

**THESE DE DOCTORAT DE L'ETABLISSEMENT UNIVERSITE BOURGOGNE FRANCHE-COMTE
PREPAREE AU CENTRE DES SCIENCES DU GOUT ET DE L'ALIMENTATION**

Ecole doctorale n°554
Environnement-Santé
Doctorat de Sciences de la vie

Par
Élise LÉGER-CHARNAY

**Régulation du métabolisme du cholestérol dans la rétine
en conditions expérimentales associées au glaucome**

Thèse présentée et soutenue à Dijon, le 10 décembre 2019

Composition du Jury :

Mme Corinne LELOUP	Professeur des Universités, UB CSGA, Dijon	Présidente
M. Xavier GUILLONNEAU	Chargé de recherche, INSERM Institut de la vision, Paris	Rapporteur
M. Fabrice SAEZ	Maître de conférences des Universités, UCA GReD, Clermont-Ferrand	Rapporteur
Mme Cécile DELCOURT	Directrice de recherche, INSERM BPH, Bordeaux	Examinatrice
Mme Isabelle MUS-VETEAU	Directrice de recherche, CNRS IPMC, Sophia Antipolis	Examinatrice
M. Alain BRON	Professeur des Universités -Praticien hospitalier CHU, Dijon	Examineur
M. Lionel BRETILLON	Directeur de recherche, INRA CSGA, Dijon	Directeur de thèse
Mme Ségolène GAMBERT	Maître de conférences des Universités -Praticien hospitalier CHU, Dijon	Codirectrice
Mme Élodie MASSON	Chargée de recherche, INRA CSGA, Dijon	Codirectrice

Remerciements

Je remercie mon directeur de thèse, Lionel, qui s'est toujours montré disponible, malgré ses nombreuses responsabilités. Merci d'avoir été présent pour les prises de décisions importantes et pour ton éclairage scientifique qui a permis à ce projet d'avancer.

C'est très chaleureusement que je remercie mes deux co-encadrantes, Elodie et Ségolène. Merci pour vos conseils scientifiques quotidiens, votre soutien et la confiance que vous m'avez apportée pendant ces trois ans. Merci également pour votre bonne humeur, même dans les moments intenses de la thèse, qui m'a beaucoup aidée à ne pas baisser les bras. Merci aussi pour votre écoute, votre patience et votre disponibilité qui m'ont permis de travailler dans un environnement agréable.

C'est avec beaucoup de reconnaissance que je remercie le professeur Philippe Gambert pour sa contribution financière au projet et la confiance qu'il nous a accordée.

Je remercie le professeur Alain Bron de nous avoir apporté son œil d'expert en ophtalmologie. Vos conseils techniques sur la photocoagulation laser ont été décisifs pour le démarrage du projet. C'est également grâce à vous que nous avons eu la chance de nous former dans l'équipe de M. Vidal-Sanz. Enfin, merci pour la relecture des articles et les échanges profitables que nous avons pu avoir régulièrement.

Je tiens à remercier les membres de mon comité de suivi de thèse, Madame Simon-Plas et Madame Cartier, pour leurs conseils avisés qui nous ont permis d'orienter le projet dans une direction fructueuse.

Je remercie les membres du jury d'avoir accepté d'évaluer ce travail. Monsieur Xavier Guillonnet et Monsieur Fabrice Saez d'être rapporteurs et Madame Cécile Delcourt, Madame Isabelle Mus-Veteau et Monsieur Alain Bron d'avoir accepté de l'examiner.

Je tiens particulièrement à remercier Lucy, pour ta grande contribution à ce projet, ta gentillesse et pour avoir tenu bon malgré les multiples rebondissements que nous avons rencontrés !

Je remercie également Bénédicte et Laurent pour leurs aides avisées qui m'ont aidée au quotidien. Stéphane pour ton humour et ta bonne humeur de tous les jours.

Merci Elisabeth pour ton aide précieuse et tes conseils d'experte ! Tu m'as beaucoup apporté.

Merci à tous les membres de l'équipe 6, qui m'ont accueillie dans une ambiance conviviale. Merci également pour l'accueil que vous avez réservé à Tristan.

Mayssa, ou plutôt Habibi, que dire... Que si tu n'avais pas été là, cette thèse n'aurait pas eu la même saveur, même si ce n'est pas avec de bons petits gâteaux maison que tu as conquis mon cœur (mais pour ça Hani et son caviar d'aubergine ont rattrapé largement le coup). Tu as été un soutien quotidien dans le boulot, mais tu es surtout une amie que j'espère ne pas perdre de vue.

Elisa...pas bourguignonne mais assurément un grand cru de 90 ! Merci pour ta force mentale, que tu as distillée dans ce bureau. Ne sous-estime pas ce super pouvoir.

Rémi ~~Murphy~~ Karadayi, je te souhaite tout le ~~malheur~~ bonheur du monde, pour aujourd'hui comme pour demain. Et toc !

Patrick et Glenda, de belles rencontres qui ont éclairé mes journées passées à INRA. Dédicace spéciale au big boss Matéo... que tu ressembles à tes deux supers parents !

Merci à toi, Laurence pour ta gentillesse et ta prévenance quand j'ai fait mes premiers pas à l'animalerie.

Merci à Christine Arnould, pour ton aide et le temps que tu m'as accordé...que de belles images ! Je remercie également Vincent Gigot, sans qui les comptages de neurones sur rétines mises à plats n'auraient pas été possibles.

Un grand merci au professeur Vidal-Sanz et à toute son équipe, qui nous ont accueillies à bras ouvert dans leur laboratoire en Espagne. Nous avons pu apprendre de leur expertise, notamment sur les modèles de glaucome.

Je réserve ces dernières lignes à mes proches, sans qui je n'aurais sans doute jamais fait de thèse. A mon père, pour m'avoir transmis sa curiosité et sa ténacité. A ma mère, quelle douceur et quel soutien extraordinaire ! A ma sœur qui n'est jamais loin et sur qui, je sais, je peux compter. A Dan, @meilleurbeaufEVER ! Et à Lucie, qui devra bientôt choisir entre première S ou L...et saura faire le bon choix. Hum, ou plutôt, à Lucie qui fera bientôt plein de bêtises avec sa tata gaga. A Tristan, avec qui j'ai beaucoup de chance de partager ma vie. Fais-toi confiance

Abstract

Cholesterol is a lipid found in every animal cell and is necessary for its survival. Among its multiple roles in the body, it is a component of cell membranes that is crucial for the maintenance of their structure, their fluidity and is thus implicated in the modulation of many signalling pathways. Neurons are especially dependent on cholesterol input since the proper composition of their plasma membrane is required for vesicular exocytosis of neurotransmitters and transduction of the post-synaptic signal. It has been shown that both an excess and a lack of cholesterol are neurotoxic. Moreover, many neurodegenerative diseases, such as Alzheimer's or Huntington's diseases, have been associated with dysregulation of cholesterol homeostasis, highlighting the need for a fine regulation of its metabolism in nervous tissues. Coordinated actions of neurons and glia, that exhibit complementary functions, are mandatory in this respect. In the brain, astrocytes, the main macroglial cells, may be the major source of cholesterol biosynthesis and export. Neurons, acting as consumers, may be specifically in charge of cholesterol elimination via conversion into 24S-OHC by the CYP46A1 enzyme. This metabolite is likely to be not only an elimination product of cholesterol but also a signalling molecule in glial cells. It might enable glial cholesterol metabolism to adjust as needed and avoid an overload in brain tissues. In the retina, cholesterol metabolism and its regulation under physiological and pathological conditions remain largely unknown. Müller cells, the major macroglial cells of the retina, could participate in cholesterol synthesis in this tissue even though evidence is still needed. Regarding 24S-OHC, its synthesis is mainly restricted to retinal ganglion cells, neurons responsible for the nervous signal transmission from the retina to the brain. Studies performed in our laboratory suggest that CYP46A1 and its product could be implicated in the physiopathology of glaucoma, a disease characterized by ganglion cell degeneration.

The present project aims to provide a better understanding of cholesterol metabolism in Müller cells and its potential regulation by 24S-OHC. The goal is also to unveil changes in cholesterol metabolism during the progression of glaucoma by characterizing, at different time points, the molecular players implicated in its biosynthesis, transport and elimination.

Our experiments performed on primary Müller cell cultures indicate that these cells possess the molecular machinery to synthesize and export cholesterol and could therefore actively participate in its metabolism in the retina. We also report a strong hypocholesterolemic effect of 24S-OHC in Müller cells, reinforcing the hypothesis that this compound could be a regulator of retinal cholesterol metabolism. In an experimental glaucoma model, induced by an elevation in intraocular pressure in rats, we observed major changes in cholesterol metabolism. At the earliest time points, genes implicated in cholesterol biosynthesis and uptake were upregulated in the retina, and cholesterol precursor levels were consecutively and transiently elevated. An important component of our work was to demonstrate that counter-regulatory mechanisms were activated in response to these initial dysregulations, that enabled the maintenance of cholesterol homeostasis in the retina and likely participated in ganglion cell survival.

Keywords: *Oxysterols, Eye, Degeneration, Cholesterol-24S-Hydroxylase, Gliosis, Neuron-glia communication*

Résumé

Le cholestérol est un lipide présent dans toutes les cellules animales et indispensable à leur survie. Parmi les rôles multiples qu'il joue dans l'organisme, celui de composant des membranes cellulaires est essentiel pour le maintien de leur structure, de leur fluidité et donc clé dans la modulation de nombreuses voies de signalisation. A ce titre, les neurones sont particulièrement dépendants de l'apport en cholestérol car l'intégrité de la composition de leurs membranes est requise pour l'exocytose vésiculaire des neurotransmetteurs et la transduction du signal post-synaptique. Ainsi, il a été montré qu'un excès ou un défaut de ce composé est neurotoxique. De nombreuses maladies neurodégénératives, comme les maladies d'Alzheimer ou de Huntington, ont d'ailleurs été associées à des perturbations de l'homéostasie du cholestérol, soulignant la nécessité d'une régulation fine de son métabolisme dans les tissus nerveux. Dans ce cadre, l'existence de mécanismes de coordination entre les actions des neurones et de la glie, dont les fonctions sont complémentaires, semble indispensable. Dans le cerveau, les astrocytes, cellules macrogliales majoritaires, seraient le principal lieu de synthèse et d'export du cholestérol. Les neurones, plutôt consommateurs, seraient spécifiquement en charge de son élimination, via sa conversion en 24(S)-hydroxycholestérol (24S-OHC) par l'enzyme CYP46A1. Ce métabolite ne serait pas seulement un produit d'excrétion du cholestérol, mais jouerait également le rôle de molécule signal dans les cellules gliales. Il permettrait d'adapter le métabolisme de la glie aux besoins en cholestérol, afin d'éviter toute surcharge dans les tissus cérébraux. Dans la rétine, le métabolisme du cholestérol et sa régulation, en conditions physiologiques et pathologiques, sont encore peu décrits. Les cellules de Müller, macroglie majoritaire de la rétine, pourraient participer à la synthèse de cholestérol dans ce tissu, mais les arguments dans ce sens méritent d'être étoffés. Concernant le 24S-OHC, sa synthèse est essentiellement restreinte aux cellules ganglionnaires, neurones chargés de transmettre l'influx nerveux de la rétine au cerveau. Les résultats de quelques études menées au laboratoire suggèrent d'ailleurs que l'enzyme CYP46A1 et son métabolite seraient impliqués dans la physiopathologie du glaucome, maladie liée à la dégénérescence des cellules ganglionnaires.

Le but de cette thèse est de contribuer à une meilleure compréhension du métabolisme du cholestérol dans les cellules de Müller et son éventuelle régulation par le 24S-OHC. L'objectif était également de mettre en évidence de potentielles altérations du métabolisme du cholestérol au cours du glaucome en caractérisant, à différents points de temps, les acteurs moléculaires impliqués dans sa synthèse, son transport et son élimination.

Nos expériences menées sur des cultures primaires de cellules de Müller indiquent que ces cellules possèdent la machinerie moléculaire pour synthétiser et exporter le cholestérol, et pourraient donc participer activement à son métabolisme dans la rétine. Nous avons également décrit un effet hypocholestérolémiant du 24S-OHC dans les cellules de Müller, ce qui renforce l'hypothèse selon laquelle ce composé pourrait intervenir dans la régulation du métabolisme du cholestérol dans la rétine. Dans un modèle de glaucome expérimental, par hyperpression oculaire chez le rat, nous avons observé des modifications majeures du métabolisme du cholestérol. De manière très précoce, il s'agit d'une surexpression des gènes impliqués dans la synthèse et la captation de cholestérol dans la rétine, puis d'une élévation transitoire des taux de ses précurseurs. Un élément important de notre travail a été de montrer que ces perturbations initiales sont suivies de l'activation de mécanismes de contre-régulation coordonnés, permettant de maintenir l'homéostasie du cholestérol dans la rétine et participant donc sans doute positivement à la survie des cellules ganglionnaires.

Mots-clés : Oxystérols, Œil, Dégénérescence, Cholestérol-24S-hydroxylase, Gliose, Communication neurone-glie

Table des matières

Table des Figures	11
Abréviations	13
Introduction générale	15
Chapitre 1- Contexte bibliographique et objectifs de l'étude.....	19
I. Anatomie de l'œil et de la rétine	21
1. La cornée et la sclère	21
2. L'uvéa	24
3. Le cristallin	25
4. L'humeur aqueuse et le vitré	25
4.1. Humeur aqueuse et pression intraoculaire-Notions de tonométrie	25
4.2. Le vitré	27
5. La rétine	28
5.1. La rétine neurosensorielle	28
5.1.1. Les neurones	28
5.1.1.1. Les photorécepteurs	31
5.1.1.2. Les cellules bipolaires	33
5.1.1.3. Les cellules horizontales et les cellules amacrines	34
5.1.1.4. Les cellules ganglionnaires (RGC)	34
5.1.2. Les cellules gliales	38
5.1.2.1. Les cellules de Müller	38
5.1.2.2. Les astrocytes	42
5.1.2.3. Les cellules microgliales	42
5.1.2.4. La gliose rétinienne	43
5.2. L'épithélium pigmentaire rétinien	44
6. Réseaux vasculaires et barrière hémato-rétinienne	46
6.1. Le réseau vasculaire rétinien	46
6.2. Le réseau vasculaire choroïdien	46
6.3. Les barrières hémato-rétiniennes	48
II. Le glaucome, maladie neurodégénérative de la rétine	51
1. Types de glaucomes	51
1.1. Glaucome à angle ouvert / à angle fermé	51
1.2. Glaucome primaire / secondaire	52
2. Facteurs de risque	52
2.1. Hyperpression oculaire	52
2.2. Vieillesse	54
2.3. Génétique et histoire familiale	54
3. Mécanismes concourant à la mort des RGC	55
3.1. Un ensemble d'événements délétères pour les neurones	55
3.2. Une mort par apoptose	57
4. Modèles animaux de glaucome et techniques d'étude de la souffrance et de la mort des RGC	58
4.1. Modèles animaux de glaucome	58
4.1.1. Hyperpression génétique chez la souris	59
4.1.2. Hyperpression induite par procédure chirurgicale ou laser	60
4.1.2.1. Injection de microbilles	60

4.1.2.2.	Injection d'acide hyaluronique	61
4.1.2.3.	Injection d'une solution hypertonique dans les veines épisclérales	61
4.1.2.4.	Photocoagulation laser	61
4.2.	Techniques d'étude de la souffrance et de la mort des RGC	64
4.2.1.	Mise en évidence de perturbations du transport axonal <i>ex-vivo</i>	64
4.2.2.	Quantification de la mort des RGC <i>ex-vivo</i>	64
4.2.2.1.	Comptage du nombre de RGC dans la rétine	64
4.2.2.2.	Comptage des fibres nerveuses dans le nerf optique	67
5.	Traitement du glaucome chez l'homme	68
III.	Le cholestérol dans l'organisme et dans la rétine	69
1.	Rôles principaux du cholestérol	69
2.	Répartition du cholestérol dans l'organisme et importance dans le système nerveux	71
3.	Le métabolisme du cholestérol	73
3.1.	Métabolisme du cholestérol dans l'organisme	74
3.1.1.	Les apports en cholestérol	74
3.1.1.1.	Teneurs en cholestérol des aliments et absorption intestinale	74
3.1.1.2.	Biosynthèse endogène du cholestérol	76
3.1.2.	Transport plasmatique du cholestérol dans les lipoprotéines	80
3.1.2.1.	Structure générale des lipoprotéines	80
3.1.2.2.	Principaux types d'apolipoprotéines, et rôles physiologiques	81
3.1.2.3.	Classes de lipoprotéines : composition lipidique et protéique	83
3.1.2.4.	Rôles des différentes classes de lipoprotéines	85
3.1.3.	Captation du cholestérol par les cellules : les récepteurs aux LDL	87
3.1.4.	Voies d'éliminations du cholestérol	88
3.1.4.1.	Des tissus vers le foie : transport reverse du cholestérol médié par les HDL	89
3.1.4.2.	Synthèse des oxystérols	90
3.1.4.3.	Catabolisme du cholestérol et des oxystérols en acides biliaires	91
3.1.4.4.	Excrétion trans-intestinale du cholestérol (TICE)	92
3.1.5.	Régulation du métabolisme du cholestérol	92
3.1.5.1.	Les facteurs de transcription LXR	93
3.1.5.2.	Les facteurs de transcription SREBP	94
3.1.5.3.	Régulation de l'absorption du cholestérol	95
3.1.5.4.	Régulation de la biosynthèse du cholestérol	95
3.1.5.5.	Régulation de la captation du cholestérol par les cellules	96
3.1.5.6.	Régulation de l'élimination du cholestérol	97
3.2.	Métabolisme du cholestérol dans les tissus nerveux	98
3.2.1.	Apports	99
3.2.2.	Transport et distribution aux neurones	100
3.2.3.	Élimination	102
3.2.4.	Régulation du métabolisme du cholestérol	106
IV.	Neurodégénérescence et métabolisme du cholestérol	109
1.	Maladies neurodégénératives causées par un défaut d'homéostasie du cholestérol-Exemple de la maladie de Niemann-Pick type C	109
2.	Maladies neurodégénératives associées à des défauts d'homéostasie du cholestérol	110
2.1.	Neurodégénérescence cérébrale-Exemple de la maladie d'Alzheimer	110
2.2.	Neurodégénérescence rétinienne - Le cas du glaucome	112
V.	Objectifs du projet de thèse	115

Chapitre 2 Effet du 24(S)-hydroxycholestérol sur la régulation du métabolisme du cholestérol dans les cellules de Müller117

- I. Problématique 119
- II. Article “Is 24S-OHC a potent modulator of cholesterol metabolism in Müller cells? An in vitro study about neuron to glia communication in the retina” 121
- III. Principaux résultats et conclusion 131

Chapitre 3 Caractérisation du métabolisme du cholestérol au cours du glaucome133

- I. Problématique 135
- II. Article “Changes in retinal cholesterol metabolism in a rat model of ocular hypertension” 137
- III. Principaux résultats et conclusion 155

Chapitre 4 Discussion générale et perspectives157

- Références bibliographiques 167

Table des Figures

Figure 1. Anatomie de l'œil humain	23
Figure 2. Voies d'élimination de l'humeur aqueuse.	27
Figure 3. Anatomie de la rétine.....	30
Figure 4. Structure simplifiée des photorécepteurs et d'un photopigment, la rhodopsine. ..	31
Figure 5. Anatomie simplifiée de la tête du nerf optique et de la lame criblée.	36
Figure 6. Principales fonctions assurées par les cellules de Müller.	41
Figure 7. Principaux rôles de l'épithélium pigmentaire rétinien.	45
Figure 8. Réseaux vasculaires rétiniens et choroïdiens	47
Figure 9. Les barrières hémato-rétiniennes interne et externe.....	49
Figure 10. Structures oculaires classiquement photocoagulées au laser dans le cadre de l'induction d'un glaucome expérimental.	63
Figure 11. Visualisation des RGC sur rétine mise à plat.	67
Figure 12. Le cholestérol, formule chimique et rôles principaux.	70
Figure 13. Distribution du cholestérol dans la rétine.	73
Figure 14. Métabolisme du cholestérol dans les entérocytes.	76
Figure 15. Voies de biosynthèse du cholestérol.	79
Figure 16. Structure simplifiée des lipoprotéines.	80
Figure 17. Dynamique des lipoprotéines.	81
Figure 18. Principales classes de lipoprotéines plasmatiques : composition lipidique et protéique.....	85
Figure 19. Métabolisme des lipoprotéines chez l'Homme.	87
Figure 20. Oxystérols majeurs du plasma humain.	91
Figure 21. Régulation de la transcription de gènes clés du métabolisme du cholestérol par les facteurs de transcription SREBP 2 et LXR.....	98
Figure 22. Représentation simplifiée du métabolisme du cholestérol dans la rétine.....	105

Abréviations

24-OHC	24(S)-hydroxycholestérol
27-COOH	Acide 3 β -hydroxy-5-cholesténoïque
27-OHC	27-hydroxycholestérol
AAV	Vecteur Viral Adéno-associé (“ <u>A</u> d <u>e</u> n <u>o</u> - <u>a</u> ssoci <u>e</u> d <u>v</u> irus”)
ABCA1	“ <u>A</u> TP- <u>b</u> inding <u>c</u> ass <u>e</u> tte <u>t</u> ransp <u>o</u> rt <u>e</u> r <u>A</u> 1”
ACAT	“ <u>A</u> cy <u>l</u> - <u>c</u> holester <u>o</u> l <u>a</u> cy <u>l</u> <u>t</u> ransferase”
ApoE	<u>A</u> polipoprotéine <u>E</u>
BDNF	“ <u>B</u> rain- <u>D</u> erived <u>N</u> eurotrophic <u>F</u> actor”
CETP	“ <u>C</u> holester <u>y</u> lester <u>t</u> ransfer <u>p</u> rotein”
CNTF	“ <u>C</u> iliary <u>n</u> eurotrophic <u>f</u> actor”
CRALBP	“ <u>C</u> ellular <u>r</u> etinaldeh <u>y</u> de- <u>b</u> inding <u>p</u> rotein”
CTB	“ <u>C</u> holera <u>t</u> oxin <u>B</u> ”
CYP46A1	“ <u>C</u> ytochrome <u>P</u> 450 family <u>4</u> 6 subfamily <u>A</u> member <u>1</u> ”
DHCR24	“ <u>2</u> 4- <u>d</u> ehydrocholesterol <u>r</u> eductase”
GFAP	“ <u>G</u> lial fibrillary <u>a</u> cidic <u>p</u> rotein”
HDL	Lipoprotéine de haute densité (“ <u>H</u> igh <u>d</u> ensity <u>l</u> ipoprotein”)
HRP	Peroxydase du raifort (“ <u>H</u> orseradish <u>p</u> eroxidase”)
IDOL	“ <u>I</u> nducible <u>d</u> egrader of <u>L</u> DL receptor”
LCAT	Lécithine cholestérol acyltransférase
LDL	Lipoprotéine de basse densité (“ <u>L</u> ow <u>d</u> ensity <u>l</u> ipoprotein”)
LDL-R	Récepteur au LDL (<u>L</u> ow <u>d</u> ensity <u>l</u> ipoprotein <u>r</u> eceptor”)
LPL	“ <u>L</u> ipoprotein <u>l</u> ipase”
LRP	“ <u>L</u> ow density lipoprotein receptor- <u>r</u> elated <u>p</u> rotein”
LXR	“ <u>L</u> iver <u>X</u> receptor”
LXRE	“ <u>L</u> XR <u>r</u> esponse <u>e</u> lement”
LXREn	“ <u>n</u> egative <u>L</u> XR <u>r</u> esponse <u>e</u> lement”
NPC1	“ <u>N</u> iemann- <u>P</u> ick type <u>C</u> 1”
NPC1L1	“ <u>N</u> iemann- <u>P</u> ick- <u>C</u> 1- <u>l</u> ike- <u>1</u> ”
NPC2	“ <u>N</u> iemann- <u>P</u> ick type <u>C</u> 2”
PIO	Pression intraoculaire
PPAR	“ <u>P</u> eroxisome <u>p</u> roliferator- <u>a</u> ctivated <u>r</u> eceptor”
RGC	Cellule ganglionnaire de la rétine (“ <u>R</u> etinal <u>g</u> anglion <u>c</u> ell”)
RITC	“ <u>R</u> hodamine- <u>B</u> - <u>I</u> sothio <u>C</u> yanate”
ROS	Espèces réactives de l’oxygène (“ <u>R</u> eactive <u>o</u> xygen <u>s</u> pecies”)
RPE	Épithélium pigmentaire de la rétine (“ <u>R</u> etinal <u>p</u> igmentary <u>e</u> pithelium”)
RXR	“ <u>R</u> etinoic <u>X</u> receptor”
SR-BI	“ <u>S</u> cavenger <u>R</u> eceptor class <u>B</u> type <u>1</u> ”
SRE	“ <u>S</u> REBP <u>r</u> esponse <u>e</u> lement”
SREBP	“ <u>S</u> terol <u>r</u> egulatory <u>e</u> lement- <u>b</u> inding <u>p</u> rotein”
TICE	Excrétion trans-intestinale du cholestérol (“ <u>T</u> rans <u>i</u> ntestinal <u>c</u> holesterol <u>e</u> xcretion”)
TNF α	“ <u>T</u> umor <u>n</u> ecrosis <u>f</u> actor <u>a</u> lpha”

Introduction générale

La rétine constitue le tissu photosensible de l'œil qui permet la vision. Elle appartient au système nerveux central et est de ce fait composée de neurones et de cellules gliales. Au sein de ce tissu très ordonné, ces deux types cellulaires sont en contact étroit et constant. Les cellules de Müller sont les principales cellules macrogliales de la rétine. Elles participent activement au maintien de l'homéostasie rétinienne, en assurant un soutien nutritionnel et métabolique aux neurones voisins et en maintenant l'équilibre de leur environnement extracellulaire. Elles sont activées dans diverses conditions de stress, lors du processus de gliose, pour préserver au maximum l'intégrité rétinienne en favorisant la restauration des homéostasies et la survie neuronale (Bringmann et al., 2006).

Le cholestérol est un composant majeur des membranes cellulaires. En modulant leur fluidité, il participe notamment à la régulation du fonctionnement des radeaux lipidiques, plateformes de signalisation membranaires. Le cholestérol joue à ce titre un rôle crucial dans le développement et le fonctionnement du système nerveux central, les neurones synthétisant de grandes quantités de membranes pour la croissance et la formation de leurs axones, dendrites et synapses. Dans le cerveau, une étroite coopération entre les cellules gliales que sont les astrocytes, considérés comme les fournisseurs de cholestérol, et les neurones, semble permettre de maintenir un taux de cholestérol adapté aux besoins grâce à des mécanismes de régulation efficaces. Les travaux portant sur l'importance du cholestérol dans les maladies neurodégénératives sont de plus en plus nombreux. Des dérégulations du métabolisme du cholestérol ont en effet été démontrées comme étant à l'origine de maladies, telles que le syndrome de Niemann-Pick ou de Smith-Lemli Opitz. Elles ont par la suite été associées à la maladie d'Alzheimer et à celle de Huntington (Vance, 2012).

L'intérêt porté au métabolisme du cholestérol dans la rétine reste, quant à lui, plus récent (Fliesler et Bretillon, 2010, Pikuleva et Curcio, 2014). Même s'il présente des similitudes avec le métabolisme cérébral, il comprend aussi des spécificités qui doivent être mises en lumière et prises en compte. En termes de pathologies, les travaux de recherche se sont d'abord focalisés sur la dégénérescence maculaire liée à l'âge, le cholestérol étant un composant majeur des drusen qui sont un

facteur causal dans le développement de cette maladie. Le glaucome est également une cause majeure de cécité dans le monde. C'est une maladie neurodégénérative de la rétine caractérisée par la mort d'un type de neurones réiniens, les cellules ganglionnaires, et des atteintes spécifiques de la tête du nerf optique conduisant à une perte progressive et irréversible de la vision périphérique. Des travaux précédemment menés au laboratoire ont montré qu'un polymorphisme dans le gène codant pour la protéine CYP46A1, enzyme neuronale impliquée dans l'élimination du cholestérol, est associé à une prévalence accrue de glaucome (Fourgeux et al., 2009). Une modification de l'expression de cette enzyme et de son produit, le 24S-hydroxycholestérol (24S-OHC), a également été décrite dans un modèle de glaucome expérimental chez le rat (Fourgeux et al., 2012).

L'objectif global du projet de thèse présenté ici a été de caractériser le métabolisme du cholestérol et sa régulation dans la rétine, au travers d'une approche double menée *in vitro* et *in vivo*.

Ce manuscrit de thèse est organisé en 4 chapitres :

- Le premier chapitre est consacré au contexte bibliographique qui vise à fournir les informations nécessaires à la compréhension du projet (objectifs, modèles utilisés, interprétation des résultats, impacts et perspectives du travail). Ce premier chapitre décrit tout d'abord l'anatomie de l'œil, puis la rétine dans ses particularités de tissu neurosensoriel hautement organisé, avec un focus particulier sur les types cellulaires d'intérêt pour le projet : les cellules gliales de Müller et les cellules ganglionnaires. La physiopathologie du glaucome est ensuite abordée avec notamment une description des processus pathogéniques, des modèles animaux et des techniques d'étude. Ce chapitre bibliographique présente enfin de façon approfondie le métabolisme du cholestérol, en particulier dans les tissus nerveux. Il met en parallèle les connaissances acquises sur le cerveau et sur la rétine, pour laquelle les données sont plus limitées. Ce chapitre se termine par une description des objectifs du projet de thèse.

- Les deux chapitres suivants sont consacrés aux deux grandes études expérimentales réalisées dans le cadre de la thèse :

- l'étude des effets du 24S-OHC sur le métabolisme du cholestérol dans les cellules de Müller (2e chapitre). Ce travail réalisé *in vitro* est présenté sous forme d'un article accepté pour publication dans le journal *Experimental Eye Research*.

- l'étude du métabolisme du cholestérol dans un modèle d'hyperpression oculaire chez le rat (3e chapitre). Ce travail est également présenté sous la forme d'un article à soumettre dans le journal *Experimental Eye Research*.

- Le dernier chapitre du manuscrit correspond, quant à lui, à une discussion générale des résultats obtenus dans le cadre de la thèse ainsi qu'à une conclusion. Il aborde également les perspectives qui découlent de ce travail de thèse.

Chapitre | 1

Contexte bibliographique et objectifs de l'étude

I. Anatomie de l'œil et de la rétine

Chez tous les vertébrés, la vision est assurée par un organe de structure globale commune, l'œil ou globe oculaire (Fig.1), directement connecté au cerveau par le nerf optique. L'œil est dit « camera-like » car non seulement, il permet de détecter la lumière, mais il assure aussi la formation d'images. Il est composé de tissus, dont des tissus de protection (sclère, cornée) et de détection de la lumière (rétine), de lentilles convergentes (cornée, cristallin) et de milieux liquidiens transparents (humour aqueuse et vitré). Le globe oculaire est organisé de manière à ce que les rayons lumineux qui pénètrent par la cornée convergent sur la rétine. Dans la rétine, l'information lumineuse est convertie en un message neuronal transmis au cerveau, via le nerf optique, pour intégration centrale.

1. La cornée et la sclère

La cornée et la sclère sont les enveloppes qui délimitent le globe oculaire (Fig. 1). Elles se rejoignent au niveau d'une zone nommée limbe. Ainsi, elles permettent d'isoler l'œil de l'environnement extérieur et constituent une barrière physique et mécanique.

La cornée, partie la plus antérieure du globe, couvre 15% de la surface de l'œil. Il s'agit d'une coupole transparente qui laisse passer la lumière incidente (90 % dans le spectre visible, chez l'Homme). Elle constitue la première lentille convergente rencontrée par les rayons lumineux et possède la vergence¹ la plus élevée parmi les structures oculaires (43 dioptries en moyenne chez l'Homme). La vergence cornéenne est influencée par son rayon de courbure, fixe à l'âge adulte. La cornée n'est pas vascularisée. En revanche, elle est richement innervée : tout contact avec un corps étranger déclenche le réflexe de clignement des paupières permettant ainsi de protéger l'œil des agressions extérieures.

¹ Vergence (V) : capacité d'une lentille à dévier les rayons lumineux qui la traversent. Sa valeur dépend de l'indice de réfraction de la lentille et des milieux qui l'environnent ainsi que du/des rayons de courbure de la lentille. L'unité de la vergence est la dioptrie (σ). Si $V > 0$ le système est convergent, si $V < 0$, le système est divergent.

La sclère, ou blanc de l'œil chez l'Homme, couvre les 85% restants du globe. Elle est en continuité avec la cornée mais, contrairement à celle-ci, est complètement opaque. La sclère sert de support pour les tissus, choroïde et rétine, qui tapissent l'intérieur de l'œil. Elle assure également le maintien de la forme du globe malgré les contraintes mécaniques appliquées, par exemple, par les muscles oculomoteurs. La sclère elle-même est très peu vascularisée. Elle est en revanche recouverte d'un tissu conjonctif lâche, l'épisclère qui, elle, est fortement irriguée. Les veines épisclérales sont importantes pour l'élimination de l'humeur aqueuse et donc pour le maintien de la pression intraoculaire (PIO). Nous reparlerons plus en détail des structures impliquées dans l'homéostasie de la PIO dans le paragraphe II.2.1 de ce chapitre.

Le limbe est la jonction cornéo-sclérale. Il s'agit d'une zone très vascularisée (veines limbiques) impliquée également dans le recyclage de l'humeur aqueuse. Le limbe est aussi le lieu de résidence des cellules souches qui assure le renouvellement permanent de l'épithélium cornéen (Schermer et al., 1986).

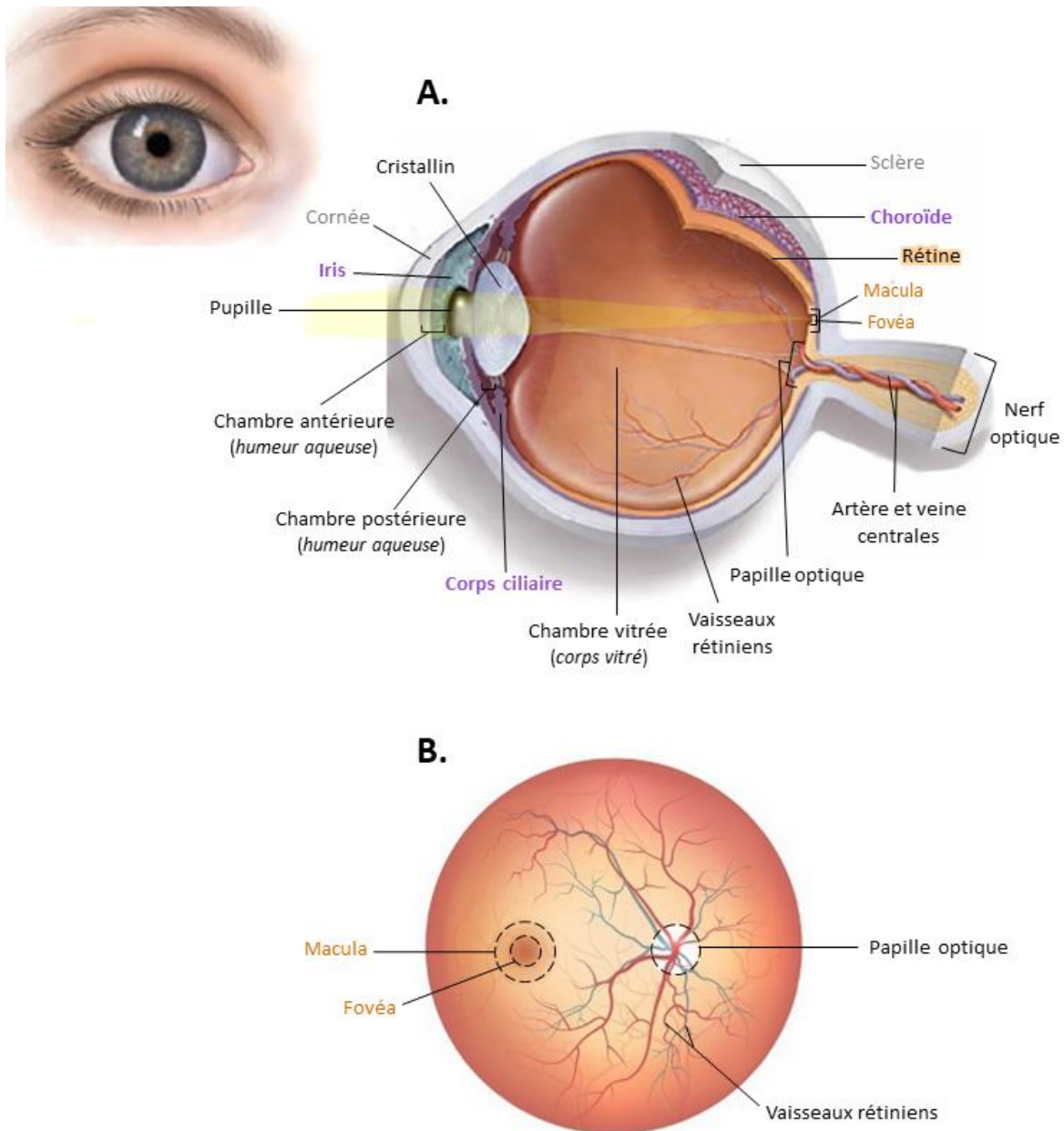


Figure 1. Anatomie de l'œil humain

(A) Représentation schématisée d'une coupe sagittale d'œil. La sclère, communément appelé blanc de l'œil, est la membrane qui entoure le globe oculaire et lui donne sa forme. A l'avant de l'œil, la sclère laisse place à la cornée, membrane transparente qui est le lieu d'entrée des rayons lumineux (représentés en jaune). Entre la cornée et l'iris se trouve la chambre antérieure de l'œil, remplie d'humeur aqueuse. Ce fluide, produit par le corps ciliaire situé derrière l'iris, est déversé dans la chambre postérieure avant de rejoindre la chambre antérieure en passant par la pupille. Le cristallin, lentille biconvexe, permet aux rayons lumineux de converger sur une petite zone de la rétine, la fovéa. Entre le cristallin et la rétine, la chambre vitrée contient le corps vitré. Le nerf optique permet la transmission de l'information visuelle générée par la rétine jusqu'au cerveau. La choroïde est un tissu richement vascularisé localisé entre la rétine et la sclère. (B) Représentation schématisée d'un fond d'œil. La papille optique, zone aveugle de la rétine, correspond à la tête du nerf optique. La fovéa est une petite dépression au sein de la macula et représente la zone d'acuité visuelle maximum. Des vaisseaux, issus de l'artère et de la veine centrales, tapissent et irriguent la rétine interne. D'après « L'association américaine d'ophtalmologie et de strabisme pédiatrique » et de « Reineg-Adobe Stock ».

