fries et al., 2004; Fries et al., 2005). Toutefois, les études d'immunolocalisation ne semblent pas indiquer la présence de récepteurs P2Y2 ou P2Y6 dans les cellules de Müller chez le rat, qui reposerait ainsi quasi exclusivement sur le récepteur P2Y1 (Newman and Zahs, 1997; Li et al., 2001; Wurm et al., 2010), comme chez la souris (Lipp et al., 2009). Les récepteurs P2Y sont notamment localisés au niveau des lipid rafts dans la membrane plasmique, et impliquent le recrutement consécutif d'une PLC-β (Krishnan and Chatterjee, 2013). La libération d'IP_3 impliquerait l'activation du sous-type de récepteur IP3R2, contrairement aux astrocytes dans lesquels ce dernier ne semble pas impliqué (Lipp et al., 2009; Wurm et al., 2010). Par ailleurs, si les bases puriques et notamment l'ATP représentent le stimulus principal des cellules de Müller, il a également été montré que d'autres molécules sont capables d'induire une réponse calcique, comme la thrombine, la dopamine et l'acide lysophosphatidique (Puro and Stuenkel, 1995; Newman, 2003).

Enfin, tout comme les astrocytes, les cellules de Müller se distinguent également par une activité calcique intrinsèque et spontanée (Newman, 2005; Metea and Newman, 2006a).

2. Propagation du message

Les cellules de Müller et les astrocytes sont tous deux capables de propager un signal calcique, que ce soit au sein de leurs réseaux propres ou bien entre les deux types cellulaires. Cependant, les mécanismes de cette propagation diffèrent et montrent là encore des spécificités propres à chacune.

Les astrocytes sont très fortement couplés entre eux par les jonctions gap. C'est la présence de ces dernières qui permet de propager une information par voie calcique au sein des réseaux astrocytaires, selon une distance plus ou moins importante avec une vitesse moyenne comprise entre 19 et 28µm/sec selon les études (Scemes et al., 1998; Newman, 2001). La diffusion de la vague calcique peut-être suivie lors d'expériences en microscopie fluorescente *in vitro* grâce à l'usage de sondes adaptées **(Figure 36A)**, et la réponse des astrocytes peut-être enregistrée individuellement afin d'être analysée **(Figure 36B)**.

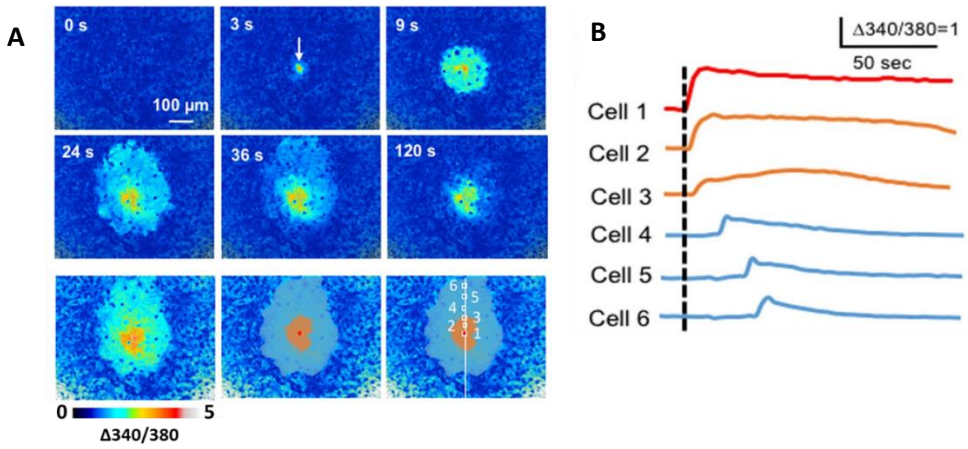

Figure 36 : Enregistrement expérimental d'une vague calcique astrocytaire. La propagation de la vague calcique (en bleu clair puis orangé) au sein d'un réseau astrocytaire préalablement marqué au Fura-2 en microscopie de fluorescence (A) et enregistrement du signal au sein des astrocytes individuels tout au long de la propagation du signal (B). Adapté de Fujii et al., (2017).

Cependant, contrairement à ce que son nom laisserait suggérer au premier abord, la propagation du signal calcique depuis un astrocyte initial repose quasi exclusivement sur la diffusion de l'IP_3 à travers les jonctions gap, et non sur celle du Ca^{2+} (Hofer et al., 2002). L'importance des jonctions gap et notamment de la Cx43 dans la propagation du signal calcique astrocytaire est soulignée par les études qui montrent des altérations significatives en cas de déficience en Cx43 (Scemes et al., 1998). Ce système de diffusion est néanmoins limité puisqu'il perd en intensité à chaque astrocyte parcouru. Ainsi, bien que le couplage adéquat des cellules soit un paramètre important quant à la bonne propagation du signal calcique, la perméabilité à l'IP_3 possède un seuil au-delà duquel elle ne permet plus d'augmenter la distance de propagation du signal **(Figure 37A)**. Cette diffusion est en réalité secondée par l'activité de la PLC-γ, qui agit comme un mécanisme d'amplification permettant une régénération partielle de l'IP_3 au sein de chaque astrocyte stimulé **(Figure 37B)** (Hofer et al., 2002; Goldberg et al., 2010). Cela est notamment étayé par le fait que la distance de propagation est réduite à quelques cellules en l'absence d'activité de la PLC. Cette régénération n'étant toutefois que partielle, cela explique pourquoi le signal finit par s'atténuer pour enfin cesser de se propager après un certain nombre d'astrocytes stimulés successivement (Giaume and Venance, 1998). L'intensité du stimulus initial semble également être un facteur important. En effet, le nombre de cellules activées (et donc la distance propagation) est au moins partiellement corrélé à l'intensité du stimulus initial. C'est pourquoi les modèles montrent que l'activité de la PLC représenterait en réalité le paramètre le plus important quant à la distance de diffusion de ce signal **(Figure 37B,C)** (Hofer et al., 2002). Tout comme les astrocytes, la stimulation d'une cellule de Müller pourra entrainer la stimulation de

nombreuses cellules environnantes, sous la forme d'une vague calcique mesurable **(Figure 38)** (Newman and Zahs, 1997; Newman, 2001).

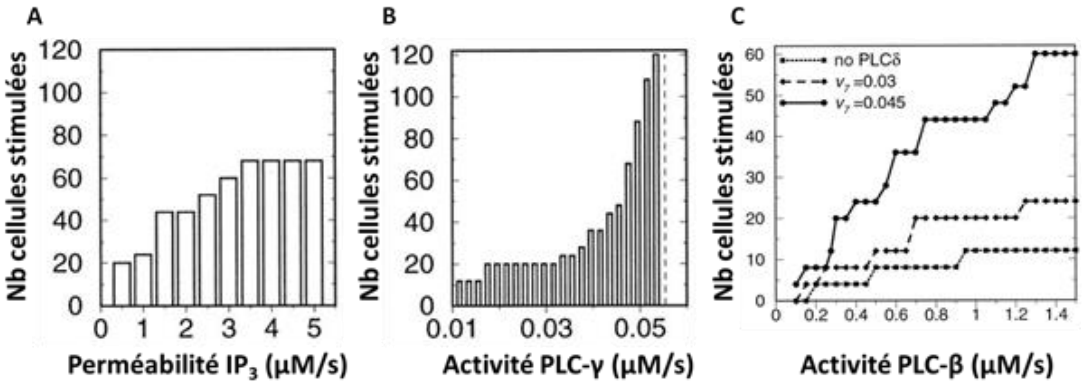

Figure 37 : Importance de différents paramètres sur la propagation de la vague calcique, tels que l'impact de la perméabilité à l'IP3 (A), de l'activité de la PLC-γ (B) et de l'activité de la PLC-β dans l'astrocyte initial (C). Adapté de Höfer et al., (2002).

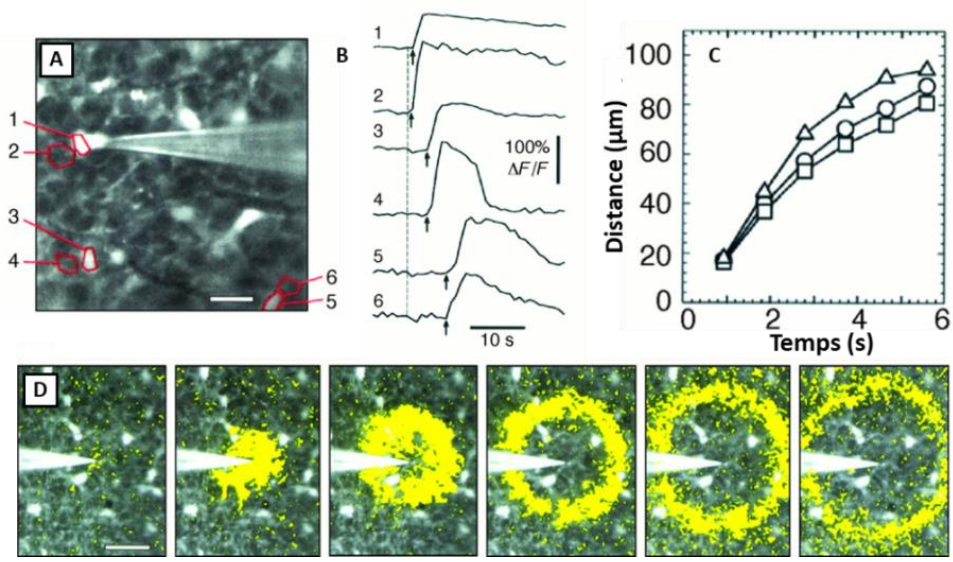

Figure 38 : Stimulation expérimentale de la communication intercellulaire par voie calcique (GJIC) des cellules de Müller. A : Stimulation d'une cellule de Müller à l'aide d'une micropipette. **B :** Enregistrement de l'activation des cellules adjacentes. **C :** Corrélation entre le temps d'activation d'une cellule et sa distance par rapport à la cellule à l'origine du signal. **D :** Time-lapse de la propagation de la vague calcique au sein d'un réseau de cellules de Müller visualisée en fluorescence Intervalles = 0,93s. Adapté de Newman and Zahs (1997).

Cependant, bien que contenant elles aussi des jonctions gap qui reposent essentiellement sur la Cx43, les cellules de Müller ne propagent pas la vague calcique par diffusion de l'IP_3 à travers les jonctions gap. A la place, l'activation calcique d'une cellule de Müller entraine une libération extracellulaire d'ATP à travers les connexons (Newman, 2001, 2005; Metea and Newman, 2006a). Cet ATP va alors stimuler les cellules de Müller adjacentes, qui vont à leur tour activer les cellules

voisines selon le même principe. Cette stimulation s'apparente donc à un mode de communication paracrine **(Figure 39)**. De plus, cette spécificité permet une propagation plus rapide du signal que par la diffusion de l'IP_3 (41µm/sec *versus* 19-28µm/sec) (Newman, 2001). Puisque les connexons chargés de la libération de l'ATP reposent sur leur contenu en connexine, une perturbation de leur expression est susceptible d'induire des altérations fonctionnelles. Ainsi, il a été montré *in vitro* que la déficience en connexine inhibe la propagation des vagues calciques (Cotrina et al., 1998).

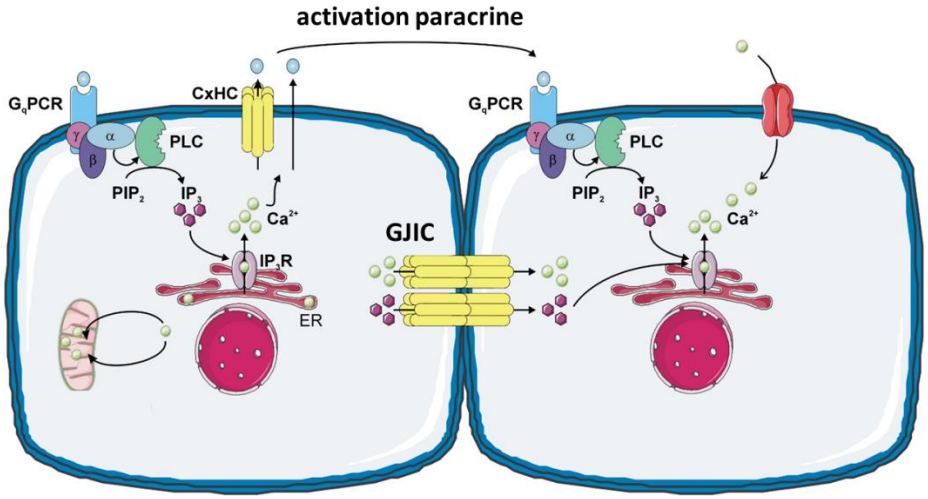

Figure 39 : Représentation schématique des différents modes de propagation du signal calcique au sein des cellules gliales de la rétine. Adapté de De Bock et al., (2014).

3. Rôles physiologiques et régulation en contexte pathologique

A l'échelle physiologique, la GJIC intervient dans la régulation de nombreuses fonctions d'importance pour l'organisme, y compris dans l'œil, où elle est par exemple impliquée dans la bonne formation du cristallin (White and Bruzzone, 2000; Cheng et al., 2008). Si le contrôle de l'activité synaptique neuronale fait figure de rôle de premier plan pour les cellules gliales rétiniennes, les études montrent qu'elles sont capables de réguler d'autres fonctions essentielles par le moyen de la communication calcique, telle que la régulation de la circulation sanguine par un phénomène de couplage neuro-vasculaire (Fiacco and McCarthy, 2006; Metea and Newman, 2006b; Straub et al., 2006; Newman, 2015; Otsu et al., 2015). Cette fonction repose notamment sur l'activation de PLA_2 calcium-dépendantes, qui en libérant les AGPIs des phospholipides membranaires induisent la production d'eicosanoïdes capables de réguler la dilatation ou la constriction des vaisseaux (Metea and Newman, 2006b; Newman, 2015). Or, il s'avère que ce couplage neuro-vasculaire est altéré dans des pathologies telle que la rétinopathie diabétique, notamment en raison d'une diminution de la vasodilatation induite par les cellules gliales (Newman, 2015). La régulation de ces mécanismes par les cellules gliales pourra donc représenter l'une des cibles thérapeutiques contre les atteintes rétiniennes du diabète.

De plus, on observe dans de nombreuses pathologies de la rétine une augmentation de l'activation calcique des cellules de Müller, comme par exemple au cours d'une ischémie, d'un décollement rétinien ou d'une rétinopathie proliférante (Francke et al., 2002; Francke et al., 2003; Uckermann et al., 2003; Uhlmann et al., 2003). Si les mécanismes propres à chacune des rétinopathies restent à éclaircir, de nombreuses pistes et éléments ont déjà pu être identifiés. Ainsi, en contexte ischémique et inflammatoire, on observe une diminution de l'expression et de l'activité des canaux potassiques Kir4.1. Ceci conduit à une altération du transport des ions K^+ dans la cellule de Müller et entraine des perturbations de l'homéostasie osmotique (Wurm et al., 2011), qui peuvent mener à l'apparition d'un œdème rétinien (Bringmann et al., 2004; Reichenbach et al., 2007). La perturbation fonctionnelle de ces canaux constitue notamment un prérequis pour l'induction du cycle prolifératif des cellules de Müller au cours de la gliose (Bringmann et al., 2000). Or, ce taux de prolifération repose notamment sur l'activation des récepteurs P2Y, qui régulent le degré de synthèse d'ADN (Moll et al., 2002; Pearson et al., 2005), et dont l'expression est augmentée en contexte pathologique (Iandev et al., 2006). Cette information est doublement intéressante car on sait que dans les contextes pathologiques on observe justement une libération accrue d'ATP par les neurones (Reigada et al., 2008; Sanderson et al., 2014; Perez de Lara et al., 2015). Ainsi, la réduction de l'activation des P2YR inhibe la prolifération normalement induite par l'ATP (Kodal et al., 2000; Moll et al., 2002).

Enfin, un nombre croissant d'études établissent un lien entre la Cx43, la GJIC et les pathologies oculaires, mais parfois avec des conclusions opposées. Par exemple, dans le cas d'une élévation de la pression intraoculaire, certaines études montrent une augmentation significative de l'expression de la Cx43 dans les cellules gliales, suggérant que la GJIC constituerait l'un des mécanismes de la propagation de l'inflammation, de la perméabilité vasculaire et de la mort des cellules ganglionnaires (Kerr et al., 2012), tandis que d'autres évoquent au contraire une diminution significative de l'expression de la Cx43 (Malone et al., 2007). Les études menées sur la rétinopathie diabétique montrent quant à elles une diminution de l'expression de la Cx43 et la GJIC aussi bien chez l'Homme que chez les modèles de rongeurs (Ly et al., 2011; Tien et al., 2016). L'augmentation de la glycémie induit en effet une sous-expression de la Cx43 notamment par les cellules de Müller (Muto et al., 2014). Ces études montrent ainsi que la réduction de l'expression de la Cx43 et de la GJIC sont associées à l'apparition des anomalies vasculaires, suggérant que la Cx43 joue un rôle central dans la pathogenèse des rétinopathies à composante néovasculaire.

Objectifs et enjeux de la thèse

Les plasmalogènes sont des phospholipides particuliers, dotés de fonctions physiologiques et cellulaires primordiales : ils exercent des rôles structurels et fonctionnels pour la cellule, notamment en lui conférant un potentiel antioxydant et en participant aux mécanismes de signalisation intracellulaires *via* leur capacité à concentrer les AGPIs. S'ils sont présents dans tous les types cellulaires, ils sont particulièrement enrichis dans les tissus nerveux comme la rétine, où leur métabolisme semble reposer essentiellement sur les cellules de Müller, les cellules gliales majoritaires et spécifiques de la rétine. Les cellules gliales jouent un rôle primordial dans la régulation physiologique de la rétine, y compris dans son développement vasculaire. Or, le modèle murin de déficience en plasmalogènes (souris DAPAT$^{-/-}$) possède un phénotype pathologique notamment caractérisé par des anomalies du développement vasculaire rétinien. Ces anomalies sont par ailleurs semblables à celles observées au cours de la rétinopathie du prématuré (ROP), suggérant un rôle potentiel des plasmalogènes dans la physiopathologie de la ROP. Ainsi, nous avons organisé cette thèse autour de trois objectifs complémentaires :

Objectif 1 : Le premier objectif de cette thèse a été d'identifier et de caractériser le rôle des plasmalogènes dans la physiologie des cellules de Müller. Pour ce faire, nous avons utilisé un modèle de déplétion partielle en plasmalogènes *in vitro* afin de vérifier si les plasmalogènes sont impliqués dans les fonctions clés des cellules de Müller et d'en déterminer les mécanismes sous-jacents, ainsi que leurs conséquences physiologiques potentielles (chapitre 2).

Objectif 2 : Dans un deuxième temps, nous avons cherché à mettre en évidence les anomalies du développement vasculaire rétinien associées à la déficience en plasmalogènes *in vivo* à travers différentes approches, notamment d'expression génique et d'immunohistochimie. Pour ce faire, nous avons voulu caractériser le profil inflammatoire de la rétine de souris DAPAT$^{-/-}$ aux différentes étapes du développement vasculaire rétinien (J7, J14, J21), tout en vérifiant si une supplémentation maternelle en précurseurs de plasmalogènes pourrait inhiber l'inflammation et atténuer ces anomalies (chapitre 3). Parallèlement, nous avons souhaité investiguer la possibilité d'un lien entre les plasmalogènes et le système endocannabinoïde au cours de la mise en place des anomalies du développement vasculaire rétinien (chapitre 4).

Objectif 3 : Enfin, l'accès à une sérothèque d'échantillons de sérums de prématurés développant ou non la ROP nous a permis en dernier lieu de confirmer l'intérêt de l'étude du métabolisme des plasmalogènes dans le cadre de cette pathologie (chapitre 5).

Chapitre 2 : Rôle des plasmalogènes dans la physiologie des cellules de Müller

Problématique

Les cellules de Müller sont les cellules gliales majoritaires de la rétine. Elles jouent des rôles structurels et fonctionnels, en participant à l'architecture rétinienne et à la formation de la barrière hémato-rétinienne, mais aussi en régulant le développement et l'homéostasie générale de la rétine. Véritables chefs d'orchestre, elles sont capables de communiquer indirectement avec d'autre cellules à distance en sécrétant des facteurs de croissance et autres cytokines, mais aussi directement avec les cellules adjacentes par le biais de messages calciques intercellulaires relayés par les jonctions gap. Ces jonctions sont constituées de connexines, protéines transmembranaires qui s'assemblent en canaux permettant de coupler physiquement deux cellules adjacentes. Au sein de la rétine, la Cx43 est la connexine majoritaire des cellules gliales. En conditions pathologiques, les cellules de Müller sont également capables de modifier leur morphologie pour répondre aux besoins, et même de se dédifférencier en cellules progénitrices neuronales afin de compenser d'éventuelles pertes consécutives à l'inflammation. Ces capacités mettent notamment en jeu des mécanismes d'activation et de migration cellulaire, qui reposent notamment sur l'expression d'une protéine caractéristique : la GFAP. De manière intéressante, les études *in vivo* sur la souris déficiente en plasmalogènes (DAPAT$^{-/-}$) montrent une suractivation des cellules gliales rétiniennes ainsi qu'une diminution de l'expression de la connexine 43 dans le cerveau.

Dans ce premier volet d'étude *in vitro*, nous avons ainsi voulu déterminer si les niveaux de plasmalogènes des cellules de Müller étaient directement impliqués dans la régulation de l'expression de la GFAP et de la Cx43, et si ces altérations étaient suivies de conséquences fonctionnelles, notamment sur la capacité de migration et de communication intercellulaire par jonction gap (GJIC).

Ces travaux font l'objet de deux articles scientifiques. L'article 1 a été soumis dans la revue Molecular and Cellular and Biochemistry. L'article 2 a été soumis dans la revue Scientific Reports.

Article 1

Plasmalogens regulate Müller cells migration in the rat retina

Authors

Rémi Karadayi[1*], Laurent Leclere[1], Julie Mazzocco[1], Bénédicte Buteau[1], Stéphane Gregoire[1], Charlotte Pallot[1,2], Charlène Develay[1], Mounzer Koudsi[1], Alain M. Bron[1,2], Niyazi Acar[1*]

Authors' institutional affiliations

1 Eye and Nutrition Research Group, CSGA, UMR1324 INRAE, 6265 CNRS, Université de Bourgogne Franche-Comté, AgroSup Dijon, France

2 Department of Ophthalmology, University Hospital, Dijon, France

Corresponding author (*)

Correspondence and requests for information should be addressed to N.A. (niyazi.acar@inrae.fr)

Abstract

The retina is characterized by high contents in plasmalogen ether-lipids as well as by the presence of glial cells. Interestingly, plasmalogen deficiency is associated with altered expression of glial-fibrillary acidic protein (GFAP) and Connexin 43 (Cx43) proteins that are involved in cell migration. We aimed at evaluating the impact of plasmalogen depletion on Müller cell migration. We show that plasmalogen-depleted Müller cells exhibit a downregulation of Cx43 and GFAP and impaired cell migration abilities. These data indicate that plasmalogens are involved in Müller cell migration abilities and could then represent a target to control Müller cell reactivity in retinopathies.

Keywords

Retina, Müller cells, Plasmalogens, GFAP, Connexin43, Migration

Introduction

The retina is an extension of the central nervous system, where neurons and glial cells closely interact to ensure proper tissue homeostasis. Müller cells are the principal retinal macroglial cells. They have the basic morphology of polarized radial cells and are characterized by microvilli-rich processes. In addition to their role in the physical maintenance of retinal architecture, Müller cells play crucial functions in retinal homeostasis. They are involved in the formation and maintenance of the blood-retinal barrier, in the regulation of retinal vascularization, in signal transduction and transmission and in neural waste management [1]. Moreover, Müller cells can be activated during retinal gliosis under pathologic conditions [1]. Gliosis results in several phenotypic and functional changes including rapid proliferation and migration [2, 3]. Unlike astrocytes, Müller cells are able to dedifferentiate into retinal progenitors and acquire characteristics of neural cells [4, 5]. Although the molecular mechanisms involved in the response of Müller cells to pathological conditions are yet to be fully understood, recent data suggest that metabolism of lipids is crucial for signaling pathways implicated in migration [6].

We have shown that Müller cells are enriched in plasmalogens [7, 8], a subgroup of glycerophospholipids characterized by a sn-1 vinyl-ether bound. Plasmalogens have been associated with essential cellular functions like antioxidative mechanisms, membrane trafficking and cell signaling [9] and are crucial for mammals viability, reproduction, or even proper eye formation and vascular development of the retina [10, 11]. Interestingly, in vivo plasmalogen deficiency was associated with an activation of Müller cells leading to an overexpression of GFAP [11], as well as a downregulation of Connexin 43 (Cx43) expression [10]. GFAP is a glia-specific intermediate filament protein that is overexpressed by glial cells upon their activation and that regulates cell shape and cytoskeleton network, thus enabling their migration toward the injury site [12, 13]. Cx43 is the major connexin in retinal glial cells gap junctions [14, 15]. Previous studies have shown that Cx43 acts as a docking point for cytoskeletal proteins [16-18], therefore regulating cell migration [19], including that of astrocytes [20]. Moreover, it has been shown that plasmalogens could face dysregulations during inflammation process [21]. Taken together, these data suggest a possible interconnection between plasmalogens, Cx43, cytoskeleton and ultimately cell migration. Such interplay could be of particular relevance to understand Müller glial cells response to retinal injury. Accordingly, we induced a partial depletion of plasmalogens in primary Müller cells using a siRNA targeting DHAPAT, the key enzyme of plasmalogen biosynthesis. Better than a total deficiency, partial depletion is interesting to mimic potential consequences of retinal inflammation [21]. We then investigated the ability of Müller cells to migrate as well as the expression of proteins involved in cell migration.

Materials and methods

We isolated primary Müller cells from rat retinas according to Hicks and Courtois [22] with slight modifications. Eyes were isolated from 9 to 12 days-old rats and placed in Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM, Pan Biotech) with 10% Fetal Bovine Serum (FBS) overnight at room temperature in the dark. Eyeballs were then pre-digested in DMEM containing 0.1% Trypsin-EDTA 10X (Sigma-Aldrich, USA) and 70U/mL collagenase (Sigma-Aldrich) at 37°C for 45min. Eyeballs were then placed in DMEM - 10% FBS, corneas were incised; lenses and vitreous bodies taken out, and retinas were gently isolated. Retinas were dissociated into small pieces and placed into a Petri dish containing DMEM with 4.5g/L of glucose, 10% FBS and 10µL/mL of streptomycin– penicillin (10000 U/mL) (Pan Biotech) inside a 37°C and 5% CO2 atmosphere. Medium was not changed during the first 2 days and then progressively substituted by DMEM with 1 g/L of glucose. Cells were reseeded when they reached 80% confluence and were used for the transfection protocol.

Silencer® Select siRNAs were used to knockdown DHAP-AT gene expression. SiDHAPAT (SiRNA ID s136618 sense 5'-CAUCGUUCUCAAUUCUGAAtt-3', anti-sense 5'-UUCAGAAUUGAGAACGAUGga-3' and siRNA ID s136619 sense 5'-GGAUGUCCUUCAGUUGCUUUtt-3', anti-sense 5'-AAGCAACUGAAGACAUCCtc-3') and the non-targeting controls (siCTL) were purchased from Ambion (ThermoFisher Scientific, USA). The siRNA transfection of Müller cells was performed using Lipofectamine RNAiMAX transfection reagent (ThermoFisher Scientific) in OPTIMEM medium (ThermoFisher Scientific) overnight at 37°C in 5% CO2 humidified atmosphere according to manufacturer's instructions. Cells were submitted to an 8h transfection following their first and second passages. Transfected cells were isolated for experiments 5 days after the second transfection. Plasmalogen levels were assessed by a GC-FID quantification using their DMA (dimethylacetal) derivatives according to previously described procedures [7].

GFAP, Cx43 and cytoskeleton proteins expression was determined by Western-blotting. Briefly, twenty five micrograms of protein extracts were loaded in 4-15% SDS-PAGE Stain-Free precast gels (BioRad, USA) and then separated by electrophoresis at 150V for 1h (BioRad). Proteins were subsequently transferred on a nitrocellulose membrane (BioRad) by a Transblot Turbo (BioRad). Primary antibodies used were rabbit anti DHAPAT (1:1000 dilution, ref 14931-1-AP, ProteinTech), rabbit anti GFAP (1:1000 dilution, ref sc-6171-R, Santa Cruz Biotechnology, USA), mouse anti β -tubulin (1:2000 dilution, ref 32-26000, ThermoFisher) and rabbit anti β-actin (1:2000 dilution, ref A2066, Sigma-Aldrich). Secondary antibodies were HRP-conjugated goat anti-mouse (1:2000 dilution,

ref P0447, Dako, Denmark) and goat anti-rabbit (1:2000 dilution, ref P0448, Dako). Protein expression was normalized to total protein loads using the Stain-Free technology.

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

Results are presented as mean ± SEM and statistical analysis was performed using GraphPad Prism v6.05 (GraphPad software, San Diego, CA, USA). For gene and protein expression, comparisons between two groups were performed using a non-parametric Mann-Whitney test. p values lower than 0.05 was considered statistically significant and noted by one (*) or two stars for p values lower than 0.01 (**).

Results and discussion

The transfection of Müller cells with the DHAPAT-targeting siRNA (siDHAPAT) was associated with a 60%-decrease in plasmalogen levels (17.9% of total phospholipids ± 1.2% vs 7.1% ± 1.8%; $p < 0.01$), which is consistent with the 64% downregulation of DHAPAT protein expression ($p < 0.05$) (Figure 1 a,b). This partial reduction of cell plasmalogen content was associated with a 47%-decrease in Cx43 expression ($p < 0.05$) (Figure 1c), thus confirming that plasmalogen metabolism is linked to the regulation of Cx43 expression [10]. Interestingly, plasmalogen depletion was also associated with a significant 37%-decrease in GFAP protein expression ($p = 0.05$) (Figure 1d), but not in those of β-Actin (Figure 1e) and β-Tubulin (Figure 1f).

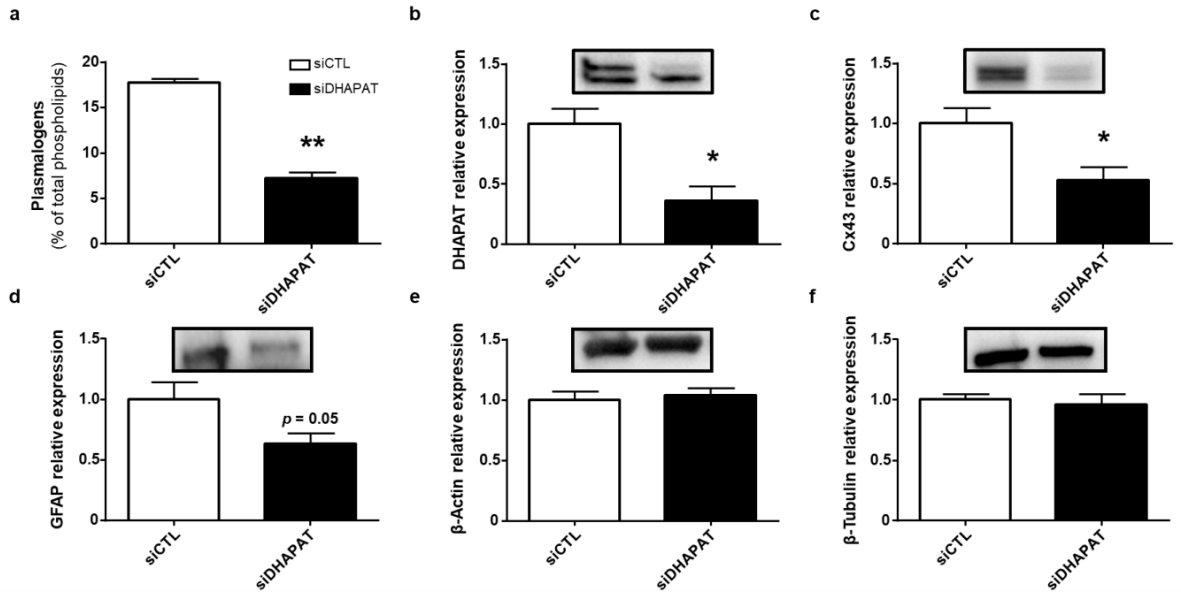

Fig. 1. Inhibition of plasmalogen biosynthesis is associated with a downregulation of Cx43 and GFAP but not of other cytoskeleton proteins in retinal Müller glia. (a) GC-FID quantification of plasmalogen concentrations in primary Müller glial cells transfected with a control or a DHAPAT-targeting siRNA (siCTL and siDHAPAT respectively). Plasmalogen levels are significantly reduced in siDHAPAT-transfected Müller cells. (b-f) Western-blot analyses show a significant reduction of DHAPAT (b), Cx43 (c) and GFAP (d) expression in siDHAPAT-transfected Müller cells. However, other cytoskeleton proteins expression such as β-Actin (e) or β -Tubulin (f) remains unchanged. n = 5 cell cultures. Mann & Whitney test. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$. Data shown as mean ± SEM.

Cx43 plays crucial functions in cell physiology. It is known for its involvement in gap junction intercellular communication (GJIC), especially in glial cells where it represents the main connexin subtype [14, 15]. However, the functions of Cx43 in glial cells are not restricted to GJIC, since several studies pointed out the implication of Cx43 in cellular mechanisms such as cell migration [19, 20, 23]. Indeed, Cx43 is a transmembrane protein that acts as a membrane anchor for cytoskeletal proteins, thereby regulating cell cytoskeleton network. Therefore, it is likely that alterations in cell Cx43 may induce modifications of the cytoskeleton network and subsequent cell migration process potentially even without altering the expression of protein actors. Nevertheless, further experiments are required to understand the mechanisms by which the reduction of plasmalogen levels impact Cx43 expression. Surprisingly, we also found that a partial reduction of cell levels of plasmalogen was associated with a downregulation of GFAP (Figure 1d) in Müller cells. As GFAP is overexpressed in activated glial cells during gliosis and considering its implication in cell migration mechanisms, our data suggest that lowering Müller cells plasmalogen content may influence the reactivity of Müller cells to gliosis but also their ability to migrate. This is why we further evaluated the migration ability of plasmalogen-depleted Müller cells. Through wound healing assays on cells treated with the

siRNAS, we observed that in siCTL-treated cells the wound closure was about 70 % after 72 hours (Figure 2 a,b). Inhibition of plasmalogen biosynthesis strongly affected the migration ability of retinal Müller cells as the rate of wound closure was significantly reduced by 35-40 % after 72 hours in siDHAPAT-treated cells ($p < 0.05$) (Figure 2 a,b).

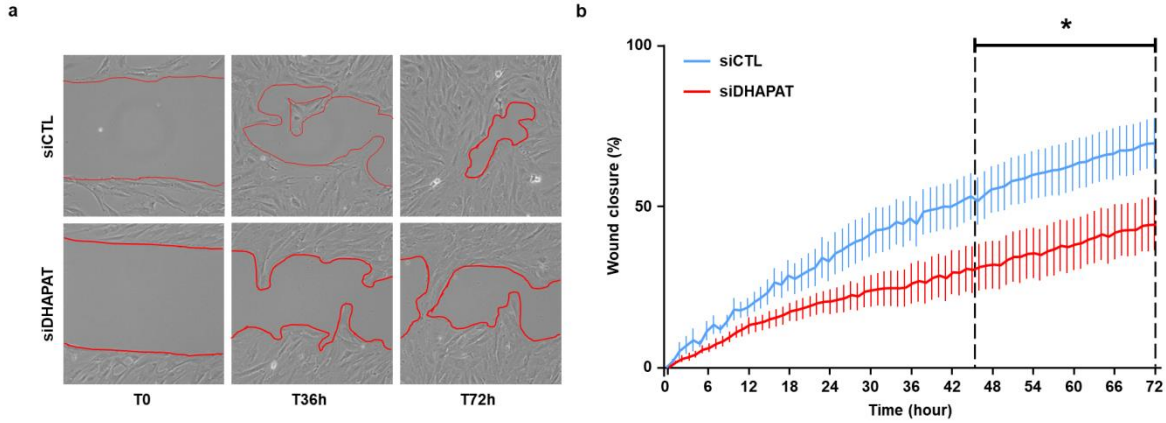

Fig. 2. Plasmalogen depletion impacts migration of retinal Müller glia. (a) Representative micrographs of primary Müller cells treated with a control siRNA (siCTL) or a DHAPAT-targeting siRNA (siDHAPAT) in a wound closure assay before treatment (T0), 36h and 72h after treatment. (b) Quantification of wound closure assays. Summary graph of Müller cells migration speed represented as a percentage of wound closure at indicated time points. Plasmalogen-depleted Müller cells exhibited a significant reduction of migration speed when compared to controls (siDHAPAT vs siCTL, $p < 0.05$). Results are presented as mean ± SEM (n=10 for siCTL, n=9 for siDHAPAT). Two-way ANOVA with Tukey's multiple comparisons test.

Taken together, our data show that a partial depletion in Müller cell plasmalogen contents is sufficient to alter GFAP and Cx43 expression and impair their migration ability. These observations are consistent with previous studies conducted on astrocytes [20]. To our knowledge, this is the first time that plasmalogen metabolism is associated with such functional alterations in retinal Müller cells. Although these data could provide an interesting insight into retinal gliosis mechanisms, further studies are needed to unravel the precise cellular and molecular mechanisms linking plasmalogen levels to GFAP and Cx43 protein metabolism. Several mechanisms can be hypothesized. First, GFAP and Cx43 have several common transcription factors regulating sites in their promoter sequence such as NFkB, AP-1 or AP-2 [24-27]. This is why quantifying the levels of these transcriptional regulators could be of great interest. Secondly, it has been shown that plasmalogens regulate Protein Kinase C (PKC) activity [28, 29], which is responsible for Cx43 phosphorylation and subsequent degradation by the ubiquitin-proteasome pathway [30]. Accordingly, we can hypothesize that plasmalogen depletion would induce a greater activity of PKC and then contribute at least partially to Cx43 downregulation. To conclude, it can be underlined that the model of partial reduction of cellular plasmalogen content

presented in this study could be of particular interest to investigate the plasmalogen-related cellular mechanisms, as it may mimic biochemical alterations that are closer to pathological conditions when compared to full-deficient cell lines.

References

1.Bringmann A, Pannicke T, Grosche J, Francke M, Wiedemann P, Skatchkov SN, Osborne NN and Reichenbach A (2006) Muller cells in the healthy and diseased retina. Prog Retin Eye Res 25:397-424. doi: 10.1016/j.preteyeres.2006.05.003

2.Reichenbach A and Bringmann A (2013) New functions of Muller cells. Glia 61:651-78. doi: 10.1002/glia.22477

3.Tackenberg MA, Tucker BA, Swift JS, Jiang C, Redenti S, Greenberg KP, Flannery JG, Reichenbach A and Young MJ (2009) Muller cell activation, proliferation and migration following laser injury. Mol Vis 15:1886-96.

4.Ramachandran R, Fausett BV and Goldman D (2010) Ascl1a regulates Muller glia dedifferentiation and retinal regeneration through a Lin-28-dependent, let-7 microRNA signalling pathway. Nat Cell Biol 12:1101-7. doi: 10.1038/ncb2115

5.Wan J, Ramachandran R and Goldman D (2012) HB-EGF is necessary and sufficient for Muller glia dedifferentiation and retina regeneration. Dev Cell 22:334-47. doi: 10.1016/j.devcel.2011.11.020

6.Simon MV, Prado Spalm FH, Politi LE and Rotstein NP (2015) Sphingosine-1-Phosphate Is a Crucial Signal for Migration of Retina Muller Glial Cells. Invest Ophthalmol Vis Sci 56:5808-15. doi: 10.1167/iovs.14-16195

7.Acar N, Gregoire S, Andre A, Juaneda P, Joffre C, Bron AM, Creuzot-Garcher CP and Bretillon L (2007) Plasmalogens in the retina: in situ hybridization of dihydroxyacetone phosphate acyltransferase (DHAP-AT)--the first enzyme involved in their biosynthesis--and comparative study of retinal and retinal pigment epithelial lipid composition. Exp Eye Res 84:143-51. doi: 10.1016/j.exer.2006.09.009

8.Nagy K, Brahmbhatt VV, Berdeaux O, Bretillon L, Destaillats F and Acar N (2012) Comparative study of serine-plasmalogens in human retina and optic nerve: identification of atypical species with odd carbon chains. J Lipid Res 53:776-83. doi: 10.1194/jlr.D022962

9.Nagan N and Zoeller RA (2001) Plasmalogens: biosynthesis and functions. Prog Lipid Res 40:199-229. doi: 10.1016/s0163-7827(01)00003-0

10.Rodemer C, Thai TP, Brugger B, Kaercher T, Werner H, Nave KA, Wieland F, Gorgas K and Just WW (2003) Inactivation of ether lipid biosynthesis causes male infertility, defects in eye development and optic nerve hypoplasia in mice. Hum Mol Genet 12:1881-95. doi: 10.1093/hmg/ddg191

11.Saab S, Mazzocco J, Creuzot-Garcher CP, Bron AM, Bretillon L and Acar N (2014) Plasmalogens in the retina: from occurrence in retinal cell membranes to potential involvement in pathophysiology of retinal diseases. Biochimie 107 Pt A:58-65. doi: 10.1016/j.biochi.2014.07.023

12.Middeldorp J and Hol EM (2011) GFAP in health and disease. Prog Neurobiol 93:421-43. doi: 10.1016/j.pneurobio.2011.01.005

13.Li D, Liu X, Liu T, Liu H, Tong L, Jia S and Wang YF (2020) Neurochemical regulation of the expression and function of glial fibrillary acidic protein in astrocytes. Glia 68:878-897. doi: 10.1002/glia.23734

14.Zahs KR and Ceelen PW (2006) Gap junctional coupling and connexin immunoreactivity in rabbit retinal glia. Vis Neurosci 23:1-10. doi: 10.1017/S0952523806231018

15.Kerr NM, Johnson CS, de Souza CF, Chee KS, Good WR, Green CR and Danesh-Meyer HV (2010) Immunolocalization of gap junction protein connexin43 (GJA1) in the human retina and optic nerve. Invest Ophthalmol Vis Sci 51:4028-34. doi: 10.1167/iovs.09-4847

16.Butkevich E, Hulsmann S, Wenzel D, Shirao T, Duden R and Majoul I (2004) Drebrin is a novel connexin-43 binding partner that links gap junctions to the submembrane cytoskeleton. Curr Biol 14:650-8. doi: 10.1016/j.cub.2004.03.063

17.Crespin S, Bechberger J, Mesnil M, Naus CC and Sin WC (2010) The carboxy-terminal tail of connexin43 gap junction protein is sufficient to mediate cytoskeleton changes in human glioma cells. J Cell Biochem 110:589-97. doi: 10.1002/jcb.22554

18.Matsuuchi L and Naus CC (2013) Gap junction proteins on the move: connexins, the cytoskeleton and migration. Biochim Biophys Acta 1828:94-108. doi: 10.1016/j.bbamem.2012.05.014

19.Olk S, Turchinovich A, Grzendowski M, Stuhler K, Meyer HE, Zoidl G and Dermietzel R (2010) Proteomic analysis of astroglial connexin43 silencing uncovers a cytoskeletal platform involved in process formation and migration. Glia 58:494-505. doi: 10.1002/glia.20942

20.Homkajorn B, Sims NR and Muyderman H (2010) Connexin 43 regulates astrocytic migration and proliferation in response to injury. Neurosci Lett 486:197-201. doi: 10.1016/j.neulet.2010.09.051

21.Hossain MS, Abe Y, Ali F, Youssef M, Honsho M, Fujiki Y and Katafuchi T (2017) Reduction of Ether-Type Glycerophospholipids, Plasmalogens, by NF-kappaB Signal Leading to Microglial Activation. J Neurosci 37:4074-4092. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3941-15.2017

22.Hicks D and Courtois Y (1990) The growth and behaviour of rat retinal Muller cells in vitro. 1. An improved method for isolation and culture. Exp Eye Res 51:119-29. doi: 10.1016/0014-4835(90)90063-z

23.Lagos-Cabre R, Burgos-Bravo F, Avalos AM and Leyton L (2019) Connexins in Astrocyte Migration. Front Pharmacol 10:1546. doi: 10.3389/fphar.2019.01546

24.Gomes FC, Paulin D and Moura Neto V (1999) Glial fibrillary acidic protein (GFAP): modulation by growth factors and its implication in astrocyte differentiation. Braz J Med Biol Res 32:619-31. doi: 10.1590/s0100-879x1999000500016

25.Brenner M, Messing A and Olsen ML (2019) AP-1 and the injury response of the GFAP gene. J Neurosci Res 97:149-161. doi: 10.1002/jnr.24338

26.Wu X, Huang W, Luo G and Alain LA (2013) Hypoxia induces connexin 43 dysregulation by modulating matrix metalloproteinases via MAPK signaling. Mol Cell Biochem 384:155-62. doi: 10.1007/s11010-013-1793-5

27.Geimonen E, Jiang W, Ali M, Fishman GI, Garfield RE and Andersen J (1996) Activation of protein kinase C in human uterine smooth muscle induces connexin-43 gene transcription through an AP-1 site in the promoter sequence. J Biol Chem 271:23667-74. doi: 10.1074/jbc.271.39.23667

28.Sejimo S, Hossain MS and Akashi K (2018) Scallop-derived plasmalogens attenuate the activation of PKCdelta associated with the brain inflammation. Biochem Biophys Res Commun 503:837-842. doi: 10.1016/j.bbrc.2018.06.084

29.Daniel LW, Small GW, Schmitt JD, Marasco CJ, Ishaq K and Piantadosi C (1988) Alkyl-linked diglycerides inhibit protein kinase C activation by diacylglycerols. Biochem Biophys Res Commun 151:291-7. doi: 10.1016/0006-291x(88)90592-x

30.Leithe E (2016) Regulation of connexins by the ubiquitin system: Implications for intercellular communication and cancer. Biochim Biophys Acta 1865:133-46. doi: 10.1016/j.bbcan.2016.02.001

Funding: The authors thank National Research Institute for Agriculture, Food and Environment (INRAE); Regional Council of Burgundy (PARI Grant); European Regional Development Fund (FEDER); Agence Nationale de la Recherche (ANR-11-LABX-0021-01); Fondation de France/Fondation de l'Oeil; Groupe Lipides et Nutrition (GLN) for their financial support.

Conflicts of interest/Competing interests: The author(s) declare no competing interests related to this study.

Availability of data and material: The data that support the findings of this study are available from Niyazi Acar upon reasonable request.

Authors' contributions: RK, JM, NA designed the study. RK, LL, JM, BB, MK, CP, CD, SG, NA acquired, analyzed and interpreted the data. RK, JM, AMB and NA drafted the manuscript. All authors reviewed the manuscript.

Ethics approval: The authors certify that animal experiments were carried out in accordance with the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC). The authors also certify that formal approval to conduct the experiments described has been obtained from the animal subjects review board of their institution and could be provided upon request. The authors further attest that all efforts were made to minimize the number of animals used and their suffering.

Article 2

Plasmalogens regulate connexin 43 expression in Müller glia and gap junction intercellular communication with neighboring astrocytes

Authors

Rémi KARADAYI[1*], Laurent LECLERE[1], Julie MAZZOCCO[1], Stéphane GREGOIRE[1], Bénédicte BUTEAU[1], Christine BELLOIR[2], Mounzer KOUDSI[1], Pauline BESSARD[1], Claire FENECH[3], Loïc BRIAND[2], Lionel BRETILLON[1], Alain M. BRON[1,4], Xavier FIORAMONTI[5], Niyazi ACAR[1*]

Authors's institutional affiliations

1 Eye and Nutrition Research Group, CSGA, UMR1324 INRAE, 6265 CNRS, Université de Bourgogne Franche-Comté, AgroSup Dijon, France

2 Taste and Olfaction Research Group, CSGA, UMR1324 INRAE, 6265 CNRS, Université de Bourgogne Franche-Comté, AgroSup Dijon, France

3 Brain Nutrient Sensing and Energy Homeostasis, CSGA, UMR1324 INRAE, 6265 CNRS, Université de Bourgogne Franche-Comté, AgroSup Dijon, France

4 Department of Ophthalmology, University Hospital, Dijon, France

5 INRAE, UMR NutriNeuro, Bordeaux, France

Corresponding author (*)

Correspondence and requests for information should be addressed to N.A. (niyazi.acar@inrae.fr)

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank National Research Institute for Agriculture, Food and Environment (INRAE); Regional Council of Burgundy (PARI Grant); European Regional Development Fund (FEDER); Agence Nationale de la Recherche (ANR-11-LABX-0021-01); Fondation de France/Fondation de l'Oeil; Groupe Lipides et Nutrition (GLN) for their financial support.

The authors declare no competing financial interest.

AUTHOR CONTRIBUTION

RK, JM, CB, MK, CF, LBd, LBn, AMB, XF, NA designed the study. RK, LL, JM, SG, BB, CB, MK, PB, CF, NA acquired, analyzed and interpreted the data. RK, JM, CB, MK, CF, LBd, LBn, AMB, XF, NA drafted the manuscript. All authors reviewed the manuscript.

ADDITIONAL INFORMATION

The author(s) declare no competing interests related to this study.

ABSTRACT

Vascular development of the retina relies on the proper formation of an astrocytic template on which endothelial cells migrate and grow. Previous work has shown that plasmalogen-deficient mice exhibit several eye defects including retinal astrocyte over-activation and template misplacement that leads ultimately to abnormal vascular development in the retina. Interestingly, plasmalogen deficiency is associated to a reduced expression of connexin 43 (Cx43) protein. Since retinal astrocytes are known to communicate with retinal macroglial Müller cells through Cx43-rich gap junctions, the aim of this work was to investigate whether plasmalogen deficiency affects calcium-based gap junction intercellular communication (GJIC) between retinal astrocytes and Müller cells. We found that a 50%- reduction of Müller cell content in plasmalogens was sufficient to induce Cx43 downregulation. Plasmalogen-depleted Müller cells evoked calcium waves of higher amplitude that propagated slower to neighboring astrocytes. Restoring plasmalogen cellular levels with the plasmalogen precursor alkylglycerol prevented some of the alterations in Müller cells response to ATP and the subsequent calcium wave propagation. These data confirm that plasmalogens are critical for the regulation of Cx43 expression and GJIC in retinal Müller glial cells.

Keywords: Plasmalogens, Connexin 43, Gap junction intercellular communication, Retina, Müller glia, Astrocytes, Alkylglycerol.

INTRODUCTION

Plasmalogens represent a specific glycerophospholipid subgroup that is characterized by the presence of a vinyl-ether bond at the sn-1 position of the glycerol backbone. They are synthesized by a multi-step process that starts with the first and key enzyme of plasmalogen biosynthesis DHAPAT (dihydroxyacetone phosphate-acyltransferase)[1]. Plasmalogens are present in various concentrations in all cell types and tissues. The heart and nervous tissues are particularly rich in plasmalogens, where they can make up to 20-30% of total phospholipids[2]. As an extension of the central nervous system, the retina also contains high amounts of plasmalogens, which are mostly represented in the ethanolamine phospholipids subclass (PE) and can make up to 30% of total PE species[3-5]. Interestingly, plasmalogen-deficient mice exhibit several eye defects, including retinal vascular development abnormalities[6].

In the retina, vascular development and proper positioning of endothelial cells relies on the prior formation of an astrocytic template[7]. Astrocytes are glial cells involved in neuronal metabolic support and several other homeostasis functions. However, in the retina, they represent a minor fraction of glial cells compared to Müller cells. Müller cells are crucial regulators of retinal physiology[8-11], and can make up to 90% of total glial cells[8]. Interestingly, it has been shown that Müller cells and astrocytes through gap junctions-dependent pathways, including calcium-based gap junction intercellular communication (GJIC)[12,13]. Gap junctions are channels that allow direct calcium wave-mediated intercellular communication between cells[14]. Their constitutive units, namely connexons, are made up of proteins called connexins. Up to 21 connexins have been identified in the human genome15, with connexin 43 (Cx43) being the major one in mammal cells[16]. In the retina, gap junctions between Müller cells and astrocytes mostly rely on Cx43[17,18]. Previous data revealed high plasmalogen levels in the retina and suggested that retinal Müller glial cells are in charge of plasmalogens biosynthesis[3]. Interestingly, it has been shown that plasmalogen deficiency is associated to several critical eye defects as well as a decreased Cx43 expression[19]. Thus, using complementary genetic approaches, our study aimed at determining the impact of plasmalogen depletion on Cx43 expression and GJIC in retinal glial cells, and whether supplementing Müller cells with the plasmalogen precursor alkylglycerol prevents plasmalogen deficiency-related GJIC alterations.

RESULTS

Plasmalogens are synthesized and concentrated in retinal Müller glial cells

Immunohistochemical staining of retinal cryosections revealed DHAPAT expression in several layers corresponding to the ganglion cell layer (GCL), the inner nuclear layer (INL) and the photoreceptors inner segments (IS) (Figure 1a, b, c). Such a pattern is consistent with the localization of Müller cells endfeet, soma and distal processes respectively. DHAPAT expression in Müller glia was then further confirmed by immunocytochemistry. A GS-DHAPAT double immunolabeling first confirmed the purity of our Müller cell culture (Figure 1d) and that Müller cells strongly express DHAPAT (Figure 1e, f). Finally, in order to assess the extent of plasmalogen biosynthesis activity in Müller glia, plasmalogen concentrations were compared in total lipid extracts from primary rat Müller glia and whole mouse retinas. Results show a significantly higher concentration of plasmalogen in Müller glia compared to whole retina extracts (17.67 ± 0.30 % *vs* 7.53 ± 0.30 % of total phospholipids, $p < 0.001$) (Figure 1g), confirming Müller glia as a major reservoir of plasmalogens in the retina. These data also reinforce the idea that plasmalogens might play a particular role in Müller cells physiology.

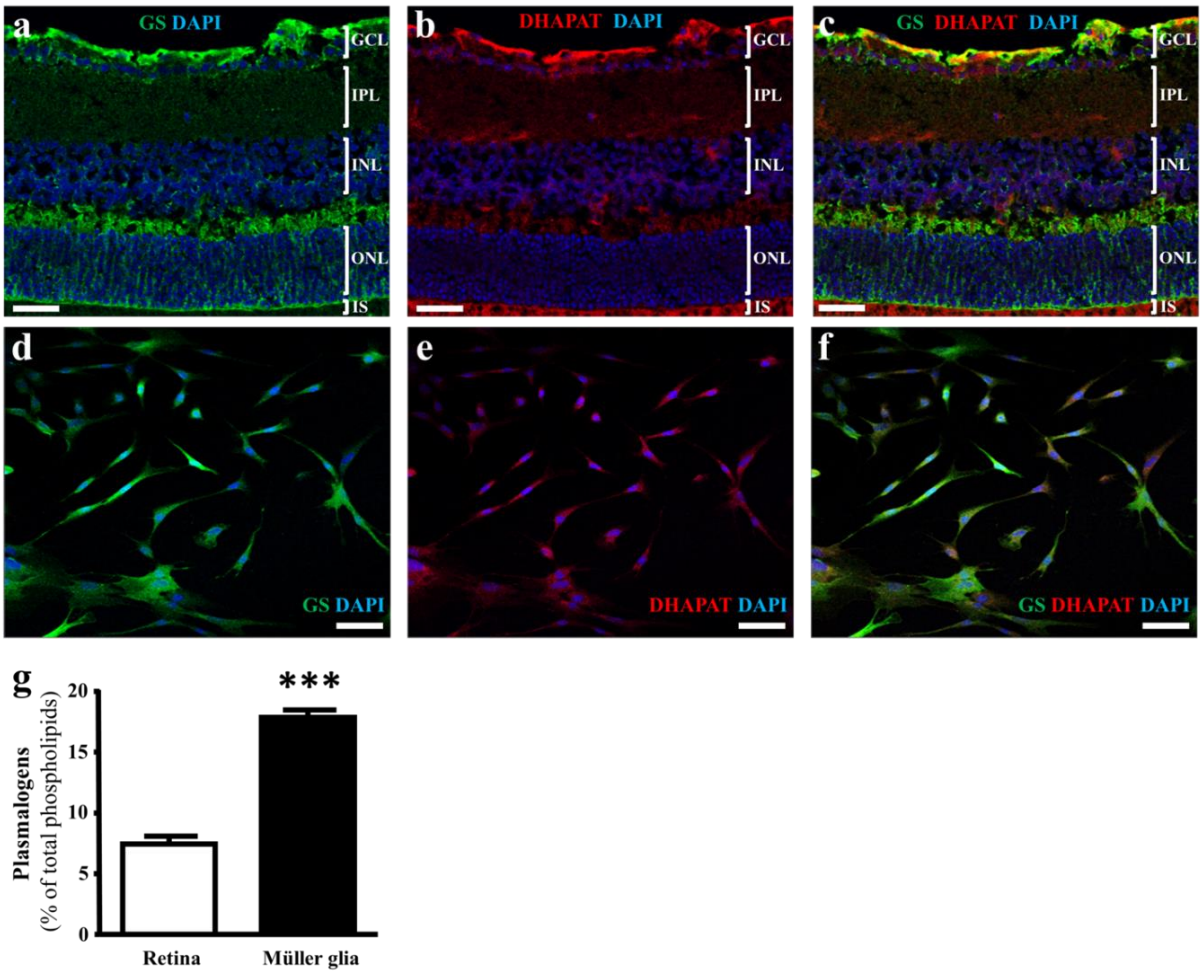

Figure 1: Müller glia express DHAPAT and concentrate plasmalogens in the retina.

(a-c) Immunohistochemical stainings of GS and DHAPAT in retinal slices. GS expression pattern confirmed the radial Müller cells localization (a, c). DHAPAT-positive cells showed a strong expression pattern in the ganglion cells layer (GCL), the inner nuclear layer (INL) and photoreceptors inner segments (IS) (b, c), corresponding to the localization of Müller cells endfeet, soma and distal processes, respectively. (d-f) Micrographs of primary rat Müller cells labeled with GS and DHAPAT primary antibody showing that GS-positive Müller cells also show a strong expression of DHAPAT. (g) Plasmalogen quantification by GC-FID reveals a strong concentration in Müller glia compared to whole retina extracts, suggesting a particular function of these ether-lipids in their physiology. n = 8. Mann & Whitney test. ** $p < 0.01$. Data shown as mean ± SD. GCL = ganglion cell layer; IPL = inner plexiform layer; INL = inner nuclear layer; ONL = outer nuclear layer; OS = outer segments of the photoreceptors. Scale bars = 25µM.DHAPAT-targeting siRNA treatment is associated to a depletion of plasmalogen cell content

In a second series of experiments, we decided to assess the efficiency of our siRNA-based plasmalogen depletion and alkylglycerol-based plasmalogen restoration protocols. Decreased plasmalogen content in Müller cells was assessed by double transfection of primary Müller cells with the DHAPAT-targeted siRNA (siDHAPAT). siRNA treatment induces a significant decrease in DHAPAT protein expression (-56%, $p < 0.01$) (Figure 2a, b) as well as a significant decrease by 56 % of the cellular plasmalogen content (7.74 ± 1.68 % *vs* 17.61 ± 0.98 % of total phospholipids, $p < 0.001$) (Figure 2c). Alkylglycerol supplementation did not influence DHAPAT expression in plasmalogen-depleted Müller cells (Figure 2a,b) but did restore plasmalogen concentrations to physiological levels (Figure 2c).

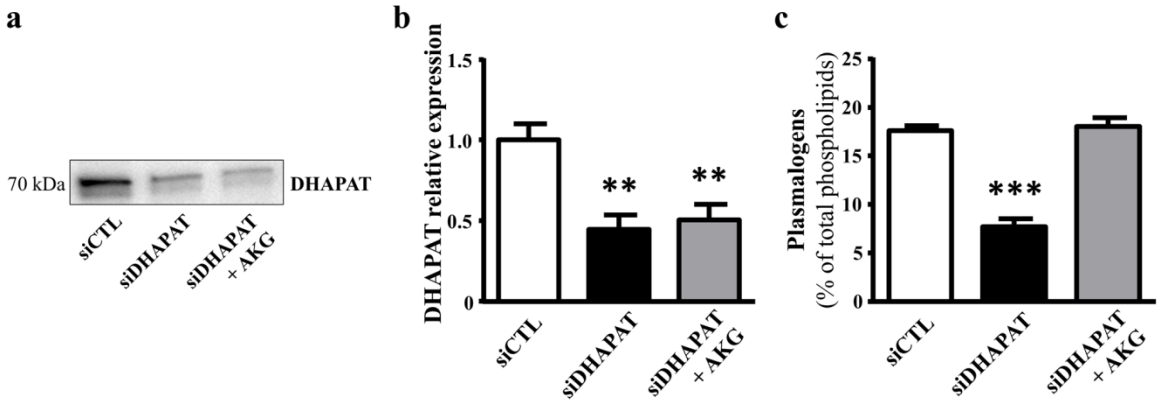

Figure 2: Loss of DHAPAT expression in siDHAPAT-transfected Müller glial cells.
(a, b) Western-blot analyses showing the reduced expression of DHAPAT in primary Müller cells transfected with a control siRNA (siCTL) or a DHAPAT-targeting siRNA (siDHAPAT). Alkylglycerol supplementation had no impact on the protein expression. (c) Plasmalogen concentrations determined by GC-FID are reduced in siDHAPAT-transfected cells, whereas alkylglycerol supplementation restored physiological levels of plasmalogens. Mann & Whitney test. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. Data shown as mean ± SEM.