2. L'uvée

L'uvée est composée de 3 structures, qui sont, en suivant l'axe antéro-postérieur de l'œil : l'iris, le corps ciliaire et la choroïde (Fig.1). Une des caractéristiques de l'uvée est d'être pigmentée et fortement vascularisée.

L'iris est une membrane circulaire située entre la cornée et le cristallin. Il baigne dans l'humeur aqueuse. Son degré de pigmentation et le type de pigment qu'il contient (dont l'eumélanine marron/noire et la phéomélanine rouge/jaune) déterminent la couleur des yeux d'un individu. L'iris joue le rôle de diaphragme. En effet, il est percé en son centre par un orifice, la pupille, dont le diamètre s'adapte à l'intensité lumineuse : c'est la motilité intrinsèque de l'œil. Ceci permet de contrôler la quantité de lumière qui parvient à la rétine. Plus l'intensité lumineuse est forte, plus le muscle sphincter de l'iris se contracte, ce qui réduit le diamètre pupillaire : on parle de myosis. Au contraire, lorsque l'intensité lumineuse est faible, c'est le muscle dilatateur de l'iris qui prend le relais et ouvre la pupille : on parle de mydriase. La motilité intrinsèque est déclenchée par un arc reflexe, le réflexe photomoteur.

Le corps ciliaire comprend une partie contractile, le muscle ciliaire, et une partie glandulaire, les procès ciliaires. Le muscle ciliaire est relié au cristallin par des fibres zonulaires. Sa contraction permet, en déformant le cristallin, le phénomène d'accommodation. Les procès ciliaires sont le lieu de production de l'humeur aqueuse.

La choroïde est le tissu situé entre la sclère et la rétine. Elle comprend un vaste réseau vasculaire composé d'artères, de veines et de capillaires (couche choriocapillaire). La circulation choroïdienne compte pour 85% du flux sanguin total de l'œil (Ehrlich et al., 2017). Son rôle est d'approvisionner la rétine externe en nutriments et d'éliminer les déchets métaboliques produits par cette dernière. La membrane de Bruch, partie la plus interne de la choroïde en contact avec l'épithélium pigmentaire rétinien, joue le rôle barrière de filtration semi-perméable pour les échanges choriocapillaire /rétine. Nous y reviendrons dans le paragraphe I.5.2 de ce chapitre.

3. Le cristallin

Le cristallin est localisé juste derrière l'iris. Il est en contact avec l'humeur aqueuse sur sa face antérieure et avec le vitré en postérieur (Fig.1). Avec la cornée, le cristallin constitue la seconde lentille convergente de l'œil (21 dioptries environ chez l'Homme). Il est biconvexe. La modification des rayons de courbures de ses faces, par contraction/décontraction des muscles ciliaires, est à l'origine du phénomène d'accommodation. L'accommodation correspond à la mise au point de l'œil : elle permet, en adaptant la vergence du cristallin, d'avoir une vision nette d'un objet (c'est-à-dire la convergence des rayons lumineux sur la rétine) quelle que soit la distance à laquelle il se trouve.

Une opacification du cristallin conduit à l'apparition d'une cataracte, première cause de cécité dans le monde selon l'Organisation Mondiale de la Santé. Cette pathologie oculaire, le plus souvent liée à l'âge, est traitée efficacement en remplaçant l'intérieur du cristallin par une lentille artificielle.

4. L'humeur aqueuse et le vitré

L'humeur aqueuse et le vitré sont les milieux transparents qui combler les chambres de l'œil. L'humeur aqueuse remplit la chambre antérieure, localisée entre la cornée et l'iris, et la chambre postérieure, entre l'iris et le cristallin. Le vitré remplit la chambre vitrée, entre le cristallin et la rétine (Fig. 1). L'humeur aqueuse et le vitré sont indispensables au maintien de la forme du globe oculaire. Ils participent également à la convergence des rayons lumineux jusqu'à la rétine.

4.1. Humeur aqueuse et pression intraoculaire-Notions de tonométrie

L'humeur aqueuse est composée à 98 % d'eau, dans laquelle baignent divers solutés dont des ions organiques et inorganiques, du glucose, des antioxydants, des protéines et de l'oxygène. De son lieu de production à son lieu d'élimination, la composition de l'humeur aqueuse varie au gré des transferts qui s'opèrent avec les cellules et milieux environnants (De Berardinis et al., 1966, Goel et al., 2010).

L'humeur aqueuse est produite par les procès ciliaires dans la chambre postérieure (Fig.1). Elle passe ensuite entre l'iris et le cristallin puis à travers la pupille pour se déverser dans la chambre antérieure. Elle est éliminée en continu grâce à des structures localisées au niveau du limbe, via 2 voies (Fig.2). La voie d'efflux principale fait intervenir un tissu de drainage poreux, le trabéculum, puis le canal de Schlemm et enfin les veines aqueuses et épisclérales. La seconde voie d'élimination, dite uvéo-sclérale, comprend le passage de l'humeur aqueuse à travers les muscles ciliaires, puis sa circulation dans l'espace suprachoroïdal et enfin sa sortie du globe oculaire en traversant la sclère (pour revue voir Goel et al., 2010 et Alm, 2000). Entre synthèse et élimination, le taux de renouvellement de l'humeur aqueuse est élevé : il est de $2,6 \mu\text{l}.\text{min}^{-1}$ en moyenne chez l'Homme, soit 1 % du volume de la chambre antérieure renouvelé chaque minute (Maus et Brubacker., 1999).

En plus de son rôle structural, l'humeur aqueuse est un substitut du sang pour la cornée et le cristallin qui sont avasculaires. Elle est ainsi en charge de la nutrition et de l'élimination des déchets métaboliques de ces structures oculaires. Le flux d'humeur aqueuse véhicule également un cocktail de molécules de signalisation, comme des facteurs de croissance et des cytokines, qui agissent sur les tissus environnants (Welge-Lüssen et al., 2001). Enfin, elle est indispensable au maintien de la PIO.

La PIO est générée et modulée par de nombreux facteurs internes et externes au globe oculaire. Le volume sanguin, le volume des milieux intraoculaires (humeur aqueuse et vitré) ainsi que la rigidité des enveloppes qui entourent le globe (sclère et cornée) font partis des facteurs internes. Le tonus des muscles orbitaux est un exemple de facteur externe (Murgatroyd et Bembridge., 2008). En dehors de légères fluctuations physiologiques, liées notamment au cycle jour/nuit, à l'âge et au sexe, la PIO est globalement stable. Elle s'élève à 15 mm Hg en moyenne chez l'Homme et 10 mm Hg chez le rat (Millar et Kaufman., 1995, Cabrera et al., 1999, Fourgeux et al., 2012). L'homéostasie de la PIO est principalement assurée par un ajustement du volume d'humeur aqueuse dans la chambre antérieure. Étant donné que la sécrétion d'humeur est peu régulée, c'est sa vitesse d'élimination qui est déterminante (Murgatroyd et Bembridge., 2008). Cette dernière dépend notamment de la perméabilité du trabéculum qui, grâce à ses propriétés contractiles, peut réduire ou augmenter la taille de ses pores

(Luna et al., 2012, Rao et al., 2001, Johnstone., 2014). Tout défaut dans l'élimination de l'humeur aqueuse conduit à une **élévation de la PIO**, principal facteur de risque de développer un **glaucome**.

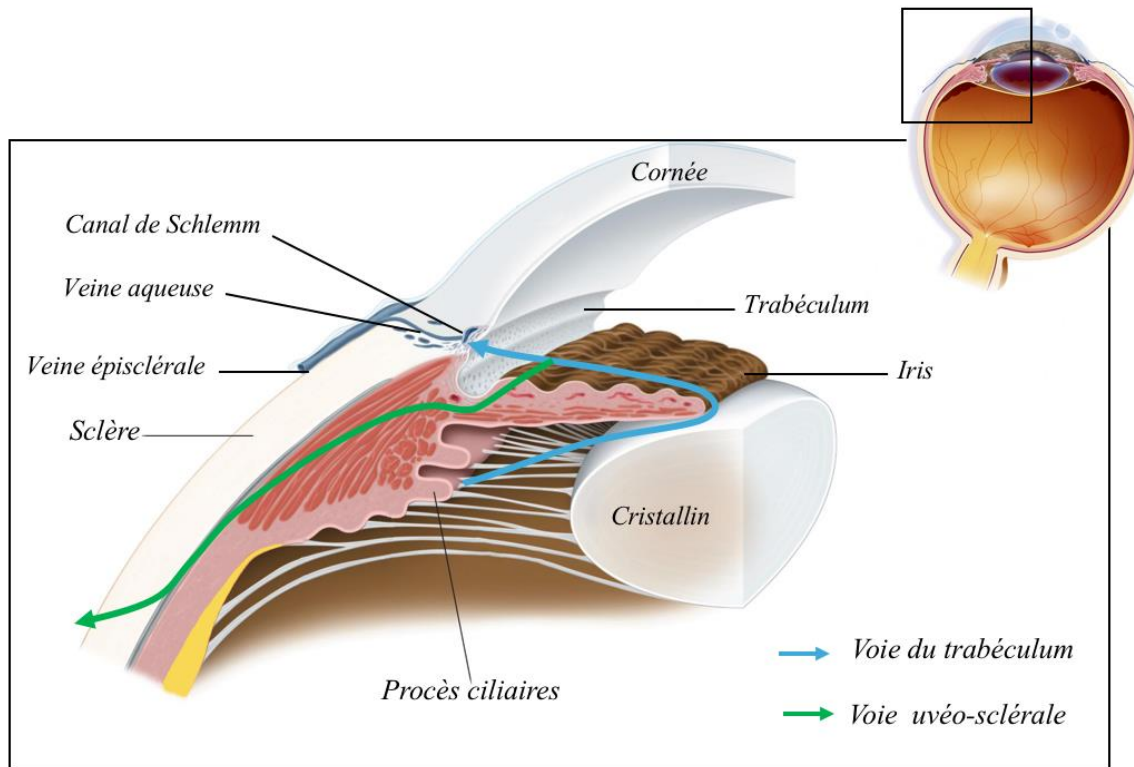


Figure 2. Voies d'élimination de l'humeur aqueuse.

D'après « the cataractcourse.com »

4.2. Le vitré

Le vitré est une substance gélatineuse composée d'un réseau de protéines fibrillaires et de glycosaminoglycanes enchâssés dans une matrice aqueuse (eau, ions, glucose, protéines solubles, oxygène,...) (Sebag, 2014). Chez les mammifères, les protéines fibrillaires appartiennent principalement à la famille des collagènes, et le glycosaminoglycane majoritaire est l'acide hyaluronique. Le vitré est essentiellement acellulaire, mais il abrite quelques hyalocytes et fibroblastes, impliqués notamment dans la synthèse des fibres protéiques et glucidiques (Halfter et al., 2008)

A l'interface entre humeur aqueuse et rétine, le vitré est un lieu d'échange : eau, ions, protéines, ... sont en effet capables de diffuser entre ces milieux (Le Goff et Bishop., 2008, Aretz et al., 2013).

Tout comme l'humeur aqueuse, le vitré exerce une pression sur les enveloppes externes de l'œil et est donc indispensable au maintien de la PIO. En revanche, son renouvellement étant lent, il n'intervient pas dans la régulation de cette dernière.

5. La rétine

La rétine est située entre la choroïde et le vitré. Elle comprend la rétine neurosensorielle et l'épithélium pigmentaire rétinien (« *retinal pigmentary epithelium* », RPE) (Fig. 3).

5.1. La rétine neurosensorielle

C'est au sein de la rétine neurosensorielle que le message lumineux, véhiculé par les photons, est transformé en message nerveux interprétable par le cerveau. De par son origine embryonnaire, la rétine neurosensorielle appartient au système nerveux central. Comme tous les tissus nerveux, elle est composée de cellules nerveuses et de cellules gliales.

5.1.1. Les cellules nerveuses

La rétine contient 5 types de cellules nerveuses qui sont les photorécepteurs, les cellules horizontales, les cellules bipolaires, les cellules amacrines et les cellules ganglionnaires (« *retinal ganglion cell* », RGC) (Fig. 3A).

D'un point de vue histologique, les cellules sont organisées en plusieurs couches. De l'extérieur de l'œil vers l'intérieur, on distingue (Fig. 3B) :

- la couche des photorécepteurs (segments externes et internes des photorécepteurs), en contact avec le RPE
- la couche nucléaire externe (corps cellulaires des photorécepteurs)
- la couche plexiforme externe (synapses photorécepteurs/cellules bipolaires)
- la couche nucléaire interne (corps cellulaires des cellules horizontales, bipolaires et amacrines, ainsi que les corps cellulaires des cellules gliales de Müller)

- la couche plexiforme interne (synapses cellules bipolaires/RGC)
- la couche des RGC (corps cellulaires des RGC)
- la couche des fibres nerveuses (axones des RGC en amont du nerf optique), en contact avec le vitré.

Cette organisation permet aux populations neuronales de communiquer successivement entre elles afin d'acheminer l'information visuelle des photorécepteurs, point de détection de la lumière et de genèse du signal nerveux, jusqu'au cerveau. Les photorécepteurs, les cellules bipolaires et les RGC relaient l'information visuelle via la libération d'un neurotransmetteur excitateur : le glutamate. Les cellules horizontales et les cellules amacrines relarguent des neurotransmetteurs inhibiteurs, GABA pour les premières et GABA ou glycine pour les secondes (Puller et al., 2014 ; Zhang et McCall, 2012).

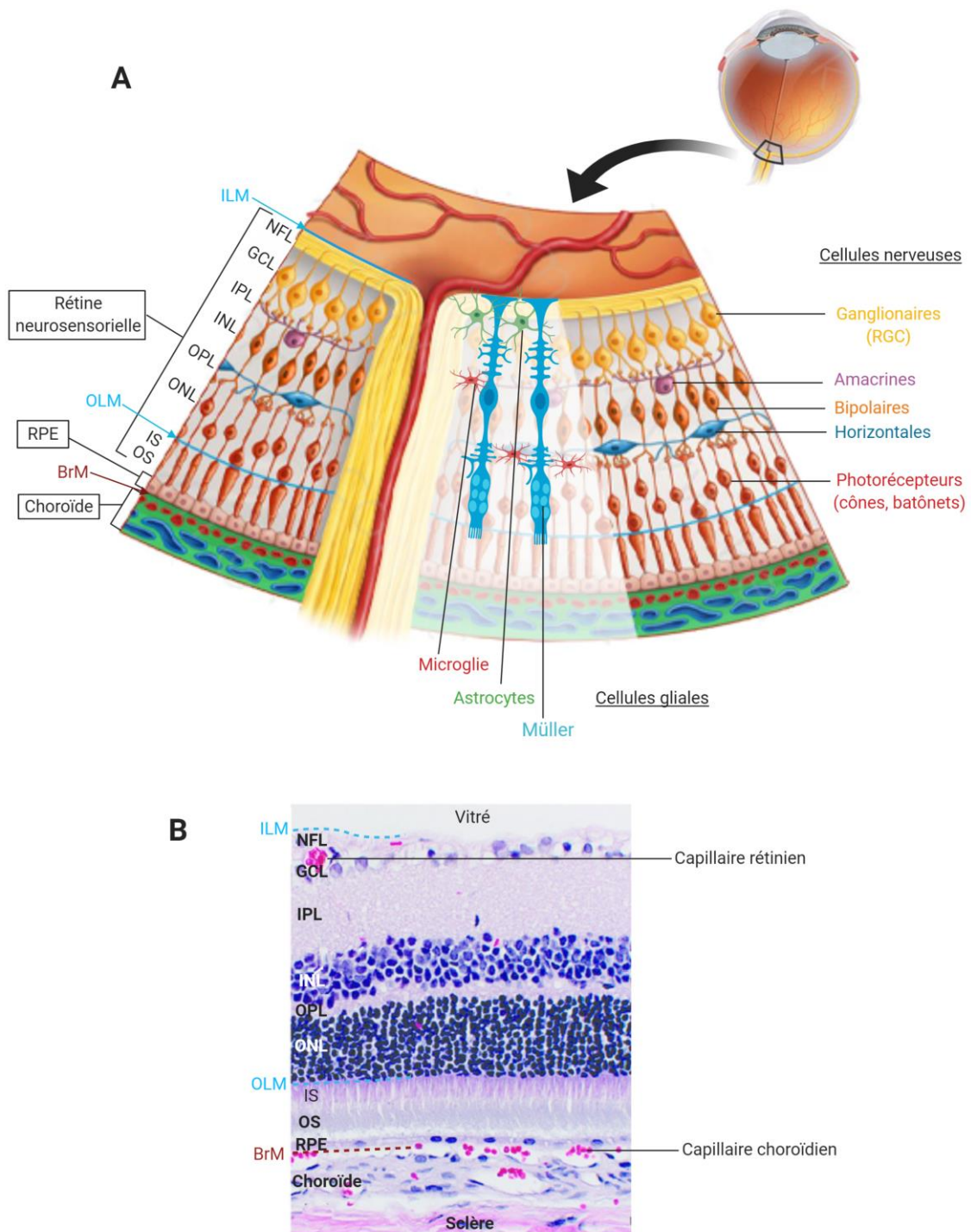


Figure 3. Anatomie de la rétine.

(A) Schéma simplifié de l'organisation cellulaire de la rétine. Illustration réalisée sur Biorender, d'après KenHub.com. (B) Coupe histologique de rétine de rat colorée à l'hématoxyline/éosine. D'après Fliesler et Bretillon., 2010.

ILM : Membrane limitante interne, NFL : couche des fibres nerveuses, GCL : couche des cellules ganglionnaires, IPL : couche plexiforme interne, INL : couche nucléaire interne, OPL : couche plexiforme externe, ONL : couche nucléaire externe, OLM : membrane limitante externe, IS : segments internes des photorécepteurs, OS : segment externe des photorécepteurs, RPE : épithélium pigmentaire rétinien, BrM : membrane de Bruch.

5.1.1.1. Les photorécepteurs

Les photorécepteurs sont les cellules rétiniennes qui assurent la transduction visuelle, c'est-à-dire la conversion des photons lumineux détectés en un signal électrique. Ce mécanisme est permis par la présence de photopigments enchâssés dans la membrane des disques, organites contenus dans les segments externes des photorécepteurs (Fig. 4). Chez tous les vertébrés, les photopigments visuels appartiennent à la famille des opsines, qui sont l'association d'un récepteur couplé aux protéines G et d'un chromophore, le 11-cis-rétinal (Terakita., 2005).

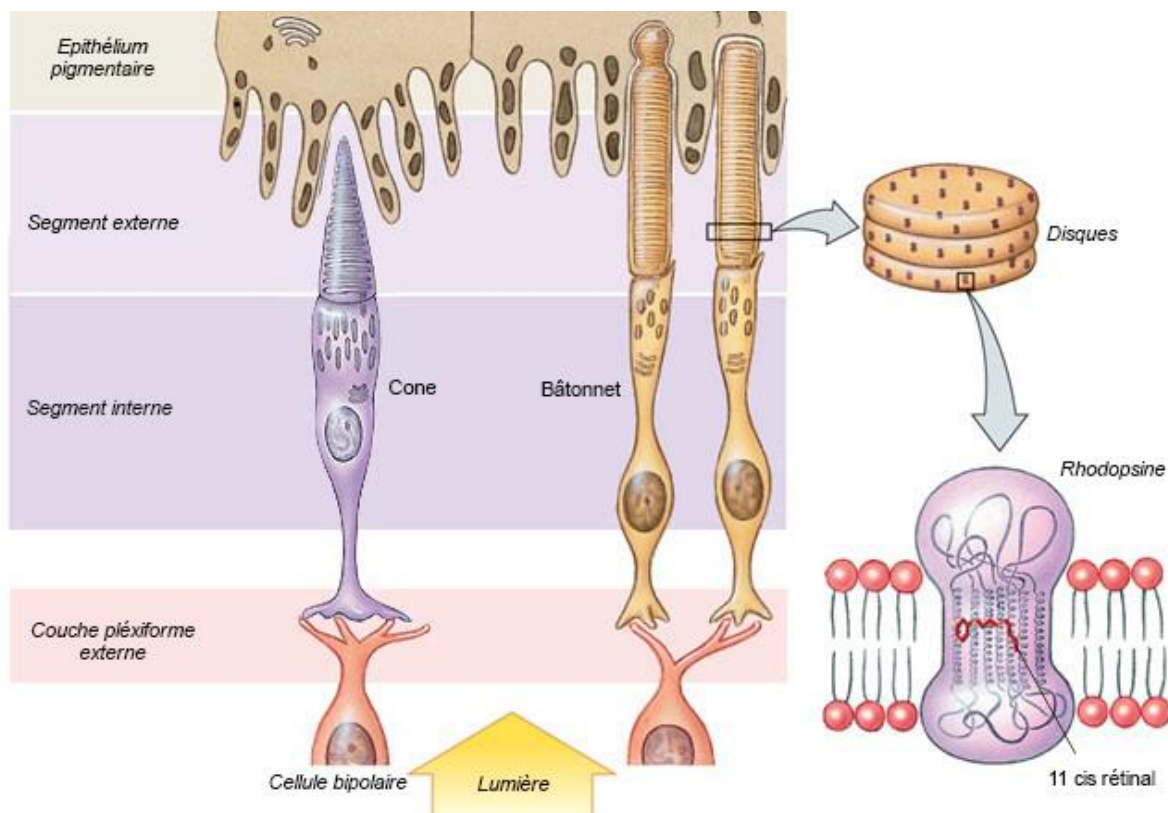


Figure 4. Structure simplifiée des photorécepteurs et d'un photopigment, la rhodopsine.

D'après Pearson Education, 2007 et Stevenson., 2010 (slidepayer.com).

La transduction visuelle

L'excitation d'un photopigment par un photon entraîne l'isomérisation du 11-cis-rétinal en all-trans-rétinal, ce qui modifie la conformation de l'opsine. Sous cette nouvelle conformation, l'opsine est dite active car capable de lier une protéine G, la transducine, et de l'activer à son tour. La cascade de signalisation qui suit, dont le second messenger est le GMP cyclique, aboutit à l'hyperpolarisation de

la membrane du photorécepteur. L'hyperpolarisation membranaire se traduit par une réduction de la libération de glutamate par le photorécepteur qui, en absence de stimulation lumineuse, relargue ce neurotransmetteur en continu et à un taux constant (Heidelberger et al., 2005). La réduction de libération de glutamate est détectée par les neurones qui font synapse avec le photorécepteur (cellules horizontales et bipolaires) et représente le codage de l'information visuelle sous forme de message neuronal.

Afin de pouvoir assurer un nouveau cycle, le système de transduction visuelle doit au final revenir à son état basal. Pour cela, la transducine et ses effecteurs sont inactivés, le taux de GMPc cytoplasmique est restauré et les photopigments sont recyclés (Burns et Arshavsky, 2005).

Les bâtonnets et les cônes

Chez la plupart des vertébrés, on distingue 2 types de photorécepteurs : les bâtonnets et les cônes. Ils contiennent un panel spécifique de molécules de phototransduction (opsines, transducine, phosphodiesterases, canaux, ...) qui leur confèrent des propriétés différentes de détection de la lumière. La spécificité cône/bâtonnet est encore amplifiée par un circuit neuronal rétinien propre à chaque type de photorécepteur.

Les bâtonnets sont responsables de la vision crépusculaire, c'est-à-dire qu'ils sont mis en jeu uniquement pour des intensités lumineuses faibles car ils sont très sensibles à la lumière (Hecht et al., 1942, Reingruber et al., 2015, Pugh., 2018). Les bâtonnets contiennent un seul type d'opsine, la rhodopsine. Ils ne permettent donc pas de discriminer les couleurs.

Les cônes sont responsables de la vision diurne. Ils ont une sensibilité 100 fois inférieure à celle des bâtonnets (Kefalov., 2012). Les opsines des cônes sont de 4 types (Terakita., 2005) : les opsines « Long Wavelength (L) sensibles au rouge, les « Middle Wavelength » (M) sensibles au vert et les « Short Wavelength » (S) sensibles aux UV (S1, absentes chez les mammifères) et au bleu (S2). Les cônes permettent ainsi une vision en couleur. Enfin, les cônes ont une meilleure résolution spatiale que les bâtonnets et assurent donc la vision de précision.

La proportion, la répartition et la densité des cônes et des bâtonnets sont différentes selon les espèces et les régions de la rétine (Viets et al., 2016). Chez la plupart des mammifères, le nombre de bâtonnets est supérieur au nombre de cônes. La dominance des bâtonnets est d'autant plus marquée chez les espèces nocturnes. A titre d'exemple, chez la souris de laboratoire la rétine contient seulement 3 % de cônes, en moyenne (Ortin-Martinez et al., 2014). La proportion de cônes est plus élevée chez les animaux diurnes, comme le porc (15 % de cônes en moyenne) et le cochon d'inde (autour de 12 %) (Peichl, 2005). Chez certaines rares espèces purement diurnes, comme l'écureuil terrestre, la rétine contient plus de cônes que de bâtonnets (Kryger et al., 1998). Le cas des primates diurnes, dont l'Homme fait partie, est particulier. Dans ces espèces, les cônes représentent seulement 5 à 7% des photorécepteurs, mais ils sont concentrés dans une zone spécialisée de la rétine, la macula (Fig.1) (Ahnelt et Kolb, 2000). Au centre de la macula, une petite dépression nommée fovéa ne contient que des cônes. Il s'agit donc de la zone où l'acuité visuelle est la plus forte.

5.1.1.2. Les cellules bipolaires

Les cellules bipolaires sont les neurones qui relaient l'influx nerveux, issu des photorécepteurs, aux RGC (pour revue voir Euler et al, 2014) (Fig. 3).

Chaque cellule bipolaire reçoit des informations de plusieurs photorécepteurs, mais d'un seul type, cônes ou bâtonnets, (Dunn et Wong, 2014). La fovéa fait exception, puisque dans cette zone de la rétine chaque bipolaire est connectée à un seul photorécepteur, cône en l'occurrence (Kolb et Dekorver, 1991).

Le codage de l'information visuelle par les cellules bipolaires est complexe. Il dépend notamment de la quantité de lumière reçue par les photorécepteurs et met en jeu des cellules bipolaires ON, qui sont dépolarisées lors d'une exposition à la lumière, et des cellules bipolaires OFF, qui sont au contraire activées dans l'obscurité. (Hartveit, 1997).

Sur la base de leur morphologie et de différents marqueurs protéiques, douze types de cellules bipolaires ont été identifiés chez la souris (Wässle et al, 2009). Des études sont en cours pour comprendre leurs rôles spécifiques (Euler et al, 2014).

5.1.1.3. Les cellules horizontales et les cellules amacrines

Les cellules horizontales et les cellules amacrines sont deux types cellulaires qui modulent le signal nerveux transmis aux cellules bipolaires et aux RGC, afin d'augmenter l'acuité de l'information visuelle qui sera acheminée vers le cerveau. Plus précisément, les cellules horizontales agissent au niveau des synapses entre les photorécepteurs et les cellules bipolaires alors que les cellules amacrines agissent au niveau des contacts entre les cellules bipolaires et les RGC (Puller et al., 2014, Zhang et McCall, 2012) (Fig. 3). Les cellules horizontales procèdent notamment au phénomène d'inhibition latérale, c'est-à-dire qu'elles suppriment l'influx nerveux issu des photorécepteurs localisés en périphérie de la cellule bipolaire dont elles sont en charge (Kramer et Davenport., 2015). Le principe est similaire pour les cellules amacrines (Yeonan-Kim et Bertalmío, 2016).

Sur la base de critères morphologiques, deux types de cellules horizontales (Boije et al., 2016) et une trentaine de types de cellules amacrines (MacNeil et Masland, 1998, MacNeil et al., 1999) ont classiquement été décrits chez les mammifères.

5.1.1.4. Les cellules ganglionnaires (RGC)

Les RGC sont les neurones qui relaient l'information visuelle de la rétine au cerveau. Dans la rétine, ils sont en connexion avec les cellules bipolaires et les cellules amacrines. Leurs axones circulent dans la couche des fibres nerveuses et se regroupent à l'arrière du globe, au niveau de la papille, pour former le nerf optique (Figs. 3 et 5).

Une multitude de types de RGC aux fonctions spécifiques

On distingue plusieurs types de RGC selon leurs caractéristiques morphologiques (arborisation dendritique), électrophysiologiques et moléculaires (expression de marqueurs spécifiques). Ces caractéristiques confèrent aux populations de RGC une sensibilité différente aux stimuli visuels, ce qui augmente encore la précision du message transmis au cerveau.

Chez l'Homme les recherches sont récentes et l'identification des types de RGC encore à ses débuts (Langer et al., 2018). Chez les primates, les spécialistes s'accordent à penser qu'il en existerait plus d'une vingtaine (Field et Chichilnisky., 2007).

Chez la souris, plus de 30 types ont déjà été identifiés (Baden et al., 2016 ; Sanes et Masland, 2015). Parmi les RGC majoritaires, on trouve par exemple les DSGC ON-OFF (375 cellules/mm² en moyenne sur la rétine), les Mini-J (350 cellules/mm²) et les JAM-B (200 cellules/mm²). Les JAM-B ont été identifiées comme la population de RGC exprimant la protéine de jonction JAM-B. Elles sont caractérisées par une arborisation dendritique asymétrique. Ce sont des RGC-OFF, c'est-à-dire qu'elles sont mises en jeu lors d'une diminution de l'intensité lumineuse. Les JAM-B sont impliquées dans la détection des mouvements ascendants dans le champ visuel. Parmi les RGC en nombre plus minoritaire, nous pouvons citer les RGCip (60 cellules/mm²) et les RGCα (40 cellules/mm²). Grâce à l'expression d'un photopigment, la mélanopsine, les RGCip sont intrinsèquement photosensibles, c'est-à-dire qu'elles sont directement stimulées par la lumière. La plupart de ces cellules projettent dans des aires cérébrales qui n'assurent pas la formation d'image et sont impliquées dans la régulation du rythme circadien et la mise en place du réflexe photomoteur de la pupille.

Distribution topographique et marqueurs des RGC

La distribution topographique des RGC sur la rétine est généralement étudiée par marquage des cellules sur rétine mise à plat, ou *flatmount*. Nous reparlerons ultérieurement de cette technique et des différents marqueurs des RGC disponibles (page 65).

Chez le rongeur, l'utilisation de marqueurs généraux des RGC, comme la protéine Brn3a, a permis de montrer que la distribution topographique de ces cellules n'est pas homogène (Nadal-Nicolás et al., 2009, Salinas-Navarro et al., 2009b). Le nombre de RGC est élevé dans la rétine centrale, plus particulièrement du côté dorsal le long de l'axe naso-temporal (densité maximale ≥ 3500 RGC/mm²). Leur abondance décroît régulièrement en allant vers la périphérie.

Chez l'Homme, la densité de RGC est également plus élevée au centre de la rétine qu'en périphérie. Le maximum est atteint dans une ellipse entourant la fovéa (35000 RGC/ mm²) (Curcio et

Allen., 1990), où chaque RGC reçoit les informations issues d'un seul cône : on parle de convergence minimum du signal visuel (Kolb et Dekorver., 1991).

La distribution topographique des différents types de RGC est encore peu documentée dans la littérature et ne sera pas détaillée dans ce manuscrit.

La papille optique et la lame criblée

Les axones des RGC forment la couche des fibres nerveuses. Ils convergent vers la papille optique, ou tête du nerf optique, qui correspond à la zone de liaison intraoculaire avec le nerf optique. A cet endroit, la sclère est interrompue et remplacée par une structure poreuse traversée par les fibres nerveuses, la lame criblée. Elle correspond à un tissu conjonctif élastique contenant des cellules gliales (astrocytes) et des microvaisseaux (Morrison et al., 1989, Elkington et al., 1990). La lame criblée a un rôle de soutien mécanique et fonctionnel pour les axones en transit vers le nerf optique. Des orifices centraux plus larges assurent le passage de l'artère et de la veine centrale de la rétine.

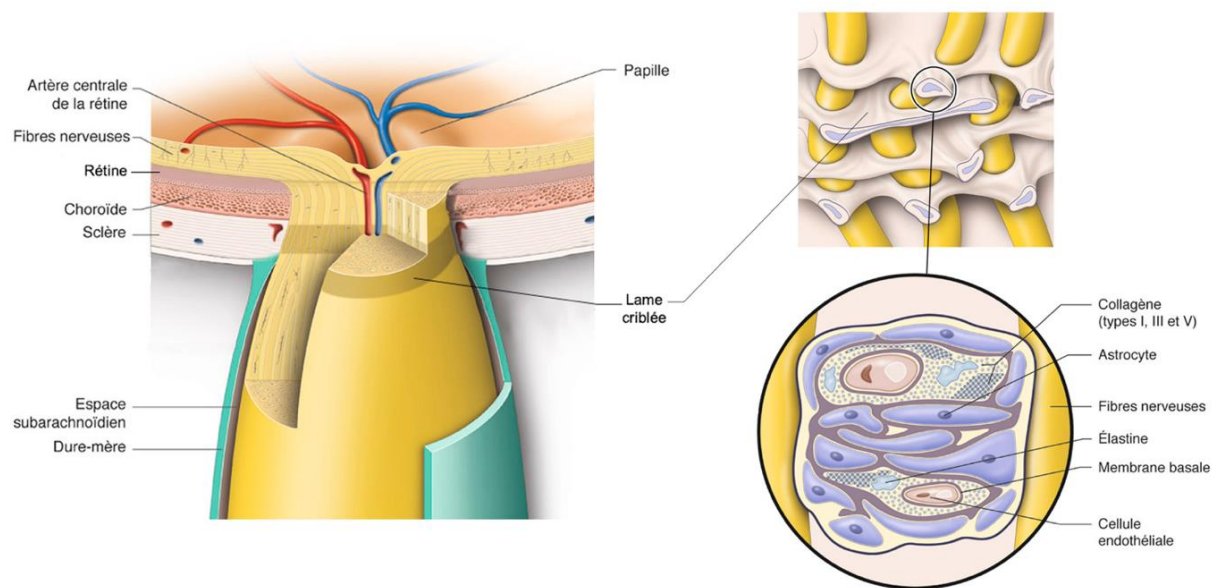


Figure 5. Anatomie simplifiée de la tête du nerf optique et de la lame criblée.

La pie-mère, couche protectrice du nerf optique en contact avec les fibres nerveuses n'est pas représentée.

D'après la « Société française d'ophtalmologie (SFO)».

Le nerf optique et les connexions cérébrales

Le nerf optique est composé de l'ensemble des axones des RGC, myélinisés pour augmenter la vitesse de conduction de l'information visuelle, et est enveloppé dans une gaine protectrice, les méninges. La dure-mère est l'enveloppe la plus externe des méninges, en continuité avec la sclère. La pie-mère est la couche la plus interne et l'arachnoïde la couche médiane. L'espace entre la pie-mère et l'arachnoïde est rempli de liquide céphalorachidien, qui joue notamment le rôle d'amortisseur des chocs.

En plus de conduire le message visuel, les axones des RGC (et donc le nerf optique) sont un lieu d'échange d'organites et de macromolécules entre le corps cellulaire, les bourgeons synaptiques et l'aire cérébrale dans laquelle ils projettent. Les macromolécules concernées sont notamment des facteurs neurotrophiques essentiels à la survie des RGC. Les flux sont bidirectionnels : ils sont antérogrades (depuis le corps cellulaire) et rétrogrades (vers le corps cellulaire).

Le nerf optique, après un trajet intra-orbitaire, pénètre dans le secteur crânien par le canal optique. Il rejoint ensuite le chiasma optique situé sur la face ventrale du cerveau. Le chiasma optique est le lieu de rencontre des fibres nerveuses du nerf optique de l'œil droit et de celles du nerf optique de l'œil gauche. Certains axones se croisent et projettent dans l'aire cérébrale opposée (projections controlatérales) et d'autres projettent dans l'aire située du même côté que l'œil dont elles sont issues (projections ipsilatérales).

Au final, les axones des RGC se terminent dans le corps genouillé latéral du thalamus et/ou dans le colliculus supérieur du tronc cérébral (Dhande et Huberman, 2014, Ellis et al., 2016). L'information est ensuite transmise à d'autres régions du cerveau, comme les cortex visuels primaire et secondaire. Les RGCip, qui ne sont pas responsables de la transmission d'une information nécessitant la formation d'images, projettent principalement dans le noyau suprachiasmatique de l'hypothalamus (régulation du rythme circadien) et dans les noyaux de l'aire prétéctale du tronc cérébral (réflexe pupillaire) (Dhande et Huberman, 2014).

5.1.2. Les cellules gliales

La glie rétinienne comprend des cellules macrogliales, cellules de Müller et astrocytes, ainsi que des cellules microgliales. Ces cellules communiquent entre elles de façon coordonnée, afin de soutenir la fonction neuronale et de maintenir l'homéostasie de la rétine en condition physiologique et pathologique.

5.1.2.1. Les cellules de Müller

Les cellules de Müller constituent 90% de la macroglie rétinienne (Vecino et al., 2016), le reste étant représenté par les astrocytes.

Morphologie des cellules de Müller

Les cellules de Müller traversent entièrement la neurorétine, en s'étendant de la couche des fibres nerveuses (axones des RGC) à la couche nucléaire externe (corps cellulaires des photorécepteurs) (Fig. 3A). La morphologie des cellules de Müller est similaire chez tous les vertébrés. Elle présente néanmoins quelques variations, de taille notamment, entre les espèces mais aussi entre les zones topographiques de la rétine (rétine centrale ou périphérique) (Reichenbach et Bringmann, 2010).

Au sein des couches rétinienne, les cellules de Müller émettent de petits prolongements, les procès lamellaires, qui entourent les corps cellulaires des neurones et les vaisseaux. Côté vitré, elles développent une structure nommée pied qui assure les échanges avec ce milieu. D'une cellule à une autre, les pieds sont contigus et constituent la membrane limitante interne de la rétine. Face à l'espace sous rétinien, les prolongements apicaux des cellules de Müller sont attachés aux segments internes des photorécepteurs, formant ainsi la membrane limitante externe (Fig. 9). En plus des jonctions d'adhérence, la membrane limitante externe posséderait des jonctions serrées, faisant de cette structure une barrière sélective (Omri et al., 2010). Sur leur pôle apical, les cellules de Müller arborent un ensemble de microvillosités propices aux échanges avec les segments externes des photorécepteurs et le RPE qui fait face aux vaisseaux choroïdiens.

Ainsi, d'une part les cellules de Müller établissent des relations très étroites, presque symbiotiques, avec les neurones des différentes couches rétinienne (Bringmann et al., 2006) et, d'autre part, elles sont en contact avec les milieux d'échange qui sont les capillaires sanguins de la rétine, le vitré et l'espace sous-rétinien.

Des cellules au service des neurones

Chaque cellule de Müller constitue, avec les neurones auxquels elle est associée, une unité fonctionnelle (Fig. 6) : les neurones assurent la transduction visuelle et la cellule de Müller permet que toutes les conditions soient réunies pour le bon fonctionnement des neurones (Reichenbach et Bringmann, 2010). Dans ce but, les cellules de Müller exercent des rôles nombreux et variés.

Une des principales fonctions des cellules de Müller est d'assurer et réguler des échanges entre la rétine et les milieux environnants, c'est-à-dire la circulation sanguine et le vitré. Ainsi, les cellules de Müller servent de support métabolique aux neurones, en leur apportant des substrats énergétiques (glucose, lactate) et en éliminant leurs déchets (Tsacopoulos et Magistretti, 1996). Elles contribuent également à l'homéostasie du milieu extracellulaire, notamment par le maintien de l'équilibre hydrique (via l'Aquaporine 4) et potassique (via les canaux Kir 4.1), ainsi que par le recyclage du glutamate (via les transporteurs EAAT1/2 et l'enzyme Glutamine synthétase) (Bringmann et al., 2006). Les échanges se font en fonction de la perméabilité des membranes limitantes interne et externe, ainsi que de celle des barrières-hémato-rétiniennes, dont la formation et le maintien dépendent des cellules de Müller (Tout et al., 1993, Constable et Lawrenson, 2009). Les cellules de Müller sont également impliquées dans la modulation du tonus des capillaires rétiens, via le relargage de molécules vasoactives. Ceci permet d'adapter le flux sanguin qui parvient à la rétine interne en fonction de l'activité neuronale (Newman, 2015).

En plus de recapter le glutamate, neurotoxique en excès, et de fournir aux neurones les précurseurs des neurotransmetteurs, les cellules de Müller sont capables de libérer des gliotransmetteurs (Newman, 2015), modulant ainsi la transmission synaptique.

En outre, les cellules de Müller synthétisent des facteurs neurotrophiques, des facteurs de croissance ainsi que des cytokines essentielles à la survie des neurones et à la croissance axonale. Il s'agit par exemple du brain-derived neurotrophic factor (BDNF), du ciliary neurotrophic factor (CNTF) et du basic fibroblast growth factor (Vecino et al., 2016).

La rétine est un tissu très exposé à l'oxydation, notamment de par sa forte consommation en dioxygène et la peroxydation lipidique causée par l'exposition lumineuse (Handelman et Dratz, 1986). Les cellules de Müller participent à la lutte contre le stress oxydatif, via notamment la synthèse d'antioxydants comme la glutathionne (Pow et Crook, 1995).

Elles sont également en charge du recyclage des photopigments, mécanisme indispensable pour que la transduction visuelle puisse avoir lieu, grâce à l'enzyme *cellular retinaldehyde-binding protein* (CRALBP).

Par ailleurs, les cellules de Müller sont un soutien physique de l'architecture tissulaire de la rétine. Il est également connu qu'elles guident les rayons lumineux de la surface de la rétine jusqu'aux photorécepteurs, jouant ainsi le rôle de fibres optiques vivantes (Franze et al., 2007, Reichenbach et Bringmann, 2013).

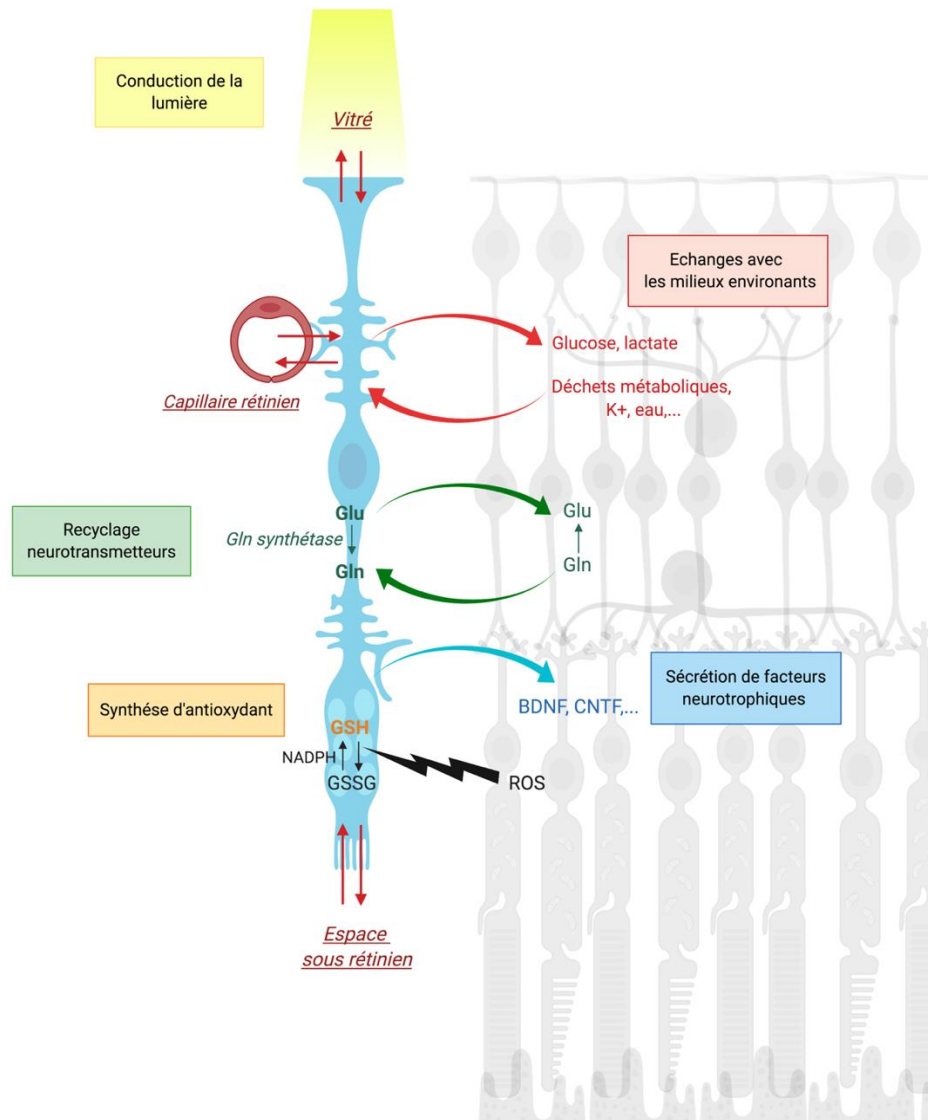


Figure 6. Principales fonctions assurées par les cellules de Müller.

Glu : glutamate, *Gln* : glutamine, *GSH* : glutathionne réduite, *GSSG* : glutathionne oxydée, *NADPH* : nicotinamide adenine dinucleotide phosphate. Illustration réalisée sur le site Biorender.

Marqueurs des cellules de Müller

Les protéines couramment utilisées comme marqueurs des cellules de Müller sont :

- Les protéines des filaments intermédiaires, c'est-à-dire la *glial fibrillary acidic protein* (GFAP), la vimentine et la nestine. Ces protéines marquent également les astrocytes. Leur expression est faible en condition basale, mais elles sont fortement surexprimées en cas de gliose.
- Les enzymes glutamine synthétase et CRALBP, le transporteur du glutamate EAAT1, les canaux potassiques Kir 4.1 et l'Aquaporine 4. Ils sont tous spécifiquement exprimés par les cellules de Müller (Vecino et al., 2016).

5.1.2.2. Les astrocytes

Les astrocytes sont le second type de cellules macrogliales de la rétine. Ils résident principalement dans la couche des fibres nerveuses et la couche nucléaire interne, où ils co-localisent avec les vaisseaux. Ils sont également présents tout le long du nerf optique. Comme les cellules de Müller, les astrocytes constituent une interface entre les vaisseaux et les neurones (Vecino et al., 2016).

Le réseau astrocytaire forme une trame indispensable au développement du réseau vasculaire rétinien (Fruttiger, 2002, Stone et Dreher, 1987). Les astrocytes sont également essentiels pour la formation et le maintien des barrières hémato-rétiniennes. Ils possèdent de nombreux autres rôles en commun avec les cellules de Müller, tels que la production de facteurs neurotrophiques et la régulation de l'équilibre hydrique.

5.1.2.3. Les cellules microgliales

Les cellules microgliales sont les cellules immunitaires résidentes de la rétine. Ce sont des cellules très ramifiées, de petite taille comme leur nom l'indique. A l'état quiescent elles sont, chez le rat, localisées principalement dans les couches plexiformes. Chez les primates, elles se trouvent également dans la couche nucléaire externe, la couche des RGC et la couche des fibres nerveuses. (Chen et al., 2002).

Les cellules microgliales jouent un rôle crucial dans la lutte contre les pathogènes, elles surveillent en permanence l'intégrité de leur micro-environnement rétinien. Ces cellules présentent à la fois des caractéristiques de macrophages, comme la phagocytose, et de cellules présentatrices d'antigènes (Li et al., 2015). A l'instar des cellules macrogliales, la microglie synthétise des facteurs neurotrophiques et anti-inflammatoires. Enfin, les cellules microgliales sont essentielles au maintien de la structure et de la fonctionnalité des synapses (Wang et al., 2016).

5.1.2.4. La gliose rétinienne

Tout dommage de la rétine est suivi de l'activation des cellules gliales, ou gliose. Le but est de préserver au maximum l'intégrité rétinienne en favorisant la survie neuronale, la restauration des homéostasies et la réparation tissulaire.

D'un point de vue morphologique, la gliose se traduit par une hypertrophie des cellules de Müller et des astrocytes. Les cellules microgliales perdent leurs ramifications et prennent une forme dite amiboïde. Elles sont également capables de migrer dans les couches rétinienne endommagées.

D'un point de vue fonctionnel, la gliose se traduit par une intensification des rôles déjà assurés par les cellules gliales, comme par exemple une augmentation de la sécrétion des facteurs neuroprotecteurs. Dans plusieurs modèles de lésions rétinienne dommageables pour les RGC (glaucome, pincement du nerf optique) il a été montré que l'activation de la macroglie est favorable à la régénération axonale, sans doute via l'expression de divers facteurs trophiques (Lorber et al., 2012, Ahmed et al., 2010, Lorber et al., 2009). La gliose permet également l'expression de nouvelles fonctions par les cellules gliales. Par exemple, certaines cellules de Müller sont capables de se différencier en cellules souches rétinienne, de migrer sur le site de l'agression et de régénérer une partie des neurones perdus. Cependant, ce potentiel de transdifférenciation des cellules de Müller en neurones diffère selon les espèces : il est élevé chez les poissons (Wu et al., 2001, Fausett et Goldman, 2006) mais plus limité chez les oiseaux et les mammifères (Wilken et Reh, 2016).

Certaines des réponses mises en place au cours de la gliose sont dites spécifiques car elles dépendent du stress subi. Selon les cas, la glutamine synthétase est ainsi sur ou sous-exprimée dans les cellules de Müller. En cas de perte rapide des photorécepteurs, qui représentent la majorité des neurones glutamatergiques, l'expression de la glutamine synthétase est diminuée. Elle est au contraire augmentée au cours de pathologies entraînant l'accumulation d'ammoniaque dans la rétine (Bringmann et al., 2009). Certaines réponses sont dites non spécifiques car elles surviennent quelle que soit le type d'agression. Il s'agit par exemple de la surexpression des protéines des filaments intermédiaires dans les cellules macrogliales, indispensable pour l'hypertrophie cellulaire et qui est

considérée comme un marqueur d'activation de ces cellules (Bignami et Dahl, 1979, Bringmann et Reichenbach, 2001).

La gliose n'est pas toujours positive pour la survie des neurones. Si à court terme elle est neuroprotectrice, elle est au contraire délétère lorsque maintenue dans le temps, comme au cours de pathologies neurodégénératives chroniques (glaucome, dégénérescence maculaire liée à l'âge,...). Prenons l'exemple des cellules de Müller. La dé-différentiation d'un petit nombre de cellules en progéniteurs neuronaux est positive pour la régénération tissulaire. En revanche, si la gliose persiste et qu'un nombre important de cellules de Müller n'assure plus ses fonctions, l'homéostasie rétinienne est compromise. De surcroît, les cellules acquièrent des fonctions nocives, comme la sécrétion de glutamate, la libération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et la synthèse de facteurs pro-inflammatoires (*tumor necrosis factor alpha* (TNF α), *monocyte chemoattractant protein 1*,...). Enfin, les cellules dédifférenciées possèdent des capacités prolifératives accrues et prennent la place des neurones mourants : il y a formation d'une cicatrice gliale qui empêche toute régénération neuronale (Bringmann et al., 2009).

5.2. L'épithélium pigmentaire rétinien

Le RPE est un épithélium monostratifié composé de cellules cuboïdes pigmentées. Le pôle apical des cellules fait face à l'espace sous-rétinien et à la membrane limitante externe de la neurorétine. Il présente un ensemble de microvillosités entourant les segments externes des photorécepteurs. Côté basal, les cellules reposent sur la membrane de Bruch, elle-même en contact avec les capillaires choroïdiens. Latéralement, les cellules du RPE sont jointives grâce aux **jonctions serrées** qui assurent la cohésion entre leurs membranes (Rizzolo, 2007).

Le RPE exerce des rôles essentiels au fonctionnement de la rétine (Fig. 7). Tout d'abord, il s'agit d'une zone d'échange entre la neurorétine et les capillaires choroïdiens, hautement sélective de par l'étanchéité des jonctions serrées qui existent entre les cellules. Le RPE constitue de ce fait la **barrière hémato-rétinienne externe** (voir paragraphe I.6.3, page 48). Il est également impliqué dans la protection de la rétine contre la photooxydation via l'absorption de la lumière grâce aux pigments

qu'il contient, via la synthèse d'antioxydants comme la superoxyde dismutase et via sa participation au renouvellement des segments externes des photorécepteurs (Simó et al., 2010). Une autre fonction du RPE est d'assurer le recyclage du all trans-retinal en 11-cis-retinal, processus essentiel au cycle visuel des photorécepteurs. Enfin, les cellules épithéliales synthétisent des facteurs de croissance, comme le *pigment epithelium-derived growth factor (PEDF)*, indispensables à la survie des photorécepteurs (Strauss, 2005).

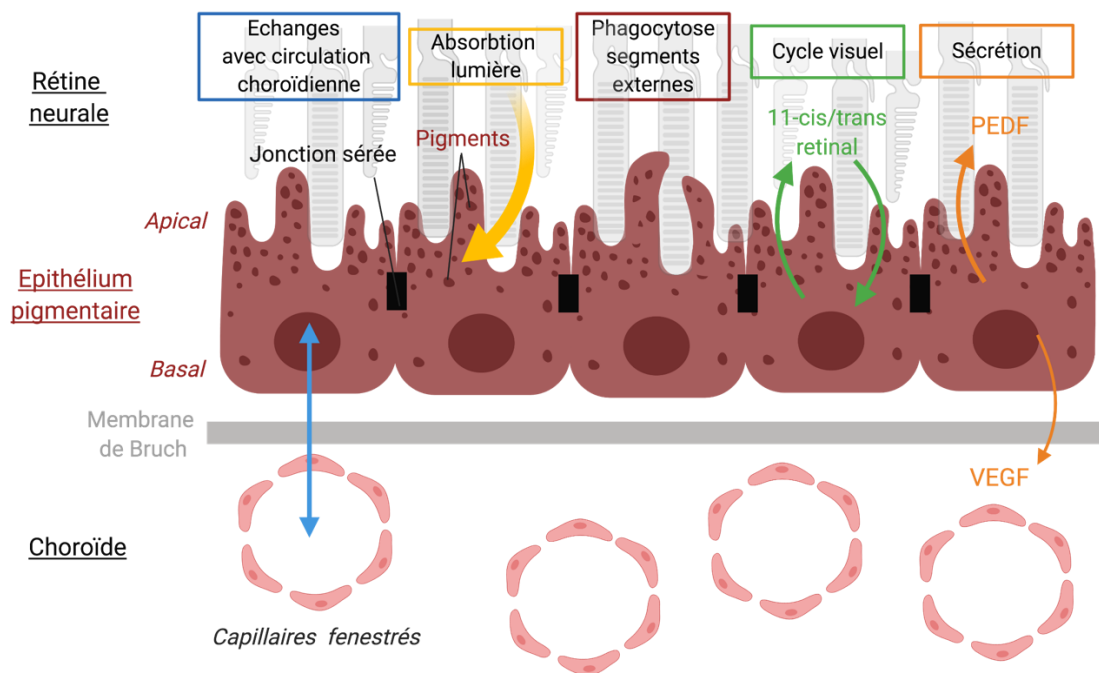


Figure 7. Principaux rôles de l'épithélium pigmentaire rétinien.

Illustration réalisée avec Biorender, d'après Straus., 2005.

6. Réseaux vasculaires et barrière hémato-rétinienne

Dans ce chapitre, nous allons présenter exclusivement les systèmes vasculaires qui irriguent la rétine. Chez la plupart des mammifères, il s'agit du réseau vasculaire **rétinien** et du réseau vasculaire **choroïdien** (Selvam et al., 2018).

6.1. Le réseau vasculaire rétinien

Le réseau vasculaire rétinien comprend un ensemble de capillaires qui irriguent la rétine **interne**, de la couche des fibres nerveuses à la couche plexiforme externe. On distingue le réseau capillaire superficiel qui parcourt la couche des fibres nerveuses et la couche des RGC, le réseau capillaire intermédiaire localisé dans la couche plexiforme interne et le réseau capillaire profond dans la couche plexiforme externe (Pi et al., 2018). Le réseau profond est relié au réseau intermédiaire, lui-même connecté au réseau superficiel par des anastomoses verticales (Fig. 8). Le réseau superficiel est relié à la circulation générale par des artérioles issues de l'artère centrale de la rétine et par des veinules qui se déversent dans la veine centrale de la rétine. L'artère et la veine centrales cheminant au centre du nerf optique, émergent du globe oculaire au niveau de la papille optique (Fig. 1).

Une des caractéristiques des capillaires rétiniens est d'être continus, c'est-à-dire qu'il n'y a pas de pores entre les cellules endothéliales. Cette structure particulière leur confère le rôle de barrière hémato-rétinienne interne. Une autre particularité de la circulation rétinienne est qu'elle n'est pas innervée par le système nerveux autonome. La régulation du flux sanguin met en jeu d'autres mécanismes, comme le tonus myogénique des péricytes et des cellules musculaires lisses vasculaires (Kur et al., 2012).

6.2. Le réseau vasculaire choroïdien

Le réseau vasculaire choroïdien assure l'irrigation de la rétine **externe**, c'est-à-dire la couche nucléaire externe et la couche des photorécepteurs, ainsi que celle du RPE. Plus on s'éloigne de la sclère, plus le diamètre des vaisseaux choroïdien diminue pour former, au contact de la membrane de

Bruch, un réseau de capillaires fenestrés propices aux échanges avec le RPE (Chen et al., 2016) (Fig.8).

Le réseau choroïdien est alimenté par les artères ciliaires, puis le sang est drainé par les veines vorticeuses et la veine ciliaire postérieure (Bhutto et Amemiya., 2001). Les vaisseaux choroïdiens sont richement innervés par les systèmes sympathique et parasympathique qui assurent la régulation du flux sanguin (Reiner et al., 2018). La choroïde présente d'ailleurs un débit sanguin parmi les plus élevés de l'organisme.

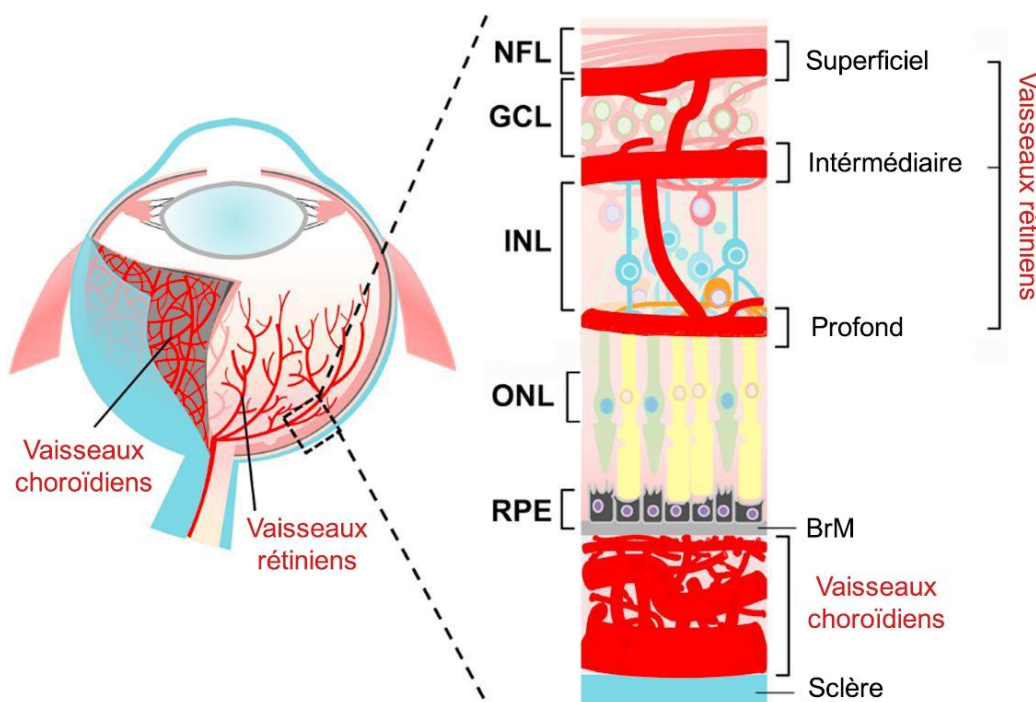


Figure 8. Réseaux vasculaires rétiniens et choroïdiens

Le réseau vasculaire rétinien assure principalement l'irrigation de la rétine interne. Il est organisé en trois couches : les vaisseaux superficiels parcourent la couche des fibres nerveuses (NFL) et les vaisseaux intermédiaires et profonds bordent, de chaque côté, la couche nucléaire interne (INL). Le réseau vasculaire choroïdien, localisé entre l'épithélium pigmentaire rétinien (RPE) et la sclère, permet quant à lui d'irriguer la portion externe de la rétine.

NFL : Couche des fibres nerveuses, GCL : couche des cellules ganglionnaires, INL : couche nucléaire interne, ONL : couche nucléaire externe, RPE : Épithélium pigmentaire rétinien, BrM : Membrane de Bruch.

D'après Chen et al., 2016

6.3. Les barrières hémato-rétiniennes

Les barrières hémato-rétiniennes sont des structures semi-perméables qui régulent les échanges entre le sang et la rétine (Cunha-Vaz et al., 2011). Elles sont composées d'acteurs rétiniens localisés à l'interface sang-rétine, dont les cellules sont jointives grâce à la présence de jonctions serrées (Fig. 9). La **barrière hémato-rétinienne externe** correspond au RPE qui régule les échanges entre la circulation choroïdienne et l'espace sous-rétinien. Elle inclut également la membrane de Bruch, matrice extracellulaire localisée entre le RPE et la choroïde, qui se comporte comme un tamis moléculaire (Booij et al., 2010). Des études suggèrent que la membrane limitante externe, formée par les prolongements apicaux des cellules de Müller, est aussi une composante de la barrière hémato-rétinienne externe (Omri et al., 2010) (cf. paragraphe 1.5.1.2.1, page 38). La **barrière hémato-rétinienne interne** est structurellement proche de la barrière hémato-encéphalique. Elle correspond à l'endothélium continu des capillaires rétiniens et régule donc les échanges vis-à-vis de la circulation rétinienne. Les péricytes et la macroglie, dont les prolongements entourent les capillaires rétiniens, font également partie intégrante de la barrière hémato-rétinienne interne et sont indispensables à la formation et au maintien de l'intégrité de cette dernière (Trost et al., 2016 ; Tout et al., 1993) (Fig. 9).

Les échanges de molécules et de cellules à travers les barrières hémato-rétiniennes se font selon deux modalités. La voie paracellulaire correspond aux flux passant entre les cellules adjacentes. La perméabilité de cette voie est fortement limitée par les jonctions serrées qui lient les cellules des barrières hémato-rétiniennes (Anderson et Van Itallie, 2009). La voie transcellulaire, c'est-à-dire à travers le cytoplasme des cellules, s'opère de manière plus ou moins sélective selon les composés. Pour les petites molécules lipophiles, le transport a lieu par diffusion passive. Pour les autres composés, il dépend de l'expression de protéines spécifiques (transporteurs, récepteurs, pompes ioniques,...) à la membrane des cellules composant les barrières hémato-rétiniennes (Díaz-Coránguez et al., 2017). Le RPE et les cellules endothéliales des capillaires rétiniens expriment, par exemple, le transporteur GLUT-1 qui permet le transport du glucose de la circulation sanguine vers la rétine (Kumagai et al., 1994, Harik et al., 1990). Nous reviendrons ultérieurement sur la sélectivité des

barrières hémato-rétiniennes vis-à-vis des lipoprotéines plasmatiques impliquées dans le transport du cholestérol.

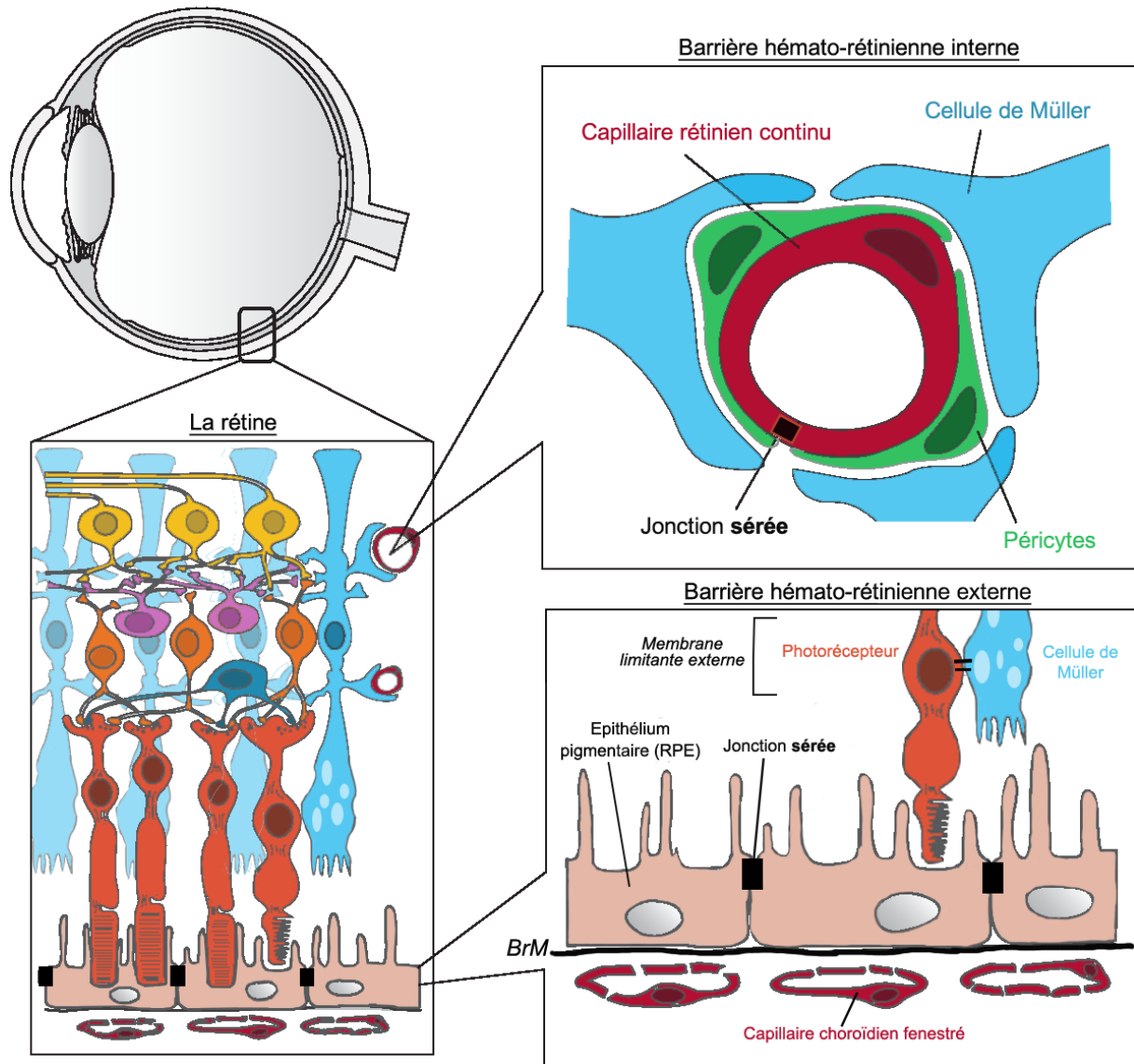


Figure 9. Les barrières hémato-rétiniennes interne et externe.

BrM : membrane de Bruch

D'après Hosoya et al., 2011

II. Le glaucome, maladie neurodégénérative de la rétine

Le glaucome est la première cause de cécité irréversible dans le monde, selon l'Organisation Mondiale de la Santé. Le nombre d'adultes âgés de 40 à 80 ans affectés par la maladie était estimé à 64,3 millions en 2013 et devrait atteindre 76 millions en 2020 (Tham et al., 2014). Le terme glaucome regroupe un ensemble de pathologies oculaires caractérisées par la dégénérescence des cellules ganglionnaires de la rétine (RGC) et de leurs axones, associées à des altérations typiques du nerf optique. Le glaucome est une maladie chronique dont la progression s'effectue en général sur plusieurs années. Pour le patient, la maladie se traduit par une réduction progressive du champ de vision périphérique, la vision centrale étant préservée jusqu'à un stade très avancé de la maladie (Quigley., 2011).

1. Types de glaucomes

1.1. Glaucome à angle ouvert / à angle fermé

Selon le degré d'ouverture de l'angle entre l'iris et la cornée (Figs. 1 et 2), on distingue le glaucome à angle ouvert et le glaucome à angle fermé (Quigley., 2011). Dans le glaucome à angle ouvert, l'angle irido-cornéen présente une ouverture normale, ce paramètre n'est donc pas impliqué dans la genèse de la maladie. Au contraire, dans le glaucome à angle fermé, la réduction de l'angle irido-cornéen obstrue les structures impliquées dans l'élimination de l'humeur aqueuse, entraînant ainsi une élévation de la pression intraoculaire (PIO) à l'origine de la pathologie. Le terme glaucome englobe normalement des neuropathies optiques chroniques, mais le glaucome à angle fermé peut se manifester sous forme d'une crise aiguë, avec une élévation très rapide de la PIO. Bien que nommé glaucome, la forme aiguë est un peu à part car elle n'est pas toujours associée aux atteintes du nerf optique et aux altérations du champ visuel typiques de la maladie (Wormald et Jones, 2015). A l'échelle mondiale, la prévalence des glaucomes à angle ouvert est nettement supérieure à celle des

glaucomes par fermeture d'angle : en 2013 elles étaient respectivement estimées à 3,05 % et 0,5 % dans la population âgée de 40 à 80 ans (Tham et al., 2014).

1.2. Glaucome primaire / secondaire

Un glaucome peut être secondaire au développement d'une autre pathologie ou à la prise d'un traitement pharmacologique, on parle alors de glaucome **secondaire**. Sinon, le glaucome est dit **primaire**. Les stéroïdes, prescrits pour leurs propriétés anti-inflammatoires, sont notamment à l'origine de glaucomes secondaires à angle ouvert. Le mécanisme sous-jacent n'est pas encore complètement caractérisé mais, en réduisant la conductivité hydrique du *trabéculum*, les stéroïdes sont connus pour augmenter la PIO et favoriser ainsi le développement d'un glaucome (Phulke et al., 2017, Clark et Wordinger, 2009).

2. Facteurs de risque

Il existe de multiples facteurs de risque de développer un glaucome, les deux principaux étant l'hyperpression oculaire et le vieillissement dont les implications sont détaillées dans la suite de ce manuscrit. L'origine ethnique, les susceptibilités génétiques, le genre et les amétropies sont également des facteurs de risques décrits dans la littérature. Nous reviendrons uniquement sur les susceptibilités génétiques, puisque d'importances particulières pour notre projet.