Plasmalogen depletion is associated to Cx43 protein downregulation

Reduced level of plasmalogens was associated to 47% decrease in Cx43 protein expression ($p < 0.01$) that was not restored upon alkylglycerol supplementation (Figure 3a, e). RT-qPCR analyses confirmed that Cx43 mRNA expression was significantly downregulated in siDHAPAT-transfected Müller cells (-47%, $p < 0.01$) (Figure 3b), and that alkylglycerol supplementation had no effect. In order to determine whether other Cx43 dysregulations are involved in this downregulation, we assessed Cx43 phosphorylation status. It has been shown that phosphorylation of Cx43 on S368 and Y265 residues triggers its degradation through the ubiquitin-proteasome pathway. We found that plasmalogen depletion induces a significant increase of 52 % ($p < 0.05$) on the S368 but not on the Y265 (Figure 3c-e). Alkylglycerol supplementation did not affect Cx43 phosphorylation of siDHAPAT-treated cells (Figure 3c, d, e).

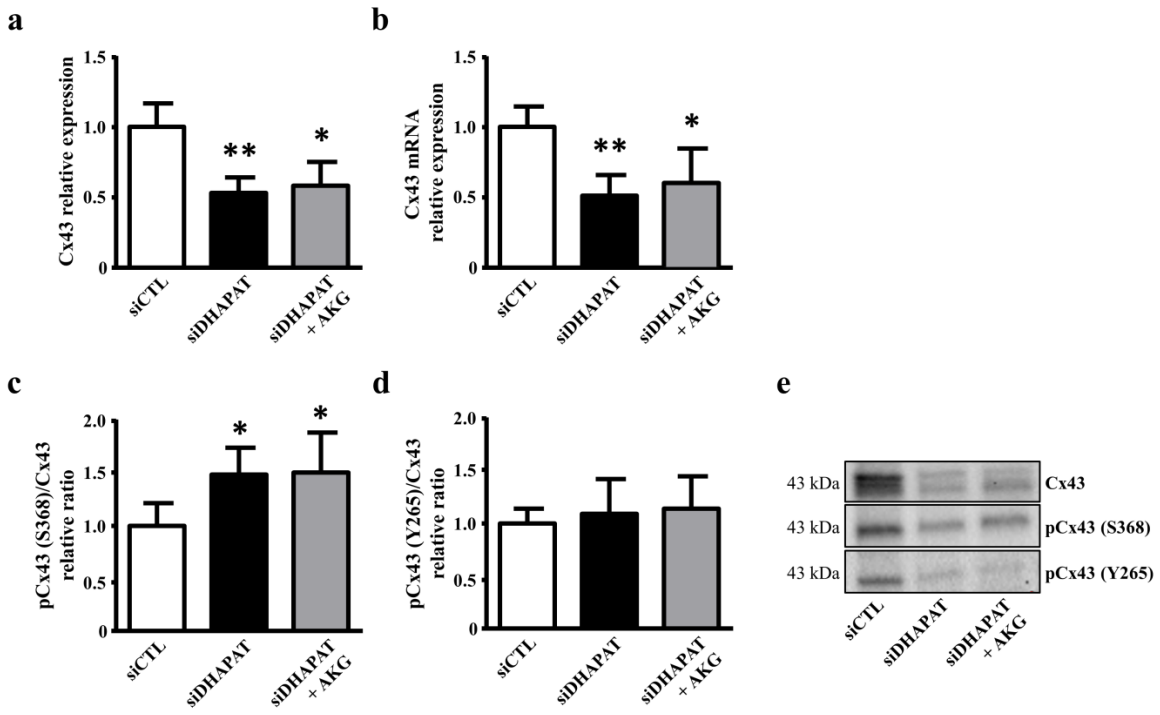

Figure 3: Plasmalogen depletion impacts Cx43 expression in primary Müller glia.
(a) Cx43 protein expression in primary Müller glia is significantly decreased in siDHAPAT-transfected cells and is not restored by alkylglycerol supplementation. (b) Reverse transcription quantitative PCR (RT-qPCR) indicating that siDHAPAT transfection significantly downregulated Cx43 gene expression, which is not restored upon alkylglycerol supplementation. (c, d, e) Western-blot analyses showing a significant increase in the phosphorylation status of Cx43 on its S368 residue but not on its Y265 residue. Alkylglycerol supplementation did not prevent S368 phosphorylation of the plasmalogen-depleted Müller cells. n = 6-8 cell cultures. Mann & Whitney test. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$. Data shown as mean ± SEM.

Plasmalogen depletion alters retinal glial cells gap junction-dependent intercellular communication

We used calcium imaging to determine whether plasmalogen depletion-induced decreased Cx43 expression affects Müller cells-astrocytes calcium-based communication. Müller cells were selectively activated in response to topical ATP application using a pipette placed nearby (Figure 4a). Astrocytes could be morphologically distinguished from Müller cells (Figure 4a, b), and the activation of neighboring astrocytes could be effectively monitored as the calcium wave propagated among the astrocytic network (Figure 4c, d). Astrocytes activation time data were plotted against the radius from the stimulated Müller cell (Figure 5a) and Pearson's correlation coefficients were determined to assess the statistical relationship between these two variables. The data showed positive linear associations for each groups, confirming that astrocytes activation time is directly correlated to their distance from the ATP-stimulated Müller cell (rPearson: siCTL = 0.5257; siDHAPAT = 0.4355; siDHAPAT + AKG = 0.5438. $p < 0.0001$). To further analyze astrocytes responses, we decided to split these data among 3 radius tertiles according to their distance from the ATP-stimulated Müller cell (T1 = 0-50µm; T2 = 50-100µm; T3 > 100µm). Tertile analyses confirmed that the increase in activation delay of neighboring astrocytes was maintained with increasing distance from Müller cells (Figure 5b). Plasmalogen-depletion of Müller cells was associated to an increase of astrocytes activation time (Figure 5b) as well as a decrease of calcium wave velocity (Figure 5c), regardless of the distance between the astrocyte and the Müller cell (0-50µm, $p < 0.05$; 50-100µm, $p < 0.001$; >100µm, $p < 0.01$). ATP stimulation of plasmalogen-depleted Müller cells also led to a significant increase in the activation amplitude of astrocytes whatever their distance to the Müller cells ($p < 0.05$) (Figure 5d). Alkylglycerol-mediated plasmalogen level restoration in Müller cells was able to restore calcium wave velocity and astrocytes activation time to control levels. However, alkylglycerol supplementation of Müller cells induced a significant decrease in astrocytes activation amplitude that was maintained throughout the increasing radius (0-50µm, $p < 0.01$; 50-100µm, $p < 0.05$; >100µm, $p < 0.001$).

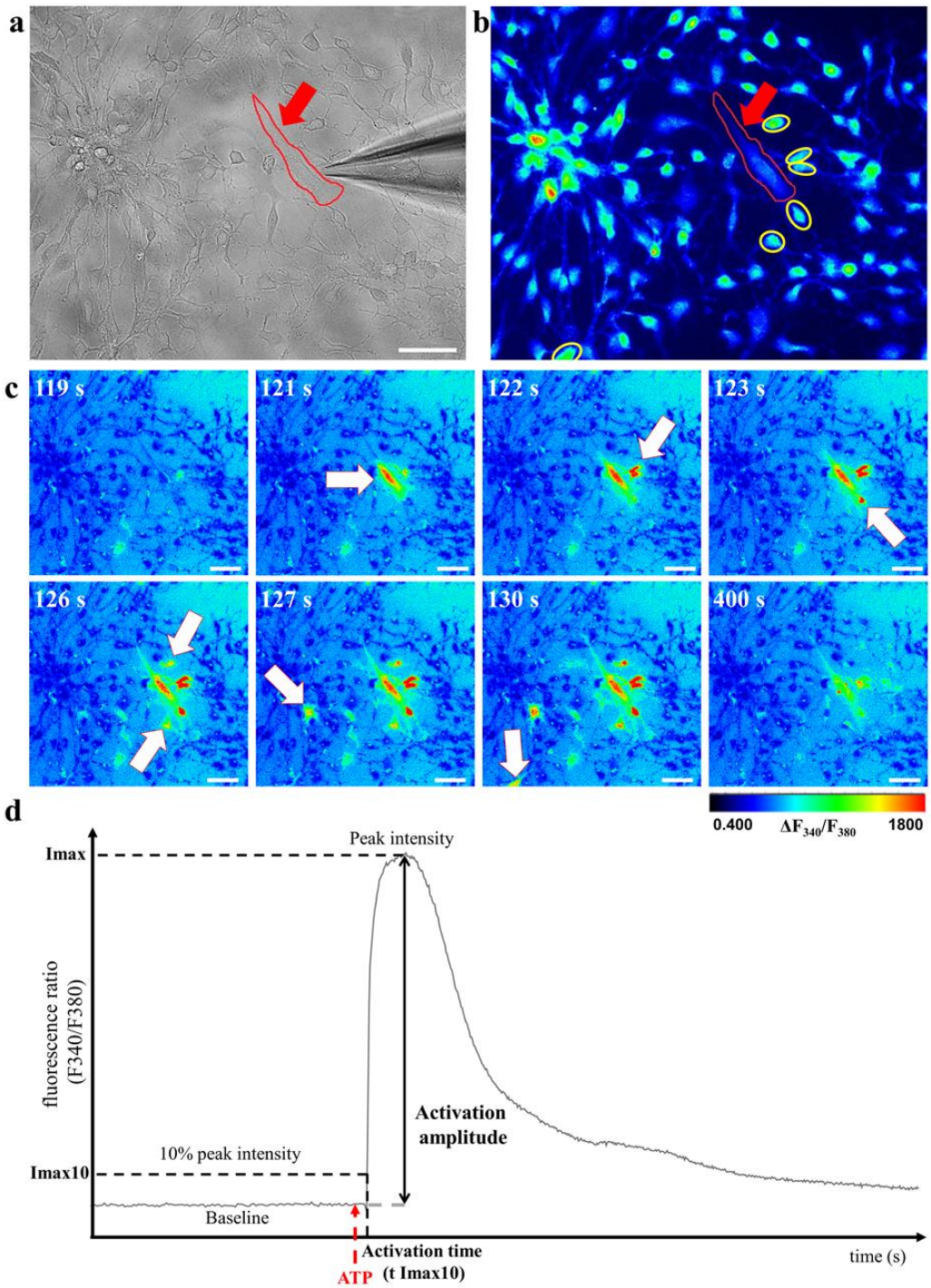

Figure 4: Evaluation of GJIC between retinal Müller cells and astrocytes.
(a,b) Calcium imaging. Müller cells (red arrow) can be morphologically distinguished from astrocytes (yellow circles) under fluorescent (a) and brightfield (b) modes. (c) ATP-stimulated calcium response of the Müller cell and neighboring astrocytes could be monitored under fluorescent microscopy as a function of time (white arrows). Pseudocolors images were obtained by the 340nm / 380nm fluorescence ratio and the pseudocolors scale indicates fluorescence ratio values. (d) Graphical representation of astrocytes calcium response curves with the parameters selected for further analyses: cell activation threshold (Imax10), activation amplitude (% of baseline increase) and cell activation threshold time (T Imax10) were analyzed. Scale bars = 50µm.

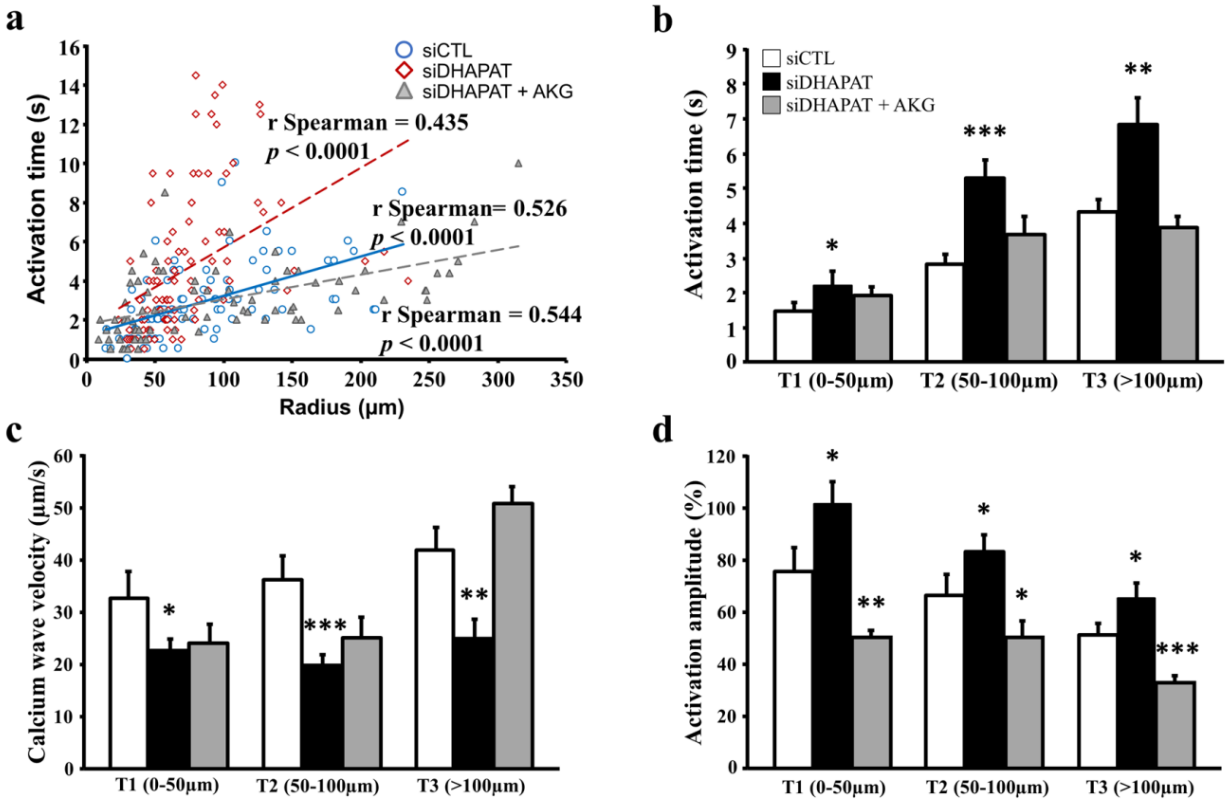

Figure 5: GJIC alterations in astrocytes neighboring plasmalogen-depleted Müller cells.
(a,b) Astrocytes stimulated by plasmalogen-depleted Müller cells display a significant increase in the activation time and amplitude (d), as well as in calcium wave velocity in all tertiles of distance (c). Alkylglycerol supplementation restored physiologic activation latency and amplitude values. n ≥ 75 astrocytes. Student t test. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. Data shown as mean ± SEM.

Plasmalogen depletion affects Müller glia response to ATP

To evaluate whether the increased activation amplitude of astrocytes is due to abnormal calcium wave initiation in ATP-stimulated Müller cells, we investigated Müller cells direct response to ATP stimulation (Figure 6a). Results show that Müller cells treated with siDHAPAT exhibited a significant increase of the ATP-mediated calcium response, which was 36%-higher when compared to siCTL cells (149 ± 5% vs 113 ± 12 %, $p < 0.05$) (Figure 6b, c). Restoring cellular levels of plasmalogens with alkylglycerol supplementation prevented this alteration (Figure 6b, c). Taken together, these results suggest that plasmalogen metabolism is involved in the ATP-stimulated calcium response of retinal Müller cells as well as its propagation to neighboring astrocytes.

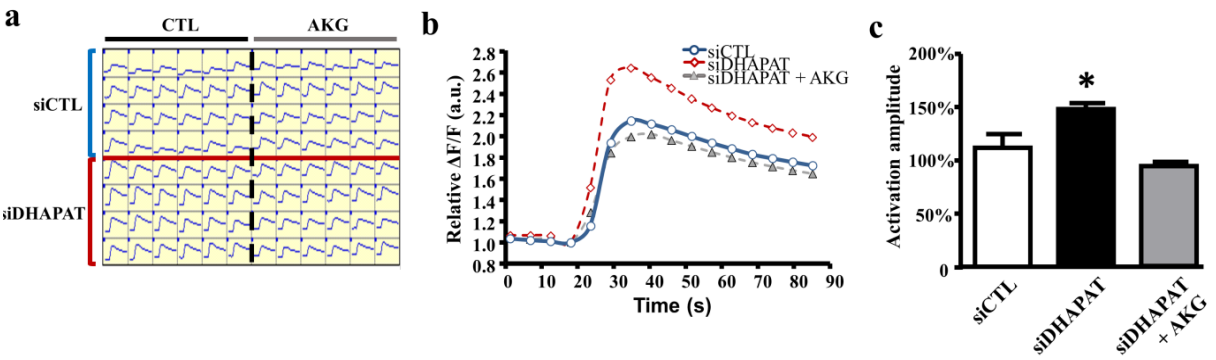

Figure 6: Plasmalogen depletion enhances the calcium response of ATP-stimulated Müller cells. (a) Kinetic response curves obtained on the Flexstation® 3 plate reader device. (b) Mean kinetic curves responses of control (siCTL), plasmalogen-depleted (siDHAPAT) and alkylglycerol-supplemented plasmalogen-depleted (siDHAPAT + AKG) Müller cells stimulated with ATP. (c) Activation amplitude of ATP-stimulated Müller cells, showing that plasmalogen-depleted Müller cells display a significantly increased calcium response that was prevented by alkylglycerol supplementation. n = 4. Mann & Whitney test. * $p < 0.05$. Data shown as mean ± SEM.

DISCUSSION

In this study, we used in vitro models of rat glial cells to investigate whether plasmalogens are involved in the regulation of GJIC in retinal glial cells. First, we showed that cell levels of plasmalogens influence the expression of Cx43, the major protein in gap junctions. Indeed, reducing plasmalogen levels with a siDHAPAT induced a decrease in Cx43 mRNA expression, as well as an increase of the phosphorylation status of Cx43, which is a well-known mechanism for its degradation. In addition to the Cx43 downregulation, plasmalogen-depleted Müller cells displayed defects in both the initiation of calcium waves and its propagation to neighboring astrocytes. Interestingly, restoring plasmalogen levels in deficient cells was able to prevent some of the observed alterations. Therefore, our data support the hypothesis that plasmalogen metabolism is involved in the regulation of GJIC in retinal glial cells.

Our data demonstrate that Müller cells concentrate plasmalogens in the retina, suggesting a particular role of these ether-lipids in these cells. Yet, we did not know to what extent they are significant for their physiological functions. Interestingly, previous research showed that plasmalogen deficiency induced by DHAPAT knocking out led to a downregulation of Cx43 in vivo[19]. Therefore, we decided to investigate the possibility of a causative link and the main mechanisms involved, as well as whether it could have a potential impact on GJIC.

Using molecular and biochemical approaches, we showed that plasmalogen depletion was sufficient to trigger Cx43 downregulation by affecting both transcriptional and post-translational mechanisms in Müller cells in vitro. Cx43 encoding gene expression is known to be regulated by numerous

mechanisms such as transcription factors, epigenetic mechanisms[20], and even vitamin-associated compounds[21]. It would be of particular interest to conduct dedicated studies in order to determine the mechanisms leading to Cx43 gene (GJA1) downregulation in plasmalogen deficient-cells. Moreover, one of the key features of the Cx43 stands to its C-terminus tail. Cx43 C-terminus is a pretty long intracytoplasmic tail with many binding sites for several enzymes, making it a target for various regulation mechanisms such as phosphorylation[22]. Connexin 43 phosphorylation is known to trigger its degradation by the ubiquitin-proteasome pathway[23,24]. Here we focused on the main phosphorylation sites linked to PKC (S368) and Src (Y265) activities. Our results indicate that plasmalogen depletion resulted in Cx43 overphosphorylation by PKC, but not by Src. Therefore, we suggest that Cx43 degradation is increased by a PKC-mediated overphosphorylation that may be responsible for an additional factor reducing cell content in Cx43. Cx43 overphosphorylation by PKC in plasmalogen-deficient cells could be a direct consequence of the changes in cell membrane composition. Indeed, previous studies have shown that unlike usual diacyl glycerol (DAG) generated from phospholipids by PLC activity, alkenylacyl-glycerids (plasmalogen derived DAG) doesn't induce PKC activation despite being ligands of the enzyme[25-28]. They would rather act as DAG competitive inhibitors, therefore representing an inhibition mechanism for PKC activity[29-31]. Besides, PKC activation requires prior docking to the cell membrane. Several phospholipid species of the choline (PC) and serine (PS) subgroups, as well as DAG or even phosphoinositides such as phosphatidylinositol bisphosphate (PIP2) are involved in this mechanism[32-34]. Accordingly, one could hypothesize that plasmalogen depletion induces spatial and molecular rearrangements inside the cell membrane, leading to a facilitated recruitment of PKC. Further studies are needed to understand the link between plasmalogens and Cx43 expression and/or phosphorylation in Müller cells.

Connexin 43 being the major component of retinal gap junctions, we aimed to look for potential alterations of GJIC between plasmalogen-depleted Müller cells and astrocytes. Our data show that siDHAPAT-treated Müller cells evoked calcium waves that propagated slower than calcium waves originating from control Müller cells, thus resulting in a delayed activation of neighboring astrocytes. The average activation time of astrocytes closer than 50µm from the Müller cell was 1.8sec for the siCTL group, while it rose to 2.5sec for the siDHAPAT group. Here, we show that calcium waves from control Müller glia propagated at an average speed of 37.3µm/s, which is consistent with the findings of Newman and Zahs[13] and Scemes, Dermietzel and Spray[35] who measured calcium wave velocities of 25.3µm/s and 18.8µm/s, respectively. Calcium waves from plasmalogen-depleted Müller glia propagated at 23.7µm/s, which represents a 37%-diminution in propagation velocity. Interestingly, Scemes, Dermietzel and Spray[35] also found a 36% reduction of calcium wave velocity in Cx43-KO astrocytes. However, they also found that knocking out Cx43 induced a reduction in astrocytes

activation amplitude, while we found that astrocytes stimulated by plasmalogen-depleted Müller cells (which are Cx43-depleted) exhibited stronger activation amplitudes. This suggests that in our conditions, plasmalogen-depleted Müller cells evoked calcium waves of higher amplitude.

By using the Flexstation 3® plate reader device, we were able to study precisely the isolated calcium response of Müller cells to ATP-stimulation with reproducible and well-calibrated parameters. Our data confirmed the increase in activation amplitude of plasmalogen-depleted Müller cells (siDHAPAT = 85% vs siCTL = 64%). Interestingly, Scemes, Dermietzel and Spray[35] observed decreased activation amplitude in Cx43 KO astrocytes. Even though our model only exhibited partial Cx43 depletion, this suggests the existence of some distinct mechanisms between retinal Müller cells and astrocytes ATP-induced calcium response. To our knowledge, our data are the first reporting an increase of ATP-induced calcium response following a plasmalogen depletion in retinal Müller cells. Interestingly, previous studies have linked calcium release from the endoplasmic reticulum (ER) to n-3 polyunsaturated fatty acids (PUFAs) such as the docosahexaenoic acid (DHA) in astrocytes[36,37] by showing that DHA reduces astrocytic calcium response amplitudes, partly by inhibiting the IP3 receptors activity. As plasmalogens are known to be "reservoirs" of PUFAs including DHA in the cell membrane[2], we could hypothesize that plasmalogen depletion is associated to a lower DHA bioavailability in Müller cells, thereby preventing its inhibitory effects on the calcium release from the ER. This hypothesis is supported by significantly reduced n-6/n-3 PUFAs ratio in siDHAPAT treated Müller cells (data not shown), and by a previous work from our laboratory showing that inhibiting PUFA release from plasmalogens leads to alterations that are similar to plasmalogen deficiency in mouse[6].

Plasmalogen-deficient mice (DAPAT$^{-/-}$) exhibit total plasmalogen deficiency that leads to critical defects in the eye, such as optic nerve hypoplasia, microphtalmia, cataract and abnormalities of the retinal vascular development[6,19]. In the retina, vascular development takes place on the preexisting angiogenic template formed by the astrocytic network[7]. Interestingly, defects of the astrocyte template, including astrocyte over-activation have been observed in the DHAPAT KO mice[6], suggesting that vascular development abnormalities are a consequence of prior alterations in astrocyte metabolism. Considering that retinal plasmalogen metabolism seem to be concentrated in Müller cells and that Müller cells communicate with astrocytes by the mean of gap junctions, one could hypothesize that astrocytes alterations are linked, at least in part, to functional defects of Müller glia. As shown in our study, plasmalogens are involved in proper GJIC. In order to validate our data, it would be of particular interest to assess Müller cell response to ATP and the subsequent GJIC in situ on whole retinas or on isolated Müller glia from ex vivo retinas[38-40] from DAPAT$^{-/-}$ mice. Further studies would then be needed to evaluate to what extent defects in GJIC participate to the abnormal

astrocytic template formation in DAPAT$^{-/-}$ mice and to the subsequent defects in retinal vasculature formation. Moreover, considering that supplementing DAPAT$^{-/-}$ mice has proven to successfully restore plasmalogen levels as well as plasmalogen-induced functional alterations[41,42], it would be interesting to conduct such studies in alkylglycerol-supplemented DAPAT$^{-/-}$ mice.

Alkylglycerol family comprises several molecular species, distinguished by their specific ether-linked sn-1 chain, such as batyl alcohol (1-O-octadecylglycerol), chimyl alcohol (1-O-hexadecylglycerol), and selachyl alcohol (1-O-octadec-9-enyl glycerol). As shown by Acar et al.[3], plasmalogens containing a C18:0 chain at the sn-1 moiety are the main plasmalogen subclass in the retina. Accordingly, we decided to supplement our cells with an alkylglycerol containing a C18:0 alkyl chain, namely batyl alcohol (1-O-octadecylglycerol). As expected, alkylglycerol supplementation successfully restored plasmalogen concentrations in Müller glia without any change in DHAPAT expression. Alkylglycerol supplementation also significantly inhibited plasmalogen-depleted Müller cells response to ATP, which in turn led to a reduction of astrocyte activation amplitude. This result confirms that the initial calcium response evoked by Müller cells is an important regulating factor of the calcium wave propagation with astrocytes. Surprisingly, alkylglycerol supplementation also restored astrocyte activation latency without influencing Cx43 expression. The reasons for such results are currently unknown, and it would be of particular interest to figure out what mechanisms could be responsible for this.

METHODS

Animals and cells

Animals

Experiments on animals were performed according to previously reported procedures[43] and in accordance with the ARRIVE guidelines, the Association for Research in Vision Ophthalmology (ARVO) statement for the use of animals in ophthalmic and vision research, and with French legislation (personal authorization number 21CAA086 for N.A and animal quarters agreement number A21231010 EA), after approval by ethics committees (#105 Comité d'Ethique de l'Expérimentation Animale Grand Campus Dijon) and by the French Ministry of Higher Education and Research (reference number 02271.1).

Müller cells

Primary Müller cells were prepared from rat retinas according to a procedure previously described by Hicks and Courtois with slight modifications[44]. Nine to 12 days-old animals were obtained from a Wistar rat colony established in our animal quarters. Animals were killed by decapitation. Eyes were isolated and placed in Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM; Pan Biotech, Germany) with 10% Fetal Bovine Serum (FBS) overnight at room temperature in the dark. Eyeballs were then pre-digested in DMEM containing 0.1% Trypsin-EDTA 10X (Sigma-Aldrich, USA) and 70 U/mL collagenase (Sigma-Aldrich, USA) at 37°C for 45min. Eyeballs were then placed in DMEM - 10% FBS, corneas were incised, lenses and vitreous bodies taken out, and retinas were gently isolated. Retinas were dissociated into small pieces and placed into a petri dish containing DMEM with 4.5 g/L of glucose, 10% FBS and 10 µL/mL of streptomycin (10 mg/mL) – penicillin (10000 U/mL) (Pan Biotech, Germany). The medium was not changed during the first 2 days and then progressively substituted by DMEM with 1 g/L of glucose. Cells at 80% confluence were reseeded on different material depending on their final use. They were used at second generation.

Astrocytes

Primary astrocytes were extracted from rat cerebral cortex. Twenty-one days-old pups were obtained from the same Wistar rat colony established in animal quarters. Anesthesia was performed *via* an intraperitoneal injection of pentobarbital (Ceva, France) at 0.1mg/100g. Animals were perfused through heart's left ventricle with a cold PBS solution. The brain was removed and astroglial cells isolation were performed according to a previously described protocol[45] with slight modifications. Briefly, cortices were separated from the brain and the meninges removed. Cortices were cut into small pieces using sharp blades, and cells were then dissociated by three successive trituration and sedimentation steps in DMEM F12 + 10 µL/mL of streptomycin-penicillin medium. Dissociated cells were then plated onto a 75cm^2 culture flask, previously pre-coated with poly-L-

lysine (1X) and maintained in culture medium (DMEM F12 + 10 % FBS + 10µL/mL of streptomycin-penicillin) in an incubator at 37°C with 5% CO2 and 95% humidity. The media was changed every 3-4 days. At 80% confluence, the flask was shaken overnight at 200 rpm to remove non-astroglial cells.

Co-culture model

At second generation, Müller cells and astrocytes were seeded on poly-L-lys coated glass coverslips (18 mm diameter) in 6-wells plates (25 mm diameter) at 5.10^5 cells/mL and 8.10^5 cells/mL, respectively. Müller cells were seeded one day before astrocytes to allow the transfection with siRNA. Cells were co-cultured together during 4 days before the experiment in DMEM F12 + 10% FBS + 10µL/mL of streptomycin-penicillin medium.

Immunohistochemistry

Experiments were performed according to previously reported procedures[43]. Adult C57BL/6 mice (3 months of age, Centre d'Elevage Janvier, Le-Genest-Saint-Isle, France) were euthanized by CO2 exposure. The eyeballs were isolated, embedded in Tissue-Tek O.C.T. (reference 4583, Sakura Finetek, Alphen aan den Rijn, Netherlands) and frozen into cold isopentane. Cryo-sections of 10µm-thickness were mounted on slides and stored at -80°C until further experiments.

Third generation Müller cells seeded on microscope slides and 10 µm-retina slices were fixed for 5min with a mixture composed of acetone and methanol (1:1, v:v), treated for 8min with 0.3 % H2O2 in TBS-T (50mM Tris, 150mM NaCl, 0.01% Tween 20), blocked 1h with mouse IgG Blocking Reagent (reference BMK 2202, Vector Labs, Burlingame, CA, USA) and incubated for 1h with the following primary antibodies in 1% bovine serum albumin (BSA): GNPAT at a dilution of 1:100 (rabbit polyclonal, reference 14931-1-AP, ProteinTech), and vimentin at a dilution of 1:50 (goat polyclonal, reference SC-7557 Santa Cruz). Samples were then incubated with either Alexa Fluor 488 or Alexa Fluor 594-conjugated secondary antibodies for 1h at room temperature (anti goat reference A11057, Invitrogen and goat anti rabbit reference 111-035-144, Jackson Immuno Research, West Groove, PA, USA, respectively), before being sealed in mounting media for imaging on an inverted confocal microscope (Leica TCS SP8, Leica Microsystemes, Nanterre, France)

Inhibition of DHAPAT-mediated plasmalogen biosynthesis by siRNA transfection

Transfection steps were accomplished according to previously reported protocols[43]. Silencer® Select siRNAs were used to knockdown expression of DHAPAT gene that encodes for the regulating enzyme of plasmalogen biosynthesis. SiDHAPAT (siRNA ID s136618 sense 5'-CAUCGUUCUCAAUUCUGAAtt-3', anti-sense 5'-UUCAGAAUUGAGAACGAUGga-3' and siRNA ID s136619 sense 5'-GGAUGUCCUUCAGUUGCUUUtt-3', anti-sense 5'-AAGCAACUGAAGACAUCCtc-3') and the non-targeting controls (siCTL) were purchased from Ambion (references 4390771 and 4404020,

ThermoFisher Scientific, USA). The siRNA transfection of Müller cells was performed using Lipofectamine RNAiMAX transfection reagent (ThermoFisher Scientific, USA) in OPTIMEM medium (ThermoFisher Scientific, USA) overnight at 37°C in 5% CO2 humidified atmosphere according to manufacturer's instructions. Then medium was replaced by DMEM supplemented with 10% FBS. Cells were then submitted to an 8h transfection process following both their first and second passages. Finally, cells were isolated for experiments 5 days after the second transfection.

Alkylglycerol supplementation of Müller cells

After the second siRNA transfection step, siCTL and siDHAPAT-transfected Müller cells were either maintained in the culture medium described earlier (1g/L glucose DMEM medium + 10% FBS + BSA 0.25mM + 10µL/mL streptomycin – penicillin cocktail) or either with the same culture medium supplemented with 7.5µM of batyl alcohol (1-O-Octadecyl-rac-glycerol) (Sigma-Aldrich, USA).

Evaluation of glial cell plasmalogen content

Total lipid from Müller cells were extracted according to the method described by Folch and collaborators by using a mixture of chloroform/methanol (2:1, v:v)[46]. Lipid extracts were stored at -20°C under inert gas until further analyses. Total lipids previously extracted were transmethylated using boron trifluoride (BF3) in methanol according to Morrison and Smith (Morrison and Smith, 1964). Fatty acid methyl esters (FAMEs; formed by the transmethylation of fatty acids at *sn*-1 and *sn*-2 positions of diacylglycerophospholipids and the *sn*-2 of plasmalogens) and dimethylacetals (DMAs; formed by the transmethylation of the aldehyde aliphatic groups on *sn*-1 position of plasmalogens) were subsequently extracted with hexane and analyzed by gas chromatography on a Hewlett Packard Model 5890 gas chromatograph (Hewlett Packard, USA) using a CPSIL-88 column (100 m x 0.25 mm i.d, film thickness 0.20 µm; Varian, France) equipped with a flame ionization detector. Hydrogen was used as the carrier gas (inlet pressure 210kPa). The oven temperature was held at 60°C for 5 min, increased at 165°C with a 15°C/min rate, held for 1 min and then to 225°C at 2°C/min and finally held at 225°C. FAMEs and DMAs were identified by comparison with their commercial and synthetic standards. The data were processed using the EZChrom Elite software (Agilent Technologies, France) and reported as a percentage of total FAMEs and DMAs. Plasmalogen levels were calculated as 2 x (% of total DMAs) as previously described by Acar and collaborators[3].

Protein expression

Proteins were first extracted from Müller cells in RIPA lysis buffer (ThermoFisher Scientific, USA) with extemporaneous addition of a phosphatase inhibitor (Roche, Sigma-Aldrich, USA) and protease inhibitor (Roche, Sigma-Aldrich, USA) cocktails. After a 30-min centrifugation at 10,000 x g, the supernatant containing proteins was isolated. Protein content was measured by using Pierce BCA Protein Assay Kit (ThermoFisher Scientific, USA) at 562nm by a multilabel plate reader (Victor 3V,

PerkinElmer, USA). Dilutions of known concentrations of BSA were prepared and used to determine standard curve.

Twenty-five micrograms of protein extracts were boiled for 5min in a 4X Laemmli buffer (40% glycerol, 240mM Tris/HCl pH 6.8, 8% SDS, 0.04% bromophenol blue, 5% beta-mercaptoethanol) and then separated by electrophoresis at 125V for 1h (Mini-PROTEAN® Tetra System, BioRad, USA) using 4-15% SDS-PAGE Stain-Free precast gels (Mini-PROTEAN®, TGX Stain-Free, BioRad, USA). After UV activation of the protein gels on a Chemidoc (BioRad, USA), proteins were subsequently transferred on a nitrocellulose membrane (BioRad, USA) using a Transblot Turbo (BioRad, USA). Membranes were blocked for 1h at room temperature in a PBS solution with 3% BSA (Sigma-Aldrich, USA) and then incubated for 1h at room temperature with primary antibodies. Primary antibodies used were 1:1000 rabbit anti DHAPAT (ref 14931-1-AP, ProteinTech, UK), mouse anti-Cx43 at 1:1000 dilution (ref 610062, BD Biosciences, USA), 1:1000 mouse anti-pCx43 (S368) (ref 52559, Cell Signaling Technology, Netherlands) and 1:1000 rabbit anti-pCx43 (Y265) (ref ab193373, Abcam, UK). Membranes were then rinsed for 30min at room temperature using a mixture of PBS-T (10mM Na_2HPO_4, 1,76mM KH_2PO_4, 137mM NaCl, 2,7mM KCl, 0.1% Tween 20 w/v) and incubated with HRP-conjugated secondary goat anti-mouse antibodies (reference P0161, Dako, Denmark) for 1h at room temperature. After another 30min rinsing, blots were incubated for 2min with ECL reagents (Perkin Elmer, USA) and visualized by chemiluminescence using a charge-coupled device (CCD) camera (Chemidoc, BioRad, USA). Protein expression was then quantified using total protein loads.

Gene expression

After being grown and transfected, primary Müller cells were collected from culture flask in PBS solution, snap-frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C. Total RNA was isolated from primary Müller cells using the NucleoSpin RNA Plus XS Kit (Macherey-Nagel, France) and quantified using a NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, USA). RNA samples were then divided in 10µL aliquots each containing 100ng of RNA and stored at -20°C. cDNA was synthesized from RNA samples using the high-capacity cDNA reverse transcription Kit (Applied Biosystems, USA) and stored in 20µL aliquots at -20°C. 2µL of cDNA sample were added to 10µL of iTaq Universal SYBR® Green Supermix (BioRad, USA) plus the corresponding primers. Finally, qPCR was performed on a StepOnePlus™ (ThermoFisher, USA). The qPCR run consisted of a first step at 95°C for 10min, followed by 40 cycles of 15s at 95°C, 1 min at 60°C and 30s at 72°C. In addition to the Cx43, Gusb and B2m were used as housekeeping genes. Primers sequences were as follows: Gusb: Forward 5'-CTCGAACAATCGGTTGCA-3', Reverse 5'- TCATTGAAGCTGCAAGGGACC-3'; B2m: Forward 5'-CCGTGATCTTTCTGGTGCTTG -3', Reverse 5'-CGGTGGATGGCGAGAGTACA-3'.Cx43 Forward 5'-CAGCTGTTGAGTCAGCTTGG - 3', Reverse 5'-ACATGGGCCAAGTACAGGAG-3'.

Calcium imaging

Calcium waves were studies according to previously reported procedures[43]. Co-cultured astrocytes and Müller cells were loaded for 45min at 37°C under gentle agitation with 2,5 µM of Fura-2 acetoxymethylester (Fura-2AM, Molecular Probes, USA) in a modified Hanks buffered saline solution (HBSS; 13 mM NaCl, 5mM KCl, 1.3mM $CaCl_2$, 1mM $MgCl_2$, 10 mM HEPES, 2.5 D-glucose, pH 7.4) supplemented with 0.002% pluronic acid (P3000MP, Molecular Probes, USA). After incubation, glass plates covered with cells were mounted in a thermostatically regulated microscope chamber on an inverted Olympus microscope (IX 70, Olympus Corporation, Japan) and visualized with a 20X objective. Intercellular calcium waves were induced by the application of ATP at 100µM onto a single Müller cell with an 8.4-µm glass micropipette. Two 100msec-pulses at 10psi were delivered with a pneumatic PicoPump (PV830, World Precision Instruments, USA). A real-time movie of intercellular calcium waves of stimulated Müller cell and neighboring astrocytes following stimulation was recorded at 2 Hz for 4min by alternating excitations at 340 nm and 380 nm (emission spectrum: 420-600nm). Images were recorded using a CCD camera with the live acquisition software (TiLL photonics, USA). The 340/380 nm fluorescence ratio was calculated after correction for background fluorescence values. A baseline recording was performed for 2min before stimulation.

Quantitative analysis of intercellular Ca2+ waves

Each cell was considered as an individual region of interest (ROI). For each ROI, we obtained a curve representing the 340/380nm fluorescence ratio. Since the fluorescence intensity of Fura-2AM was proportional to calcium concentrations, changes in cytosolic calcium concentrations were inferred from the fluorescence profile of individual cells. The mask of each ROI was imported on ImageJ software (National Institute of Health, USA, https://imagej.nih.gov/ij) to measure the distance between the stimulated Müller cell and the subsequently activated astrocytes. Astrocytes were considered as activated once they reached a 10% increase of the baseline (0.1 x Imax + baseline), and the corresponding latency time was evaluated (activation time). The velocity of calcium wave propagation was calculated and expressed in µm/s. Finally, astrocytes calcium response intensity following their activation was evaluated and expressed as a percentage of increase of the baseline (activation amplitude = ((Imax x 100) / baseline) - 100). The change in fluorescence intensity was normalized to the level of baseline fluorescence.

ATP-stimulated Müller glia calcium response

Primary Müller cells were isolated, cultured and transfected according to the previously described conditions[44]. Cells were seeded in Poly-D-lysine coated 96-wells plastic plates (Corning Biocoat™, Falcon, USA). Müller cells were loaded for 45min at 37°C with the calcium probe Fluo-4 AM (Molecular Probes, USA) and the organic anion transporters inhibitor probenecid (Invitrogen, USA) in

the same modified HBSS. After incubation, plates were placed in a multi-mode microplate reader FlexStation® 3 (Molecular Devices, USA) together with a 500 µM ATP-containing stimulation plate. Müller cells were then stimulated with ATP using the following injection parameters: volume = 50 µL, speed rate 6 (~94 µL/sec), height = 60µL. Calcium response was recorded during 90sec with the following recording parameters: sensitivity = 50 readings, PMT high; reading interval = 5.04sec. Data were recorded and analyzed using the SoftMax Pro 5.4.6 software (Molecular Devices, USA). Three 96-wells plates were used as replicates for each experiment. The mean of the three plates was used for analysis.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism v6.05 (GraphPad software, USA). For gene and protein expression, comparisons between two groups were performed using a non-parametric Mann-Whitney test. For the calcium wave quantitative analysis, Pearson correlation coefficients were determined to assess linear associations between astrocytes activation time and their distance from the ATP-stimulated Müller cell. Radius-dependent comparisons between groups were performed by a student *t*-test. A *p* value lower than 0.05 was considered as statistically significant and noted by one star (*). Two and three stars were used for *p* values lower than 0.01 and 0.001, respectively.

REFERENCES

1 Liu, D. et al. Role of dihydroxyacetonephosphate acyltransferase in the biosynthesis of plasmalogens and nonether glycerolipids. J Lipid Res 46, 727-735 (2005).

2 Nagan, N. & Zoeller, R. A. Plasmalogens: biosynthesis and functions. Prog Lipid Res 40, 199-229. (2001).

3 Acar, N. et al. Plasmalogens in the retina: in situ hybridization of dihydroxyacetone phosphate acyltransferase (DHAP-AT)--the first enzyme involved in their biosynthesis--and comparative study of retinal and retinal pigment epithelial lipid composition. Exp Eye Res 84, 143-151 (2007).

4 Nagy, K. et al. Comparative study of serine-plasmalogens in human retina and optic nerve: identification of atypical species with odd carbon chains. J Lipid Res 53, 776-783, doi:10.1194/jlr.D022962 (2012).

5 Dorman, R. V., Dreyfus, H., Freysz, L. & Horrocks, L. A. Ether lipid content of phosphoglycerides from the retina and brain of chicken and calf. Biochim Biophys Acta 486, 55-59 (1976).

6 Saab, S. et al. Plasmalogens in the retina: from occurrence in retinal cell membranes to potential involvement in pathophysiology of retinal diseases. Biochimie 107 Pt A, 58-65, doi:10.1016/j.biochi.2014.07.023 (2014).

7 O'Sullivan, M. L. et al. Astrocytes follow ganglion cell axons to establish an angiogenic template during retinal development. Glia 65, 1697-1716, doi:10.1002/glia.23189 (2017).

8 Bringmann, A. et al. Muller cells in the healthy and diseased retina. Prog Retin Eye Res 25, 397-424, doi:10.1016/j.preteyeres.2006.05.003 (2006).

9 Reichenbach, A. & Bringmann, A. New functions of Muller cells. Glia 61, 651-678, doi:10.1002/glia.22477 (2013).

10 Toft-Kehler, A. K., Skytt, D. M. & Kolko, M. A Perspective on the Muller Cell-Neuron Metabolic Partnership in the Inner Retina. Mol Neurobiol 55, 5353-5361, doi:10.1007/s12035-017-0760-7 (2018).

11 Vecino, E., Rodriguez, F. D., Ruzafa, N., Pereiro, X. & Sharma, S. C. Glia-neuron interactions in the mammalian retina. Prog Retin Eye Res 51, 1-40, doi:10.1016/j.preteyeres.2015.06.003 (2016).

12 Newman, E. A. Propagation of intercellular calcium waves in retinal astrocytes and Muller cells. J Neurosci 21, 2215-2223 (2001).

13 Newman, E. A. & Zahs, K. R. Calcium waves in retinal glial cells. Science 275, 844-847, doi:10.1126/science.275.5301.844 (1997).

14 Herve, J. C. & Derangeon, M. Gap-junction-mediated cell-to-cell communication. Cell TissueRes 352, 21-31, doi:10.1007/s00441-012-1485-6 (2013).

15 Sohl, G. & Willecke, K. An update on connexin genes and their nomenclature in mouse and man. Cell Commun Adhes 10, 173-180, doi:10.1080/cac.10.4-6.173.180 (2003).

16 Laird, D. W. Life cycle of connexins in health and disease. Biochem J 394, 527-543, doi:10.1042/BJ20051922 (2006).

17 Kerr, N. M. et al. Immunolocalization of gap junction protein connexin43 (GJA1) in the human retina and optic nerve. Invest Ophthalmol Vis Sci 51, 4028-4034, doi:10.1167/iovs.09-4847 (2010).

18 Zahs, K. R. & Ceelen, P. W. Gap junctional coupling and connexin immunoreactivity in rabbit retinal glia. Vis Neurosci 23, 1-10, doi:10.1017/S0952523806231018 (2006).

19 Rodemer, C. et al. Inactivation of ether lipid biosynthesis causes male infertility, defects in eye development and optic nerve hypoplasia in mice. Hum Mol Genet 12, 1881-1895 (2003).

20 Oyamada, M., Takebe, K. & Oyamada, Y. Regulation of connexin expression by transcription factors and epigenetic mechanisms. Biochim Biophys Acta 1828, 118-133, doi:10.1016/j.bbamem.2011.12.031 (2013).

21 Vine, A. L., Leung, Y. M. & Bertram, J. S. Transcriptional regulation of connexin 43 expression by retinoids and carotenoids: similarities and differences. Mol Carcinog 43, 75-85, doi:10.1002/mc.20080 (2005).
22 Leithe, E., Mesnil, M. & Aasen, T. The connexin 43 C-terminus: A tail of many tales. B Biochim Biophys Acta Biomembr 1860, 48-64, doi:10.1016/j.bbamem.2017.05.008 (2018).
23 Kimura, K. & Nishida, T. Role of the ubiquitin-proteasome pathway in downregulation of the gap-junction protein Connexin43 by TNF-alpha in human corneal fibroblasts. Invest Ophthalmol Vis Sci 51, 1943-1947, doi:10.1167/iovs.09-3573 (2010).
24 Leithe, E. & Rivedal, E. Ubiquitination and down-regulation of gap junction protein connexin-43 in response to 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate treatment. J Biol Chem 279, 50089-50096, doi:10.1074/jbc.M402006200 (2004).
25 Cabot, M. C. & Jaken, S. Structural and chemical specificity of diacylglycerols for protein kinase C activation. Biochem Biophys Res Commun 125, 163-169, doi:10.1016/s0006-291x(84)80349-6 (1984).
26 Daniel, L. W. et al. Alkyl-linked diglycerides inhibit protein kinase C activation by diacylglycerols. Biochem Biophys Res Commun 151, 291-297, doi:10.1016/0006-291x(88)90592-x (1988).
27 Ganong, B. R., Loomis, C. R., Hannun, Y. A. & Bell, R. M. Specificity and mechanism of protein kinase C activation by sn-1,2-diacylglycerols. Proc Natl Acad Sci USA 83, 1184-1188, doi:10.1073/pnas.83.5.1184 (1986).
28 Heymans, F., Da Silva, C., Marrec, N., Godfroid, J. J. & Castagna, M. Alkyl analogs of diacylglycerol as activators of protein kinase C. FEBS letters 218, 35-40, doi:10.1016/0014-5793(87)81013-x (1987).
29 Clark, K. J. & Murray, A. W. Evidence that the bradykinin-induced activation of phospholipase D and of the mitogen-activated protein kinase cascade involve different protein kinase C isoforms. J Biol Chem 270, 7097-7103, doi:10.1074/jbc.270.13.7097 (1995).
30 Warne, T. R., Buchanan, F. G. & Robinson, M. Growth-dependent accumulation of monoalkylglycerol in Madin-Darby canine kidney cells. Evidence for a role in the regulation of protein kinase C. J Biol Chem 270, 11147-11154, doi:10.1074/jbc.270.19.11147 (1995).
31 Mandal, A., Wang, Y., Ernsberger, P. & Kester, M. Interleukin-1-induced ether-linked diglycerides inhibit calcium-insensitive protein kinase C isotypes. Implications for growth senescence. J Biol Chem 272, 20306-20311, doi:10.1074/jbc.272.32.20306 (1997).
32 Gould, C. M. & Newton, A. C. The life and death of protein kinase C. Curr Drug Targets 9, 614-625, doi:10.2174/138945008785132411 (2008).
33 Guerrero-Valero, M. et al. Structural and mechanistic insights into the association of PKCalpha-C2 domain to PtdIns(4,5)P2. Proc Natl Acad Sci USA 106, 6603-6607, doi:10.1073/pnas.0813099106 (2009).
34 Lucic, I., Truebestein, L. & Leonard, T. A. Novel Features of DAG-Activated PKC Isozymes Reveal a Conserved 3-D Architecture. J Mol Biol 428, 121-141, doi:10.1016/j.jmb.2015.11.001 (2016).
35 Scemes, E., Dermietzel, R. & Spray, D. C. Calcium waves between astrocytes from Cx43 knockout mice. Glia 24, 65-73, doi:10.1002/(sici)1098-1136(199809)24:1<65::aid-glia7>3.0.co;2-# (1998).
36 Begum, G., Kintner, D., Liu, Y., Cramer, S. W. & Sun, D. DHA inhibits ER Ca2+ release and ER stress in astrocytes following in vitro ischemia. J Neurochem 120, 622-630, doi:10.1111/j.1471-4159.2011.07606.x (2012).
37 Sergeeva, M., Strokin, M. & Reiser, G. Regulation of intracellular calcium levels by polyunsaturated fatty acids, arachidonic acid and docosahexaenoic acid, in astrocytes: possible involvement of phospholipase A2. Reprod Nutr Dev 45, 633-646, doi:10.1051/rnd:2005050 (2005).

38 Kurth-Nelson, Z. L., Mishra, A. & Newman, E. A. Spontaneous glial calcium waves in the retina develop over early adulthood. J Neurosci 29, 11339-11346, doi:10.1523/JNEUROSCI.2493-09.2009 (2009).
39 Tchernookova, B. K. et al. Activation of retinal glial (Muller) cells by extracellular ATP induces pronounced increases in extracellular H+ flux. PLoS One 13, e0190893, doi:10.1371/journal.pone.0190893 (2018).
40 Uckermann, O., Grosche, J., Reichenbach, A. & Bringmann, A. ATP-evoked calcium responses of radial glial (Muller) cells in the postnatal rabbit retina. J Neurosci Res 70, 209-218, doi:10.1002/jnr.10406 (2002).
41 Brites, P. et al. Alkyl-glycerol rescues plasmalogen levels and pathology of ether-phospholipid deficient mice. PLoS One 6, e28539, doi:10.1371/journal.pone.0028539 (2011).
42 Todt, H. et al. Oral batyl alcohol supplementation rescues decreased cardiac conduction in ether phospholipid-deficient mice. J Inherit Metab Dis 43, 1046-1055, doi:10.1002/jimd.12264 (2020).
43 Mazzocco, J. Métabolisme des plasmalogènes dans les cellules gliales rétiniennes : interactions cellule-cellule au cours du développement vasculaire rétinien normal ou pathologique. Doctoral dissertation, University of Burgundy, Dijon, France (2017). Retrived from https://tel.archives-ouvertes.fr
44 Hicks, D. & Courtois, Y. The growth and behaviour of rat retinal Muller cells in vitro. 1. An improved method for isolation and culture. Exp Eye Res 51, 119-129 (1990).
45 Schildge, S., Bohrer, C., Beck, K. & Schachtrup, C. Isolation and culture of mouse cortical astrocytes. J Vis Exp, doi:10.3791/50079 (2013).
46 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).

Résultats complémentaires et conclusion

A travers ces deux études, nous avons pu montrer que les plasmalogènes jouent un rôle crucial dans la physiologie des cellules de Müller, en régulant notamment des mécanismes clés tels que la migration cellulaire et la GJIC. Toutefois, plusieurs questions restent en suspens et demandent des investigations plus poussées, notamment au niveau mécanistique, afin de comprendre comment la diminution du contenu cellulaire en plasmalogènes altère ces fonctions.

En premier lieu, des données complémentaires d'expression génique menées sur les 3 protéines du cytosquelette présentées dans l'article 1 (GFAP, B-actine et B-tubuline) suggèrent que la diminution de l'expression de la GFAP pourrait être due à une diminution de l'expression du gène associé (**Figure 40**). Ce dernier est notamment régulé par des facteurs de transcription tels qu'AP1, SP1 ou NFkB, qui interviennent également dans la régulation de l'expression génique de la Cx43, et pourraient ainsi expliquer la sous expression de l'ARNm Cx43 décrite dans l'article 2. Ces facteurs de transcription sont généralement sur ou sous-exprimés au cours de modifications de la physiologie cellulaire, comme l'inflammation. Or, l'activation des cellules de Müller à la suite d'un processus inflammatoire se traduit justement par une surexpression de la GFAP, excluant de fait que la diminution du contenu en plasmalogènes déclenche l'apparition d'un profil inflammatoire.

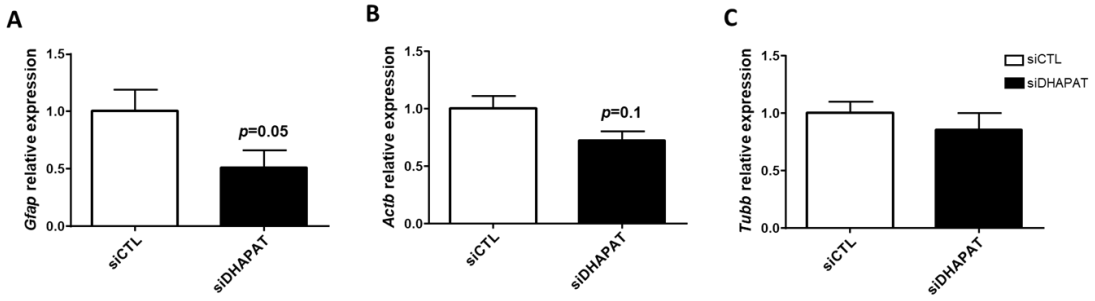

Figure 40 : Expression relative des gènes codant pour les protéines du cytosquelette des cellules de Müller. La déplétion partielle du contenu en plasmalogènes de cellules de Müller est associée à une sous-expression du gène codant pour la GFAP (A), tandis que les gènes codant pour la β –Actine (B) et la β-Tubuline (C) ne montrent pas de différence d'expression. Données présentées sous la forme M±SEM. Test de Mann-Whitney. n=5

Dans un deuxième temps, l'article 2 a permis de révéler que la sous-expression de la Cx43 induite par la déplétion en plasmalogène impactait significativement la GJIC non seulement entre les cellules de Müller, mais également avec les astrocytes. Une partie des anomalies ayant été corrigée par la supplémentation en précurseurs de plasmalogènes (AKG), l'implication des plasmalogènes dans ces processus s'en trouve d'autant plus renforcée. Toutefois, la restauration du contenu cellulaire en plasmalogènes n'ayant pas permis de restaurer l'expression de la Cx43, nous avons été surpris

d'observer une restauration partielle de la GJIC. Afin de compléter la compréhension des mécanismes impliqués, nous avons décidé de vérifier l'expression d'autres connexines exprimées par les cellules de Müller. Ces résultats préliminaires suggèrent que les plasmalogènes pourraient réguler l'expression d'autres connexines que la Cx43 (**Figure 41**). Il est toutefois nécessaire de répéter ces expérimentations afin de pouvoir conclure avec certitude sur les tendances observées. De plus, les western-blots correspondants permettront de relier les éventuelles altérations de l'expression génique à l'expression protéique de ces dernières.

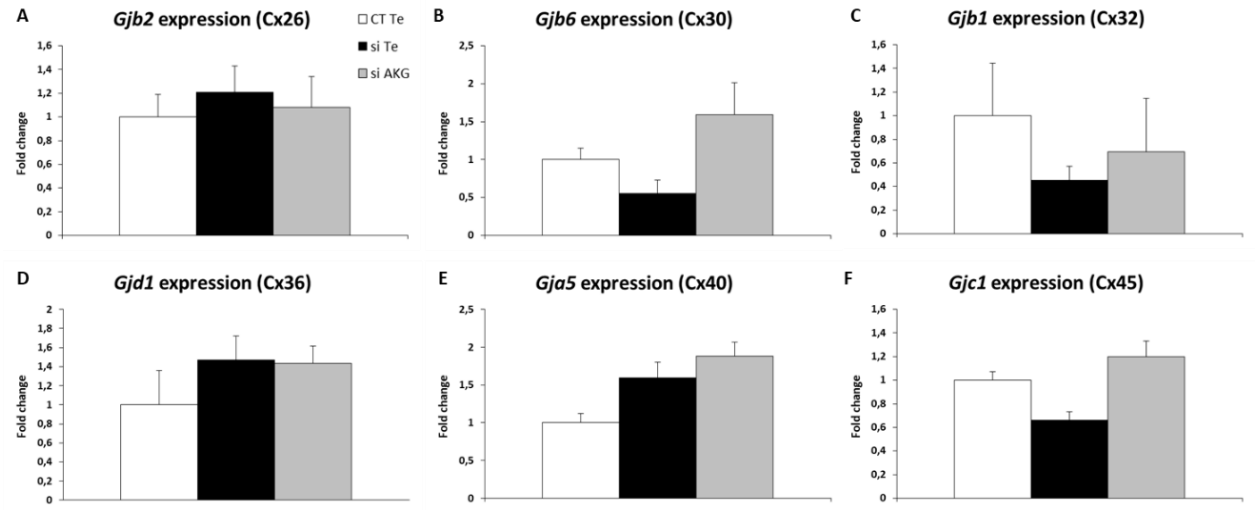

Figure 41 : Expression relative des gènes codant pour les différentes connexines dans les cellules de Müller. Données présentées sous la forme M±SEM. Test de Mann-Whitney. n=4-6

Ces résultats préliminaires suggèrent que les plasmalogènes pourraient réguler l'expression d'autres connexines que la Cx43, mais les conséquences sur la GJIC restent encore à déterminer. Par ailleurs, nous savons également que la réponse calcique provoquée par des stimuli tels que l'ATP entraine l'activation de voies de signalisation intracellulaire, comme la voie des MAPKs et Akt. Nous avons donc également souhaité vérifier les conséquences de la déplétion en plasmalogènes sur l'activation des MAPKs en réalisant une cinétique de phosphorylation à la suite d'un stimulus ATP (**Figure 42**).

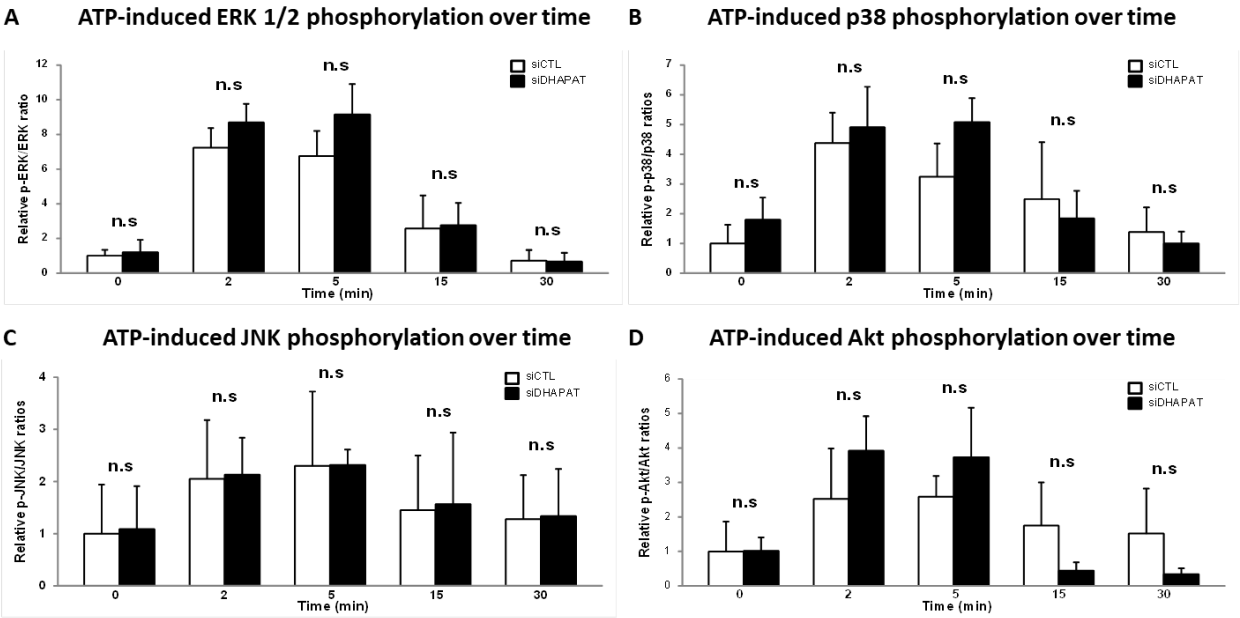

Figure 42 : Cinétique de phosphorylation des voies de signalisation intracellulaire dans les cellules de Müller à la suite d'un stimulus ATP. Données présentées sous la forme M±SEM. Test de Mann-Whitney. n=4-6

Si les résultats suggèrent une tendance à la suractivation de ERK 1/2, de p38 et d'Akt dans les cellules de Müller déplétées en plasmalogènes, cette augmentation n'est cependant pas suffisante pour être significative. Il convient toutefois de rappeler ici que notre modèle de déplétion en plasmalogènes n'induit qu'une déplétion partielle de l'ordre de 50%, et ne pourrait ne pas être suffisant pour mimer la physiologie de cellules déficientes en plasmalogènes, comme dans le cas de la souris DAPAT$^{-/-}$. Afin de combler ce biais, il pourrait être envisagé de réaliser ces expérimentations sur des cultures primaires de cellules de Müller isolées de souris déficientes en plasmalogènes, comme la souris PEX7 ou encore la souris DAPAT.