2.1. Hyperpression oculaire

Chez l'Homme, l'hyperpression oculaire est définie par une PIO supérieure à 21 mmHg (Khaw et al., 2004). Ce phénomène résulte en général d'une accumulation d'humeur aqueuse dans la chambre antérieure de l'œil, dont l'origine peut être une hypersécrétion ou un défaut d'élimination.

L'hypersécrétion d'humeur aqueuse, par les procès ciliaires, est extrêmement rare et donc peu étudiée dans le cadre du glaucome (Becker et al, 1956).

Plusieurs mécanismes peuvent concourir au dysfonctionnement des voies d'élimination de l'humeur aqueuse. Concernant la voie médiée par le trabéculum, une réduction de l'angle irido-

cornéen peut conduire à une altération de l'évacuation de l'humeur par cette structure. Ce phénomène trouve son origine dans un blocage pupillaire, par un adossement de la face antérieure du cristallin sur l'iris, conduisant à un défaut de circulation de l'humeur aqueuse entre la chambre postérieure, son lieu de production, et la chambre antérieure, son lieu d'élimination. En s'accumulant dans la chambre postérieure, elle crée une pression qui pousse l'iris contre le trabéculum. Cette séquence d'événements est impliquée dans le développement de l'hyperpression, et donc du glaucome, par fermeture d'angle. Par ailleurs, rappelons que le trabéculum est un tissu poreux, dont les espaces intercellulaires permettent le drainage de l'humeur aqueuse. Plusieurs mécanismes ont été proposés comme pouvant participer à l'obstruction des pores du trabéculum, dont des changements morphologiques et ultrastructuraux de sa matrice extracellulaire (pour revue, voir Vranka et al., 2015). Lutjen-Drecoll et al. (1996) et Knepper et al. (1996) ont par exemple mis en évidence un épaississement de la matrice extracellulaire et un changement de sa composition chez des patients glaucomateux. La formation d'agrégats protéiques dans cette même matrice a également été avancée comme pouvant potentiellement obstruer les pores du trabéculum (Bhattacharya et al., 2005). Une autre voie d'élimination de l'humeur aqueuse, la voie uvéosclérale, serait en cause dans la mise en place d'une hyperpression oculaire. Une réduction de son efficacité de drainage a en effet été mise en évidence avec l'âge, mais les mécanismes sous-jacents sont encore inconnus.

La rapidité avec laquelle l'hyperpression se traduit par des atteintes glaucomateuses (altération de la papille optique, réduction du champ visuel,...) dépend essentiellement de son amplitude. Alors qu'une PIO de 30 mmHg conduit en général à une évolution lente de la maladie, c'est-à-dire sur plusieurs années, celles dépassant les 40 mmHg sont très rapidement néfastes (Khaw et al., 2004).

L'hyperpression oculaire est un facteur de risque majeur de développer un glaucome, mais n'en est pas l'unique cause. En effet, certains patients ayant une PIO anormalement élevée ne sont jamais atteints par la maladie, alors que d'autres présentent des atteintes typiques de la pathologie sans pour autant qu'une hyperpression soit détectée. Dans ce dernier cas, on parle de glaucome à pression normale (Trivli et al., 2019).

Enfin, il est important de noter que l'hyperpression oculaire représente l'unique facteur de risque traitable à l'heure actuelle, même si sa normalisation ne suffit en général pas pour

complètement stopper l'évolution de la maladie (voir paragraphe II-5. Traitement du glaucome, page 68).

2.2. Vieillesse

Hormis les rares formes congénitales et juvéniles, dont nous ne parlerons pas dans ce manuscrit, le glaucome est une pathologie affectant les adultes. Le risque de développer un glaucome est faible avant 40-50 ans et augmente ensuite de manière exponentielle avec l'âge (Quigley et Broman., 2006, Rudnicka et al., 2006). Dans une étude menée sur 14700 personnes originaires de Mayence (Allemagne), Marx-Gross et al. (2017) ont effectivement observé une explosion de la prévalence du glaucome à partir de 45 ans : de 0,16% chez les 18-39 ans et 0,17% chez les 40-45 ans, la prévalence passe à 1,98% chez 46-75 ans, soit une augmentation de 11 fois du risque de développer la maladie dans cette dernière tranche d'âge.

2.3. Génétique et histoire familiale

Le glaucome primaire à angle ouvert présente une composante héréditaire. En effet, il a été observé que les proches d'une personne atteinte ont un risque augmenté de développer eux-mêmes la maladie (Klein et al., 2004, Wolfs et al., 1998, Asefa et al., 2018). Ce risque semble plus important chez les frères et sœurs du malade, que chez ses parents ou ses enfants (Tielsch et al., 1994). Dans certaines familles, la transmission du glaucome suit les lois mendéliennes, ce qui indique que la maladie est monogénique, c'est-à-dire causée par la mutation d'un seul gène. Dans ce cas, c'est la mutation qui est directement à l'origine de la maladie, l'environnement ayant peu d'influence sur son développement. Les mutations identifiées à l'heure actuelle touchent les gènes codant pour la myociline, l'optineurine et la sérine/threonine kinase *TANK-binding kinase-1*, mais peu de données sont disponibles sur les mécanismes liant ces mutations au développement du glaucome (Fingert., 2011, Allingham et al., 2009). Les glaucomes monogéniques sont rares, puisqu'ils représentent seulement 3 à 5 % des cas de glaucome à angle ouvert dans le monde (Asefa et al., 2018). Dans la grande majorité des cas, le glaucome est une maladie plurifactorielle, dont le développement dépend d'interactions entre l'environnement et les susceptibilités génétiques. Selon l'origine ethnique,

différents polymorphismes ont d'ailleurs été mis en évidence comme étant des facteurs de risque de développer cette pathologie (Khawaja et al., 2018, Allingham et al., 2009). Il s'agit notamment de variants de gènes impliqués dans l'immunité et l'inflammation ((*Toll like receptor 4*, *Interleukin-1 α* et *1 β* , *TNF- α*), dans le cycle cellulaire (*Tumor protein P53*, *Cyclin dependent kinase inhibitor 1A*) ou dans le métabolisme du cholestérol (*Apolipoprotein E (ApoE)*, *Cytochrome P450 family 46 subfamily A member 1 (CYP46A1)*). Dans notre laboratoire, Fourgeux et al. (2009) ont en effet montré que la prévalence du glaucome à angle ouvert est plus importante chez les personnes présentant le *polymorphisme* rs754203 dans le gène *CYP46A1*. Ce gène code pour l'enzyme CYP46A1 qui joue un rôle clé dans l'homéostasie du cholestérol dans le système nerveux central. Nous reviendrons plus en détail sur les fonctions de cette protéine dans le paragraphe III-3.).

Le glaucome à angle fermé présente également une composante génétique, comme le suggère l'influence forte de l'origine ethnique, du genre et des caractéristiques biométriques de l'œil sur la prévalence de cette pathologie. La littérature est encore peu fournie sur l'existence de formes monogéniques du glaucome à angle fermé. En revanche, divers polymorphismes génétiques ont été identifiés comme facteurs de susceptibilité (Ahram et al., 2015).

3. Mécanismes concourant à la mort des RGC

3.1. Un ensemble d'événements délétères pour les neurones

Rappelons que le glaucome est défini comme l'ensemble des pathologies oculaires caractérisées par la dégénérescence des cellules ganglionnaires de la rétine (RGC). Les mécanismes et la séquence d'événements conduisant à la mort de ces cellules sont encore largement incompris mais différentes hypothèses ont été avancées (pour revue voir Nickells, 2012, Almasieh et al., 2012).

Dans les cas des glaucomes dû à une élévation de la PIO, l'évènement initial serait la privation des RGC en facteurs neurotrophiques, comme le BDNF. En effet, l'hyperpression entraînerait, par compression mécanique de la tête du nerf optique au niveau de la lame criblée, une réduction du

transport axonal rétrograde permettant normalement de véhiculer des facteurs neurotrophiques depuis le cerveau (Quigley et al, 2000).

Parallèlement, l'hyperpression oculaire exercerait une compression des vaisseaux qui perfusent la rétine interne. L'ischémie résultante serait associée à un déficit en nutriments et à une hypoxie des cellules, phénomènes dommageables pour les neurones (Chidlow et al, 2017). Le manque d'oxygène, en perturbant le fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale, est connu pour conduire à la production excessive de ROS dans les cellules. Ce stress oxydant pourrait conduire directement à la mort des RGC, puisque que les ROS sont à l'origine de différents dommages cellulaires, touchant l'ADN, les lipides et les protéines (Nita et Grzybowski, 2016). Le stress oxydant pourrait également participer de manière indirecte à la mort des RGC en induisant un dysfonctionnement des cellules gliales (Tezel, 2006). Par exemple, dans un modèle de glaucome expérimental par élévation de la PIO chez le rat, Tezel et al (2005) ont mis en évidence un phénomène d'oxydation de la glutamine synthétase. Un dysfonctionnement de cette enzyme, permettant normalement le recyclage du glutamate par les cellules de Müller, pourrait conduire à une excitotoxicité, fatale pour les neurones.

L'activation des cellules macro et microgliales est sans doute un événement important dans la physiopathologie du glaucome. Cette maladie est en effet associée à une gliose prononcée, mise en évidence chez des patients (Varela et Hernandez., 1997, Wang et al., 2002a, Nützi et al., 2017, Neufeld, 1999, Yuan et Neufeld. 2001) et dans de nombreux modèles expérimentaux (Woldemussie et al., 2004, Kanamori et al., 2005, Tanihara et al., 1997, Ebnetter et al., 2010). Au cours du glaucome, la macrogliose est caractérisée par l'activation des astrocytes, principalement ceux de la lame criblée, et l'activation des cellules de Müller. Elle se traduit classiquement par une hypertrophie des cellules, une surexpression de la GFAP, et dans le cas des astrocytes laminaires par une prolifération cellulaire (Varela et Hernandez., 1997, Wang et al., 2002a, Tuccari et al., 1986). L'activation de la microglie, dans la rétine et la tête du nerf optique, est caractérisée par des changements morphologiques drastiques : d'une forme ramifiée, les cellules pleinement activées acquièrent une forme amiboïde. Une prolifération et/ou une migration vers les sites lésés, dont la couche des RGC et la papille optique, est également décrite (Ebnetter et al., 2010, Neufeld, 1999, Rojas et al., 2014). Le rôle de la gliose dans la survie des RGC est ambigu. D'un côté, elle pourrait être bénéfique, puisqu'il a par exemple été

montré que la glie activée synthétise des facteurs neurotrophiques, comme du BDNF et du CNTF, de manière accrue (Sarup et al., 2004, Seitz et al., 2013). Les astrocytes et la microglie réactives acquièrent également des propriétés de phagocytose, permettant l'élimination de débris cellulaires potentiellement toxiques (Nguyen et al., 2011, Rojas et al., 2014). D'un autre côté, la gliose pourrait être délétère pour la survie des RGC. Au cours du glaucome, il a été montré que les cellules gliales sécrètent un cocktail de cytokines pro-inflammatoires, dont du $TNF\alpha$, composé capable de promouvoir la mort des RGC (Tezel et al., 2001, Cueva Vargas et Di Polo., 2015). La glie libérerait également d'autres molécules neurotoxiques, comme de l'oxyde nitrique (Liu et Neufeld., 2000). Dans plusieurs modèles d'atteintes du nerf optique ou de glaucome, inhiber l'activation de la microglie a d'ailleurs été décrite comme permettant de retarder la mort des RGC (Levkovitch-verbin et al., 2006, Nakazawa et al., 2006, Bosco et al., 2008). Ainsi, le rôle de la gliose au cours du glaucome est encore mal compris, les mécanismes concourant à faire basculer ses effets de bénéfiques à délétères restant encore à élucider (Johnson et Morrison., 2009).

Dans le cas des glaucomes à pression normale, il est proposé que la composante vasculaire soit un évènement important. Une altération du flux sanguin rétinien, indépendant d'une élévation de la PIO, pourrait en effet participer au développement de cette pathologie (pour revue, voir Trivli et al., 2019).

3.2. Une mort par apoptose

La mort des RGC au cours du glaucome survient par apoptose, comme observé dans de nombreux modèles expérimentaux (Garcia-Valenzuela et al., 1995, Quigley et al., 1995, Cordeiro et al., 2004) et confirmé chez l'Homme (Cordeiro et al., 2017, Kerrigan et al., 1997). L'apoptose est un type de mort cellulaire programmée, c'est-à-dire qui suit une séquence d'évènements définis (pour revue voir Elmore, 2007). L'apoptose est consommatrice d'énergie, contrairement à la nécrose qui est décrite comme un phénomène passif. Les cellules en apoptose sont caractérisées par une morphologie particulière, qui comprend notamment une atrophie du cytoplasme, une pycnose (condensation de la chromatine) et une caryorrhexie, correspondant à la fragmentation de l'ADN. Traditionnellement, deux voies d'apoptose ont été décrites. La voie extrinsèque est activée par des récepteurs

membranaires de mort, comme le récepteur du TNF α (TNFR1) ou le récepteur FasR. La voie intrinsèque est mise en jeu par un stress intracellulaire, tel qu'une privation en facteurs neurotrophiques ou un stress oxydatif. Les deux voies concourent à l'activation d'enzymes protéolytiques clés, les caspases. Les premières activées sont les caspases initiatrices, qui activent à leur tour, par clivage, les caspases effectrices. Ce sont ces dernières qui sont à l'origine de la mort de la cellule, via la dégradation de divers substrats, dont les protéines du cytosquelette, et par l'activation d'endonucléases capables de dégrader le matériel génétique. Plus d'une dizaine de caspases ont été identifiées. Les n° 8 et 9 sont initiatrices, la première intervenant plutôt dans la voie extrinsèque et la seconde dans la voie intrinsèque. Parmi les caspases effectrices, la caspase 3 est majeure car elle est commune aux deux voies. Dans des modèles de glaucome par élévation de la PIO, plusieurs auteurs décrivent une activation des caspases 3, 8 et 9. Des résultats similaires ont été obtenus par Kermer et al. (1999, 2000) après transection ou pincement du nerf optique. L'inhibition pharmacologique des caspases a d'ailleurs été montrée comme positive pour la survie des RGC et pourrait permettre, dans le futur, de développer de nouvelles stratégies de neuroprotection (pour revue, voir Thomas et al., 2017).

Des études récentes suggèrent que les RGC meurent également par pyroptose, une forme de mort cellulaire programmée, caspase-1 dépendante, déclenchée par des processus inflammatoires (Pronin et al., 2019).

4. Modèles animaux de glaucome et techniques d'étude du stress et de la mort des RGC

4.1. Modèles animaux de glaucome

Dans cette partie, sont uniquement présentés les modèles développés chez les rongeurs, rats et souris, couramment utilisés en laboratoire de recherche. En outre, nous ne décrivons que les modèles basés sur une élévation de la PIO, premier facteur de risque de développer un glaucome. Pour évaluer leur pertinence trois paramètres sont couramment pris en compte : l'amplitude de l'hyperpression, son maintien dans le temps et le pourcentage de perte de RGC et/ou de leurs axones.

4.1.1. Hyperpression génétique chez la souris

Trois modèles animaux d'hyperpression génétique sont disponibles mais, au vu du faible nombre de publications les concernant, ils sont peu utilisés. La petite taille de la souris en est sans doute la raison, même si ces modèles présentent les caractéristiques nécessaires à l'étude d'un glaucome à angle ouvert.

Souris DBA/2J

La souche de souris DBA/2J présente spontanément une hyperpression oculaire qui se développe avec l'âge et qui s'accompagne d'une dégénérescence des RGC (jusqu'à 40% de perte) et d'une atteinte du nerf optique (John et al., 1998). L'origine de l'hyperpression réside dans la dispersion de pigments de l'iris dans l'humeur aqueuse, résultant en un encrassement progressif du trabéculum (Libby et al., 2005).

Souris MYOC

Parmi les gènes identifiés chez l'humain comme directement responsables du glaucome figure celui de la myociline, glycoprotéine sécrétée par les cellules du trabéculum (Tamm, 2002). Shepard et al. (2007) ont fait exprimer, dans un œil de souris, la version mutée du gène humain codant pour la myociline, grâce à l'injection intravitréenne d'un vecteur viral adéno-associé (AAV). Les auteurs ont observé une élévation rapide de la PIO (doublement à 8 jours), mais n'ont cependant pas analysé davantage de paramètres liés au glaucome.

Souris 129-Col1a1(tm1Jae)

Les travaux d'Aihara et al. (2003) portent sur des souris transgéniques spécifiquement mutées sur le gène codant pour le collagène I. Cette modification génétique fait disparaître le site de clivage du collagène par les métalloprotéinases, étape indispensable pour son élimination. Les animaux présentent une hyperpression oculaire apparaissant progressivement avec l'âge et une réduction du

nombre d'axones dans le nerf optique (-20%), phénotype sans doute causé par l'accumulation de collagène dans le trabéculum (Mabuchi et al., 2004, Dai et al., 2009).

La découverte d'un nombre de plus en plus important de variants génétiques comme facteurs de susceptibilité de développer un glaucome devrait conduire dans un avenir proche au développement de nouveaux modèles pertinents chez la souris (Youngblood et al, 2019).

4.1.2. Hyperpression induite par procédure chirurgicale ou laser

Les modèles de glaucome les plus documentés sont ceux faisant appel à une intervention chirurgicale ou une procédure laser afin de limiter l'évacuation de l'humeur aqueuse et ainsi augmenter la PIO (pour revue voir Biswas et Wan., 2019). Pour des raisons éthiques (recommandations de l'ARVO, « *Association for Research in Vision and Ophthalmology* »), la procédure est effectuée sur un seul œil, le controlatéral servant de témoin. Quelques-uns des modèles disponibles en laboratoire de recherche sont brièvement décrits ci-dessous.

4.1.2.1. Injection de microbilles

Des microbilles de latex ou de polystyrène, de 5 à 10 µm de diamètre, sont injectées dans la chambre antérieure de l'œil, afin d'obstruer les pores du trabéculum. Si une seule injection est réalisée, les effets sur la PIO et la mort des RGC sont en général modestes. Il est donc nécessaire de répéter fréquemment la procédure pour maintenir l'hyperpression sur une longue période, au risque de produire à terme une opacité cornéenne et une inflammation. Avec des injections hebdomadaires de microbilles de latex chez le rat, Urcola et al. (2006) ont réussi à augmenter progressivement la PIO, avec un pic au 26^{ème} jour, correspondant à un doublement de sa valeur. Au 30^{ème} jour, la perte de RGC annoncée par les auteurs est de 23%. L'utilisation de billes magnétiques dirigeables par l'expérimentateur dans l'angle irido-cornéen, a plus récemment été proposé. Samsel et al. (2011) ont ainsi décrit, suite à une injection unique chez le rat, une élévation de 25% de la PIO pendant 13 jours et une perte de RGC de 36%.

4.1.2.2. Injection d'acide hyaluronique

L'acide hyaluronique est le glycosaminoglycane majoritaire de la matrice extracellulaire du trabéculum (Acott et al., 1985). Des études ont montré que l'injection de ce composé dans la chambre antérieure de l'œil permet, chez le rat, d'augmenter la PIO pendant plus d'une semaine (Benozzi et al., 2002). En injection journalière Moreno et al. (2005) ont obtenu une augmentation de 86% la PIO, stable pendant 10 semaines, et associée à une perte de RGC de 40%.

4.1.2.3. Injection d'une solution hypertonique dans les veines épisclérales

L'injection d'une solution hypertonique de NaCl (1,5-2 M) dans les veines épisclérales, structures impliquées dans l'élimination de l'humeur aqueuse, est également utilisée comme modèle de glaucome (Morrison et al., 2018). Les expériences de Morrison et al (1997) chez le rat montrent que l'élévation de la PIO dépend notamment de la concentration en sel de la solution injectée : plus celle-ci est importante, plus la pression est élevée et maintenue dans le temps, mais plus l'inflammation est forte également. Pour une solution de 1,85 M, la PIO est doublée les premiers jours, puis redescend petit à petit à sa valeur initiale. L'hyperpression est maintenue pendant près de 200 jours chez certains animaux. Concernant la mort des RGC, les auteurs annoncent une perte presque totale des axones du nerf optique lorsque la PIO est doublée, que ce soit au bout d'une ou de 5 semaines.

Le geste chirurgical est difficile à maîtriser et demande donc beaucoup d'entraînement, ce qui limite l'utilisation de cette technique. De plus, les résultats obtenus sont très variables entre les animaux.

4.1.2.4. Photocoagulation laser

La photocoagulation est la méthode la plus utilisée pour produire un modèle de glaucome chez l'animal, et que nous avons jugé la plus reproductible dans notre laboratoire. Avec cette technique sont ciblés, seuls ou en combinaison, les veines épisclérales, le plexus limbique et/ou le trabéculum (Figs. 2

et 10). Sur chacune des structures, plusieurs points d'impact sont réalisés. Le laser est soit à argon soit à diode, la puissance du premier étant supérieure mais les lésions produites par le second étant plus profondes et plus étendues (voir Biswas et Wan, 2019). Le faisceau laser peut être appliqué directement à la surface de l'œil à l'aide d'une sonde endoscopique ou bien au travers d'une lampe à fente. D'après Biermann et al (2102), la puissance du faisceau laser, le temps de coagulation et le nombre de points d'impact permettent, dans une certaine mesure, de contrôler la durée et le pourcentage d'augmentation de la PIO.

Levkovitch-Verbin et al. (2002) ont développé une méthode de référence, chez le rat, qui comprend la coagulation du trabéculum (60-80 impacts) et des veines épisclérales (15-20 impacts). Le laser utilisé est à diode et les impacts sont délivrés, via une lampe à fente, pendant 0,7 seconde à la puissance de 0,4 W (groupe 1) ou pendant 0,5 sec à 0,6 W (groupe 2). Le profil de PIO obtenu est relativement similaire entre les groupes 1 et 2, avec une hyperpression importante (+100 %) dès les premiers jours suivant la photocoagulation et un retour à sa valeur basale autour du 20^{ème} jour. A noter que la procédure laser est réitérée une semaine après la première intervention si l'hyperpression n'est pas maintenue. Concernant la perte axonale, elle est beaucoup plus importante dans le premier groupe (-71%, à 9 semaines) que dans le second (-50%). Les auteurs proposent également de photocoaguler uniquement le trabéculum (60-80 impacts, 0,7 sec, 0, 4 W). Le profil de pression observé est similaire à celui des groupes précédents et la perte axonale est de 48 % à 9 semaines. De nombreux auteurs ont repris et adapté la méthode publiée par Levkovitch-Verbin (2002). Il est notable que les profils de PIO et le pourcentage de mort de RGC obtenus sont variables d'une étude à l'autre (Salinas-Navarro et al., 2010, Johnson et al., 2010, Scnebelen et al., 2009). Cette approche a également été transposée avec succès chez la souris (Salinas-Navarro et al., 2009a, Yun et al., 2014).

L'avantage de la photocoagulation au laser est de conduire à une élévation acceptable de la PIO après une seule, ou maximum deux, interventions. En effet, une PIO trop élevée correspondrait alors plus à un modèle d'ischémie reperfusion qu'à un modèle de glaucome. L'inconvénient de cette procédure relève par contre du degré important de technicité qu'elle requiert de la part de l'expérimentateur, afin d'obtenir une élévation durable de la PIO et de limiter les effets secondaires qui lui sont associés. Dans notre laboratoire les plus courants sont une sécheresse et une opacité

cornéenne, une cataracte, et une inflammation importante, également décrites par d'autres auteurs (voir Biswas et Wan, 2019). L'hyphéma, correspondant à la présence de sang dans la chambre antérieure, est également courante (Levkovitch-Verbin et al., 2002). Enfin, les lasers sont des dispositifs coûteux qui ne sont pas accessibles dans toutes les structures de recherche.

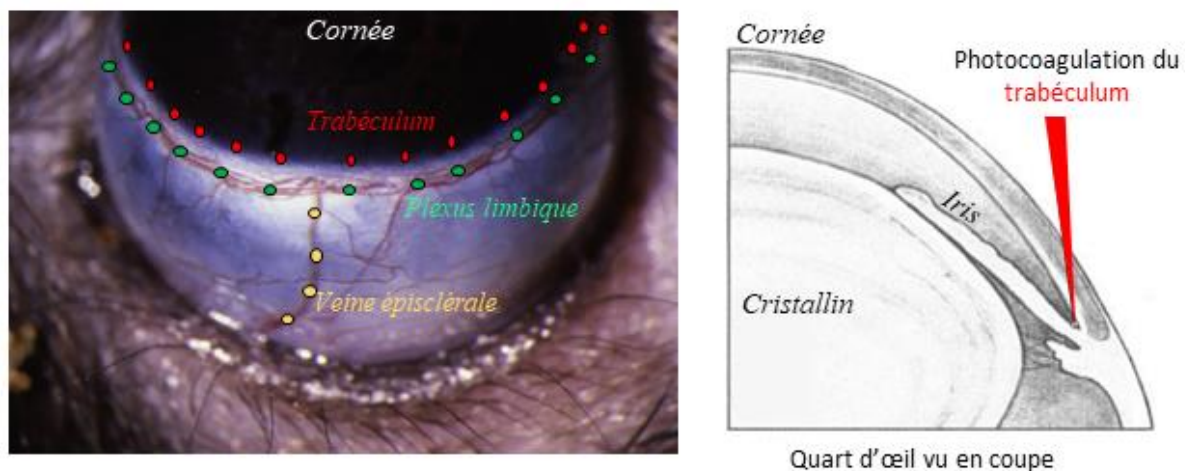


Figure 10. Structures oculaires classiquement photocoagulées au laser dans le cadre de l'induction d'un glaucome expérimental.

Les veines épisclérales, le plexus limbique et le trabéculum sont trois structures essentielles pour l'élimination de l'humeur aqueuse. Alors que les veines épisclérales et le plexus limbique sont visibles à l'extérieur de l'œil, le trabéculum est plus difficile à atteindre, car localisé dans l'angle irido-cornéen, à l'intérieur du globe.

A gauche, photo d'œil de rat de Morrison et al., 2015. A droite, schéma d'un quart d'œil vu en coupe, d'après Levkovitch-Verbin et al., 2002

En résumé, il apparaît que la même méthode utilisée par différents auteurs apporte des résultats variables et que chaque méthode présente des inconvénients (nécessité de répéter les injections pour maintenir une élévation durable de la PIO, geste chirurgical délicat, inflammation et autres complications post-opératoires). Dans leur revue de la littérature, Biswas et Wan. (2019) concluent qu'il n'existe pas de relation entre le degré d'augmentation de la PIO et le pourcentage de perte des RGC. D'autres auteurs décrivent au contraire une corrélation entre ces deux paramètres (Kwong et al, 2013, Jia et al., 2000, Levkovitch-Verbin et al, 2002).

4.2. Techniques d'étude du stress et de la mort des RGC

De nombreuses méthodes ont été mises au point pour mesurer les dommages subis par les RGC au cours des glaucomes expérimentaux. Certaines sont mises en œuvre *in vivo*, l'avantage étant de pouvoir faire un suivi longitudinal chez un même animal. Il s'agit notamment de techniques d'imagerie, comme l'OCT (*optical coherence tomography*) ou la SLO (*scanning laser ophthalmoscopy*), qui sont également utilisées chez l'homme (Fortune, 2015). D'autres méthodes sont réalisées *ex vivo*, c'est-à-dire qu'elles nécessitent de sacrifier l'animal. Le but est en général de mettre en évidence des altérations du transport axonal dans le nerf optique ou de quantifier la mort des RGC (pour revue voir Nuschke et al., 2015)

4.2.1. Mise en évidence de perturbations du transport axonal *ex-vivo*

L'étude du transport axonal est classiquement basée sur l'emploi de traceurs activement transportés au sein des fibres nerveuses. Ces molécules sont administrées chez l'animal vivant, par injection intravitréenne, pour les traceurs antérogrades, et par application sur le colliculus supérieur ou le noyau genouillé latéral, sites cérébraux des terminaisons axonales du nerf optique, pour les traceurs rétrogrades (Nuschke et al., 2015). Les traceurs les plus courants sont la peroxidase du raifort (*horseradish peroxidase*, HRP), la rhodamine-B-isothiocyanate (RITC) et les conjugués fluorescents de la sous unité B de la toxine cholérique (*cholera toxine B*, CTB). La vitesse de transport le long des axones est variable selon le traceur, le sens de transport considéré (pour les traceurs bidirectionnels) et l'espèce animale chez laquelle il est administré (Nuschke et al., 2015). Une fois l'animal sacrifié, le marquage axonal est visualisé sur des coupes de nerf optique, par réaction enzymatique dans le cas du traceur HRP et par fluorescence pour la RITC et la CTB.

4.2.2. Quantification de la mort des RGC *ex-vivo*

4.2.2.1. Comptage du nombre de RGC dans la rétine

Le dénombrement des RGC peut être réalisé sur coupes ou sur rétine mise à plat (*flatmount*) (Fig. 11) (Mead et al, 2014). Au cours du glaucome, la mort neuronale ayant été décrite comme non

homogène sur l'ensemble de la rétine, la seconde technique est privilégiée par rapport à la première (Soto et al., 2011, Vidal-Sanz et al., 2012). La quantification du nombre total de RGC est également préférable par rapport à la réalisation d'un échantillonnage dans quelques zones. Un comptage assisté par ordinateur peut être utilisé afin de rendre le travail moins fastidieux (Salinas-Navarro et al., 2009b, Geeraerts et al., 2016).

Afin de pouvoir compter les RGC, il est nécessaire de les visualiser. Les caractéristiques essentielles que doivent posséder les marqueurs sont 1) une spécificité élevée pour les RGC en condition physiologique et pathologique, 2) une expression binaire, c'est-à-dire qu'ils doivent allumer les RGC vivantes et s'éteindre lors de leur mort, et 3) une expression homogène dans le noyau ou le corps cellulaire, mais pas dans les fibres nerveuses, afin de permettre un comptage fiable et aisé des cellules marquées. La technique de référence pour marquer les RGC emploie un traceur rétrograde, le FluoroGoldTM, en général administré dans le colliculus supérieur (Nuschke et al., 2015). L'avantage de ce composé par rapport à d'autres traceurs, comme la RITC ou la CTB, est qu'il s'accumule dans les corps cellulaires des RGC mais ne marque par leurs axones. Un autre point positif réside dans sa flexibilité de détection, puisqu'en plus de la fluorescence, le marquage peut également être visualisé par immunohistochimie (Naumann et al., 2000). Les inconvénients du FluoroGold sont notamment inhérent à l'utilisation des traceurs. Il s'agit de la nécessité de réaliser une intervention chirurgicale sur l'animal pour appliquer la molécule dans l'aire cérébrale appropriée. De plus, le marquage étant dépendant du transport axonal, perturbé précocement par rapport à la mort des RGC, il est probable que la perte neuronale soit surestimée par rapport à la réalité (Mead et Tomarev, 2016). Enfin, les RGC ne projetant pas dans l'aire cérébrale dans laquelle le traceur est appliqué ne sont pas marqués. Pour tenter de pallier à ces problèmes, des techniques alternatives, basées sur des immunomarquages de protéines spécifiquement exprimées dans RGC, ont été développées. Parmi les marqueurs les plus couramment utilisés figure la protéine nucléaire Brn3a. Brn3 a, b et c sont des facteurs de transcription impliqués dans le développement, la différenciation et la survie des RGC (Wang et al., 2002b, Badea et al., 2009). Chez le rat, Nadal-Nicolás et al. (2012) ont décrit une forte colocalisation entre le marquage Brn3a et celui induit par le Fluorogold préalablement appliqué dans le Colliculus supérieur : 92,5 à 96,4 % des cellules marquées au Fluorogold étaient également positives pour Brn3a. Le nombre de

RGC quantifié est d'ailleurs très similaire entre les deux techniques, avec en moyenne 82595 ± 1568 RGC pour le comptage au Fluorogold et 82979 ± 1787 pour Brn3a. Les auteurs indiquent que les facteurs Brn3b et Brn3c sont exprimés dans un nombre plus restreint de RGC et ne peuvent donc pas être utilisés dans le cadre d'une quantification absolue. Un avantage de Brn3a par rapport au Fluorogold est que ce marqueur permet de détecter des RGC projetant dans d'autres aires que le colliculus supérieur, comme le noyau genouillé latéral (Quina et al., 2005). En revanche, Brn3a ne serait exprimé que par la moitié des RGC ipsilatérales et par quasiment aucune RGC intrinsèquement photosensible (RGCip, cf. page 35) (Nadal-Nicolás et al., 2012). L'utilisation du marqueur Brn3a a été validé dans différents modèles de glaucomes (Pérez de Lara et al., 2014, Vidal-Sanz et al., 2017, Salinas-Navarro et al., 2010) et d'atteintes du nerf optique (Nadal-Nicolás et al., 2012, Mead et al., 2014, Sánchez-Migallón et al., 2011). Un inconvénient du Brn3a serait sa sous-expression dans les RGC en souffrance, mais encore vivantes, conduisant donc potentiellement à une surestimation de la perte neuronale (Nadal-Nicolás et al., 2012, Sanchez-Migallon et al., 2011). Au contraire, Brn3a pourrait-être surexprimé dans d'autres types cellulaires que les RGC, avec donc le risque d'une sous-estimation de la mort neuronale (Nuschke et al., 2015). La protéine Rbpms, intervenant dans la régulation post-transcriptionnelle de l'expression génique, est présentée comme le marqueur des RGC le plus prometteur. Kwong et al. (2011) annoncent en effet une colocalisation presque parfaite du marquage Rbpms avec celui induit par le Fluorogold, chez des animaux sains ou atteints de glaucome par hyperpression. Le marquage Rbpms, essentiellement cytoplasmique, est facilement détectable. La limitation de l'utilisation de cette protéine réside dans la faible quantité de données disponibles à son sujet. Enfin, citons la glycoprotéine membranaire Thy-1 qui est également employée comme marqueur des RGC (Barnstable et Drager, 1984). Dans un modèle de glaucome par élévation de la PIO, Huang et al. (2006) ont décrit une sous-expression de Thy-1 dans les yeux malades, d'ampleur bien plus importante que la perte des RGC déterminée par marquage rétrograde au Fluorogold. Les auteurs proposent donc que Thy-1 soit un marqueur intéressant dans l'étude précoce de la souffrance des RGC mais pas dans l'évaluation de leur mort. Des observations similaires avaient également été rapportées par Schlamp et al. (2001) et Chidlow et al. (2005).

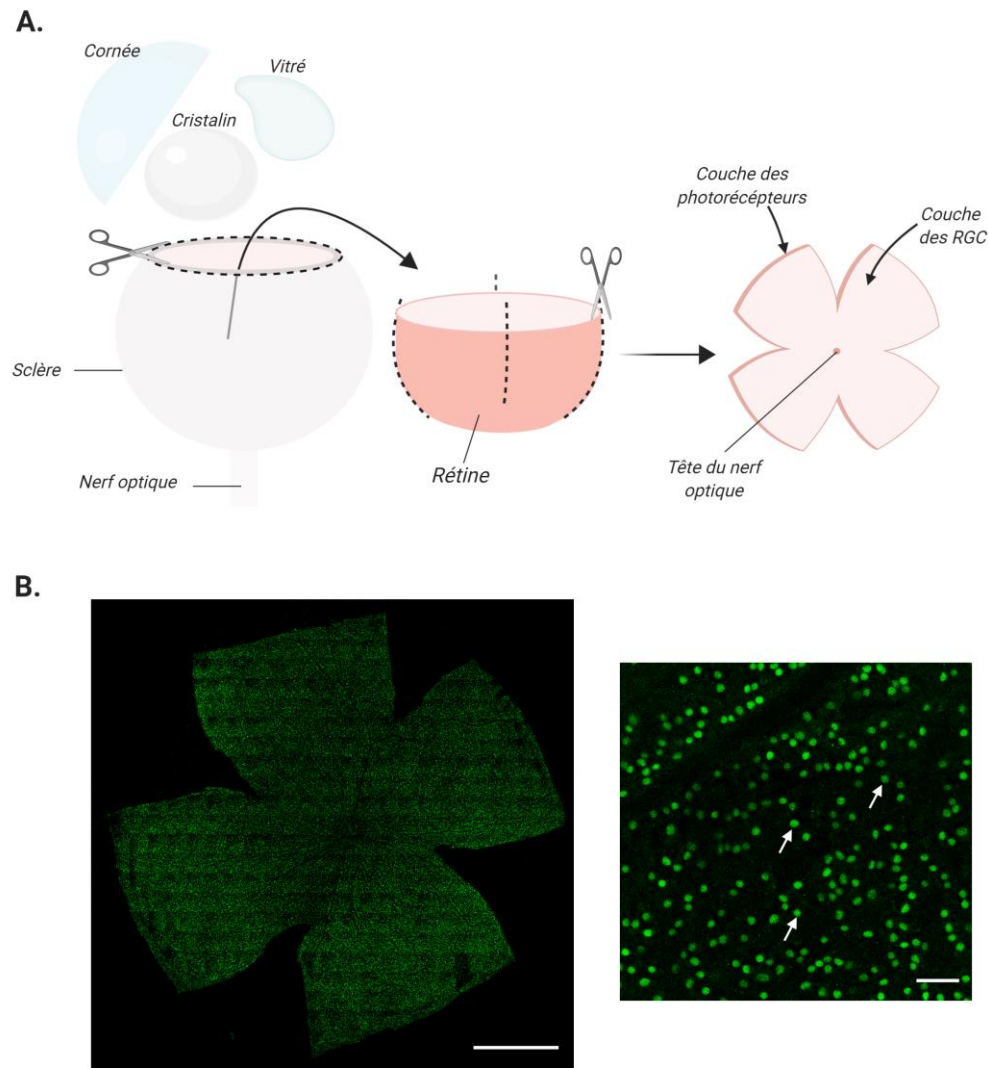


Figure 11. Visualisation des RGC sur rétine mise à plat.