Bien que n'étant pas suffisante pour induire des changements significatifs dans l'activation des voies de signalisation, la déplétion partielle en plasmalogènes permet d'altérer de manière significative le ratio n-6/n-3 (Figure 43 A), qui repose en grande partie sur le ratio AA/DHA (Figure 43B). La déplétion en plasmalogènes est ainsi associée à une augmentation de ces ratios, suggérant une diminution significative de la biodisponibilité en oméga-3, confirmant par là même d'autres études antérieures (Gaposchkin and Zoeller, 1999).

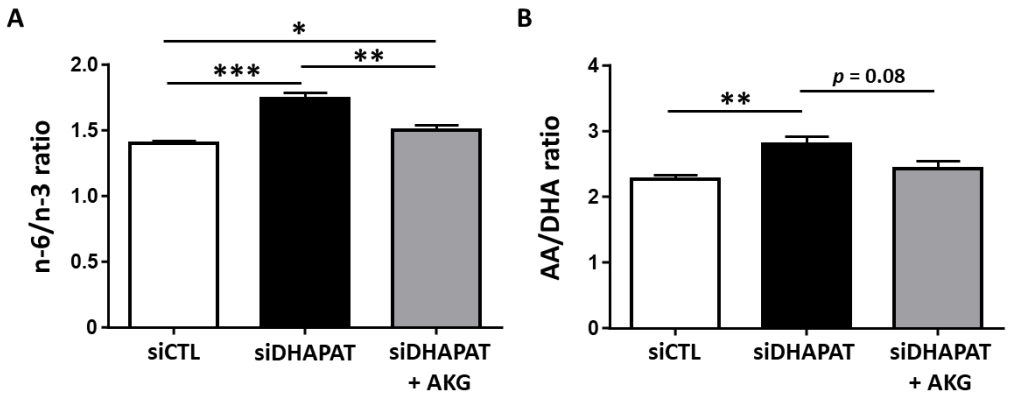

Figure 43 : Impact de la transfection et de la supplémentation en AKG sur le statut en AGPIs des cellules de Müller in vitro. A : La déplétion partielle en plasmalogènes des cellules de Müller induite par la transfection (siDHAPAT) est associée à une augmentation significative du ratio n-6/n-3 ($p < 0.001$), qui est partiellement restaurée par la supplémentation en alkylglycérols (AKG) ($p < 0.05$). **B :** La déplétion partielle en plasmalogènes des cellules de Müller (siDHAPAT) est associée à une augmentation significative du ratio AA/DHA ($p < 0.01$), qui tend à être restaurée par la supplémentation en AKG ($p = 0.08$). Données présentées sous la forme moyenne ± SEM. Test de Mann-Whitney ; n=8.

Chapitre 3 : Rôle des plasmalogènes dans le développement vasculaire rétinien – intérêt potentiel d'un apport nutritionnel en précurseurs de plasmalogènes

Problématique

Les études in vitro développées dans le chapitre 2 ont permis de mettre en évidence l'implication des plasmalogènes dans la physiologie des cellules de Müller. Bien que ces études pourraient être étendues à d'autres fonctions afin de discriminer précisément celles qui sont régulées par les plasmalogènes de celles qui ne sont pas impactées, l'altération de la GJIC et des capacités de migration suggèrent que les cellules de Müller pourraient participer à la mise en place et/ou la sévérité des anomalies rétiniennes de la souris déficiente en plasmalogènes (DAPAT$^{-/-}$). Par ailleurs, des études ont pu montrer que la supplémentation du régime alimentaire de souris déficientes en plasmalogènes avec des alkylglycérols était capable de restaurer les niveaux tissulaires en plasmalogènes ainsi que des anomalies liées à cette déficience, y compris oculaires. L'impact sur les altérations de la rétine et de son développement vasculaire n'est cependant pas connu à l'heure actuelle. De plus, la supplémentation *in vitro* des cellules de Müller en alkylglycérols ayant montré une capacité à rétablir au moins partiellement certaines anomalies induites par la déplétion en plasmalogènes, il apparait envisageable de considérer que la supplémentation *in vivo* en alkylglycérols puisse limiter les altérations fonctionnelles des cellules de Müller et par extension, le phénotype pathologique rétinien de la souris DAPAT $^{-/-}$. En conséquence, nous avons souhaité étendre notre compréhension des mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans la mise en place des anomalies du développement vasculaire rétinien de la souris DAPAT$^{-/-}$ et de déterminer l'impact d'une supplémentation nutritionnelle orale en alkylglycérols sur ces paramètres. Le développement vasculaire de la rétine s'effectuant postérieurement à la naissance au cours des trois premières de vie, les souriceaux s'alimentent par lactation. Nous avons donc supplémenté le régime des mères à hauteur de 2% d'alkylglycérols, afin que les souriceaux en bénéficient par transfert *via* le lait maternel.

Cet article est en préparation pour une soumission dans le journal internationnal Plos One.

Supplementing mice with the plasmalogen-precursors alkylglycerols limits retinal inflammation and vascular abnormalities associated with plasmalogen deficiency.

Rémi Karadayi[1], Bénédicte Buteau[1], Elisabeth Dubus[1], Stéphane Gregoire[1], Lucy Martine[1], Alain M. Bron[1,2], Niyazi Acar[1,*]

[1]Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation, AgroSup Dijon, CNRS, INRAE, Université Bourgogne Franche-Comté, Eye and Nutrition Research Group, Dijon, F-21000 France

[2]University Hospital, Department of Ophthalmology, Dijon, F-21000, France

*** Corresponding Author:** niyazi.acar@inrae.fr

Keywords: Plasmalogens, Retina, Vascular development, Inflammation, Alkylglycerols, Diet

Author contributions: RK, NA designed the study. RK, BB, SG, NA acquired, analyzed and interpreted the data. RK, AMB, NA drafted the manuscript. All authors reviewed the manuscript.

Competing interests: The author(s) declare no competing interests related to this study.

Abstract

Plasmalogens are ether-phospholipids that are involved in several crucial functions of cell physiology. Plasmalogen deficiency is associated with major eye defects in the mouse, including vascular development abnormalities of the retina, namely artery dilatation, tortuosity, and leakage that ultimately remain up in adulthood. These alterations have been associated with the activation retinal glial cells and modifications in the expression of angiogenic factors. In this work, we aimed to expand our knowledge on the underlying mechanisms as well as at testing whether a nutritional supplementation with plasmalogen precursors could prevent these abnormalities. Accordingly, the diets of lactating mice were enriched in 2% alkylglycerols and retinal vascular development as well as the expression of key genes involved in glial cells activation, angiogenesis and inflammation were assessed during the first three weeks at post-natal days 7, 14 and 21 (PN7, 14, 21). Results show that plasmalogen deficiency is associated with several impairments in the expression of crucial genes such as *Gfap*, *Angpt1*, *Mmp9*, *Fn1* or *Il1b*, that can be at least partially restored with alkylglycerol supplementation. However, the alkylglycerol-enriched diet was not sufficient not fully restore neither plasmalogen levels nor plasmalogen deficiency-induced vascular abnormalities. Despite providing promising clues, further research is needed to achieve a full understanding of the mechanisms linking plasmalogens and vascular development of the retina.

Introduction

Plasmalogens are a subgroup of membrane phospholipids characterized by a vinyl-ether bond at the *sn*-1 position of glycreol. They are involved in several major functions of cell physiology such as membrane structure and dynamics, antioxidative status maintenance and cell signaling (Nagan and Zoeller, 2001; Braverman and Moser, 2012). Plasmalogens are abundant in nervous tissues, suggesting a specific role in their physiology. As an extension of the central nervous system, the retina was also shown to exhibit high concentrations of plasmalogens (Acar et al 2007). As for other lipid species (Vecino et al., 2016; Gambert et al., 2017; Leger-Charnay et al., 2019), the retinal metabolism of plasmalogens seem to rely on Müller cells (Acar et al., 2007), the principal glial cell of the retina (Bringmann et al., 2006). Interestingly, plasmalogen deficiency is associated with several major eye defects in the mouse (DAPAT$^{-/-}$), such as microphthalmia, optic nerve hypoplasia, cataract, persistence of hyaloid vessels during adult life, and abnormal vascular development of retinal vessels (Rodemer et al., 2003; Brites et al., 2011; Saab et al., 2014b). These abnormalities in retinal vascularization take place in a two-phase manner during retinal post-natal development: a delayed outgrowth at post-natal day 7 (PN7), followed by a second phase of proliferative angiogenesis at post-natal day 14 (PN14). Adult vessels exhibit increased dilatation and tortuosity (Saab et al., 2014a). The onset of these abnormalities is associated with modifications in the expression of several factors involved in angiogenesis such as angiopoietins 1 and 2, glial cells activation such GFAP (Saab et al., 2014a) as well as in microglial cells metabolism such as Iba1 (Langmann 2007). On the other hand, it is well known that the activation of glial cells is associated with the overexpression of pro-inflammatory cytokines such as Il-1β, IL6, IL17, IL23 and TNF-α (Kumar et al., 2013; Eastlake et al., 2016; Abcouwer, 2017). Retinopathies are also associated with various dysregulation of extracellular matrix (ECM) proteins like fibronectin (Saab et al. 2014a; Roy et al., 1996) and ECM degrading enzymes like the matrix metalloproteinases 2 and 9 (MMP2 and MMP9, respectively). Previous studies have shown that a nutritional supplementation with the plasmalogens precursor alkylglycerols is able to restore at least partly several of the defects observed in the DAPAT$^{-/-}$ mouse, including those related to lens development (Brites et al., 2011). However, the impact of such a dietary supplementation on vascular development of the retina is currently not known, and the exact mechanisms underlying the onset of these abnormalities are still undocumented. Therefore, our study aimed at expending our knowledge on the mechanisms by which plasmalogens regulate retinal vascular development. Accordingly, using biomolecular, histological, and nutritional approaches, we explored the mechanisms underlying plasmalogen deficiency-related retinal abnormalities *in vivo* and the impact of a nutritional rescue of tissue plasmalogen levels.

Materials and methods

Animals

Experiments were conducted in accordance with the Association for Research in Vision and Ophthalmology statements and with French legislation (authorization number 21CAE086 for N.A. and animal quarters agreement number A21231010 EA), after approval by the local ethics committees (#105 Comité d'Ethique de l'Expérimentation Animale Grand Campus Dijon).

DAPAT heterozygous ($DAPAT^{+/-}$) mutants were kindly provided by Prof. W.W. Just (Heidelberg, Germany) and housed in our animal quarters. They were crossed to generate $DAPAT^{+/+}$, $DAPAT^{+/-}$ and DAPAT knock-out ($DAPAT^{-/-}$) mice. Animals were genotyped as previously described (Saab et al., 2014). Briefly, polymerase-chain reaction (PCR) was performed on genomic tail DNA using the primers neomycin-forward (CGCATCGCCTTCTATCGCCTTCTTG, Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Germany), exon7-forward (CGATACCTACTTTGTCCCAATTAGC, Eurofins) and exon7-reverse (GCTGGTCTCAAACAGCTACGTAGCTGA, Eurofins). DNA was extracted using the Archive Pure DNA Cell/Tissue kit (5 Prime GmbH, Catalog no 2300820; Gaithersburg, MD). Then, 2 ng of genomic DNA, 100 pmol of each primer in reaction buffer and 2.5 U of Taq polymerase (BiotaqTM DNA Polymerase, BIO-21040, Bioline, Paris, France) were used in a total volume of 25 µl to amplify DNA. After 2 min of denaturation at 95°C, PCR was performed on a C1000TM Thermo Cycler (Biorad Laboratories, Hercules, CA, USA) through 35 cycles at 94°C for 30 s and 57°C for 1 min, followed by a final extension step at 72°C for 1 min. This resulted in a 650-bp product for the wild-type gene and an 860-bp product for the neomycin-recombinant DAPAT gene. PCR products were determined by electrophoresis in 2% agarose gels that were further visualized on a Geldoc 2000 (Biorad) for analysis.

Diets

Animals were fed from birth with diets containing either 2% alkylglycerol (AKG) or 0% AKG (Table 1). The lipid fraction of the diets were prepared by using sunflower oil and canola oil in order to supply linoleic acid (LA, C18:2n-6) and α-linolenic acid (ALA, C18:3n-3), respectively. High oleic sunflower oil and palm oil were added to balance the levels of oleic acid and palmitic acid, respectively. Fish oil was used to balance docosahexaenoic acid (DHA, C22:6n-3) and eicosapentaenoic acid (EPA, C20:5n-3) levels, and shark liver oil (Polaris, France) was used to provide AKG. The detailed composition of dietary lipids is presented in Table 2.

Table 1 Composition of diets

Ingredients	Amount (g/kg diet)
Casein	180
Cornstarch	460
Sucrose	230
Cellulose	20
Fat[a]	50
Mineral mix[b]	50
Vitamin mix[c]	10

[a]Represented by oil mixes prepared with variable amounts of sunflower oil, canola oil, high oleic sunflower oil, palm oil, and fish oil.

[b]Composition (g/kg diet): sucrose, 5.535; $CaCO_3$, 12; K_2HPO_4, 10.75; $CaHPO_4$, 10.75; $MgSO_4$, $7H_2O$, 5; NaCl, 3; MgO, 2; $FeSO_4$, $7H_2O$, 0.4; $ZnSO_4$, $7H_2O$, 0.35; $MnSO_4$, H_2O, 0.1; $CuSO_4$, $5H_2O$, 0.05; Na_2SiO_7, $3H_2O$, 0.025; $AlK(SO_4)_2$, $12H_2O$, 0.01; K_2CrO_4, 0.0075; NaF, 0.005; $NiSO_4$, $6H_2O$, 0.005; H_2BO_3, 0.005; $CoSO_4$, $7H_2O$, 0.00025; KIO_3, 0.002; $(NH_4)_6Mo_7O_{24}$, $4H_2O$, 0.001; LiCl, 0.00075; Na_2SeO_3, 0.00075; NH_4VO_3, 0.0005.

[c]Composition (g/kg diet): sucrose, 5.4945; retinyl acetate, 0.01; cholecalciferol, 0.0025; DL-a-tocopheryl acetate, 0.2; phylloquinone, 0.001; thiamin HCl, 0.01; riboflavin, 0.01; nicotinic acid, 0.05; calcium pantothenate, 0.025; pyridoxine HCl, 0.01; biotin, 0.01; folic acid, 0.002; cyanobalamin, 0.025; choline HCl, 2; DL-methionin, 2; p-aminobenzoic acid, 0.05; inositol, 0.1.

Table 2 Fatty acid composition of dietary lipids

Fatty acids	Control diet	AKG-supplemented diet
Total alkylglycerols	0%	2%
Total saturated fatty acids	28.7%	25.5%
Total mono-unsaturated fatty acids	53.2%	36.9%
C18:2n-6 (LA)	13.5%	13.5%
C20:4n-6 (ARA)	0.03%	0.2%
Total n-6 fatty acids	13.6%	13.7%
C18:3n-3 (ALA)	1.2%	1.2%
C20:5n-3 (EPA)	0.6%	0.4%
C22:6n-3 (DHA)	0.3%	0.5%
Total n-3 fatty acids	2.3%	2.3%
Total n-6 + n-3 fatty acids	15.9%	16.0%
LA/ALA ratio	11.1	11.4
n-6/n-3 ratio	6.03	6.02

Values are expressed as a percentage of total fatty acids, except for AKG that are expressed as percentage of total fat.

Lipid quantification

Animals were euthanized at PN21. The retinas were carefully excised from the ocular globe and quickly frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until further analyses. Total lipid from retina were extracted according to the method described by Folch and collaborators by using a mixture of chloroform/methanol (2:1. v:v) (Folch et al., 1957). Lipid extracts were stored at -20°C under inert gas. Total lipids were transmethylated using boron trifluoride (BF3) in methanol according to Morrison and Smith (Morrison and Smith, 1964). Fatty acid methyl esters (FAMEs; formed by the transmethylation of fatty acids at *sn*-1 and *sn*-2 positions of diacylglycerophospholipids and the *sn*-2 of plasmalogens) and dimethylacetals (DMAs; formed by the transmethylation of the aldehyde aliphatic groups on *sn*-1 position of plasmalogens) were subsequently extracted with hexane and analyzed by gas chromatography on a Hewlett Packard Model 5890 gas chromatograph (Hewlett Packard. USA) using a CPSIL-88 column (100 m x 0.25 mm i.d. film thickness 0.20 µm; Varian. France) equipped with a flame ionization detector. Hydrogen was used as the carrier gas (inlet pressure 210 kPa). The oven temperature was held at 60°C for 5 min. increased at 165°C with a 15°C/min rate. held for 1 min and then to 225°C at 2°C/min and finally held at 225°C. FAMEs and DMAs were identified by comparison with commercial and synthetic standards. The data were processed using the EZChrom Elite software (Agilent Technologies. France) and reported as a percentage of total FAMEs and DMAs. Plasmalogen levels were calculated as 2 x (% of total DMAs) as previously described by Acar and collaborators (Acar et al., 2007).

Gene expression

Retinas were isolated from the eyeballs and pooled for one animal before being snap-frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C. Total RNAs were isolated using the NucleoSpin RNA/Protein kit (Macherey-Nagel, France) and the corresponding cDNAs were synthesized using the PrimeScript RT Reagent Kit (Takara, Japan) according to the manufacturer's instructions. The quantity and the quality of RNAs were evaluated on a nanodrop spectrophotometer (ND1000. ThermoFisher, France).

The primers used to quantify the expression of genes involved in angiogenesis, glial activation, extracellular matrix remodeling and retinal inflammation as well as the endogenous controls are presented in Table 3. Quantitative real-time PCR (qPCR) was performed using 10ng of total RNA in 10 µl of Syber Master Mix (Biorad). QPCR was performed on 384-well plates (Applied Biosystems. Life Technologies). using the ViiA™ 7 Real-Time PCR System equipped with the QuantStudio 12k Flex software (Applied Biosystems. Life Technologies). Genes encoding for *Hprt* and *Gapdh* were used as

endogenous controls for normalization and relative quantification (RQ) with the Cycle Threshold (CT)-method.

Table 3 – List of mouse primers

Gene	Accession #	Forward sequence (5'-3')	Reverse sequence (5'-3')
Gfap	**NM_001131020.1**	ATGATCCTGGGTGCGTGATG	CACCAGTGAAAGACCTGGGA
Aif1	**NM_001361501.1**	GTCCTTGAAGCGAATGCTGG	CATTCTCAAGATGGCAGATC
Hif1a	**NM_001313919.1**	TCATCAGTTGCCACTTCCCCAC	CCGTCATCTGTTAGCACCATCAC
Vegfa	**NM_001025250.3**	CACGACAGAAGGAGAGCAGAAGT	TTCGCTGGTAGACATCCATGAA
Angpt1	**NM_001286062.1**	CGCCGAAATCCAGAAAACGG	AGGTAAACACAAATGCCCCCT
Angpt2	**NM_007426.4**	TCTCTTTGCTCGGTGTGGAC	TGAGAGCTGTTTCTAGTGTCTTTCT
Fn1	**NM_001276408.1**	CTGAACCAGCCTACAGATGAC	CATTTTCTCCCTGCCGATCC
Mmp2	**NM_008610.3**	GGTAGATGTCTCCTCCCTGGT	TGCCTGCTACTGACGTGATG
Mmp9	**NM_013599.4**	CCTCACCTGGCCCCACAAG	CTGCAGGAGGTCGTAGGTC
Tnfa	**NM_001278601.1**	AGGCACTCCCCCAAAAGATG	ATCCCATGCCTAACTGCCCT
Il1b	**NM_008361.4**	TGGACCTTCCAGGATGAGGACA	GTTCATCTCGGAGCCTGTAGTG
Il6	**NM_001314054.1**	ATCCAGTTGCCTTCTTGGGACTGA	TAAGCCTCCGACTTGTGAAGTGGT
Il17a	**NM_010552.3**	GCCCCAAAGAGAAAAGCCAC	CCTTACCTCCACCCCTAGTGA
Il23a	**NM_031252.2**	TCAAAGGGGAGCCTGCTCTA	CACAGGACACAGTCAGAAAGGA
Hprt	**NM_013556.2**	CAAACTTTGCTTTCCCTGGT	CAAGGGCATATCCAACAACA
Gapdh	**NM_001289726.1**	TGACGTGCCGCCTGGAGAAA	AGTGTAGCCCAAGATGCCCTTCAG

Immunohistochemistry (IHC)

Pups were euthanized by decapitation at post-natal day 21 (PN21). The eyeballs were isolated and fixed in 4% paraformaldehyde. They were then processed for flatmounts as following. The corneas were incised, the lenses taken out, and four radial cuts were made on the eyecups. Vitreous bodies were removed with forceps and retinas were delicately isolated and flattened on microscope slides. Flat-mounted retinas were stained to visualize endothelial cells and astrocytes. Briefly, retinas (n = 3-4) were incubated in a blocking solution for 1h (5% BSA. 2% Triton. 0.5% Tween. pH 6.8), and then incubated overnight with primary antibodies solution. Primary antibodies solution consisted in polyclonal goat anti-collagen IV (1:500. ref 134001. Biorad) for endothelial cell labelling and

polyclonal rabbit anti-mouse GFAP (1:500. ref Z0334. Dako. Denmark) for astrocytes labeling. The retinas were then washed in PBS and incubated in a secondary antibodies solution for 1h at room temperature. Secondary antibodies were Alexa 488-labelled donkey anti-rabbit (1:200. Invitrogen A-21206) and Alexa 594-labelled donkey anti-goat (1:200. Invitrogen A-11058). Following the labelling steps, the retinas were rinsed in PBS and coverslipped using a fluorescence-mounting medium (Dako). Controls for these experiments consisted of secondary antibodies labeling. Confocal fluorescent microphotographs were taken on an inverted confocal microscope (TCS SP8. Leica Microsystemes. France) and processed with the Leica LCSlite software.

Statistical analyses

Data was processed using GraphPad Prism v6.05 (GraphPad software. USA). For gene expression, comparisons between two groups were performed using a non-parametric Mann-Whitney test. A p value lower than 0.05 was considered as statistically significant and noted by one star (*). Two and three stars were used for p values lower than 0.01 and 0.001, respectively.

Results

Nutritional supplementation

The analysis of retinal lipids in mice pups at PN21 first confirmed the lack of plasmalogens in the plasmalogen-deficient mice ($DAPAT^{-/-}$) (Figure 1A). Second, it revealed that supplementing mothers' diet with the AKG-enriched shark liver oil was able to induce a small but not significant increase in the plasmalogen content of the retina (1.03 ± 0.77% *versus* 6.28 ± 0.28% for $DAPAT^{+/+}$ wild-type animals) (Figure 1A). Interestingly, plasmalogen deficiency was also associated with a significant increase of the n-6/n-3 ratio of the retina at PN21 (2.28 ± 0.13% *versus* 0.92 ± 0.09% in $DAPAT^{-/-}$ and $DAPAT^{+/+}$ mice, respectively; $p < 0.01$) (Figure 1B). Shark liver oil-supplemented diet could not restore this ratio despite a a 30%-decrease (1.61 ± 0.57% *versus* 2.28 ± 0.13% in AKG-supplemented $DAPAT^{-/-}$ and non-supplemented $DAPAT^{-/-}$ mice, respectively; $p = 0.1$). Accordingly, shark liver oil-supplemented mice still exhibited a n-6/n-3 ratio that was significantly higher compared to control mice (1.61 ± 0.57% *versus* 0.92 ± 0.09% in AKG-supplemented $DAPAT^{-/-}$ and $DAPAT^{+/+}$ mice, respectively; $p < 0.01$).

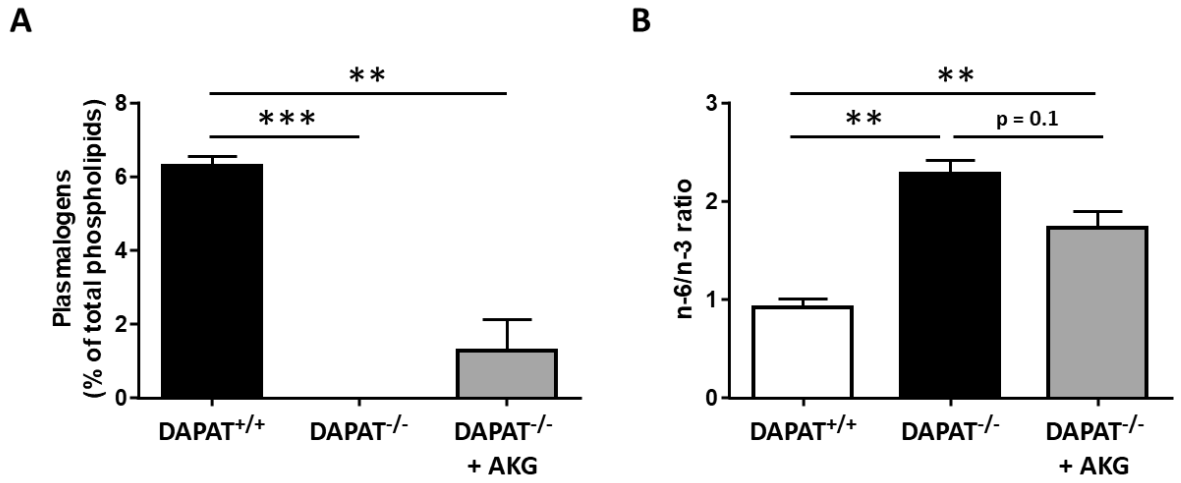

Figure 1: Impact of maternal alkylglycerol-supplemented diet on the plasmalogens and n-6/n-3 profiles in mice pups' retinas after 21 days. A: Relative quantification of plasmalogens in the retina of mice pups at post-natal day 21 (PN21) by GC-FID reveals a slight increase of the plasmalogens content in plasmalogen-deficient mice (DAPAT$^{-/-}$). **B:** Plasmalogen deficiency is associated with a significant increase of the n-6/n-3 ratios in the retina. Alkylglycerol-enriched diet was not able to lower this ratio at PN21. Data are presented as mean ± SEM. Mann & Whitney test. n=4-8. * $p < 0.05$

Impact of dietary AKG on the vascular development of the retina

Flat-mounted retinas were used to confirm the extent of vascular abnormalities in DAPAT$^{-/-}$ mice and to assess the impact of maternal AKG supplementation on retinal vessel architecture as well as on the astrocytic network morphology of pups. First, flat-mounted retinas at PN7 displayed a significant delayed vascular outgrowth in DAPAT$^{-/-}$ mice (-20%) (Figure 2A). Then, flat-mounted retinas from PN21 DAPAT$^{-/-}$ (Figure 2C) mice exhibited a several abnormalities compared to control mice (DAPAT$^{+/+}$) (Figure 2B), especially in astrocytes networks that displayed lower density and less organized networks. They also seemed to be less sharpened and to have a more fibrous aspect than astrocytes from DAPAT$^{+/+}$ mice. Supplementing maternal diets with AKG did not seem to restore astrocytic networks morphology at PN21 (Figure 2D).

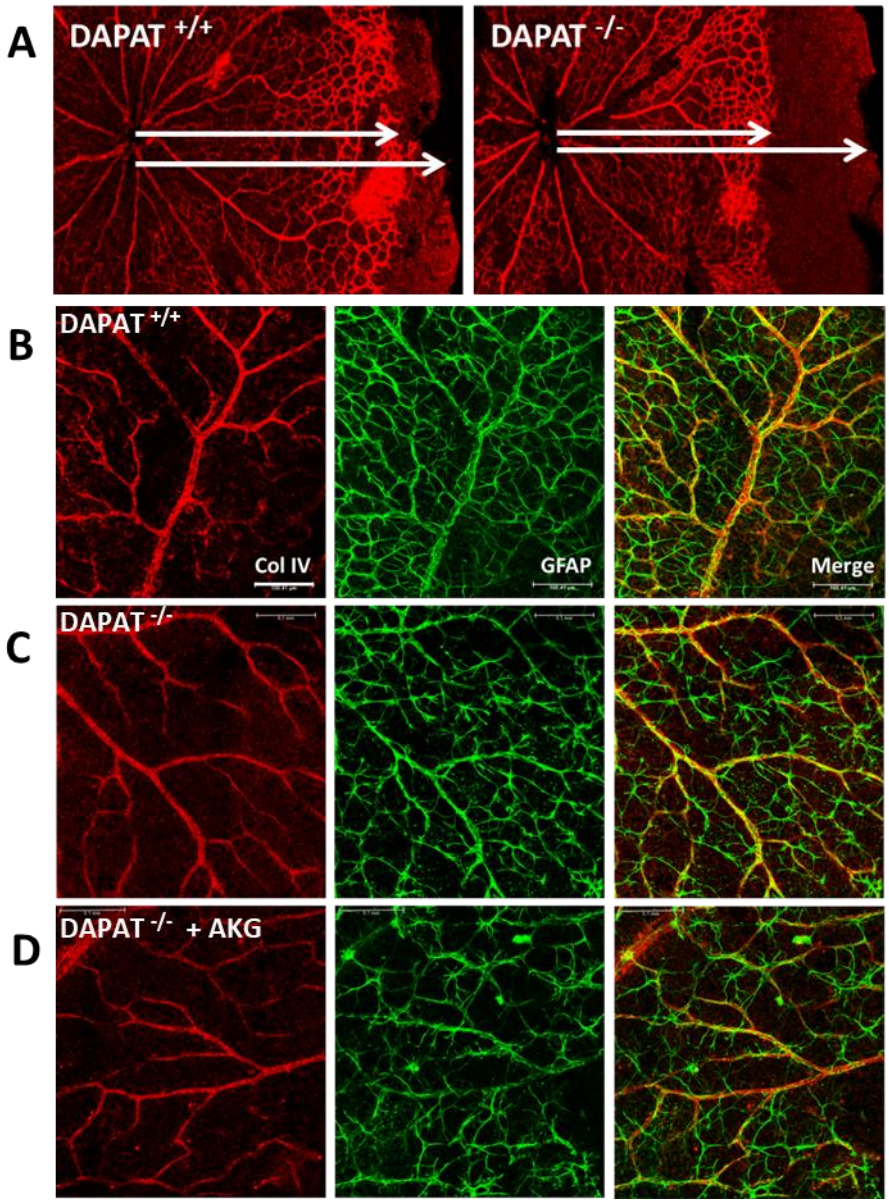

Figure 2: Immunohistochemical labeling of retinal vasculature (red) and astrocytes (green) reveals several alterations of the vascular development of the retina. A: Retinas from plasmalogen-deficient mice (DAPAT$^{-/-}$) exhibit a delay in vascular outgrowth at PN7. **B-D:** plasmalogen deficiency was associated to minor vascular abnormalities at PN21 (C), while astrocytes displayed alterations of cell and networks morphology, the latter being less dense and organized compared to DAPAT$^{+/+}$ mice (B). AKG-supplementation did not seemrestore the physiological phenotype as observed in control mice (DAPAT$^{+/+}$) (D). n = 2-4 retinas per group. Scale bars = 100µm.

Impact of dietary AKG on glial cell activation

RT-qPCR analyses revealed several alterations in the expression of genes involved in the activation of retinal glial cells (astrocytes, Müller cells and microglia). At PN7, *Gfap* did not seem to be affected by plasmalogen deficiency despite a trend toward its increase in the AKG-supplemented group (grey bars, p = 0.06) (Figure 3). However, microglial cells exhibited a small but significant overexpression of

the gene coding for Iba1, the microglial cells-marker (*Aif1*). At PN14, neither *Gfap* nor *Aif1* genes exhibited significant dysregulations. However, *Gfap* expression was significantly increased by 3 at PN21 ($p < 0.05$), while *Aif1* only exhibited a trend toward a 15%-overexpression ($p = 0.05$). AKG-enriched maternal diet was not able to prevent the abnormal expression of genes regulating glial activation in DAPAT$^{-/-}$ mice.

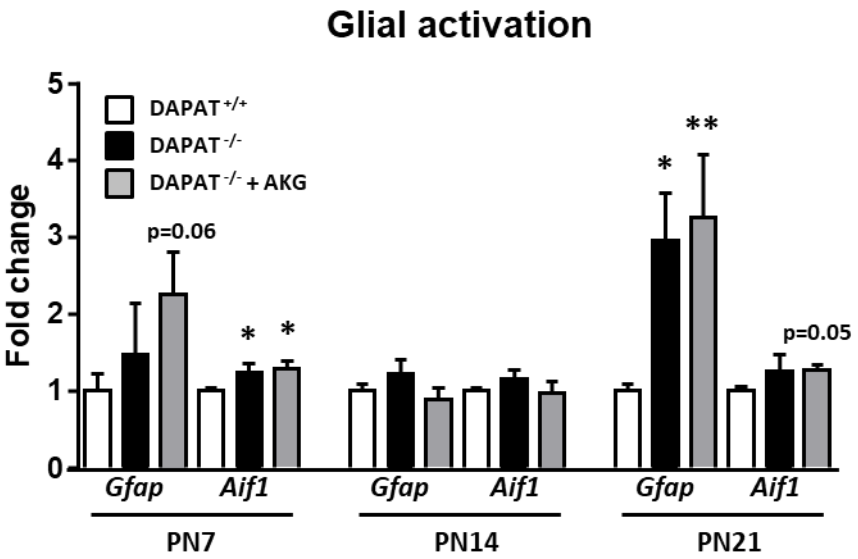

Figure 3: Expression of genes regulating glial cell activation at PN7, PN14 and PN21 in the retina of DAPAT$^{+/+}$ and DAPAT$^{-/-}$ supplemented or not with AKG. RT-qPCR analysis of genes encoding for the macroglial cells marker GFAP (*Gfap*) as well as the microglial cells marker Iba1 (*Aif1*). Gene expression is expressed as relative quantification against DAPAT$^{+/+}$ mice. Results are presented as mean ± SEM. Mann & Whitney test. n=4-8. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

Impact of AKG supplementation on the expression of factors regulating angiogenesis.

RT-qPCR analysis of genes regulating retinal angiogenesis exhibited several alterations. At PN7 and PN14, *Angpt1* was the only gene that was overexpressed in DAPAT$^{-/-}$ mice ($p < 0.05$) (Figure 4). AKG supplementation seemed to inhibit this overexpression as there was no more significant change in *Angpt1* expression in the supplemented group (DAPAT$^{-/-}$ + AKG) when compared to controls. At PN21, both *Hif1a* and *Vegfa* gene expression exhibited a significant increase ($p < 0.05$). Supplementing maternal diets with alkylglycerol-rich shark liver oil seemed to inhibit the overexpression of *Hif1a* in DAPAT$^{-/-}$ mice, but without reaching the level of statistical significance for *Vegfa*. Furthermore, despite trends at PN7, PN14 and PN21, *Angpt2* expression was not altered neither by plasmalogen deficiency nor by maternal supplementation (Figure 4).

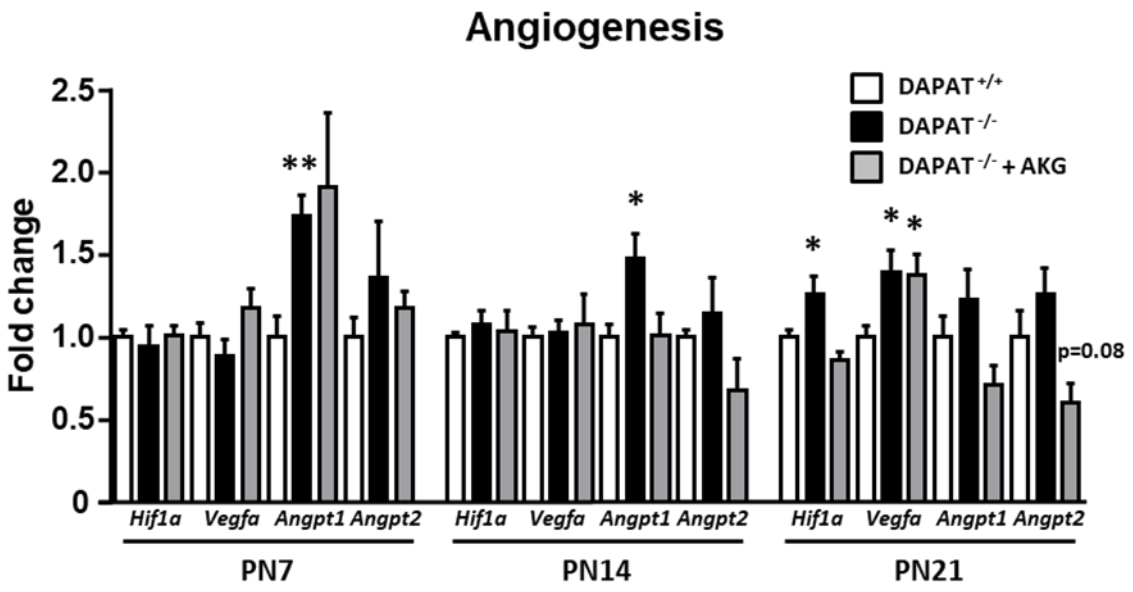

Figure 4: Expression of genes involved in angiogenesis in the mouse retina at PN7, PN14 and PN21 in the retina of DAPAT$^{+/+}$ and DAPAT$^{-/-}$ supplemented or not with AKG. RT-qPCR analysis of genes encoding for the angiogenesis mediators HIF-1α (*Hif1a*), VEGF (*Vegfa*), Angiopoietin 1 and 2 (*Angpt1* and *Angpt2*). Genes are expressed as relative quantification against DAPAT$^{+/+}$ mice. Results are presented as mean ± SEM. Mann & Whitney test. n=4-8. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

Impact of maternal supplementation of retinal expression of genes involved in extracellular matrix remodeling.

Analysis of genes regulating proteins involved in the extracellular matrix exhibited significant alterations throughout the development of the retina. At PN7, both genes encoding for Matrix Metalloproteinases *(Mmp2* and *Mmp9*) exhibited a trend toward a downregulation in plasmalogen-deficient mice ($p = 0.1$ and $p = 0.07$, respectively) (Figure 5). However, *Fn1*, the gene encoding for Fibronectin, exhibited no alteration. At PN14, no impact of plasmalogen deficiency was observed for *Mmp2* expression, while *Mmp9* expression was significantly decreased in the DAPAT$^{-/-}$ and DAPAT$^{-/-}$ + AKG groups ($p < 0.01$). On the other hand, *Fn1* exhibited a trend toward its overexpression in DAPAT$^{-/-}$ mice ($p = 0.06$). At PN21, plasmalogen deficiency had no impact on *Mmp2* expression, while Mmp9 expression was significantly decreased in the DAPAT$^{-/-}$ + AKG group ($p < 0.01$). Fn1 exhibited a significant overexpression ($p < 0.01$) that was not affected by the AKG-enriched maternal diet.

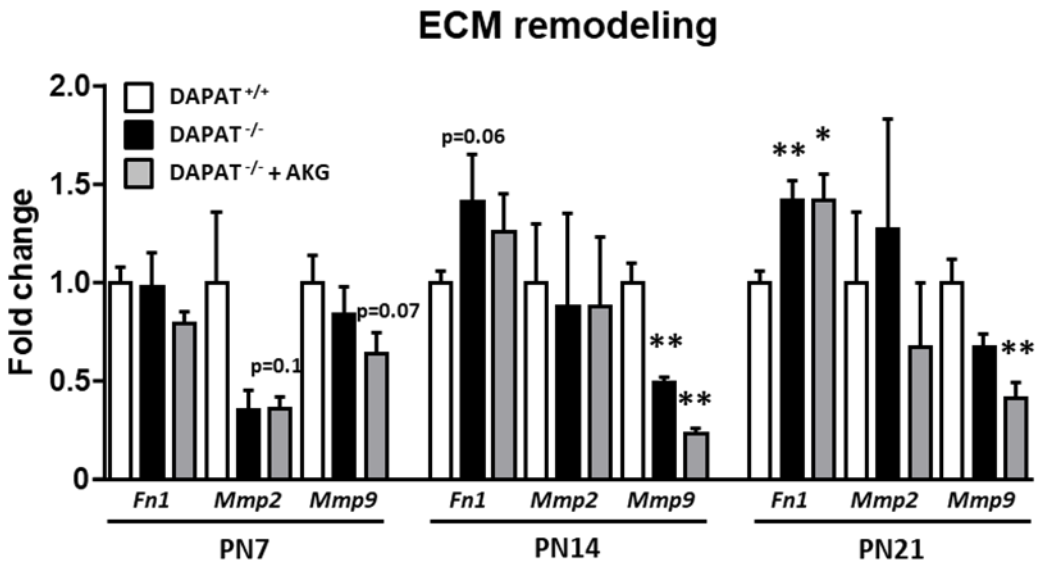

Figure 5: Expression of genes involved in the remodeling of the extracellular matrix (ECM) of the mouse retina at PN7, PN14 and PN21 in the retina of DAPAT$^{+/+}$ and DAPAT$^{-/-}$ supplemented or not with AKG. RT-qPCR analysis of genes encoding for the Matrix Metalloproteinases 2 and 9 (*Mmp2* and *Mmp9*, respectively), as well as the astrocytic-expressed protein Fibronectin (*Fn1*), revealed significant alterations in plasmalogen-deficient mice (DAPAT$^{-/-}$). Genes are expressed as relative quantification against DAPAT$^{+/+}$ mice. Results are presented as mean ± SEM. Mann & Whitney test. n=4-8. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

Effects of maternal supplementation with AKG on retinal expression of cytokines in pups

The retinal profile of genes regulating the expression of pro-inflammatory cytokines involved in pathological angiogenesis of the retina was assessed by RT-qPCR. No significant alteration was observed at PN7, while *Il1b* expression was significantly decreased in the DAPAT$^{-/-}$ + AKG group ($p < 0.05$) (Figure 6). However, *Il1b* exhibited a significant overexpression in plasmalogen-deficient mice at PN21 ($p < 0.05$) that was prevented by AKG supplementation, while Il6 only exhibited a trend toward an increased expression ($p = 0.09$). *Tnfa*, *Il17a* and *Il23a* remained unaffected by plasmalogen deficiency.

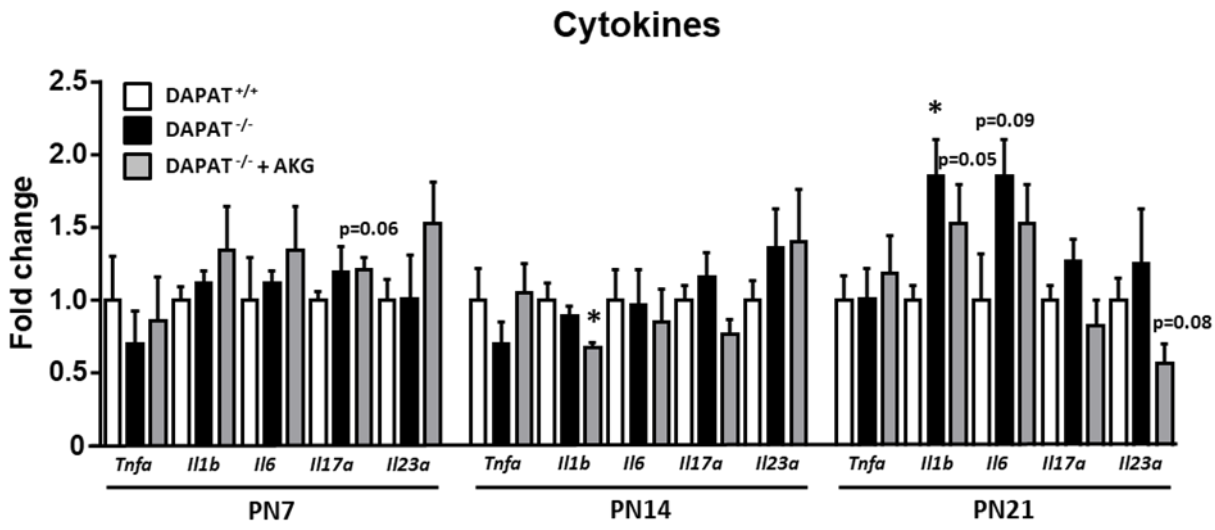

Figure 6: Relative quantification of genes involved in the expression of the pro-inflammatory cytokines involved in pathological angiogenesis of the retina at PN7, PN14 and PN21 in the retina of DAPAT$^{+/+}$ and DAPAT$^{-/-}$ supplemented or not with AKG. RT-qPCR analysis of genes encoding for Tumor Necrosis Factor alpha (Tnfa), as well as the Interleukines-1β, -6, -17 and -23 (*Il1b, Il6, Il17a, Il23a*, respectively). Genes are expressed as relative quantification against DAPAT$^{+/+}$ mice. Results are presented as mean ± SEM. Mann & Whitney test. n=4-8. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

Discussion

Previous studies including those from our team described several eye defects in the mouse model of plasmalogen-deficiency (DAPAT$^{-/-}$ mice). These defects consist in microphthalmia, optic nerve hypoplasia, cataract, persistence of hyaloid vessels in adult life, and abnormalities in the vascular architecture of the retina (Rodemer et al., 2003; Brites et al., 2011; Saab et al., 2014a). Alteration of retinal vasculature is a hallmark of several retinopathies that can lead to visual impairments or even vision loss if no treatment is applied. Interestingly, the retinal vascular abnormalities of the DAPAT$^{-/-}$ mice take place in two-phase manner that is somehow similar to what is observed in retinopathy of prematurity (ROP).Previous studies showed that supplementing mouse diets with the plasmalogen precursor AKG can restore, at least partially, tissue levels of plasmalogens and prevent some of the ocular phenotypa associated to plasmalogen deficiency (Das et al., 1992; Brites et al., 2011). Therefore, we decided to check whether maternal supplementation with AKG would be prevent the retinal vascular abnormalities of DAPAT$^{-/-}$ pups of mice. Accordingly, we looked for a nutritional

source of AKG. Shark liver turned out to be the most potent source of AKG since it can contain more than 30% of AKG depending on the manufacturer. Using shark liver oil containing 60% of AKG, we were able to design a balanced diet that contains 2% of alkylglycerols, for which efficiency was previously proven (Brites et al., 2011). Our results suggest that such a diet is able to increase tissue concentrations of plasmalogens, confirming the uptake of AKG through maternal lactation (Das et al., 1992). However, the increase in retinal plasmalogen concentrations was low and inconsistent regarding physiological concentrations of plasmalogens in this tissue. Brites and collaborators (Brites et al., 2011) showed that an 8-week period is necessary to reach plasmalogen levels that match controls, which looks relevant regarding to our findings. On the other hand, our results also showed that some pups were not able to increase their plasmalogen levels at all. Thiscould be the result of a competition between pups to get maternal milk, as well as the low ability of AKG to cross the blood-retinal barrier. Besides, plasmalogen-deficiency was also associated with a significant increase of the retinal n-6/n-3 ratio. As plasmalogens are a biological reservoir for PUFAs, including that of the n-3 series, such an alteration is not surprising. Besides, considering the anti-angiogenic properties of the n-3 docosahexaenoic acid (DHA) compared to the pro-angiogenic properties of the n-6 arachidonic acid (AA) (Connor et al., 2007), such a finding looks consistent with an abnormal retinal vascular development. Interestingly, the supplementation of maternal diet with AKG was able to partly restore a physiologic n-6/n-3 ratio, suggesting that an incomplete restoration of retinal plasmalogen levels could improve retinal PUFAs content.

In order to have a better understanding of the mechanisms underlying the onset of the vascular alterations in plasmalogen-deficient mouse retina, we decided to further investigate the expression of genes involved in glial cells activation, angiogenesis, extracellular matrix remodeling and inflammation. Our results show that plasmalogen deficiency is associated with the activation of macroglial cells (astrocytes, Müller cells) through the expression of *Gfap* and with the activation of microglial cells through the overexpression of *Aif1*. Considering that both macroglial and microglial cells are potent mediators of retinal inflammatory and pro-angiogenic mechanisms, this data looks consistent with the literature (Langmann, 2007; Kumar et al., 2013; Abcouwer, 2017). HIF-1α is the biggest actor of hypoxia-related conditions (Semenza, 2007). Previous studies suggested an hypoxic retina in the DAPAT$^{-/-}$ mouse (Saab et al., 2014a), so the overexpression of *Hif1a* at PN21 looks consistent with such findings. However, considering that the neovascular steps are assumed to take place earlier than PN21, one could expect to observe a retinal hypoxia between PN7 and PN14 that would in turn induce the corresponding proangiogenic mechanisms, particularly those involving the VEGF (Ozaki et al., 1999; Zimna and Kurpisz, 2015; Rattner et al., 2019). As *Vegfa* did not exhibit any

modification in its expression before PN21, our data suggest that the angiogenic activity only starts somewhere between PN14 and PN21. However, as HIF-1α protein is regulated by post-translational mechanisms, experiments measuring HIF-1α protein levels or *in vivo* measurements as done previously (Saab et al., 2014) are required to confirm the suspected hypoxic status of the developing retina in plasmalogen-deficient mice. Genes encoding for the angiopoietins also displayed several alterations in the DAPAT$^{-/-}$ mouse. While Angpt1 protein is a critical actor involved in vessel maturation since it mediates migration, adhesion and survival of endothelial cells, Angpt2 protein is known to disrupt the connections between the endothelium and perivascular cells, thus promoting cell death and vascular regression (Fagiani and Christofori, 2013). Accordingly, it was surprising to observe an overexpression of *Angpt1* at PN7 as this stage is considered as a vaso-obliteration step in the plasmalogen-deficient mouse (Saab et al., 2014a; Saab 2014).

As previously described, plasmalogen-deficiency was associated with the overexpression of *Fn1* encoding Fibronectin (Saab et al., 2014a). Fibronectin is an extracellular glycoprotein that binds with several other extracellular matrix proteins such as collagen. It is known to promote endothelial cell proliferation and vessel formation in the retina (Jiang et al., 1994; Wilson et al., 2003; Stenzel et al., 2011). Its expression relies on astrocytes (Liesi et al., 1986; Stenzel et al., 2011), and it was found to be over-expressed in retinal capillaries of patients with proliferative diabetic retinopathy (Roy et al., 1996). Thus, this result looks consistent with these previous studies. On the other hand, genes encoding for the matrix metalloproteinases 2 and 9 (*Mmp2* and *Mmp9*, respectively) only displayed small modifications. Considering their involvement in the breakdown of the extracellular matrix that further facilitates neovascularization processes and their association with proliferative retinopathies (Noda et al., 2003; Giebel et al., 2005; Kowluru et al., 2012), it is surprising to observe a general trend toward their downregulation. On the other hand, a work of Eastlake and collaborators showed that Müller cell gliosis during proliferative vitreoretinopathy was associated with Mmp9 downregulation (Eastlake et al. 2016), suggesting a more complex regulation MMPs-encoding genes. Furthermore, studies conducted on knock-out models of MMP9 resulted in delayed vascularization (Vu et al., 1998). Considering that the retinal vasculature of plasmalogen-deficient mice displays delays in its outgrowth, a reduced expression of MMP genes actually makes sense. However, as MMPs are secreted as inactive proproteins, which requires them to be cleaved by extracellular proteinases to get to their active form (Nagase et al., 2006), quantification of protein levels would be of great help to conclude on the impact of plasmalogen deficiency on the roles of MMPs in retinal abnormalities of the DAPAT$^{-/-}$ mouse.

Cytokines related to retinal inflammation exhibited little to no change in the plasmalogen-deficient mice. Despite a few trends, only *Il1b* gene displayed a significant increase at PN21. Microglial cells are known to express the IL-1β protein upon their activation and subsequently induce the activation of macroglial cells (Langmann, 2007; Natoli et al., 2017). As both *Gfap* and *Aif1* genes are upregulated at PN21, we can hypothesize that microglial cells activation is responsible for the induction of retinal inflammation that is further propagated by Müller cells. However, the mechanisms triggering these alterations remain to be determined.

While AKG-enriched diet inhibited some of the alterations associated with plasmalogen deficiency, our results suggest that a diet containing 2% of the plasmalogen precursor AKG is not sufficient to completely restore abnormalities of the vascular development of the retina at PN21. Increasing the concentration and/or the duration of the supplementation might help to better prevent these abnormalities. Besides, the inconsistency of plasmalogen status increase between mice pups could explain the wide variability that we observed for the expression of some of the genes studied.

References

Abcouwer, S.F., 2017. Muller Cell-Microglia Cross Talk Drives Neuroinflammation in Diabetic Retinopathy. Diabetes 66, 261-263.

Acar, N., Gregoire, S., Andre, A., Juaneda, P., Joffre, C., Bron, A.M., Creuzot-Garcher, C.P., Bretillon, L., 2007. Plasmalogens in the retina: in situ hybridization of dihydroxyacetone phosphate acyltransferase (DHAP-AT)--the first enzyme involved in their biosynthesis--and comparative study of retinal and retinal pigment epithelial lipid composition. Experimental eye research 84, 143-151.

Braverman, N.E., Moser, A.B., 2012. Functions of plasmalogen lipids in health and disease. Biochimica et biophysica acta 1822, 1442-1452.

Bringmann, A., Pannicke, T., Grosche, J., Francke, M., Wiedemann, P., Skatchkov, S.N., Osborne, N.N., Reichenbach, A., 2006. Muller cells in the healthy and diseased retina. Progress in retinal and eye research 25, 397-424.

Brites, P., Ferreira, A.S., da Silva, T.F., Sousa, V.F., Malheiro, A.R., Duran, M., Waterham, H.R., Baes, M., Wanders, R.J., 2011. Alkyl-glycerol rescues plasmalogen levels and pathology of ether-phospholipid deficient mice. PloS one 6, e28539.

Connor, K.M., SanGiovanni, J.P., Lofqvist, C., Aderman, C.M., Chen, J., Higuchi, A., Hong, S., Pravda, E.A., Majchrzak, S., Carper, D., Hellstrom, A., Kang, J.X., Chew, E.Y., Salem, N., Jr., Serhan, C.N., Smith, L.E.H., 2007. Increased dietary intake of omega-3-polyunsaturated fatty acids reduces pathological retinal angiogenesis. Nature medicine 13, 868-873.

Das, A.K., Holmes, R.D., Wilson, G.N., Hajra, A.K., 1992. Dietary ether lipid incorporation into tissue plasmalogens of humans and rodents. Lipids 27, 401-405.

Eastlake, K., Banerjee, P.J., Angbohang, A., Charteris, D.G., Khaw, P.T., Limb, G.A., 2016. Muller glia as an important source of cytokines and inflammatory factors present in the gliotic retina during proliferative vitreoretinopathy. Glia 64, 495-506.

Fagiani, E., Christofori, G., 2013. Angiopoietins in angiogenesis. Cancer letters 328, 18-26.

Folch, J., Lees, M., Sloane Stanley, G.H., 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. The Journal of biological chemistry 226, 497-509.

Gambert, S., Gabrielle, P.H., Masson, E., Leger-Charnay, E., Ferrerro, A., Vannier, A., Gendrault, C., Lachot, M., Creuzot-Garcher, C., Bron, A., Gregoire, S., Leclere, L., Martine, L., Lucchi, G., Truntzer, C., Pecqueur, D., Bretillon, L., 2017. Cholesterol metabolism and glaucoma: Modulation of Muller cell membrane organization by 24S-hydroxycholesterol. Chemistry and physics of lipids 207, 179-191.

Giebel, S.J., Menicucci, G., McGuire, P.G., Das, A., 2005. Matrix metalloproteinases in early diabetic retinopathy and their role in alteration of the blood-retinal barrier. Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology 85, 597-607.

Jiang, B., Liou, G.I., Behzadian, M.A., Caldwell, R.B., 1994. Astrocytes modulate retinal vasculogenesis: effects on fibronectin expression. Journal of cell science 107 (Pt 9), 2499-2508.

Kowluru, R.A., Zhong, Q., Santos, J.M., 2012. Matrix metalloproteinases in diabetic retinopathy: potential role of MMP-9. Expert opinion on investigational drugs 21, 797-805.

Kumar, A., Pandey, R.K., Miller, L.J., Singh, P.K., Kanwar, M., 2013. Muller glia in retinal innate immunity: a perspective on their roles in endophthalmitis. Critical reviews in immunology 33, 119-135.

Langmann, T., 2007. Microglia activation in retinal degeneration. Journal of leukocyte biology 81, 1345-1351.

Leger-Charnay, E., Masson, E.A.Y., Morala, T., Martine, L., Buteau, B., Leclere, L., Bretillon, L., Gambert, S., 2019. Is 24(S)-hydroxycholesterol a potent modulator of cholesterol metabolism in Muller cells? An in vitro study about neuron to glia communication in the retina. Experimental eye research 189, 107857.

Liesi, P., Kirkwood, T., Vaheri, A., 1986. Fibronectin is expressed by astrocytes cultured from embryonic and early postnatal rat brain. Experimental cell research 163, 175-185.

Morrison, W.R., Smith, L.M., 1964. Preparation of Fatty Acid Methyl Esters and Dimethylacetals from Lipids with Boron Fluoride--Methanol. Journal of lipid research 5, 600-608.

Nagan, N., Zoeller, R.A., 2001. Plasmalogens: biosynthesis and functions. Progress in lipid research 40, 199-229.

Nagase, H., Visse, R., Murphy, G., 2006. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. Cardiovascular research 69, 562-573.

Natoli, R., Fernando, N., Madigan, M., Chu-Tan, J.A., Valter, K., Provis, J., Rutar, M., 2017. Microglia-derived IL-1beta promotes chemokine expression by Muller cells and RPE in focal retinal degeneration. Molecular neurodegeneration 12, 31.

Noda, K., Ishida, S., Inoue, M., Obata, K., Oguchi, Y., Okada, Y., Ikeda, E., 2003. Production and activation of matrix metalloproteinase-2 in proliferative diabetic retinopathy. Investigative ophthalmology & visual science 44, 2163-2170.

Ozaki, H., Yu, A.Y., Della, N., Ozaki, K., Luna, J.D., Yamada, H., Hackett, S.F., Okamoto, N., Zack, D.J., Semenza, G.L., Campochiaro, P.A., 1999. Hypoxia inducible factor-1alpha is increased in ischemic retina: temporal and spatial correlation with VEGF expression. Investigative ophthalmology & visual science 40, 182-189.

Rattner, A., Williams, J., Nathans, J., 2019. Roles of HIFs and VEGF in angiogenesis in the retina and brain. The Journal of clinical investigation 129, 3807-3820.

Rodemer, C., Thai, T.P., Brugger, B., Kaercher, T., Werner, H., Nave, K.A., Wieland, F., Gorgas, K., Just, W.W., 2003. Inactivation of ether lipid biosynthesis causes male infertility, defects in eye development and optic nerve hypoplasia in mice. Human molecular genetics 12, 1881-1895.

Roy, S., Cagliero, E., Lorenzi, M., 1996. Fibronectin overexpression in retinal microvessels of patients with diabetes. Investigative ophthalmology & visual science 37, 258-266.

Saab, S., Buteau, B., Leclere, L., Bron, A.M., Creuzot-Garcher, C.P., Bretillon, L., Acar, N., 2014a. Involvement of plasmalogens in post-natal retinal vascular development. PloS one 9, e101076.

Saab, S., Mazzocco, J., Creuzot-Garcher, C.P., Bron, A.M., Bretillon, L., Acar, N., 2014b. Plasmalogens in the retina: from occurrence in retinal cell membranes to potential involvement in pathophysiology of retinal diseases. Biochimie 107 Pt A, 58-65.

Semenza, G.L., 2007. Hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) pathway. Science's STKE : signal transduction knowledge environment 2007, cm8.

Stenzel, D., Lundkvist, A., Sauvaget, D., Busse, M., Graupera, M., van der Flier, A., Wijelath, E.S., Murray, J., Sobel, M., Costell, M., Takahashi, S., Fassler, R., Yamaguchi, Y., Gutmann, D.H., Hynes, R.O., Gerhardt, H., 2011. Integrin-dependent and -independent functions of astrocytic fibronectin in retinal angiogenesis. Development 138, 4451-4463.

Vecino, E., Rodriguez, F.D., Ruzafa, N., Pereiro, X., Sharma, S.C., 2016. Glia-neuron interactions in the mammalian retina. Progress in retinal and eye research 51, 1-40.

Vu, T.H., Shipley, J.M., Bergers, G., Berger, J.E., Helms, J.A., Hanahan, D., Shapiro, S.D., Senior, R.M., Werb, Z., 1998. MMP-9/gelatinase B is a key regulator of growth plate angiogenesis and apoptosis of hypertrophic chondrocytes. Cell 93, 411-422.

Wilson, S.H., Ljubimov, A.V., Morla, A.O., Caballero, S., Shaw, L.C., Spoerri, P.E., Tarnuzzer, R.W., Grant, M.B., 2003. Fibronectin fragments promote human retinal endothelial cell adhesion and proliferation and ERK activation through alpha5beta1 integrin and PI 3-kinase. Investigative ophthalmology & visual science 44, 1704-1715.

Zimna, A., Kurpisz, M., 2015. Hypoxia-Inducible Factor-1 in Physiological and Pathophysiological Angiogenesis: Applications and Therapies. BioMed research international 2015, 549412.

Résultats complémentaires et conclusion

A travers cette étude, nous avons pu montrer que la déficience en plasmalogènes altère de nombreux facteurs régulant la physiologie rétinienne, notamment l'expression de gènes impliqués dans l'activation des cellules gliales, dans l'angiogenèse, le remodelage de la matrice extracellulaire et l'inflammation. Bien que nécessitant de plus amples investigations, notamment mécanistiques, afin de comprendre avec plus de précision les mécanismes précis reliant le métabolisme des plasmalogènes et la mise en place des anomalies du développement vasculaire rétinien, cette étude apporte toutefois de nouveaux éléments sur lesquels s'appuyer. Ainsi, nous avons par exemple voulu enquêter sur la relation entre plasmalogènes, cytokines pro-inflammatoires et sécrétion de facteurs angiogéniques par la cellule de Müller. En effet, les données obtenues notamment à PN21 montrent une surexpression des gènes codants pour l'interleukine-1β (*Il1b*) et pour le VEGF (*Vegfa*) chez les souris DAPAT$^{-/-}$. Les études à notre disposition suggèrent que dans la rétine, les cellules microgliales sécrètent de l'IL-1β en cas de condition inflammatoire, et que cette dernière est justement capable d'induire l'expression du VEGF et de l'interleukine-6 (IL6) par les cellules de Müller (Hitakura et al., 2005 ; Liu et al., *2015*). En conséquence, nous avons utilisé le même modèle de déplétion partielle en plasmalogène de cultures primaires de cellules de Müller que celui décrit dans le chapitre 2. Nous avons stimulé les cellules de Müller avec de l'IL-1β (10ng/mL) afin d'étudier l'impact de la déplétion en plasmalogènes sur l'expression des gènes codant pour le VEGF et l'IL-6 dans les 24h suivantes au moyen d'un suivi cinétique. De façon surprenante, les résultats préliminaires n'indiquaient aucune différence dans l'expression de *Vegfa* (Figure 44A) ni d'*Il6* (Figure 44B) dans les cellules de Müller déplétées en plasmalogènes. Toutefois, les cellules de Müller transfectées par siDHAPAT ne subissant qu'une réduction d'environ 50% de leur contenu en plasmalogènes, il n'est pas à exclure que des cellules déficientes montrent une réponse différente.

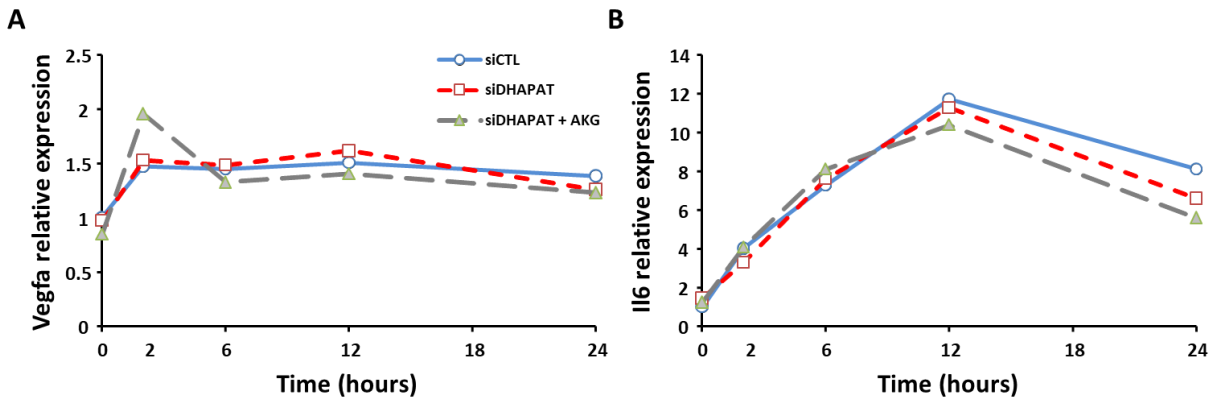

Figure 44 : Impact de la déplétion en plasmalogène des cellules de Müller sur l'expression de gènes impliqués dans les mécanismes de l'angiogenèse pathologique suite à un stimulus pro-inflammatoire induit par l'IL-1β (10ng/mL). A : l'exposition des cellules de Müller à l'IL-1β induit une surexpression du *Vegfa*, qui n'est pas altérée par la déplétion en plasmalogènes. **B :** l'exposition des cellules de Müller à l'IL-1β induit une surexpression d'*Il6*, qui n'est pas altérée par la déplétion en plasmalogènes. n = 3.

Par ailleurs, si la supplémentation maternelle en alkylglycérols n'est associée qu'un un impact très modeste *in vivo*, nos résultats suggèrent que cette dernière n'est pas suffisante pour inhiber les anomalies induites par la déficience en plasmalogènes. De futurs travaux pourraient tenter d'optimiser cette dernière, mais l'étude de Brites et collaborateurs (Brites *et al.,* 2011) a montré que 8 semaines de supplémentation sont nécessaires afin de restaurer les niveaux tissulaires plasmalogènes. Sachant que le développement vasculaire ne s'effectue qu'au cours des 3 premières semaines de vie, il apparait en réalité peu probable qu'une telle supplémentation puisse restaurer intégralement ces anomalies chez la souris déficiente en plasmalogènes.

De manière intéressante, cette étude a toutefois montré que la déficience en plasmalogènes est associée à une augmentation significative du ratio oméga-6/oméga-3 dans la rétine. Compte tenu du caractère de réservoir membranaire des plasmalogènes pour les AGPIs et notamment du DHA, il n'est finalement pas surprenant d'observer une altération de ce ratio. De plus, ce résultat confirme des études *in vitro* menées sur des lignées de macrophages déficients en plasmalogènes ayant rapporté une diminution de 50% du DHA, tandis que l'AA ne montrait aucune modification (Gaposchkin and Zoeller, 1999). L'AA est un acide gras plutôt pro-inflammatoire, et constitue de plus le précurseur d'une classe de molécules particulières, les endocannabinoïdes. Or, il s'avère que des études récentes suggèrent justement une implication du système endocannabinoïde dans les mécanismes de l'angiogenèse pathologique de la rétine. Le chapitre suivant porte ainsi sur le rôle du système endocannabinoïde dans les anomalies du développement vasculaire rétinien associées à la déficience en plasmalogènes.

Chapitre 4 : Rôle des plasmalogènes dans le développement vasculaire rétinien – le système endocannabinoïde, un nouvel acteur ?

Problématique

Le système endocannabinoïde (sEC) est un système de régulation physiologique qui intervient notamment au sein du système nerveux en tant que modulateur de la communication synaptique. Il repose essentiellement sur des ligands dérivés d'AGPIs d'une part, et sur les récepteurs associés d'autre part. La rétine étant une extension du système nerveux central, il ne fut ainsi pas surprenant d'y retrouver les différents acteurs de ce système. Pourtant, si les rôles du sEC commencent à être bien décrits dans le cerveau, son étude dans la rétine n'est que très récente. Aussi, on observe actuellement un intérêt grandissant pour le sEC de la rétine à mesure que de nouvelles études suggèrent son implication dans divers aspects physiologiques et physiopathologiques de la rétine. Sachant que les plasmalogènes constituent une source importante d'AGPIs biodisponibles pour les cellules, et que la déficience en plasmalogènes est associée à un profil rétinien anormal caractérisé par une inflammation et des anomalies du développement vasculaire, nous avons souhaité déterminer si une partie de ces anomalies pouvait être associée à une dérégulation du sEC. Pour ce faire, nous avons suivi l'évolution des acteurs du sEC rétinien à différents points de temps cruciaux pour le développement vasculaire (P7, P14, P21), jusqu'à l'âge adulte (13 semaines) par des approches complémentaires d'immunohistochimie et d'expression génique.

Cet article est en préparation pour une soumission dans le journale scientifique international Frontiers in Physiology.

Plasmalogens regulate endocannabinoid system during retinal vascular development of the mouse.

Rémi Karadayi[1*], Julia Leemput[2], Bénédicte Buteau[1], Stéphane Grégoire[1], Jean-Paul Pais de Barros[3], Alain M. Bron[1,4], Tony Jourdan[2], Pascal Degrace[2], Niyazi Acar[1*]

1 Eye and Nutrition Research Group, CSGA, UMR1324 INRAE, 6265 CNRS, Université de Bourgogne Franche-Comté, Dijon, France

2 INSERM LNC UMR1231, Team PADYS, University of Burgundy, Dijon, France

3 Lipidomic Analytical Platform, University of Burgundy, Dijon, France

4 Department of Ophthalmology, University Hospital, Dijon, France

***Corresponding Authors**: remi.karadayi@inrae.fr; niyazi.acar@inrae.fr

Keywords: Retina, Plasmalogens, Endocannabinoids, Angiogenesis, Müller glia.

Abstract

As an extension of central nervous system, the retina is enriched in ether-lipids plasmalogens. Previous studies have shown that plasmalogen-deficiency is associated with several and major ocular defects, including abnormal vascular development of the retina. Plasmalogens are known to exert a wide range of cellular functions, including that of reservoir for *n*-3 and *n*-6 PUFAs, such as docosahexaenoic acid (DHA) or arachidonic acid (AA), the latter being the main precursor of *n*-6 endocannabinoids. Interestingly, recent studies have associated the endocannabinoid system with the regulation of angiogenesis, including that of the retina. Therefore, our study aimed at finding out if the endocannabinoid system is involved in the plasmalogen deficiency-associated abnormalities of retinal vascularization. Using a mouse model of plasmalogen deficiency (DAPAT$^{-/-}$ mouse), we assessed the gene expression of the main receptors and enzymes of the endocannabinoid system in the retina during the key stages of retinal vascular development at (7, 14 and 21 days of life), and adulthood (13 weeks). We found that Müller cells, the main glial cells of the retina, might play a predominant role in the regulation of retinal endocannabinoid system and its dysregulations. As such, plasmalogen-deficiency appears associated with several major dysregulations of the endocannabinoid system in the retina, including cannabinoid receptor-1 (CB1R) expression, endocannabinoids synthesis and degradation enzymes. Taken together, our results show for the first time that the endocannabinoid system is affected in animals with retinal vascular development abnormalities due to plasmalogen deficiency.

Background

The retina is a very unique tissue. As an extension of the central nervous system, it relies on a complex partnership between neurons and glial cells (Vecino et al., 2016). Similarly to the brain, it is particularly enriched in plasmalogens, a glycerophospholipid subtype characterized by a vinyl-ether bound to the sn-1 position of glycerol (Acar et al., 2007; Nagy et al., 2012). Plasmalogens biosynthesis is a multi-step process that first relies on the key enzyme DHAPAT (Nagan and Zoeller, 2001). We and others previously showed that Müller cells, the main glial cells of the retina, are crucial actors of the lipid metabolism of the retina (Amaratunga et al., 1996; Gambert et al., 2017; Leger-Charnay et al., 2019; Vecino et al., 2016), and especially that of plasmalogens (Acar et al., 2007). Plasmalogens have been shown to regulate crucial eye features, such as lens morphogenesis and vascular development of the retina (Brites et al., 2011; Saab et al., 2014a). Several functions were attributed to plasmalogens, such as antioxidative activity, cell membrane organization and trafficking, as well as cell signaling (Nagan and Zoeller, 2001). The latter relies on their ability to preferentially bind polyunsaturated fatty acids (PUFAs) as their sn-2 moiety, making them generally regarded as a reservoir for PUFAs (Nagan and Zoeller, 2001) These PUFAs belong to the n-6 or n-3 series, with the most abundant species for each series being arachidonic acid (AA) and docosahexaenoic acid (DHA), respectively. The cellular and physiological actions of PUFAs are mainly mediated through their metabolization into bioactive molecules through the action of specific enzymes (Bazinet and Laye, 2014). Among them, the N-acyl phosphatidylethanolamine-specific phospholipase D (NAPE-PLD) and diacylglycerol lipase (DAGLa) are responsible for the conversion of AA-containing phospholipids, including plasmalogens (Tsuboi et al., 2011), into the endocannabinoids N-arachidonoylethanolamide (AEA) and 2-arachidonoylglycerol (2-AG) (Tsuboi et al., 2018; Ueda et al., 2010). Levels of AEA and 2-AG are further regulated by other enzymes responsible for their degradation such as the fatty acid amide hydrolase (FAAH) and the monoacylglycerol lipase (MAGL) (Schwitzer et al., 2016; Ueda et al., 2013).

The endocannabinoid system relies on ligands such as AEA or 2-AG and their associated-receptors (Iannotti et al., 2016; Zou and Kumar, 2018). To date, several receptors have been identified as being part of the endocannabinoid system (Maccarrone, 2017). Among them, the most prominent and biologically relevant are the cannabinoid-1, -2 receptors (CB1R, CB2R) (Bouchard et al., 2016; Cecyre et al., 2013; Lu and Mackie, 2016). Interestingly, CB1R and CB2R are differentially expressed by retinal cells: CB1R expression is found in neurons and glia (Bouchard et al., 2016; Hu et al., 2010; Straiker et al., 1999; Zabouri et al., 2011) while CB2R is mainly expressed in glial and immune cells (Borowska-Fielding et al., 2018; Bouskila et al., 2016; Lopez et al., 2011). This dichotomy in the

cellular distribution suggests that each receptor may regulate specific mechanisms related to health and disease of the retina.

While informations related to physiologic functions played by the endocannabinoid system in the retina are still scarce, a growing interest exists on its involvement in retinal pathophysiology as both CB1R and CB2R expression are impacted in inflammatory and neurodegenerative conditions (Ashton and Glass, 2007; Benito et al., 2008; Spigelman, 2010; Zou and Kumar, 2018). Recent studies have associated CB1R with several pathological features of the retina (Chen et al., 2018; Miller et al., 2020; Spyridakos et al., 2021), such as proliferative angiogenesis and neovascularization (Pisanti et al., 2007; Pisanti et al., 2011). On the other hand, CB2R could be a key modulator of neuroinflammation (Spyridakos et al., 2021), thereby suggesting a putative role of immune cells in the regulation of retinal inflammation. Finally, recent attempts to modulate retinal disorders by pharmacological activation/inhibition of the CB1R and CB2R gave promising results, such as rescuing retinal barrier properties of Müller glia and modulating retinal inflammation (Krishnan and Chatterjee, 2015; Spyridakos et al., 2021), thus reinforcing the hypothesis that they could be major actors of retinal physiology and pathophysiology.

We and others previously demonstrated that plasmalogen deficiency leads to several critical defects of the eye and major abnormalities in retinal vascular development that were associated with reactive gliosis (Rodemer et al., 2003; Saab et al., 2014b), thereby suggesting the involvement of plasmalogens and glial cells in mechanisms related to angiogenesis. Considering that plasmalogens are a significant source of endocannabinoids and that their metabolism predominantly relies on glial cells, we hypothesize plasmalogen deficiency-induced abnormalities of the retinal vascular development may be linked to dysregulations of endocannabinoid system. As such, using the plasmalogen-deficient mouse model (DAPAT-/-), we investigated the expression of the main receptors and synthesis/degradation enzymes of the endocannabinoid system at key developmental stages of the retinal vascular development.

Materials and methods

Animals

Experiments were conducted in accordance with the Association for Research in Vision and Ophthalmology statements and with French legislation (authorization number 21CAE086 for N.A. and animal quarters agreement number A21231010 EA), after approval by the local ethics committees (#105 Comité d'Ethique de l'Expérimentation Animale Grand Campus Dijon).

DAPAT heterozygous ($DAPAT^{+/-}$) mutants were kindly provided by Prof. W.W. Just (Heidelberg, Germany) and housed in our animal quarters. They were crossed to generate $DAPAT^{+/+}$, $DAPAT^{+/-}$ and DAPAT knock-out ($DAPAT^{-/-}$) mice. Animals were genotyped as previously described (Saab et al., 2014). Briefly, polymerase-chain reaction (PCR) was performed on genomic tail DNA using the primers neomycin-forward (CGCATCGCCTTCTATCGCCTTCTTG, Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Germany), exon7-forward (CGATACCTACTTTGTCCCAATTAGC, Eurofins) and exon7-reverse (GCTGGTCTCAAACAGCTACGTAGCTGA, Eurofins). DNA was extracted using the Archive Pure DNA Cell/Tissue kit (5 Prime GmbH, Catalog no 2300820; Gaithersburg, MD). Then, 2 ng of genomic DNA, 100 pmol of each primer in reaction buffer and 2.5 U of Taq polymerase (BiotaqTM DNA Polymerase, BIO-21040, Bioline, Paris, France) were used in a total volume of 25 µl to amplify DNA. After 2 min of denaturation at 95°C, PCR was performed on a C1000TM Thermo Cycler (Biorad Laboratories, Hercules, CA, USA) through 35 cycles at 94°C for 30 s and 57°C for 1 min, followed by a final extension step at 72°C for 1 min. This resulted in a 650-bp product for the wild-type gene and an 860-bp product for the neomycin-recombinant DAPAT gene. PCR products were determined by electrophoresis in 2% agarose gels that were further visualized on a Geldoc 2000 (Biorad) for analysis.

Gene expression

Retinas were isolated from the eyeballs and pooled for one animal before being snap-frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C. Total RNAs were isolated using the Qiagen Quantitect Reverse Transcription Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. The quantity and the quality of RNAs were evaluated on a nanodrop spectrophotometer (ND1000, Thermo Fisher, Illkirch, France). The primers used to quantify the genes of the cannabinoid system and the endogenous control genes are presented in Table 1. Quantitative real-time PCR (qPCR) was performed using 10ng of total RNA in 10 µl of Syber Master Mix (Biorad). QPCR was performed on 96-well plates (Applied Biosystems, Life Technologies), using the StepOnePlus Real-Time PCR System

equipped with the StepOne software V2.2.2 (Applied Biosystems, Life Technologies). Data were analyzed using DataAssist software V3.0 (Applied Biosystems, Life Technologies). Genes encoding for ribosomal 18S and Rpl38 were used as endogenous controls for normalization and relative quantification (RQ) with the Cycle Threshold (CT)-method.

Table 1 – List of mouse primers

Gene	Accession #	Forward sequence (5'-3')	Reverse sequence (5'-3')
Cnr1	NM_001355020.2	CCGCAAAGATAGTCCCAATG	AACCCCACCCAGTTTGAAC
Cnr2	NM_001305278.1	CAAAGGAGGAAGTGCTTGGT	TGGAGAGATCGGCTTATGTTG
Napepld	NM_001359963.1	AGACGCTGGAGTGAGAGAGG	GCTCGTCCATTTCCACCAT
Faah	NM_010173.5	GGACCTTGCTCCCCTTTC	CCTGCTGGGCTGTCACATA
Dagla	NM_198114.2	GCTGGACGAGGCAAACAATG	CTCGTGCGAGTTCTTGAGGT
Mgll	NM_001166249.1	CGCGAGGTTTCCTTCCCTAA	AAAGTCACCCCGATTCTCCG
Rn18S	NR_003278.3	GTGTGGGGAGTGAATGGTG	GCGAGACAGTCAAACCACG
Rpl38	NM_001048057.2	CATGCCTCGGAAAATTGAG	TCTTGACAGACTTGGCATCCT

Immunohistochemistry (IHC)

Pups were euthanized by decapitation at days 7 (PN7), 14 (PN14), and 21 (PN21). The eyeballs were isolated and fixed in 4% paraformaldehyde and processed for cryosections as follow : lens and cornea were removed and eyecups were dehydrated in sucrose baths with gradually increasing sucrose concentrations before being embedded in Tissue-Tek O.C.T. (Sakura Finetek, Netherlands) and frozen into liquid nitrogen. Ten µm-thick cryo-sections were performed on a Leica microtome (CM 3050 S, Leica Microsystemes) and were mounted on SuperFrost PlusTM slides (Thermo Scientific, USA). Prior to antibody labeling, eye cryo-sections slides were blocked for 1h in 1% BSA (Sigma-Aldrich, USA) + 0,1% Triton X-100 (Sigma-Aldrich) + 0,05% Tween (Sigma-Aldrich, USA). They were then incubated overnight at 4°C in the same BSA/Triton/Tween solution with the following primary antibodies: GNPAT at a dilution of 1:250 (PA5-36447, rabbit polyclonal, Invitrogen, USA), and Glutamin synthetase at a dilution of 1:10,000 (MA5-27749, mouse monoclonal, Invitrogen). After 5 consecutive washes in 1X-PBS, samples were then incubated for 1h at room temperature in BSA/Triton/Tween solution with DAPI (1:200, Sigma-Aldrich, USA), Alexa Fluor 488 (A11001, goat anti-mouse, Invitrogen, USA) and Alexa Fluor 594 conjugated secondary antibodies (A-11032, goat anti-rabbit, Invitrogen, USA). Samples were then washed again 5 times with PBS for 5min before being sealed in mounting media (Dako) for imaging on an inverted confocal microscope (TCS SP8, Leica Microsystemes, France).

Results

CB1R is strongly expressed by glial cells in the mouse retina

In order to assess the expression pattern of CB1R in mouse retina and particularly in Müller cells , we performed a double immunolabeling of the CB1R and the Müller glia-specific marker glutamine synthetase (GS) in mouse retinal cryosections (Fig.1). Analysis revealed that CB1R is expressed in several retinal layers, especially in the ganglion cell layer (GCL), the outer plexiform layer (OPL), the photoreceptor inner segments (IS), and the photoreceptor outer segments (OS) (Fig. 1 C), and strongly colocalizes with GS in the GCL, the IS and the OPL (Fig. 1D,G). Such a pattern is consistent with the localization of Müller cells endfeet and soma (Fig. 1B) suggesting the expression of CB1R in the retina may be exclusively supported by these cells . Strong labeling of the photoreceptors layer also suggests that photoreceptors are actors of the retinal endocannabinoid system. However, labeling of photoreceptor OS in negative controls of our retinal cryosections (Fig. 1 E,F) rather suggests that photoreceptor OS expression of CB1R might be overestimated when compared to other retinal layers.

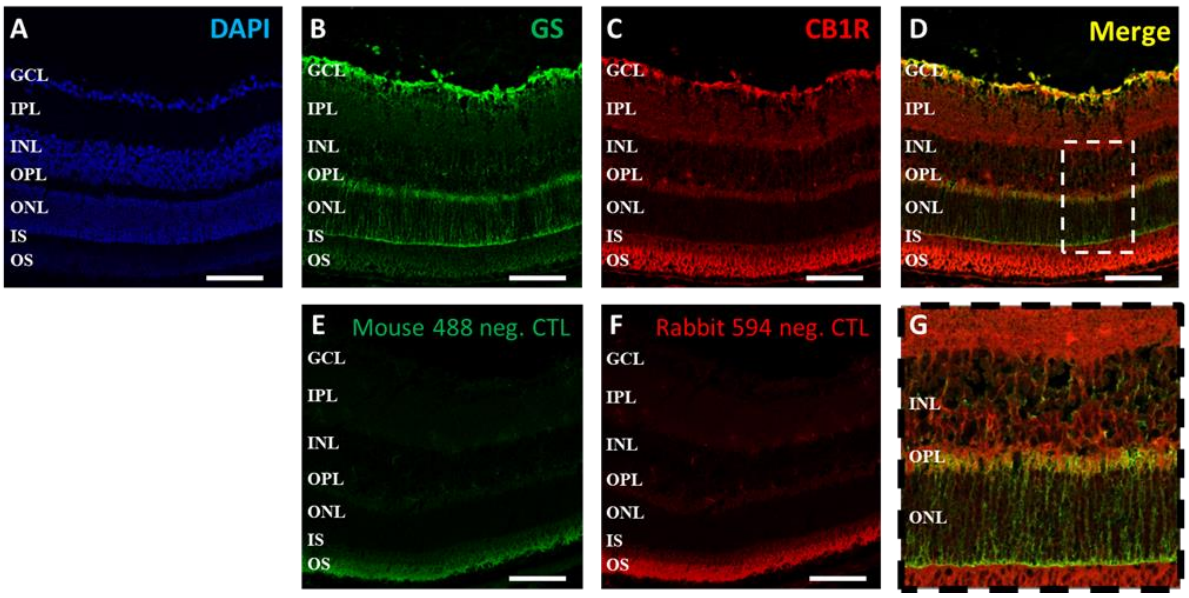

Figure 1: Müller cells strongly express the CB1R in the mouse retina. A-D: Double immunolabeling of mouse retinal cryosections for GS and CB1R. CB1R-positive cells showed a strong expression pattern in the ganglion cells layer (GCL), the outer plexiform layer (OPL), the photoreceptor inner segments (IS) and photoreceptors outer segments (OS) (C), which colocalizes with Müller cells endfeet (B,H) and soma (B,G), respectively. **E-F:** Negative controls. Scale bars = 25 µm.

Plasmalogen deficiency alters the retinal expression of genes of the endocannabinoid system

In a second series of experiments, we assessed the impact of plasmalogen deficiency on the expression of the major endocannabinoid system-related genes throughout key developmental stages (P7, P14, P21) and at 13 weeks of age. While no significant modifications were observed at P7 and P14 (despite a trend toward Faah overexpression at P14) (Figure 2A-B), P21 and 13 weeks-old DAPAT-/- mice exhibited several gene expression alterations. Namely, P21 DAPAT-/- mice displayed significant downregulation of Cnr1, Napepld, Dagla and Mgll expression ($p<0.05$), with Faah exhibiting a trend toward downregulation ($p=0.012$) and Cnr2 remaining unaffected by plasmalogen deficiency (Figure 2C). This global trend toward a downregulation of the endocannabinoid system remained in 13 weeks-old DAPAT-/- mice, as both Cnr1 and Dagla were still significantly downregulated ($p<0.05$), while Napepld and Faah displayed a trend ($p=0.14$ and $p=0.08$, respectively). Cnr2 expression remained unaffected by plasmalogen-deficiency (Figure 2D).

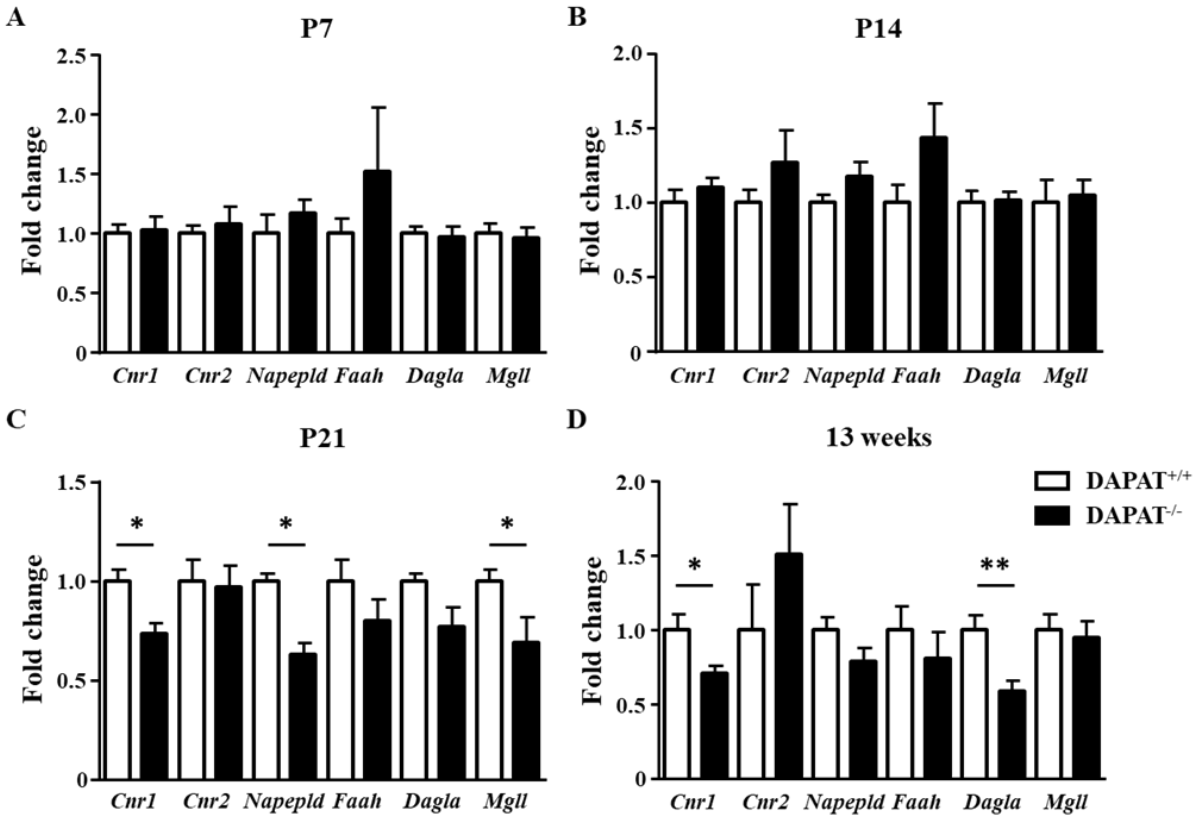

Figure 2: Plasmalogen deficiency is associated with several dysregulations of genes involved in the mouse retinal endocannabinoid system. A-D: RT-qPCR analysis of the main genes involved in the endocannabinoid system at P7 (A), P14 (B), P21 (C) and at 13 weeks (D). n = 4-8. Mann & Whitney test. * $p < 0.05$. Data shown as mean ± SEM.

Discussion

A growing body of evidence suggests that the PUFAs-derived endocannabinoids may be of particular importance in both retinal physiology and pathophysiology. As PUFAs are concentrated in the vinyl-ether lipids plasmalogens, we aimed to assess if plasmalogens actually regulate the endocannabinoid system of the retina.

Immunostaining of CB1R in Müller glial cells is consistent with current knowledge about their role in the regulation of neurons synaptic activity (Navarrete and Araque, 2008; Perea et al., 2009) and reinforces the idea that they are important actors of lipid metabolism in the retina. Furthermore, non-glial cells expression of CB1R in photoreceptors is also consistent with previous works documenting its expression in neuronal cells, particularly in photoreceptors, amacrine and ganglion cells (Aguirre et al., 2019; Straiker et al., 1999). However, the interpretation of this data can be tricky, as the negative controls reveal that there is strong unspecific staining of the photoreceptors, thereby potentially leading to an overestimated expression by these cells (Fig. 1 G). In our study, we decided to assess only CB1R localization as it was suggested that current antibodies targeting CB2R are not suitable (Marchalant et al., 2014). Even though some studies have evaluated CB2R expression pattern in the rat retina using mRNA (Lopez et al., 2011), further work with performant CB2R antibodies or probes should document its retinal localization and provide great insight into the roles of CB2R in retinal physiology (Sarott et al., 2020). Besides, describing the expression pattern of synthesis and degradation enzymes in plasmalogen-deficient mice retinas would be of particular interest in order to better understand the pathophysiological mechanisms taking place in DAPAT-/- mouse retina. However, a recent study found that DAGLa and MAGL were mostly expressed in neuronal cells during postnatal development of the rat retina (Cecyre et al., 2014) and in photoreceptors of the mouse retina (Hu et al., 2010), suggesting potentially little to none impact on Müller cells.

In our work, gene expression data provided important information about the impact of plasmalogen deficiency on retinal endocannabinoid system, and subsequently about the relationships between plasmalogen and endocannabinoids metabolism. We show here for the first time that plasmalogen deficiency is associated with several dysregulations of the endocannabinoid system at key developmental stages of the retina. However, it is difficult to interpret the precise impact of these alterations on the vascular development abnormalities of the DAPAT-/- mouse. Indeed, while some studies showed that retinal neovascularization is associated to an increase in CB1R expression (Pisanti et al., 2011), other have suggested that the CB1R ligand AEA could have anti-angiogenic

properties (Pisanti et al., 2007) as well as functions in blood-retinal barrier maintenance in Müller cells (Krishnan and Chatterjee, 2015). Furthermore, the vascular abnormalities of the plasmalogen-deficient mouse take place in two distinct phases: delayed vascular growth at P7 followed by anarchic neovascularization at P14 (Saab et al., 2014a). Despite small trends, our data suggest that plasmalogen deficiency do not alter endocannabinoid genes expression at P7 and P14. However, 21-days old pups exhibited several significantly downregulated genes, such as Cnr1, Napepld and Mgll, while Faah and Dagla only exhibited a trend towards downregulation. Interestingly, both Cnr1 and Dagla remained significantly downregulated in the adult mice retina (13 weeks-old). These data suggest that plasmalogen deficiency alters Cnr1-related signalization as well as endocannabinoids synthesis and degradation enzymes from P21 to adulthood. Yet, the exact implications for retinal physiology and vascular development remain to be determined.

As the endocannabinoid system relies on both receptors and their ligands, gene expression alone isn't sufficient to fully understand how plasmalogen deficiency impacts the retinal endocannabinoid system and, quantifying endocannabinoid molecular species would be of great help. Furthermore, recent studies have highlighted that DHA-derived n-3 endocannabinoids also exert important physiological functions in nervous tissues (Bosch-Bouju and Laye, 2016; Dyall, 2017; Dyall et al., 2016; McDougle et al., 2017). Considering that plasmalogens act as reservoir for n-6 but also n-3 PUFAs (Nagan and Zoeller, 2001), it is likely that alteration of DHA bioavailability through plasmalogen deficiency would result in dysregulations of DHA-derived endocannabinoids. Thus, further studies including the quantification of both n-6 and n-3 endocannabinoids will be of great interest in order to draw an accurate picture of the interplay between plasmalogens, endocannabinoids and vascular development of the retina.

Funding

The authors thank National Research Institute for Agriculture, Food and Environment (INRAE); Regional Council of Burgundy (PARI Grant); European Regional Development Fund (FEDER); Agence Nationale de la Recherche (ANR-11-LABX-0021-01); Fondation de France/Fondation de l'Oeil.

The authors declare no competing financial interest.

References

Acar, N., Gregoire, S., Andre, A., Juaneda, P., Joffre, C., Bron, A.M., Creuzot-Garcher, C.P., Bretillon, L., 2007. Plasmalogens in the retina: in situ hybridization of dihydroxyacetone phosphate acyltransferase (DHAP-AT)--the first enzyme involved in their biosynthesis--and comparative study of retinal and retinal pigment epithelial lipid composition. Experimental eye research 84, 143-151.

Aguirre, E.C., Gaveglio, V.L., Pasquare, S.J., 2019. The Endocannabinoid System Is Present in Rod Outer Segments from Retina and Is Modulated by Light. Molecular neurobiology 56, 7284-7295.

Amaratunga, A., Abraham, C.R., Edwards, R.B., Sandell, J.H., Schreiber, B.M., Fine, R.E., 1996. Apolipoprotein E is synthesized in the retina by Muller glial cells, secreted into the vitreous, and rapidly transported into the optic nerve by retinal ganglion cells. The Journal of biological chemistry 271, 5628-5632.

Ashton, J.C., Glass, M., 2007. The cannabinoid CB2 receptor as a target for inflammation-dependent neurodegeneration. Current neuropharmacology 5, 73-80.

Bazinet, R.P., Laye, S., 2014. Polyunsaturated fatty acids and their metabolites in brain function and disease. Nature reviews. Neuroscience 15, 771-785.

Benito, C., Tolon, R.M., Pazos, M.R., Nunez, E., Castillo, A.I., Romero, J., 2008. Cannabinoid CB2 receptors in human brain inflammation. British journal of pharmacology 153, 277-285.

Borowska-Fielding, J., Murataeva, N., Smith, B., Szczesniak, A.M., Leishman, E., Daily, L., Toguri, J.T., Hillard, C.J., Romero, J., Bradshaw, H., Kelly, M.E.M., Straiker, A., 2018. Revisiting cannabinoid receptor 2 expression and function in murine retina. Neuropharmacology 141, 21-31.

Bosch-Bouju, C., Laye, S., 2016. Dietary Omega-6/Omega-3 and Endocannabinoids: Implications for Brain Health and Diseases, In: Meccariello, R., Chianese, R. (Eds.), Cannabinoids in Health and Disease. Intech Open.

Bouchard, J.F., Casanova, C., Cecyre, B., Redmond, W.J., 2016. Expression and Function of the Endocannabinoid System in the Retina and the Visual Brain. Neural plasticity 2016, 9247057.

Bouskila, J., Javadi, P., Elkrief, L., Casanova, C., Bouchard, J.F., Ptito, M., 2016. A Comparative Analysis of the Endocannabinoid System in the Retina of Mice, Tree Shrews, and Monkeys. Neural plasticity 2016, 3127658.

Brites, P., Ferreira, A.S., da Silva, T.F., Sousa, V.F., Malheiro, A.R., Duran, M., Waterham, H.R., Baes, M., Wanders, R.J., 2011. Alkyl-glycerol rescues plasmalogen levels and pathology of ether-phospholipid deficient mice. PloS one 6, e28539.

Cecyre, B., Monette, M., Beudjekian, L., Casanova, C., Bouchard, J.F., 2014. Localization of diacylglycerol lipase alpha and monoacylglycerol lipase during postnatal development of the rat retina. Frontiers in neuroanatomy 8, 150.

Cecyre, B., Zabouri, N., Huppe-Gourgues, F., Bouchard, J.F., Casanova, C., 2013. Roles of cannabinoid receptors type 1 and 2 on the retinal function of adult mice. Investigative ophthalmology & visual science 54, 8079-8090.

Chen, Y., Luo, X., Liu, S., Shen, Y., 2018. Neuroprotective effect of cannabinoid receptor 1 antagonist in the MNU-induced retinal degeneration model. Experimental eye research 167, 145-151.

Dyall, S.C., 2017. Interplay Between n-3 and n-6 Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acids and the Endocannabinoid System in Brain Protection and Repair. Lipids 52, 885-900.

Dyall, S.C., Mandhair, H.K., Fincham, R.E.A., Kerr, D.M., Roche, M., Molina-Holgado, F., 2016. Distinctive effects of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids in regulating neural stem cell fate are mediated via endocannabinoid signalling pathways. Neuropharmacology 107, 387-395.

Gambert, S., Gabrielle, P.H., Masson, E., Leger-Charnay, E., Ferrerro, A., Vannier, A., Gendrault, C., Lachot, M., Creuzot-Garcher, C., Bron, A., Gregoire, S., Leclere, L., Martine, L., Lucchi, G., Truntzer, C., Pecqueur, D., Bretillon, L., 2017. Cholesterol metabolism and glaucoma: Modulation of Muller cell membrane organization by 24S-hydroxycholesterol. Chemistry and physics of lipids 207, 179-191.

Hu, S.S., Arnold, A., Hutchens, J.M., Radicke, J., Cravatt, B.F., Wager-Miller, J., Mackie, K., Straiker, A., 2010. Architecture of cannabinoid signaling in mouse retina. The Journal of comparative neurology 518, 3848-3866.

Iannotti, F.A., Di Marzo, V., Petrosino, S., 2016. Endocannabinoids and endocannabinoid-related mediators: Targets, metabolism and role in neurological disorders. Progress in lipid research 62, 107-128.

Krishnan, G., Chatterjee, N., 2015. Anandamide rescues retinal barrier properties in Muller glia through nitric oxide regulation. Neuroscience 284, 536-545.

Leger-Charnay, E., Masson, E.A.Y., Morala, T., Martine, L., Buteau, B., Leclere, L., Bretillon, L., Gambert, S., 2019. Is 24(S)-hydroxycholesterol a potent modulator of cholesterol metabolism in Muller cells? An in vitro study about neuron to glia communication in the retina. Experimental eye research 189, 107857.

Lopez, E.M., Tagliaferro, P., Onaivi, E.S., Lopez-Costa, J.J., 2011. Distribution of CB2 cannabinoid receptor in adult rat retina. Synapse 65, 388-392.

Lu, H.C., Mackie, K., 2016. An Introduction to the Endogenous Cannabinoid System. Biological psychiatry 79, 516-525.

Maccarrone, M., 2017. Metabolism of the Endocannabinoid Anandamide: Open Questions after 25 Years. Frontiers in molecular neuroscience 10, 166.

Marchalant, Y., Brownjohn, P.W., Bonnet, A., Kleffmann, T., Ashton, J.C., 2014. Validating Antibodies to the Cannabinoid CB2 Receptor: Antibody Sensitivity Is Not Evidence of Antibody Specificity. The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society 62, 395-404.

McDougle, D.R., Watson, J.E., Abdeen, A.A., Adili, R., Caputo, M.P., Krapf, J.E., Johnson, R.W., Kilian, K.A., Holinstat, M., Das, A., 2017. Anti-inflammatory omega-3 endocannabinoid epoxides. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 114, E6034-E6043.

Miller, S., Daily, L., Ploss, M., Greig, I., Ross, R., Rayana, N.P., Dai, J., Sugali, C.K., Mao, W., Straiker, A., 2020. Evidence that cannabinoid CB1 receptors regulate intraocular pressure via two opposing mechanisms. Experimental eye research 200, 108241.

Nagan, N., Zoeller, R.A., 2001. Plasmalogens: biosynthesis and functions. Progress in lipid research 40, 199-229.

Nagy, K., Brahmbhatt, V.V., Berdeaux, O., Bretillon, L., Destaillats, F., Acar, N., 2012. Comparative study of serine-plasmalogens in human retina and optic nerve: identification of atypical species with odd carbon chains. Journal of lipid research 53, 776-783.

Navarrete, M., Araque, A., 2008. Endocannabinoids mediate neuron-astrocyte communication. Neuron 57, 883-893.

Perea, G., Navarrete, M., Araque, A., 2009. Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information. Trends in neurosciences 32, 421-431.

Pisanti, S., Borselli, C., Oliviero, O., Laezza, C., Gazzerro, P., Bifulco, M., 2007. Antiangiogenic activity of the endocannabinoid anandamide: correlation to its tumor-suppressor efficacy. Journal of cellular physiology 211, 495-503.

Pisanti, S., Picardi, P., Prota, L., Proto, M.C., Laezza, C., McGuire, P.G., Morbidelli, L., Gazzerro, P., Ziche, M., Das, A., Bifulco, M., 2011. Genetic and pharmacologic inactivation of cannabinoid CB1 receptor inhibits angiogenesis. Blood 117, 5541-5550.

Rodemer, C., Thai, T.P., Brugger, B., Kaercher, T., Werner, H., Nave, K.A., Wieland, F., Gorgas, K., Just, W.W., 2003. Inactivation of ether lipid biosynthesis causes male infertility, defects in eye development and optic nerve hypoplasia in mice. Human molecular genetics 12, 1881-1895.

Saab, S., Buteau, B., Leclere, L., Bron, A.M., Creuzot-Garcher, C.P., Bretillon, L., Acar, N., 2014a. Involvement of plasmalogens in post-natal retinal vascular development. PloS one 9, e101076.

Saab, S., Mazzocco, J., Creuzot-Garcher, C.P., Bron, A.M., Bretillon, L., Acar, N., 2014b. Plasmalogens in the retina: from occurrence in retinal cell membranes to potential involvement in pathophysiology of retinal diseases. Biochimie 107 Pt A, 58-65.

Sarott, R.C., Westphal, M.V., Pfaff, P., Korn, C., Sykes, D.A., Gazzi, T., Brennecke, B., Atz, K., Weise, M., Mostinski, Y., Hompluem, P., Koers, E., Miljus, T., Roth, N.J., Asmelash, H., Vong, M.C., Piovesan, J., Guba, W., Rufer, A.C., Kusznir, E.A., Huber, S., Raposo, C., Zirwes, E.A., Osterwald, A., Pavlovic, A., Moes, S., Beck, J., Benito-Cuesta, I., Grande, T., Ruiz de Marti, N.E.S., Yeliseev, A., Drawnel, F., Widmer, G., Holzer, D., van der Wel, T., Mandhair, H., Yuan, C.Y., Drobyski, W.R., Saroz, Y., Grimsey, N., Honer, M., Fingerle, J., Gawrisch, K., Romero, J., Hillard, C.J., Varga, Z.V., van der Stelt, M., Pacher, P., Gertsch, J., McCormick, P.J., Ullmer, C., Oddi, S., Maccarrone, M., Veprintsev, D.B., Nazare, M., Grether, U., Carreira, E.M., 2020. Development of High-Specificity Fluorescent Probes to Enable Cannabinoid Type 2 Receptor Studies in Living Cells. Journal of the American Chemical Society 142, 16953-16964.

Schwitzer, T., Schwan, R., Angioi-Duprez, K., Giersch, A., Laprevote, V., 2016. The Endocannabinoid System in the Retina: From Physiology to Practical and Therapeutic Applications. Neural plasticity 2016, 2916732.

Spigelman, I., 2010. Therapeutic Targeting of Peripheral Cannabinoid Receptors in Inflammatory and Neuropathic Pain States, In: Kruger, L., Light, A.R. (Eds.), Translational Pain Research: From Mouse to Man. Boca Raton (FL).

Spyridakos, D., Papadogkonaki, S., Dionysopoulou, S., Mastrodimou, N., Polioudaki, H., Thermos, K., 2021. Effect of acute and subchronic administration of (R)-WIN55,212-2 induced neuroprotection and anti inflammatory actions in rat retina: CB1 and CB2 receptor involvement. Neurochemistry international 142, 104907.

Straiker, A., Stella, N., Piomelli, D., Mackie, K., Karten, H.J., Maguire, G., 1999. Cannabinoid CB1 receptors and ligands in vertebrate retina: localization and function of an endogenous signaling system. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 96, 14565-14570.

Tsuboi, K., Okamoto, Y., Ikematsu, N., Inoue, M., Shimizu, Y., Uyama, T., Wang, J., Deutsch, D.G., Burns, M.P., Ulloa, N.M., Tokumura, A., Ueda, N., 2011. Enzymatic formation of N-acylethanolamines from N-acylethanolamine plasmalogen through N-acylphosphatidylethanolamine-hydrolyzing phospholipase D-dependent and -independent pathways. Biochimica et biophysica acta 1811, 565-577.

Tsuboi, K., Uyama, T., Okamoto, Y., Ueda, N., 2018. Endocannabinoids and related N-acylethanolamines: biological activities and metabolism. Inflammation and regeneration 38, 28.

Ueda, N., Tsuboi, K., Uyama, T., 2010. Enzymological studies on the biosynthesis of N-acylethanolamines. Biochimica et biophysica acta 1801, 1274-1285.

Ueda, N., Tsuboi, K., Uyama, T., 2013. Metabolism of endocannabinoids and related N-acylethanolamines: canonical and alternative pathways. The FEBS journal 280, 1874-1894.

Vecino, E., Rodriguez, F.D., Ruzafa, N., Pereiro, X., Sharma, S.C., 2016. Glia-neuron interactions in the mammalian retina. Progress in retinal and eye research 51, 1-40.

Zabouri, N., Bouchard, J.F., Casanova, C., 2011. Cannabinoid receptor type 1 expression during postnatal development of the rat retina. The Journal of comparative neurology 519, 1258-1280.

Zou, S., Kumar, U., 2018. Cannabinoid Receptors and the Endocannabinoid System: Signaling and Function in the Central Nervous System. International journal of molecular sciences 19.

Résultats complémentaires et conclusion

A travers cet article, nous avons pu montrer que la déficience en plasmalogènes altère la régulation d'acteurs majeurs du système endocannabinoïde rétinien tels que le récepteur CB1, mais aussi l'expression génique des enzymes de synthèse (*Napepld*, *Dagla*) et de dégradation (*Mgll*) des endocannabinoïdes. Cette étude fait ainsi apparaitre un nouvel acteur potentiel dans l'apparition des anomalies du développement vasculaire rétinien de la souris DAPAT$^{-/-}$, et ouvre de nouvelles perspectives quant à l'approche fondamentale et thérapeutique des mécanismes du remodelage vasculaire au cours des rétinopathies. Ces résultats, bien que prometteurs, demandent toutefois à être complétés afin d'appréhender les mécanismes sous-jacents et les acteurs concernés dans leur intégralité. Deux approches complémentaires semblent s'imposer ici :

-en premier lieu, il serait pertinent de pouvoir corréler les résultats issus de l'expression génique des enzymes de synthèse/dégradation avec leur expression protéique, par une méthode de semi-quantification comme le western blot par exemple. Ces données nous permettront de dresser le tableau global de leurs altérations, et surtout le suivi de leur mise en place au cours des différentes étapes du développement vasculaire rétinien (J7, J14 et J21). Enfin, la commercialisation future de nouveaux anticorps spécifiques et fiables du récepteur CB2 permettront d'inclure cet acteur crucial du système endocannabinoïde dans l'étude de la relation plasmalogènes-endocannabinoïdes au sein de la rétine.

-dans un deuxième temps, il sera nécessaire de caractériser l'évolution des différents endocannabinoïdes. En effet, comme nombre d'autres systèmes physiologiques, le système endocannabinoïde repose sur une dualité ligands/récepteurs, et si l'altération des récepteurs apporte une partie des informations, la compréhension globale du système ne pourra se faire qu'avec ses effecteurs moléculaires. Ces données permettront par ailleurs de corréler (ou non…) les altérations observées dans l'expression de leurs enzyme de synthèse et de dégradation. En ce sens, nous avons conduit des essais préliminaires afin d'établir un protocole fiable et efficace d'extraction et de quantification des endocannabinoïdes rétiniens. Le protocole est basé sur les travaux de Wang et al., (2003), avec une extraction des endocannabinoïdes rétiniens par des solvants organiques (CHCl3, CH3OH) et des centrifugations successives, normalisée par l'ajout d'un standard interne deutéré (Arachidonoyl Ethanolamide-d_4 # *10011178)*. La particularité de cette extraction repose sur la thermosensibilité des endocannabinoïdes : se dégradant rapidement à température ambiante, toutes les étapes doivent impérativement être réalisées sur glace et les centrifugations doivent se faire à -2°C. Les résultats suivants ont ainsi été obtenus sur des rétines de souris adultes (13 semaines) :

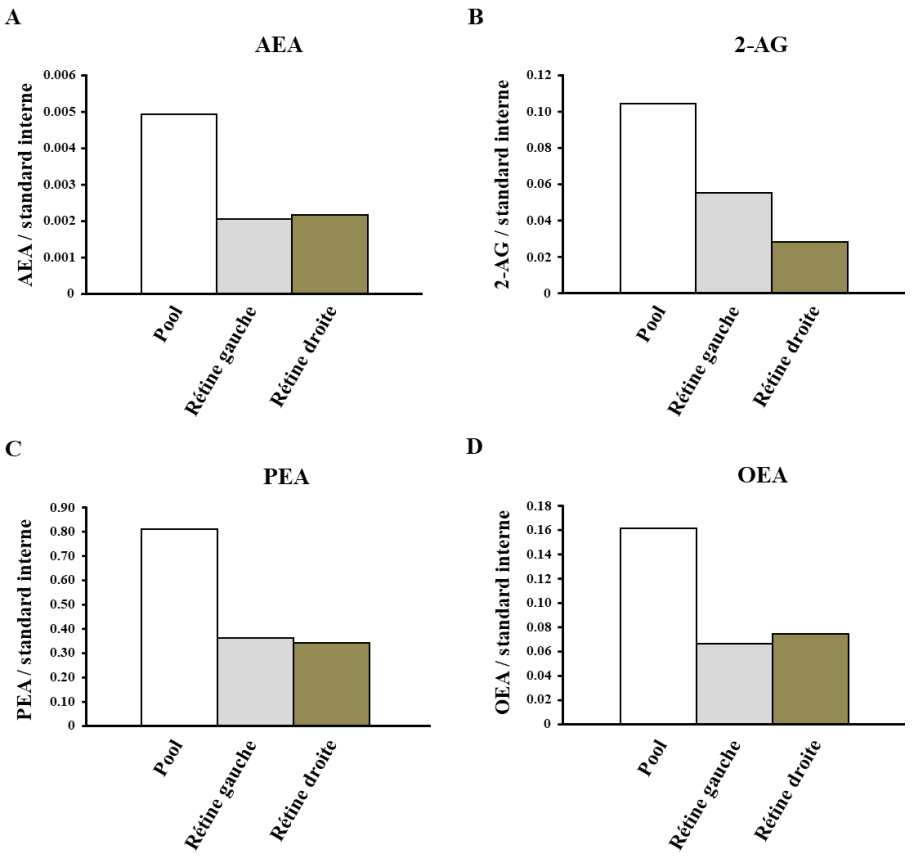

Figure 45 : Validation de la méthode d'extraction et de quantification relative des endocannabinoïdes dans la rétine de souris. n=1.

Ces profils ont notamment été mis en perspective avec un échantillon de cerveau. De nombreux travaux ayant déjà été conduits sur les endocannabinoïdes dans le cerveau, ceci nous permettra notamment de comparer les profils en endocannabinoïdes de ces deux tissus nerveux.

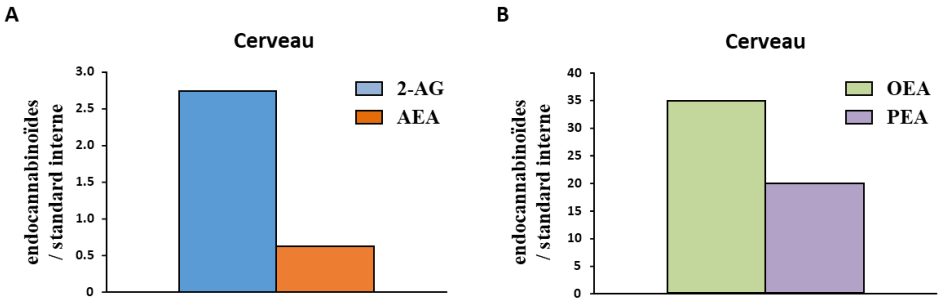

Figure 46 : Comparaison préliminaire du niveau des principaux endocannabinoïdes dans la rétine et le cerveau de la souris DAPAT. n=1.

Cette étude, conjuguée aux résultats obtenus dans le chapitre 3, tend à suggérer l'implication d'altérations du profil en AGPIs dans le développement vasculaire rétinien pathologique. Partant de ce constat, il apparait pertinent d'envisager l'existence d'une possible corrélation chez le prématuré.

Chapitre 5 : Plasmalogènes, AGPIs et ROP – l'étude OmegaROP

Problématique

Les travaux menés dans les chapitres précédents montrent que les plasmalogènes interviennent dans la régulation des fonctions gliales et du développement vasculaire rétinien, qui sont des paramètres impliqués dans la physiopathologie de la ROP. Toutefois, ces études possèdent comme limite d'avoir été menées sur des modèles cellulaires *in vitro* ou animaux *in vivo*, ne permettant qu'une extrapolation pour la physiopathologie de la ROP. Il était donc nécessaire d'obtenir des données supplémentaires chez l'Homme afin de poursuivre l'hypothèse d'un rôle des plasmalogènes dans la pathologie. Si les rétines de prématurés ne peuvent être exploitées pour des raisons éthiques évidentes, il est néanmoins possible d'obtenir des informations quant au statut lipidique des prématurés en analysant les lipides circulants. Plusieurs études récentes évoquent en effet un profil lipidique érythrocytaire, plasmatique et adipeux altéré chez les prématurés qui développeront la ROP (ou d'autres comorbidités de la prématurité également corrélées à la ROP). En particulier, les premiers résultats de l'étude OmegaROP menée par notre équipe montrent une altération du profil en AGPIs des globules rouges chez les prématurés développant une ROP, avec notamment une association entre le ratio oméga-6/oméga-3 et l'âge gestationnel, probablement en lien avec des modifications du transfert materno-fœtal (Pallot et al., 2019). Toutefois, ces études ne présentent que pas ou peu de données sur l'origine phospholipidique de ces altérations. Or, nous savons que les plasmalogènes jouent justement un rôle de réservoir pour les AGPIs membranaires. Ainsi, l'objectif de ce dernier chapitre est de caractériser le profil phospholipidique des globules rouges des prématurés, avec une attention particulière sur les plasmalogènes afin de déterminer les espèces phospholipidiques à l'origine de ces modifications et éventuellement de les corréler avec le développement de la ROP. Pour ce faire, nous avons pu compter sur une sérotèque d'échantillons issus de prématurés en collaboration avec les services d'ophtalmologie et de réanimation néonatale du CHU de Dijon.

Remodeling of polyunsaturated fatty acid-carrying phospholipids in erythrocyte membrane of preterm newborns with retinopathy of prematurity: the OmegaROP Study

Rémi Karadayi[1,§,]Charlotte Pallot[1,2,§], Stéphanie Cabaret[3], Julie Mazzocco[1], Cyril Meillon[2], Denis S. Semama[4], Corinne Chantegret[4], Ninon Ternoy[4], Delphine Martin[4], Aurélie Donier[4], Stéphane Gregoire[1], Catherine P. Creuzot-Garcher[1,2], Alain M. Bron[1,2] Lionel Bretillon[1], Olivier Berdeaux[3], Niyazi Acar[1,*]

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

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

3 Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation, AgroSup Dijon, CNRS, INRA, Université Bourgogne Franche-Comté, ChemoSens Platform, Dijon, F-21000 France

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

* niyazi.acar@inra.fr

$ these authors contributed equally to the work

Keywords: Polyunsaturated fatty acids, phospholipids, erythrocyte, retinopathy of prematurity

Abstract

Purpose: N-3 polyunsaturated fatty acids (PUFAs) prevent retinal vascular abnormalities observed in oxygen-induced retinopathy, a model retinopathy of prematurity (ROP). In the OmegaROP prospective cohort study, we have shown that preterm infants who will develop ROP accumulate the n-6 PUFA arachidonic acid (AA) at the expense of the n-3 PUFA docosahexaenoic acid (DHA) in erythrocytes with advancing gestational age (GA). As mice lacking plasmalogens —that are specific phospholipids considered as reservoirs of n-6 and n-3 PUFAs— display a ROP-like phenotype, the aim of this study was to determine whether plasmalogens are responsible for the changes observed in subjects from the OmegaROP study.

Methods: Preterm infants aged less than 29 weeks GA were recruited at birth in the Neonatal Intensive Care Unit of the University Hospital of Dijon, France. Blood was sampled very early after birth in order to avoid any nutritional influence on its lipid composition. After red blood cells isolation, lipids were extracted and the composition and the structure of phospholipids including plasmalogens were determined by global lipidomics using liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry (LC-HRMS).

Results: LC-HRMS data confirmed our previous observations by showing a negative association between the erythrocyte content in phospholipid esterified to n-6 PUFAs and GA in infants not developing ROP (rSpearman = -0.485, p = 0.013 and rSpearman = -0.477, p = 0.015 for ethanolamine and choline total phospholipids, respectively). Phosphatidylcholine (PC) and phosphatidylethanolamine (PE) species esterified with AA, namely PC 16:0/20:4 (rSpearman = -0.511, p < 0.01) and PE 18:1/20:4 (rSpearman = -0.479, p = 0.015), were the major contributors to the relationship observed. On the contrary, preterm infants developing ROP displayed negative association between PE species with n-3 PUFAs and GA (rSpearman = -0.380, p = 0.034). They were also characterized by a positive association between GA and the ratio of ethanolamine plasmalogens (PlsE) with n-6 PUFA to PlsE with n-3 PUFAs (rSpearman = 0.420, p = 0.029), as well as the ratio of PlsE with AA to PlsE with DHA (rSpearman = 0.843, p = 0.011).

Conclusions: These data confirm the potential accumulation of n-6 PUFAs with advancing GA in erythrocytes of infants developing ROP. These changes may be partly due to plasmalogens.

Introduction

Retinopathy of prematurity (ROP) is the leading cause of childhood blindness with an estimated incidence ranging from 6 to 34% in developed countries[1,2]. ROP is characterized by a first phase of vaso-obliteration in the central retina (phase 1), followed by the overexpression of pro-angiogenic growth factors such angiopoietins and VEGF[3-5] associated to neovascular events in the retina (phase 2)[6]. As a result, mature retinal vessels exhibit several major abnormalities, such as increased dilatation and tortuosity, as well as vascular leakage6.