A. Principe de la réalisation d'une rétine mise à plat (*flatmount*). La rétine est extraite du globe oculaire, puis 4 incisions radiales sont pratiquées afin de l'étaler à plat. Sur la face du *flatmount* correspondant à la face interne de la rétine, auparavant en contact avec le vitré, se trouve la couche des RGC. L'autre face correspond à la couche des photorécepteurs. Illustration réalisée sur le site Biorender. **B.** Cliché d'une rétine de rat mise à plat dont les noyaux des RGC sont marqués au Brn3a (en vert). Rétine totale à gauche, échelle : 2 mm. Grossissement à droite, échelle : 50 µm.

4.2.2.2. Comptage des fibres nerveuses dans le nerf optique

L'atteinte des RGC peut également être mesurée par le dénombrement des fibres nerveuses sur des coupes transversales de nerf optique. Ces coupes, photographiées en microscopie optique ou électronique, sont colorées avec un contrastant des gaines de myéline. Étant donné le nombre très important d'axones que contient le nerf optique, 60 000 en moyenne chez la souris, plusieurs auteurs ont développé des techniques de comptage automatique ou semi-automatique (Zarei et al, 2016).

D'autres équipes proposent des méthodes de quantification basées sur l'échantillonnage de plusieurs régions du nerf optique (Levkovitch-Verbin et al., 2002, Chauhan et al., 2006).

5. Traitement du glaucome chez l'homme

Les traitements des glaucomes sont basés sur une réduction, pharmacologique ou chirurgicale, de la PIO, puisque ce sont son augmentation et son maintien à une valeur élevée qui constituent les facteurs de risque majeurs de la dégénérescence du nerf optique et des RGC (pour revue sur les traitements, voir Cohen et Pasquale., 2014 et Conlon et al., 2017). A l'heure actuelle, il n'existe malheureusement pas de thérapie capable de stopper complètement l'évolution de la maladie, les traitements permettant seulement de ralentir son évolution.

L'évolution actuelle des traitements des glaucomes va vers le développement de stratégies de neuroprotection qui permettraient, indépendamment d'une réduction de la PIO, de prévenir la dégénérescence des RGC (Guymier et al., 2019, Weinreb., 2007, Whitmore et al., 2005). Dans ce cadre, différentes voies thérapeutiques sont à l'étude, dont l'utilisation d'agents pharmacologiques et la thérapie génique (Aktas et al, 2018). L'objectif est essentiellement de contrer les mécanismes favorisant la mort des RGC au cours du glaucome, comme la privation en facteurs neurotrophiques ou le stress oxydant (Doozandeh et Yazdani., 2016). Par exemple, l'administration intra-vitréenne de facteurs neurotrophiques, principalement le BDNF et le CNTF, a été décrite comme positive pour la survie des RGC dans des modèles de souffrance neuronale par pincement (Chen et Weber, 2001) ou section du nerf optique (Peinado-Ramón et al., 1996). Les travaux de Osborne et al (2018) semblent encore plus prometteurs. En effet, dans un modèle de glaucome chez le rat, les auteurs ont réussi à améliorer la survie des RGC en administrant, par injection intravitréenne, un vecteur viral permettant d'augmenter l'expression du BDNF dans la rétine.

Une meilleure compréhension des mécanismes biologiques à l'origine de la mort des RGC est nécessaire afin de pouvoir mettre au point de nouvelles stratégies neuroprotectrices.

III. Le cholestérol dans l'organisme et dans la rétine

Le cholestérol est un lipide majeur du monde animal. Souvent perçu comme un composé délétère par le grand public, en raison de son implication dans la survenue de maladies cardiovasculaires, il est pourtant indispensable au fonctionnement de l'organisme.

1. Rôles principaux du cholestérol

Le cholestérol est un lipide constitutif des membranes cellulaires. Composé d'un corps carboné hydrophobe (27 carbones), comprenant un noyau stérane additionné d'une chaîne latérale, et d'une fonction hydroxyl (-OH) hydrophile, le cholestérol est globalement apolaire mais légèrement amphiphile (Fig. 12). Cette propriété lui confère la capacité de s'insérer entre les phospholipides des bicouches lipidiques, modulant la fluidité et la perméabilité membranaire (Ohvo-Rekila et al, 2002). En jouant ainsi sur les propriétés physiques des membranes, le cholestérol est un acteur clé dans le maintien de l'intégrité membranaire, du « trafficking » intracellulaire, et de la régulation des voies de signalisation (Gimpl et al., 1987, Burger et al., 2000). La proportion de cholestérol dans les membranes est variable selon les organismes, les conditions environnementales (de température notamment), les types cellulaires, les types de membrane (plasmique, du *réticulum endoplasmique*, ...) et la localisation sub-membranaire (Wattenberg et Silbert, 1983, Subczynski et al., 2017). Par exemple, au sein de la membrane plasmique le cholestérol n'est pas réparti uniformément : il est particulièrement abondant dans des zones particulières nommées radeaux lipidiques ou *rafts* (Fig. 12). Également enrichis en phospholipides et sphingolipides à chaînes latérales saturées, les *rafts* forment des régions membranaires épaisses, ordonnées et peu fluides, dans lesquelles se concentrent des protéines de signalisation (Pike, 2009). Les études montrent que le cholestérol est indispensable pour la formation et la fonctionnalité des *rafts*. Par exemple, le traitement de cellules en culture avec de la méthyl- β -cyclodextrine, un agent déplétant les membranes en cholestérol, entraîne la dissociation des protéines de signalisation des radeaux lipidiques (Zidovetzki et Levitan., 2007, Kabouridis et al., 2000).

Outre son rôle capital en tant que lipide membranaire, le cholestérol est le précurseur des hormones stéroïdiennes, c'est-à-dire des hormones sexuelles et des corticoïdes, respectivement synthétisés par les gonades et les glandes surrénales (Miller, 2017) (Fig. 12). Dans les kératinocytes de la peau en contact avec les UV, le 7-déhydrocholestérol, précurseur du cholestérol, donne naissance à la vitamine D3 (Kametani et Furuyama, 1987). Enfin, le catabolisme du cholestérol par les hépatocytes permet la synthèse des sels biliaires, acides aux propriétés détergentes qui sont indispensables à la solubilisation et l'absorption intestinale des lipides (Kiriyaama et Nochi., 2019).

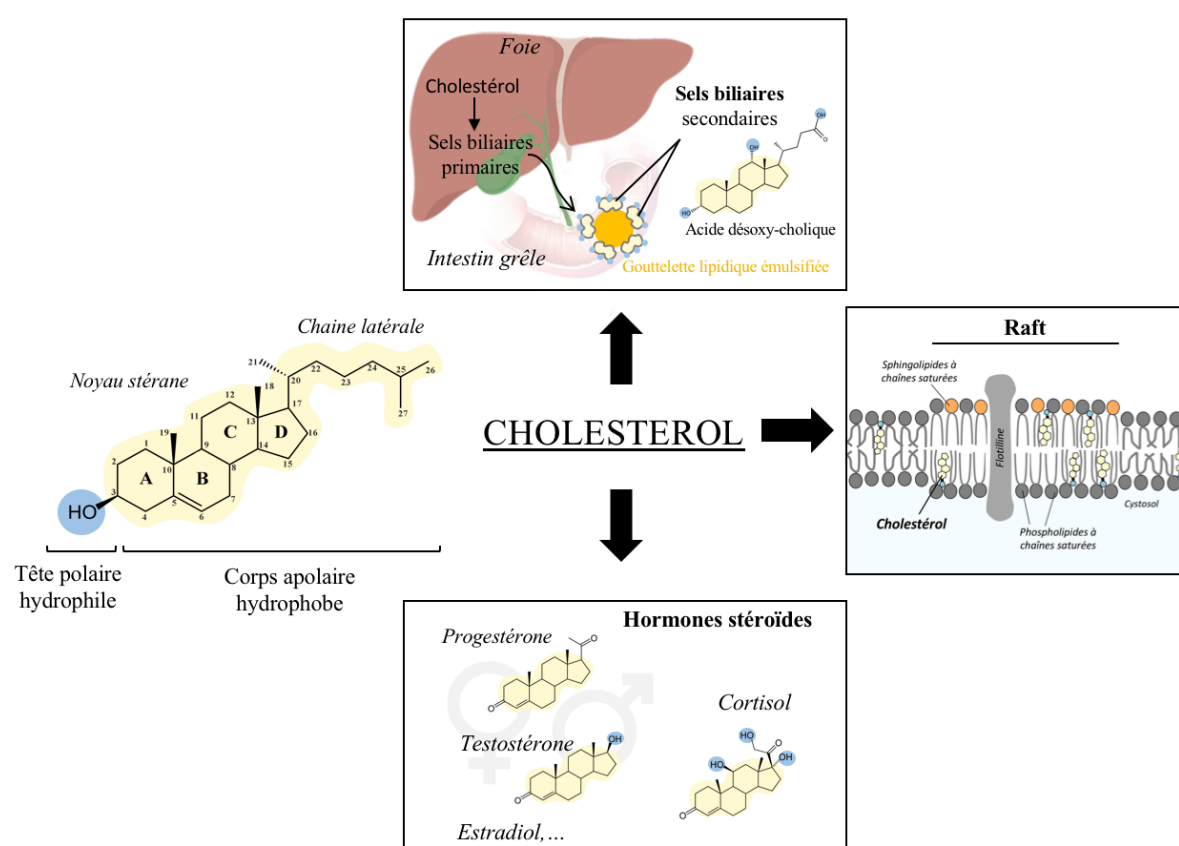


Figure 12. Le cholestérol, formule chimique et rôles principaux.

Le cholestérol est un lipide appartenant à la famille des stérols. Il est composé d'un squelette carboné, comprenant un noyau stérane à 4 cycles de carbones (A, B, C, D), et d'une chaîne latérale. Sur le cycle A, en position 3, est lié une fonction hydroxyl (-OH) qui confère au cholestérol la propriété d'être amphiphile. Au sein des membranes, il s'insère entre les phospholipides et régule la fluidité des bicouches lipidiques. De plus, il est requis pour la formation des *rafts*, plateformes de signalisation localisées dans la membrane plasmique. Par ailleurs, le cholestérol est le précurseur d'autres molécules bioactives que sont les hormones stéroïdiennes. Enfin, le catabolisme du cholestérol sert à la synthèse des sels biliaires primaires par les hépatocytes, transformés en sels biliaires secondaires, comme l'acide désoxycholique, par les bactéries intestinales. Ces sels permettent d'émulsifier les lipides du bol alimentaire lors de leur passage dans l'intestin grêle.

2. Répartition du cholestérol dans l'organisme et importance dans le système nerveux

On retrouve en moyenne 140 g de cholestérol chez un Homme de 70 kg, soit 2 mg de cholestérol/ kg (Sabine, 1977 dans Pikuleva et Curcio, 2014). Environ 8% de ce pool sont localisés dans la circulation sanguine, majoritairement sous forme estérifiée au cœur des lipoprotéines. Les 92% restants sont présents dans les organes, principalement dans les membranes cellulaires sous forme non estérifiée. Dans la rétine, 90% du cholestérol serait présent sous cette forme (Bretillon et al., 2008, Pikuleva and Curcio., 2014). Les tissus stéroïdogènes font exception, les cellules stockant dans leur cytoplasme de grandes quantités d'esters de cholestérol pour la synthèse hormonale.

Le cerveau, et plus généralement le système nerveux, font partie des organes les plus riches en cholestérol, avec 20 mg/g de tissu sec (Sabine, 1977). Ils contiennent d'ailleurs à eux seuls 23 % de la quantité totale de cholestérol dans l'organisme. Les tissus stéroïdogènes, comme les glandes surrénales, présentent également des teneurs en cholestérol très élevées (25 à 150 mg/g). A titre de comparaison, le foie contient environ 3 mg de cholestérol/g (Sabine, 1977). La rétine présente une teneur similaire à celle observée dans le foie, mais la mesure ayant été réalisée chez le bœuf demande à être validée chez l'Homme (Bretillon et al., 2007). Chez le rat, nous avons mesuré une quantité moyenne de 2,7 mg de cholestérol/g de rétine, ce qui est proche des données publiées chez le bœuf.

Dans l'organisme, les tissus nerveux sont particulièrement dépendants du cholestérol. En effet, les neurones synthétisent en permanence de grandes quantités de membranes, notamment pour pouvoir assurer l'exocytose synaptique des neurotransmetteurs et la croissance des épines dendritiques. Comme mentionné précédemment, le cholestérol module les propriétés physiques des membranes et influence ainsi le « trafficking » et la signalisation cellulaire. Il est donc probable que la quantité de cholestérol dans les membranes des neurones soit un élément déterminant de la régulation de la transmission nerveuse. Certains canaux ioniques et récepteurs impliqués dans la transduction post-synaptique seraient d'ailleurs localisés dans les *rafts* (Korade et Kenworthy, 2008, Tsui-Pierchala et al., 2002). Par ailleurs, les gaines de myéline qui entourent les fibres nerveuses sont extrêmement riches en cholestérol : 70 à 80 % du cholestérol cérébral serait contenu dans ces structures. Les

membranes des neurones et de la glie représentent les 30% restants (Diestchy et al., 2009). Les gaines de myéline correspondent à des extensions de la membrane des oligodendrocytes, rendue très dense et compacte notamment grâce à la présence de cholestérol en grande quantité (ratio cholestérol / phosphatidylcholine en moyenne de 5,1 dans la myéline contre 1,6 dans la matière grise, Saher et Stumpf., 2015). Elles possèdent ainsi une haute capacité d'isolement électrique, permettant une conduction rapide de l'influx nerveux le long des axones. La mise en place des gaines de myéline a lieu principalement pendant la maturation du cerveau, qui débute en général à la naissance et se poursuit jusqu'à un âge plus ou moins avancé selon les espèces (Dietschy et al., 2009, Miller et al., 2011). Dans la rétine, le cholestérol est réparti de manière homogène entre les différentes couches cellulaires, principalement présent au sein de la membrane des neurones et des cellules gliales. Les segments externes des photorécepteurs font exception car ils possèdent une teneur en cholestérol bien inférieure à celle du reste de la rétine, les bâtonnets étant plus pauvres que les cônes (Fig. 13) (Zheng et al., 2012, Pikuleva et Curcio, 2014). Au sein des segments externes, c'est plus précisément la membrane des disques apicaux qui présente une teneur en cholestérol réduite. Dans les bâtonnets elle est trois fois inférieure à celle des disques basaux ou à celle de la membrane plasmique (Boesze-Battaglia et al., 1989, Fliesler and Schroepfer, 1982). Les disques prennent naissance à la base du segment externe, probablement à partir d'évaginations de la membrane plasmique, et mûrissent le long de leur trajet vers l'extrémité apicale du segment (sur une période d'environ 10 jours chez les vertébrés) (Goldberg et al., 2016). Dans les bâtonnets cette maturation comprend notamment la déplétion partielle de leur membrane en cholestérol, étape indispensable à l'activation du pigment visuel qu'est la rhodopsine. En effet, l'environnement membranaire « rigide » créé par la présence de cholestérol empêcherait le changement de conformation de la rhodopsine, qui fait normalement suite la fixation d'un photon (Albert et al., 2016). L'extrémité apicale des photorécepteurs est en permanence phagocytée par les microvillosités du RPE et il est probable que, comme pour les pigments visuels ou d'autres composés de la membrane des segments externes, le cholestérol soit recyclé et retourne en partie aux photorécepteurs.

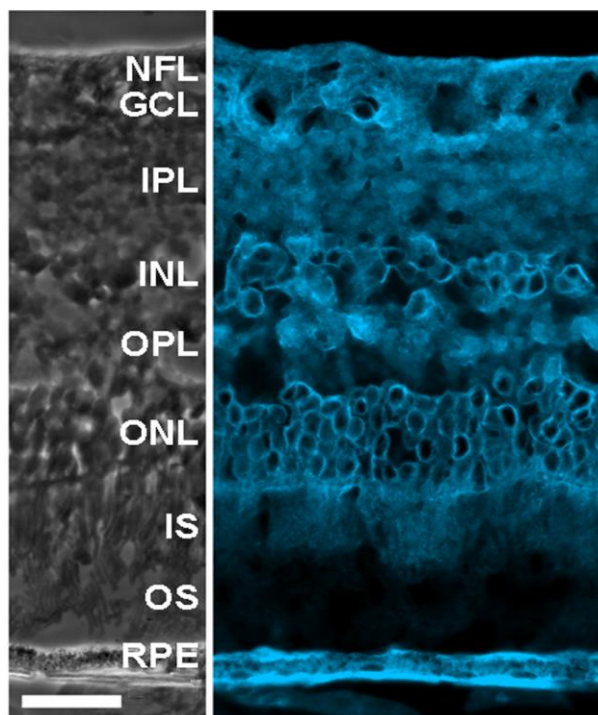


Figure 13. Distribution du cholestérol dans la rétine.

Cliché d'une coupe histologique de rétine humaine marquée à la filipine, molécule fluorescente affine pour les stérols non estérifiés. Dans la rétine, le cholestérol est le stérol majoritaire (quantité 1000 fois supérieure à celle des autres stérols) et présent sous forme non estérifié à 90%. Le marquage filipine est donc pertinent pour étudier la répartition du cholestérol dans ce tissu. Comme illustré sur cette coupe, le marquage par la filipine est visible dans toutes les couches cellulaires, indiquant que le cholestérol est présent dans l'ensemble de la rétine. La partie apicale des segments externes (OS) des photorécepteurs fait exception puisqu'elle est très faiblement marquée, ceci reflétant une teneur réduite en cholestérol dans ces structures. NFL: *Nerve fiber layer* (couche des fibres nerveuses), GCL: *Ganglion cell layer* (couche des cellules ganglionnaires), IPL: *Inner plexiform layer* (couche plexiforme interne), INL: *Inner nuclear layer* (couche nucléaire interne), OPL: *Outer plexiform layer* (couche plexiforme externe), ONL: *Outer nuclear layer* (couche nucléaire externe), IS: *Inner segment* (Segment interne), OS: *Outer segment* (segment externe), RPE: *Retinal pigmentary epithelium* (epithelium pigmentaire rétinien). D'après Zheng et al., 2012. Barre d'échelle : 30 μ m.

3. Le métabolisme du cholestérol

Le métabolisme du cholestérol correspond aux étapes d'**apport**, de **distribution** et d'**élimination** du cholestérol, à l'échelle globale de l'organisme mais aussi à l'échelle tissulaire et cellulaire.

Chez les mammifères de petite taille, comme les rongeurs, le turnover du cholestérol est élevé, puisqu'environ 8% du pool de cholestérol est renouvelé chaque jour. Au contraire, chez les

mammifères de plus grande taille, seul 0,7 % du pool de cholestérol est remplacé quotidiennement, ce qui équivaut chez l'Homme à un turnover d'environ 1g par jour (Li et al., 2008, Nestel et al., 1969, Dietschy et Turley, 2004)

3.1. Métabolisme du cholestérol dans l'organisme

3.1.1. Les apports en cholestérol

Dans la plupart des organes, le cholestérol provient à la fois de l'alimentation (source exogène) et de la synthèse *de novo* effectuée par les cellules (source endogène). La contribution de chacune des sources à l'apport global de cholestérol dans l'organisme dépend notamment de la quantité de cholestérol ingéré, la biosynthèse endogène étant régulée négativement par une alimentation riche en cholestérol (McNamara et al, 1987).

3.1.1.1. Teneurs en cholestérol des aliments et absorption intestinale

Dans l'alimentation, les lipides sont essentiellement présents sous forme de triglycérides (environ 95%), de phospholipides et de cholestérol.

Le cholestérol est un lipide typique du monde animal. Il est donc abondant dans les produits carnés, les abats étant parmi les aliments les plus riches en cholestérol. La cervelle contient, par exemple, en moyenne 2000 mg de cholestérol par 100g, le foie 500 mg et les rognons 400 mg (Tables de composition nutritionnelle des aliments, Ciqval, Anses). Les œufs, et plus particulièrement le jaune, sont également très riches en cholestérol (930 mg de cholestérol /100g de jaune). Les poissons présentent des teneurs plus modestes (40 mg de cholestérol aux 100g pour le cabillaud, par exemple). Les végétaux, et donc les fruits et légumes, sont dépourvus de cholestérol. Ils contiennent en revanche des phytostérols qui, en limitant l'absorption intestinale du cholestérol, permettraient de réduire la concentration plasmatique du LDL-cholestérol, dit « mauvais » cholestérol » (Rocha et al., 2011, Trautwein et al. 2018). Dans les pays industrialisés, une personne ingère entre 300 et 500 mg de cholestérol par jour (Pikuleva et Curcio., 2014, Mok et al., 1979).

La digestion des lipides alimentaires, en vue de leur absorption par les entérocytes, comprend notamment les étapes d'hydrolyse enzymatique et d'émulsification (Fig. 14). Dans l'intestin grêle, la cholestérol estérase est en charge de l'hydrolyse des esters de cholestérol (10-15% du cholestérol ingéré), libérant ainsi du cholestérol libre et des acides gras (Heidrich et al., 2004, Iqbal et Hussain, 2009). En effet, seule la forme non estérifiée du cholestérol est absorbable par les entérocytes. L'étape d'émulsification permet ensuite de solubiliser le cholestérol, et plus généralement les lipides présents dans la lumière intestinale, via leur association avec les sels biliaires. Les lipides, contenus dans les micelles ainsi formés, sont captés par les entérocytes par diffusion passive et/ou via l'action de transporteurs localisés dans la membrane apicale des cellules (Hussain., 2014). En 2004, Altmann et al., ont identifié la protéine Niemann-Pick-C1-like-1 (NPC1L1) comme transporteur majeur du cholestérol dans les entérocytes. Ils ont notamment mis en évidence que l'ablation génétique de NPC1L1 chez la souris réduit l'absorption intestinale de cholestérol de 70 % (Pour revue sur NPC1L1, voir Betters et Yu., 2010). Dans les entérocytes, la majeure partie du cholestérol est estérifié, par l'enzyme acyl-cholestérol acyl transférase (ACAT). Il est ensuite incorporé, avec le cholestérol libre et les triglycérides, dans les **chylomicrons**. Ces particules sont sécrétées à la membrane basale des entérocytes et rejoignent la lymphe puis la circulation sanguine (Hussain, 2000, Iqbal et Hussain., 2009). Grâce à l'activité des protéines *ATP-binding cassette transporter A1* (ABCA1) et *Scavenger receptor-BI* (SR-BI), exprimées dans la membrane basale des entérocytes, le cholestérol non estérifié peut également être incorporé dans des particules de haute densité (HDL) présentes dans la lymphe (voir paragraphe III.3.1.2.Transport plasmatique du cholestérol dans les lipoprotéines, page 80). Enfin, le cholestérol peut être ré-exporté dans la lumière intestinale grâce au transporteur hétérodimérique ABCG5/ABCG8 présent dans la membrane apicale des entérocytes (Yu et al., 2002). Ce mécanisme participe à l'excrétion trans-intestinale du cholestérol, ou TICE, (Fig. 14), voie importante dans le cadre de l'élimination du cholestérol.

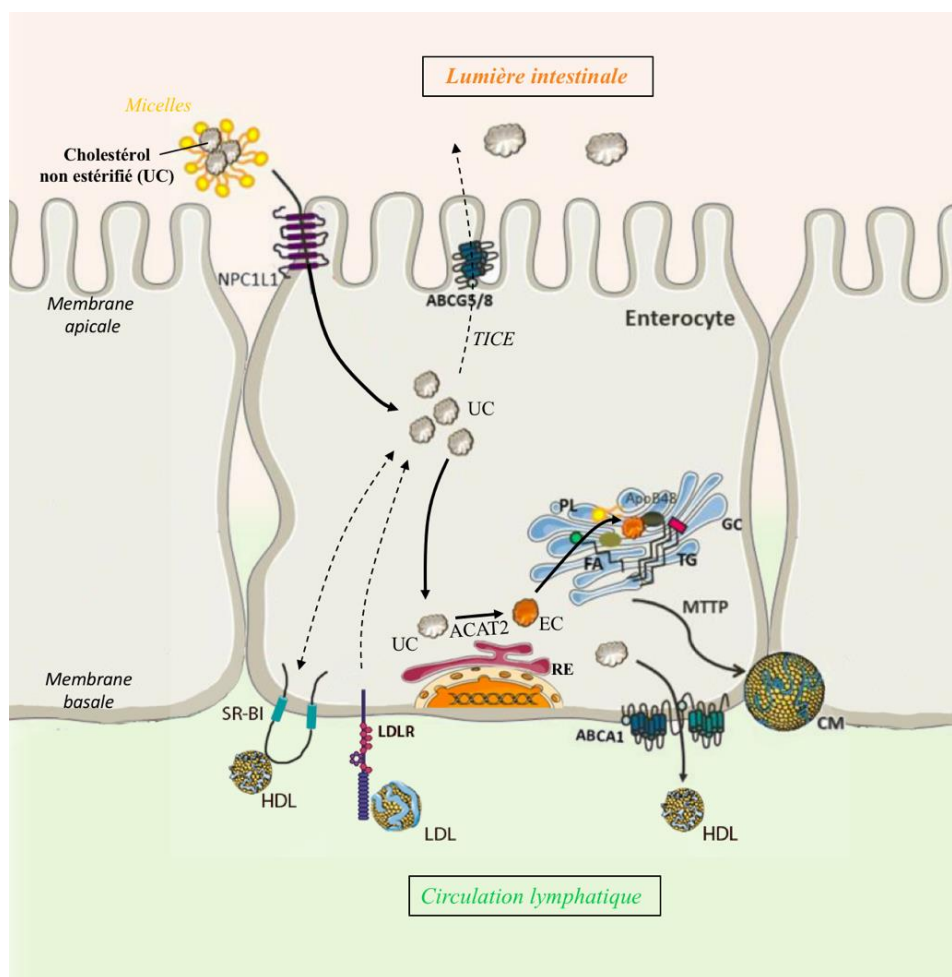


Figure 14. Métabolisme du cholestérol dans les entérocytes.

Le cholestérol non estérifié (UC), transporté dans des micelles, entre dans les entérocytes grâce au transporteur NPC1L1, puis est estérifié (EC) par l'enzyme ACAT2 dans le réticulum endoplasmique (RE). Les triglycérides (TG), les esters de cholestérol et l'apolipoprotéine B-48 (apo B-48) sont transformés en chylomicrons (CM) dans le complexe de Golgi (GC) par la protéine MTP. Les chylomicrons sont ensuite transférés au système lymphatique. ABCA1 et SR-BI participent également à l'efflux de cholestérol via des lipoprotéines HDL. L'excrétion trans-intestinale (TICE) permet l'élimination du cholestérol, via son efflux dans la lumière intestinale, grâce aux transporteurs ABCG5/G8 localisés dans la membrane apicale des entérocytes. *Autres abréviations : FA: Acides gras, LDL-R: Récepteur aux LDL, PL : phospholipides, SR-B1: Scavenger Receptor class B type 1*

Schéma modifié d'après Afonso et al., 2018.

3.1.1.2. Biosynthèse endogène du cholestérol

La synthèse du cholestérol est un processus complexe, impliquant une série de plus de trente réactions enzymatiques ayant lieu dans plusieurs compartiments subcellulaires (Cerqueira et al., 2016, Faust et Kovacs., 2014). Ces réactions n'étant pas toutes spécifiquement dédiées à la production de

cholestérol, une partie des intermédiaires produits sont détournés pour d'autres utilisations cellulaires (prénylation et N-glycosylation des protéines, ...).

La synthèse débute par la condensation de deux acétyl-coenzyme A (acétyl-CoA), sous l'action de l'enzyme thiolase, en acéto-acétyl-CoA (Fig. 15). Ce dernier est condensé avec une autre molécule d'acétyl-CoA, donnant naissance au 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA (HMG-CoA), l'enzyme impliquée étant la HMG-CoA synthétase. La réaction suivante correspond à la réduction du HMG-CoA en mévalonate par l'enzyme **HMG-CoA réductase**. Il s'agit de l'étape limitante de la synthèse du cholestérol et c'est à son niveau qu'opèrent les principaux mécanismes de régulation. La synthèse se poursuit par plusieurs réactions qui conduisent à la production de squalène, précurseur de l'ensemble des stéroïdes. La cyclisation du squalène aboutit au lanostérol. A partir de ce composé, deux voies de synthèse du cholestérol ont été caractérisées, qui font toutes deux appel aux mêmes enzymes mais qui diffèrent par l'étape à laquelle la double liaison de la chaîne latérale (C24) est réduite. Cette réaction est catalysée par la 24-déhydrocholesterol réductase (DHCR24). Dans la voie de **Bloch** (1965), la biosynthèse se déroule sans réduction de la chaîne latérale, jusqu'à la dernière étape qui correspond à la conversion du desmostérol en cholestérol. Dans la voie de **Kandutsch et Russell** (1960), c'est directement le lanostérol qui est réduit. A partir du dihydrolanostérol produit, les réactions s'enchainent jusqu'au lathostérol, puis au 7-déhydrocholestérol et enfin au cholestérol. En 2015, Mitsche et al. ont cependant démontré que, chez la souris, aucun tissu ne semble utiliser la voie de Kandutsch-Russell tel qu'initialement décrite. Les auteurs proposent une voie hybride, dans laquelle le lanostérol suit la voie de Bloch jusqu'au zymostérol, étape à laquelle la chaîne latérale est réduite. La validité de cette proposition est confortée par l'étude de Bae et Paik (1997) qui rapporte que le substrat préférentiel de l'enzyme DHCR24 est le zymostérol et non pas le lanostérol. Par ailleurs, l'utilisation préférentielle de la voie de Bloch ou de la voie de Kandutsch-Russell (ou voie de Kandutsch-Russell modifiée) dépendrait du type cellulaire et des conditions environnementales.

Les premières étapes de la biosynthèse se déroulent dans le cytosol, les mitochondries, les peroxysomes et le réticulum endoplasmique (Faust et Kovacs., 2014). A partir du squalène, les réactions se poursuivent uniquement dans le réticulum endoplasmique, qui est donc le lieu de genèse du cholestérol. Une fois produit, il est distribué aux différents compartiments membranaires,

membrane plasmique et membrane des organites, par voie vésiculaire ou via des protéines de transport (pour revue, voir Arenas et al., 2017).

Presque toutes les cellules de l'organisme semblent capables de synthétiser du cholestérol. Dans certains types cellulaires la synthèse est cependant plus efficace que dans d'autres et celle-ci est couplée à la production de lipoprotéines, particules qui permettent l'export de cholestérol et donc sa distribution aux autres types cellulaires. Chez le rat et la souris, les hépatocytes et les entérocytes sont les principaux lieux de synthèse et d'export du cholestérol. Chez l'Homme le débat est encore ouvert (Dietschy et Gamel. 1971, Dietschy et al., 1993, McFarlane et al., 2014).

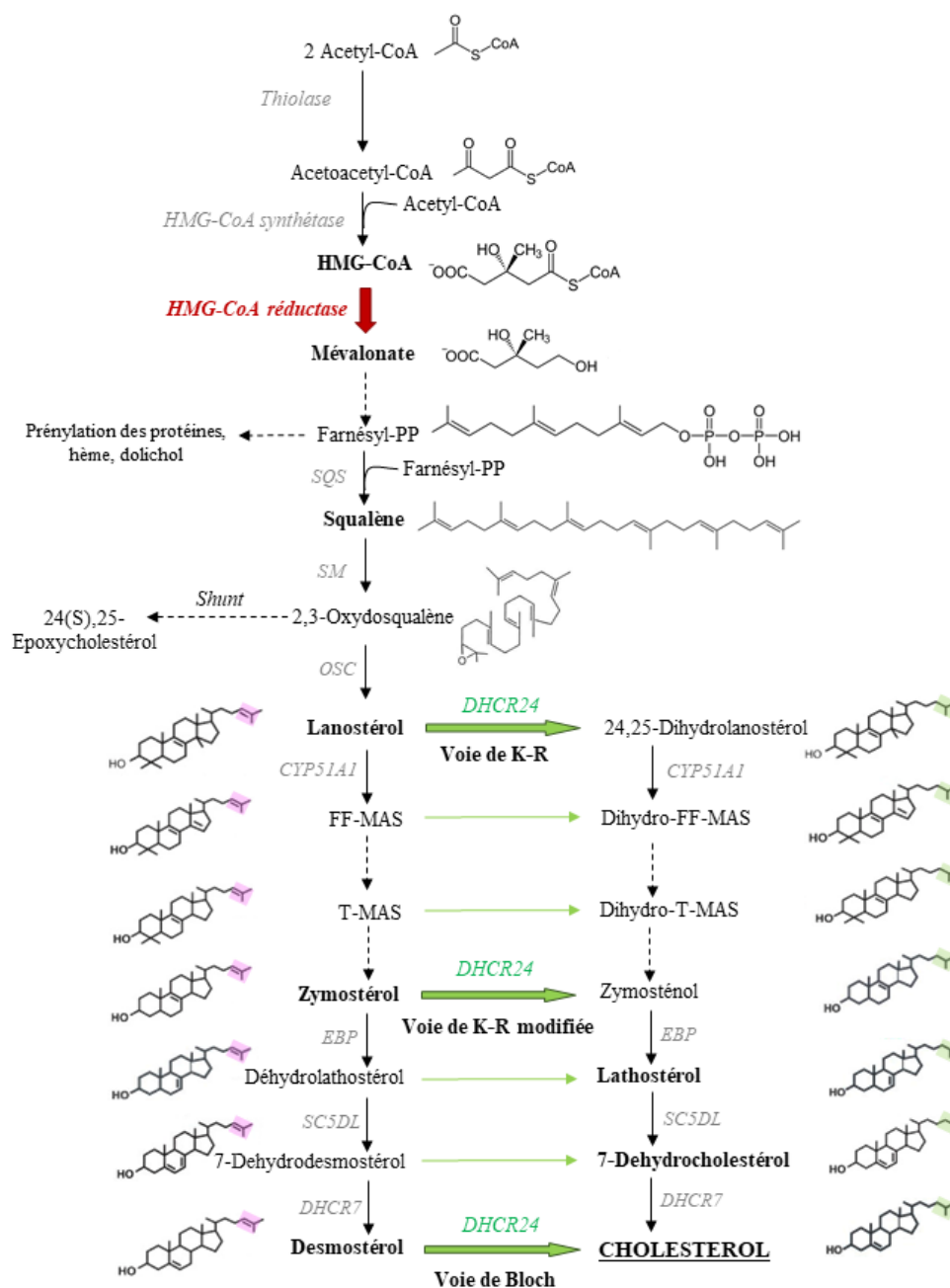


Figure 15. Voies de biosynthèse du cholestérol.

Les flèches pleines représentent chacune une réaction. Les flèches en pointillé représentent chacune plusieurs réactions, pour lesquelles seul le substrat initial et le produit final sont indiqués. En gris, certaines des enzymes impliquées. En rouge est représentée l'étape limitante de la synthèse du cholestérol, réaction catalysée par la HMG-CoA réductase. En vert, la réaction de réduction catalysée par l'enzyme DHCR24.

Farnésyl-PP : farnésyl pyrophosphate, SQS : squalène synthase, SM : squalène monooxigénase, OSC : oxydosqualène cyclase, DHCR24 : 24-dehydrocholestérol réductase, EBP : 3-béta-hydroxystéroïde-Delta (8), Delta (7)-isomérase, SC5DL : lathostérol oxydase, DHCR7 : 7-dehydrocholestérol réductase, Voie de K-R : voie de Kandutsch-Russell.