Previous studies have reported that the polyunsaturated fatty acids (PUFAs) such as arachidonic acid (AA, C20:4 n-6) and docosahexaenoic acid (DHA, C22:6 n-3) influence retinal vascularization processes in mouse models of oxygen-induced retinopathy, a mouse model of ROP[7,8]. Moreover, human studies revealed alterations in blood levels of PUFAs in preterm newborns developing ROP[9-11]. Particularly in the OmegaROP study, we have shown an accumulation of AA at the expense of DHA in erythrocytes of preterm infants that will develop ROP. In cell membranes, PUFAs such as AA and DHA are esterified on membrane phospholipids, from which they can be released by phospholipases for further intracellular metabolization and/or signaling. Within these phospholipids, plasmalogens represent a particular sub-class characterized by the presence of a vinyl-ether bond at *sn*-1 position of glycerol instead of an ester bond. Plasmalogens are considered as “reservoirs” for PUFAs such as AA and DHA[12] and we have shown that plasmalogens are abundant in the human retina[13-15]. Interestingly, we have also shown that plasmalogen-deficient mice exhibit retinal vascular

abnormalities resembling to those observed in ROP[16,17]. Indeed, retinal vascular development in these mice was characterized by a delayed outgrowth followed by increased angiogenesis associated to the overexpression of pro-angiogenic factors such as angiopoietins[16].

In this work, we aimed to assess whether the differential accumulation of AA and DHA in preterm infants of the OmegaROP study is associated to plasmalogens. By using high-resolution mass spectrometry (HRMS), we evaluated the concentrations of individual phospholipids species in erythrocytes of preterm infants that will or not develop ROP. In this study, blood was collected immediately after birth, in order to limit the interference with lipid nutritional intakes, and recorded the incidence of ROP.

Materials and methods

Ethics statement

This study was conducted in accordance with the guidelines of the Declaration of Helsinki. The experimental procedures were approved by local ethics committee (CPP Est III, School of Medicine, Dijon, France) that waived the obtainment of a written consent. Instead of, an information note was given to parents and/or legal guardians. In accordance with “ethical considerations for clinical trials on medicinal products conducted with the paediatric population”, the volume of blood collected in preterm infants was limited to 0.5 mL[18].

Selection of the patients

As described previously[11], all preterm infants born before 29 weeks GA and hospitalized in the neonatal intensive care unit of the Dijon University Hospital, Dijon, France, between July 31st 2015 and January 31st 2018 were included in the study. A 0.5-mL blood sample was collected by venipuncture in a heparinized tube within the first 48 h of life. Red blood cells were immediately separated from serum and samples were stored at –80°C until lipidomic analyses.

ROP screening was performed with the wide-field RETCAM II® camera (Clarity Medical Systems; Pleasanton, CA, USA) using a lid speculum after topical anesthesia by chlorhydrate oxybuprocain (1.6 mg/0.4 mL). Pupillary dilation was previously performed using one drop of 2.5% epinephrine (Phenylephrine 5% diluted to 2.5%) and one drop of tropicamide (2 mg/0.4 mL). The procedure was completed by a trained nurse and all fundus photographs were analyzed by a trained pediatrics-specialized ophthalmologist. Screening began at 4 to 6 weeks of life but never before 31 weeks of postconceptional age (PCA). Fundus imaging was repeated every other week until 39 weeks PCA if no

ROP was detected, and every week or up to twice a week in case of ROP. ROP staging was determined according to the International Classification of ROP19. Subjects were classified in the group suffering from ROP (ROP group) or in the group of unaffected controls (no-ROP group). Within the ROP group, subjects were classified into ROP type 1 and ROP type 2. The major risks of developing ROP, namely term and weight at birth, duration of mechanical ventilation, sepsis, use of erythropoietin, red blood cell transfusion and cerebral hemorrhage were documented.

Characterization and quantification of individual phospholipid species

The concentrations of individual phospholipids species of erythrocytes was determined by Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography coupled to High Resolution Mass Spectrometry (HILIC-HR-MS).

Liquid chromatography analyses were performed using a Dionex UltiMate™ 3000 LC pump from Thermo Scientific (San Jose, CA, USA) equipped with an autosampler. The injection volume was 10°µL. Separation of lipid classes was achieved under HILIC conditions using an Accucore HILIC column (150°mm x 2.1°mm i.d., 2.6°µm, Thermo). The column was maintained at 40°C. The solvent-gradient system of the analytical pump was as follows: 0°min 100% A, 10°min 92%A, 40°min 50% A, 41-60°min 100% A. The flow rate was set to 500°µL.min−1. HR-MS analyses of phospholipids were carried out using the Orbitrap FusionTM (Thermo Scientific, USA) Mass Spectrometer equipped with an EASY-MAX NGTM Ion Source (H-ESI). H-ESI source parameters were optimized and set as follows: ion transfer tube temperature of 285°C, sheath gas flow rate of 35°au, auxiliary gas flow rate of 25°au, sweep gas of 1°au, and vaporizer temperature of 370°C. 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 target resolution of 120,000 (FWHM at m/z°200). All MS data were recorded using a max injection time of 50°ms, automated gain control (AGC) at 4.105 and one microscan. An Intensity Threshold filter of 1.103 counts was applied. For MS/MS analyses, High-energy Collisional Dissociation (HCD) was employed for the fragmentation of PL species with optimized stepped collision energy of 30% (±5%). The linear ion trap (LIT) was used to acquire spectra for fragment ions in data-dependent mode. The AGC target was set to 2.104 with a max injection time of 50°ms. All MS and MS/MS data were acquired in the profile mode. The Orbitrap Fusion was controlled by XcaliburTM 4.1 software. The identification of PL species was performed, using the data of high accuracy and the information collected from fragmentation spectra (tolerance 5°ppm for MS1

and 20°ppm for MS2), with the help of the LipidSearchTM software and the LIPID MAPS® database (https://www.lipidmaps.org/).

Relative quantification of the abundances of choline phospholipids [including phosphatidylcholines (PC) and plasmenylcholines (choline plasmalogens orPlsC)] and ethanolamine phospholipids [including phosphatidylethanolamines (PE) and plasmenylethanolamines (ethanolamine plasmalogens or PlsE)] molecular species between samples was performed in the high resolution MS1 mode (positive for PC, negative for PE) by normalization of targeted phospholipid ion peak areas to the PC14:0/14:0 or PE14:0/14:0 internal standard respectively. Due to the lack of available lipid standards representing individual molecular species of PE and PC, the abundances of PC and PE molecular species was reported as the percentage of the total PC or PE ion abundance, respectively (after normalization on the PC14 :0/14 :0 and PE14:0/14:0 internal standards).

Statistical analyses

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism v6.05 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) and XLSTAT v2018.02.50494 (Addinsoft, Paris, France). Quantitative data are expressed as median and interquartile range [IQR]. The groups were compared using the nonparametric Mann-Whitney test for quantitative variables and the Chi-2 test or Fisher exact test for qualitative variables. Linear regression analyses were carried out to compare the levels of individual or total levels of phospholipids and ratios as a function of GA. A p-value lower than 0.05 was considered as statistically significant and the tests were two-tailed.

Results

Characteristics of the population

The characteristics of the population are presented in Table 1. As described before[11], fifty-eight preterm infants born before 29 weeks of gestational age (GA) were included in the study. Six infants died and the mortality rate was of 11.5%. The final population included five sets of heterozygote twins. Blood samples were obtained from 52 infants at a median time of 12 h and a maximum time of 48 h after birth. No difference was observed between the ROP and the no-ROP groups for sampling time, gender, use of EPO and cerebral hemorrhage. ROP was associated with significantly higher sepsis and red blood cell transfusion ($p = 0.023$ and $p = 0.025$, respectively), lower GA and birth weight ($p < 0.001$ and $p = 0.001$, respectively) and higher duration of mechanical ventilation ($p < 0.001$). The mean follow-up for ROP screening was 11.3 ± 4.5 weeks of life.

The mean number of screening examinations was 3.6 ± 2.0 per infant. The incidence of ROP was of 51.9%, including three cases of type 1 ROP (11.1%) and 24 cases of type 2 ROP (88.9%). Subjects with type 1 ROP underwent laser therapy on both eyes. No intravitreal injection of bevacizumab was used. Twenty-six ROP cases were observed in zone 2 (96.3%) and one ROP case was observed in zone 3(3.7%). We did not observe any ROP in zone 1. One case of ROP was at stage 1 (3.7%), 19 cases were at stage 2 (70.4%) and seven cases were at stage 3 (25.9%). Four subjects were classified as a stage "plus" and three of them underwent laser treatment.

Individual phospholipid species distribution in erythrocytes

Except for PE18:1/18:2+PE16:0/20:3, no significant difference was observed between groups in the proportions of individual ethanolamine- and choline- phospholipid species as well as in total levels of phosphatidylcholines (PC), plasmenylcholines (PlsC), phosphatidylethanolamines (PE), and plasmenylethanolamines (PlsE) (Table 2). The predominant species were PC16:0/18:1, PC16:0/16:0 and PC16:0/20:4+PC16:1/20:3 for choline phospholipids and PE16:0/18:1, PE16:2/20:4+PE16:1/20:3, and PE18:0/20:4+16:0/22:4 for ethanolamine phospholipids. The most represented plasmalogen species were PlsC16:0/16:1, PlsC18:0/16:0 and PlsC18:1/18:2 for the choline subgroup and PlsE18:1/22:4 and PlsE18:0/22:4 the ethanolamine subgroup. The wide interquartile ranges confirmed the high interindividual variability previously observed for the fatty acid concentrations[11].

Associations between gestational age and erythrocyte phospholipid species

As for our previous work on the OmegaROP cohort, and considering the results of the principal component analysis showing an interaction between GA and lipid data[11], we checked for Spearman correlations between GA and individual phospholipid species (Table 3). In order to identify the phospholipid origin of the differential accumulation of AA and/or DHA in subjects with or without ROP, we have focused our attention on phospholipids carrying n-6 and n-3 PUFAs. Total choline and ethanolamine phospholipids carrying n-6 PUFAs were negatively associated with GA in the no-ROP group (rSpearman = -0.485, p = 0.013 and rSpearman = -0.477, p = 0.015 for PC+ PlsC and PE+PlsE, respectively). Within the choline subgroup, this negative association was significant only for total PC species esterified with n-6 PUFAs (rSpearman = -0.509, p = 0.009), but not for PlsC. PC species carrying AA are likely to contribute to this finding since total PC species carrying AA were also strongly negatively associated with GA in the no-ROP group (rSpearman = -0.495, p = 0.011), and particularly the individual PC16:0/20:4, PC18:1/20:4, and PC18:0/20:4 species (Table 4). These phospholipids represented 28.8% of total PC species, as well as 88.4% of total PC species carrying AA (Figure 1A). Their sum was negatively associated to GA in the no-ROP group (rSpearman = -0.483, p =

0.012, Figure 1B). Within ethanolamine phospholipids, only PlsE carrying n-6 PUFAs were negatively associated with GA (rSpearman = -0.587, p = 0.002). PlsE18:1/20:4 may be a significant contributor to this observation (rSpearman = -0.395, p = 0.049). No significant association was observed for PE species.

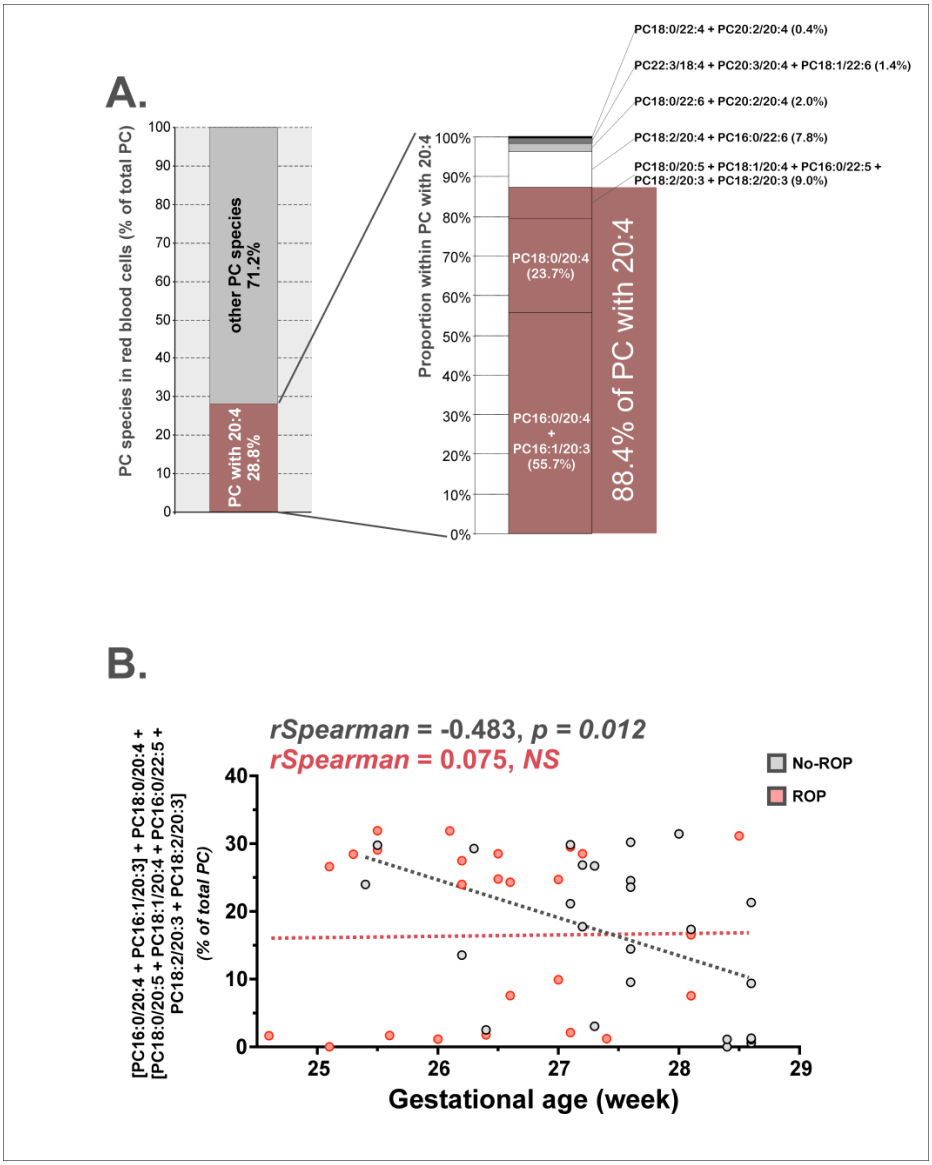

Figure 1: Phosphatidylcholines with AA are associated with GA in preterm infants without ROP. A) PC with AA (20:4) accounted for 28.8% of total retinal PC species. Within these entities, PC species whose mass corresponded to PC16:0/20:4 ([M+H]+=782.5695), PC18:1/20:4 ([M+H]+=808.5851), and PC18:0/20:4 ([M+H]+=810.6008) represented 88.4% of the total PC with 20:4. **B)** The sum of PC whose mass corresponded to PC16:0/20:4 ([M+H]+=782.5695), PC18:1/20:4 ([M+H]+=808.5851), and PC18:0/20:4 ([M+H]+=810.6008) was negatively associated to GA in erythrocytes of preterm infants of the no-ROP group (rSpearman = -0.483, p = 0.012). Abbreviations of individual PC species are as follows: position on the glycerol backbone as shown as sn-1 / sn-2 of the fatty alcohol radicals (abbreviated as number of carbons: number of double bonds).

In the no-ROP group, no significant association between GA and phospholipids carrying n-6 PUFAs was observed (Tables 3 and 4). Only a significant negative association was observed between GA and total ethanolamine phospholipids esterified with n-3 PUFAs (rSpearman = -0.380, p = 0.034). Probably as a consequence, the ratios of total PE with n-6 PUFAs to total PE with n-3 PUFAs, total PlsE with n-6 PUFAs to total PlsE with n-3 PUFAs, and total PE with AA to total PE with DHA were impacted and positively associated with GA in the ROP group (rSpearman = 0.420, 0.886, and 0.843, p = 0.029, 0.006, and 0.011, respectively; Table 3).

Discussion

This study characterizes the phospholipid composition of erythrocyte in preterm infants born before 29 weeks GA. The clinical characteristics of our population were comparable with those of several studies. Indeed, the incidence of ROP was high (51.9%) and in agreement with other very-low-GA populations[20].

Our data show a negative association between choline- and ethanolamine phospholipids carrying n-6 PUFAs with GA in the no-ROP group, while no significant association was observed in the ROP group. These findings are in the line of our previous reports related to the OmegaROP study[11]. Considering that choline- and ethanolamine phospholipids species represent more than 90% of total phospholipids in erythrocytes[13,21,22], we assumed that the changes observed in their concentrations would be a reliable indicator of the whole phospholipid pool in erythrocytes. However, further analyses on phosphatidylserines and phosphatidylinositols could be of interest to draw a more complete picture of erythrocyte phospholipidome alterations in ROP.

In preterm infants who will not develop ROP, erythrocyte relative levels of phospholipids carrying AA decrease as GA increases, while no change was observed in preterm infants who will develop ROP. This negative correlation mostly relies on PC species and more specifically on individual PC16:0/20:4, PC18:1/20:4, and PC18:0/20:4 entities. This finding is highly consistent with others that revealed a similar remodeling in PC species esterified with AA in preterm infants[23,24], including in those developing bronchopulmonary dysplasia (BPD)[25] a disorder that is correlated with extreme prematurity, and subsequently with ROP[26]. These data are consistent since AA is considered as playing a pivotal role in the promotion of inflammation, especially through its eicosanoid derivatives such as prostaglandin E2 (PGE2). PGE2 is known to be involved in pathological angiogenesis and in the pathogenesis of proliferative retinopathies such as ROP[27-30]. Accordingly, other studies have shown that inflammation is a significant risk factor for developing ROP[5,31]. Finally, it is recognized that

AA competes with DHA, this last being known to inhibit retinal pathological neovascularization in a mouse model of ROP[7].

Interestingly, the n-6 to n-3 PUFA ratio in erythrocytes seems to display a similar pattern when considering PlsE species, as PlsE carrying n-6 PUFAs were negatively associated with GA (rSpearman = -0.587, p = 0.002), with PlsE18:1/20:4 being the most significant contributor to this observation (rSpearman = -0.395, p = 0.049). Considering that erythrocyte lipid composition could represent a reliable indicator of the lipid composition of the retina in newborns[32-34], we may speculate that retinal lipids display similar modifications in AA, DHA and plasmalogen levels of newborns developing ROP.

While PUFAs status of the newborn correlates with maternal status[25], and as it can be influenced by dietary supplementation after birth[35], plasmalogen content of tissues only relies on fetal de novo synthesis as no materno-fetal transfer of ether-lipids has been demonstrated so far[36]. In our study, blood samples were collected within the first 48 h of life. Considering that the erythrocyte life-span ranges from 35 to 50 days in preterm infants[37], the modifications observed in the present study might be assigned to differences in in situ lipid metabolisms rather than to a nutritional influence.

Several limitations must be acknowledged in our study. First, our population included a limited number of subjects. Second, our population only includes three preterm infants with severe ROP, while this population is specifically concerned by treatments targeting vascular events. Furthermore, while PC and PE species are the main contributors to erythrocytes phospholipidome, further lipidomic analyses including PS and PI individual phospholipid species could provide useful complementary information.

Taken together, our results confirm the alterations of erythrocyte PUFA profile in preterm infants developing ROP and bring evidences that plasmalogens may contribute to these alterations. Considering the importance of plasmalogens in the cellular bioavailability of PUFAs and their involvement in the vascular development of the retina, our study suggests that investigating the relationships between plasmalogen metabolism and ROP could be of particular interest to deeply understand the pathophysiological mechanisms driving ROP.

References

1. Good, W.V. and R.J. Hardy, The multicenter study of Early Treatment for Retinopathy of Prematurity (ETROP). Ophthalmology, 2001. 108(6): p. 1013-4.

2. Jordan, C.O., Retinopathy of prematurity. Pediatr Clin North Am, 2014. 61(3): p. 567-77.

3. Sato, T., C. Shima, and S. Kusaka, Vitreous levels of angiopoietin-1 and angiopoietin-2 in eyes with retinopathy of prematurity. Am J Ophthalmol, 2011. 151(2): p. 353-7 e1.

4. Sonmez, K., K.A. Drenser, A. Capone, Jr., and M.T. Trese, Vitreous levels of stromal cell-derived factor 1 and vascular endothelial growth factor in patients with retinopathy of prematurity. Ophthalmology, 2008. 115(6): p. 1065-1070 e1.

5. Rivera, J.C., M. Holm, D. Austeng, T.S. Morken, T.E. Zhou, A. Beaudry-Richard, E.M. Sierra, O. Dammann, and S. Chemtob, Retinopathy of prematurity: inflammation, choroidal degeneration, and novel promising therapeutic strategies. J Neuroinflammation, 2017. 14(1): p. 165.

6. Hellstrom, A., L.E. Smith, and O. Dammann, Retinopathy of prematurity. Lancet, 2013. 382(9902): p. 1445-57.

7. Connor, K.M., J.P. SanGiovanni, C. Lofqvist, C.M. Aderman, J. Chen, A. Higuchi, S. Hong, E.A. Pravda, S. Majchrzak, D. Carper, A. Hellstrom, J.X. Kang, E.Y. Chew, N. Salem, Jr., C.N. Serhan, and L.E. Smith, Increased dietary intake of omega-3-polyunsaturated fatty acids reduces pathological retinal angiogenesis. Nat Med, 2007. 13(7): p. 868-73.

8. Sapieha, P., A. Stahl, J. Chen, M.R. Seaward, K.L. Willett, N.M. Krah, R.J. Dennison, K.M. Connor, C.M. Aderman, E. Liclican, A. Carughi, D. Perelman, Y. Kanaoka, J.P. Sangiovanni, K. Gronert, and L.E. Smith, 5-Lipoxygenase metabolite 4-HDHA is a mediator of the antiangiogenic effect of omega-3 polyunsaturated fatty acids. Sci Transl Med, 2011. 3(69): p. 69ra12.

9. Martin, C.R., D.A. Dasilva, J.E. Cluette-Brown, C. Dimonda, A. Hamill, A.Q. Bhutta, E. Coronel, M. Wilschanski, A.J. Stephens, D.F. Driscoll, B.R. Bistrian, J.H. Ware, M.M. Zaman, and S.D. Freedman, Decreased postnatal docosahexaenoic and arachidonic acid blood levels in premature infants are associated with neonatal morbidities. J Pediatr, 2011. 159(5): p. 743-749 e1-2.

10. Lofqvist, C.A., S. Najm, G. Hellgren, E. Engstrom, K. Savman, A.K. Nilsson, M.X. Andersson, A.L. Hard, L.E.H. Smith, and A. Hellstrom, Association of Retinopathy of Prematurity With Low Levels of Arachidonic Acid: A Secondary Analysis of a Randomized Clinical Trial. JAMA Ophthalmol, 2018. 136(3): p. 271-277.

11. Pallot, C., J. Mazzocco, C. Meillon, D.S. Semama, C. Chantegret, N. Ternoy, D. Martin, A. Donier, S. Gregoire, C.P. Creuzot-Garcher, A.M. Bron, L. Bretillon, and N. Acar, Alteration of erythrocyte membrane polyunsaturated fatty acids in preterm newborns with retinopathy of prematurity. Sci Rep, 2019. 9(1): p. 7930.

12. Nagan, N. and R.A. Zoeller, Plasmalogens: biosynthesis and functions. Prog Lipid Res, 2001. 40(3): p. 199-229.

13. Acar, N., O. Berdeaux, S. Gregoire, S. Cabaret, L. Martine, P. Gain, G. Thuret, C.P. Creuzot-Garcher, A.M. Bron, and L. Bretillon, Lipid composition of the human eye: are red blood cells a good mirror of retinal and optic nerve fatty acids? PLoS ONE, 2012. 7(4): p. e35102.

14. Berdeaux, O., P. Juaneda, L. Martine, S. Cabaret, L. Bretillon, and N. Acar, Identification and quantification of phosphatidylcholines containing very long chain polyunsaturated fatty acid (VLC-PUFA) in bovine and human retina by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. J Chromatogr A, 2010. 1217(49): p. 7738-7748.

15. Bretillon, L., G. Thuret, S. Gregoire, N. Acar, C. Joffre, A.M. Bron, P. Gain, and C.P. Creuzot-Garcher, Lipid and fatty acid profile of the retina, retinal pigment epithelium/choroid, and the lacrimal gland, and associations with adipose tissue fatty acids in human subjects. Exp Eye Res, 2008. 87(6): p. 521-8.

16. Saab, S., B. Buteau, L. Leclere, A.M. Bron, C.P. Creuzot-Garcher, L. Bretillon, and N. Acar, Involvement of plasmalogens in post-natal retinal vascular development. PLoS ONE, 2014. 9(6): p. e101076.

17. Saab-Aoude, S., A.M. Bron, C.P. Creuzot-Garcher, L. Bretillon, and N. Acar, A mouse model of in vivo chemical inhibition of retinal calcium-independent phospholipase A2 (iPLA2). Biochimie, 2013. 95(4): p. 903-11.

18. European Union. Ethical considerations for clinical trials on medicinal products conducted with the paediatric population. Eur J Health Law, 2008. 15(2): p. 223-50.

19. International Committee for the Classification of Retinopathy of, P., The International Classification of Retinopathy of Prematurity revisited. Arch Ophthalmol, 2005. 123(7): p. 991-9.

20. Austeng, D., K.B. Kallen, U.W. Ewald, P.G. Jakobsson, and G.E. Holmstrom, Incidence of retinopathy of prematurity in infants born before 27 weeks' gestation in Sweden. Arch Ophthalmol, 2009. 127(10): p. 1315-9.

21. Acar, N., O. Berdeaux, P. Juaneda, S. Gregoire, S. Cabaret, C. Joffre, C.P. Creuzot-Garcher, L. Bretillon, and A.M. Bron, Red blood cell plasmalogens and docosahexaenoic acid are independently reduced in primary open-angle glaucoma. Exp Eye Res, 2009. 89(6): p. 840-53.

22. Acar, N., S. Gregoire, A. Andre, P. Juaneda, C. Joffre, A.M. Bron, C.P. Creuzot-Garcher, and L. Bretillon, Plasmalogens in the retina: in situ hybridization of dihydroxyacetone phosphate acyltransferase (DHAP-AT)--the first enzyme involved in their biosynthesis--and comparative study of retinal and retinal pigment epithelial lipid composition. Exp Eye Res, 2007. 84(1): p. 143-51.

23. Bernhard, W., M. Raith, V. Koch, R. Kunze, C. Maas, H. Abele, C.F. Poets, and A.R. Franz, Plasma phospholipids indicate impaired fatty acid homeostasis in preterm infants. Eur J Nutr, 2014. 53(7): p. 1533-47.

24. Bockmann, K.A., A. von Stumpff, W. Bernhard, A. Shunova, M. Minarski, B. Frische, S. Warmann, E. Schleicher, C.F. Poets, and A.R. Franz, Fatty acid composition of adipose tissue at term indicates deficiency of arachidonic and docosahexaenoic acid and excessive linoleic acid supply in preterm infants. Eur J Nutr, 2021. 60(2): p. 861-872.

25. Bernhard, W., M. Raith, V. Koch, C. Maas, H. Abele, C.F. Poets, and A.R. Franz, Developmental changes in polyunsaturated fetal plasma phospholipids and feto-maternal plasma phospholipid ratios and their association with bronchopulmonary dysplasia. Eur J Nutr, 2016. 55(7): p. 2265-74.

26. Podraza, W., B. Michalczuk, K. Jezierska, H. Domek, A. Kordek, B. Loniewska, M. Modrzejewska, and J. Kot, Correlation of Retinopathy of Prematurity with Bronchopulmonary Dysplasia. Open Med (Wars), 2018. 13: p. 67-73.

27. Yanni, S.E., J.M. Barnett, M.L. Clark, and J.S. Penn, The role of PGE2 receptor EP4 in pathologic ocular angiogenesis. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2009. 50(11): p. 5479-86.

28. Hartnett, M.E. and J.S. Penn, Mechanisms and management of retinopathy of prematurity. N Engl J Med, 2012. 367(26): p. 2515-26.

29. Xie, T., Z. Zhang, Y. Cui, Y. Shu, Y. Liu, J. Zou, M. Wang, Y. Wang, Q. Yang, X. Pan, J. Cai, X. Sun, Y. Yao, and X. Wang, Prostaglandin E2 promotes pathological retinal neovascularisation via EP4R-EGFR-Gab1-AKT signaling pathway. Exp Eye Res, 2021. 205: p. 108507.

30. Schoenberger, S.D., S.J. Kim, J. Sheng, K.A. Rezaei, M. Lalezary, and E. Cherney, Increased prostaglandin E2 (PGE2) levels in proliferative diabetic retinopathy, and correlation with VEGF and inflammatory cytokines. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2012. 53(9): p. 5906-11.

31. Holm, M., T.S. Morken, R.N. Fichorova, D.K. VanderVeen, E.N. Allred, O. Dammann, A. Leviton, E.S. Neonatology, and C. Ophthalmology, Systemic Inflammation-Associated Proteins and Retinopathy of Prematurity in Infants Born Before the 28th Week of Gestation. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2017. 58(14): p. 6419-6428.

32. Carlson, S.E., J.D. Carver, and S.G. House, High fat diets varying in ratios of polyunsaturated to saturated fatty acid and linoleic to linolenic acid: a comparison of rat neural and red cell membrane phospholipids. J Nutr, 1986. 116(5): p. 718-25.

33. Sarkadi-Nagy, E., V. Wijendran, G.Y. Diau, A.C. Chao, A.T. Hsieh, A. Turpeinen, P. Lawrence, P.W. Nathanielsz, and J.T. Brenna, Formula feeding potentiates docosahexaenoic and arachidonic acid biosynthesis in term and preterm baboon neonates. J Lipid Res, 2004. 45(1): p. 71-80.

34. Makrides, M., M.A. Neumann, R.W. Byard, K. Simmer, and R.A. Gibson, Fatty acid composition of brain, retina, and erythrocytes in breast- and formula-fed infants. Am J Clin Nutr, 1994. 60(2): p. 189-94.

35. Schulzke, S.M., S.K. Patole, and K. Simmer, Long-chain polyunsaturated fatty acid supplementation in preterm infants. Cochrane Database Syst Rev, 2011(2): p. CD000375.

36. Das, A.K., R.D. Holmes, G.N. Wilson, and A.K. Hajra, Dietary ether lipid incorporation into tissue plasmalogens of humans and rodents. Lipids, 1992. 27(6): p. 401-5.

37. Pearson, H.A., Life-span of the fetal red blood cell. J Pediatr, 1967. 70(2): p. 166-71.

Acknowledgment

The authors would like to thank the VISIO Foundation for its support.

Author contributions: CP, CM, DSM, CPC-G, LB, NA designed the study. RK, CP, SC, JM, DSM, CC, NT, DM, AD, SG, OB, NA acquired, analyzed and interpreted the data. RK, CP, JM, DSM, AMB, CPC-G, LB, OB, NA drafted the manuscript. All authors reviewed the manuscript.

Competing interests: The author(s) declare no competing interests related to this study.

Table 1: Main characteristics of the OmegaROP population

	Total population *n* = 52	ROP *n* = 27	No-ROP *n* = 25	*p*-value
Sampling time (h)	12 [12-24]	12 [12-21]	12 [12-30]	0.056
Male	26 (50.0)	14 (51.8)	12 (48.0)	0.781
Gestational age (weeks)	27.1 [26.2-27.7]	26.5 [25.5-27.1]	27.6 [27.1-28.4]	**<0.001**
Birth weight (g)	887 [797-1081]	815 [735-967]	1020 [870-1160]	**0.001**
ROP	27 (51.9)	27 (100)	-	-
ROP treated	3 (5.8)	3 (11.1)	-	-
ROP detection (weeks)	8.2 [6.6-9.5]	8.2 [6.6-9.5]	-	-
Mechanical ventilation (days)	7.0 [1.0-14.0]	11.0 [5.5-16.5]	2.0 [1.0-7.0]	**<0.001**
Sepsis	23 (44.2)	16 (59.2)	7 (28.0)	**0.023**
Erythropoietin use	33 (63.4)	18 (66.6)	15 (60.0)	0.617
RBC transfusion	25 (48.0)	17(62.9)	8(32.0)	**0.025**
Cerebral haemorrhage	25 (48.0)	13 (48.1)	12 (48.0)	0.991

Continuous variables are expressed as median [IQR], categorical variables are expressed as No. (%)

ROP: retinopathy of prematurity; RBC: red blood cells

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

Table 2: Concentrations of individual phospholipid species of red blood cells of preterm infants without or with retinopathy of prematurity (% of total plasmenylcholines or phosphatidylethanolamines)

		No-ROP		**ROP**		
	[M+H]+ or [M-H]-[a]	**median**	*[IQR]*[b]	**median**	*[IQR]*	*p*-value
PC14:0/16:0	706.5382	**2.84**	*[1.59–5.35]*	**2.69**	*[1.81-3.69]*	*0.974*
PC15:0/16:0	720.5538	**0.80**	*[0.40-1.43]*	**0.82**	*[0.46-1.26]*	*0.781*
PlsC16:0/16:1	720.5902	**1.04**	*[0.67-2.64]*	**1.05**	*[0.56-1.98]*	*0.582*
PC16:1/16:1	730.5382	**0.10**	*[0.00-0.15]*	**0.09**	*[0.00-0.14]*	*0.897*
PC16:0/16:1	732.5538	**3.31**	*[41.96-4.59]*	**3.15**	*[1.84-4.39]*	*0.533*
PC16:0/16:0	734.5695	**13.73**	*[7.28-31.24]*	**14.00**	*[8.15-23.80]*	*0.936*
PlsC16:0/18:1	744.5902	**0.06**	*[0.00-0.20]*	**0.07**	*[0.00-0.16]*	*0.829*
PC15:0/18:0	746.5695	**0.50**	*[0.42-0.57]*	**0.46**	*[0.40-0.57]*	*0.672*
PlsC18:0/16:0	746.6058	**0.94**	*[0.76-1.14]*	**0.86**	*[0.59-1.19]*	*0.550*
PC16:0/18:2	758.5695	**7.03**	*[4.07-8.64]*	**6.52**	*[4.02-8.29]*	*0.908*
PC16:0/18:1	760.5851	**23.32**	*[18.27-25.66]*	**23.33**	*[17.99-25.58]*	*0.952*

PC16:0/18:0	762.6008	**3.28**	*[2.62-5.09]*	**3.27**	*[2.53-5.14]*	*0.802*
PlsC18:1/18:3	766.5745	**0.00**	*[0.00-0.33]*	**0.24**	*[0.00-0.64]*	*0.155*
PlsC18:1/18:2	768.5902	**0.89**	*[0.00-1.14]*	**0.73**	*[0.00-1.01]*	*0.516*
PlsC18:1/18:0	772.6215	**0.21**	*[0.00-0.33]*	**0.16**	*[0.00-0.33]*	*0.973*
unknown	774.6008	**0.30**	*[0.00-0.38]*	**0.33**	*[0.00-0.48]*	*0.555*
PlsC18:0/18:0	774.6371	**0.10**	*[0.00-0.23]*	**0.11**	*[0.00-0.19]*	*0.746*
PC16:0/20:4 + PC16:1/20:3	782.5695	**11.80**	*[1.92-16.75]*	**15.50**	*[1.10-17.56]*	*0.726*
PC18:1/18:2	784.5851	**3.24**	*[1.96-5.21]*	**2.30**	*[1.35-4.12]*	*0.230*
PC18:1/18:1	786.6008	**3.31**	*[1.53-4.34]*	**3.34**	*[2.43-3.98]*	*0.931*
PC18:0/18:1	788.6164	**3.22**	*[1.59-3.44]*	**3.30**	*[2.05-3.67]*	*0.601*
PC18:0/18:0	790.6321	**0.00**	*[0.00-0.40]*	**0.30**	*[0.00-0.42]*	*0.804*
PlsC18:1/20:4 + PlsC16:1/22:4	792.5902	**0.00**	*[0.00-0.17]*	**0.00**	*[0.00-0.23]*	*0.904*
PlsC18:0/20:4 + PlsC16:0/22:4	794.6058	**0.00**	*[0.00-0.82]*	**0.00**	*[0.00-0.85]*	*0.962*
PlsC18:0/20:3 + PlsC18:1/20:2	796.6215	**0.00**	*[0.00-0.70]*	**0.00**	*[0.00-0.66]*	*0.711*
unknown	804.5538	**0.32**	*[0.19-0.52]*	**0.36**	*[0.26-0.50]*	*0.780*
PC18:2/20:4 + PC16:0/22:6	806.5695	**1.55**	*[0.00-3.09]*	**2.03**	*[0.00-2.66]*	*0.646*
PC18:0/20:5 + PC18:1/20:4 + PC16:0/22:5 + PC18:2/20:3 + PC18:2/20:3	808.5851	**1.29**	*[0.37-2.67]*	**1.26**	*[0.25-2.86]*	*0.996*
PC18:0/20:4	810.6008	**4.80**	*[0.77-7.38]*	**2.01**	*[0.45-7.54]*	*0.719*
PC18:0/20:2	814.6321	**0.03**	*[0.00-0.16]*	**0.10**	*[0.00-0.15]*	*0.965*
PlsC18:0/22:6	818.6058	**0.00**	*[0.00-0.16]*	**0.00**	*[0.00-0.17]*	*0.953*
PlsC18:1/22:4 + PlsC18:0/22:5	820.6215	**0.00**	*[0.00-0.19]*	**0.00**	*[0.00-0.19]*	*0.971*
PlsC18:0/22:4	822.6371	**0.19**	*[0-14-0.39]*	**0.18**	*[0.05-0.25]*	*0.605*
PlsC18:1/22:2	824.6528	**0.00**	*[0.00-0.13]*	**0.00**	*[0.00-0.12]*	*0.679*
PlsC18:1/22:1	826.6684	**0.00**	*[0.00-0.04]*	**0.00**	*[0.00-0.03]*	*0.397*
PC20:5/22:6	828.5538	**0.00**	*[0.00-0.05]*	**0.00**	*[0.00-0.05]*	*0.803*
unknown	830.5695	**0.33**	*[0.25-0.59]*	**0.36**	*[0.19-0.59]*	*0.780*
PC22:3/18:4 + PC20:3/20:4 +	832.5851	**0.00**	*[0.00-0.64]*	**0.00**	*[0.00-0.67]*	*0.999*

PC18:1/22:6						
PC18:0/22:6 + PC20:2/20:4	834.6008	**0.00**	*[0.00-0.04]*	**0.00**	*[0.00-1.01]*	*0.914*
PC18:0/22:4 + PC20:0/20:4	838.6321	**0.00**	*[0.00-0.05]*	**0.00**	*[0.00-0.23]*	*0.928*
unknown	854.5695	**0.05**	*[0.00-0.12]*	**0.07**	*[0.00-0.12]*	*0.642*
PC20:0/22:1	872.7103	**0.01**	*[0.00-0.04]*	**0.03**	*[0.00-0.05]*	*0.400*
Total PC	-	**93.77**	*[91.97-94.75]*	**94.07**	*[92.10-95.44]*	*0.431*
Total PlsC	-	**5.29**	*[4.01-6.28]*	**3.97**	*[3.49-6.33]*	*0.230*
Total PC+PlsC	-	**98.91**	*[98.67-99.01]*	**98.74**	*[98.40-98.97]*	*0.284*
PE16:0/16:1	688.4923	**1.56**	*[1.10-2.07]*	**1.20**	*[1.02-1.73]*	*0.237*
PE16:0/16:0	690.5079	**1.20**	*[0.71-3.71]*	**1.15**	*[0.68-3.62]*	*0.960*
PE16:1/18:2 + PE16:2/18:1	700.5287	**0.01**	*[0.00-1.07]*	**0.08**	*[0.00-1.33]*	*0.469*
PlsE16:0/18:1	712.4921	**0.16**	*[0.13-0.19]*	**0.15**	*[0.13-0.21]*	*0.816*
PE16:0/18:2 + PE16:1/18:1	714.5079	**3.17**	*[2.59-3.52]*	**3.26**	*[2.35-3.95]*	*0.706*
PE16:0/18:1	716.5236	**17.62**	*[15.01-25.92]*	**19.56**	*[15.09-28.22]*	*0.533*
PlsE16:0/20:4	722.5130	**0.00**	*[0.00-1.41]*	**0.00**	*[0.00-2.29]*	*0.894*
unknown	726.5443	**0.00**	*[0.00-0.70]*	**0.00**	*[0.00-0.72]*	*0.856*
unknown	736.4923	**0.47**	*[0.05-0.57]*	**0.43**	*[0.00-0.56]*	*0.384*
PE16:0/20:4 + PE16:1/20:3	738.5079	**14.97**	*[9.77-20.14]*	**12.91**	*[3.43-19.87]*	*0.952*
PE18:1/18:2 + PE16:0/20:3	740.5236	**4.50**	*[3.25-5.68]*	**3.38**	*[2.66-4.60]*	***0.037***
PE18:1/18:1 + PE18:0/18:2 + PE16:0/20:2	742.5392	**3.28**	*[2.42-3.93]*	**3.10**	*[2.52-4.34]*	*0.633*
PE18:0/18:1 + PE16:0/20:1	744.5549	**3.30**	*[2.93-5.07]*	**3.42**	*[2.57-4.79]*	*0.816*
PlsE16:0/22:6	746.5130	**0.00**	*[0.00-0.65]*	**0.00**	*[0.00-0.94]*	*0.924*
PlsE18:1/20:4	748.5287	**0.00**	*[0.00-2.41]*	**0.00**	*[0.00-3.31]*	*0.736*
PlsE18:0/20:4 + PlsE16:0/22:4	750.5443	**0.00**	*[0.00-5.51]*	**0.00**	*[0..00-8.38]*	*0.857*
PE16:0/22:6 + PE18:1/20:5 + PE18:2/20:4	762.5079	**5.10**	*[1.54-5.77]*	**3.99**	*[0.37-5.71]*	*0.444*
PE18:1/20:4 + PE16:0/22:5	764.5236	**6.19**	*[1.01-7.63]*	**5.30**	*[0.81-7.30]*	*0.501*

PE18:0/20:4 + PE16:0/22:4	766.5392	**10.01**	*[4.97-14.08]*	**9.04**	*[2.07-13.83]*	*0.653*
PE18:0/20:2 + PE18:1/20:1 + PE18:2/20:0	770.5705	**0.00**	*[0.00-0.19]*	**0.00**	*[0.00-0.16]*	*0.799*
PlsE18:1/22:6	772.5287	**0.00**	*[0.00-0.67]*	**0.00**	*[0.00-1.03]*	*0.835*
PlsE18:0/22:6 + PlsE18:1/22:5	774.5443	**0.00**	*[0.00-1.93]*	**0.00**	*[0.00-3.01]*	*0.874*
PlsE18:1/22:4	776.5600	**0.38**	*[0.00-1.43]*	**0.29**	*[0.00-1.71]*	*0.588*
PlsE18:0/22:4	778.5756	**0.33**	*[0.00-1.92]*	**0.29**	*[0.00-2.32]*	*0.871*
PE20:4/20:4 + PE18:2/22:6	786.5079	**0.84**	*[0.36.1.41]*	**0.76**	*[0.19-1.20]*	*0.938*
PE18:1/22:6 + PE20:3/20:4	788.5236	**1.44**	*[0.00-2.56]*	**1.00**	*[0.00-2.10]*	*0.320*
PE18:0/22:6	790.5392	**1.50**	*[0.00-2.23]*	**1.16**	*[0.00-1.89]*	*0.320*
PE18:0/22:5 + PE18:1/22:4	792.5549	**0.96**	*[0.00-1.33]*	**0.82**	*[0.00-1.26]*	*0.521*
PE18:0/22:4 + PE20:0/20:4	794.5705	**0.83**	*[0.20-1.00]*	**0.76**	*[0.05-0.99]*	*0.537*
PE20:0/20:2	798.6018	**0.00**	*[0.00-0.00]*	**0.00**	*[0.00-0.00]*	*0.965*
PE20:4/22:6	810.5079	**0.56**	*[0.31-0.79]*	**0.39**	*[0.17-0.67]*	*0.359*
PE22:6/22:6	834.5079	**0.26**	*[0.07-0.66]*	**0.26**	*[0.06-1.15]*	*0.938*
Total PE	-	**98.44**	*[83.16-98.90]*	**98.48**	*[75.38-98.86]*	*0.902*
Total PlsE	-	**0.97**	*[0.61-16.10]*	**0.87**	*[0.47-23.69]*	*0.823*
Total PE+PlsE	-	**99.37**	*[98.84-99.44]*	**99.40**	*[99.07-99.51]*	*0.582*

[a]: [M+H]+ for PC, PlsC, and [M-H]- for PE and PlsE species

[b]: IQR: interquartile range

PC: phosphatidylcholine; PlsC: plasmenylcholine; PE: phosphatidylethanolamine: PlsE: plasmenylethanolamine

Abbreviations of individual PC, PlsC, PE, and PlsE species are as follows: position on the glycerol backbone as shown as *sn*-1/*sn*-2 of the fatty acid and fatty alcohol radicals (abbreviated as number of carbons: number of double bonds).

Table 3: Spearman correlations between gestational age and erythrocyte choline and ethanolamine phospholipids esterified with n-6 and/or n-3 PUFAs in preterm infants with or without retinopathy of prematurity.

	No-ROP *n* = 25		ROP *n* = 27	
	rSpearman	*p*-value	*rSpearman*	*p*-value
Total PC and PlsC with n-6 PUFAs	**-0.485**	**0.013**	0.079	0.693
Total PC and PlsC with n-3 PUFAs	-0.375	0.064	-0.160	0.422
Total PE and PlsE with n-6 PUFAs	**-0.477**	**0.015**	0.050	0.801
Total PE and PlsE with n-3 PUFAs	-0.117	0.575	**-0.380**	**0.034**
Total PC with n-6 PUFAs	**-0.509**	**0.009**	0.122	0.544
Total PlsC with n-6 PUFAs	-0.191	0.359	-0.198	0.319
Total PC with n-3 PUFAs	-0.391	0.052	-0.011	0.953
Total PlsC with n-3 PUFAs	-0.093	0.657	-0.352	0.071
Total PE with n-6 PUFAs	-0.311	0.129	0.211	0.288
Total PlsE with n-6 PUFAs	**-0.587**	**0.002**	0.027	0.892
Total PE with n-3 PUFAs	0.025	0.904	-0.260	0.189
Total PlsE with n-3 PUFAs	-0.326	0.111	-0.215	0.281
Total PC with AA	**-0.495**	**0.011**	0.062	0.756
Total PlsC with AA	-0.340	0.096	-0.104	0.603
Total PE with AA	-0.319	0.119	0.243	0.221
Total PlsE with AA	-0.286	0.164	-0.110	0.583
Total PC with DHA	-0.359	0.077	-0.016	0.936
Total PlsC with DHA	-0.308	0.133	-0.131	0.514
Total PE with DHA	0.189	0.364	-0.132	0.509
Total PlsE with DHA	-0.338	0.098	-0.206	0.300
Total PC with n-6 PUFAs / total PC with n-3 PUFAs	-0.286	0.165	0.312	0.112
Total PC with AA / total PC with DHA	**-0.410**	**0.041**	0.242	0.222
Total PlsC with n-6 PUFAs / total PlsC with n-3 PUFAs	-0.355	0.081	-0.063	0.752
Total PlsC with AA / total PlsC with DHA	-0.390	0.053	-0.088	0.661
Total PE with n-6 PUFAs / total PE with n-3 PUFAs	-0.072	0.731	**0.420**	**0.029**
Total PE with AA / total PE with DHA	-0.239	0.249	0.366	0.060
Total PlsE with n-6 PUFAs / total PlsE with n-3 PUFAs	-0.308	0.133	**0.886**	**0.006**
Total PlsE with AA / total PlsE with DHA	-0.296	0.150	**0.843**	**0.011**

AA: arachidonic acid; DHA, docosahexaenoic acid; PC: phosphatidylcholine; PlsC: plasmenylcholine; PE: phosphatidylethanolamine: PlsE: plasmenylethanolamine ; ROP: retinopathy of prematurity

Abbreviations of individual PC, PlsC, PE, and PlsE species are as follows: position on the glycerol backbone as shown as *sn*-1/*sn*-2 of the fatty acid and fatty alcohol radicals (abbreviated as number of carbons: number of double bonds).

Table 4: Spearman correlations between gestational age and erythrocyte individual phospholipids species esterified in preterm infants with or without retinopathy of prematurity.

	[M+H]+ or [M-H]-[a]	No-ROP *n* = 25		ROP *n* = 27	
		rSpearman	*p*-value	*rSpearman*	*p*-value
Phosphatidylcholine species					
PC16:0/20:4 + PC16:1/20:3	782.5695	**–0.511**	**0.009**	0.013	0.945
PC18:2/20:4 + PC16:0/22:6	806.5695	-0.346	0.089	-0.016	0.936
PC18:0/20:5 + PC18:1/20:4 + PC16:0/22:5 + PC18:2/20:3 + PC20:3/18:2	808.5851	**-0.479**	**0.015**	-0.023	0.906
PC18:0/20:4	810.6008	**-0.517**	**0.008**	0.183	0.360
PC20:5/22:6	828.5538	-0.338	0.097	-0.123	0.538
PC22:3/18:4 + PC20:3/20:4 +PC18:1/22:6	832.5851	-0.304	0.138	-0.58	0.772
PC18:0/22:6 + PC20:2/20:4	834.6008	-0.331	0.105	-0.088	0.660
PC18:0/22:4 + PC20:0/20:4	838.6321	-0.350	0.086	-0.045	0.822
Plasmenylcholine species					
PlsC18:1/20:4 + PlsC16:1/22:4	792.5902	-0.352	0.083	-0.122	0.542
PlsC18:0/20:4 + PlsC16:0/22:4	794.6058	-0.336	0.100	-0.104	0.603
PlsC18:0/22:6	818.6058	-0.308	0.133	-0.131	0.514
Phosphatidylethanolamine species					
PE16:0/20:4 + PE16:1/20:3	738.5079	-0.298	0.147	0.196	0.327
PE16:0/22:6 + PE18:1/20:5 + PE18:2/20:4	762.5079	-0.213	0.306	0.188	0.347
PE18:1/20:4 + PE16:0/22:5	764.5236	**-0.432**	**0.030**	0.082	0.683
PE18:0/20:4 + PE16:0/22:4	766.5392	-0.344	0.091	0.200	0.315
PE20:4/20:4 + PE18:2/22:6	786.5079	0.001	0.992	-0.185	0.354
PE18:1/22:6 + PE20:3/20:4	788.5236	-0.259	0.210	0.106	0.596
PE18:0/22:6	790.5392	-0.306	0.136	0.083	0.678
PE18:0/22:4 + PE20:0/20:4	794.5705	-0.282	0.171	0.314	0.110
PE20:4/22:6	810.5079	-0.047	0.821	-0.285	0.148
PE22:6/22:6	834.5079	**0.439**	**0.027**	-0.011	0.954
Plasmenylethanolamine species					
PlsE16:0/20:4	722.5130	-0.376	0.063	-0.179	0.369
PlsE16:0/22:6	746.5130	-0.343	0.092	-0.193	0.333
PlsE18:1/20:4	748.5287	**-0.395**	**0.049**	-0.214	0.283
PlsE18:0/20:4 + PlsE16:0/22:4	750.5443	-0.298	0.146	-0.117	0.560
PlsE18:1/22:6	772.5287	-0.326	0.111	-0.223	0.262
PlsE18:0/22:6 + PlsE18:1/22:5	774.5443	-0.326	0.111	-0.216	0.277

a: [M+H]+ for PC, PlsC, and [M+H]+ for PE and PlsE species

PC: phosphatidylcholine; PlsC: plasmenylcholine; PE: phosphatidylethanolamine: PlsE: plasmenylethanolamine ; ROP: retinopathy of prematurity

Abbreviations of individual PC, PlsC, PE, and PlsE species are as follows: position on the glycerol backbone as shown as *sn*-1/*sn*-2 of the fatty acid and fatty alcohol radicals (abbreviated as number of carbons: number of double bonds).

Résultats et conclusion

Cette dernière partie nous a permis dans un premier temps de confirmer les résultats de précédentes études (Bernhard et al), dont l'étude OmegaROP publiée par notre équipe (Pallot et al). On constate en effet l'existence d'une corrélation négative entre l'âge gestationnel et la ratio oméga-6/oméga-3 des érythrocytes chez les prématurés développant la ROP, avec notamment une augmentation significative de ce ratio chez les plus grands prématurés. La caractérisation du phospholipidome des globules rouges nous a permis dans un deuxième temps de déterminer l'origine phospholipidique de ces altérations. Si les PC représentent la majeure partie des phospholipides impliqués dans ces variations, nos résultats montrent que certaines espèces de PE, et notamment de pPE, représentent elles-aussi des contributeurs significatifs quant à ces altérations. Ces résultats semblent d'autant plus pertinents lorsque l'on considère que les globules rouges pourraient représenter un marqueur fiable des lipides rétiniens. En effet, compte tenu du rôle des AGPIs dans le contrôle du développement vasculaire rétinien et de l'inflammation, deux paramètres clés de la ROP, l'altération de leurs concentrations respectives pourrait avoir d'importantes conséquences sur la physiologie de la rétine. De plus, ces données ont été obtenues chez l'Homme, ce qui apporte un niveau d'évidence scientifique significativement plus élevé que les modèles cellulaires ou animaux.

Malgré les nouvelles données apportées par notre étude, cette dernière présente toutefois plusieurs limites. Tout d'abord, seuls les PC et PE ont été quantifiés, et bien que les PS + PI ne représentent que moins de 10% du phospholipidome érythrocytaire ou rétinien, il n'est pas exclu que certaines données significatives manquent à nos conclusions. Par ailleurs, ces résultats ne sont que descriptifs et appellent à de plus amples études fonctionnelles afin de déterminer les mécanismes sous-jacents aux altérations du phospholipidome décrites ici.

Chapitre 6 : Discussion générale et perspectives de la thèse

A travers cette thèse, nous avons étudié le rôle des plasmalogènes dans la physiologie des cellules gliales et du développement vasculaire rétinien par des approches diverses et complémentaires. Ces études ont notamment permis de révéler l'implication des plasmalogènes dans la capacité de migration et de GJIC des cellules de Müller *in vitro*, dans la régulation du développement vasculaire rétinien de la souris DAPAT à travers des acteurs moléculaires liés à l'inflammation, à l'angiogenèse et au système endocannabinoïde *in vivo*, ainsi que dans la biodisponibilité sanguine des phospholipides chez le grand prématuré. Bien que ces résultats semblent prometteurs, ils s'accompagnent inévitablement d'interrogations. Nous allons ainsi discuter dans cette dernière partie du choix des approches expérimentales, des résultats obtenus, ainsi que des perspectives pour la physiopathologie de la ROP chez l'Homme.

Rôle des plasmalogènes dans la physiologie des cellules de Müller *in vitro*

- Migration cellulaire

Dans la première partie de nos études *in vitro*, nous avons montré que la déplétion en plasmalogènes par interférence ARN était associée à une altération de la capacité de migration des cellules de Müller, notamment *via* l'expression de la GFAP et de la Cx43. Toutefois, les mécanismes menant à la sous-expression de ces protéines restent à élucider. Les données complémentaires acquises montrent une diminution de l'expression des gènes codant pour la GFAP et la Cx43 dans les cellules transfectées par siDHAPAT (Figure 40 ; Figure 3b article 2), suggérant une régulation commune de ces deux gènes. Il s'avère que les régions promotrices des gènes codant pour la GFAP et la Cx43 possèdent des domaines régulés par des facteurs de transcription communs, comme NFκB, AP-1, AP-2 ou SP-1 (Geimonen et al., 1996; Gomes et al., 1999; Wu et al., 2013; Brenner et al., 2019). Il apparait dès lors indispensable de vérifier l'expression de ces facteurs de transcription afin de déterminer s'ils jouent ou non un rôle dans la sous-expression de la GFAP et de la CX43 des cellules de Müller partiellement déplétées en plasmalogènes. Par ailleurs, des mécanismes post-traductionnels comme la phosphorylation interviennent dans la régulation de l'expression protéique de la GFAP (Kosako et al., 1997; Rodnight et al., 1997; Sullivan et al., 2012; Battaglia et al., 2019) et la Cx43 (Kimura and Nishida, 2010; Leithe, 2016). Nos travaux montrent que déplétion en plasmalogènes est associée à une sur-phosphorylation de la Cx43 en S368, site de phosphorylation

par la PKC connu pour induire sa dégradation. Ce résultat mériterait d'être doublement exploité : tout d'abord *via* l'utilisation d'inhibiteurs de PKC, comme la Calphostin C ou le Gö 6983, ce qui prouverait l'implication de cette dernière dans la sous-expression de la Cx43 (l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de chaque isoforme de PKC permettrait de plus d'en définir les isoformes responsables) ; et dans un deuxième temps en étudiant la phosphorylation de la GFAP par western-blot, ce qui pourrait apporter des éléments de réponse supplémentaires quant à sa sous-expression. La réalisation d'une étude cinétique de l'expression de la GFAP et de la Cx43 suite aux transfections permettrait en outre de déterminer les dynamiques respectives de leur sous-expression.

De précédants travaux ayant déjà évoqué une altération de la migration d'atrocytes sous-exprimant la Cx43 (Homkajorn et al., 2010; Lagos-Cabre et al., 2019), cette première étude semble renforcer l'idée que la Cx43 joue un rôle dans la capacité de migration des cellules gliales. Ce rôle s'expliquerait notamment par le fait que la Cx43 constitue de véritables points d'ancrages membranaires pour les protéines du cytosquelette. La chaine C-terminale de la Cx43 possède en effet de nombreux sites de liaisons qui entrainent la formation de complexes supra-moléculaires permettant de lier des acteurs du cytosquelette comme les microtubules et les filaments d'actine, directement ou indirectement par la liaison de protéines intermédiaires comme ZO-1 ou la drébrine (Butkevich et al., 2004; Olk et al., 2009; Crespin et al., 2010; Francis et al., 2011; Kameritsch et al., 2012; Matsuuchi and Naus, 2013; Ambrosi et al., 2016). Ces interactions ont ainsi également été associées à la polarisation et la migration d'autres types cellulaires (Rhee et al., 2009; Elias et al., 2010), et seraient notamment régulés par la phosphorylation de la Cx43 (Saidi Brikci-Nigassa et al., 2012), que nous avons montré être altérée au moins en S368 (article 2). De ce fait, il pourrait être pertinent de vérifier l'expression de ces autres protéines, tout en complétant ces informations par des marquages immunohistochimiques pour les protéines du cytosquelette, qui permettraient alors de révéler d'éventuels remodellage du cytosqueltte des cellules de Müller déplétées en plasmalogènes.

Puisque les cellules de Müller semblent se caractériser par une forte concentration en plasmalogènes, la déplétion partielle de leur contenu en plasmalogènes pourrait constituer une sorte de « déspécialisation » fonctionnelle de ces dernières (à ne pas confondre avec la dédifférenciation en cellules progénitrices, car les RPC sont a priori caractérisés par une certaine capacité de migration). L'ajout d'un groupe supplémenté en AKG permettrait de déterminer si la restauration du contenu en plasmalogènes serait à même de rétablir au moins partiellement leur capacité de migration.

- GJIC

Dans le 2e article *in vitro* du chapitre 1, nous avons montré que la concentration en plasmalogènes des cellules de Müller est significativement plus élevée que celle de la rétine totale, ce qui suggère un rôle particulier des plasmalogènes dans la physiologie de ces cellules. Si les raisons exactes n'en sont pour l'heure pas connues, plusieurs hypothèses peuvent être formulées en se basant sur le rôle des cellules de Müller dans la fonction rétinienne. En effet, les cellules de Müller représentent l'un des principaux acteurs impliqués dans la réaction aux stimuli, notamment pathologiques (Bringmann and Wiedemann, 2012; Graca et al., 2018). Ces derniers s'accompagnent fréquemment d'une élévation du stress oxydant, caractérisé par la génération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Rohowetz et al., 2018). Or, les plasmalogènes possèdent justement une affinité particulière pour les ROS grâce à leur liaison vinyl-éther (Morand et al., 1988; Braverman and Moser, 2012; Dean and Lodhi, 2018; Zhou et al., 2020). La forte concentration en plasmalogènes des cellules de Müller pourrait alors témoigner d'un rôle de « tampon » de ces dernières vis-à-vis de l'oxydation dans la rétine. De plus, les plasmalogènes jouent un rôle important dans la signalisation intracellulaire par leur capacité à concentrer les AGPIs (Nagan and Zoeller, 2001). De ce fait, une forte concentration en plasmalogènes permettrait d'accroitre la capacité de la réponse cellulaire à un stimulus. Par ailleurs, les cellules de Müller sont capables de communiquer entre elles ou avec d'autres type cellulaires par l'intermédiaire de la GJIC, qui repose essentiellement sur la Cx43 dans le cas des cellules macrogliales (Zahs et al., 2003; Kerr et al., 2010). Or, les études développées dans le chapitre 2 montrent que les plasmalogènes participeraient justement à la régulation de l'expression de la Cx43 et la GJIC qui en découle. Les mécanismes de cette régulation restent toutefois à déterminer, et plusieurs hypothèses de travail se dégagent dans un premier temps comme évoqué dans le paragraphe précédent. Concernant l'augmentation de la réponse calcique à l'ATP suite à la déplétion en plasmalogènes, plusieurs paramètres sont ici à prendre en compte. Cette réponse implique une cascade de signalisation faisant intervenir de nombreux acteurs, multipliant d'autant les niveaux de régulation possibles. Il faut ainsi considérer les récepteurs P2Y, l'activité de la PKC et le relargage du Ca^{2+} depuis les stocks du RE à la suite de l'activation des récepteurs à l'IP_3 (Clapham, 2007). En conséquence, il apparait pertinent d'évaluer leur expression génique et protéique respectivement en RT-qPCR et en WB. Ces informations devraient toutefois être complétées une évaluation de leur activité. En effet, les voies de signalisation régulées par la PKC notamment ne dépendent pas tant de son expression que sa capacité à être recrutée au niveau de la membrane plasmique. Ce recrutement membranaire repose essentiellement sur la composition phospholipidique de la membrane (Gallegos and Newton, 2008; Gould and Newton, 2008; Guerrero-Valero et al., 2009; Lucic et al., 2016), et notamment

plasmalogènes : les diglycérides issus de la famille des éther-lipides jouent en effet un rôle d'inhibiteurs compétitif vis-à-vis de la PKC : la présence de d'éther-lipides diminue l'activité de la PKC (Daniel et al., 1988; Mandal et al., 1997). Ainsi, en conditions de déplétion ou de déficience en plasmalogènes, on observe une augmentation de l'activité de PKC. Cette information semble cohérente avec la surphosphorylation de la Cx43 en S368 comme montré dans l'article 2. Par ailleurs, plusieurs travaux ont montré que les IP3R sont régulés négativement par le DHA (Sergeeva et al., 2005; Begum et al., 2012). Or, la quantification relative des lipides dans notre modèle de déplétion partielle en plasmalogènes montre justement une altération du ratio n-6/n-3, caractérisée par une diminution du contenu en DHA (Figure 43, chapitre 2). On peut ainsi émettre l'hypothèse qu'en plus d'une augmentation de l'activité de PKC, la déplétion partielle en plasmalogènes diminue la régulation des IP3R par le DHA, qui relarguent alors des quantités plus importantes de Ca^{2+}, d'où l'augmentation du signal calcique observée dans les cellules de Müller transfectées avec le siDHAPAT. Cette hypothèse pourrait être confirmée en réalisant ces expérimentations sur des cellules de Müller traitées au BEL (bromoénolactone), un inhibiteur de la $iPLA_2$ et donc de la libération du DHA par les plasmalogènes, comme déjà réalisé précédemment au laboratoire (Saab-Aoude et al., 2013).

Pour conclure cette première partie de la discussion, nous allons discuter de la pertinence de l'étude des cellules gliales *in vitro*. Compte tenu de la complexité structurale et fonctionnelle de la rétine et de la difficulté d'étudier la physiologie *in vivo*, il est fréquent de recourir à des études *in vitro* afin de comprendre le comportement et les adaptations d'un type cellulaire particulier. La culture *in vitro* de cellules de Müller est ainsi utilisée depuis plusieurs décennies déjà (Hicks and Courtois, 1981), et les dernières études montrent qu'il est même possible de reproduire certaines adaptations pathologiques de ces dernières (Couturier et al., 2021). Toutefois, la physiologie des cellules repose en partie sur la relation structure/fonction, et l'environnement de culture *in vitro* ne permet pas de restituer l'environnement physiologique de ces cellules. Il a ainsi été montré que les astrocytes cultivés dans des environnements en deux dimensions (2D) standards présentent des altérations morphologiques et fonctionnelles, qui se traduisent notamment par la surexpression de la GFAP (Placone et al., 2015). Il est donc permis d'envisager que les études *in vitro* menées sur des cellules de Müller et/ou des astrocytes minimisent, ou au contraire exacerbent les caractéristiques étudiées.

Enfin, notre modèle de déplétion par interférence ARN n'entraine qu'une diminution d'environ 50% du contenu en plasmalogènes des cellules de Müller. Si cela permet d'obtenir des informations utiles quant au rôle des plasmalogènes dans la physiologie des cellules de Müller, il ne permet malheureusement pas d'en rendre pleinement compte. Il faudrait pour cela utiliser des cellules

déficientes en plasmalogènes, en réalisant par exemple des cultures primaires de cellules de Müller issues de souris DAPAT$^{-/-}$. Les animaux KO étant toutefois infertiles et ayant fait face à des difficultés récurrentes de reproduction de ces animaux, nous n'avons pas pu mettre en place une telle approche expérimentale dans le cadre de cette thèse. Par ailleurs, certains auteurs ont montré qu'il était possible d'étudier la propagation du signal calcique induit par l'ATP dans des coupes de rétine *ex vivo* (Newman, 2001; Uckermann et al., 2002). Bien que nécessitant de nombreuses mises au point expérimentales, une telle approche permettrait de vérifier et d'affiner nos résultats obtenus sur la GJIC *in vitro*, tout en leur apportant une plus-value conséquente d'une étude sur le tissu rétinien complet.

Rôle des plasmalogènes dans la physiologie rétinienne *in vivo*

Dans la deuxième partie de cette thèse, nous nous sommes intéressés au rôle des plasmalogènes dans le développement vasculaire rétinien de la souris et ses altérations pathologiques. Nous avons ainsi pu caractériser l'implication de nombreux acteurs moléculaires à travers les différents points de temps étudiés (J7, J14, J21), concernant notamment l'activation des cellules gliales, le remodelage de la matrice extracellulaire, l'expression de facteurs angiogéniques et inflammatoires (chapitre 3). Si les résultats montrent bien des altérations dans l'expression de nombreux gènes, ces altérations semblent parfois modérées, et ne sont peut-être pas comparables aux altérations observées dans d'autres modèles de rétinopathies comme les modèles de rétinopathie induite par l'oxygène (OIR) ou de rétinopathie diabétique. De plus, il pourrait être intéressant d'étendre ces travaux en ajoutant d'autres gènes associés aux rétinopathies, comme les gènes codant pour le PDGF, COX2, IL-8, IL-12, MCP1, MPO ou ANGPTL4 pour ne citer qu'eux (Sennlaub et al., 2003; Davies et al., 2006; Ishikawa et al., 2010; Couturier et al., 2021). Parallèlement à ces expérimentations, il sera nécessaire d'étudier l'expression protéique de ces différents acteurs, afin de prendre en compte d'éventuelles altérations post-traductionnelles. On pourrait éventuellement envisager d'y adjoindre des marquages immunohistochimiques afin de déterminer les types cellulaires impliqués. Par ailleurs, de nombreuses études ont également montré une altération de l'expression de la Cx43 et de la GJIC dans la physiopathologie des rétinopathies (Malone et al., 2007; Ly et al., 2011; Muto et al., 2014; Tien et al., 2016). Il serait ainsi pertinent d'évaluer l'expression des gènes et protéines de la GJIC chez la souris DAPAT$^{-/-}$, notamment pour relier ces informations aux observations effectuées dans notre modèle *in vitro* (chapitre 2).

Concernant la supplémentation nutritionnelle, nos données suggèrent une efficacité très modeste. Plusieurs phénomènes peuvent expliquer ces résultats : tout d'abord, les souriceaux DAPAT$^{-/-}$ sont particulièrement fragiles et décèdent fréquemment dans les premières semaines de vie (nos données

indiquent 7% de DAPAT$^{-/-}$ sur l'intégralité des reproductions effectuées, et celles de Rodemer (2003) indiquent un taux de survie de 40% des DAPAT$^{-/-}$ au cours des 2 premières semaines de vie). Si cela est en partie du aux nombreuses dysfonctions physiologiques, il faut également évoquer la « compétition » entre souriceaux pour l'allaitement maternel. Il est ainsi envisageable que les souriceaux DAPAT$^{-/-}$ ne soient pas suffisamment allaités, ne facilitant ni leur survie ni l'incorporation des AKG issus du lait maternel. Dans un deuxième temps, bien que plusieurs études aient montré l'intérêt d'une supplémentation maternelle en AKG (Das et al., 1992; Brites et al., 2011), il est possible que ces derniers ne traversent pas efficacement la barrière hémato-rétinienne, ce qui pourrait notamment expliquer pourquoi deux mois de supplémentation sont nécessaires avant de restaurer les niveaux tissulaires en plasmalogènes (Brites et al., 2011).

Bien qu'apportant certaines informations pertinentes, cette étude ne permet malheureusement pas de répondre à l'intégralité de la problématique en l'état, et nécessiterait d'être étendue. Parmi les approches supplémentaires, on pourrait envisager une supplémentation nutritionnelle en AGPIs, comme le DHA, ce qui permettrait de montrer que les anomalies induites par la déficience en plasmalogènes sont notamment dues à la moindre biodisponibilité des AGPIs.

- Implication du système endocannabinoïde

Parmi les métabolismes régulés par les AGPIs figure notamment celui du système endocannabinoïde (sEC). Grâce à nos travaux présentés dans l'article 4 (chapitre 3), nous évoquons pour la première fois la possibilité d'un lien entre plasmalogènes et sEC. La déficience en plasmalogènes est en effet associée à diverses altération de l'expression des gènes régulant le sEC *in vivo*. Ces données seront complétées par des western-blots afin de déterminer si ces altérations se retrouvent également à l'échelle protéique. Parallèlement, il est prévu de quantifier en chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS) les différents endocannabinoïdes dans les rétines de nos souris, ce qui nous permettra de faire le lien avec les différents acteurs identifiés et de dresser le tableau complet du sEC chez la souris DAPAT$^{-/-}$. Notre étude est toutefois uniquement basée sur les endocannabinoïdes dérivés de l'AA. S'ils représentent les acteurs majoritaires, des études montrent que les endocannabinoïdes dérivés des AGPIs oméga-3 comme le DHA exercent également diverses fonctions physiologiques (Bosch-Bouju and Laye, 2016). Il pourra ainsi être envisagé dans un deuxième temps d'inclure ces espèces moléculaires dans l'objectif de réaliser une étude plus complète. Par la suite, il pourra être intéressant de réaliser une étude similaire chez un modèle de rétinopathie induite par l'oxygène, afin de vérifier l'implication du sEC dans la survenue et la sévérité des anomalies associées à ce modèle. Ceci permettra notamment de conforter l'idée d'une

potentielle implication du sEC dans la ROP. En ce sens, il semblerait pertinent de pouvoir quantifier les endocannabinoïdes chez les prématurés développant la ROP afin d'identifier d'éventuelles associations qui pourraient alors servir de biomarqueur pronostic quant à l'apparition de la pathologie, ce qui fait actuellement défaut. Ceci pourra notamment être envisagé dans la suite des travaux de l'étude OmegaROP.

Rôle des plasmalogènes et des AGPIs dans la ROP – l'étude OmegaROP

Dans cette dernière étude, nous avons pu confirmer nos précédents résultats montre une altération du profil en AGPIs des érythrocytes chez les prématurés développant une ROP (Pallot et al., 2019). Chez les prématurés ne développant pas la ROP, on observe une corrélation négative entre le ratio AA/DHA et l'âge gestationnel, tandis qu'on observe une corrélation positive chez les prématurés développant la ROP. Ces anomalies pourraient notamment être en lien avec des altérations du transfert materno-fœtal en AGPIs (Pallot et al., 2019). La nouveauté de cette étude réside dans l'identification de l'origine phospholipidique de ces altérations. Nos résultats montrent en effet que les PC et les PE estérifiés avec un oméga-6 sont négativement corrélés avec l'âge gestationnel de manière significative, et surtout identifient plusieurs espèces de PC et de PE estérifiés avec un AA en tant que contributeurs principaux de cette association (PC 16:0/20:4 et PE 18:1/20:4). A l'inverse, on observe une corrélation négative entre l'âge gestationnel et les PE estérifiés avec un oméga-3 les prématurés développant la ROP, à laquelle s'ajoute une corrélation positive entre l'âge gestationnel et le ratio entre plasmalogènes à éthanolamine (pPE) estérifiés avec un oméga-6 et PlsPE estérifiés avec un oméga-3 (pPE n-6/PlsPE n-3) (p = 0.029), y compris du ratio pPE-AA/PlsPE-DHA (p = 0.011). Considérant les propriétés respectivement pro-inflammatoires de l'AA et anti-inflammatoires du DHA, ces données confirment l'hypothèse d'un profil inflammatoire généralisé chez les prématurés développant la ROP, caractérisé par un profil polypathologique (Kelly, 2006; Pravia and Benny, 2020). Plusieurs questions subsistent néanmoins : l'altération du profil phospholipidique est-elle causale ou consécutive d'autres altérations ? Quels mécanismes sous-tendent ces altérations ? Par ailleurs, plusieurs études suggèrent que le profil érythrocytaire pourrait être un bon indicateur de la composition phospholipidique rétinienne (Carlson et al., 1986; Makrides et al., 1994; Sarkadi-Nagy et al., 2004), ce qui tendrait à conforter l'idée d'un profil pro-inflammatoire rétinien favorable à la pathogenèse de la ROP. Il serait ainsi intéressant de valider ces données sur de plus vastes populations de prématurés afin de proposer aux praticiens un paramètre pronostic facilement mesurable. Le profil phospholipidique pourrait alors s'ajouter à l'éventail des marqueurs déjà associées au développement de la ROP, comme l'IGF-1 (Hellstrom et al., 2003; Hellgren et al., 2018). Enfin, compte tenu de la suggestion d'anomalies du transfert materno-fœtal en AGPIs, les études

futures pourraient également révéler de nouveaux indicateurs et mécanismes gestationnels intervenant dans la pathogenèse de la ROP, ou au moins de facteurs de risques associés. Ces travaux sont prévus dans l'étude OmegaROP 2, qui en est actuellement en cours de démarrage.

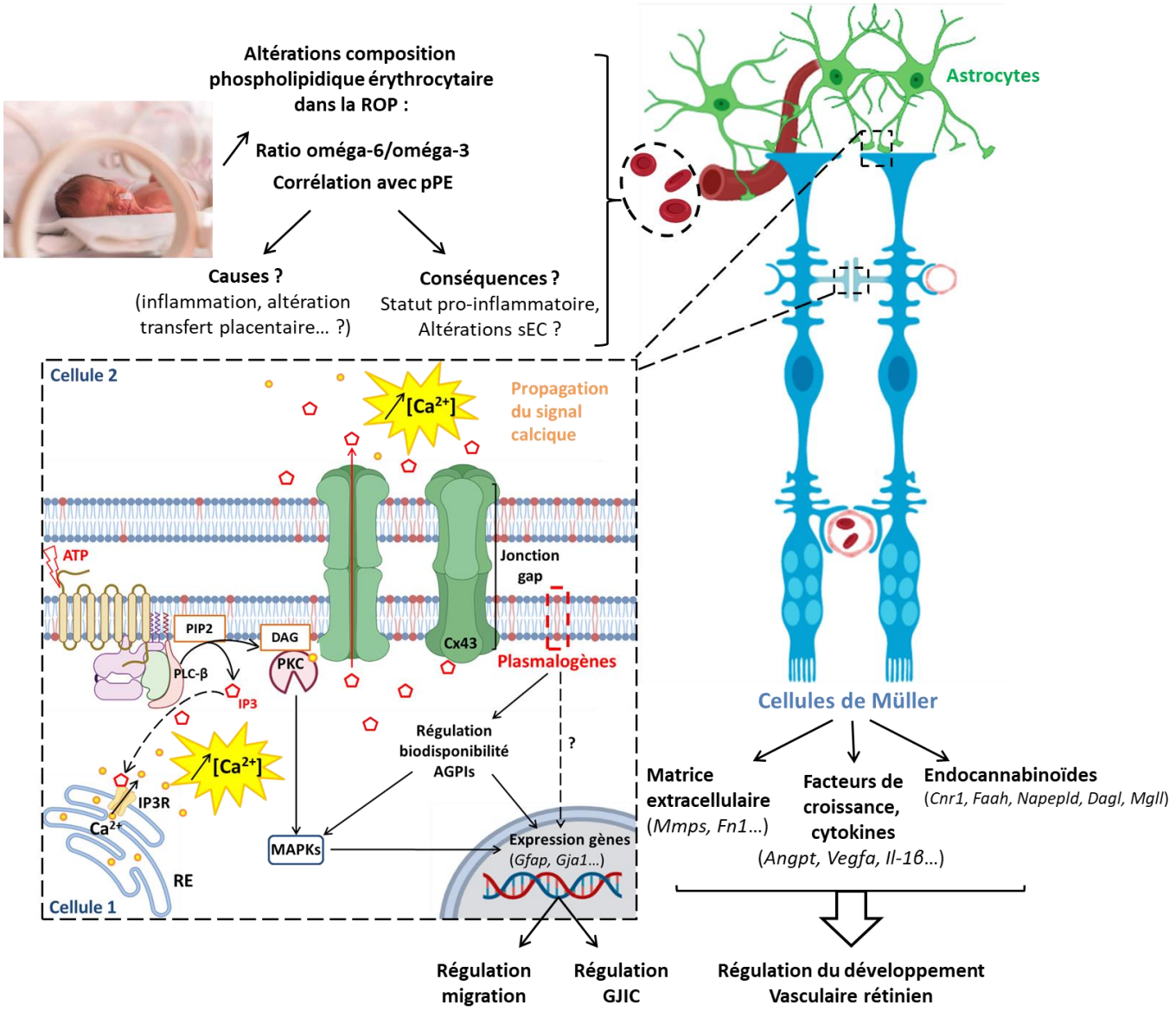

Figure 47 : Schéma général - rôle des plasmalogènes dans la physiologie des cellules gliales rétiniennes et implications pour le développement vasculaire rétinien.

En conclusion, les travaux menés au cours de cette thèse nous ont permis d'avancer dans la compréhension du rôle des plasmalogènes dans la physiologie des cellules de Müller en lien avec la régulation du développement vasculaire rétinien. Plus précisément, nous avons pu mettre en évidence un rôle des plasmalogènes dans certaines fonctions physiologiques clés des cellules de Müller comme la migration cellulaire et la GJIC, notamment *via* la régulation de la Cx43 et de la GFAP (**Figure 47**). Les études *in vivo* nous ont permis dans un deuxième temps de caractériser les acteurs moléculaires intervenant dans les anomalies du développement vasculaire rétinien de la souris DAPAT$^{-/-}$, tout en apportant des pistes novatrices comme celle de l'implication potentielle du sEC. Enfin, l'analyse de la composition phospholipidique des globules rouges de prématurés nous a confirmé l'existence d'altérations du profil phospholipidique chez les prématurés développant la ROP. Ces altérations sont caractérisées par une augmentation des ratios AGPIs oméga-6/oméga-3 et impliquant notamment les plasmalogènes du groupe des phospholipides à éthanolamine (pPE), confirmant ainsi les données préalablement recueillies et les hypothèses initialement formulées. La poursuite de ces travaux permettra d'en identifier les acteurs et mécanismes sous-jacents, ce qui pourra mener à la découverte de nouveaux marqueurs, voir à de nouvelles approches thérapeutiques des rétinopathies à composante vasculaire comme la ROP.

Références bibliographiques

2000. Supplemental Therapeutic Oxygen for Prethreshold Retinopathy Of Prematurity (STOP-ROP), a randomized, controlled trial. I: primary outcomes. *Pediatrics* 105, 295-310.

2005. The International Classification of Retinopathy of Prematurity revisited. *Arch Ophthalmol* 123, 991-999.

Abdelmoaty, S., Wigerblad, G., Bas, D.B., Codeluppi, S., Fernandez-Zafra, T., El-Awady el, S., Moustafa, Y., Abdelhamid Ael, D., Brodin, E., Svensson, C.I., 2013. Spinal actions of lipoxin A4 and 17(R)-resolvin D1 attenuate inflammation-induced mechanical hypersensitivity and spinal TNF release. *PLoS One* 8, e75543.

Acar, N., Berdeaux, O., Juaneda, P., Gregoire, S., Cabaret, S., Joffre, C., Creuzot-Garcher, C.P., Bretillon, L., Bron, A.M., 2009. Red blood cell plasmalogens and docosahexaenoic acid are independently reduced in primary open-angle glaucoma. *Exp Eye Res* 89, 840-853.

Acar, N., Gregoire, S., Andre, A., Juaneda, P., Joffre, C., Bron, A.M., Creuzot-Garcher, C.P., Bretillon, L., 2007. Plasmalogens in the retina: in situ hybridization of dihydroxyacetone phosphate acyltransferase (DHAP-AT)--the first enzyme involved in their biosynthesis--and comparative study of retinal and retinal pigment epithelial lipid composition. *Exp Eye Res* 84, 143-151.

Agathocleous, M., Harris, W.A., 2009. From progenitors to differentiated cells in the vertebrate retina. *Annu Rev Cell Dev Biol* 25, 45-69.

Agte, S., Junek, S., Matthias, S., Ulbricht, E., Erdmann, I., Wurm, A., Schild, D., Kas, J.A., Reichenbach, A., 2011. Muller glial cell-provided cellular light guidance through the vital guinea-pig retina. *Biophys J* 101, 2611-2619.

Ahmadpour-Kacho, M., Motlagh, A.J., Rasoulinejad, S.A., Jahangir, T., Bijani, A., Pasha, Y.Z., 2014. Correlation between hyperglycemia and retinopathy of prematurity. *Pediatr Int* 56, 726-730.

Ait-Hmyed Hakkari, O., Acar, N., Savier, E., Spinnhirny, P., Bennis, M., Felder-Schmittbuhl, M.P., Mendoza, J., Hicks, D., 2016. Rev-Erbalpha modulates retinal visual processing and behavioral responses to light. *FASEB J* 30, 3690-3701.

Akoh, C.C., Chapkin, R.S., 1990. Composition of mouse peritoneal macrophage phospholipid molecular species. *Lipids* 25, 613-617.

Allegaert, K., Vanhole, C., Casteels, I., Naulaers, G., Debeer, A., Cossey, V., Devlieger, H., 2003. Perinatal growth characteristics and associated risk of developing threshold retinopathy of prematurity. *J AAPOS* 7, 34-37.

Ambrosi, C., Ren, C., Spagnol, G., Cavin, G., Cone, A., Grintsevich, E.E., Sosinsky, G.E., Sorgen, P.L., 2016. Connexin43 Forms Supramolecular Complexes through Non-Overlapping Binding Sites for Drebrin, Tubulin, and ZO-1. *PLoS One* 11, e0157073.

Araque, A., Martin, E.D., Perea, G., Arellano, J.I., Buno, W., 2002. Synaptically released acetylcholine evokes Ca2+ elevations in astrocytes in hippocampal slices. *J Neurosci* 22, 2443-2450.

Araque, A., Parpura, V., Sanzgiri, R.P., Haydon, P.G., 1999. Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends Neurosci* 22, 208-215.

Arendt, D., Wittbrodt, J., 2001. Reconstructing the eyes of Urbilateria. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 356, 1545-1563.

Ariel, A., Serhan, C.N., 2007. Resolvins and protectins in the termination program of acute inflammation. *Trends Immunol* 28, 176-183.

Ashare, A., Nymon, A.B., Doerschug, K.C., Morrison, J.M., Monick, M.M., Hunninghake, G.W., 2008. Insulin-like growth factor-1 improves survival in sepsis via enhanced hepatic bacterial clearance. *Am J Respir Crit Care Med* 178, 149-157.

Ashton, N., 1954. Pathological basis of retrolental fibroplasia. *Br J Ophthalmol* 38, 385-396.

Ashton, N., 1966. Oxygen and the growth and development of retinal vessels. In vivo and in vitro studies. The XX Francis I. Proctor Lecture. *Am J Ophthalmol* 62, 412-435.

Ashton, N., Cook, C., 1954. Direct observation of the effect of oxygen on developing vessels: preliminary report. *Br J Ophthalmol* 38, 433-440.

Ashton, N., Ward, B., Serpell, G., 1954. Effect of oxygen on developing retinal vessels with particular reference to the problem of retrolental fibroplasia. *Br J Ophthalmol* 38, 397-432.

Askew, K., Li, K., Olmos-Alonso, A., Garcia-Moreno, F., Liang, Y., Richardson, P., Tipton, T., Chapman, M.A., Riecken, K., Beccari, S., Sierra, A., Molnar, Z., Cragg, M.S., Garaschuk, O., Perry, V.H., Gomez-Nicola, D., 2017. Coupled Proliferation and Apoptosis Maintain the Rapid Turnover of Microglia in the Adult Brain. *Cell Rep* 18, 391-405.

Askie, L.M., Henderson-Smart, D.J., Irwig, L., Simpson, J.M., 2003. Oxygen-saturation targets and outcomes in extremely preterm infants. *N Engl J Med* 349, 959-967.

Augustin, A.J., Breipohl, W., Boker, T., Lutz, J., Spitznas, M., 1993. Increased lipid peroxide levels and myeloperoxidase activity in the vitreous of patients suffering from proliferative diabetic retinopathy. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 231, 647-650.

Augustin, A.J., Spitznas, M., Koch, F., Grus, F., Boker, T., 1995. Indicators of oxidative tissue damage and inflammatory activity in epiretinal membranes of proliferative diabetic retinopathy, proliferative vitreoretinopathy and macular pucker. *Ger J Ophthalmol* 4, 47-51.

Austeng, D., Kallen, K.B., Ewald, U.W., Jakobsson, P.G., Holmstrom, G.E., 2009. Incidence of retinopathy of prematurity in infants born before 27 weeks' gestation in Sweden. *Arch Ophthalmol* 127, 1315-1319.

Bagga, D., Wang, L., Farias-Eisner, R., Glaspy, J.A., Reddy, S.T., 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, 1751-1756.

Bai, Y., Ma, J.X., Guo, J., Wang, J., Zhu, M., Chen, Y., Le, Y.Z., 2009. Muller cell-derived VEGF is a significant contributor to retinal neovascularization. *J Pathol* 219, 446-454.

Balasubramanian, R., Gan, L., 2014. Development of Retinal Amacrine Cells and Their Dendritic Stratification. *Curr Ophthalmol Rep* 2, 100-106.

Bardin, C., Zelkowitz, P., Papageorgiou, A., 1997. Outcome of small-for-gestational age and appropriate-for-gestational age infants born before 27 weeks of gestation. *Pediatrics* 100, E4.

Battaglia, R.A., Beltran, A.S., Delic, S., Dumitru, R., Robinson, J.A., Kabiraj, P., Herring, L.E., Madden, V.J., Ravinder, N., Willems, E., Newman, R.A., Quinlan, R.A., Goldman, J.E., Perng, M.D., Inagaki,

M., Snider, N.T., 2019. Site-specific phosphorylation and caspase cleavage of GFAP are new markers of Alexander disease severity. *Elife* 8.

Baylor, D.A., Lamb, T.D., Yau, K.W., 1979. Responses of retinal rods to single photons. *J Physiol* 288, 613-634.

Bazan, N.G., 2009a. Cellular and molecular events mediated by docosahexaenoic acid-derived neuroprotectin D1 signaling in photoreceptor cell survival and brain protection. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 81, 205-211.

Bazan, N.G., 2009b. Neuroprotectin D1-mediated anti-inflammatory and survival signaling in stroke, retinal degenerations, and Alzheimer's disease. *J Lipid Res* 50 Suppl, S400-405.

Beardsall, K., Vanhaesebrouck, S., Frystyk, J., Ogilvy-Stuart, A.L., Vanhole, C., van Weissenbruch, M., Midgley, P., Thio, M., Cornette, L., Gill, B., Ossuetta, I., Iglesias, I., Theyskens, C., de Jong, M., Ahluwalia, J.S., de Zegher, F., Dunger, D.B., 2014. Relationship between insulin-like growth factor I levels, early insulin treatment, and clinical outcomes of very low birth weight infants. *J Pediatr* 164, 1038-1044 e1031.

Beck, S.C., Feng, Y., Sothilingam, V., Garcia Garrido, M., Tanimoto, N., Acar, N., Shan, S., Seebauer, B., Berger, W., Hammes, H.P., Seeliger, M.W., 2017. Long-term consequences of developmental vascular defects on retinal vessel homeostasis and function in a mouse model of Norrie disease. *PLoS One* 12, e0178753.

Begum, G., Kintner, D., Liu, Y., Cramer, S.W., Sun, D., 2012. DHA inhibits ER Ca2+ release and ER stress in astrocytes following in vitro ischemia. *J Neurochem* 120, 622-630.

Behzadian, M.A., Wang, X.L., Windsor, L.J., Ghaly, N., Caldwell, R.B., 2001. TGF-beta increases retinal endothelial cell permeability by increasing MMP-9: possible role of glial cells in endothelial barrier function. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42, 853-859.

Belecky-Adams, T., Cook, B., Adler, R., 1996. Correlations between terminal mitosis and differentiated fate of retinal precursor cells in vivo and in vitro: analysis with the "window-labeling" technique. *Dev Biol* 178, 304-315.

Bernhard, W., Raith, M., Koch, V., Kunze, R., Maas, C., Abele, H., Poets, C.F., Franz, A.R., 2014. Plasma phospholipids indicate impaired fatty acid homeostasis in preterm infants. *Eur J Nutr* 53, 1533-1547.

Berthoud, V.M., Minogue, P.J., Osmolak, P., Snabb, J.I., Beyer, E.C., 2014. Roles and regulation of lens epithelial cell connexins. *FEBS Lett* 588, 1297-1303.

Bharwani, S.K., Green, B.F., Pezzullo, J.C., Bharwani, S.S., Dhanireddy, R., 2016. Systematic review and meta-analysis of human milk intake and retinopathy of prematurity: a significant update. *J Perinatol* 36, 913-920.

Bhat, N.R., 1995. Signal transduction mechanisms in glial cells. *Dev Neurosci* 17, 267-284.

Billeaud, C., Boue-Vaysse, C., Couedelo, L., Steenhout, P., Jaeger, J., Cruz-Hernandez, C., Ameye, L., Rigo, J., Picaud, J.C., Saliba, E., Hays, N.P., Destaillats, F., 2018. Effects on Fatty Acid Metabolism of a New Powdered Human Milk Fortifier Containing Medium-Chain Triacylglycerols and Docosahexaenoic Acid in Preterm Infants. *Nutrients* 10.

Binenbaum, G., Ying, G.S., Quinn, G.E., Huang, J., Dreiseitl, S., Antigua, J., Foroughi, N., Abbasi, S., 2012. The CHOP postnatal weight gain, birth weight, and gestational age retinopathy of prematurity risk model. *Arch Ophthalmol* 130, 1560-1565.

Bishop, P.N., 2000. Structural macromolecules and supramolecular organisation of the vitreous gel. *Prog Retin Eye Res* 19, 323-344.

Blank, M.L., Wykle, R.L., Snyder, F., 1973. The retention of arachidonic acid in ethanolamine plasmalogens of rat testes during essential fatty acid deficiency. *Biochim Biophys Acta* 316, 28-34.

Blencowe, H., Lawn, J.E., Vazquez, T., Fielder, A., Gilbert, C., 2013. Preterm-associated visual impairment and estimates of retinopathy of prematurity at regional and global levels for 2010. *Pediatr Res* 74 Suppl 1, 35-49.

Bloomfield, S.A., Dacheux, R.F., 2001. Rod vision: pathways and processing in the mammalian retina. *Prog Retin Eye Res* 20, 351-384.

Bordoni, A., Di Nunzio, M., Danesi, F., Biagi, P.L., 2006. Polyunsaturated fatty acids: From diet to binding to ppars and other nuclear receptors. *Genes Nutr* 1, 95-106.

Bosch-Bouju, C., Laye, S., 2016. Dietary Omega-6/Omega-3 and Endocannabinoids: Implications for Brain Health and Diseases, In: Meccariello, R., Chianese, R. (Eds.), Cannabinoids in Health and Disease. Intech Open.

Braverman, N., Zhang, R., Chen, L., Nimmo, G., Scheper, S., Tran, T., Chaudhury, R., Moser, A., Steinberg, S., 2010. A Pex7 hypomorphic mouse model for plasmalogen deficiency affecting the lens and skeleton. *Mol Genet Metab* 99, 408-416.

Braverman, N.E., Moser, A.B., 2012. Functions of plasmalogen lipids in health and disease. *Biochim Biophys Acta* 1822, 1442-1452.

Brenner, M., Messing, A., Olsen, M.L., 2019. AP-1 and the injury response of the GFAP gene. *J Neurosci Res* 97, 149-161.

Bringmann, A., Francke, M., Pannicke, T., Biedermann, B., Kodal, H., Faude, F., Reichelt, W., Reichenbach, A., 2000. Role of glial K(+) channels in ontogeny and gliosis: a hypothesis based upon studies on Muller cells. *Glia* 29, 35-44.

Bringmann, A., Pannicke, T., Grosche, J., Francke, M., Wiedemann, P., Skatchkov, S.N., Osborne, N.N., Reichenbach, A., 2006. Muller cells in the healthy and diseased retina. *Prog Retin Eye Res* 25, 397-424.

Bringmann, A., Pannicke, T., Moll, V., Milenkovic, I., Faude, F., Enzmann, V., Wolf, S., Reichenbach, A., 2001. Upregulation of P2X(7) receptor currents in Muller glial cells during proliferative vitreoretinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42, 860-867.

Bringmann, A., Pannicke, T., Weick, M., Biedermann, B., Uhlmann, S., Kohen, L., Wiedemann, P., Reichenbach, A., 2002. Activation of P2Y receptors stimulates potassium and cation currents in acutely isolated human Muller (glial) cells. *Glia* 37, 139-152.

Bringmann, A., Reichenbach, A., Wiedemann, P., 2004. Pathomechanisms of cystoid macular edema. *Ophthalmic Res* 36, 241-249.

Bringmann, A., Wiedemann, P., 2012. Muller glial cells in retinal disease. *Ophthalmologica* 227, 1-19.

Brites, P., Ferreira, A.S., da Silva, T.F., Sousa, V.F., Malheiro, A.R., Duran, M., Waterham, H.R., Baes, M., Wanders, R.J., 2011. Alkyl-glycerol rescues plasmalogen levels and pathology of ether-phospholipid deficient mice. *PLoS One* 6, e28539.

Brites, P., Motley, A.M., Gressens, P., Mooyer, P.A., Ploegaert, I., Everts, V., Evrard, P., Carmeliet, P., Dewerchin, M., Schoonjans, L., Duran, M., Waterham, H.R., Wanders, R.J., Baes, M., 2003. Impaired neuronal migration and endochondral ossification in Pex7 knockout mice: a model for rhizomelic chondrodysplasia punctata. *Hum Mol Genet* 12, 2255-2267.

Buchert, R., Tawamie, H., Smith, C., Uebe, S., Innes, A.M., Al Hallak, B., Ekici, A.B., Sticht, H., Schwarze, B., Lamont, R.E., Parboosingh, J.S., Bernier, F.P., Abou Jamra, R., 2014. A peroxisomal disorder of severe intellectual disability, epilepsy, and cataracts due to fatty acyl-CoA reductase 1 deficiency. *Am J Hum Genet* 95, 602-610.

Buhrer, C., Bassler, D., 2015. Oral Propranolol: A New Treatment for Infants with Retinopathy of Prematurity? *Neonatology* 108, 49-52.

Bukauskas, F.F., Jordan, K., Bukauskiene, A., Bennett, M.V., Lampe, P.D., Laird, D.W., Verselis, V.K., 2000. Clustering of connexin 43-enhanced green fluorescent protein gap junction channels and functional coupling in living cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 2556-2561.

Butkevich, E., Hulsmann, S., Wenzel, D., Shirao, T., Duden, R., Majoul, I., 2004. Drebrin is a novel connexin-43 binding partner that links gap junctions to the submembrane cytoskeleton. *Curr Biol* 14, 650-658.

Buttery, R.G., Hinrichsen, C.F., Weller, W.L., Haight, J.R., 1991. How thick should a retina be? A comparative study of mammalian species with and without intraretinal vasculature. *Vision Res* 31, 169-187.

Cabot, M.C., Jaken, S., 1984. Structural and chemical specificity of diacylglycerols for protein kinase C activation. *Biochem Biophys Res Commun* 125, 163-169.

Cabot, M.C., Synder, F., 1980. Manipulation of alkylglycerolipid levels in cultured cells. Fatty alcohol versus alkylglycerol supplements. *Biochim Biophys Acta* 617, 410-418.

Calandria, J.M., Marcheselli, V.L., Mukherjee, P.K., Uddin, J., Winkler, J.W., Petasis, N.A., Bazan, N.G., 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, 17877-17882.

Campbell, K., 1951. Intensive oxygen therapy as a possible cause of retrolental fibroplasia; a clinical approach. *Med J Aust* 2, 48-50.

Carlson, S.E., Carver, J.D., House, S.G., 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, 718-725.

Cepko, C., 1993. Lineage versus environment in the embryonic retina. *Trends Neurosci* 16, 96-97; author reply 98.

Chan-Ling, T., Chu, Y., Baxter, L., Weible Ii, M., Hughes, S., 2009. In vivo characterization of astrocyte precursor cells (APCs) and astrocytes in developing rat retinae: differentiation, proliferation, and apoptosis. *Glia* 57, 39-53.

Chan-Ling, T., Gock, B., Stone, J., 1995. The effect of oxygen on vasoformative cell division. Evidence that 'physiological hypoxia' is the stimulus for normal retinal vasculogenesis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 36, 1201-1214.

Chan-Ling, T.L., Halasz, P., Stone, J., 1990. Development of retinal vasculature in the cat: processes and mechanisms. *Curr Eye Res* 9, 459-478.

Chao, T.I., Grosche, J., Friedrich, K.J., Biedermann, B., Francke, M., Pannicke, T., Reichelt, W., Wulst, M., Muhle, C., Pritz-Hohmeier, S., Kuhrt, H., Faude, F., Drommer, W., Kasper, M., Buse, E., Reichenbach, A., 1997. Comparative studies on mammalian Muller (retinal glial) cells. *J Neurocytol* 26, 439-454.

Chase, J., 1982. The evolution of retinal vascularization in mammals. A comparison of vascular and avascular retinae. *Ophthalmology* 89, 1518-1525.

Chen, C.H., Chen, S.C., 1984. Mediation of vascular endothelial proliferation by factors in fetal bovine retinal extracts and serum. *Exp Eye Res* 39, 469-478.

Chen, C.H., Chen, S.C., 1987. Evidence of the presence of a specific vascular endothelial growth factor in fetal bovine retina. *Exp Cell Res* 169, 287-295.

Chen, J., Connor, K.M., Aderman, C.M., Smith, L.E., 2008. Erythropoietin deficiency decreases vascular stability in mice. *J Clin Invest* 118, 526-533.

Chen, J., Connor, K.M., Aderman, C.M., Willett, K.L., Aspegren, O.P., Smith, L.E., 2009. Suppression of retinal neovascularization by erythropoietin siRNA in a mouse model of proliferative retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 50, 1329-1335.

Chen, J., Joyal, J.S., Hatton, C.J., Juan, A.M., Pei, D.T., Hurst, C.G., Xu, D., Stahl, A., Hellstrom, A., Smith, L.E., 2012. Propranolol inhibition of beta-adrenergic receptor does not suppress pathologic neovascularization in oxygen-induced retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 53, 2968-2977.

Chen, M., Citil, A., McCabe, F., Leicht, K.M., Fiascone, J., Dammann, C.E., Dammann, O., 2011. Infection, oxygen, and immaturity: interacting risk factors for retinopathy of prematurity. *Neonatology* 99, 125-132.

Chen, Q., Galleano, M., Cederbaum, A.I., 1997. Cytotoxicity and apoptosis produced by arachidonic acid in Hep G2 cells overexpressing human cytochrome P4502E1. *J Biol Chem* 272, 14532-14541.

Cheng, C., Xia, C.H., Li, L., White, T.W., Niimi, J., Gong, X., 2008. Gap junction communication influences intercellular protein distribution in the lens. *Exp Eye Res* 86, 966-974.

Cheng, J.B., Russell, D.W., 2004. Mammalian wax biosynthesis. I. Identification of two fatty acyl-Coenzyme A reductases with different substrate specificities and tissue distributions. *J Biol Chem* 279, 37789-37797.

Chidlow, G., Wood, J.P., Graham, M., Osborne, N.N., 2005. Expression of monocarboxylate transporters in rat ocular tissues. *Am J Physiol Cell Physiol* 288, C416-428.

Choi, Y.K., Kim, K.W., 2008. Blood-neural barrier: its diversity and coordinated cell-to-cell communication. *BMB Rep* 41, 345-352.

Chu, Y., Hughes, S., Chan-Ling, T., 2001. Differentiation and migration of astrocyte precursor cells and astrocytes in human fetal retina: relevance to optic nerve coloboma. *FASEB J* 15, 2013-2015.

Clapham, D.E., 2007. Calcium signaling. *Cell* 131, 1047-1058.

Clark, K.J., Murray, A.W., 1995. Evidence that the bradykinin-induced activation of phospholipase D and of the mitogen-activated protein kinase cascade involve different protein kinase C isoforms. *J Biol Chem* 270, 7097-7103.

Cockcroft, S., Raghu, P., 2018. Phospholipid transport protein function at organelle contact sites. *Curr Opin Cell Biol* 53, 52-60.

Collins, C.T., Sullivan, T.R., McPhee, A.J., Stark, M.J., Makrides, M., Gibson, R.A., 2015. A dose response randomised controlled trial of docosahexaenoic acid (DHA) in preterm infants. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 99, 1-6.

Colussi, C., Rosati, J., Straino, S., Spallotta, F., Berni, R., Stilli, D., Rossi, S., Musso, E., Macchi, E., Mai, A., Sbardella, G., Castellano, S., Chimenti, C., Frustaci, A., Nebbioso, A., Altucci, L., Capogrossi, M.C., Gaetano, C., 2011. Nepsilon-lysine acetylation determines dissociation from GAP junctions and lateralization of connexin 43 in normal and dystrophic heart. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 2795-2800.

Connor, K.M., SanGiovanni, J.P., Lofqvist, C., Aderman, C.M., Chen, J., Higuchi, A., Hong, S., Pravda, E.A., Majchrzak, S., Carper, D., Hellstrom, A., Kang, J.X., Chew, E.Y., Salem, N., Jr., Serhan, C.N., Smith, L.E.H., 2007. Increased dietary intake of omega-3-polyunsaturated fatty acids reduces pathological retinal angiogenesis. *Nat Med* 13, 868-873.

Cooper, J.A., 2013. Cell biology in neuroscience: mechanisms of cell migration in the nervous system. *J Cell Biol* 202, 725-734.

Cornell-Bell, A.H., Finkbeiner, S.M., 1991. Ca2+ waves in astrocytes. *Cell Calcium* 12, 185-204.

Costeloe, K.L., Hennessy, E.M., Haider, S., Stacey, F., Marlow, N., Draper, E.S., 2012. Short term outcomes after extreme preterm birth in England: comparison of two birth cohorts in 1995 and 2006 (the EPICure studies). *BMJ* 345, e7976.

Cotrina, M.L., Lin, J.H., Alves-Rodrigues, A., Liu, S., Li, J., Azmi-Ghadimi, H., Kang, J., Naus, C.C., Nedergaard, M., 1998. Connexins regulate calcium signaling by controlling ATP release. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 15735-15740.

Couturier, A., Blot, G., Vignaud, L., Nanteau, C., Slembrouck-Brec, A., Fradot, V., Acar, N., Sahel, J.A., Tadayoni, R., Thuret, G., Sennlaub, F., Roger, J.E., Goureau, O., Guillonneau, X., Reichman, S., 2021. Reproducing diabetic retinopathy features using newly developed human induced-pluripotent stem cell-derived retinal Muller glial cells. *Glia*.

Crawford, M.A., Golfetto, I., Ghebremeskel, K., Min, Y., Moodley, T., Poston, L., Phylactos, A., Cunnane, S., Schmidt, W., 2003. The potential role for arachidonic and docosahexaenoic acids in protection against some central nervous system injuries in preterm infants. *Lipids* 38, 303-315.

Crespin, S., Bechberger, J., Mesnil, M., Naus, C.C., Sin, W.C., 2010. The carboxy-terminal tail of connexin43 gap junction protein is sufficient to mediate cytoskeleton changes in human glioma cells. *J Cell Biochem* 110, 589-597.

Crosse, V.M., Evans, P.J., 1952. Prevention of retrolental fibroplasia. *AMA Arch Ophthalmol* 48, 83-87.

Cunha-Vaz, J., Bernardes, R., Lobo, C., 2011. Blood-retinal barrier. *Eur J Ophthalmol* 21 Suppl 6, S3-9.

Dacey, D.M., 1994. Physiology, morphology and spatial densities of identified ganglion cell types in primate retina. *Ciba Found Symp* 184, 12-28; discussion 28-34, 63-70.

Dalli, J., Colas, R.A., Serhan, C.N., 2013. Novel n-3 immunoresolvents: structures and actions. *Sci Rep* 3, 1940.

Dammann, O., 2010. Inflammation and retinopathy of prematurity. *Acta Paediatr* 99, 975-977.

Dammann, O., Brinkhaus, M.J., Bartels, D.B., Dordelmann, M., Dressler, F., Kerk, J., Dork, T., Dammann, C.E., 2009. Immaturity, perinatal inflammation, and retinopathy of prematurity: a multi-hit hypothesis. *Early Hum Dev* 85, 325-329.

Danbolt, N.C., 2001. Glutamate uptake. *Prog Neurobiol* 65, 1-105.

Daniel, L.W., Small, G.W., Schmitt, J.D., Marasco, C.J., Ishaq, K., Piantadosi, C., 1988. Alkyl-linked diglycerides inhibit protein kinase C activation by diacylglycerols. *Biochem Biophys Res Commun* 151, 291-297.

Daniel, L.W., Waite, M., Wykle, R.L., 1986. A novel mechanism of diglyceride formation. 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate stimulates the cyclic breakdown and resynthesis of phosphatidylcholine. *J Biol Chem* 261, 9128-9132.

Darlow, B.A., Ells, A.L., Gilbert, C.E., Gole, G.A., Quinn, G.E., 2013. Are we there yet? Bevacizumab therapy for retinopathy of prematurity. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 98, F170-174.

Darlow, B.A., Hutchinson, J.L., Henderson-Smart, D.J., Donoghue, D.A., Simpson, J.M., Evans, N.J., 2005. Prenatal risk factors for severe retinopathy of prematurity among very preterm infants of the Australian and New Zealand Neonatal Network. *Pediatrics* 115, 990-996.

Darrow, B.J., Laing, J.G., Lampe, P.D., Saffitz, J.E., Beyer, E.C., 1995. Expression of multiple connexins in cultured neonatal rat ventricular myocytes. *Circ Res* 76, 381-387.

Das, A.K., Hajra, A.K., 1988. High incorporation of dietary 1-O-heptadecyl glycerol into tissue plasmalogens of young rats. *FEBS Lett* 227, 187-190.

Das, A.K., Holmes, R.D., Wilson, G.N., Hajra, A.K., 1992. Dietary ether lipid incorporation into tissue plasmalogens of humans and rodents. *Lipids* 27, 401-405.

Davies, M.H., Eubanks, J.P., Powers, M.R., 2006. Microglia and macrophages are increased in response to ischemia-induced retinopathy in the mouse retina. *Mol Vis* 12, 467-477.

de Queiroz, A., 1999. Do Image-Forming Eyes Promote Evolutionary Diversification? *Evolution* 53, 1654-1664.

de Vet, E.C., Ijlst, L., Oostheim, W., Dekker, C., Moser, H.W., van Den Bosch, H., Wanders, R.J., 1999. Ether lipid biosynthesis: alkyl-dihydroxyacetonephosphate synthase protein deficiency leads to reduced dihydroxyacetonephosphate acyltransferase activities. *J Lipid Res* 40, 1998-2003.

Dean, J.M., Lodhi, I.J., 2018. Structural and functional roles of ether lipids. *Protein Cell* 9, 196-206.

Defamie, N., Mesnil, M., 2012. The modulation of gap-junctional intercellular communication by lipid rafts. *Biochim Biophys Acta* 1818, 1866-1869.

Dehouck, M.P., Meresse, S., Delorme, P., Fruchart, J.C., Cecchelli, R., 1990. An easier, reproducible, and mass-production method to study the blood-brain barrier in vitro. *J Neurochem* 54, 1798-1801.

del Rio-Hortega, P., 1932. Cytology & [and] Cellular Pathology of the Nervous System. *Hoeber*.

Demb, J.B., Singer, J.H., 2015. Functional Circuitry of the Retina. *Annu Rev Vis Sci* 1, 263-289.

Derouiche, A., Rauen, T., 1995. Coincidence of L-glutamate/L-aspartate transporter (GLAST) and glutamine synthetase (GS) immunoreactions in retinal glia: evidence for coupling of GLAST and GS in transmitter clearance. *J Neurosci Res* 42, 131-143.

Desjardins, D., Liu, Y., Crosson, C.E., Ablonczy, Z., 2016. Histone Deacetylase Inhibition Restores Retinal Pigment Epithelium Function in Hyperglycemia. *PLoS One* 11, e0162596.

Dhaliwal, C.A., Fleck, B.W., Wright, E., Graham, C., McIntosh, N., 2009. Retinopathy of prematurity in small-for-gestational age infants compared with those of appropriate size for gestational age. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 94, F193-195.

Di Castro, M.A., Chuquet, J., Liaudet, N., Bhaukaurally, K., Santello, M., Bouvier, D., Tiret, P., Volterra, A., 2011. Local Ca2+ detection and modulation of synaptic release by astrocytes. *Nat Neurosci* 14, 1276-1284.

Diaz-Araya, C.M., Provis, J.M., Penfold, P.L., 1995a. Ontogeny and cellular expression of MHC and leucocyte antigens in human retina. *Glia* 15, 458-470.

Diaz-Araya, C.M., Provis, J.M., Penfold, P.L., Billson, F.A., 1995b. Development of microglial topography in human retina. *J Comp Neurol* 363, 53-68.

Dorninger, F., Brodde, A., Braverman, N.E., Moser, A.B., Just, W.W., Forss-Petter, S., Brugger, B., Berger, J., 2015. Homeostasis of phospholipids - The level of phosphatidylethanolamine tightly adapts to changes in ethanolamine plasmalogens. *Biochim Biophys Acta* 1851, 117-128.

Dorrell, M.I., Aguilar, E., Friedlander, M., 2002. Retinal vascular development is mediated by endothelial filopodia, a preexisting astrocytic template and specific R-cadherin adhesion. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43, 3500-3510.

Dorrell, M.I., Aguilar, E., Jacobson, R., Trauger, S.A., Friedlander, J., Siuzdak, G., Friedlander, M., 2010. Maintaining retinal astrocytes normalizes revascularization and prevents vascular pathology associated with oxygen-induced retinopathy. *Glia* 58, 43-54.

Dorrell, M.I., Friedlander, M., 2006. Mechanisms of endothelial cell guidance and vascular patterning in the developing mouse retina. *Prog Retin Eye Res* 25, 277-295.

Dreher, Z., Robinson, S.R., Distler, C., 1992. Muller cells in vascular and avascular retinae: a survey of seven mammals. *J Comp Neurol* 323, 59-80.

Duan, L.J., Takeda, K., Fong, G.H., 2014. Hypoxia inducible factor-2alpha regulates the development of retinal astrocytic network by maintaining adequate supply of astrocyte progenitors. *PLoS One* 9, e84736.

Dubois-Dauphin, M., Poitry-Yamate, C., de Bilbao, F., Julliard, A.K., Jourdan, F., Donati, G., 2000. Early postnatal Muller cell death leads to retinal but not optic nerve degeneration in NSE-Hu-Bcl-2 transgenic mice. *Neuroscience* 95, 9-21.

Dursun, A., Ozturk, S., Yucel, H., Ozec, A.V., Dursun, F.G., Toker, M.I., Erdogan, H., Arici, M.K., Topalkara, A., 2015. Association of neutrophil/lymphocyte ratio and retinal vein occlusion. *Eur J Ophthalmol* 25, 343-346.

Eckert, G.U., Fortes Filho, J.B., Maia, M., Procianoy, R.S., 2012. A predictive score for retinopathy of prematurity in very low birth weight preterm infants. *Eye (Lond)* 26, 400-406.

Eckert, P., Knickmeyer, M.D., Schutz, L., Wittbrodt, J., Heermann, S., 2019. Morphogenesis and axis specification occur in parallel during optic cup and optic fissure formation, differentially modulated by BMP and Wnt. *Open Biol* 9, 180179.

Edwards, M.M., McLeod, D.S., Li, R., Grebe, R., Bhutto, I., Mu, X., Lutty, G.A., 2012. The deletion of Math5 disrupts retinal blood vessel and glial development in mice. *Exp Eye Res* 96, 147-156.

Eichler, W., Yafai, Y., Keller, T., Wiedemann, P., Reichenbach, A., 2004a. PEDF derived from glial Muller cells: a possible regulator of retinal angiogenesis. *Exp Cell Res* 299, 68-78.

Eichler, W., Yafai, Y., Wiedemann, P., Reichenbach, A., 2004b. Angiogenesis-related factors derived from retinal glial (Muller) cells in hypoxia. *Neuroreport* 15, 1633-1637.

Eichmann, A., Simons, M., 2012. VEGF signaling inside vascular endothelial cells and beyond. *Curr Opin Cell Biol* 24, 188-193.

Elias, L.A., Turmaine, M., Parnavelas, J.G., Kriegstein, A.R., 2010. Connexin 43 mediates the tangential to radial migratory switch in ventrally derived cortical interneurons. *J Neurosci* 30, 7072-7077.

Elmasry, K., Ibrahim, A.S., Abdulmoneim, S., Al-Shabrawey, M., 2019. Bioactive lipids and pathological retinal angiogenesis. *Br J Pharmacol* 176, 93-109.

Elsasser, T.H., Caperna, T.J., Rumsey, T.S., 1995. Endotoxin administration decreases plasma insulin-like growth factor (IGF)-I and IGF-binding protein-2 in Angus x Hereford steers independent of changes in nutritional intake. *J Endocrinol* 144, 109-117.

Engelmann, B., 2004. Plasmalogens: targets for oxidants and major lipophilic antioxidants. *Biochem Soc Trans* 32, 147-150.

Enoch, J.M., Tobey, F.L., 1981. Vertebrate Photoreceptor Optics.

Erskine, L., Herrera, E., 2014. Connecting the retina to the brain. *ASN Neuro* 6.

Ertl, T., Gyarmati, J., Gaal, V., Szabo, I., 2006. Relationship between hyperglycemia and retinopathy of prematurity in very low birth weight infants. *Biol Neonate* 89, 56-59.

Euler, T., Haverkamp, S., Schubert, T., Baden, T., 2014. Retinal bipolar cells: elementary building blocks of vision. *Nat Rev Neurosci* 15, 507-519.

Evans, W.H., Martin, P.E., 2002. Gap junctions: structure and function (Review). *Mol Membr Biol* 19, 121-136.

Facciotti, F., Ramanjaneyulu, G.S., Lepore, M., Sansano, S., Cavallari, M., Kistowska, M., Forss-Petter, S., Ni, G., Colone, A., Singhal, A., Berger, J., Xia, C., Mori, L., De Libero, G., 2012. Peroxisome-derived lipids are self antigens that stimulate invariant natural killer T cells in the thymus. *Nat Immunol* 13, 474-480.

Fallon, R.F., Goodenough, D.A., 1981. Five-hour half-life of mouse liver gap-junction protein. *J Cell Biol* 90, 521-526.

Faria, R.X., Freitas, H.R., Reis, R.A.M., 2017. P2X7 receptor large pore signaling in avian Muller glial cells. *J Bioenerg Biomembr* 49, 215-229.

Fekete, D.M., Perez-Miguelsanz, J., Ryder, E.F., Cepko, C.L., 1994. Clonal analysis in the chicken retina reveals tangential dispersion of clonally related cells. *Dev Biol* 166, 666-682.

Fernald, R.D., 2004. Eyes: variety, development and evolution. *Brain Behav Evol* 64, 141-147.

Feulgen, R., Voit, K., 1924. Über einen weitverbreiteten festen Aldehyd. *Pflüger's Archiv für die gesamte Physiologie des Menschen und der Tiere* 206, 389-410.

Fiacco, T.A., McCarthy, K.D., 2006. Astrocyte calcium elevations: properties, propagation, and effects on brain signaling. *Glia* 54, 676-690.

Field, G.D., Sher, A., Gauthier, J.L., Greschner, M., Shlens, J., Litke, A.M., Chichilnisky, E.J., 2007. Spatial properties and functional organization of small bistratified ganglion cells in primate retina. *J Neurosci* 27, 13261-13272.

Filippi, L., Cavallaro, G., Bagnoli, P., Dal Monte, M., Fiorini, P., Donzelli, G., Tinelli, F., Araimo, G., Cristofori, G., la Marca, G., Della Bona, M.L., La Torre, A., Fortunato, P., Furlanetto, S., Osnaghi, S., Mosca, F., 2013. Oral propranolol for retinopathy of prematurity: risks, safety concerns, and perspectives. *J Pediatr* 163, 1570-1577 e1576.

Filippi, L., Cavallaro, G., Berti, E., Padrini, L., Araimo, G., Regiroli, G., Raffaeli, G., Bozzetti, V., Tagliabue, P., Tomasini, B., Mori, A., Buonocore, G., Agosti, M., Bossi, A., Chirico, G., Aversa, S., Fortunato, P., Osnaghi, S., Cavallotti, B., Suzani, M., Vanni, M., Borsari, G., Donati, S., Nascimbeni, G., Nardo, D., Piermarocchi, S., la Marca, G., Forni, G., Milani, S., Cortinovis, I., Calvani, M., Bagnoli, P., Dal Monte, M., Calvani, A.M., Pugi, A., Villamor, E., Donzelli, G., Mosca, F., 2019. Propranolol 0.2% Eye Micro-Drops for Retinopathy of Prematurity: A Prospective Phase IIB Study. *Front Pediatr* 7, 180.

Filippi, L., Cavallaro, G., Fiorini, P., Daniotti, M., Benedetti, V., Cristofori, G., Araimo, G., Ramenghi, L., La Torre, A., Fortunato, P., Pollazzi, L., la Marca, G., Malvagia, S., Bagnoli, P., Ristori, C., Dal Monte, M., Bilia, A.R., Isacchi, B., Furlanetto, S., Tinelli, F., Cioni, G., Donzelli, G., Osnaghi, S., Mosca, F., 2010. Study protocol: safety and efficacy of propranolol in newborns with Retinopathy of Prematurity (PROP-ROP): ISRCTN18523491. *BMC Pediatr* 10, 83.

Fischer, D.J., Liliom, K., Guo, Z., Nusser, N., Virag, T., Murakami-Murofushi, K., Kobayashi, S., Erickson, J.R., Sun, G., Miller, D.D., Tigyi, G., 1998. Naturally occurring analogs of lysophosphatidic acid elicit different cellular responses through selective activation of multiple receptor subtypes. *Mol Pharmacol* 54, 979-988.

Fischer, F., Martin, G., Agostini, H.T., 2011. Activation of retinal microglia rather than microglial cell density correlates with retinal neovascularization in the mouse model of oxygen-induced retinopathy. *J Neuroinflammation* 8, 120.

Fluckiger, S., Bucher, H.U., Hellstrom, A., Lovqist, C., Sturm, V., Arri, S.J., 2011. The early postnatal weight gain as a predictor of retinopathy of prematurity. *Klin Monbl Augenheilkd* 228, 306-310.

Ford, D.A., Gross, R.W., 1989a. Differential accumulation of diacyl and plasmalogenic diglycerides during myocardial ischemia. *Circ Res* 64, 173-177.

Ford, D.A., Gross, R.W., 1989b. 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, 3479-3483.

Ford, D.A., Hazen, S.L., Saffitz, J.E., Gross, R.W., 1991. The rapid and reversible activation of a calcium-independent plasmalogen-selective phospholipase A2 during myocardial ischemia. *J Clin Invest* 88, 331-335.

Ford, D.A., Miyake, R., Glaser, P.E., Gross, R.W., 1989. Activation of protein kinase C by naturally occurring ether-linked diglycerides. *J Biol Chem* 264, 13818-13824.

Ford, K.M., Saint-Geniez, M., Walshe, T., Zahr, A., D'Amore, P.A., 2011. Expression and role of VEGF in the adult retinal pigment epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 52, 9478-9487.

Forsythe, J.A., Jiang, B.H., Iyer, N.V., Agani, F., Leung, S.W., Koos, R.D., Semenza, G.L., 1996. Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol Cell Biol* 16, 4604-4613.

Francis, R., Xu, X., Park, H., Wei, C.J., Chang, S., Chatterjee, B., Lo, C., 2011. Connexin43 modulates cell polarity and directional cell migration by regulating microtubule dynamics. *PLoS One* 6, e26379.

Francke, M., Uhlmann, S., Pannicke, T., Goczalik, I., Uckermann, O., Weick, M., Hartig, W., Wiedemann, P., Reichenbach, A., Bringmann, A., 2003. Experimental dispase-induced retinopathy causes up-regulation of P2Y receptor-mediated calcium responses in Muller glial cells. *Ophthalmic Res* 35, 30-41.

Francke, M., Weick, M., Pannicke, T., Uckermann, O., Grosche, J., Goczalik, I., Milenkovic, I., Uhlmann, S., Faude, F., Wiedemann, P., Reichenbach, A., Bringmann, A., 2002. Upregulation of extracellular ATP-induced Muller cell responses in a dispase model of proliferative vitreoretinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43, 870-881.

Franze, K., Grosche, J., Skatchkov, S.N., Schinkinger, S., Foja, C., Schild, D., Uckermann, O., Travis, K., Reichenbach, A., Guck, J., 2007. Muller cells are living optical fibers in the vertebrate retina. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 8287-8292.