D'après Mitsche et al., 2015 et Cerqueira et al., 2016.

3.1.2. Transport plasmatique du cholestérol dans les lipoprotéines

Le cholestérol est une molécule trop apolaire pour être soluble dans les liquides biologiques. Dans la circulation sanguine et les milieux interstitiels, il est transporté, avec les triglycérides et les vitamines liposolubles, dans des **lipoprotéines** (Jonas et Phillips, 2008).

3.1.2.1. Structure générale des lipoprotéines

Les lipoprotéines sont composées d'une enveloppe hydrophile et d'un cœur hydrophobe (Fig. 16). L'enveloppe hydrophile correspond à une monocouche de lipides amphiphiles, principalement des phospholipides et du cholestérol non estérifié, dans laquelle sont enchâssées des protéines, les apolipoprotéines. Le cœur hydrophobe renferme les triglycérides, les esters de cholestérol et les vitamines liposolubles (Jonas et Phillips., 2008). Il est intéressant de noter que les lipoprotéines transportent d'autres stérols que le cholestérol, dont certains de ses précurseurs. Leurs concentrations plasmatiques sont d'ailleurs le reflet de la biosynthèse de cholestérol dans l'organisme (Ketomäki et al., 2003).

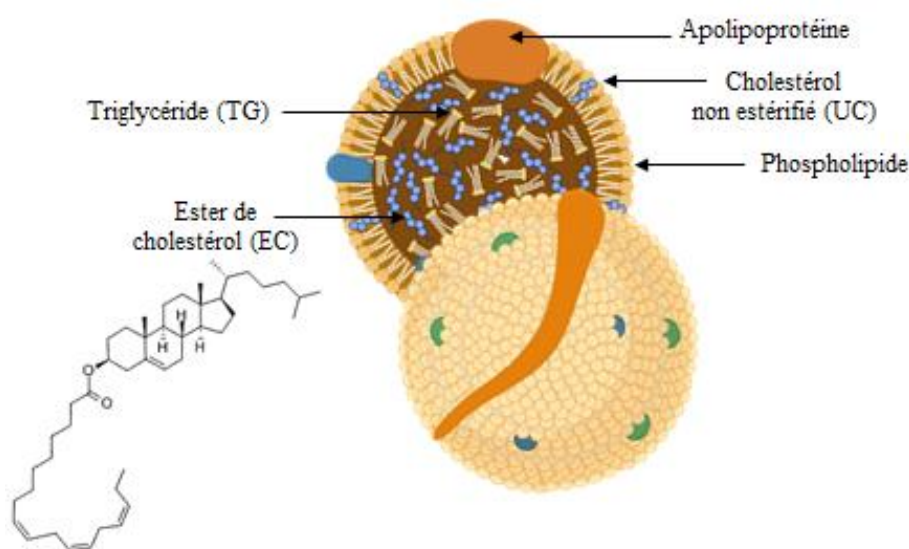


Figure 16. Structure simplifiée des lipoprotéines.

L'enveloppe hydrophile contient les apolipoprotéines et les lipides amphiphiles (phospholipides et cholestérol non estérifié). Le cœur hydrophobe renferme les triglycérides et les esters de cholestérol, c'est-à-dire les molécules de cholestérol estérifié par un acide gras.

Image vierge de la lipoparticule issue du site Biorender.

Les lipoprotéines sont des particules dynamiques, constamment remodelées en fonction des interactions qu'elles ont avec leur environnement. De leur naissance à leur utilisation par les cellules, elles subissent en permanence des transferts de lipides et d'apolipoprotéines, ainsi que des réactions enzymatiques sur les lipides qu'elles renferment (lipolyse, estérification) (Fig. 17).

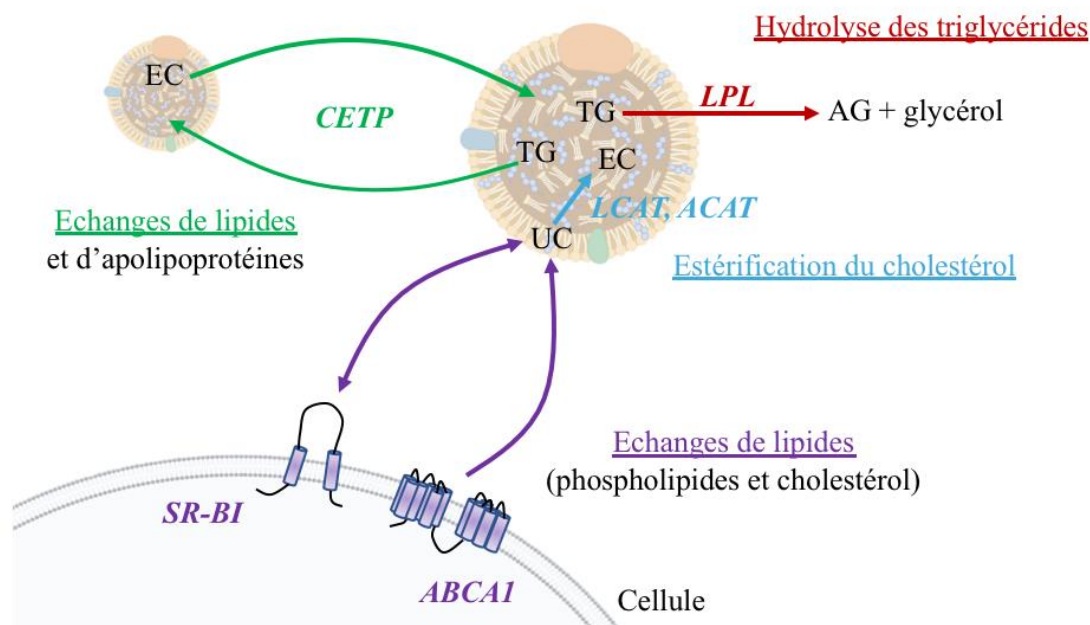


Figure 17. Dynamique des lipoprotéines.

De leur naissance à leur captation par les cellules, les lipoprotéines sont en constant remodelage.

ABCA1: ATP binding cassette A1, ACAT: Acyl-CoA cholestérol acyltransférase, CETP : Cholesterylester transfer protein, EC: Ester de cholestérol, LCAT: Lécithine-cholestérol acyltransférase, LPL : lipoprotein lipase, SR-BI: Scavenger receptor-BI, EC: Ester de cholestérol, TG: Triglycéride, UC: Cholestérol non estérifié.

3.1.2.2. Principaux types d'apolipoprotéines, et rôles physiologiques

Il existe une multitude d'apolipoprotéines. Chez l'Homme, les apolipoprotéines plasmatiques majoritaires sont les apoA (I, II et IV), les apoB (48 et 100), les apoC (I, II et III), l'apoD et l'apoE. D'autres apolipoprotéines, comme l'apo F ou l'apo J sont également présentes dans le plasma mais à de faibles concentrations. Le foie est le tissu synthétisant la plus grande quantité et la plus grande diversité d'apolipoprotéines, suivi de l'intestin. Les apolipoprotéines sont codées par des gènes distincts, à l'exception de l'apoB48 qui est issue d'une modification post-transcriptionnelle de l'ARNm (introduction d'un codon stop) du gène de l'apoB100. Cette modification étant tissu-

spécifique, l'apoB100 est plutôt exprimée dans le foie et l'apoB48 plutôt dans l'intestin (Powell et al., 1987, Chen et al., 1987).

Selon leur solubilité dans les liquides biologiques, on distingue les apolipoprotéines échangeables, comme les apoA, C et E, et les apolipoprotéines non échangeables, comme les apoB. Les apolipoprotéines échangeables sont solubles. Elles sont donc sécrétées sous forme libre puis lipidées dans le milieu extracellulaire ou la circulation sanguine. Ces apolipoprotéines sont d'ailleurs caractérisées par la présence d'hélices alpha-amphiphiles : ces motifs leur permettent de solubiliser les phospholipides et le cholestérol membranaire, en présence de certains transporteurs comme ABCA1, et ainsi de donner naissance à des lipoparticules (Phillips., 2018). Au contraire, les apolipoprotéines non échangeables sont insolubles dans les liquides physiologiques et ne sont donc pas sécrétées seules. Elles sont incorporées aux lipoprotéines formées dans les cellules, c'est-à-dire les chylomicrons des entérocytes pour l'apoB48 et les VLDL des hépatocytes pour l'apoB100. Elles restent liées à la même lipoprotéine de sa naissance à sa captation par les cellules (Jonas et Phillips., 2008).

Les apolipoprotéines sont des éléments indispensables à la fonctionnalité des lipoprotéines. Présentes à la surface de ces particules lipidiques, elles améliorent leur solubilité dans les milieux aqueux. Les apolipoprotéines assurent également la reconnaissance et la liaison avec les récepteurs aux lipoprotéines. Par exemple, l'apoE et l'apoB100 sont de puissants ligands des récepteurs aux LDL (LDL-R et apparentés) (Go et Mani, 2012). Enfin, les apolipoprotéines sont impliquées dans la régulation des enzymes de remodelage des lipoprotéines, l'apo A-I étant par exemple le principal activateur de la *lecithin-cholesterol acyltransferase* (LCAT) et l'apo C-II de la lipoprotéine lipase (LPL) (Sorci-Thomas et al., 2009, Olivecrona et Beisiegel., 1997). Au contraire, les apoC-I et C-III seraient des inhibiteurs de la LPL (Larsson et al., 2013).

3.1.2.3. Classes de lipoprotéines : composition lipidique et protéique

Les lipoprotéines sont subdivisées en classes en fonction de leur densité, paramètre proportionnel au ratio protéine / lipide qu'elles renferment (Fig. 18). Les chylomicrons sont les plus riches en lipides et donc les moins denses. Ils sont en effet composés à 98 % de lipides et ont une densité inférieure à 0,94 g/ml. Par ordre croissant de densité, les classes de lipoprotéines suivantes sont les VLDL (*Very low density lipoprotein*), les IDL (*Intermediate density lipoprotein*) et les LDL (*Low density lipoprotein*). Enfin, les HDL (*High density lipoprotein*) sont les particules les plus denses (1,063-1,210 g/ml) et donc les plus pauvres en lipides (45 %). Le diamètre des lipoprotéines étant inversement proportionnel à leur densité, les chylomicrons sont les particules les plus grosses et les HDL les plus petites.

Plus que par leur teneur en lipides totaux, les différentes classes de lipoprotéines sont caractérisées par leur composition lipidique (Fig. 18). Les chylomicrons et les VLDL sont les plus riches en triglycérides mais les plus pauvres en cholestérol, ce dernier représentant, respectivement, en moyenne 5 et 27,5 % des lipides totaux dans ces particules. Les LDL sont au contraire pauvres en triglycérides mais sont les particules les plus riches en cholestérol (60% des lipides totaux). Les HDL sont les lipoprotéines qui contiennent le moins de triglycérides mais des taux élevés de cholestérol (41,5%). A noter que, quel que soit le type de lipoprotéine considérée, le cholestérol est en grande majorité présent sous forme estérifié. La synthèse des esters de cholestérol peut avoir lieu dans les cellules, sous l'action de l'enzyme ACAT qui transfère l'acide gras d'un acyl-coA sur le groupement hydroxyl du cholestérol (Chang et al., 2009). Dans les entérocytes la majorité du cholestérol absorbé est estérifiée par la ACAT avant d'être incorporé dans les chylomicrons (voir Fig. 14). Le cholestérol peut également être estérifié au sein des lipoprotéines circulantes, grâce à la *lecithin-cholesterol acyltransferase* (LCAT) plasmatique. Cette enzyme utilise comme source d'acides gras les phosphatidylcholines présentes dans l'enveloppe des lipoprotéines. L'estérification par la LCAT a pour effet de relocaliser le cholestérol de l'enveloppe vers le cœur des lipoprotéines, étape essentielle pour la maturation des HDL. Enfin, la *cholesterylester transfer protein* (CETP) plasmatique stimule les transferts d'esters de cholestérol des HDL vers les VLDL et les LDL, et le transfert des

triglycérides dans le sens inverse. Ainsi, la CETP permet notamment de redistribuer les esters de cholestérol des HDL aux autres types de lipoprotéines (Jonas et Phillips., 2008) (Figs. 17 et 18).

En plus de présenter des compositions lipidiques différentes, les classes de lipoprotéines se distinguent par les types d'apolipoprotéines qui les composent. Nous n'allons pas faire de revue exhaustive des apolipoprotéines présentes dans chacun des types de lipoprotéines, mais citer uniquement les plus caractéristiques. Les chylomicrons sont caractérisés par la présence d'**apoB48**, mais contiennent également de l'apoC (II, II et III) et de l'apoE (Jonas et Phillips., 2008). L'apolipoprotéine majeure des VLDL, IDL et LDL est l'**apoB100**. Ces particules possèdent également de l'apoC, ainsi que de l'apoE, à des taux plus importants dans les VLDL que dans les IDL et les LDL : 25 à 50 % de l'apoE plasmatique seraient associés aux VLDL et 10 à 25 % aux IDL/LDL (Mendivil et al., 2013). Enfin, les HDL sont caractérisés par l'**apoA-I**, majoritairement, et l'apoA-II. Les HDL contiennent également de l'apoE, puisque 30 à 50 % du pool d'apoE plasmatique serait contenu dans ces particules (Mendivil et al., 2013). Enfin, elles possèdent également de l'apoC et de l'apoD, apolipoprotéine non conventionnelle dont les fonctions sont encore mal connues (Perdomo et Henry Dong., 2009).

A noter que, au sein de chaque classe de lipoprotéines, les particules sont légèrement hétérogènes en termes de densité, de taille, de composition lipidique et protéique. Ainsi, les classes sont subdivisées en sous-classes en fonction de ces différents critères. Les HDL sont par exemple classés en fonction de leur densité ou de leur teneur en apoA-II (Zhou et al., 2015, Jonas et Phillips., 2008).

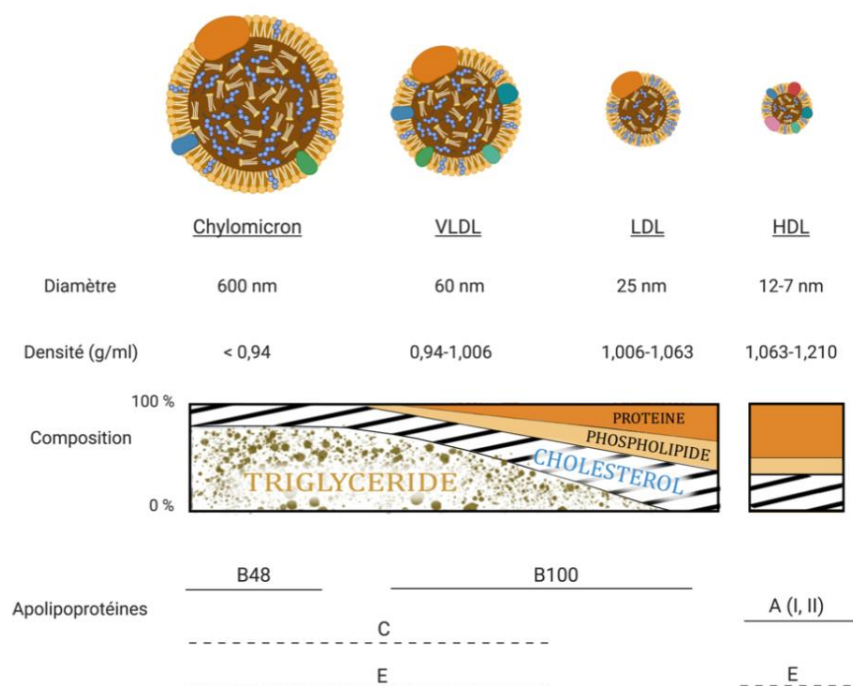


Figure 18. Principales classes de lipoprotéines plasmatiques : composition lipidique et protéique.

Les lipoprotéines sont classées en fonction de leur densité. Les chylomicrons sont les moins denses, les plus gros et les plus riches en triglycérides. Les LDL sont de densité moyenne, de petit diamètre et sont les plus riches en cholestérol. Les HDL sont les particules les plus denses, les plus petites et présentent une teneur en cholestérol un peu inférieure à celle des LDL. Les apolipoprotéines caractéristiques de chacun des types de lipoparticules sont indiquées par un trait plein. Certaines de leurs apolipoprotéines secondaires sont indiquées par un trait pointillé.

Illustration réalisée sur le site Biorender, d'après Jonas et Phillips, 2008.

3.1.2.4. Rôles des différentes classes de lipoprotéines

L'origine, la dynamique et la composition des lipoprotéines sont spécifiques de chacune des classes. Ces caractéristiques leur confèrent des propriétés fonctionnelles distinctes, mais cependant complémentaires.

Les chylomicrons, sécrétés par les entérocytes, transportent les lipides de l'intestin vers le foie (Fig. 19). Dans la circulation, ils acquièrent de nouvelles apolipoprotéines et libèrent des acides gras issus de l'hydrolyse des triglycérides qu'ils contiennent. Cette réaction est catalysée par la lipoprotéine lipase (LPL), enzyme localisée à la surface de l'endothélium vasculaire (Preiss-Landl et al., 2002). Les muscles et le tissu adipeux sont des organes qui expriment fortement la LPL. Les muscles utilisent les acides gras comme source d'énergie immédiate et le tissu adipeux les stocke sous forme de triglycérides. Dans le sang, les chylomicrons sont également soumis à l'action de la CETP, qui

échange une partie de leurs triglycérides contre des esters de cholestérol contenus dans les HDL. Les chylomicrons délestés de leurs triglycérides sont alors nommés chylomicrons remnants et sont captés par les hépatocytes.

Dans le foie, les triglycérides et le cholestérol, issus des chylomicrons remnants et de la biosynthèse endogène de ces composés par les hépatocytes, sont incorporé aux VLDL. Ces particules sont sécrétées dans la circulation et, via l'hydrolyse des triglycérides qu'elles transportent, délivrent des acides gras aux tissus périphériques. Sous l'action de la CETP, les VLDL perdent leurs triglycérides et se chargent petit à petit en esters de cholestérol. Elles acquièrent également de nouvelles apolipoprotéines et passent de VLDL à IDL puis LDL. Les LDL sont reconnues par les récepteurs de la famille du LDL-R et permettent ainsi de délivrer le cholestérol aux cellules périphériques selon leur besoin (voir paragraphe III.3.1.3, page 87).

Au contraire, les HDL prennent en charge l'élimination du cholestérol des tissus périphériques et son retour vers le foie, lieu où il sera recyclé ou catabolisé en sels biliaires : c'est le transport reverse du cholestérol (voir paragraphe III.3.1.4.1, page 89). Le cholestérol contenu dans les HDL peut également être capté par les tissus stéroïdogènes pour leur synthèse hormonale.

recepteur 2. La structure globale des récepteurs de la famille du LDL-R est la même pour tous les membres et comprend : 1) une queue cytoplasmique contenant au moins un motif NPXY, qui joue à la fois le rôle de signal d'endocytose et de site de liaison pour des protéines adaptatrices de voies de signalisation, 2) Un domaine transmembranaire, 3) Au moins un domaine EGFP contenant des structures tertiaires β -propeller, permettant une rupture de la liaison récepteur/ligand à un pH acide, 4) un ou plusieurs domaines de liaison au ligand (Holtzman et al., 2012, Go et Mani., 2012).

Les récepteurs de la famille du LDL-R ont une grande variété de ligands. Dans le cadre du métabolisme des lipoprotéines, ils sont impliqués dans la reconnaissance de l'apoB100, apolipoprotéine caractéristique des LDL. Ils ont également une forte affinité pour l'apoE et seraient ainsi capables de lier, notamment, les chylomicrons remnants, les VLDL et les HDL (Go et Mani., 2012, Jeon et Blacklow., 2005).

La liaison d'une lipoprotéine sur un LDL-R (ou récepteur apparenté) entraîne l'endocytose du complexe ligand/récepteur. Dans les endosomes, l'acidification progressive du pH permet la dissociation de la lipoprotéine vis-à-vis du récepteur. Alors que le récepteur est recyclé à la membrane, la lipoprotéine est dégradée dans les lysosomes (Go et Mani., 2012, Defesche, 2004). La lipase acide hydrolyse les triglycérides et les esters de cholestérol, libérant des acides gras et du cholestérol libre (Zhang, 2018). Ce dernier est pris en charge par les protéines Niemann-Pick type C1 et C2 (NPC1 et NPC2) qui le conduisent à la membrane plasmique ou à la membrane du réticulum endoplasmique (Vance et Peake, 2011).

3.1.4. Voies d'éliminations du cholestérol

Dans les cellules des tissus périphériques, le cholestérol peut être éliminé sous forme native, via son transport réverse par les HDL ou être converti en oxystérol. Sous l'une ou l'autre de ces formes, il est au final délivré au foie qui, par la synthèse d'acides biliaires, permet son évacuation hors de l'organisme. Le cholestérol peut également être excrété dans la lumière intestinale par voie trans-intestinale (TICE).

3.1.4.1. Des tissus vers le foie : transport reverse du cholestérol médié par les HDL

Les HDL natives ou préβHDL sont des particules composées d'apoA-I et de quelques molécules de phospholipides. Elles sont sécrétées par les hépatocytes et les entérocytes, mais sont également directement générées dans la circulation à partir des chylomicrons (pour revue, voir Gautier et al., 2011). A noter que l'apoE serait également capable de participer à la genèse de particules HDL natives (Zannis et al., 2008).

Grâce à l'apoA-I (ou l'apoE) et leurs hélices amphiphiles, les préβHDL interagissent avec le transporteur ABCA1 localisé à la surface des cellules. Ce dernier permet de transférer des phospholipides et du cholestérol membranaire, des cellules vers les lipoparticules naissantes. Sous l'action de la LCAT plasmatique, le cholestérol est ensuite estérifié et passe au cœur des particules. De forme discoïdale au départ, les préβHDL acquièrent petit à petit une forme sphérique au fur et à mesure qu'elles se gorgent de cholestérol, devenant ainsi des HDL matures (Gautier et al., 2011).

Les HDL peuvent alors interagir avec deux autres types de récepteurs, les récepteurs ABCG1 et *Scavenger B1* (SR-BI). ABCG1 a la même action que ABCA1 mais, contrairement à ce dernier, ne peut agir que sur des HDL déjà matures. Quant au récepteur SR-BI, il permet un transfert bidirectionnel du cholestérol, le flux net dépendant notamment du type cellulaire considéré. Par exemple, dans les tissus stéroïdogènes (et le foie) ce récepteur est plutôt impliqué dans la captation de cholestérol (Acton et al., 1996). Notons que SR-BI a une forte affinité pour les HDL, mais est également capable de lier les LDL et les VLDL.

Les HDL sont au final pris en charge par le foie, notamment via le récepteur SR-BI exprimé par les cellules de l'endothélium hépatique (Ganesan et al., 2016). Le cholestérol est transféré dans les hépatocytes dans lesquels il est recyclé ou catabolisé en fonction des besoins. Le cholestérol issu des HDL peut également être capté par les entérocytes et ainsi être éliminé par excrétion dans la lumière intestinale (voir paragraphe III.3.1.4.4. TICE, page 92).

3.1.4.2.Synthèse des oxystérols

Comme leur nom l'indique, les oxystérols sont des dérivés oxydés du cholestérol (ou de ses précurseurs). L'oxydation peut avoir lieu sur le noyau stérane ou sur la chaîne latérale. Cette réaction peut résulter d'un phénomène d'auto-oxydation, notamment en présence de ROS, ou être catalysée par des enzymes de la famille des cytochromes P450 (CYP) (Souidi et al., 2004). Par exemple, l'enzyme mitochondriale CYP27A1 catalyse la production de 27-hydroxycholesterol (27-OHC) et dans certains types cellulaires d'acide 3 β -hydroxy-5-cholestenoïc (27-COOH). Cette enzyme est exprimée dans tous les tissus de l'organisme, mais joue un rôle particulièrement important dans les hépatocytes et les macrophages (Andersson et al., 1989, Björkhem et al., 1994). La CYP46A1, synthétisant le 24(S)-hydroxycholestérol (24S-OHC), est quant à elle exprimée spécifiquement dans les tissus nerveux (Lund et al., 2003).

Au final, le terme oxystérol recouvre une très grande famille de molécules aux origines et fonctions biologiques variées. Les principaux oxystérols détectables dans le plasma chez l'Homme sont présentés en Figure 20.

La synthèse d'oxystérols par voie enzymatique représente, pour les cellules extra-hépatiques, une voie d'élimination du cholestérol complémentaire du transport reverse. En effet, la fonction -OH supplémentaire des oxystérols leur confère une plus grande capacité à traverser les membranes et facilite leur catabolisme par les hépatocytes (Björkhem, 2006, Meaney et al., 2002). Ainsi, une fois synthétisés, les oxystérols diffusent rapidement hors des cellules et passent dans la circulation sanguine. Dans ce compartiment, leur transport serait assuré par les lipoprotéines plasmatiques, principalement de type HDL chez l'Homme, à l'exception du 27-COOH qui serait transporté par l'albumine (Burkard et al., 2007, Babiker et al., 1997). Les oxystérols sont captés par les hépatocytes, dans lesquels ils servent de précurseurs pour la synthèse des acides biliaires.

L'importance des oxystérols en tant que voie d'élimination du cholestérol est plus ou moins grande selon les tissus. Nous verrons que la synthèse d'oxystérols, et plus particulièrement de 24S-OHC, est capitale dans le système nerveux.

Enfin, il est important de noter que, plus que de simples produits d'élimination, les oxystérols joueraient le rôle de molécules de signalisation impliquées dans la régulation du métabolisme du cholestérol (cf. paragraphe III.3.2.4.).

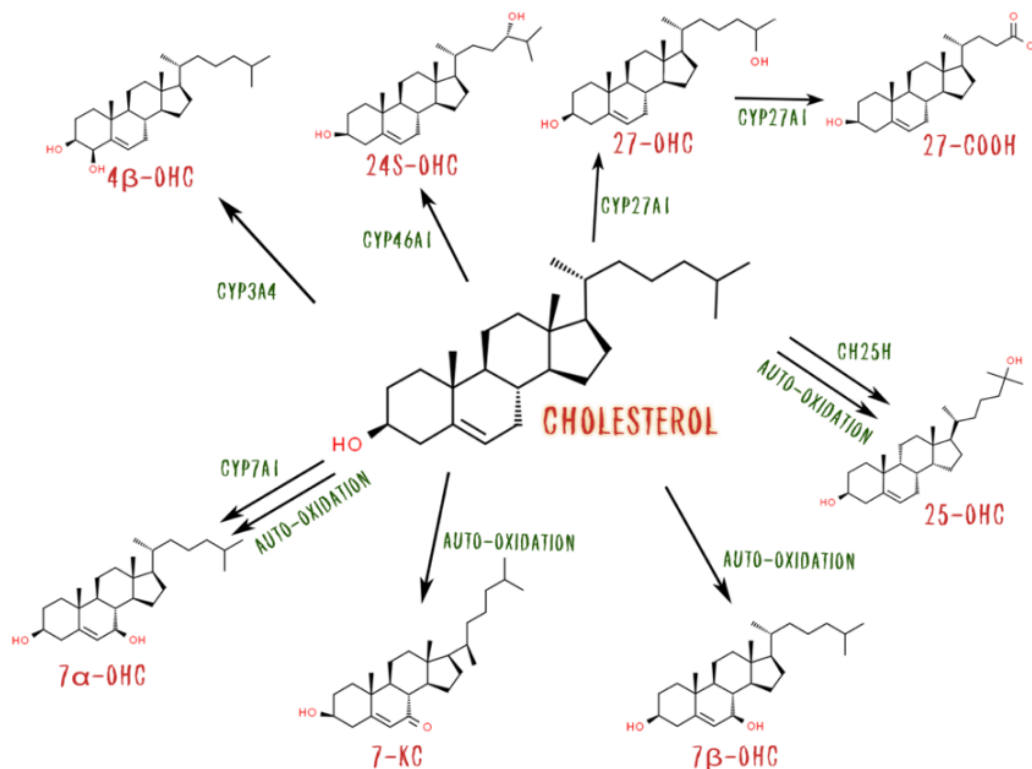


Figure 20. Oxystérols majeurs du plasma humain.

Les oxystérols sont des dérivés oxygénés du cholestérol. Ils sont issus soit d'une synthèse enzymatique, soit du phénomène d'auto-oxydation. A noter que le 27-COOH ne provient pas de l'oxydation du cholestérol, mais de celle du 27-OHC, réaction catalysée par l'enzyme CYP27A1.

24S-OHC : 24(S)-hydroxycholestérol, 27-OHC : 27-hydroxycholesterol, 27-COOH : 3 β-hydroxy-5-cholestenoic acid, 25-OHC : 25-hydroxycholesterol, 7β-OHC : 7β-hydroxycholesterol, 7α-OHC : 7α-hydroxycholesterol, 4β-OHC : 4β-hydroxycholesterol. CH25H : cholesterol 25-hydroxylase.

D'après Filomenko et al., 2015.

3.1.4.3. Catabolisme du cholestérol et des oxystérols en acides biliaires

Les hépatocytes sont les seules cellules capables de dégrader le cholestérol et les oxystérols en grande quantité car elles expriment très fortement l'enzyme CYP7A1, limitante dans la synthèse des acides biliaires. Ces cellules expriment également l'enzyme CYP27A1, à l'origine d'une voie alternative, dite « voie acide » (Chiang, 2017).

Environ 98 % des sels biliaires sécrétés dans la lumière intestinale sont réabsorbés dans la partie distale de l'intestin, rejoignent la veine porte et sont recaptés par les hépatocytes. Ils peuvent être à nouveau sécrétés dans la bile et subir un nouveau cycle de recyclage. Les 1 à 2 % des sels biliaires qui ne sont pas réabsorbés sont éliminés dans les fèces, ce qui correspond à 0,4 g de cholestérol perdu par jour sous cette forme (Cohen, 2016)

3.1.4.4. Excrétion trans-intestinale du cholestérol (TICE)

Dans les entérocytes, le cholestérol a une origine triple. Il provient à la fois de la lumière intestinale, de la biosynthèse par les entérocytes eux-mêmes et de l'interaction de lipoprotéines avec des récepteurs LDL-R et SR-BI localisés à la membrane basale des entérocytes (Fig. 14).

Le TICE correspond à l'excrétion du cholestérol, par les entérocytes, dans la lumière intestinale et donc son élimination dans les fèces (Reeskamp et al., 2018, Cohen, 2016). Cet efflux de cholestérol est médié par les transporteurs ABCG5/G8 exprimés dans la membrane apicale des entérocytes.

Le mécanisme de TICE est une voie importante d'élimination du cholestérol de l'organisme, qui est complémentaire de la synthèse des acides biliaires par les hépatocytes.

3.1.5. Régulation du métabolisme du cholestérol

Le cholestérol est un composé indispensable au fonctionnement de l'organisme et dont la quantité doit globalement rester stable. Ainsi, au même titre que la glycémie ou que l'équilibre ionique, l'homéostasie du cholestérol doit être maintenue.

De multiples mécanismes de régulation du métabolisme du cholestérol existent dans notre organisme, afin que les entrées et les sorties s'équilibrent parfaitement. Ces mécanismes agissent de manière complémentaire et coordonnée sur les différentes étapes du métabolisme du cholestérol (Brown et Goldstein, 2009). Par exemple, un apport alimentaire de cholestérol augmenté doit être compensé par une diminution de son absorption intestinale, une diminution de sa biosynthèse et/ou une augmentation de son élimination hépatique et entérocytaire (TICE). D'un point de vue moléculaire, les régulations opèrent sur les acteurs clés du métabolisme du cholestérol, au niveau

transcriptionnel ou post-transcriptionnel/traductionnel, et modulent ainsi leur expression ou leur activité. Les signaux d'activation de ces mécanismes de régulation sont principalement le cholestérol lui-même, certains de ses précurseurs et des oxystérols.

La régulation transcriptionnelle de l'homéostasie du cholestérol met principalement en jeu deux types de facteurs de transcription : les *Liver X receptors* (LXRs) et les *Sterol regulatory element-binding proteins* (SREBPs) (Fig.21). Nous ne parlerons pas des autres types de récepteurs, comme le *peroxisome proliferator-activated receptor* (PPAR) ou les oxysterol-binding protein (OSBP), qui sont également impliqués dans ces régulations. En plus de ces voies traditionnelles, des mécanismes épigénétiques, modulant la transcription des gènes clés du métabolisme du cholestérol, ont également été mis en évidence (pour revue voir Meaney, 2014)

3.1.5.1. Les facteurs de transcription LXR

Les LXR appartiennent à la superfamille des récepteurs nucléaires. À la base identifiés comme récepteurs « orphelins », c'est-à-dire sans ligand connu, les LXRs ont été « adoptés » lors de la découverte des oxystérols comme étant leurs ligands endogènes (Janowski et al., 1996). Parmi les oxystérols capables d'activer les LXR, citons par exemple le 24S-OHC, le 27-OHC et le 22(R)-hydroxycholestérol, un intermédiaire dans la synthèse des hormones stéroïdiennes. Le 24(S), 25-epoxycholesterol serait quant à lui l'oxystérol le plus affiné pour les LXR et donc l'agoniste endogène le plus puissant (Lehmann et al., 1997). Contrairement aux autres oxystérols, ce composé n'est pas issu de l'oxydation du cholestérol mais de celle du mono-oxidosqualène, intermédiaire entre le squalène et le lanostérol. La synthèse du 24(S), 25-epoxycholesterol correspond donc à un shunt dans la voie de biosynthèse du cholestérol (Gill et al., 2008). Certains précurseurs du cholestérol, comme le desmostérol et le zymostérol, ont également été identifiés comme ligands des LXRs. En revanche, le cholestérol lui-même ne semble pas capable d'activer ces récepteurs (Yang et al., 2006).

Les LXRs présentent une structure et un fonctionnement typiques de la famille des récepteurs nucléaires. Ils se lient sur des séquences régulatrices de l'ADN, les *LXR response element* (LXRE) présents dans le promoteur de gènes cibles, où ils forment un hétérodimère avec le récepteur de l'acide

rétinoïque (RXR). La liaison d'oxystérols et/ou d'acide rétinoïque sur le dimère active la transcription du gène cible. En 2008, Wang et al., ont proposé l'existence d'éléments de réponses négatifs (LXREn), qui permettraient au contraire aux LXRs activés d'inhiber la transcription du gène cible.

Ainsi, les LXRs sont mis en jeu lors d'une augmentation des taux d'oxystérols intracellulaires, qui reflète elle-même une augmentation du taux de cholestérol (ou précurseurs). Ils activent la transcription de gènes aux effets **hypocholestérolémiant**, permettant ainsi d'éviter une surcharge de cholestérol dans les cellules.

Les LXRs existent sous deux isoformes, LXR α et LXR β , codées par des gènes différents mais partageant un fort degré d'homologie (80% d'identité dans leur domaine de liaison à l'ADN) (Zhao et Dahlman-Wright, 2010). L'importance biologique de ces deux isoformes est encore mal comprise, mais il semblerait qu'elles aient des rôles tissus-spécifiques. Alors que l'isoforme β est ubiquitaire, la forme α prédomine dans les tissus à haute activité métabolique comme le foie, l'intestin grêle ou les macrophages (Zhao et Dahlman-Wright, 2010).

3.1.5.2. Les facteurs de transcription SREBP

Les SREBPs sont des facteurs de transcription qui, contrairement aux LXRs, sont activés par une diminution de la concentration intracellulaire en stérols et plus précisément, en cholestérols, certains de ces précurseurs, ou en oxystérols (Rodríguez-Acebes et al., 2009, Radhakrishnan et al., 2007). Ils ont pour effet d'activer la transcription de gènes aux effets **hypercholestérolémiant**.

En présence de stérols, SREBP est localisé dans la membrane du *reticulum endoplasmique*, lié à la protéine SCAP (*SREBP cleavage-activating protein*), elle-même liée à la protéine INSIG (*insulin-induced gene protein*). La diminution des taux de stérols intracellulaires entraîne la dissociation de SCAP et INSIG, exposant ainsi le signal d'adressage au Golgi présent sur SCAP. Le complexe SREBP-SCAP est donc exporté dans ce compartiment, où SREBP subit un double clivage protéolytique, libérant ainsi son domaine facteur de transcription dans le cytosol (Sato, 2010). Ce dernier rejoint le noyau et se lie à l'ADN sur les « *sterol response element* » (SRE) présents dans les promoteurs des gènes cibles, activant ainsi leur transcription (Cheng et al., 2018).