Fraser, R., 1971. The treatment of diabetic retinopathy by hypophysectomy. *Journ Annu Diabetol Hotel Dieu* 12, 237-238.

Fries, J.E., Goczalik, I.M., Wheeler-Schilling, T.H., Kohler, K., Guenther, E., Wolf, S., Wiedemann, P., Bringmann, A., Reichenbach, A., Francke, M., Pannicke, T., 2005. Identification of P2Y receptor subtypes in human muller glial cells by physiology, single cell RT-PCR, and immunohistochemistry. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46, 3000-3007.

Fries, J.E., Wheeler-Schilling, T.H., Kohler, K., Guenther, E., 2004. Distribution of metabotropic P2Y receptors in the rat retina: a single-cell RT-PCR study. *Brain Res Mol Brain Res* 130, 1-6.

Fruttiger, M., 2007. Development of the retinal vasculature. *Angiogenesis* 10, 77-88.

Fruttiger, M., Calver, A.R., Kruger, W.H., Mudhar, H.S., Michalovich, D., Takakura, N., Nishikawa, S., Richardson, W.D., 1996. PDGF mediates a neuron-astrocyte interaction in the developing retina. *Neuron* 17, 1117-1131.

Fruttiger, M., Calver, A.R., Richardson, W.D., 2000. Platelet-derived growth factor is constitutively secreted from neuronal cell bodies but not from axons. *Curr Biol* 10, 1283-1286.

Fuhrmann, S., 2010. Eye morphogenesis and patterning of the optic vesicle. *Current topics in developmental biology* 93, 61-84.

Fujino, T., Yamada, T., Asada, T., Tsuboi, Y., Wakana, C., Mawatari, S., Kono, S., 2017. Efficacy and Blood Plasmalogen Changes by Oral Administration of Plasmalogen in Patients with Mild Alzheimer's Disease and Mild Cognitive Impairment: A Multicenter, Randomized, Double-blind, Placebo-controlled Trial. *EBioMedicine* 17, 199-205.

Gaietta, G., Deerinck, T.J., Adams, S.R., Bouwer, J., Tour, O., Laird, D.W., Sosinsky, G.E., Tsien, R.Y., Ellisman, M.H., 2002. Multicolor and electron microscopic imaging of connexin trafficking. *Science* 296, 503-507.

Gallegos, L.L., Newton, A.C., 2008. Spatiotemporal dynamics of lipid signaling: protein kinase C as a paradigm. *IUBMB Life* 60, 782-789.

Galli-Resta, L., Novelli, E., Volpini, M., Strettoi, E., 2000. The spatial organization of cholinergic mosaics in the adult mouse retina. *Eur J Neurosci* 12, 3819-3822.

Ganong, B.R., Loomis, C.R., Hannun, Y.A., Bell, R.M., 1986. Specificity and mechanism of protein kinase C activation by sn-1,2-diacylglycerols. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 1184-1188.

Gaposchkin, D.P., Zoeller, R.A., 1999. Plasmalogen status influences docosahexaenoic acid levels in a macrophage cell line. Insights using ether lipid-deficient variants. *J Lipid Res* 40, 495-503.

Garg, R., Agthe, A.G., Donohue, P.K., Lehmann, C.U., 2003. Hyperglycemia and retinopathy of prematurity in very low birth weight infants. *J Perinatol* 23, 186-194.

Gariano, R.F., 2003. Cellular mechanisms in retinal vascular development. *Prog Retin Eye Res* 22, 295-306.

Gariano, R.F., Gardner, T.W., 2005. Retinal angiogenesis in development and disease. *Nature* 438, 960-966.

Gariano, R.F., Iruela-Arispe, M.L., Hendrickson, A.E., 1994. Vascular development in primate retina: comparison of laminar plexus formation in monkey and human. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35, 3442-3455.

Geimonen, E., Jiang, W., Ali, M., Fishman, G.I., Garfield, R.E., Andersen, J., 1996. Activation of protein kinase C in human uterine smooth muscle induces connexin-43 gene transcription through an AP-1 site in the promoter sequence. *J Biol Chem* 271, 23667-23674.

Germer, A., Jahnke, C., Mack, A., Enzmann, V., Reichenbach, A., 1997. Modification of glutamine synthetase expression by mammalian Muller (glial) cells in retinal organ cultures. *Neuroreport* 8, 3067-3072.

Giaume, C., Venance, L., 1998. Intercellular calcium signaling and gap junctional communication in astrocytes. *Glia* 24, 50-64.

Giebel, S.J., Menicucci, G., McGuire, P.G., Das, A., 2005. Matrix metalloproteinases in early diabetic retinopathy and their role in alteration of the blood-retinal barrier. *Lab Invest* 85, 597-607.

Giepmans, B.N., Hengeveld, T., Postma, F.R., Moolenaar, W.H., 2001. Interaction of c-Src with gap junction protein connexin-43. Role in the regulation of cell-cell communication. *J Biol Chem* 276, 8544-8549.

Gilbert, C., Fielder, A., Gordillo, L., Quinn, G., Semiglia, R., Visintin, P., Zin, A., 2005. Characteristics of infants with severe retinopathy of prematurity in countries with low, moderate, and high levels of development: implications for screening programs. *Pediatrics* 115, e518-525.

Gluckman, P.D., Harding, J.E., 1997. The physiology and pathophysiology of intrauterine growth retardation. *Horm Res* 48 Suppl 1, 11-16.

Gnanaguru, G., Bachay, G., Biswas, S., Pinzon-Duarte, G., Hunter, D.D., Brunken, W.J., 2013. Laminins containing the beta2 and gamma3 chains regulate astrocyte migration and angiogenesis in the retina. *Development* 140, 2050-2060.

Goldberg, M., De Pitta, M., Volman, V., Berry, H., Ben-Jacob, E., 2010. Nonlinear gap junctions enable long-distance propagation of pulsating calcium waves in astrocyte networks. *PLoS Comput Biol* 6.

Goldfine, H., 2010. The appearance, disappearance and reappearance of plasmalogens in evolution. *Prog Lipid Res* 49, 493-498.

Gomes, F.C., Paulin, D., Moura Neto, V., 1999. Glial fibrillary acidic protein (GFAP): modulation by growth factors and its implication in astrocyte differentiation. *Braz J Med Biol Res* 32, 619-631.

Good, W.V., 2004. Final results of the Early Treatment for Retinopathy of Prematurity (ETROP) randomized trial. *Trans Am Ophthalmol Soc* 102, 233-248; discussion 248-250.

Gottfried, E.L., Rapport, M.M., 1962. The biochemistry of plasmalogens. I. Isolation and characterization of phosphatidal choline, a pure native plasmalogen. *J Biol Chem* 237, 329-333.

Gould, C.M., Newton, A.C., 2008. The life and death of protein kinase C. *Curr Drug Targets* 9, 614-625.

Graca, A.B., Hippert, C., Pearson, R.A., 2018. Muller Glia Reactivity and Development of Gliosis in Response to Pathological Conditions. *Adv Exp Med Biol* 1074, 303-308.

Gresset, A., Sondek, J., Harden, T.K., 2012. The phospholipase C isozymes and their regulation. *Subcell Biochem* 58, 61-94.

Gross, R.W., 1984. High plasmalogen and arachidonic acid content of canine myocardial sarcolemma: a fast atom bombardment mass spectroscopic and gas chromatography-mass spectroscopic characterization. *Biochemistry* 23, 158-165.

Group, C.f.R.o.P.C., 2001. Multicenter Trial of Cryotherapy for Retinopathy of Prematurity: ophthalmological outcomes at 10 years. *Arch Ophthalmol* 119, 1110-1118.

Gu, X., Reagan, A., Yen, A., Bhatti, F., Cohen, A.W., Elliott, M.H., 2014. Spatial and temporal localization of caveolin-1 protein in the developing retina. *Adv Exp Med Biol* 801, 15-21.

Gubitosi-Klug, R.A., Talahalli, R., Du, Y., Nadler, J.L., Kern, T.S., 2008. 5-Lipoxygenase, but not 12/15-lipoxygenase, contributes to degeneration of retinal capillaries in a mouse model of diabetic retinopathy. *Diabetes* 57, 1387-1393.

Guerrero-Valero, M., Ferrer-Orta, C., Querol-Audi, J., Marin-Vicente, C., Fita, I., Gomez-Fernandez, J.C., Verdaguer, N., Corbalan-Garcia, S., 2009. Structural and mechanistic insights into the association of PKCalpha-C2 domain to PtdIns(4,5)P2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 6603-6607.

Hajrasouliha, A.R., Jiang, G., Lu, Q., Lu, H., Kaplan, H.J., Zhang, H.G., Shao, H., 2013. Exosomes from retinal astrocytes contain antiangiogenic components that inhibit laser-induced choroidal neovascularization. *J Biol Chem* 288, 28058-28067.

Halassa, M.M., Fellin, T., Haydon, P.G., 2007. The tripartite synapse: roles for gliotransmission in health and disease. *Trends Mol Med* 13, 54-63.

Hamada, K., Miyatake, H., Terauchi, A., Mikoshiba, K., 2017. IP3-mediated gating mechanism of the IP3 receptor revealed by mutagenesis and X-ray crystallography. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114, 4661-4666.

Han, X., Holtzman, D.M., McKeel, D.W., Jr., 2001. Plasmalogen deficiency in early Alzheimer's disease subjects and in animal models: molecular characterization using electrospray ionization mass spectrometry. *J Neurochem* 77, 1168-1180.

Han, X.L., Gross, R.W., 1990. Plasmenylcholine and phosphatidylcholine membrane bilayers possess distinct conformational motifs. *Biochemistry* 29, 4992-4996.

Hara, H., Wakisaka, T., Aoyama, Y., 2003. Lymphatic absorption of plasmalogen in rats. *Br J Nutr* 90, 29-32.

Hard, A.L., Hellstrom, A., 2011. On safety, pharmacokinetics and dosage of bevacizumab in ROP treatment - a review. *Acta Paediatr* 100, 1523-1527.

Hard, A.L., Lofqvist, C., Fortes Filho, J.B., Procianoy, R.S., Smith, L., Hellstrom, A., 2010. Predicting proliferative retinopathy in a Brazilian population of preterm infants with the screening algorithm WINROP. *Arch Ophthalmol* 128, 1432-1436.

Harden, T.K., Waldo, G.L., Hicks, S.N., Sondek, J., 2011. Mechanism of activation and inactivation of Gq/phospholipase C-beta signaling nodes. *Chem Rev* 111, 6120-6129.

Harder, B.C., von Baltz, S., Jonas, J.B., Schlichtenbrede, F.C., 2014. Intravitreal low-dosage bevacizumab for retinopathy of prematurity. *Acta Ophthalmol* 92, 577-581.

Hardy, P., Beauchamp, M., Sennlaub, F., Gobeil, F., Jr., Tremblay, L., Mwaikambo, B., Lachapelle, P., Chemtob, S., 2005. New insights into the retinal circulation: inflammatory lipid mediators in ischemic retinopathy. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 72, 301-325.

Hare, J.F., 1990. Mechanisms of membrane protein turnover. *Biochim Biophys Acta* 1031, 71-90.

Hare, J.F., Taylor, K., 1991. Mechanisms of plasma membrane protein degradation: recycling proteins are degraded more rapidly than those confined to the cell surface. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 5902-5906.

Harizi, H., Corcuff, J.B., Gualde, N., 2008. Arachidonic-acid-derived eicosanoids: roles in biology and immunopathology. *Trends Mol Med* 14, 461-469.

Hazen, S.L., Ford, D.A., Gross, R.W., 1991a. Activation of a membrane-associated phospholipase A2 during rabbit myocardial ischemia which is highly selective for plasmalogen substrate. *J Biol Chem* 266, 5629-5633.

Hazen, S.L., Gross, R.W., 1992. Identification and characterization of human myocardial phospholipase A2 from transplant recipients suffering from end-stage ischemic heart disease. *Circ Res* 70, 486-495.

Hazen, S.L., Stuppy, R.J., Gross, R.W., 1990. Purification and characterization of canine myocardial cytosolic phospholipase A2. A calcium-independent phospholipase with absolute f1-2 regiospecificity for diradyl glycerophospholipids. *J Biol Chem* 265, 10622-10630.

Hazen, S.L., Zupan, L.A., Weiss, R.H., Getman, D.P., Gross, R.W., 1991b. Suicide inhibition of canine myocardial cytosolic calcium-independent phospholipase A2. Mechanism-based discrimination between calcium-dependent and -independent phospholipases A2. *J Biol Chem* 266, 7227-7232.

Heller, C.D., O'Shea, M., Yao, Q., Langer, J., Ehrenkranz, R.A., Phelps, D.L., Poole, W.K., Stoll, B., Duara, S., Oh, W., Lemons, J., Poindexter, B., 2007. Human milk intake and retinopathy of prematurity in extremely low birth weight infants. *Pediatrics* 120, 1-9.

Hellgren, G., Lofqvist, C., Hansen-Pupp, I., Gram, M., Smith, L.E., Ley, D., Hellstrom, A., 2018. Increased postnatal concentrations of pro-inflammatory cytokines are associated with reduced IGF-I levels and retinopathy of prematurity. *Growth Horm IGF Res* 39, 19-24.

Hellstrom, A., Engstrom, E., Hard, A.L., Albertsson-Wikland, K., Carlsson, B., Niklasson, A., Lofqvist, C., Svensson, E., Holm, S., Ewald, U., Holmstrom, G., Smith, L.E., 2003. Postnatal serum insulin-like growth factor I deficiency is associated with retinopathy of prematurity and other complications of premature birth. *Pediatrics* 112, 1016-1020.

Hellstrom, A., Ley, D., Hansen-Pupp, I., Hallberg, B., Lofqvist, C., van Marter, L., van Weissenbruch, M., Ramenghi, L.A., Beardsall, K., Dunger, D., Hard, A.L., Smith, L.E., 2016. Insulin-like growth factor 1 has multisystem effects on foetal and preterm infant development. *Acta Paediatr* 105, 576-586.

Hellstrom, A., Perruzzi, C., Ju, M., Engstrom, E., Hard, A.L., Liu, J.L., Albertsson-Wikland, K., Carlsson, B., Niklasson, A., Sjodell, L., LeRoith, D., Senger, D.R., Smith, L.E., 2001. Low IGF-I suppresses VEGF-survival signaling in retinal endothelial cells: direct correlation with clinical retinopathy of prematurity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 5804-5808.

Hellström, A., Smith, L.E.H., Dammann, O., 2013. Retinopathy of prematurity. *The Lancet* 382, 1445-1457.

Heras-Sandoval, D., Pedraza-Chaverri, J., Perez-Rojas, J.M., 2016. Role of docosahexaenoic acid in the modulation of glial cells in Alzheimer's disease. *J Neuroinflammation* 13, 61.

Hermetter, A., Rainer, B., Ivessa, E., Kalb, E., Loidl, J., Roscher, A., Paltauf, F., 1989. Influence of plasmalogen deficiency on membrane fluidity of human skin fibroblasts: a fluorescence anisotropy study. *Biochim Biophys Acta* 978, 151-157.

Heymans, F., Da Silva, C., Marrec, N., Godfroid, J.J., Castagna, M., 1987. Alkyl analogs of diacylglycerol as activators of protein kinase C. *FEBS Lett* 218, 35-40.

Hilla, A.M., Diekmann, H., Fischer, D., 2017. Microglia Are Irrelevant for Neuronal Degeneration and Axon Regeneration after Acute Injury. *J Neurosci* 37, 6113-6124.

Hirota, S., Liu, Q., Lee, H.S., Hossain, M.G., Lacy-Hulbert, A., McCarty, J.H., 2011. The astrocyte-expressed integrin alphavbeta8 governs blood vessel sprouting in the developing retina. *Development* 138, 5157-5166.

Hirsch, L., Nazari, H., Sreekumar, P.G., Kannan, R., Dustin, L., Zhu, D., Barron, E., Hinton, D.R., 2015. TGF-beta2 secretion from RPE decreases with polarization and becomes apically oriented. *Cytokine* 71, 394-396.

Hofer, T., Venance, L., Giaume, C., 2002. Control and plasticity of intercellular calcium waves in astrocytes: a modeling approach. *J Neurosci* 22, 4850-4859.

Hoffman, D.R., Wheaton, D.K., James, K.J., Tuazon, M., Diersen-Schade, D.A., Harris, C.L., Stolz, S., Berseth, C.L., 2006. Docosahexaenoic acid in red blood cells of term infants receiving two levels of long-chain polyunsaturated fatty acids. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 42, 287-292.

Holt, C.E., Bertsch, T.W., Ellis, H.M., Harris, W.A., 1988. Cellular determination in the Xenopus retina is independent of lineage and birth date. *Neuron* 1, 15-26.

Holubiec, M.I., Romero, J.I., Suarez, J., Portavella, M., Fernandez-Espejo, E., Blanco, E., Galeano, P., de Fonseca, F.R., 2018. Palmitoylethanolamide prevents neuroinflammation, reduces astrogliosis and preserves recognition and spatial memory following induction of neonatal anoxia-ischemia. *Psychopharmacology (Berl)* 235, 2929-2945.

Homkajorn, B., Sims, N.R., Muyderman, H., 2010. Connexin 43 regulates astrocytic migration and proliferation in response to injury. *Neurosci Lett* 486, 197-201.

Hong, C.C., Peterson, Q.P., Hong, J.Y., Peterson, R.T., 2006. Artery/vein specification is governed by opposing phosphatidylinositol-3 kinase and MAP kinase/ERK signaling. *Curr Biol* 16, 1366-1372.

Hong, S., Lu, Y., 2013. Omega-3 fatty acid-derived resolvins and protectins in inflammation resolution and leukocyte functions: targeting novel lipid mediator pathways in mitigation of acute kidney injury. *Front Immunol* 4, 13.

Honsho, M., Abe, Y., Fujiki, Y., 2015. Dysregulation of Plasmalogen Homeostasis Impairs Cholesterol Biosynthesis. *J Biol Chem* 290, 28822-28833.

Honsho, M., Asaoku, S., Fujiki, Y., 2010. Posttranslational regulation of fatty acyl-CoA reductase 1, Far1, controls ether glycerophospholipid synthesis. *J Biol Chem* 285, 8537-8542.

Honsho, M., Dorninger, F., Abe, Y., Setoyama, D., Ohgi, R., Uchiumi, T., Kang, D., Berger, J., Fujiki, Y., 2019. Impaired plasmalogen synthesis dysregulates liver X receptor-dependent transcription in cerebellum. *J Biochem*.

Honsho, M., Fujiki, Y., 2017. Plasmalogen homeostasis - regulation of plasmalogen biosynthesis and its physiological consequence in mammals. *FEBS Lett* 591, 2720-2729.

Honsho, M., Yagita, Y., Kinoshita, N., Fujiki, Y., 2008. Isolation and characterization of mutant animal cell line defective in alkyl-dihydroxyacetonephosphate synthase: localization and transport of plasmalogens to post-Golgi compartments. *Biochim Biophys Acta* 1783, 1857-1865.

Hoon, M., Okawa, H., Della Santina, L., Wong, R.O., 2014. Functional architecture of the retina: development and disease. *Prog Retin Eye Res* 42, 44-84.

Hossain, M.S., Tajima, A., Kotoura, S., Katafuchi, T., 2018. Oral ingestion of plasmalogens can attenuate the LPS-induced memory loss and microglial activation. *Biochem Biophys Res Commun* 496, 1033-1039.

Huang, R.L., Teo, Z., Chong, H.C., Zhu, P., Tan, M.J., Tan, C.K., Lam, C.R., Sng, M.K., Leong, D.T., Tan, S.M., Kersten, S., Ding, J.L., Li, H.Y., Tan, N.S., 2011. ANGPTL4 modulates vascular junction integrity by integrin signaling and disruption of intercellular VE-cadherin and claudin-5 clusters. *Blood* 118, 3990-4002.

Hughes, S., Yang, H., Chan-Ling, T., 2000. Vascularization of the human fetal retina: roles of vasculogenesis and angiogenesis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41, 1217-1228.

Hyland, R.M., Komlosi, K., Alleman, B.W., Tolnai, M., Wood, L.M., Bell, E.F., Ertl, T., 2013. Infantile hemangiomas and retinopathy of prematurity: clues to the regulation of vasculogenesis. *Eur J Pediatr* 172, 803-809.

Hylander, M.A., Strobino, D.M., Pezzullo, J.C., Dhanireddy, R., 2001. Association of human milk feedings with a reduction in retinopathy of prematurity among very low birthweight infants. *J Perinatol* 21, 356-362.

Icha, J., Kunath, C., Rocha-Martins, M., Norden, C., 2016. Independent modes of ganglion cell translocation ensure correct lamination of the zebrafish retina. *J Cell Biol* 215, 259-275.

Ishikawa, K., Yoshida, S., Kadota, K., Nakamura, T., Niiro, H., Arakawa, S., Yoshida, A., Akashi, K., Ishibashi, T., 2010. Gene expression profile of hyperoxic and hypoxic retinas in a mouse model of oxygen-induced retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 51, 4307-4319.

Ito, D., Imai, Y., Ohsawa, K., Nakajima, K., Fukuuchi, Y., Kohsaka, S., 1998. Microglia-specific localisation of a novel calcium binding protein, Iba1. *Brain Res Mol Brain Res* 57, 1-9.

Itoh, T., Yamamoto, K., 2008. Peroxisome proliferator activated receptor gamma and oxidized docosahexaenoic acids as new class of ligand. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 377, 541-547.

Itzkovitz, B., Jiralerspong, S., Nimmo, G., Loscalzo, M., Horovitz, D.D., Snowden, A., Moser, A., Steinberg, S., Braverman, N., 2012. Functional characterization of novel mutations in GNPAT and AGPS, causing rhizomelic chondrodysplasia punctata (RCDP) types 2 and 3. *Hum Mutat* 33, 189-197.

James, P.F., Lake, A.C., Hajra, A.K., Larkins, L.K., Robinson, M., Buchanan, F.G., Zoeller, R.A., 1997. An animal cell mutant with a deficiency in acyl/alkyl-dihydroxyacetone-phosphate reductase activity. Effects on the biosynthesis of ether-linked and diacyl glycerolipids. *J Biol Chem* 272, 23540-23546.

Jammalamadaka, A., Suwannatat, P., Fisher, S.K., Manjunath, B.S., Hollerer, T., Luna, G., 2015. Characterizing spatial distributions of astrocytes in the mammalian retina. *Bioinformatics* 31, 2024-2031.

Jiang, J., Xia, X.B., Xu, H.Z., Xiong, Y., Song, W.T., Xiong, S.Q., Li, Y., 2009. Inhibition of retinal neovascularization by gene transfer of small interfering RNA targeting HIF-1alpha and VEGF. *J Cell Physiol* 218, 66-74.

Jo, A.O., Ryskamp, D.A., Phuong, T.T., Verkman, A.S., Yarishkin, O., MacAulay, N., Krizaj, D., 2015. TRPV4 and AQP4 Channels Synergistically Regulate Cell Volume and Calcium Homeostasis in Retinal Muller Glia. *J Neurosci* 35, 13525-13537.

Joffre, C., Rey, C., Nadjar, A., Laye, S., 2016. Role of n-3 PUFAs in inflammation via resolvin biosynthesis. *OCL* 23, 6.

Johansson, K., Bruun, A., Ehinger, B., 1999. Gap junction protein connexin43 is heterogeneously expressed among glial cells in the adult rabbit retina. *J Comp Neurol* 407, 395-403.

Johnson, R.G., Reynhout, J.K., TenBroek, E.M., Quade, B.J., Yasumura, T., Davidson, K.G., Sheridan, J.D., Rash, J.E., 2012. Gap junction assembly: roles for the formation plaque and regulation by the C-terminus of connexin43. *Mol Biol Cell* 23, 71-86.

Joplin, G.F., Oakley, N.W., Hill, D.W., Kohner, E.M., Fraser, T.R., 1967. Diabetic retinopathy. II. Comparison of disease remission induced by various degrees of pituitary ablation by Y90. *Diabetologia* 3, 406-412.

Jordan, K., Chodock, R., Hand, A.R., Laird, D.W., 2001. The origin of annular junctions: a mechanism of gap junction internalization. *J Cell Sci* 114, 763-773.

Kameritsch, P., Pogoda, K., Pohl, U., 2012. Channel-independent influence of connexin 43 on cell migration. *Biochim Biophys Acta* 1818, 1993-2001.

Kanai, Y., Hediger, M.A., 2004. The glutamate/neutral amino acid transporter family SLC1: molecular, physiological and pharmacological aspects. *Pflugers Arch* 447, 469-479.

Kang Derwent, J., Linsenmeier, R.A., 2000. Effects of hypoxemia on the a- and b-waves of the electroretinogram in the cat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41, 3634-3642.

Karkhaneh, R., Khodabande, A., Riazi-Eafahani, M., Roohipoor, R., Ghassemi, F., Imani, M., Dastjani Farahani, A., Ebrahimi Adib, N., Torabi, H., 2016. Efficacy of intravitreal bevacizumab for zone-II retinopathy of prematurity. *Acta Ophthalmol* 94, e417-420.

Kautzman, A.G., Keeley, P.W., Nahmou, M.M., Luna, G., Fisher, S.K., Reese, B.E., 2018. Sox2 regulates astrocytic and vascular development in the retina. *Glia* 66, 623-636.

Kelly, M.M., 2006. The basics of prematurity. *J Pediatr Health Care* 20, 238-244.

Kerr, N.M., Johnson, C.S., de Souza, C.F., Chee, K.S., Good, W.R., Green, C.R., Danesh-Meyer, H.V., 2010. Immunolocalization of gap junction protein connexin43 (GJA1) in the human retina and optic nerve. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 51, 4028-4034.

Kerr, N.M., Johnson, C.S., Zhang, J., Eady, E.K., Green, C.R., Danesh-Meyer, H.V., 2012. High pressure-induced retinal ischaemia reperfusion causes upregulation of gap junction protein connexin43 prior to retinal ganglion cell loss. *Exp Neurol* 234, 144-152.

Kida, T., Oku, H., Osuka, S., Horie, T., Ikeda, T., 2021. Hyperglycemia-induced VEGF and ROS production in retinal cells is inhibited by the mTOR inhibitor, rapamycin. *Sci Rep* 11, 1885.

Kierdorf, K., Prinz, M., 2013. Factors regulating microglia activation. *Front Cell Neurosci* 7, 44.

Kierdorf, K., Prinz, M., 2017. Microglia in steady state. *J Clin Invest* 127, 3201-3209.

Kihara, A.H., Mantovani de Castro, L., Belmonte, M.A., Yan, C.Y., Moriscot, A.S., Hamassaki, D.E., 2006. Expression of connexins 36, 43, and 45 during postnatal development of the mouse retina. *J Neurobiol* 66, 1397-1410.

Kim, S.Y., Johnson, M.A., McLeod, D.S., Alexander, T., Hansen, B.C., Lutty, G.A., 2005. Neutrophils are associated with capillary closure in spontaneously diabetic monkey retinas. *Diabetes* 54, 1534-1542.

Kimelberg, H.K., 1995. Receptors on astrocytes--what possible functions? *Neurochem Int* 26, 27-40.

Kimelberg, H.K., Katz, D.M., 1985. High-affinity uptake of serotonin into immunocytochemically identified astrocytes. *Science* 228, 889-891.

Kimura, K., Nishida, T., 2010. Role of the ubiquitin-proteasome pathway in downregulation of the gap-junction protein Connexin43 by TNF-{alpha} in human corneal fibroblasts. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 51, 1943-1947.

Kimura, T., Kimura, A.K., Ren, M., Monteiro, V., Xu, Y., Berno, B., Schlame, M., Epand, R.M., 2019. Plasmalogen loss caused by remodeling deficiency in mitochondria. *Life Sci Alliance* 2.

Kitajewski, J., 2011. Endothelial laminins underlie the tip cell microenvironment. *EMBO Rep* 12, 1087-1088.

Klaassen, L.J., Sun, Z., Steijaert, M.N., Bolte, P., Fahrenfort, I., Sjoerdsma, T., Klooster, J., Claassen, Y., Shields, C.R., Ten Eikelder, H.M., Janssen-Bienhold, U., Zoidl, G., McMahon, D.G., Kamermans, M., 2011. Synaptic transmission from horizontal cells to cones is impaired by loss of connexin hemichannels. *PLoS Biol* 9, e1001107.

Klinger, G., Levy, I., Sirota, L., Boyko, V., Lerner-Geva, L., Reichman, B., 2010. Outcome of early-onset sepsis in a national cohort of very low birth weight infants. *Pediatrics* 125, e736-740.

Knickelbein, J.E., Liu, B., Arakelyan, A., Zicari, S., Hannes, S., Chen, P., Li, Z., Grivel, J.C., Chaigne-Delalande, B., Sen, H.N., Margolis, L., Nussenblatt, R.B., 2016. Modulation of Immune Responses

by Extracellular Vesicles From Retinal Pigment Epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 57, 4101-4107.

Kociok, N., Crespo-Garcia, S., Liang, Y., Klein, S.V., Nurnberg, C., Reichhart, N., Skosyrski, S., Moritz, E., Maier, A.K., Brunken, W.J., Strauss, O., Koch, M., Joussen, A.M., 2016. Lack of netrin-4 modulates pathologic neovascularization in the eye. *Sci Rep* 6, 18828.

Kodal, H., Weick, M., Moll, V., Biedermann, B., Reichenbach, A., Bringmann, A., 2000. Involvement of calcium-activated potassium channels in the regulation of DNA synthesis in cultured Muller glial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41, 4262-4267.

Kofuji, P., Biedermann, B., Siddharthan, V., Raap, M., Iandiev, I., Milenkovic, I., Thomzig, A., Veh, R.W., Bringmann, A., Reichenbach, A., 2002. Kir potassium channel subunit expression in retinal glial cells: implications for spatial potassium buffering. *Glia* 39, 292-303.

Koronyo, Y., Salumbides, B.C., Black, K.L., Koronyo-Hamaoui, M., 2012. Alzheimer's disease in the retina: imaging retinal abeta plaques for early diagnosis and therapy assessment. *Neurodegener Dis* 10, 285-293.

Kosako, H., Amano, M., Yanagida, M., Tanabe, K., Nishi, Y., Kaibuchi, K., Inagaki, M., 1997. Phosphorylation of glial fibrillary acidic protein at the same sites by cleavage furrow kinase and Rho-associated kinase. *J Biol Chem* 272, 10333-10336.

Krantic, S., Torriglia, A., 2014. Retina: source of the earliest biomarkers for Alzheimer's disease? *J Alzheimers Dis* 40, 237-243.

Kriegstein, A.R., Noctor, S.C., 2004. Patterns of neuronal migration in the embryonic cortex. *Trends Neurosci* 27, 392-399.

Krishnan, G., Chatterjee, N., 2013. Detergent resistant membrane fractions are involved in calcium signaling in Muller glial cells of retina. *Int J Biochem Cell Biol* 45, 1758-1766.

Kudo, I., Murakami, M., 2002. Phospholipase A2 enzymes. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 68-69, 3-58.

Kulkarni, P.S., 1991. Arachidonic acid metabolism in human and bovine retina. *J Ocul Pharmacol* 7, 135-139.

Kumagai, A.K., Glasgow, B.J., Pardridge, W.M., 1994. GLUT1 glucose transporter expression in the diabetic and nondiabetic human eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35, 2887-2894.

Kurtul, B.E., Ozer, P.A., 2019. Neutrophil-to-lymphocyte ratio in ocular diseases: a systematic review. *Int J Ophthalmol* 12, 1951-1958.

La Vail, M.M., Rapaport, D.H., Rakic, P., 1991. Cytogenesis in the monkey retina. *J Comp Neurol* 309, 86-114.

Lagos-Cabre, R., Burgos-Bravo, F., Avalos, A.M., Leyton, L., 2019. Connexins in Astrocyte Migration. *Front Pharmacol* 10, 1546.

Laing, J.G., Beyer, E.C., 1995. The gap junction protein connexin43 is degraded via the ubiquitin proteasome pathway. *J Biol Chem* 270, 26399-26403.

Laird, D.W., 2006. Life cycle of connexins in health and disease. *Biochem J* 394, 527-543.

Lamb, T.D., 2013. Evolution of phototransduction, vertebrate photoreceptors and retina. *Prog Retin Eye Res* 36, 52-119.

Lampe, P.D., Lau, A.F., 2000. Regulation of gap junctions by phosphorylation of connexins. *Arch Biochem Biophys* 384, 205-215.

Land, M.F., Nilsson, D.E., 2012. Animal Eyes. Oxford University Press.

Lange, C.A., Bainbridge, J.W., 2012. Oxygen sensing in retinal health and disease. *Ophthalmologica* 227, 115-131.

Langford, K., Nicolaides, K., Miell, J.P., 1998. Maternal and fetal insulin-like growth factors and their binding proteins in the second and third trimesters of human pregnancy. *Hum Reprod* 13, 1389-1393.

Langlois, S., Cowan, K.N., Shao, Q., Cowan, B.J., Laird, D.W., 2008. Caveolin-1 and -2 interact with connexin43 and regulate gap junctional intercellular communication in keratinocytes. *Mol Biol Cell* 19, 912-928.

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

Lantos, J.D., 2013. SUPPORTing premature infants. *Pediatrics* 132, e1661-1663.

Lassarre, C., Hardouin, S., Daffos, F., Forestier, F., Frankenne, F., Binoux, M., 1991. Serum insulin-like growth factors and insulin-like growth factor binding proteins in the human fetus. Relationships with growth in normal subjects and in subjects with intrauterine growth retardation. *Pediatr Res* 29, 219-225.

Lauf, U., Giepmans, B.N., Lopez, P., Braconnot, S., Chen, S.C., Falk, M.M., 2002. Dynamic trafficking and delivery of connexons to the plasma membrane and accretion to gap junctions in living cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 10446-10451.

Laye, S., Nadjar, A., Joffre, C., Bazinet, R.P., 2018. Anti-Inflammatory Effects of Omega-3 Fatty Acids in the Brain: Physiological Mechanisms and Relevance to Pharmacology. *Pharmacol Rev* 70, 12-38.

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.

Leaute-Labreze, C., Dumas de la Roque, E., Hubiche, T., Boralevi, F., Thambo, J.B., Taieb, A., 2008. Propranolol for severe hemangiomas of infancy. *N Engl J Med* 358, 2649-2651.

Lechner, J., Chen, M., Hogg, R.E., Toth, L., Silvestri, G., Chakravarthy, U., Xu, H., 2015. Alterations in Circulating Immune Cells in Neovascular Age-Related Macular Degeneration. *Sci Rep* 5, 16754.

Lee, J., Dammann, O., 2012. Perinatal infection, inflammation, and retinopathy of prematurity. *Semin Fetal Neonatal Med* 17, 26-29.

Lee, T.C., 1998. Biosynthesis and possible biological functions of plasmalogens. *Biochim Biophys Acta* 1394, 129-145.

Leithe, E., 2016. Regulation of connexins by the ubiquitin system: Implications for intercellular communication and cancer. *Biochim Biophys Acta* 1865, 133-146.

Leithe, E., Mesnil, M., Aasen, T., 2018. The connexin 43 C-terminus: A tail of many tales. *Biochim Biophys Acta Biomembr* 1860, 48-64.

Leithe, E., Rivedal, E., 2004. Ubiquitination and down-regulation of gap junction protein connexin-43 in response to 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate treatment. *J Biol Chem* 279, 50089-50096.

Lessig, J., Fuchs, B., 2009. Plasmalogens in biological systems: their role in oxidative processes in biological membranes, their contribution to pathological processes and aging and plasmalogen analysis. *Curr Med Chem* 16, 2021-2041.

Leung, D.W., Cachianes, G., Kuang, W.J., Goeddel, D.V., Ferrara, N., 1989. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* 246, 1306-1309.

Lev, S., 2012. Nonvesicular lipid transfer from the endoplasmic reticulum. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4.

Ley, D., Hallberg, B., Hansen-Pupp, I., Dani, C., Ramenghi, L.A., Marlow, N., Beardsall, K., Bhatti, F., Dunger, D., Higginson, J.D., Mahaveer, A., Mezu-Ndubuisi, O.J., Reynolds, P., Giannantonio, C., van Weissenbruch, M., Barton, N., Tocoian, A., Hamdani, M., Jochim, E., Mangili, A., Chung, J.K., Turner, M.A., Smith, L.E.H., Hellstrom, A., 2019. rhIGF-1/rhIGFBP-3 in Preterm Infants: A Phase 2 Randomized Controlled Trial. *J Pediatr* 206, 56-65 e58.

Ley, D., Hansen-Pupp, I., Niklasson, A., Domellof, M., Friberg, L.E., Borg, J., Lofqvist, C., Hellgren, G., Smith, L.E., Hard, A.L., Hellstrom, A., 2013. Longitudinal infusion of a complex of insulin-like growth factor-I and IGF-binding protein-3 in five preterm infants: pharmacokinetics and short-term safety. *Pediatr Res* 73, 68-74.

Li, F., Jiang, D., Samuel, M.A., 2019a. Microglia in the developing retina. *Neural Dev* 14, 12.

Li, R., Maminishkis, A., Wang, F.E., Miller, S.S., 2007. PDGF-C and -D induced proliferation/migration of human RPE is abolished by inflammatory cytokines. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48, 5722-5732.

Li, S., Uno, Y., Rudolph, U., Cobb, J., Liu, J., Anderson, T., Levy, D., Balu, D.T., Coyle, J.T., 2018. Astrocytes in primary cultures express serine racemase, synthesize d-serine and acquire A1 reactive astrocyte features. *Biochem Pharmacol* 151, 245-251.

Li, X., Liu, J., Hoh, J., 2019b. Muller cells in pathological retinal angiogenesis. *Transl Res* 207, 96-106.

Li, Y., Holtzclaw, L.A., Russell, J.T., 2001. Muller cell Ca2+ waves evoked by purinergic receptor agonists in slices of rat retina. *J Neurophysiol* 85, 986-994.

Liegl, R., Lofqvist, C., Hellstrom, A., Smith, L.E., 2016. IGF-1 in retinopathy of prematurity, a CNS neurovascular disease. *Early Hum Dev* 102, 13-19.

Lin, M., Chen, Y., Jin, J., Hu, Y., Zhou, K.K., Zhu, M., Le, Y.Z., Ge, J., Johnson, R.S., Ma, J.X., 2011. Ischaemia-induced retinal neovascularisation and diabetic retinopathy in mice with conditional knockout of hypoxia-inducible factor-1 in retinal Muller cells. *Diabetologia* 54, 1554-1566.

Lipp, S., Wurm, A., Pannicke, T., Wiedemann, P., Reichenbach, A., Chen, J., Bringmann, A., 2009. Calcium responses mediated by type 2 IP3-receptors are required for osmotic volume regulation of retinal glial cells in mice. *Neurosci Lett* 457, 85-88.

Liu, B., Hunter, D.J., Smith, A.A., Chen, S., Helms, J.A., 2014. The capacity of neural crest-derived stem cells for ocular repair. *Birth Defects Res C Embryo Today* 102, 299-308.

Liu, D., Nagan, N., Just, W.W., Rodemer, C., Thai, T.P., Zoeller, R.A., 2005. Role of dihydroxyacetonephosphate acyltransferase in the biosynthesis of plasmalogens and nonether glycerolipids. *J Lipid Res* 46, 727-735.

Liu, X., Ye, F., Xiong, H., Hu, D.N., Limb, G.A., Xie, T., Peng, L., Zhang, P., Wei, Y., Zhang, W., Wang, J., Wu, H., Lee, P., Song, E., Zhang, D.Y., 2015. IL-1beta induces IL-6 production in retinal Muller cells

predominantly through the activation of p38 MAPK/NF-kappaB signaling pathway. *Exp Cell Res* 331, 223-231.

Lofqvist, C., Andersson, E., Sigurdsson, J., Engstrom, E., Hard, A.L., Niklasson, A., Smith, L.E., Hellstrom, A., 2006. Longitudinal postnatal weight and insulin-like growth factor I measurements in the prediction of retinopathy of prematurity. *Arch Ophthalmol* 124, 1711-1718.

Lofqvist, C., Hansen-Pupp, I., Andersson, E., Holm, K., Smith, L.E., Ley, D., Hellstrom, A., 2009a. Validation of a new retinopathy of prematurity screening method monitoring longitudinal postnatal weight and insulinlike growth factor I. *Arch Ophthalmol* 127, 622-627.

Lofqvist, C., Niklasson, A., Engstrom, E., Friberg, L.E., Camacho-Hubner, C., Ley, D., Borg, J., Smith, L.E., Hellstrom, A., 2009b. A pharmacokinetic and dosing study of intravenous insulin-like growth factor-I and IGF-binding protein-3 complex to preterm infants. *Pediatr Res* 65, 574-579.

Lofqvist, C.A., Najm, S., Hellgren, G., Engstrom, E., Savman, K., Nilsson, A.K., Andersson, M.X., Hard, A.L., Smith, L.E.H., Hellstrom, A., 2018. Association of Retinopathy of Prematurity With Low Levels of Arachidonic Acid: A Secondary Analysis of a Randomized Clinical Trial. *JAMA Ophthalmol* 136, 271-277.

Lucic, I., Truebestein, L., Leonard, T.A., 2016. Novel Features of DAG-Activated PKC Isozymes Reveal a Conserved 3-D Architecture. *J Mol Biol* 428, 121-141.

Ly, A., Yee, P., Vessey, K.A., Phipps, J.A., Jobling, A.I., Fletcher, E.L., 2011. Early inner retinal astrocyte dysfunction during diabetes and development of hypoxia, retinal stress, and neuronal functional loss. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 52, 9316-9326.

Lyon, A.M., Tesmer, J.J., 2013. Structural insights into phospholipase C-beta function. *Mol Pharmacol* 84, 488-500.

Ma, W., Silverman, S.M., Zhao, L., Villasmil, R., Campos, M.M., Amaral, J., Wong, W.T., 2019. Absence of TGFbeta signaling in retinal microglia induces retinal degeneration and exacerbates choroidal neovascularization. *Elife* 8.

Makrides, M., Neumann, M.A., Byard, R.W., Simmer, K., Gibson, R.A., 1994. Fatty acid composition of brain, retina, and erythrocytes in breast- and formula-fed infants. *Am J Clin Nutr* 60, 189-194.

Malone, P., Miao, H., Parker, A., Juarez, S., Hernandez, M.R., 2007. Pressure induces loss of gap junction communication and redistribution of connexin 43 in astrocytes. *Glia* 55, 1085-1098.

Mandal, A., Wang, Y., Ernsberger, P., Kester, M., 1997. Interleukin-1-induced ether-linked diglycerides inhibit calcium-insensitive protein kinase C isotypes. Implications for growth senescence. *J Biol Chem* 272, 20306-20311.

Mandel, H., Sharf, R., Berant, M., Wanders, R.J., Vreken, P., Aviram, M., 1998. Plasmalogen phospholipids are involved in HDL-mediated cholesterol efflux: insights from investigations with plasmalogen-deficient cells. *Biochem Biophys Res Commun* 250, 369-373.

Mankidy, R., Ahiahonu, P.W., Ma, H., Jayasinghe, D., Ritchie, S.A., Khan, M.A., Su-Myat, K.K., Wood, P.L., Goodenowe, D.B., 2010. Membrane plasmalogen composition and cellular cholesterol regulation: a structure activity study. *Lipids Health Dis* 9, 62.

Mansour, H., McColm, J.R., Cole, L., Weible, M., 2nd, Korlimbinis, A., Chan-Ling, T., 2013. Connexin 30 expression and frequency of connexin heterogeneity in astrocyte gap junction plaques increase with age in the rat retina. *PLoS One* 8, e57038.

Manzoni, P., Maestri, A., Leonessa, M., Mostert, M., Farina, D., Gomirato, G., 2006. Fungal and bacterial sepsis and threshold ROP in preterm very low birth weight neonates. *J Perinatol* 26, 23-30.

Manzoni, P., Stolfi, I., Pedicino, R., Vagnarelli, F., Mosca, F., Pugni, L., Bollani, L., Pozzi, M., Gomez, K., Tzialla, C., Borghesi, A., Decembrino, L., Mostert, M., Latino, M.A., Priolo, C., Galletto, P., Gallo, E., Rizzollo, S., Tavella, E., Luparia, M., Corona, G., Barberi, I., Tridapalli, E., Faldella, G., Vetrano, G., Memo, L., Saia, O.S., Bordignon, L., Messner, H., Cattani, S., Casa, E.D., Laforgia, N., Quercia, M., Romeo, M., Betta, P.M., Rinaldi, M., Magaldi, R., Maule, M., Stronati, M., Farina, D., 2013. Human milk feeding prevents retinopathy of prematurity (ROP) in preterm VLBW neonates. *Early Human Development* 89, S64-S68.

Marin-Teva, J.L., Almendros, A., Calvente, R., Cuadros, M.A., Navascues, J., 1998. Tangential migration of ameboid microglia in the developing quail retina: mechanism of migration and migratory behavior. *Glia* 22, 31-52.

Marin-Teva, J.L., Almendros, A., Calvente, R., Cuadros, M.A., Navascues, J., 1999a. Proliferation of actively migrating ameboid microglia in the developing quail retina. *Anat Embryol (Berl)* 200, 289-300.

Marin-Teva, J.L., Calvente, R., Cuadros, M.A., Almendros, A., Navascues, J., 1999b. Circumferential migration of ameboid microglia in the margin of the developing quail retina. *Glia* 27, 226-238.

Marmor, M.F., 1999. Mechanisms of fluid accumulation in retinal edema. *Doc Ophthalmol* 97, 239-249.

Marneros, A.G., Fan, J., Yokoyama, Y., Gerber, H.P., Ferrara, N., Crouch, R.K., Olsen, B.R., 2005. Vascular endothelial growth factor expression in the retinal pigment epithelium is essential for choriocapillaris development and visual function. *Am J Pathol* 167, 1451-1459.

Marshak, D.W., 2009. Retinal Ganglion Cells: Anatomy. Academic Press.

Martin, C.R., Dasilva, D.A., Cluette-Brown, J.E., Dimonda, C., Hamill, A., Bhutta, A.Q., Coronel, E., Wilschanski, M., Stephens, A.J., Driscoll, D.F., Bistrian, B.R., Ware, J.H., Zaman, M.M., Freedman, S.D., 2011. Decreased postnatal docosahexaenoic and arachidonic acid blood levels in premature infants are associated with neonatal morbidities. *J Pediatr* 159, 743-749 e741-742.

Martinez-Delgado, G., Reyes-Haro, D., Espino-Saldana, A.E., Rosas-Arellano, A., Petriz, A., Juarez-Mercado, P., Miledi, R., Martinez-Torres, A., 2011. Dynamics of GABArho2 receptors in retinal bipolar neurons and cerebellar astrocytes. *Neuroreport* 22, 4-9.

Martini, D., Monte, M.D., Ristori, C., Cupisti, E., Mei, S., Fiorini, P., Filippi, L., Bagnoli, P., 2011. Antiangiogenic effects of beta2 -adrenergic receptor blockade in a mouse model of oxygen-induced retinopathy. *J Neurochem* 119, 1317-1329.

Masland, R.H., 2012a. The neuronal organization of the retina. *Neuron* 76, 266-280.

Masland, R.H., 2012b. The tasks of amacrine cells. *Visual Neuroscience* 29, 3-9.

Matsumoto, Y., Kashiwabara, N., Oyama, T., Murayama, K., Matsumoto, H., Sakasegawa, S.I., Sugimori, D., 2016. Molecular cloning, heterologous expression, and enzymatic characterization of lysoplasmalogen-specific phospholipase D from Thermocrispum sp. *FEBS Open Bio* 6, 1113-1130.

Matsuuchi, L., Naus, C.C., 2013. Gap junction proteins on the move: connexins, the cytoskeleton and migration. *Biochim Biophys Acta* 1828, 94-108.

Mawatari, S., Katafuchi, T., Miake, K., Fujino, T., 2012. Dietary plasmalogen increases erythrocyte membrane plasmalogen in rats. *Lipids Health Dis* 11, 161.

McHowat, J., Liu, S., Creer, M.H., 1998. Selective hydrolysis of plasmalogen phospholipids by Ca2+-independent PLA2 in hypoxic ventricular myocytes. *Am J Physiol* 274, C1727-1737.

McLeod, D.S., Hasegawa, T., Prow, T., Merges, C., Lutty, G., 2006. The initial fetal human retinal vasculature develops by vasculogenesis. *Dev Dyn* 235, 3336-3347.

McLoone, E., O'Keefe, M., McLoone, S., Lanigan, B., 2006. Long term functional and structural outcomes of laser therapy for retinopathy of prematurity. *Br J Ophthalmol* 90, 754-759.

Meraviglia, V., Azzimato, V., Colussi, C., Florio, M.C., Binda, A., Panariti, A., Qanud, K., Suffredini, S., Gennaccaro, L., Miragoli, M., Barbuti, A., Lampe, P.D., Gaetano, C., Pramstaller, P.P., Capogrossi, M.C., Recchia, F.A., Pompilio, G., Rivolta, I., Rossini, A., 2015. Acetylation mediates Cx43 reduction caused by electrical stimulation. *J Mol Cell Cardiol* 87, 54-64.

Messias, M.C.F., Mecatti, G.C., Priolli, D.G., de Oliveira Carvalho, P., 2018. Plasmalogen lipids: functional mechanism and their involvement in gastrointestinal cancer. *Lipids Health Dis* 17, 41.

Metea, M.R., Newman, E.A., 2006a. Calcium signaling in specialized glial cells. *Glia* 54, 650-655.

Metea, M.R., Newman, E.A., 2006b. Glial cells dilate and constrict blood vessels: a mechanism of neurovascular coupling. *J Neurosci* 26, 2862-2870.

Michaelson, I.C., Herz, N., Lewkowitz, E., Kertesz, D., 1954. Effect of increased oxygen on the development of the retinal vessels; an experimental study. *Br J Ophthalmol* 38, 577-587.

Mikoshiba, K., 2007. The IP3 receptor/Ca2+ channel and its cellular function. *Biochem Soc Symp*, 9-22.

Miller, R.H., David, S., Patel, R., Abney, E.R., Raff, M.C., 1985. A quantitative immunohistochemical study of macroglial cell development in the rat optic nerve: in vivo evidence for two distinct astrocyte lineages. *Dev Biol* 111, 35-41.

Miller, R.H., Ffrench-Constant, C., Raff, M.C., 1989. The macroglial cells of the rat optic nerve. *Annu Rev Neurosci* 12, 517-534.

Mintz-Hittner, H.A., Geloneck, M.M., Chuang, A.Z., 2016. Clinical Management of Recurrent Retinopathy of Prematurity after Intravitreal Bevacizumab Monotherapy. *Ophthalmology* 123, 1845-1855.

Mintz-Hittner, H.A., Kennedy, K.A., Chuang, A.Z., 2011. Efficacy of intravitreal bevacizumab for stage 3+ retinopathy of prematurity. *N Engl J Med* 364, 603-615.

Mittal, M., Dhanireddy, R., Higgins, R.D., 1998. Candida sepsis and association with retinopathy of prematurity. *Pediatrics* 101, 654-657.

Miyazaki, I., Asanuma, M., 2016. Serotonin 1A Receptors on Astrocytes as a Potential Target for the Treatment of Parkinson's Disease. *Curr Med Chem* 23, 686-700.

Mohamed, S., Murray, J.C., Dagle, J.M., Colaizy, T., 2013. Hyperglycemia as a risk factor for the development of retinopathy of prematurity. *BMC Pediatr* 13, 78.

Mohsen, L., Abou-Alam, M., El-Dib, M., Labib, M., Elsada, M., Aly, H., 2014. A prospective study on hyperglycemia and retinopathy of prematurity. *J Perinatol* 34, 453-457.

Moll, V., Weick, M., Milenkovic, I., Kodal, H., Reichenbach, A., Bringmann, A., 2002. P2Y receptor-mediated stimulation of Muller glial DNA synthesis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43, 766-773.

Moran, S., O'Keefe, M., Hartnett, C., Lanigan, B., Murphy, J., Donoghue, V., 2014. Bevacizumab versus diode laser in stage 3 posterior retinopathy of prematurity. *Acta Ophthalmol* 92, e496-497.

Morand, O.H., Zoeller, R.A., Raetz, C.R., 1988. Disappearance of plasmalogens from membranes of animal cells subjected to photosensitized oxidation. *J Biol Chem* 263, 11597-11606.

Moschos, M.M., Markopoulos, I., Chatziralli, I., Rouvas, A., Papageorgiou, S.G., Ladas, I., Vassilopoulos, D., 2012. Structural and functional impairment of the retina and optic nerve in Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res* 9, 782-788.

Mowat, F.M., Luhmann, U.F., Smith, A.J., Lange, C., Duran, Y., Harten, S., Shukla, D., Maxwell, P.H., Ali, R.R., Bainbridge, J.W., 2010. HIF-1alpha and HIF-2alpha are differentially activated in distinct cell populations in retinal ischaemia. *PLoS One* 5, e11103.

Mudhar, H.S., Pollock, R.A., Wang, C., Stiles, C.D., Richardson, W.D., 1993. PDGF and its receptors in the developing rodent retina and optic nerve. *Development* 118, 539-552.

Musial, A., Mandal, A., Coroneos, E., Kester, M., 1995. Interleukin-1 and endothelin stimulate distinct species of diglycerides that differentially regulate protein kinase C in mesangial cells. *J Biol Chem* 270, 21632-21638.

Musil, L.S., Goodenough, D.A., 1991. Biochemical analysis of connexin43 intracellular transport, phosphorylation, and assembly into gap junctional plaques. *J Cell Biol* 115, 1357-1374.

Muto, T., Tien, T., Kim, D., Sarthy, V.P., Roy, S., 2014. High glucose alters Cx43 expression and gap junction intercellular communication in retinal Muller cells: promotes Muller cell and pericyte apoptosis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 55, 4327-4337.

Nagan, N., Hajra, A.K., Larkins, L.K., Lazarow, P., Purdue, P.E., Rizzo, W.B., Zoeller, R.A., 1998. Isolation of a Chinese hamster fibroblast variant defective in dihydroxyacetonephosphate acyltransferase activity and plasmalogen biosynthesis: use of a novel two-step selection protocol. *Biochem J* 332 (Pt 1), 273-279.

Nagan, N., Zoeller, R.A., 2001. Plasmalogens: biosynthesis and functions. *Prog Lipid Res* 40, 199-229.

Nagelhus, E.A., Horio, Y., Inanobe, A., Fujita, A., Haug, F.M., Nielsen, S., Kurachi, Y., Ottersen, O.P., 1999. Immunogold evidence suggests that coupling of K+ siphoning and water transport in rat retinal Muller cells is mediated by a coenrichment of Kir4.1 and AQP4 in specific membrane domains. *Glia* 26, 47-54.

Nagelhus, E.A., Ottersen, O.P., 2013. Physiological roles of aquaporin-4 in brain. *Physiol Rev* 93, 1543-1562.

Nagelhus, E.A., Veruki, M.L., Torp, R., Haug, F.M., Laake, J.H., Nielsen, S., Agre, P., Ottersen, O.P., 1998. Aquaporin-4 water channel protein in the rat retina and optic nerve: polarized expression in Muller cells and fibrous astrocytes. *J Neurosci* 18, 2506-2519.

Nagy, K., Brahmbhatt, V.V., Berdeaux, O., Bretillon, L., Destaillats, F., Acar, N., 2012. Comparative study of serine-plasmalogens in human retina and optic nerve: identification of atypical species with odd carbon chains. *J Lipid Res* 53, 776-783.

Najm, S., Lofqvist, C., Hellgren, G., Engstrom, E., Lundgren, P., Hard, A.L., Lapillonne, A., Savman, K., Nilsson, A.K., Andersson, M.X., Smith, L.E.H., Hellstrom, A., 2017. Effects of a lipid emulsion

containing fish oil on polyunsaturated fatty acid profiles, growth and morbidities in extremely premature infants: A randomized controlled trial. *Clin Nutr ESPEN* 20, 17-23.

Nawrocki, L., BreMiller, R., Streisinger, G., Kaplan, M., 1985. Larval and adult visual pigments of the zebrafish, Brachydanio rerio. *Vision Res* 25, 1569-1576.

Nelson, B.R., Ueki, Y., Reardon, S., Karl, M.O., Georgi, S., Hartman, B.H., Lamba, D.A., Reh, T.A., 2011. Genome-wide analysis of Muller glial differentiation reveals a requirement for Notch signaling in postmitotic cells to maintain the glial fate. *PLoS One* 6, e22817.

Nett, W.J., Oloff, S.H., McCarthy, K.D., 2002. Hippocampal astrocytes in situ exhibit calcium oscillations that occur independent of neuronal activity. *J Neurophysiol* 87, 528-537.

Newman, E.A., 2001. Propagation of intercellular calcium waves in retinal astrocytes and Muller cells. *J Neurosci* 21, 2215-2223.

Newman, E.A., 2003. Glial cell inhibition of neurons by release of ATP. *J Neurosci* 23, 1659-1666.

Newman, E.A., 2005. Calcium increases in retinal glial cells evoked by light-induced neuronal activity. *J Neurosci* 25, 5502-5510.

Newman, E.A., 2015. Glial cell regulation of neuronal activity and blood flow in the retina by release of gliotransmitters. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 370.

Newman, E.A., Zahs, K.R., 1997. Calcium waves in retinal glial cells. *Science* 275, 844-847.

Newton, A.C., 2009. Lipid activation of protein kinases. *J Lipid Res* 50 Suppl, S266-271.

Nilsson, D.E., 2013. Eye evolution and its functional basis. *Vis Neurosci* 30, 5-20.

Nishimukai, M., Wakisaka, T., Hara, H., 2003. Ingestion of plasmalogen markedly increased plasmalogen levels of blood plasma in rats. *Lipids* 38, 1227-1235.

Nishimukai, M., Yamashita, M., Watanabe, Y., Yamazaki, Y., Nezu, T., Maeba, R., Hara, H., 2011. Lymphatic absorption of choline plasmalogen is much higher than that of ethanolamine plasmalogen in rats. *Eur J Nutr* 50, 427-436.

Noda, K., Ishida, S., Shinoda, H., Koto, T., Aoki, T., Tsubota, K., Oguchi, Y., Okada, Y., Ikeda, E., 2005. Hypoxia induces the expression of membrane-type 1 matrix metalloproteinase in retinal glial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46, 3817-3824.

Nusshold, C., Ullen, A., Kogelnik, N., Bernhart, E., Reicher, H., Plastira, I., Glasnov, T., Zangger, K., Rechberger, G., Kollroser, M., Fauler, G., Wolinski, H., Weksler, B.B., Romero, I.A., Kohlwein, S.D., Couraud, P.O., Malle, E., Sattler, W., 2016. Assessment of electrophile damage in a human brain endothelial cell line utilizing a clickable alkyne analog of 2-chlorohexadecanal. *Free Radic Biol Med* 90, 59-74.

O'Sullivan, M.L., Punal, V.M., Kerstein, P.C., Brzezinski, J.A.t., Glaser, T., Wright, K.M., Kay, J.N., 2017. Astrocytes follow ganglion cell axons to establish an angiogenic template during retinal development. *Glia* 65, 1697-1716.

Oberheim, N.A., Takano, T., Han, X., He, W., Lin, J.H., Wang, F., Xu, Q., Wyatt, J.D., Pilcher, W., Ojemann, J.G., Ransom, B.R., Goldman, S.A., Nedergaard, M., 2009. Uniquely hominid features of adult human astrocytes. *J Neurosci* 29, 3276-3287.

Okamoto, T., Shirai, M., Kokubo, M., Takahashi, S., Kajino, M., Takase, M., Sakata, H., Oki, J., 2007. Human milk reduces the risk of retinal detachment in extremely low-birthweight infants. *Pediatr Int* 49, 894-897.

Olk, S., Zoidl, G., Dermietzel, R., 2009. Connexins, cell motility, and the cytoskeleton. *Cell Motil Cytoskeleton* 66, 1000-1016.

Orentas, D.M., Miller, R.H., 1996. A novel form of migration of glial precursors. *Glia* 16, 27-39.

Otsu, Y., Couchman, K., Lyons, D.G., Collot, M., Agarwal, A., Mallet, J.M., Pfrieger, F.W., Bergles, D.E., Charpak, S., 2015. Calcium dynamics in astrocyte processes during neurovascular coupling. *Nat Neurosci* 18, 210-218.

Ozaki, H., Seo, M.S., Ozaki, K., Yamada, H., Yamada, E., Okamoto, N., Hofmann, F., Wood, J.M., Campochiaro, P.A., 2000. Blockade of vascular endothelial cell growth factor receptor signaling is sufficient to completely prevent retinal neovascularization. *Am J Pathol* 156, 697-707.

Painter, S.L., Wilkinson, A.R., Desai, P., Goldacre, M.J., Patel, C.K., 2015. Incidence and treatment of retinopathy of prematurity in England between 1990 and 2011: database study. *Br J Ophthalmol* 99, 807-811.

Pallot, C., Mazzocco, J., Meillon, C., Semama, D.S., Chantegret, C., Ternoy, N., Martin, D., Donier, A., Gregoire, S., Creuzot-Garcher, C.P., Bron, A.M., Bretillon, L., Acar, N., 2019. Alteration of erythrocyte membrane polyunsaturated fatty acids in preterm newborns with retinopathy of prematurity. *Sci Rep* 9, 7930.

Palmer, E.A., Hardy, R.J., Dobson, V., Phelps, D.L., Quinn, G.E., Summers, C.G., Krom, C.P., Tung, B., 2005. 15-year outcomes following threshold retinopathy of prematurity: final results from the multicenter trial of cryotherapy for retinopathy of prematurity. *Arch Ophthalmol* 123, 311-318.

Paltauf, F., 1994. Ether lipids in biomembranes. *Chem Phys Lipids* 74, 101-139.

Pan, H.C., Kao, T.K., Ou, Y.C., Yang, D.Y., Yen, Y.J., Wang, C.C., Chuang, Y.H., Liao, S.L., Raung, S.L., Wu, C.W., Chiang, A.N., Chen, C.J., 2009. Protective effect of docosahexaenoic acid against brain injury in ischemic rats. *J Nutr Biochem* 20, 715-725.

Pannicke, T., Weick, M., Uckermann, O., Wheeler-Schilling, T., Fries, J.E., Reichel, M.B., Mohr, C., Stahl, T., Fluess, M., Kacza, J., Seeger, J., Richt, J.A., Reichenbach, A., 2001. Electrophysiological alterations and upregulation of ATP receptors in retinal glial Muller cells from rats infected with the Borna disease virus. *Glia* 35, 213-223.

Papouin, T., Ladepeche, L., Ruel, J., Sacchi, S., Labasque, M., Hanini, M., Groc, L., Pollegioni, L., Mothet, J.P., Oliet, S.H., 2012. Synaptic and extrasynaptic NMDA receptors are gated by different endogenous coagonists. *Cell* 150, 633-646.

Park, J.E., Keller, G.A., Ferrara, N., 1993. The vascular endothelial growth factor (VEGF) isoforms: differential deposition into the subepithelial extracellular matrix and bioactivity of extracellular matrix-bound VEGF. *Mol Biol Cell* 4, 1317-1326.

Park, S.W., Kim, J.H., Kim, K.E., Jeong, M.H., Park, H., Park, B., Suh, Y.G., Park, W.J., 2014. Beta-lapachone inhibits pathological retinal neovascularization in oxygen-induced retinopathy via regulation of HIF-1alpha. *J Cell Mol Med* 18, 875-884.

Parker, A., 2003. In the blink of an eye. Perseus Pub., Cambridge, MA.

Parri, H.R., Gould, T.M., Crunelli, V., 2001. Spontaneous astrocytic Ca2+ oscillations in situ drive NMDAR-mediated neuronal excitation. *Nat Neurosci* 4, 803-812.

Pathmaperuma, A.N., Tennekoon, K.H., Senanayake, L., Karunanayake, E.H., 2007. Maternal and cord blood levels of insulin-like growth factors--I and--II and insulin-like growth factor binding protein-1: correlation with birth weight and maternal anthropometric indices. *Ceylon Med J* 52, 48-52.

Patz, A., Eastham, A.B., 1957. Oxygen studies in retrolental fibroplasia. VI. The effect of concentration and duration of exposure to oxygen on the immature mouse eye. *Am J Ophthalmol* 44, 110-115; discussion 115-118.

Patz, A., Hoeck, L.E., De La Cruz, E., 1952. Studies on the effect of high oxygen administration in retrolental fibroplasia. I. Nursery observations. *Am J Ophthalmol* 35, 1248-1253.

Pawlik, D., Lauterbach, R., Walczak, M., Hurkala, J., Sherman, M.P., 2014. Fish-oil fat emulsion supplementation reduces the risk of retinopathy in very low birth weight infants: a prospective, randomized study. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 38, 711-716.

Pearson, R.A., Dale, N., Llaudet, E., Mobbs, P., 2005. ATP released via gap junction hemichannels from the pigment epithelium regulates neural retinal progenitor proliferation. *Neuron* 46, 731-744.

Pederson, J.E., 2006. Retina.

Perea, G., Navarrete, M., Araque, A., 2009. Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information. *Trends Neurosci* 32, 421-431.

Perez-Munuzuri, A., Couce-Pico, M.L., Bana-Souto, A., Lopez-Suarez, O., Iglesias-Deus, A., Blanco-Teijeiro, J., Fernandez-Lorenzo, J.R., Fraga-Bermudez, J.M., 2014. Preclinical screening for retinopathy of prematurity risk using IGF1 levels at 3 weeks post-partum. *PLoS One* 9, e88781.

Perez de Lara, M.J., Guzman-Aranguez, A., de la Villa, P., Diaz-Hernandez, J.I., Miras-Portugal, M.T., Pintor, J., 2015. Increased levels of extracellular ATP in glaucomatous retinas: Possible role of the vesicular nucleotide transporter during the development of the pathology. *Mol Vis* 21, 1060-1070.

Phelps, D.L., 1990. Oxygen and developmental retinal capillary remodeling in the kitten. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 31, 2194-2200.

Phillips, G.D., Stone, A.M., Jones, B.D., Schultz, J.C., Whitehead, R.A., Knighton, D.R., 1994. Vascular endothelial growth factor (rhVEGF165) stimulates direct angiogenesis in the rabbit cornea. *In Vivo* 8, 961-965.

Piatigorsky, J., 2008. A Genetic Perspective on Eye Evolution: Gene Sharing, Convergence and Parallelism. *Evolution: Education and Outreach* 403-414.

Piehl, M., Lehmann, C., Gumpert, A., Denizot, J.P., Segretain, D., Falk, M.M., 2007. Internalization of large double-membrane intercellular vesicles by a clathrin-dependent endocytic process. *Mol Biol Cell* 18, 337-347.

Piermarocchi, S., Bini, S., Martini, F., Berton, M., Lavini, A., Gusson, E., Marchini, G., Padovani, E.M., Macor, S., Pignatto, S., Lanzetta, P., Cattarossi, L., Baraldi, E., Lago, P., 2017. Predictive algorithms for early detection of retinopathy of prematurity. *Acta Ophthalmol* 95, 158-164.

Pike, L.J., Han, X., Chung, K.N., Gross, R.W., 2002. Lipid rafts are enriched in arachidonic acid and plasmenylethanolamine and their composition is independent of caveolin-1 expression: a quantitative electrospray ionization/mass spectrometric analysis. *Biochemistry* 41, 2075-2088.

Pisanti, S., Picardi, P., Prota, L., Proto, M.C., Laezza, C., McGuire, P.G., Morbidelli, L., Gazzerro, P., Ziche, M., Das, A., Bifulco, M., 2011. Genetic and pharmacologic inactivation of cannabinoid CB1 receptor inhibits angiogenesis. *Blood* 117, 5541-5550.

Placone, A.L., McGuiggan, P.M., Bergles, D.E., Guerrero-Cazares, H., Quinones-Hinojosa, A., Searson, P.C., 2015. Human astrocytes develop physiological morphology and remain quiescent in a novel 3D matrix. *Biomaterials* 42, 134-143.

Poitry-Yamate, C., Tsacopoulos, M., 1991. Glial (Muller) cells take up and phosphorylate [3H]2-deoxy-D-glucose in mammalian retina. *Neurosci Lett* 122, 241-244.

Poitry-Yamate, C.L., Poitry, S., Tsacopoulos, M., 1995. Lactate released by Muller glial cells is metabolized by photoreceptors from mammalian retina. *J Neurosci* 15, 5179-5191.

Pompeia, C., Lima, T., Curi, R., 2003. Arachidonic acid cytotoxicity: can arachidonic acid be a physiological mediator of cell death? *Cell Biochem Funct* 21, 97-104.

Portavella, M., Rodriguez-Espinosa, N., Galeano, P., Blanco, E., Romero, J.I., Holubiec, M.I., Rodriguez de Fonseca, F., Fernandez-Espejo, E., 2018. Oleoylethanolamide and Palmitoylethanolamide Protect Cultured Cortical Neurons Against Hypoxia. *Cannabis Cannabinoid Res* 3, 171-178.

Porter, J.T., McCarthy, K.D., 1997. Astrocytic neurotransmitter receptors in situ and in vivo. *Prog Neurobiol* 51, 439-455.

Portilla, D., Crew, M.D., Grant, D., Serrero, G., Bates, L.M., Dai, G., Sasner, M., Cheng, J., Buonanno, A., 1998. cDNA cloning and expression of a novel family of enzymes with calcium-independent phospholipase A2 and lysophospholipase activities. *J Am Soc Nephrol* 9, 1178-1186.

Portilla, D., Dai, G., 1996. Purification of a novel calcium-independent phospholipase A2 from rabbit kidney. *J Biol Chem* 271, 15451-15457.

Poulin, B., Sekiya, F., Rhee, S.G., 2005. Intramolecular interaction between phosphorylated tyrosine-783 and the C-terminal Src homology 2 domain activates phospholipase C-gamma1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 4276-4281.

Praveen, V., Vidavalur, R., Rosenkrantz, T.S., Hussain, N., 2009. Infantile hemangiomas and retinopathy of prematurity: possible association. *Pediatrics* 123, e484-489.

Pravia, C.I., Benny, M., 2020. Long-term consequences of prematurity. *Cleve Clin J Med* 87, 759-767.

Provis, J.M., 2001. Development of the primate retinal vasculature. *Prog Retin Eye Res* 20, 799-821.

Provis, J.M., Leech, J., Diaz, C.M., Penfold, P.L., Stone, J., Keshet, E., 1997. Development of the human retinal vasculature: cellular relations and VEGF expression. *Exp Eye Res* 65, 555-568.

Purdue, P.E., Zhang, J.W., Skoneczny, M., Lazarow, P.B., 1997. Rhizomelic chondrodysplasia punctata is caused by deficiency of human PEX7, a homologue of the yeast PTS2 receptor. *Nat Genet* 15, 381-384.

Puro, D.G., Stuenkel, E.L., 1995. Thrombin-induced inhibition of potassium currents in human retinal glial (Muller) cells. *J Physiol* 485 (Pt 2), 337-348.

Quinn, G.E., 2016. Retinopathy of prematurity blindness worldwide: phenotypes in the third epidemic. *Eye Brain* 8, 31-36.

Quinn, G.E., Barr, C., Bremer, D., Fellows, R., Gong, A., Hoffman, R., Repka, M.X., Shepard, J., Siatkowski, R.M., Wade, K., Ying, G.S., 2016. Changes in Course of Retinopathy of Prematurity

from 1986 to 2013: Comparison of Three Studies in the United States. *Ophthalmology* 123, 1595-1600.

Raff, M.C., Abney, E.R., Miller, R.H., 1984. Two glial cell lineages diverge prenatally in rat optic nerve. *Dev Biol* 106, 53-60.

Raff, M.C., Miller, R.H., Noble, M., 1983. Glial cell lineages in the rat optic nerve. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 48 Pt 2, 569-572.

Ramón y Cajal, S., 1893. La rétine des vertébrés.

Rapaport, D.H., Wong, L.L., Wood, E.D., Yasumura, D., LaVail, M.M., 2004. Timing and topography of cell genesis in the rat retina. *J Comp Neurol* 474, 304-324.

Rauen, T., Rothstein, J.D., Wassle, H., 1996. Differential expression of three glutamate transporter subtypes in the rat retina. *Cell Tissue Res* 286, 325-336.

Rauen, T., Taylor, W.R., Kuhlbrodt, K., Wiessner, M., 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, 19-31.

Reece, E.A., Wiznitzer, A., Le, E., Homko, C.J., Behrman, H., Spencer, E.M., 1994. The relation between human fetal growth and fetal blood levels of insulin-like growth factors I and II, their binding proteins, and receptors. *Obstet Gynecol* 84, 88-95.

Reese, B.E., 2012. Retinal Mosaics: Pattern Formation Driven by Local Interactions between Homotypic Neighbors. *Front Neural Circuits* 6, 24.

Regev, R.H., Lusky, A., Dolfin, T., Litmanovitz, I., Arnon, S., Reichman, B., 2003. Excess mortality and morbidity among small-for-gestational-age premature infants: a population-based study. *J Pediatr* 143, 186-191.

Reichenbach, A., Bringmann, A., 2016. Role of Purines in Muller Glia. *J Ocul Pharmacol Ther* 32, 518-533.

Reichenbach, A., Schneider, H., Leibnitz, L., Reichelt, W., Schaaf, P., Schumann, R., 1989. The structure of rabbit retinal Muller (glial) cells is adapted to the surrounding retinal layers. *Anat Embryol (Berl)* 180, 71-79.

Reichenbach, A., Stolzenburg, J.U., Eberhardt, W., Chao, T.I., Dettmer, D., Hertz, L., 1993. What do retinal muller (glial) cells do for their neuronal 'small siblings'? *J Chem Neuroanat* 6, 201-213.

Reichenbach, A., Wohlrab, F., 1986. Morphometric parameters of Muller (glial) cells dependent on their topographic localization in the nonmyelinated part of the rabbit retina. A consideration of functional aspects of radial glia. *J Neurocytol* 15, 451-459.

Reichenbach, A., Wurm, A., Pannicke, T., Iandiev, I., Wiedemann, P., Bringmann, A., 2007. Muller cells as players in retinal degeneration and edema. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 245, 627-636.

Reifel Saltzberg, J.M., Garvey, K.A., Keirstead, S.A., 2003. Pharmacological characterization of P2Y receptor subtypes on isolated tiger salamander Muller cells. *Glia* 42, 149-159.

Reigada, D., Lu, W., Zhang, M., Mitchell, C.H., 2008. Elevated pressure triggers a physiological release of ATP from the retina: Possible role for pannexin hemichannels. *Neuroscience* 157, 396-404.

Retamal, M.A., Cortes, C.J., Reuss, L., Bennett, M.V., Saez, J.C., 2006. S-nitrosylation and permeation through connexin 43 hemichannels in astrocytes: induction by oxidant stress and reversal by reducing agents. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 4475-4480.

Reu, P., Khosravi, A., Bernard, S., Mold, J.E., Salehpour, M., Alkass, K., Perl, S., Tisdale, J., Possnert, G., Druid, H., Frisen, J., 2017. The Lifespan and Turnover of Microglia in the Human Brain. *Cell Rep* 20, 779-784.

Rhee, D.Y., Zhao, X.Q., Francis, R.J., Huang, G.Y., Mably, J.D., Lo, C.W., 2009. Connexin 43 regulates epicardial cell polarity and migration in coronary vascular development. *Development* 136, 3185-3193.

Rider, L.G., Dougherty, R.W., Niedel, J.E., 1988. Phorbol diesters and dioctanoylglycerol stimulate accumulation of both diacylglycerols and alkylacylglycerols in human neutrophils. *J Immunol* 140, 200-207.

Riepe, R.E., Norenburg, M.D., 1977. Muller cell localisation of glutamine synthetase in rat retina. *Nature* 268, 654-655.

Ristori, C., Filippi, L., Dal Monte, M., Martini, D., Cammalleri, M., Fortunato, P., la Marca, G., Fiorini, P., Bagnoli, P., 2011. Role of the adrenergic system in a mouse model of oxygen-induced retinopathy: antiangiogenic effects of beta-adrenoreceptor blockade. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 52, 155-170.

Rizzo, W.B., 2014. Fatty aldehyde and fatty alcohol metabolism: review and importance for epidermal structure and function. *Biochim Biophys Acta* 1841, 377-389.

Rizzo, W.B., Craft, D.A., Judd, L.L., Moser, H.W., Moser, A.B., 1993. Fatty alcohol accumulation in the autosomal recessive form of rhizomelic chondrodysplasia punctata. *Biochem Med Metab Biol* 50, 93-102.

Rizzo, W.B., Heinz, E., Simon, M., Craft, D.A., 2000. Microsomal fatty aldehyde dehydrogenase catalyzes the oxidation of aliphatic aldehyde derived from ether glycerolipid catabolism: implications for Sjogren-Larsson syndrome. *Biochim Biophys Acta* 1535, 1-9.

Rockhill, R.L., Daly, F.J., MacNeil, M.A., Brown, S.P., Masland, R.H., 2002. The diversity of ganglion cells in a mammalian retina. *J Neurosci* 22, 3831-3843.

Rockhill, R.L., Euler, T., Masland, R.H., 2000. Spatial order within but not between types of retinal neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 2303-2307.

Rodemer, C., Thai, T.P., Brugger, B., Kaercher, T., Werner, H., Nave, K.A., Wieland, F., Gorgas, K., Just, W.W., 2003. Inactivation of ether lipid biosynthesis causes male infertility, defects in eye development and optic nerve hypoplasia in mice. *Hum Mol Genet* 12, 1881-1895.

Rodieck, R.W., Binmoeller, K.F., Dineen, J., 1985. Parasol and midget ganglion cells of the human retina. *J Comp Neurol* 233, 115-132.

Rodnight, R., Goncalves, C.A., Wofchuk, S.T., Leal, R., 1997. Control of the phosphorylation of the astrocyte marker glial fibrillary acidic protein (GFAP) in the immature rat hippocampus by glutamate and calcium ions: possible key factor in astrocytic plasticity. *Braz J Med Biol Res* 30, 325-338.

Rodrigues, M., Xin, X., Jee, K., Babapoor-Farrokhran, S., Kashiwabuchi, F., Ma, T., Bhutto, I., Hassan, S.J., Daoud, Y., Baranano, D., Solomon, S., Lutty, G., Semenza, G.L., Montaner, S., Sodhi, A., 2013. VEGF secreted by hypoxic Muller cells induces MMP-2 expression and activity in endothelial cells to promote retinal neovascularization in proliferative diabetic retinopathy. *Diabetes* 62, 3863-3873.

Rog, T., Koivuniemi, A., 2016. The biophysical properties of ethanolamine plasmalogens revealed by atomistic molecular dynamics simulations. *Biochim Biophys Acta* 1858, 97-103.

Rogove, A.D., Lu, W., Tsirka, S.E., 2002. Microglial activation and recruitment, but not proliferation, suffice to mediate neurodegeneration. *Cell Death Differ* 9, 801-806.

Rohowetz, L.J., Kraus, J.G., Koulen, P., 2018. Reactive Oxygen Species-Mediated Damage of Retinal Neurons: Drug Development Targets for Therapies of Chronic Neurodegeneration of the Retina. *Int J Mol Sci* 19.

Rojas, M., Zhang, W., Lee, D.L., Romero, M.J., Nguyen, D.T., Al-Shabrawey, M., Tsai, N.T., Liou, G.I., Brands, M.W., Caldwell, R.W., Caldwell, R.B., 2010. Role of IL-6 in angiotensin II-induced retinal vascular inflammation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 51, 1709-1718.

Rosen, D., Mahabadi, N., 2021. Embryology, Optic Cup, StatPearls. Treasure Island (FL).

Ruiz, M., Cuillerier, A., Daneault, C., Deschenes, S., Frayne, I.R., Bouchard, B., Forest, A., Legault, J.T., Vaz, F.M., Rioux, J.D., Burelle, Y., Des Rosiers, C., 2019. Lipidomics unveils lipid dyshomeostasis and low circulating plasmalogens as biomarkers in a monogenic mitochondrial disorder. *JCI Insight* 4.

Rungger-Brandle, E., Messerli, J.M., Niemeyer, G., Eppenberger, H.M., 1993. Confocal microscopy and computer-assisted image reconstruction of astrocytes in the mammalian retina. *Eur J Neurosci* 5, 1093-1106.

Ryskamp, D.A., Jo, A.O., Frye, A.M., Vazquez-Chona, F., MacAulay, N., Thoreson, W.B., Krizaj, D., 2014. Swelling and eicosanoid metabolites differentially gate TRPV4 channels in retinal neurons and glia. *J Neurosci* 34, 15689-15700.

Saab-Aoude, S., Bron, A.M., Creuzot-Garcher, C.P., Bretillon, L., Acar, N., 2013. A mouse model of in vivo chemical inhibition of retinal calcium-independent phospholipase A2 (iPLA2). *Biochimie* 95, 903-911.

Saab, S., Buteau, B., Leclere, L., Bron, A.M., Creuzot-Garcher, C.P., Bretillon, L., Acar, N., 2014. Involvement of plasmalogens in post-natal retinal vascular development. *PLoS One* 9, e101076.

Saari, J.C., Huang, J., Possin, D.E., Fariss, R.N., Leonard, J., Garwin, G.G., Crabb, J.W., Milam, A.H., 1997. Cellular retinaldehyde-binding protein is expressed by oligodendrocytes in optic nerve and brain. *Glia* 21, 259-268.

Sahni, J., Subhedar, N.V., Clark, D., 2005. Treated threshold stage 3 versus spontaneously regressed subthreshold stage 3 retinopathy of prematurity: a study of motility, refractive, and anatomical outcomes at 6 months and 36 months. *Br J Ophthalmol* 89, 154-159.

Saidi Brikci-Nigassa, A., Clement, M.J., Ha-Duong, T., Adjadj, E., Ziani, L., Pastre, D., Curmi, P.A., Savarin, P., 2012. Phosphorylation controls the interaction of the connexin43 C-terminal domain with tubulin and microtubules. *Biochemistry* 51, 4331-4342.

Saint-Geniez, M., D'Amore, P.A., 2004. Development and pathology of the hyaloid, choroidal and retinal vasculature. *Int J Dev Biol* 48, 1045-1058.

Sakasegawa, S.I., Taira, S., Yamamoto, K., Sugimori, D., 2020. Enzymatic Synthesis of 1-Alkyl-2-hydroxy-sn-glycero-2,3-cyclic-phosphate Using a Novel Lysoplasmalogen-Specific Phopholipase D. *European Journal of Lipid Science and Technology* 122.

Salceda, S., Caro, J., 1997. Hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions. Its stabilization by hypoxia depends on redox-induced changes. *J Biol Chem* 272, 22642-22647.

Salesse, C., 2017. Physiology of the visual retinal signal: From phototransduction to the visual cycle. *J Fr Ophtalmol* 40, 239-250.

Samarelli, A.V., Riccitelli, E., Bizzozero, L., Silveira, T.N., Seano, G., Pergolizzi, M., Vitagliano, G., Cascone, I., Carpentier, G., Bottos, A., Primo, L., Bussolino, F., Arese, M., 2014. Neuroligin 1 induces blood vessel maturation by cooperating with the alpha6 integrin. *J Biol Chem* 289, 19466-19476.

Sanchez-Lopez, A., Cuadros, M.A., Calvente, R., Tassi, M., Marin-Teva, J.L., Navascues, J., 2004. Radial migration of developing microglial cells in quail retina: a confocal microscopy study. *Glia* 46, 261-273.

Sanderson, J., Dartt, D.A., Trinkaus-Randall, V., Pintor, J., Civan, M.M., Delamere, N.A., Fletcher, E.L., Salt, T.E., Grosche, A., Mitchell, C.H., 2014. Purines in the eye: recent evidence for the physiological and pathological role of purines in the RPE, retinal neurons, astrocytes, Muller cells, lens, trabecular meshwork, cornea and lacrimal gland. *Exp Eye Res* 127, 270-279.

SanGiovanni, J.P., Chew, E.Y., 2005. The role of omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in health and disease of the retina. *Prog Retin Eye Res* 24, 87-138.

Santos, A.M., Calvente, R., Tassi, M., Carrasco, M.C., Martin-Oliva, D., Marin-Teva, J.L., Navascues, J., Cuadros, M.A., 2008. Embryonic and postnatal development of microglial cells in the mouse retina. *J Comp Neurol* 506, 224-239.

Sapieha, P., 2012. Eyeing central neurons in vascular growth and reparative angiogenesis. *Blood* 120, 2182-2194.

Sarkadi-Nagy, E., Wijendran, V., Diau, G.Y., Chao, A.C., Hsieh, A.T., Turpeinen, A., Lawrence, P., Nathanielsz, P.W., Brenna, J.T., 2004. Formula feeding potentiates docosahexaenoic and arachidonic acid biosynthesis in term and preterm baboon neonates. *J Lipid Res* 45, 71-80.

Sato, T., Kusaka, S., Shimojo, H., Fujikado, T., 2009a. Simultaneous analyses of vitreous levels of 27 cytokines in eyes with retinopathy of prematurity. *Ophthalmology* 116, 2165-2169.

Sato, T., Kusaka, S., Shimojo, H., Fujikado, T., 2009b. Vitreous levels of erythropoietin and vascular endothelial growth factor in eyes with retinopathy of prematurity. *Ophthalmology* 116, 1599-1603.

Sato, T., Wada, K., Arahori, H., Kuno, N., Imoto, K., Iwahashi-Shima, C., Kusaka, S., 2012. Serum concentrations of bevacizumab (avastin) and vascular endothelial growth factor in infants with retinopathy of prematurity. *Am J Ophthalmol* 153, 327-333 e321.

Scemes, E., Dermietzel, R., Spray, D.C., 1998. Calcium waves between astrocytes from Cx43 knockout mice. *Glia* 24, 65-73.

Schmidt, T.M., Do, M.T., Dacey, D., Lucas, R., Hattar, S., Matynia, A., 2011. Melanopsin-positive intrinsically photosensitive retinal ganglion cells: from form to function. *J Neurosci* 31, 16094-16101.

Schmitz, G., Ecker, J., 2008. The opposing effects of n-3 and n-6 fatty acids. *Prog Lipid Res* 47, 147-155.

Schonwasser, D.C., Marais, R.M., Marshall, C.J., Parker, P.J., 1998. Activation of the mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase pathway by conventional, novel, and atypical protein kinase C isotypes. *Mol Cell Biol* 18, 790-798.

Schrader, M., Kamoshita, M., Islinger, M., 2020. Organelle interplay-peroxisome interactions in health and disease. *J Inherit Metab Dis* 43, 71-89.

Schrakamp, G., Schutgens, R.B., Wanders, R.J., Heymans, H.S., Tager, J.M., Van den Bosch, H., 1985. The cerebro-hepato-renal (Zellweger) syndrome. Impaired de novo biosynthesis of plasmalogens in cultured skin fibroblasts. *Biochim Biophys Acta* 833, 170-174.

Schubert, A.L., Schubert, W., Spray, D.C., Lisanti, M.P., 2002. Connexin family members target to lipid raft domains and interact with caveolin-1. *Biochemistry* 41, 5754-5764.

Schuhmacher, M., Grasskamp, A.T., Barahtjan, P., Wagner, N., Lombardot, B., Schuhmacher, J.S., Sala, P., Lohmann, A., Henry, I., Shevchenko, A., Coskun, U., Walter, A.M., Nadler, A., 2020. Live-cell lipid biochemistry reveals a role of diacylglycerol side-chain composition for cellular lipid dynamics and protein affinities. *Proc Natl Acad Sci U S A* 117, 7729-7738.

Schwitzer, T., Schwan, R., Angioi-Duprez, K., Giersch, A., Laprevote, V., 2016. The Endocannabinoid System in the Retina: From Physiology to Practical and Therapeutic Applications. *Neural Plast* 2016, 2916732.

Selvam, S., Kumar, T., Fruttiger, M., 2018. Retinal vasculature development in health and disease. *Prog Retin Eye Res* 63, 1-19.

Semenza, G.L., Wang, G.L., 1992. A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol* 12, 5447-5454.

Senanayake, V., Goodenowe, D.B., 2019. Plasmalogen deficiency and neuropathology in Alzheimer's disease: Causation or coincidence? *Alzheimers Dement (N Y)* 5, 524-532.

Senger, D.R., Galli, S.J., Dvorak, A.M., Perruzzi, C.A., Harvey, V.S., Dvorak, H.F., 1983. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* 219, 983-985.

Sennlaub, F., Valamanesh, F., Vazquez-Tello, A., El-Asrar, A.M., Checchin, D., Brault, S., Gobeil, F., Beauchamp, M.H., Mwaikambo, B., Courtois, Y., Geboes, K., Varma, D.R., Lachapelle, P., Ong, H., Behar-Cohen, F., Chemtob, S., 2003. Cyclooxygenase-2 in human and experimental ischemic proliferative retinopathy. *Circulation* 108, 198-204.

Sergeeva, M., Strokin, M., Reiser, G., 2005. Regulation of intracellular calcium levels by polyunsaturated fatty acids, arachidonic acid and docosahexaenoic acid, in astrocytes: possible involvement of phospholipase A2. *Reprod Nutr Dev* 45, 633-646.

Serhan, C.N., 2002. Lipoxins and aspirin-triggered 15-epi-lipoxin biosynthesis: an update and role in anti-inflammation and pro-resolution. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 68-69, 433-455.

Shanshan, Y., Beibei, J., Li, T., Minna, G., Shipeng, L., Li, P., Yong, Z., 2017. Phospholipase A2 of Peroxiredoxin 6 Plays a Critical Role in Cerebral Ischemia/Reperfusion Inflammatory Injury. *Front Cell Neurosci* 11, 99.

Shekhar, K., Lapan, S.W., Whitney, I.E., Tran, N.M., Macosko, E.Z., Kowalczyk, M., Adiconis, X., Levin, J.Z., Nemesh, J., Goldman, M., McCarroll, S.A., Cepko, C.L., Regev, A., Sanes, J.R., 2016.

Comprehensive Classification of Retinal Bipolar Neurons by Single-Cell Transcriptomics. *Cell* 166, 1308-1323 e1330.

Shen, W., Fruttiger, M., Zhu, L., Chung, S.H., Barnett, N.L., Kirk, J.K., Lee, S., Coorey, N.J., Killingsworth, M., Sherman, L.S., Gillies, M.C., 2012. Conditional Muller cell ablation causes independent neuronal and vascular pathologies in a novel transgenic model. *J Neurosci* 32, 15715-15727.

Shigetomi, E., Kracun, S., Khakh, B.S., 2010. Monitoring astrocyte calcium microdomains with improved membrane targeted GCaMP reporters. *Neuron Glia Biol* 6, 183-191.

Silveira, R.C., Fortes Filho, J.B., Procianoy, R.S., 2011. Assessment of the contribution of cytokine plasma levels to detect retinopathy of prematurity in very low birth weight infants. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 52, 1297-1301.

Simons, M., Gordon, E., Claesson-Welsh, L., 2016. Mechanisms and regulation of endothelial VEGF receptor signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 17, 611-625.

Simpson, J.L., Melia, M., Yang, M.B., Buffenn, A.N., Chiang, M.F., Lambert, S.R., 2012. Current role of cryotherapy in retinopathy of prematurity: a report by the American Academy of Ophthalmology. *Ophthalmology* 119, 873-877.

Smith, J.J., Aitchison, J.D., 2013. Peroxisomes take shape. *Nat Rev Mol Cell Biol* 14, 803-817.

Smith, L.E., 2004. Pathogenesis of retinopathy of prematurity. *Growth Horm IGF Res* 14 Suppl A, S140-144.

Smith, L.E., Shen, W., Perruzzi, C., Soker, S., Kinose, F., Xu, X., Robinson, G., Driver, S., Bischoff, J., Zhang, B., Schaeffer, J.M., Senger, D.R., 1999. Regulation of vascular endothelial growth factor-dependent retinal neovascularization by insulin-like growth factor-1 receptor. *Nat Med* 5, 1390-1395.

Smith, R.L., Sivaprasad, S., Chong, V., 2016. Retinal Biochemistry, Physiology and Cell Biology. *Dev Ophthalmol* 55, 18-27.

Sohl, G., Willecke, K., 2003. An update on connexin genes and their nomenclature in mouse and man. *Cell Commun Adhes* 10, 173-180.

Solan, J.L., Lampe, P.D., 2007. Key connexin 43 phosphorylation events regulate the gap junction life cycle. *J Membr Biol* 217, 35-41.

Sood, B.G., Madan, A., Saha, S., Schendel, D., Thorsen, P., Skogstrand, K., Hougaard, D., Shankaran, S., Carlo, W., 2010. Perinatal systemic inflammatory response syndrome and retinopathy of prematurity. *Pediatr Res* 67, 394-400.

Sorgen, P.L., Trease, A.J., Spagnol, G., Delmar, M., Nielsen, M.S., 2018. Protein(-)Protein Interactions with Connexin 43: Regulation and Function. *Int J Mol Sci* 19.

Sparrow, J.R., Hicks, D., Hamel, C.P., 2010. The retinal pigment epithelium in health and disease. *Curr Mol Med* 10, 802-823.

Speakman, J.S., Mortimer, C.B., Briant, T.D., Ezrin, C., Lougheed, W.M., Clarke, W.T., 1966. Pituitary ablation for diabetic retinopathy. *Can Med Assoc J* 94, 627-635.

Spiegler, J., Preuss, M., Gebauer, C., Bendiks, M., Herting, E., Gopel, W., 2016. Does Breastmilk Influence the Development of Bronchopulmonary Dysplasia? *J Pediatr* 169, 76-80 e74.

Stahl, A., Connor, K.M., Sapieha, P., Chen, J., Dennison, R.J., Krah, N.M., Seaward, M.R., Willett, K.L., Aderman, C.M., Guerin, K.I., Hua, J., Lofqvist, C., Hellstrom, A., Smith, L.E., 2010. The mouse retina as an angiogenesis model. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 51, 2813-2826.

Stenzel, D., Lundkvist, A., Sauvaget, D., Busse, M., Graupera, M., van der Flier, A., Wijelath, E.S., Murray, J., Sobel, M., Costell, M., Takahashi, S., Fassler, R., Yamaguchi, Y., Gutmann, D.H., Hynes, R.O., Gerhardt, H., 2011. Integrin-dependent and -independent functions of astrocytic fibronectin in retinal angiogenesis. *Development* 138, 4451-4463.

Stevens, E.R., Esguerra, M., Kim, P.M., Newman, E.A., Snyder, S.H., Zahs, K.R., Miller, R.F., 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, 6789-6794.

Stier, H., Schlosshauer, B., 1998. Different cell surface areas of polarized radial glia having opposite effects on axonal outgrowth. *Eur J Neurosci* 10, 1000-1010.

Stone, J., Dreher, Z., 1987. Relationship between astrocytes, ganglion cells and vasculature of the retina. *J Comp Neurol* 255, 35-49.

Stone, J., Itin, A., Alon, T., Pe'er, J., Gnessin, H., Chan-Ling, T., Keshet, E., 1995. Development of retinal vasculature is mediated by hypoxia-induced vascular endothelial growth factor (VEGF) expression by neuroglia. *J Neurosci* 15, 4738-4747.

Stone, J., Maslim, J., 1997. Mechanisms of retinal angiogenesis. *Progress in Retinal and Eye Research* 16, 157-181.

Straub, A.C., Billaud, M., Johnstone, S.R., Best, A.K., Yemen, S., Dwyer, S.T., Looft-Wilson, R., Lysiak, J.J., Gaston, B., Palmer, L., Isakson, B.E., 2011. Compartmentalized connexin 43 s-nitrosylation/denitrosylation regulates heterocellular communication in the vessel wall. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 31, 399-407.

Straub, S.V., Bonev, A.D., Wilkerson, M.K., Nelson, M.T., 2006. Dynamic inositol trisphosphate-mediated calcium signals within astrocytic endfeet underlie vasodilation of cerebral arterioles. *J Gen Physiol* 128, 659-669.

Strauss, O., 2005. The retinal pigment epithelium in visual function. *Physiol Rev* 85, 845-881.

Sugiura, T., Masuzawa, Y., Waku, K., 1985. Transacylation of 1-O-alkyl-SN-glycero-3-phosphocholine (lyso platelet-activating factor) and 1-O-alkenyl-SN-glycero-3-phosphoethanolamine with docosahexaenoic acid (22:6 omega 3). *Biochem Biophys Res Commun* 133, 574-580.

Sugiura, T., Soga, N., Nitta, H., Waku, K., 1983. Occurrence of alkyl ether phospholipids in rabbit platelets: compositions and fatty chain profiles. *J Biochem* 94, 1719-1722.

Sullivan, R., Penfold, P., Pow, D.V., 2003. Neuronal migration and glial remodeling in degenerating retinas of aged rats and in nonneovascular AMD. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44, 856-865.

Sullivan, S.M., Sullivan, R.K., Miller, S.M., Ireland, Z., Bjorkman, S.T., Pow, D.V., Colditz, P.B., 2012. Phosphorylation of GFAP is associated with injury in the neonatal pig hypoxic-ischemic brain. *Neurochem Res* 37, 2364-2378.

Sun, G.Y., Shelat, P.B., Jensen, M.B., He, Y., Sun, A.Y., Simonyi, A., 2010. Phospholipases A2 and inflammatory responses in the central nervous system. *Neuromolecular Med* 12, 133-148.

Szabo, B., Schlicker, E., 2005. Effects of cannabinoids on neurotransmission. *Handb Exp Pharmacol*, 327-365.

Sztriha, L., Al-Gazali, L.I., Wanders, R.J., Ofman, R., Nork, M., Lestringant, G.G., 2000. Abnormal myelin formation in rhizomelic chondrodysplasia punctata type 2 (DHAPAT-deficiency). *Dev Med Child Neurol* 42, 492-495.

Talahalli, R., Zarini, S., Sheibani, N., Murphy, R.C., Gubitosi-Klug, R.A., 2010. Increased synthesis of leukotrienes in the mouse model of diabetic retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 51, 1699-1708.

Tao, C., Zhang, X., 2016. Retinal Proteoglycans Act as Cellular Receptors for Basement Membrane Assembly to Control Astrocyte Migration and Angiogenesis. *Cell Rep* 17, 1832-1844.

Tawfik, H.A., Dutton, J.J., 2018. Embryologic and Fetal Development of the Human Orbit. *Ophthalmic Plast Reconstr Surg* 34, 405-421.

Tay, T.L., Savage, J.C., Hui, C.W., Bisht, K., Tremblay, M.E., 2017. Microglia across the lifespan: from origin to function in brain development, plasticity and cognition. *J Physiol* 595, 1929-1945.

Taylor, C.W., Tovey, S.C., 2010. IP(3) receptors: toward understanding their activation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2, a004010.

Terry, T.L., 1942. Fibroblastic Overgrowth of Persistent Tunica Vasculosa Lentis in Infants Born Prematurely: II. Report of Cases-Clinical Aspects. *Trans Am Ophthalmol Soc* 40, 262-284.

Thoreson, W.B., Mangel, S.C., 2012. Lateral interactions in the outer retina. *Prog Retin Eye Res* 31, 407-441.

Thurston, G., Suri, C., Smith, K., McClain, J., Sato, T.N., Yancopoulos, G.D., McDonald, D.M., 1999. Leakage-resistant blood vessels in mice transgenically overexpressing angiopoietin-1. *Science* 286, 2511-2514.

Tien, T., Muto, T., Zhang, J., Sohn, E.H., Mullins, R.F., Roy, S., 2016. Association of reduced Connexin 43 expression with retinal vascular lesions in human diabetic retinopathy. *Exp Eye Res* 146, 103-106.

Tin, W., Gupta, S., 2007. Optimum oxygen therapy in preterm babies. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 92, F143-147.

Tolentino, M., 2011. Systemic and ocular safety of intravitreal anti-VEGF therapies for ocular neovascular disease. *Surv Ophthalmol* 56, 95-113.

Tolsma, K.W., Allred, E.N., Chen, M.L., Duker, J., Leviton, A., Dammann, O., 2011. Neonatal bacteremia and retinopathy of prematurity: the ELGAN study. *Arch Ophthalmol* 129, 1555-1563.

Tout, S., Chan-Ling, T., Holländer, H., Stone, J., 1993. The role of müller cells in the formation of the blood-retinal barrier. *Neuroscience* 55, 291-301.

Tretiach, M., Madigan, M.C., Wen, L., Gillies, M.C., 2005. Effect of Muller cell co-culture on in vitro permeability of bovine retinal vascular endothelium in normoxic and hypoxic conditions. *Neurosci Lett* 378, 160-165.

Trivino, A., Ramirez, J.M., Ramirez, A.I., Salazar, J.J., Garcia-Sanchez, J., 1997. Comparative study of astrocytes in human and rabbit retinae. *Vision Res* 37, 1707-1711.

Tsacopoulos, M., Magistretti, P.J., 1996. Metabolic coupling between glia and neurons. *J Neurosci* 16, 877-885.

Tsitsis, T., Tasman, W., McNamara, J.A., Brown, G., Vander, J., 1997. Diode laser photocoagulation for retinopathy of prematurity. *Trans Am Ophthalmol Soc* 95, 231-236; discussion 237-245.

Tsukamoto, Y., Omi, N., 2017. Classification of Mouse Retinal Bipolar Cells: Type-Specific Connectivity with Special Reference to Rod-Driven AII Amacrine Pathways. *Front Neuroanat* 11, 92.

Tuchin, V., 2015. Tissue Optics - Light Scattering Methods and Instruments for Medical Diagnosis. 257-281.

Turner, D.L., Cepko, C.L., 1987. A common progenitor for neurons and glia persists in rat retina late in development. *Nature* 328, 131-136.

Turner, D.L., Snyder, E.Y., Cepko, C.L., 1990. Lineage-independent determination of cell type in the embryonic mouse retina. *Neuron* 4, 833-845.

Uckermann, O., Grosche, J., Reichenbach, A., Bringmann, A., 2002. ATP-evoked calcium responses of radial glial (Muller) cells in the postnatal rabbit retina. *J Neurosci Res* 70, 209-218.

Uckermann, O., Uhlmann, S., Weick, M., Pannicke, T., Francke, M., Reichenbach, A., Wiedemann, P., Bringmann, A., 2003. Upregulation of purinergic P2Y receptor-mediated calcium responses in glial cells during experimental detachment of the rabbit retina. *Neurosci Lett* 338, 131-134.

Uemura, A., Kusuhara, S., Wiegand, S.J., Yu, R.T., Nishikawa, S., 2006. Tlx acts as a proangiogenic switch by regulating extracellular assembly of fibronectin matrices in retinal astrocytes. *J Clin Invest* 116, 369-377.

Uga, S., Smelser, 1973a. Comparative study of the fine structure of retinal Muller cells in various vertebrates. *Invest Ophthalmol* 12, 434-448.

Uga, S., Smelser, G.K., 1973b. Electron microscopic study of the development of retinal Mullerian cells. *Invest Ophthalmol* 12, 295-307.

Uhlmann, S., Bringmann, A., Uckermann, O., Pannicke, T., Weick, M., Ulbricht, E., Goczalik, I., Reichenbach, A., Wiedemann, P., Francke, M., 2003. Early glial cell reactivity in experimental retinal detachment: effect of suramin. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44, 4114-4122.

Ullen, A., Fauler, G., Kofeler, H., Waltl, S., Nusshold, C., Bernhart, E., Reicher, H., Leis, H.J., Wintersperger, A., Malle, E., Sattler, W., 2010. Mouse brain plasmalogens are targets for hypochlorous acid-mediated modification in vitro and in vivo. *Free Radic Biol Med* 49, 1655-1665.

Ullen, A., Singewald, E., Konya, V., Fauler, G., Reicher, H., Nusshold, C., Hammer, A., Kratky, D., Heinemann, A., Holzer, P., Malle, E., Sattler, W., 2013. Myeloperoxidase-derived oxidants induce blood-brain barrier dysfunction in vitro and in vivo. *PLoS One* 8, e64034.

van den Bosch, H., Schalkwijk, C.G., Schrakamp, G., Wanders, R.J., Schutgens, R.B., Schram, A.W., Tager, J.M., 1988. Aberration in de novo ether lipid biosynthesis in peroxisomal disorders. *Prog Clin Biol Res* 282, 139-150.

Vanhaesebrouck, S., Daniels, H., Moons, L., Vanhole, C., Carmeliet, P., De Zegher, F., 2009. Oxygen-induced retinopathy in mice: amplification by neonatal IGF-I deficit and attenuation by IGF-I administration. *Pediatr Res* 65, 307-310.

Vayalthrikkovil, S., Bashir, R.A., Rabi, Y., Amin, H., Spence, J.M., Robertson, H.L., Lodha, A., 2017. Parenteral Fish-Oil Lipid Emulsions in the Prevention of Severe Retinopathy of Prematurity: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Am J Perinatol* 34, 705-715.

Vecino, E., Rodriguez, F.D., Ruzafa, N., Pereiro, X., Sharma, S.C., 2016. Glia-neuron interactions in the mammalian retina. *Prog Retin Eye Res* 51, 1-40.

Veenstra, A.A., Tang, J., Kern, T.S., 2013. Antagonism of CD11b with neutrophil inhibitory factor (NIF) inhibits vascular lesions in diabetic retinopathy. *PLoS One* 8, e78405.

Vempati, P., Popel, A.S., Mac Gabhann, F., 2014. Extracellular regulation of VEGF: isoforms, proteolysis, and vascular patterning. *Cytokine Growth Factor Rev* 25, 1-19.

Waldo, G.L., Harden, T.K., 2004. Agonist binding and Gq-stimulating activities of the purified human P2Y1 receptor. *Mol Pharmacol* 65, 426-436.

Wanders, R.J., 2014. Metabolic functions of peroxisomes in health and disease. *Biochimie* 98, 36-44.

Wanders, R.J., Waterham, H.R., 2006. Peroxisomal disorders: the single peroxisomal enzyme deficiencies. *Biochim Biophys Acta* 1763, 1707-1720.

Wang, G.L., Semenza, G.L., 1995. Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem* 270, 1230-1237.

Wang, H., Han, X., Wittchen, E.S., Hartnett, M.E., 2016. TNF-alpha mediates choroidal neovascularization by upregulating VEGF expression in RPE through ROS-dependent beta-catenin activation. *Mol Vis* 22, 116-128.

Wang, L., Chopp, M., Gregg, S.R., Zhang, R.L., Teng, H., Jiang, A., Feng, Y., Zhang, Z.G., 2008. Neural progenitor cells treated with EPO induce angiogenesis through the production of VEGF. *J Cereb Blood Flow Metab* 28, 1361-1368.

Wang, T., Cong, P.X., Cui, J., Jiang, S., Xu, J., Xue, C.H., Huang, Q.R., Zhang, T.T., Wang, Y.M., 2019a. Digestion, Absorption, and Metabolism Characteristics of EPA-Enriched Phosphoethanolamine Plasmalogens Based on Gastrointestinal Functions in Healthy Mice. *J Agric Food Chem* 67, 12786-12795.

Wang, X., Tang, K., Chen, L., Cheng, S., Xu, H., 2019b. Association between sepsis and retinopathy of prematurity: a systematic review and meta-analysis. *BMJ Open* 9, e025440.

Wassle, H., Riemann, H.J., 1978. The mosaic of nerve cells in the mammalian retina. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 200, 441-461.

Watanabe, T., Raff, M.C., 1988. Retinal astrocytes are immigrants from the optic nerve. *Nature* 332, 834-837.

Watson, A.B., 2014. A formula for human retinal ganglion cell receptive field density as a function of visual field location. *J Vis* 14.

Wetts, R., Fraser, S.E., 1988. Multipotent precursors can give rise to all major cell types of the frog retina. *Science* 239, 1142-1145.

White, M.C., Rastogi, P., McHowat, J., 2007. Lysoplasmenylcholine increases neutrophil adherence to human coronary artery endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 293, C1467-1471.

White, T.W., Bruzzone, R., 2000. Intercellular communication in the eye: clarifying the need for connexin diversity. *Brain Res Brain Res Rev* 32, 130-137.

Willbold, E., Berger, J., Reinicke, M., Wolburg, H., 1997. On the role of Muller glia cells in histogenesis: only retinal spheroids, but not tectal, telencephalic and cerebellar spheroids develop histotypical patterns. *J Hirnforsch* 38, 383-396.

Williams, S.D., Ford, D.A., 1997. Activation of myocardial cAMP-dependent protein kinase by lysoplasmenylcholine. *FEBS Lett* 420, 33-38.

Winkler, B.S., Arnold, M.J., Brassell, M.A., Puro, D.G., 2000. Energy metabolism in human retinal Muller cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41, 3183-3190.

Wolf, R.A., Gross, R.W., 1985. Identification of neutral active phospholipase C which hydrolyzes choline glycerophospholipids and plasmalogen selective phospholipase A2 in canine myocardium. *J Biol Chem* 260, 7295-7303.

Wong, L.L., Rapaport, D.H., 2009. Defining retinal progenitor cell competence in Xenopus laevis by clonal analysis. *Development* 136, 1707-1715.

Wong, M.W., Braidy, N., Poljak, A., Pickford, R., Thambisetty, M., Sachdev, P.S., 2017. Dysregulation of lipids in Alzheimer's disease and their role as potential biomarkers. *Alzheimers Dement* 13, 810-827.

Wu, C., Lofqvist, C., Smith, L.E., VanderVeen, D.K., Hellstrom, A., 2012. Importance of early postnatal weight gain for normal retinal angiogenesis in very preterm infants: a multicenter study analyzing weight velocity deviations for the prediction of retinopathy of prematurity. *Arch Ophthalmol* 130, 992-999.

Wu, C., Vanderveen, D.K., Hellstrom, A., Lofqvist, C., Smith, L.E., 2010. Longitudinal postnatal weight measurements for the prediction of retinopathy of prematurity. *Arch Ophthalmol* 128, 443-447.

Wu, L.C., Pfeiffer, D.R., Calhoon, E.A., Madiai, F., Marcucci, G., Liu, S., Jurkowitz, M.S., 2011. Purification, identification, and cloning of lysoplasmalogenase, the enzyme that catalyzes hydrolysis of the vinyl ether bond of lysoplasmalogen. *J Biol Chem* 286, 24916-24930.

Wu, X., Huang, W., Luo, G., Alain, L.A., 2013. Hypoxia induces connexin 43 dysregulation by modulating matrix metalloproteinases via MAPK signaling. *Mol Cell Biochem* 384, 155-162.

Wurm, A., Lipp, S., Pannicke, T., Linnertz, R., Krugel, U., Schulz, A., Farber, K., Zahn, D., Grosse, J., Wiedemann, P., Chen, J., Schoneberg, T., Illes, P., Reichenbach, A., Bringmann, A., 2010. Endogenous purinergic signaling is required for osmotic volume regulation of retinal glial cells. *J Neurochem* 112, 1261-1272.

Wurm, A., Pannicke, T., Iandiev, I., Francke, M., Hollborn, M., Wiedemann, P., Reichenbach, A., Osborne, N.N., Bringmann, A., 2011. Purinergic signaling involved in Muller cell function in the mammalian retina. *Prog Retin Eye Res* 30, 324-342.

Xia, X.B., Xiong, S.Q., Xu, H.Z., Jiang, J., Li, Y., 2008. Suppression of retinal neovascularization by shRNA targeting HIF-1alpha. *Curr Eye Res* 33, 892-902.

Xin, X., Rodrigues, M., Umapathi, M., Kashiwabuchi, F., Ma, T., Babapoor-Farrokhran, S., Wang, S., Hu, J., Bhutto, I., Welsbie, D.S., Duh, E.J., Handa, J.T., Eberhart, C.G., Lutty, G., Semenza, G.L., Montaner, S., Sodhi, A., 2013. Hypoxic retinal Muller cells promote vascular permeability by HIF-1-dependent up-regulation of angiopoietin-like 4. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, E3425-3434.

Yafai, Y., Iandiev, I., Lange, J., Unterlauft, J.D., Wiedemann, P., Bringmann, A., Reichenbach, A., Eichler, W., 2014. Muller glial cells inhibit proliferation of retinal endothelial cells via TGF-beta2 and Smad signaling. *Glia* 62, 1476-1485.

Yafai, Y., Iandiev, I., Wiedemann, P., Reichenbach, A., Eichler, W., 2004. Retinal endothelial angiogenic activity: effects of hypoxia and glial (Muller) cells. *Microcirculation* 11, 577-586.

Yafai, Y., Lange, J., Wiedemann, P., Reichenbach, A., Eichler, W., 2007. Pigment epithelium-derived factor acts as an opponent of growth-stimulatory factors in retinal glial-endothelial cell interactions. *Glia* 55, 642-651.

Yamashita, S., Hashimoto, M., Haque, A.M., Nakagawa, K., Kinoshita, M., Shido, O., Miyazawa, T., 2017. Oral Administration of Ethanolamine Glycerophospholipid Containing a High Level of Plasmalogen Improves Memory Impairment in Amyloid beta-Infused Rats. *Lipids* 52, 575-585.

Yamashita, S., Kanno, S., Honjo, A., Otoki, Y., Nakagawa, K., Kinoshita, M., Miyazawa, T., 2016. Analysis of Plasmalogen Species in Foodstuffs. *Lipids* 51, 199-210.

Yang, H.C., Farooqui, A.A., Horrocks, L.A., 1996. Plasmalogen-selective phospholipase A2 and its role in signal transduction. *J Lipid Mediat Cell Signal* 14, 9-13.

Yao, H., Wang, T., Deng, J., Liu, D., Li, X., 2014. The development of blood-retinal barrier during the interaction of astrocytes with vascular wall cells. *Neural Regen Res* 9, 1047-1054.

Ye, S., Chen, Q., Jiang, N., Liang, X., Li, J., Zong, R., Huang, C., Qiu, Y., Ma, J.X., Liu, Z., 2020. PPARalpha-Dependent Effects of Palmitoylethanolamide Against Retinal Neovascularization and Fibrosis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 61, 15.

Yoshida, S., Sotozono, C., Ikeda, T., Kinoshita, S., 2001. Interleukin-6 (IL-6) production by cytokine-stimulated human Muller cells. *Curr Eye Res* 22, 341-347.

Young, R.W., 1985a. Cell differentiation in the retina of the mouse. *Anat Rec* 212, 199-205.

Young, R.W., 1985b. Cell proliferation during postnatal development of the retina in the mouse. *Brain Res* 353, 229-239.

Youssef, M., Ibrahim, A., Akashi, K., Hossain, M.S., 2019. PUFA-Plasmalogens Attenuate the LPS-Induced Nitric Oxide Production by Inhibiting the NF-kB, p38 MAPK and JNK Pathways in Microglial Cells. *Neuroscience* 397, 18-30.

Yu, A.Y., Frid, M.G., Shimoda, L.A., Wiener, C.M., Stenmark, K., Semenza, G.L., 1998. Temporal, spatial, and oxygen-regulated expression of hypoxia-inducible factor-1 in the lung. *Am J Physiol* 275, L818-826.

Yu, D., Buibas, M., Chow, S.K., Lee, I.Y., Singer, Z., Silva, G.A., 2009. Characterization of Calcium-Mediated Intracellular and Intercellular Signaling in the rMC-1 Glial Cell Line. *Cell Mol Bioeng* 2, 144-155.

Yu, H., Yuan, L., Zou, Y., Peng, L., Wang, Y., Li, T., Tang, S., 2014. Serum concentrations of cytokines in infants with retinopathy of prematurity. *APMIS* 122, 818-823.

Yu, Y., Chen, H., Su, S.B., 2015. Neuroinflammatory responses in diabetic retinopathy. *J Neuroinflammation* 12, 141.

Yun, J.H., Koh, Y.J., Jeong, H.S., Lee, D.H., Lee, E.H., Cho, C.H., 2018. Propranolol increases vascular permeability through pericyte apoptosis and exacerbates oxygen-induced retinopathy. *Biochem Biophys Res Commun* 503, 2792-2799.

Zahs, K.R., Ceelen, P.W., 2006. Gap junctional coupling and connexin immunoreactivity in rabbit retinal glia. *Vis Neurosci* 23, 1-10.

Zahs, K.R., Kofuji, P., Meier, C., Dermietzel, R., 2003. Connexin immunoreactivity in glial cells of the rat retina. *J Comp Neurol* 455, 531-546.

Zepeda-Romero, L.C., Hard, A.L., Gomez-Ruiz, L.M., Gutierrez-Padilla, J.A., Angulo-Castellanos, E., Barrera-de-Leon, J.C., Ramirez-Valdivia, J.M., Gonzalez-Bernal, C., Valtierra-Santiago, C.I., Garnica-Garcia, E., Lofqvist, C., Hellstrom, A., 2012. Prediction of retinopathy of prematurity using the screening algorithm WINROP in a Mexican population of preterm infants. *Arch Ophthalmol* 130, 720-723.

Zernike, F., 1955. How I discovered phase contrast. *Science* 121, 345-349.

Zhao, Y., Calon, F., Julien, C., Winkler, J.W., Petasis, N.A., Lukiw, W.J., Bazan, N.G., 2011. Docosahexaenoic acid-derived neuroprotectin D1 induces neuronal survival via secretase- and PPARgamma-mediated mechanisms in Alzheimer's disease models. *PLoS One* 6, e15816.

Zhou, J., He, S., Zhang, N., Spee, C., Zhou, P., Ryan, S.J., Kannan, R., Hinton, D.R., 2010. Neutrophils compromise retinal pigment epithelial barrier integrity. *J Biomed Biotechnol* 2010, 289360.

Zhou, R., Caspi, R.R., 2010. Ocular immune privilege. *F1000 Biol Rep* 2.

Zhou, Y., Yu, N., Zhao, J., Xie, Z., Yang, Z., Tian, B., 2020. Advances in the Biosynthetic Pathways and Application Potential of Plasmalogens in Medicine. *Front Cell Dev Biol* 8, 765.

Zhu, M., Madigan, M.C., van Driel, D., Maslim, J., Billson, F.A., Provis, J.M., Penfold, P.L., 2000. The human hyaloid system: cell death and vascular regression. *Exp Eye Res* 70, 767-776.

Zoeller, R.A., Lake, A.C., Nagan, N., Gaposchkin, D.P., Legner, M.A., Lieberthal, W., 1999. Plasmalogens as endogenous antioxidants: somatic cell mutants reveal the importance of the vinyl ether. *Biochem J* 338 (Pt 3), 769-776.

Zoeller, R.A., Morand, O.H., Raetz, C.R., 1988. A possible role for plasmalogens in protecting animal cells against photosensitized killing. *J Biol Chem* 263, 11590-11596.

Zoeller, R.A., Raetz, C.R., 1986. Isolation of animal cell mutants deficient in plasmalogen biosynthesis and peroxisome assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 5170-5174.

Zou, S., Kumar, U., 2018. Cannabinoid Receptors and the Endocannabinoid System: Signaling and Function in the Central Nervous System. *Int J Mol Sci* 19.

Résumé - Abstract

Résumé :

La rétinopathie du prématuré (ROP) est une rétinopathie à composante vasculaire, et représente la première cause de cécité infantile. Elle est principalement associée à l'hyperoxygénation thérapeutique du nouveau-né, mais la persistance de la pathologie malgré l'évolution de sa prise en charge suggère l'existence d'autres mécanismes. Les acides gras polyinsaturés (AGPIs) oméga-6 et oméga-3 sont connus pour réguler les mécanismes de l'angiogenèse, et leur origine phospholipidique semble être un facteur de première importance. Dans la membrane cellulaire, les AGPIs sont en effet majoritairement estérifiés sur des plasmalogènes, un sous groupe de phospholipides appartenant aux éther-lipides. De manière intéressante, les modèles animaux de déficience en plasmalogènes (DAPAT$^{-/-}$) présentent certaines anomalies semblables à celles observées au cours de la ROP. Au sein de la rétine, le métabolisme des plasmalogènes repose essentiellement sur les cellules de Müller, les cellules gliales rétiniennes majoritaires. A travers cette thèse, nous montrons dans un premier temps que les plasmalogènes régulent *in vitro* des fonctions essentielles des cellules de Müller comme la migration et la communication intercellulaire par jonction gap (GJIC), notamment par l'expression de la GFAP et de la Cx43. Dans un deuxième temps, nous caractérisons les anomalies moléculaires associées à la déficience en plasmalogènes *in vivo* (DAPAT$^{-/-}$), notamment à travers l'expression de gènes régulant l'activation des cellules gliales, l'angiogenèse, le remodelage de la matrice extracellulaire, l'inflammation, et pour la première fois le système endocannabinoïde. La supplémentation maternelle en précurseurs de plasmalogènes (alkylglycérols) semble présenter un intérêt modéré dans l'atténuation de ces anomalies. Enfin, les données obtenues chez l'Homme montrent une altération du profil érythrocytaire en AGPIs chez les prématurés développant la ROP, en identifiant notamment certains plasmalogènes comme contributeurs de ces anomalies.

Mots clés : Plasmalogènes, Cellules gliales, Développement vasculaire, Rétine, Rétinopathie du prématuré, Nutrition.

Abstract:

Retinopathy of prematurity (ROP) is the leading cause of childhood blindness and has been associated with therapeutic exposure to oxygen as a major risk factor. However, despite improvements in clinical care of newborns, its remaining prevalence suggests that other mechanisms could be involved. Polyunsaturated fatty acids (PUFAs) regulate several key features of human physiology, including angiogenesis. In retinal cell membranes, PUFAs are mainly esterified to the ether-lipids plasmalogens, which are regarded as PUFAs reservoirs. Interestingly, plasmalogen deficiency has been associated with several eye defects, such as vascular development abnormalities resembling to those observed in ROP. In the retina, plasmalogen metabolism mainly relies on Müller cells, the major retinal glial cells. In a first series of experiments, we show that plasmalogens are involved in the regulation of key features of Müller cells physiology such as cell migration or gap junction intercellular communication (GJIC) *in vitro* through the expression of GFAP and Cx43. In a second series of experiments, we characterized the *in vivo* molecular abnormalities associated with plasmalogen-deficiency (DAPAT$^{-/-}$ mice), revealing the implication of several genes involved in gliosis, angiogenesis, inflammation, extracellular matrice remodeling, as well as in the endocannabinoid system. Dietary supplementation with plasmalogen-precursors (alkylglycerols) was associated with a moderate prevention of the abnormalities aforementioned. Finally, we show in preterm newborns that ROP is associated with alterations in red blood cells PUFAs levels, and that plasmalogens contribute to these changes.

Keywords: Plasmalogens, Glial cells, Vascular development, Retina, Retinopathy of prematurity, Diet.