Il existe trois types d'isoforme de la protéine SREBP. SREBP1a et 1c proviennent de la transcription alternative du même gène, alors que SREBP2 est codé par un gène distinct. Dans le cadre de la régulation du métabolisme lipidique, les différentes SREBPs ont des rôles complémentaires. SREBP1c intervient dans la régulation du métabolisme des acides gras et des triglycérides, SREBP2 dans celle du métabolisme du cholestérol, et SREBP1a participe aux deux. (Cheng et al., 2018)

3.1.5.3. Régulation de l'absorption du cholestérol

La régulation de l'absorption intestinale du cholestérol est une voie majeure dans le contrôle de son homéostasie (Betters et Yu., 2010, McNamara et al., 1987). Dans les entérocytes, la transcription des gènes codant pour les transporteurs d'efflux ABCA1, ABCG5 et ABCG8 est activée par les récepteurs LXRs (Fig. 21). Au contraire, ces mêmes récepteurs nucléaires inhibent la transcription du gène codant pour la protéine NPC1L1 impliquée dans l'absorption du cholestérol depuis la lumière intestinale (Afonso et al., 2018). La transcription du gène de NPC1L1 serait au contraire activée par le facteur SREBP2 (Jia et al., 2011). Ce transporteur est également régulé d'un point de vue post-traductionnel, grâce à un domaine de sensibilité aux stérols qui entraîne son internalisation quand les entérocytes sont chargés en cholestérol (Yu et al., 2006).

La réabsorption des sels biliaires par les entérocytes est également soumise à des mécanismes de régulation que nous ne détaillerons pas ici (pour revue, voir Martínez-Augustin et Sánchez de Medina, 2008).

3.1.5.4. Régulation de la biosynthèse du cholestérol

La conversion du HMG-CoA en mévalonate, étape limitante de la biosynthèse du cholestérol, est catalysée par la HMG-CoA réductase. Cette enzyme est la cible d'un ensemble de mécanismes de régulations transcriptionnelles et post-traductionnelles qui agissent sur son expression et son activité.

Le gène codant pour la HMG-CoA réductase est sous contrôle du facteur SREBP2 qui active sa transcription lorsque la concentration cellulaire en stérols diminue (Fig. 21). Par ailleurs, la demi-vie de la protéine HMG-CoA réductase est dépendante de son ubiquitinylation, médiée par INSIG et le

complexe gp78 (pour revue voir DeBose-Boyd., 2008). Ce processus est activé par les oxystérols et certains précurseurs du cholestérol, comme le lanostérol et le 24,25 dihydrolanostérol, mais pas par le cholestérol lui-même.

L'activité enzymatique de la HMG-CoA réductase peut être régulée par phosphorylation qui, si elle a lieu sur une sérine proche du site catalytique, conduit à son inhibition. Ce mécanisme est mis en jeu lors d'un stress métabolique pour diminuer la synthèse de cholestérol, consommatrice d'énergie (Burg et Espenshade, 2011).

De nombreuses autres enzymes de la biosynthèse du cholestérol sont également régulées (Sakakura et al., 2001). Ceci concerne par exemple la squalène monooxygénase dont la transcription est également activée par le facteur SREBP2. Un mécanisme d'ubiquitinylation de cette enzyme, INSIG indépendant, a également été décrit (Afonso et al., 2018). Enfin, la transcription de l'enzyme squalène synthase et CYP51A, intervenant également dans la voie de biosynthèse du cholestérol, serait négativement régulée par le LXR α (Wang et al., 2008)

3.1.5.5. Régulation de la captation du cholestérol par les cellules

La captation de cholestérol par les cellules dépend de l'expression des récepteurs de la famille du LDL-R à leur membrane plasmique. Le taux d'expression de ces récepteurs est finement régulé en fonction de leurs besoins en cholestérol (Brown et Goldstein., 1975).

Au niveau transcriptionnel, la régulation du LDL-R est assurée par la protéine SREBP2 (Zhang et al., 2016b) (Fig. 21).

Par ailleurs, l'expression du LDL-R serait indirectement contrôlée par les facteurs LXRs. En effet, il a été montré que l'activation des LXRs augmente l'expression de la protéine IDOL (*Inducible Degradar of the LDL receptor*), ubiquitine ligase qui favorise la dégradation du LDL-R (Zelcer et al., 2009, Zhang, et al., 2012).

Enfin, en se liant au LDL-R, la protéine PCSK9 empêche son recyclage à la membrane et entraîne ainsi sa dégradation dans les lysosomes (Zhang, et al., 2016b).

3.1.5.6.Régulation de l'élimination du cholestérol

La régulation du transport réverse du cholestérol fait notamment intervenir les récepteurs LXRs. En effet, des séquences LXREs ont été identifiées dans les promoteurs des gènes codant pour l'apoE, le transporteur ABCA1 et le transporteur ABCG1 (Zhao et Dahlman-Wright, 2010, Laffitte et al., 2001, Sabol et al., 2005, Costet et al., 2000) (Fig.21). La régulation de la transcription du récepteur SR-BI est encore mal comprise. Elle est essentiellement décrite dans les tissus qui expriment le plus abondamment ce récepteur, c'est-à-dire le foie, les tissus stéroïdogènes et les macrophages. La régulation de SR-BI pourrait notamment impliquer les voies SREBP2 et LXRs, bien qu'une étude menée par Yu et al. (2004) dans les macrophages ait montré que ce ne serait pas le cas. L'AMPc et la protéine kinase C ont également été décrits comme pouvant stimuler l'expression de SR-BI (Gutierrez-Pajares et al., 2016).

L'élimination du cholestérol dépendant aussi de sa conversion en oxystérols, l'expression et l'activité enzymatique des CYP sont soumises à des régulations. Concernant CYP7A1, enzyme limitante dans la synthèse des acides biliaires, son expression est finement régulée au niveau transcriptionnel. Les acides biliaires eux-mêmes sont à l'origine d'une voie de rétrocontrôle négative qui serait principalement médiée par le *farnesoid X receptor*. Le facteur LXR α pourrait également participer à cette régulation chez la souris, mais sans doute pas chez l'Homme (Zhang et al., 2009). CYP27A1 est une autre enzyme importante dans la synthèse des acides biliaires. Plusieurs auteurs décrivent que ces derniers inhibent la transcription du gène de CYP27A1 dans des cultures d'hépatocytes (Twisk et al., 1995, Rao et al., 1999). En revanche, *in vivo*, les résultats ne sont pas concluants. L'équipe de Björkhem rapporte, par exemple, que l'administration d'acide chénodéoxycholique à des sujets humains ne modifie pas les taux hépatiques d'ARNm de cette enzyme (Björkhem et al., 2002). Par ailleurs, CYP27A1 est fortement exprimée par les macrophages, dans lesquels elle participe à l'élimination du cholestérol, processus indispensable pour éviter la formation de cellules spumeuses. Dans des macrophages en culture, Quinn et al. (2005) ont identifié une voie de régulation positive de la transcription de CYP27A1, indépendante de la charge en cholestérol dans les cellules et des LXRs, mais médiée par le récepteur PPAR γ . Outre les hépatocytes

et les macrophages, CYP27A1 est exprimée par de nombreux autres types cellulaires dans l'organisme, mais les régulations la concernant sont encore très peu décrites. Charvet et al. (2013) ont découvert, dans la rétine, une modification post-traductionnelle de CYP27A1 qui altère son activité enzymatique. Enfin, CYP46A1, dont l'expression est restreinte au système nerveux, est peu régulée au niveau transcriptionnel. Des modifications post-traductionnelles de l'enzyme ont en revanche été identifiées (cf. paragraphe III.3.2.4. page 106).

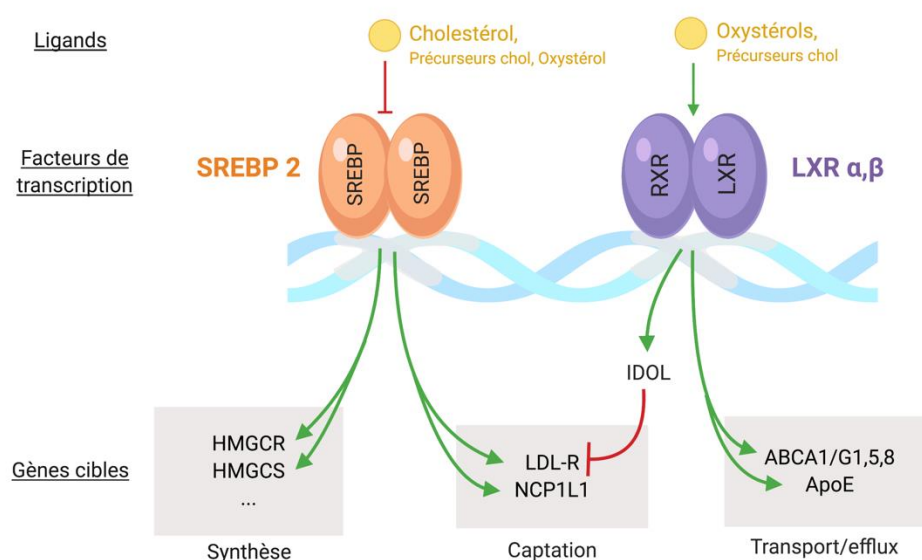


Figure 21. Régulation de la transcription de gènes clés du métabolisme du cholestérol par les facteurs de transcription SREBP 2 et LXR.

Illustration réalisée avec Biorender.

3.2. Métabolisme du cholestérol dans les tissus nerveux

La revue « *Cholesterol in the retina : the best is yet to come* », publiée par Pikuleva et Curcio en 2014, fait état des connaissances sur le métabolisme du cholestérol dans la rétine. La littérature étant encore peu abondante sur ce sujet d'intérêt récent, les auteurs mettent en regard les connaissances acquises dans la rétine avec celles obtenues dans le cerveau. Cette approche est pertinente dans la mesure où le cerveau et la rétine appartiennent tous les deux au système nerveux central et partagent de nombreuses similitudes.

3.2.1. Apports

Dans le cerveau, la barrière-hémato-méningée n'est pas, ou très peu, perméable à l'entrée de lipoprotéines plasmatiques. Les diverses études, menées chez l'animal et chez l'Homme, n'ont en effet pas permis de mettre en évidence de flux de lipoprotéines et de cholestérol du sang vers le cerveau (Pour revue, voir Dietschy et Turley, 2004). Par exemple, l'injection de cholestérol (^{14}C) à des babouins conduit à un marquage fort de tous leurs organes sauf ce dernier (Wilson et al., 1970).

Les apports de cholestérol cérébraux sont donc quasi-exclusivement assurés par une synthèse locale. Pendant le développement du système nerveux et plus précisément lors du processus de myélinisation des axones, les besoins en cholestérol sont très fortement accrus. C'est principalement la biosynthèse dans les oligodendrocytes qui permet de combler les besoins au cours de cette période (Dietschy et Turley, 2004). Chez l'adulte, ce sont les astrocytes qui assureraient principalement les apports de cholestérol. En effet, la biosynthèse dans les neurones étant peu efficace, notamment en raison d'une très faible expression de l'enzyme DHCR24, ils délègueraient cette tâche aux astrocytes (Nieweg et al., 2009). Ces auteurs ont également montré que la synthèse astrocytaire passerait principalement par la voie de Bloch. Par ailleurs, les astrocytes sont les premiers producteurs d'apoE dans le cerveau et seraient donc capables d'exporter, sous forme de lipoprotéines riches en apoE, le cholestérol qu'ils synthétisent (Elliott et al., 2010).

Contrairement à la barrière hémato-méningée, la barrière hémato-rétinienne externe est perméable aux lipoprotéines issues de la circulation sanguine. Le pool de cholestérol dans la rétine n'est donc pas, comme dans le cerveau, isolé du reste de l'organisme. La barrière hémato-rétinienne externe correspond au RPE, épithélium monostratifié de cellules jointives, dont la membrane basale fait face aux capillaires fenêtrés de la choroïde. Des travaux menés chez le rat (Tserentsoodol et al., 2006b) et le singe (Elner, 2002), ont montré que l'injection systémique de lipoprotéines, contenant un analogue fluorescent d'un dérivé du cholestérol, conduit dans un premier temps à un marquage du RPE, puis de toutes les couches de la neurorétine. Les particules LDL fluorescentes ont été décrites comme plus efficaces que les HDL, pour lesquelles le marquage rétinien était de plus faible intensité (Tserentsoodol et al., 2006b). Ainsi, ces résultats confirment l'entrée de cholestérol exogène dans la

rétilne, via le RPE, et indiquent que cet épithélium capte préférentiellement les lipoprotéines LDL. Le passage du cholestérol plasmatique à travers le RPE implique tout d'abord son entrée dans les cellules épithéliales, permise grâce à la présence de récepteurs aux lipoprotéines (LDL-R, SR-BI,II et CD36) exprimés à leur membrane basale (Tserentsoodol et al., 2006b, Duncan et al., 2002, Duncan et al., 2009). Le cholestérol est ensuite excrété à travers la membrane apicale du RPE et peut ainsi rejoindre la neurorétine (Fig. 22). La perméabilité de la barrière hémato-rétinienne **interne** aux lipoprotéines circulantes est encore inconnue. Étant donné sa structure proche de la barrière hémato-méningée, il est peu probable qu'elle soit très permissive à l'entrée de ces particules. Tachikawa et al. (2007) ont tout de même identifié la présence du récepteur SR-BI à la membrane des cellules de l'endothélium rétinien de rat.

Outre son origine exogène, le cholestérol rétinien provient de la biosynthèse qui a lieu *in situ* dans ce tissu. Lin et al., (2016) ont d'ailleurs montré que la production rétinienne représenterait la majorité (72 %) des apports de cholestérol. C'est principalement la rétine interne qui serait en charge de la biosynthèse. En revanche, aucun type cellulaire n'a pour l'instant été identifié avec certitude comme plus spécialisé dans cette fonction (Fliesler, 2015). Un faisceau d'arguments suggère que les cellules de Müller, macroglie majoritaire de la rétine, participeraient à la synthèse et à l'export de cholestérol. Par hybridation *in situ* et immunomarquage, sur des coupes de rétine de rat, Fliesler a décrit une expression forte de la HMGCR dans ces cellules (Fliesler and Bretillon., 2010). Cette affirmation est à confirmer chez l'Homme car, sur des coupes de donneurs post-mortem marquées pour cette enzyme, Zheng et al. (2012) n'ont pas observé le profil d'expression fibrillaire évocateur des cellules de Müller. Par ailleurs, il a été décrit sur des cultures primaires que ces cellules sécrètent de l'apoE et expriment les transporteurs ABCA1/G1 (Amaratunga et al., 1996, Ananth et al., 2014). Elles pourraient ainsi être à l'origine de la genèse de lipoprotéines de transport du cholestérol.

3.2.2. Transport et distribution aux neurones

Dans le cerveau, le transport intercellulaire du cholestérol est médié par des lipoprotéines *HDL-like* sécrétées par les astrocytes (Pfrieger et Ungerer, 2011). Ces particules, de densité similaire aux HDL plasmatiques, contiennent de l'apoE, de l'apoJ ou de l'apoA-I, les premières étant les plus riches

en cholestérol (Ito et al., 2014, Ito et Michikawa, 2014, DeMattos et al., 2001). Les astrocytes sont le principal lieu de synthèse d'apoE et d'apoJ, mais ne produisent pas d'apoA-I. Cette apolipoprotéine est issue de la circulation sanguine et serait également synthétisée par les cellules endothéliales des capillaires cérébraux (Elliott et al., 2011).

Le mécanisme de sécrétion des *HDL-like* par les astrocytes est encore mal compris et plusieurs hypothèses ont été émises (Karten et al., 2006, Ito et Michikawa, 2014). L'apoE étant synthétisée par les astrocytes, elle pourrait être lipidée dans les cellules et être ainsi directement sécrétée sous forme de lipoparticules. L'apoE pourrait également être sécrétée dans le milieu extracellulaire sous forme peu ou pas lipidée et être lipidée grâce à l'action du transporteur ABCA1 localisé à la membrane des astrocytes. Quelles que soit leur origine, ces particules peuvent ensuite être remodelées, notamment via leurs interactions avec les récepteurs ABCG1/G4 exprimés par les astrocytes et les neurones (Tarr et Edwards, 2008). Elles subissent également l'action de la LCAT, sécrétée par les astrocytes dans le milieu extracellulaire (Hirsch-Reinshagen et al., 2009). Les *HDL-like* sont au final captées par les neurones via leurs récepteurs aux lipoprotéines, dont principalement LRP1 (Ishiguro et al., 1995). Les astrocytes, exprimant le LDL-R, peuvent également recapter ces particules (Pitas et al., 1987). Enfin, les *HDL-like* pourraient aussi passer la barrière-hémato-méningée et être ainsi éliminées dans la circulation sanguine (cf. paragraphe III.3.2.3, page 102). Concernant les particules composées d'ApoA-I, cette apolipoprotéine d'origine exogène est lipidée dans le milieu extracellulaire sans doute sous l'action du transporteur ABCA1. Le rôle de ces particules est encore peu documenté, mais elles interviendraient notamment dans l'élimination du cholestérol via leur passage à travers la barrière-hémato-méningée (Gosselet et al., 2014). Quant aux particules riches en apoJ, leur mode de synthèse et leur rôle sont encore très peu décrits.

Dans la rétine, le transport du cholestérol impliquerait également des particules *HDL-like*, riches en apoE ou en apoA-I (Tserentsoodol et al., 2006a) (Fig.22). L'apoE est sécrétée par les cellules de Müller et le RPE, et l'apoA-I est synthétisée par le RPE mais provient aussi de la circulation sanguine. Le cholestérol exogène, issu des lipoprotéines plasmatiques captées à la membrane basale du RPE, pourrait-être exporté dans l'espace sous-rétinien sous forme de *HDL-like*, grâce aux transporteurs ABCA1/G1 fortement exprimé à la membrane apicale des cellules épithéliales (Ananth et al., 2014)

(Fig.22). Les cellules de Müller pourraient également être à l'origine de la synthèse de ce type de lipoparticule et ainsi exporter le cholestérol qu'elles ont synthétisé *de novo*. Les *HDL-like* seraient captées par les cellules avoisinantes, dont les neurones, qui expriment les récepteurs de la famille des LDL-R.

3.2.3. Élimination

Dans le cerveau, la production d'oxystérols, et plus précisément de 24S-OHC, est une voie majeure d'élimination du cholestérol (Björkhem, 2006). Elle permettrait d'éliminer 75 % du cholestérol chez l'Homme et 40 % chez la souris (Björkhem et al., 1998, Lund et al., 2003). Contrairement au cholestérol, le 24S-OHC peut passer librement les membranes et donc traverser la barrière hémato-méningée pour rejoindre la circulation sanguine. La conversion du cholestérol en 24S-OHC est catalysée par la monooxygénase CYP46A1, dont l'expression est presque exclusivement restreinte aux neurones du système nerveux central (Lund et al., 1999). Elle est synthétisée par une grande variété de neurones, localisés dans différentes régions du cerveau dont le cortex, l'hippocampe et le cervelet (Lund et al., 1999). Au niveau subcellulaire, CYP46A1 est localisée dans les corps cellulaires et les dendrites, ancrée à la membrane du *reticulum endoplasmique* (Ramirez et al., 2008). Son activité enzymatique, mesurée dans des systèmes *in vitro*, est très faible : 0,11 nmol de 24S-OHC produit par nmol d'enzyme par minute (Mast et al., 2008). Par ailleurs, il a été montré que, *in vitro*, CYP46A1 peut utiliser le 24S-OHC comme substrat et le convertir en d'autres oxystérols (Mast et al., 2003). Ces produits n'ont en revanche pas été détectés *in vivo*, ni chez l'Homme ni chez la souris (Björkhem, 2006). Enfin, CYP46A1 serait capable de métaboliser d'autres composés que le cholestérol, comme la progestérone et la testostérone, ou encore des xénobiotiques.

Par ailleurs, une partie du cholestérol cérébral serait éliminé sous forme native, via l'efflux de particules *HDL-like* dans la circulation sanguine. Les neurones et les astrocytes, exprimant les transporteurs ABCA1 et ABCG1/G4, pourraient transférer leur cholestérol à ces lipoparticules présentes dans leur environnement (Tarr et Edwards, 2008, Kim et al., 2006, Chen et al., 2013). Les *HDL-like* pourraient ensuite passer la barrière hémato-méningée, grâce aux récepteurs LRP1 et SR-BI

exprimés à la membrane des cellules endothéliales des capillaires cérébraux (Panzenboeck et al., 2002, Gosselet et al. 2009, Herz et Bock, 2002, Fung et al., 2017).

Dans la rétine, l'élimination du cholestérol passe également par sa conversion en oxystérols et son efflux via des lipoprotéines. Trois enzymes CYP ont été décrites comme impliquées dans l'oxydation du cholestérol : la CYP46A1, la CYP27A1 et la CYP11A1. Leurs expressions au sein des différentes couches de la rétine ont été principalement décrites chez l'Homme, le singe et les rongeurs (voir Pikuleva et Curcio., 2014). Les résultats étant variables entre les espèces et les études, nous décrirons ici les observations qui font consensus. CYP46A1 est principalement exprimée par les neurones de la couche des RGC, et dans une moindre mesure par le RPE. CYP27A1 semble ubiquitaire mais est plus fortement exprimée dans les segments internes des photorécepteurs. Elle serait également exprimée dans le RPE. Le profil d'expression de la CYP11A1 semble très différent entre l'Homme et le rat. Alors qu'elle est exprimée dans presque toutes les couches chez l'Homme, sa localisation est limitée à celle des RGC et à la nucléaire interne chez le rat. La quantification des taux protéiques des différentes CYP, chez l'Homme, a permis de mettre en évidence que, contrairement au cerveau, la CYP27A1 rétinienne est plus exprimée que la CYP46A1 (500 et 60 fmol/mg de protéine, respectivement) La CYP11A1 n'a été quantifiée que chez le bœuf mais, en tout cas dans cette espèce, elle est faiblement exprimée (6 fmol/mg protéine). De manière étonnante, le 27-OHC, produit de la CYP27A1, n'est pas quantifiable dans la rétine. Ce composé serait en totalité oxydé en 27-COOH, réaction catalysée par la CYP27A1 elle-même. Parmi les tissus extra-rétiens, la production de 27-COOH aurait principalement lieu dans les poumons, et plus précisément dans les macrophages alvéolaires (Babiker et al., 1999). D'après Mast et al. (2011), le 27-COOH serait l'oxystérol rétinien le plus abondant (37-125 pmol/mg protéine, chez l'Homme). Viendrait ensuite le 24S-OHC, synthétisé par la CYP46A1, et la pregnénolone, issue de la CYP11A1 (1-4 pmol/mg protéine et 2-4 pmol/mg protéine, respectivement). A noter tout de même que les quantifications de 27-COOH ont été réalisées sur des échantillons collectés 12h post-mortem, ce composé étant sans doute augmenté dans le temps qui suit la mort de l'individu (Mast et al., 2011).

L'efflux de cholestérol rétinien sous forme native, c'est-à-dire sans conversion en oxystérol, est sans doute assuré par la production de lipoprotéines à la membrane basale du RPE, mettant notamment

en jeu les apoE/A-I, les récepteurs ABCA1/G1 et SR-BI,II (Ananth et al., 2014, Tserentsoodol et al., 2006a). Les cellules épithéliales seraient également capables d'assembler des lipoprotéines contenant de l'apoB100 et du cholestérol estérifié en grande quantité, les « *Bruch membrane lipoparticles* » (Curcio et al., 2010). Ces particules seraient elles-aussi sécrétées à la membrane basale du RPE et pourraient rejoindre la circulation choroïdienne. Enfin, les lipoprotéines présentes dans l'environnement rétinien pourraient également traverser la barrière hémato-rétinienne interne, via les récepteurs SR-BI exprimés par les cellules endothéliales des capillaires rétiens (Tachikawa et al., 2007).

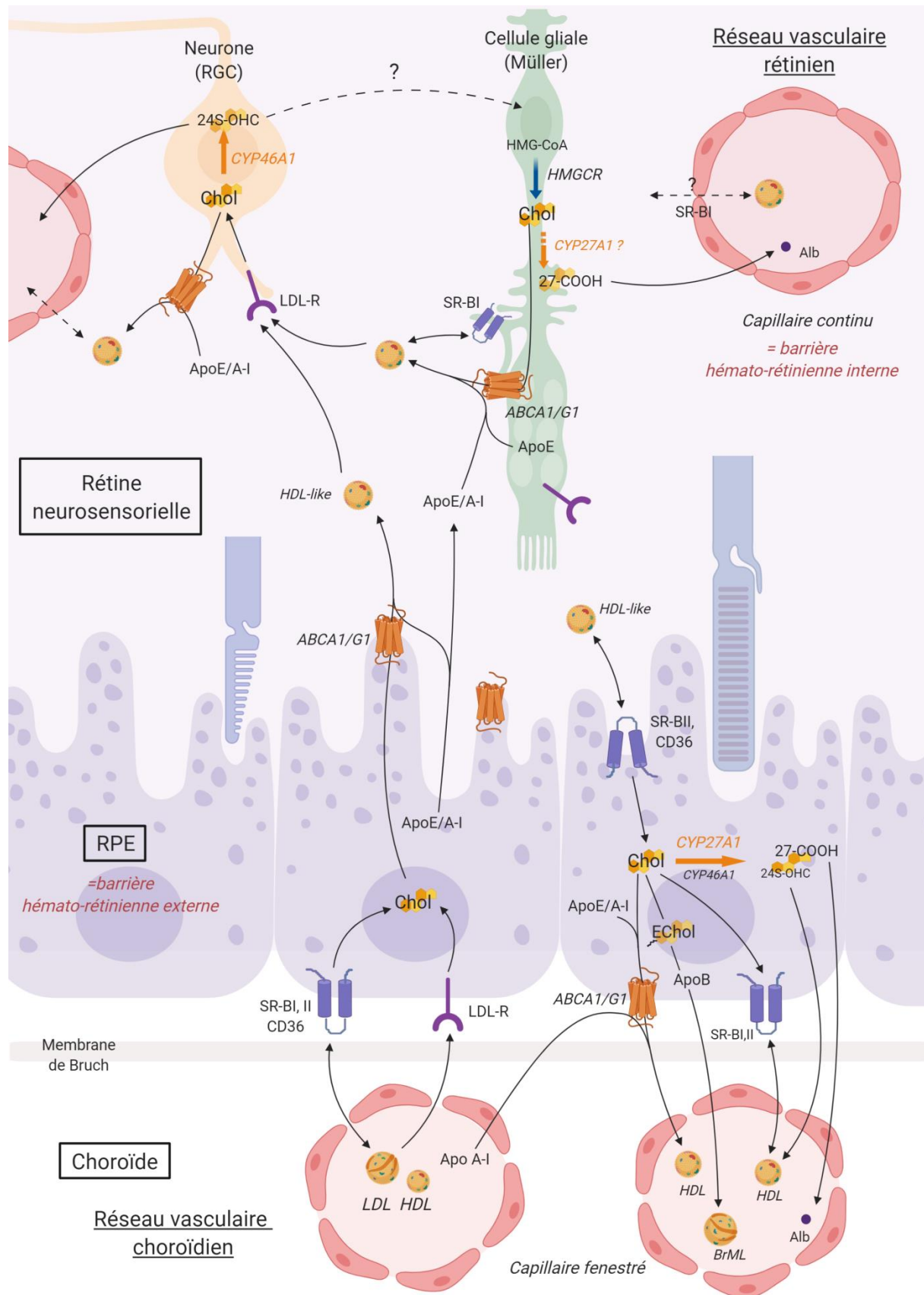


Figure 22. Représentation simplifiée du métabolisme du cholestérol dans la rétine..

BrML : Bruch Membrane lipoprotein, EChol : Ester de cholestérol, Alb : Albumine, 24S-OHC : 24(S)-hydroxycholestérol, 27-COOH : Acide 5-cholesténoïque. Illustration réalisée avec Biorender

3.2.4. Régulation du métabolisme du cholestérol

Dans le cerveau, le maintien de l'homéostasie du cholestérol implique, comme dans les autres organes, des mécanismes de régulation transcriptionnels (SREBPs, LXR dépendant) et post-transcriptionnels, qui agissent sur des acteurs clés du métabolisme du cholestérol. L'enzyme HMG-CoA réductase et les transporteurs ABC semblent être très régulés au niveau transcriptionnel. Au contraire, chez l'adulte, l'expression de l'enzyme CYP46A1 semble peu régulée au niveau transcriptionnel. Ohyama et al. (2006) ont décrit le promoteur du gène codant pour cette protéine comme similaire à celui des gènes de ménage, c'est-à-dire à celui des gènes constitutivement exprimés dans les cellules : absence de TATA ou CAAT boxes et séquence nucléotidique riche en GC. Dans plusieurs modèles cellulaires, les auteurs ont testé l'effet de divers stimuli, dont le cholestérol, des oxystérols, des hormones stéroïdiennes et des ROS, sur la transcription de CYP46A1. Hormis les ROS, qui ont augmenté significativement la transcription de l'enzyme, aucun des autres stimuli n'a eu d'effet. La production de 24S-OHC, par la CYP46A1, semble donc essentiellement déterminée par la disponibilité en substrat, c'est-à-dire en cholestérol. Mast et al. (2017) ont tout de même mis en évidence que l'activité enzymatique de CYP46A1 pourrait être régulée au niveau post-traductionnel par certains neurotransmetteurs, comme le glutamate.

Le maintien de l'homéostasie du cholestérol nécessite une communication efficace entre les astrocytes, plutôt impliqués dans la synthèse de cholestérol, et les neurones, plutôt impliqués dans son élimination. Le 24S-OHC, produit de l'enzyme CP46A1, pourrait-être une molécule signal au rôle central dans cette communication. Synthétisé spécifiquement par les neurones, en fonction de la quantité de cholestérol qu'ils renferment, cet oxystérol diffuse hors des cellules et passe ainsi dans l'espace extracellulaire. Il pourrait ensuite pénétrer dans les astrocytes environnants, dans lesquels il participerait à des régulations transcriptionnelles, notamment via les LXRs (Pfriegeer et Ungerer, 2011, Björkhem, 2006). En accord avec ce modèle, Abildayeva et al. (2006) ont décrit un effet positif du 24S-OHC sur l'expression des transporteurs ABC et de l'ApoE, spécifiquement dans des cultures astrocytaires mais pas dans des cultures neuronales. Par ailleurs, l'équipe de Björkhem a mis en évidence un flux entrant de 27-OHC dans le cerveau (Heverin et al., 2005). Cet oxystérol, majeur dans

le plasma mais peu produit dans le cerveau, participerait à la modulation du métabolisme du cholestérol dans cet organe, notamment via l'activation de la voie LXR (Zhang et al., 2015).

Dans la rétine, la régulation du métabolisme du cholestérol est encore peu décrite. Sur des coupes de rétines humaines, Zheng et al. (2012) ont réalisé des immunomarquages des facteurs de transcriptions classiquement impliqués dans la régulation du métabolisme du cholestérol. Ils ont décrit les complexes SREBPs/SCAP/INSIG et le récepteur nucléaire LXR β comme exprimés dans presque toutes les couches de la neurorétine, contrairement à LXR α qui n'est pas détecté. Ces données suggèrent un contrôle transcriptionnel du métabolisme du cholestérol dans ce tissu, médié par les facteurs SREBPs et LXR β . Dans le RPE, en revanche, les auteurs ont révélé l'absence de marquage SREBPs. La régulation du métabolisme du cholestérol dans les cellules épithéliales reposerait donc sur LXR β ou sur des modifications post-traductionnelles. Il a également été proposé que le métabolisme du cholestérol dans le RPE soit peu régulé, des études *in vitro* et *in vivo* montrant l'internalisation constante de particules LDL par ces cellules (Tserentsoodol et al., 2006b, Gordiyenko et al., 2004). Par ailleurs, sur des souris présentant une légère hypercholestérolémie rétinienne, consécutive à l'administration d'un régime enrichi en cholestérol, Zheng et al. (2015) n'ont pas observé de modification des taux de transcrits de la majorité des gènes clés du métabolisme du cholestérol. Ces résultats sont plutôt en faveur d'une régulation transcriptionnelle faible dans la rétine, sans doute compensées par des régulations post-traductionnelles, concernant notamment les enzymes HMG-CoA réductase et CYP27A1 (Zheng et al., 2015, Charvet et al., 2013).

Enfin, les rôles éventuels du 24S-OHC et du 27-COOH dans le maintien de l'homéostasie du cholestérol dans la rétine sont encore complètement inconnus. Ces données apporteraient pourtant des informations importantes sur les mécanismes de régulations qui opèrent dans ce tissu.

IV. Neurodégénérescence et métabolisme du cholestérol

De plus en plus d'études montrent que les maladies neurodégénératives sont associées à des altérations de l'homéostasie du cholestérol (pour revue, voir Vance, 2012). Certaines de ces pathologies, comme la maladie de Niemann-Pick type C ou le syndrome de Smith-Lemli-Optiz, sont connues pour être directement causées par un défaut dans le métabolisme du cholestérol. Pour d'autres maladies, le lien de cause à effet est moins clair. C'est le cas par exemple de la maladie d'Alzheimer et de Huntington, dans le cerveau, et de la dégénérescence maculaire liée à l'âge et du glaucome, dans la rétine.

1. Maladies neurodégénératives causées par un défaut d'homéostasie du cholestérol-Exemple de la maladie de Niemann-Pick type C

La maladie de Niemann-Pick type C est une pathologie monogénique rare qui touche en moyenne une naissance sur 120-150 000 en Europe (Vanier, 2010). L'âge auquel les symptômes se déclarent est très variable d'un individu à l'autre, allant de la période périnatale jusqu'à 50 ans. Les atteintes neurologiques, liées à la dégénérescence progressive des neurones, se caractérisent notamment par une ataxie et une démence. La pathologie résulte de mutations dans les gènes codant pour les protéines de transport du cholestérol NPC1 (95 % des cas) et NPC2 (5% des cas) (Nakasone et al., 2014). La perte de l'activité NPC1/2 rend impossible le transfert du cholestérol, endocyté via les LDL-R, des lysosomes au réticulum endoplasmique et à la membrane plasmique. Ceci conduit à une accumulation de cholestérol dans le premier compartiment et à un déficit dans les seconds (Liscum et al., 1989). Les conséquences cellulaires sont multiples puisque les lysosomes ne peuvent plus assurer leurs fonctions et que la composition des membranes est altérée, perturbant notamment la signalisation cellulaire et le phénomène de fusion/fission nécessaire à la libération des neurotransmetteurs par les neurones (Vance et Karten., 2014). Les causes exactes de la dégénérescence de ces derniers sont

cependant encore inconnues. Élucider les mécanismes impliqués pourrait non seulement permettre de développer des traitements de neuroprotection pour les patients atteints, mais également de mieux comprendre comment un défaut dans l'homéostasie du cholestérol conduit à la mort neuronale, ces mécanismes pouvant être communs à d'autres maladies. De nombreux modèles animaux de la maladie ont été développés. Il s'agit principalement de souris transgéniques, dont les gènes codant pour NPC1 ou NPC2 ont été mutés ou invalidés. Les phénotypes obtenus sont d'intensité variable d'un modèle à l'autre mais évoquent les signes cliniques observés chez l'Homme (Fog et Kirkegaard., 2019). Plusieurs études indiquent que les souris mutantes pour NPC1/C2 présentent de multiples altérations rétinienne (Yan et al., 2014), dont certaines seraient similaires à celles observées dans les maculopathies liés à l'âge (Claudepierre et al., 2010).

2. Maladies neurodégénératives associées à des défauts d'homéostasie du cholestérol

2.1. Neurodénérescence cérébrale-Exemple de la maladie d'Alzheimer

La maladie d'Alzheimer est une forme de démence, qui se déclare le plus souvent tardivement au cours la vie. La pathologie résulte d'une dégénérescence progressive des neurones, débutant dans l'hippocampe qui est une structure cérébrale impliquée dans la mémoire, et s'étendant ensuite au reste du cerveau (pour revue voir Long et Holtzman, 2019). Les deux marqueurs histologiques typiques de la maladie sont des agrégats extracellulaires du peptide bêta-amyloïde ($A\beta$), nommées plaques séniles, et des enchevêtrements fibrillaires intracellulaires de la protéine tau hyperphosphorylée. Les mécanismes par lesquels l'accumulation de ces deux protéines conduit à la mort neuronale sont loin d'être complètement élucidés, mais de nombreuses hypothèses ont été avancées. En ce qui concerne le peptide $A\beta$, Sotthibundhu et al (2008) proposent qu'il se lie à un récepteur membranaire de mort (p75NTR), déclenchant l'apoptose des neurones. Quant à la protéine tau, sa forme hyperphosphorylée n'est plus capable de stabiliser les microtubules, ce qui compromet le transport axonal et par

conséquence provoque la dégénérescence des terminaisons axonales, puis des corps cellulaires neuronaux (Alonso et al, 2018).

De nombreux facteurs de risque de développer la maladie d'Alzheimer ont été identifiés, dont certains concernent le métabolisme du cholestérol. Même si toutes les études épidémiologiques ne sont pas concordantes, plusieurs suggèrent que l'hypercholestérolémie prédispose à cette maladie (Pappolla et al. 2003, Kivipelto et al., 2001, Whitmer et al. 2005, Solomon et al., 2009). Dans un modèle d'hypercholestérolémie chez le lapin, induit par un régime enrichi en cholestérol, Sparks et al. (1994) ont d'ailleurs montré l'apparition de plaques séniles évoquant celles observées dans le cerveau de patients atteints d'Alzheimer. Sachant que la barrière hémato-méningée est imperméable aux lipoprotéines, il est étonnant que la modification du taux de cholestérol plasmatique puisse influencer le fonctionnement cérébral. Il est proposé que les oxystérols, pouvant librement passer la barrière, fassent le lien entre le compartiment sanguin et le cerveau (Gamba et al., 2015). De nombreux autres travaux *in vitro* et *in vivo* corroborent l'hypothèse selon laquelle des défauts de l'homéostasie du cholestérol sont impliqués dans le développement de la maladie d'Alzheimer (Gamba et al., 2012, Williamson et Sutherland., 2011, Maulik et al., 2013). D'une manière générale, un excès de cholestérol serait délétère pour la survie neuronale, notamment en augmentant l'activité de la β sécrétase, enzyme impliquée dans la synthèse de peptide A β . Dans le cerveau des patients Alzheimer, Cutler et al. (2004) ont décrit une augmentation des taux de cholestérol libre dans certaines régions du cortex. Des résultats similaires ont été obtenus par Xiong et al. (2008), qui, de manière cohérente, ont également décrit une réduction de l'expression cérébrale des facteurs LXR β chez les patients. En revanche, Mason et al. (1992) ont montré une diminution du cholestérol cortical chez les individus atteints et Eckert et al. (2000) n'ont pas détecté de changements. Par ailleurs, le variant ϵ 4 du gène de l'ApoE, a été identifié comme le facteur de susceptibilité génétique le plus fortement associé à la maladie d'Alzheimer (Corder et al., 1993). Au contraire, le variant ϵ 2 serait plutôt protecteur et le variant ϵ 3, le plus courant dans la population, serait neutre (Wu et Zhao, 2016). Ces allèles codent respectivement pour les isoformes E4, E2 et E3 de l'apoE. Cette protéine serait capable de lier le peptide A β et accélérerait son élimination (Elliott et al., 2011). *In vitro*, l'affinité de l'isoforme E4 pour le peptide A β est 20 fois inférieure à celle de E3, ce qui pourrait expliquer, au moins en partie,

pourquoi les personnes exprimant l'isoforme E4 sont plus susceptibles d'être atteints d'Alzheimer (LaDu et al., 1995). Parmi les prédispositions génétiques à cette pathologie, figurerait également le polymorphisme rs754203 dans le gène codant pour l'enzyme CYP46A1 (Papassotiropoulos et al., 2003, Fu et al., 2009, Wang et al., 2004). Des travaux menés par l'équipe de N. Cartier ont d'ailleurs mis en évidence que l'inhibition de cette enzyme dans l'hippocampe, chez la souris, conduit à une accumulation de cholestérol dans les neurones et à leur dégénérescence, associées à un phénotype de type Alzheimer (Djelti et al., 2015). De manière intéressante, Papassotiropoulos et al., (2003) ont décrit un effet synergique entre le polymorphisme de CYP46A1 et le variant E4 de l'ApoE.

En conclusion, l'hypothèse selon laquelle il existerait un lien de causalité entre des altérations du métabolisme du cholestérol et la maladie d'Alzheimer est encore vivement débattue. Certains spécialistes proposent que les défauts de l'homéostasie du cholestérol soient une conséquence plutôt que la cause première de la neurodégénérescence, ceci n'excluant pas que ces altérations aient un impact négatif sur les neurones déjà en souffrance.

2.2. Neurodégénérescence rétinienne - Le cas du glaucome

Relativement peu de données sont disponibles sur des liens éventuels entre le métabolisme du cholestérol dans la rétine et la mort des RGC. Rappelons que le glaucome est une maladie plurifactorielle et que de nombreuses susceptibilités génétiques, favorisant son développement, ont été décrites dans la littérature (voir paragraphe II.2.3, page 54). Dans notre laboratoire, Fourgeux et al. (2009) ont découvert que le polymorphisme rs754203 dans le gène de CYP46A1, déjà associé à la maladie d'Alzheimer, serait un facteur de risque de développer un glaucome à angle ouvert, et plus particulièrement à pression normale. L'allèle E4 du gène de l'apoE rendrait également plus susceptible de développer cette pathologie, mais les résultats sont variables entre les populations (Wang et al., 2014, Liao et al., 2014, Lake et al., 2004, Ressiniotis et al., 2004). La mise en évidence de prédispositions génétiques communes au glaucome et à la maladie d'Alzheimer suggère l'existence de mécanismes similaires dans ces deux pathologies neurodégénératives. Plusieurs études corroborent cette hypothèse (pour revue, voir Mancino et al., 2018). Par exemple, Cesareo et al. (2015) ont décrit une augmentation de la prévalence des lésions glaucomateuses chez les patients atteints d'Alzheimer.

Dans un modèle de glaucome expérimental, Guo et al. (2007) ont observé la présence d'agrégats de peptide A β colocalisant avec les RGC en apoptose. Chiasseu et al. (2016) ont, quant à eux, montré une accumulation de tau phosphorylée dans les dendrites des RGC et, au contraire, à une déplétion de cette protéine dans les axones. Concernant le polymorphisme de CYP46A1, les mécanismes biologiques qui sous-tendent le lien entre ce variant génétique et un risque de neurodégénérescence accru sont encore inconnus. L'inhibition de CYP46A1, en condition physiologique ou pathologique, a été décrit comme déclenchant ou aggravant la dégénérescence des neurones dans le cerveau (Djelti et al., 2015) et dans la rétine (Ischikawa et al., 2016). Au contraire, une surexpression de cette enzyme aurait des effets neuroprotecteurs, notamment car la synthèse de 24S-OHC permet d'éviter une surcharge de cholestérol potentiellement toxique pour les neurones (Boussicault et al., 2016). De plus, des travaux consistant à apporter du 24S-OHC exogène, à de faibles doses, sur des rétines en culture placées dans des conditions d'hyperpression, ont montré que le 24S-OHC aurait un effet positif pour la survie des neurones (Ishikawa et al., 2016, Ishikawa et al., 2018). Il serait tentant de penser que le polymorphisme rs754203 soit associé à une réduction de l'expression ou de l'activité enzymatique de CYP46A1, diminuant ainsi son effet protecteur pour les neurones. Cependant, le fait qu'aucune corrélation entre les taux de 24S-OHC plasmatique et le génotype des individus n'ait pu être mise en évidence, à ce jour, ne corrobore pas cette hypothèse (Fourgeux et al., 2009).

L'implication de CYP46A1 au cours de maladies neurodégénérative fait l'objet de plus en plus d'investigations. En ce qui concerne le glaucome, dans un modèle expérimental par élévation de la PIO chez le rat, Fourgeux et al. (2012) ont observé une surexpression transitoire de l'enzyme CYP46A1 dans la rétine et une légère augmentation de son produit, le 24S-OHC. Des observations similaires ont été décrites *ex-vivo*, sur des rétines placées en condition hyperbariques (Ischikawa et al., 2016).

V. Objectifs du projet de thèse

Comme exposé précédemment, le cholestérol est un lipide majeur de l'organisme, d'importance particulière dans les tissus nerveux. Dans le cerveau, son homéostasie semble reposer sur une coopération étroite entre les neurones et les cellules gliales. Les connaissances sur le métabolisme du cholestérol dans la rétine sont plus récentes et moins abondantes. En particulier, le rôle des cellules de Müller, principales cellules gliales de la rétine, mériterait d'être plus amplement investigué.

Des défauts dans le métabolisme et l'homéostasie du cholestérol ont été mis en évidence dans diverses pathologies neurodégénératives du cerveau, comme la maladie d'Alzheimer, d'Huntington ou de Parkinson. Les résultats de quelques études laissent à penser que le cholestérol puisse également être impliqué dans la physiopathologie du glaucome, maladie neurodégénérative de la rétine.

L'objectif de ce projet de thèse a été de caractériser le métabolisme du cholestérol dans la rétine suivant deux approches. La première, *in vitro*, s'est intéressée aux liens entre les neurones et la glie. Elle a consisté à évaluer le potentiel signal d'une molécule produite par les neurones réiniens, le 24S-OHC, sur le métabolisme du cholestérol des cellules gliales de Müller. La seconde, *in vivo*, s'est intéressée à la régulation du métabolisme du cholestérol en conditions pathologiques. Elle a visé à caractériser le métabolisme du cholestérol et sa régulation dans un modèle expérimental de glaucome par augmentation de la PIO. Le stress des cellules ganglionnaires, la gliose et l'inflammation ont été étudiés dans ce contexte.

Chapitre | 2

Effet du 24(S)-hydroxycholestérol sur
la régulation du métabolisme du
cholestérol dans les cellules de Müller

I. Problématique

Les cellules de Müller sont le type majoritaire de la macroglie rétinienne, à l'instar des astrocytes dans le cerveau. Elles sont en charge du maintien de l'homéostasie du milieu extracellulaire, jouent un rôle de soutien trophique pour les neurones voisins et assurent l'élimination des déchets.

Dans le cerveau, les astrocytes sont considérés comme les principaux fournisseurs de cholestérol. Ce dernier est sécrété, via le transporteur ABCA1, sous forme de *HDL-like* qui peuvent ensuite être captés par les neurones. Dans la rétine, les données de la littérature sont relativement peu abondantes sur ce sujet. Il est suspecté que les cellules de Müller puissent participer à la synthèse et à l'export du cholestérol, puisqu'elles exprimeraient la HMG-coA réductase, enzyme limitante dans la synthèse du cholestérol, et sécrèteraient de l'ApoE, apolipoprotéine de transport.

Dans les tissus nerveux, la conversion du cholestérol en 24S-hydroxycholestérol (24S-OHC), par l'enzyme neuronale CYP46A1, représente une voie d'élimination majeure du cholestérol. Une fois produit, le 24S-OHC traverse librement les membranes et rejoint la circulation générale. Il a également été suggéré que le 24S-OHC, et plus généralement les oxystérols, participent à la régulation du métabolisme du cholestérol. Ils exerceraient des effets hypocholestérolémians, notamment via les LXRs dont ils sont des ligands. Dans le cerveau, le 24S-OHC étant un produit d'origine purement neuronale, il pourrait jouer le rôle de molécule signal dans la communication entre les neurones et les astrocytes.

L'objectif de l'étude présentée ci-après a été de caractériser le métabolisme du cholestérol dans les cellules de Müller, en condition basale. Nous avons également évalué le rôle signal potentiel du 24S-OHC sur la régulation du métabolisme du cholestérol dans les cellules de Müller.

Pour mener à bien ce projet, une stratégie expérimentale *in vitro* a été adoptée. Les expérimentations ont été réalisées sur des cultures primaires de cellules de Müller de rats. Pour l'étude concernant l'effet du 24S-OHC, les cellules ont été traitées avec ce composé, pendant 48h, aux concentrations de 0,5 ou 1,5 μ M. Les taux de cholestérol, de ses précurseurs et de certains oxystérols, dont le 24S-OHC lui-même, ont été dosés par des techniques chromatographiques. La mesure de

l'expression de gènes impliqués dans la synthèse du cholestérol (HMG-CoA réductase), son transport (ApoE, ABCA1, LDL-R, SR-BI), son élimination (CYP46A1 et CYP27A) et la régulation de son métabolisme (SREBP2 et LXR), a été réalisée par RT-qPCR.

Cette étude a fait l'objet d'un article publié dans le journal *Experimental Eye Research*.

II. Article

Experimental Eye Research 189 (2019) 107857



Contents lists available at ScienceDirect

Experimental Eye Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/yexer



Is 24(S)-hydroxycholesterol a potent modulator of cholesterol metabolism in Müller cells? An in vitro study about neuron to glia communication in the retina

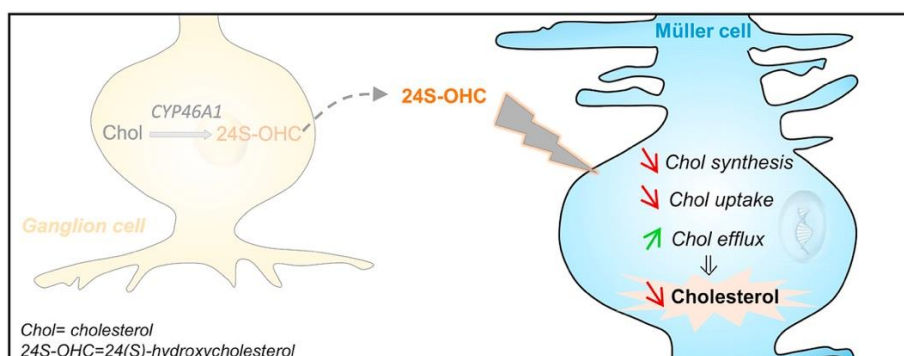


Elise Léger-Charnay^a, Elodie A.Y. Masson^a, Tristan Morala^a, Lucy Martine^a, Bénédicte Buteau^a, Laurent Leclerc^a, Lionel Bretillon^a, Ségolène Gambert^{a,b,*}

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

^b Laboratoire de Biochimie Médicale, Plateforme de Biologie Hospitalo-Universitaire, F-21000, Dijon, France

Graphical Abstract



Abstract

Communication between neurons and glia plays a major role in nervous tissue homeostasis. It is thought to participate in tuning cholesterol metabolism to cellular demand, which is a critical issue for neuronal health. Cholesterol is a membrane lipid crucial for nervous tissue functioning, and perturbed regulation of its metabolism has been linked to several neurodegenerative disorders. In the brain, 24(S)-hydroxycholesterol (24S-OHC) is an oxysterol synthesized by neurons to eliminate cholesterol, and it has been shown to regulate cholesterol metabolism in astrocytes, glial cells which provide cholesterol to neurons. In the retina, 24S-OHC is also an elimination product of cholesterol produced by neurons, especially the retinal ganglion cells. However, it is not known whether Müller cells, the major macroglial cells of the retina, play the role of cholesterol provider for retinal neurons and whether they respond to 24S-OHC signaling, similarly to brain glial cells. In the present study, primary cultures of rat Müller cells were treated with 0, 0.5 or 1.5 μ M 24S-OHC for 48 hours. The levels of cholesterol, precursors and oxysterols were quantified using gas chromatography coupled to flame-ionization detection or mass spectrometry. In addition, the expression of key genes related to cholesterol metabolism was analyzed using RTq-PCR. Müller cells were shown to express many genes linked to cholesterol metabolism, including genes coding for proteins implicated in cholesterol biosynthesis (HMGCR), cholesterol uptake and export via lipoproteins (LDL-R, SR-BI, ApoE and ABCA1) and regulation of cholesterol metabolism (SREBP2 and LXR β). Cholesterol, several of its precursors and oxidative products were present. CYP27A1, a retinal enzyme implicated in cholesterol elimination via oxysterol production, was quantified at low transcript levels but neither of its two typical products were detected in Müller cells. Furthermore, our results demonstrate that 24S-OHC has a strong hypocholesterolemic effect in Müller cells, leading to cholesterol depletion (-37 % at 1.5 μ M). This was mediated by a decrease in cholesterol synthesis, as illustrated by reduced levels of cholesterol precursors: desmosterol (-38 % at 1.5 μ M) and lathosterol (-84 % at 1.5 μ M), and strong downregulation of HMGCR gene expression (2.4

fold decrease at 1.5 μ M). In addition, LDL-R and SR-BI gene expression were reduced in response to 24S-OHC treatment (2 fold and 1.6 fold at 1.5 μ M, respectively), suggesting diminished lipoprotein uptake by the cells. On the contrary, there was a dramatic overexpression of ABCA1 transporter (10 fold increase at 1.5 μ M), probably mediating an increase in cholesterol efflux. Finally, 24S-OHC induced a small but significant upregulation of the CYP27A1 gene. These data indicate that Müller cells possess the necessary cholesterol metabolism machinery and that they are able to sharply adjust their cholesterol metabolism in response to 24S-OHC, a signal molecule of neuronal cholesterol status. This suggests that Müller cells could be major players of cholesterol homeostasis in the retina via neuron-glia crosstalk

Keywords: CYP46A1, 24(S)-Hydroxycholesterol, oxysterols, Cholesterol metabolism, Glia, Apolipoprotein E, Lipoproteins, Neuron-glia crosstalk

1. Introduction

The retina is a nervous tissue, comprising neurons and glial cells. The Müller cells are the major macroglial cells of the retina and support neuronal functioning. They cross the retina in a radial pattern, forming metabolic exchanges with neurons of all cell layers, providing nutrients, eliminating waste and more globally maintaining retinal homeostasis (Reichenbach and Bringmann, 2013). Among the homeostatic processes that are crucial for retinal health, one of them concerns a lipid found in every cell of higher animals: cholesterol.

Cholesterol is an amphiphilic lipid involved in many physiological processes. This is an important structural component of cell membranes, essential for modulating their fluidity, and thus signal transduction, membrane trafficking, ligand binding, etc. (Subczynski et al., 2017). Cholesterol can be entirely synthesized from acetyl-CoA through more than 30 consecutive reactions (Fig. 1), with HMG-CoA reductase (HMGCR) catalyzing the rate limiting and irreversible step of the process. From lanosterol, two pathways have been classically described: the Bloch pathway (Bloch, 1965) characterized by the precursor desmosterol, and the Kandutsch-Russell pathway characterized by another precursor, lathosterol (Kandutsch and Russell, 1960). The Bloch and Kandutsch-Russell pathways produce various intermediates that may have different bioactive effects on cells, including on cholesterol metabolism regulation, but also on other diverse cellular processes (Mitsche et al., 2015).

In the brain, cholesterol comes exclusively from *in situ* biosynthesis since the blood-brain barrier is not permeable to lipoproteins (Dietschy and Turley, 2004). Although all nucleated cells can synthesize cholesterol, some cell types do it more efficiently. Brain astrocytes have been proposed to produce cholesterol primarily by the Bloch pathway, supplying it to neighboring neurons (Nieweg et al., 2009; Pfrieger, 2003). Glial apolipoprotein E (ApoE) particles containing cholesterol are lipidated due to ATP-binding cassette A1 (ABCA1) transporter activity and can be captured by neurons or other cells via lipoprotein receptors, such

as low-density lipoprotein receptor (LDL-R) and scavenger receptor B1 (SR-BI). Cerebral cholesterol efflux is mainly mediated by its conversion into 24(S)-hydroxycholesterol (24S-OHC), synthesized by the neuronal enzyme CYP46A1 (Russell et al., 2009). In the retina, cholesterol metabolism is less well characterized. Even though cholesterol-rich blood lipoproteins can cross the outer blood-retinal barrier, Lin et al. (2016) identified local synthesis as the main source of retinal cholesterol in the mouse. Müller cells have been shown to express HMGCR enzyme and secrete ApoE, suggesting their ability to synthesize and deliver cholesterol to neurons (Amaratunga et al., 1996; Fliesler and Bretillon, 2010). However, further evidence is needed to determine if Müller cells can, like astrocytes in the brain, act as cholesterol providers for retinal neurons. Retinal cholesterol elimination can be mediated by lipoprotein efflux, due to ABCA1 activity, or by oxysterol synthesis. 24S-OHC and 3 β -hydroxy-5-cholestenic acid (27-COOH) are the major oxysterols found in the retina (Pikuleva and Curcio, 2014). Similarly to the brain, CYP46A1 expression in the retina is restricted to neurons, mainly to retinal ganglion cells (Bretillon et al., 2007), contrary to CYP27A1, the enzyme producing 27-COOH, which is more ubiquitous (Lee et al., 2006).

Nervous tissues are particularly dependent on cholesterol metabolism, notably because neurons have a high requirement for cholesterol since they permanently synthesize membranes for neurotransmitter exocytosis and dendritic spine growth. Nevertheless, cholesterol overload has been shown to be associated with neuronal death (Ayciriex et al., 2017), especially in the context of pathologies such as Alzheimer's disease and age-related macular degeneration (Pikuleva and Curcio, 2014; Puglielli et al., 2003). Hence, multiple feedback mechanisms exist in cells to sharply regulate key proteins related to cholesterol and maintain homeostasis. These mechanisms act at a transcriptional level, especially via liver X receptor (LXR) and sterol regulatory element-binding protein (SREBP) pathways, and at a post-translational level to modulate protein activity or degradation. Oxysterols, including 24S-OHC, have been shown to strongly activate some

* Corresponding author. INRA-UMR CSGA, 17, rue Sully, BP 86510, 21065, Dijon, France
E-mail address: segolene.gambert@chu-dijon.fr (S. Gambert).

<https://doi.org/10.1016/j.exer.2019.107857>

Received 10 August 2019; Received in revised form 12 October 2019; Accepted 21 October 2019

Available online 22 October 2019

0014-4835/ © 2019 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Abbreviations

24S-OHC 24(S)-hydroxycholesterol
 27-OHC 27-hydroxycholesterol
 27-COOH 3 β -hydroxy-5-cholestenoic acid
 7KC 7-ketocholesterol
 7 β -OHC 7 β -hydroxycholesterol
 ABCA1 ATP binding cassette subfamily A member 1
 ApoE Apolipoprotein E
 CYP27A1 Cytochrome P450 family 27 subfamily A member 1
 CYP46A1 Cytochrome P450 family 46 subfamily A member 1
 DMEM Dulbecco's modified Eagle's medium

EtOH Ethanol
 FBS Foetal bovine serum
 GC-FID Gas chromatography coupled to flame ionization detector
 GC-MS Gas chromatography coupled to mass spectrometry
 Gusb β -glucuronidase
 HMGCR HMG-CoA reductase
 LDL-R Low density lipoprotein receptor
 LXR Liver X receptor
 RQ Relative quantification
 SR-BI Scavenger receptor class B member 1
 SREBP Sterol regulatory element-binding protein

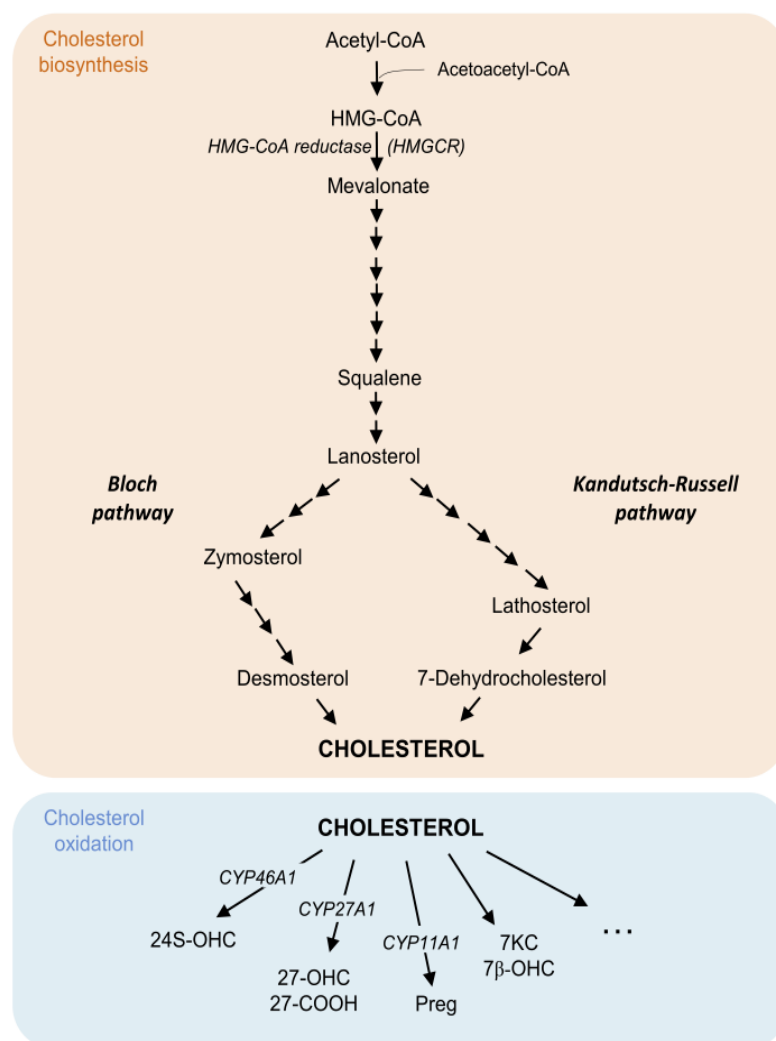


Fig. 1. Schematic representation of cholesterol biosynthesis and cholesterol oxidation pathways. Cellular cholesterol synthesis is a complex process, beginning with acetyl-CoA. HMG-CoA reductase (HMGCR) catalyzing HMG-CoA conversion into mevalonate, is the rate limiting enzyme of the synthesis. From lanosterol, cholesterol can be synthesized by two distinct enzymatic routes, the Bloch and the Kandutsch-Russell pathways, comprising distinct cholesterol precursors. Oxysterols are oxidation products of cholesterol. They arise from cholesterol by auto-oxidation (7-ketocholesterol (7KC) and 7 β -hydroxycholesterol (7 β -OHC) are typical cholesterol auto-oxidation products), or by enzymatic oxidation, usually involving the cytochrome P450 (CYP) family. CYP46A1 and CYP27A1 synthesize, 24(S)-hydroxycholesterol (24S-OHC) and 3 β -hydroxy-5-cholestenoic acid (27-COOH), which are the major oxysterols found in the retina. CYP11A1, producing pregnenolone (Preg), is also expressed in the retina. More than being elimination products of cholesterol, oxysterols are also implicated in cholesterol metabolism regulation in various tissues.

of the cholesterol regulatory pathways in various cells (Olkkonen et al., 2012). Considering the complementarity between neurons and glial cells in nervous tissues, constant neuron-glia crosstalk is crucial for the maintenance of cholesterol homeostasis. As a cholesterol-derived product, specifically synthesized by neurons, 24S-OHC may represent a signaling molecule informing glial cells of the neuronal cholesterol content. It has been described that 24S-OHC stimulates ABCA1 and ApoE expression in brain astrocytes (Abildayeva et al., 2006; Liang

et al., 2004). However, no published data demonstrate the effect of 24S-OHC on cholesterol metabolism in retinal Müller cells.

In the present study, using primary cultures of retinal Müller cells we provide some new insights on cholesterol metabolism and its regulation in the retina.

Table 1

References of TaqMan assays (Applied Bioscience) used for RT-qPCR analysis.

Genes	Coding for	TaqMan assay references	Amplicon lenght
Hmgcr	HMGCR	Rn00565598_m1	71
Ldlr	LDL-R	Rn00598442_m1	76
Scarb1	SR-BI	Rn00580588_m1	75
ApoE	ApoE	Rn00593680_m1	99
Abca1	ABCA1	Rn00710172_m1	76
Cyp46a1	CYP46A1	Rn01430188_m1	72
Cyp27a1	CYP27A1	Rn01401086_m1	94
Nr1h3	LXR α	Rn00581185_m1	90
Nr1h2	LXR β	Rn00581178_m1	75
Srebf2	SREBP2	Rn01502638_m1	61

2. Methods

2.1. Reagents

Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) with phenol red, Trypsin-EDTA (0.05% trypsin in PBS) and Penicillin-Streptomycin (10,000 U/m and 10 mg/ml respectively) were bought from PanBiotech (Dutscher, Brumath, France). Fetal bovine serum (FBS, lot 013BS986) was purchased from Biosera (Boussens, France). Collagenase was bought from Sigma-Aldrich (C2674, Sigma, St Quentin-Fallavier, France). 24S-OHC powder, purchased from Sigma-Aldrich (SML1648, Sigma, St Quentin-Fallavier, France), was solubilized in absolute ethanol (EtOH) (20 mM) and kept at -20°C for long term storage. Diluted stock solutions (200 times more concentrated than treatment media) were prepared in EtOH and kept at -20°C for up to one month. Treatment media at 0.5 μM or 1.5 μM 24S-OHC were freshly prepared in DMEM 1 g/L glucose +10% FBS, before each experiment. The control condition contained EtOH alone at the same concentration as treatment media (1:200, v/v). Standards and deuterated standards for quantification by mass-spectrometry were purchased from Avanti Polar Lipids (Interchim, Montluçon, France), except for Betulin bought from Sigma-Aldrich (St Quentin-Fallavier, France).

2.2. Animals

Long Evans rats, initially purchased from Charles River Laboratories (L'Arbresle, France), were maintained in our animal facility. Animals were housed in a controlled temperature ($22 \pm 1^{\circ}\text{C}$), 12 h dark/light cycle and pathogen-free environment. Food and water were provided *ad libitum*. All experiments were conducted in accordance with the local ethic committee (University of Burgundy, Dijon, France) and the French ministry of Higher Education and Research.

2.3. Müller cell culture

Primary Müller cell cultures were generated as previously described by Hicks and Courtois (1990). Briefly, 8–12 days new-born rats were beheaded. Eyeballs were digested in a 2% trypsin, 70 U/ml collagenase mix, for 50 min at 37°C . Retinas were dissected and explants were cultured in DMEM 4.5 g/L glucose +10% FBS. When several cell islets were observed, explants were removed, medium replaced with DMEM 1 g/L glucose +10% FBS, and cells allowed to reach confluence. Cultures were used after 2 passages. Cells were seeded in T150 flasks for sterol quantification or in T75 flasks for gene expression measurement. For the study of 24S-OHC effects, cells were incubated at about 80% confluence with EtOH vehicle (control cells), 0.5 or 1.5 μM 24S-OHC for 48 h. The purity of Müller cell cultures was assessed in 4 independent cultures by double immunofluorescence staining for glial fibrillary acidic protein (GFAP) a marker of astrocytes and Müller cells, and glutamine synthetase (GS), considered a specific marker of Müller cells. For this purpose, cells were seeded in μDish (Ibidi® 35 mm high,

0.1×10^5 cells per dish) and fixed at sub-confluence with 4% paraformaldehyde during 15 min. Blocking and permeabilization steps were performed for 1 h at room temperature with a solution of PBS 1X, 1% BSA, 0.1% Triton X100, and 0.05% Tween. Cells were then incubated with primary antibodies (mouse anti-GFAP, Interchim AYZ280, 1/100 and rabbit anti-GS, Abcam, G2781, 1/5000, diluted in blocking buffer) overnight at 4°C , washed with PBS 1X and incubated with secondary antibodies Alexa-Fluor 594 goat anti-mouse IgG and Alexa-fluor 488 goat anti-rabbit IgG (A11005, A11008, Life Technologies, 1/700) for 1 h at room temperature. Cell nuclei were visualized with DAPI (4', 6-diamidino-2-phenylindole). Images of four representative fields per dish were acquired with a Leica Confocal microscope equipped with a 40X objective. They indicated that our cultures were exclusively Müller cells (Supplemental Fig. 1).

2.4. Gene expression analysis by Taqman™ real time polymerase chain reaction

Cells were rinsed twice with PBS, collected by scraping and stored at -80°C until RNA isolation, which was performed using the Nucleospin® RNA/protein kit (Macherey-Nagel, Hoerd, France) according to manufacturer's instructions. Reverse transcription was operated using the Quantitec® Reverse Transcription Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) with 500 ng RNA per reaction. qPCR were prepared with 20 ng cDNA, TaqMan® Gene Expression Master Mix and TaqMan® probes (TaqMan® Gene Expression-Single tube assays, Thermofisher scientific, Life technologies, Courtaboeuf, France). For primer references, see Table 1. Plates were run on a StepOnePlus™ Real-Time PCR system (Applied biosystem, Thermofisher scientific) with cycle profile as denaturing at 95°C for 20 s followed by 40 cycles at 95°C for 1 s and 60°C for 20 s. β -Glucuronidase (Gusb) expression was used as a reference to normalize cDNA amounts. The expression level of this constitutively expressed control gene was not affected by our experimental conditions. Ct values were calculated by the StepOne v2.3 software from automatic threshold and baseline. The amplification efficiency of all TaqMan gene expression assays was considered to be 100% according to manufacturer's data. ΔCt (Ct (gene of interest)-Ct (Gusb)) were used to compare the expression level of each gene of interest. To determine the effect of 24S-OHC exposure, relative quantification (RQ) values were calculated by the StepOne v2.3 using the $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ method. Three replicates, cultured in three independent T75 flasks, were used for each experimental condition in each primary Müller cell culture. These replicates were used to perform independent reverse transcriptions.

2.5. Sterol quantification by gas chromatography

Cells were rinsed twice with PBS, collected by scraping and stored at -80°C until used. Samples, corresponding to 4 T150 flasks combined, were mechanically homogenized in water and homogenates were mixed with 5 vol of chloroform-methanol (2:1, v:v) (Folch et al., 1957). Total lipids were collected in the lower chloroform phase and dried under a stream of nitrogen. For sterol and oxysterol quantification, except 27-COOH, assays were carried out following the procedure described in Fourgeux et al. (2012). In brief, total lipids were submitted to alkaline hydrolysis. Material that could not be saponified, containing sterols, was extracted in chloroform. Cholesterol was quantified from 1/10 of the total non-saponified material, after trimethylsilyl ether derivation and addition of 2 μg 5 α -cholestane as a standard, by gas chromatography coupled to a flame ionization detector (GC-FID) (HP4890A, Hewlett-Packard, DB-5MS column, Agilent, Santa Clara, CA). In the remaining 9/10 of the non-saponified fraction, deuterated standards and betulin were added: 200 ng [26,26,26,27,27,27- $^2\text{H}_6$] desmosterol, 100 ng [25,26,26,26,27,27,27- $^2\text{H}_7$] lathosterol, 50 ng [25,26,26,26,27,27,27- $^2\text{H}_7$] 24S-OHC. Samples were purified on silica columns (Supelco®, Sigma, St Quentin-Fallavier, France) and

derivatized to trimethylsilyl ethers. Cholesterol precursors and oxysterols were quantified by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) (5973 N, Agilent; DB-5MS column, Agilent, Santa Clara, CA). Sterols were identified in SCAN mode according to their specific spectra and retention times defined by unlabelled standards. Sterols were quantified in SIM mode with the ions (m/z) listed in Table 2. For 27-COOH quantitation, 300 ng [25,25,26,26-²H₄] 27-COOH were added to total lipids. Samples were not submitted to alkaline hydrolysis but directly purified on silica columns, according to the protocol mentioned above for cholesterol precursor and oxysterol quantitation. After diazomethane and trimethylsilyl ether derivations, 27-COOH was quantified using GC-MS (Table 2).

Absolute sterol amounts were determined by extrapolation from unlabelled standard curves. Quantities were then normalized to protein content. For this purpose, small aliquots of homogenized samples were submitted to Ripa 5X lysing buffer and proteins were quantified using the Pierce™ BCA assay (Fisherscientific, Illkirch, France).

2.6. Statistical analysis

Results were submitted to non-parametric statistical analysis. Wilcoxon matched-pairs signed rank tests were performed with GraphPad Prism6 software. All data are represented as mean $\pm$ S.D. and statistical significance is indicated as *p < 0.05, **p < 0.01.

3. Results

3.1. Characterization of basal cholesterol metabolism in Müller cells

Quantitative measurements of sterols in primary Müller cultures were performed using GC-FID (cholesterol) and GC-MS (precursors and oxysterols). As shown in Table 3, we found that Müller cells contained typical cholesterol-related sterols including cholesterol precursors, cholesterol and oxysterols. With $45.8 \pm 12.3 \mu\text{g}/\text{mg}$ of protein, cholesterol was clearly the most abundant sterol in cells. Except for lanosterol, which was detected at low amounts, cholesterol precursors of both the Bloch and Kandutsch-Russel pathways were found in significant quantities (zymosterol: $1.4 \pm 0.6 \mu\text{g}/\text{mg}$, desmosterol: $365.8 \pm 80.4 \text{ ng}/\text{mg}$, and lathosterol: $287.8 \pm 77.1 \text{ ng}/\text{mg}$). Regarding oxysterols, 24S-OHC was not detected in Müller cells. Similarly, neither 27-hydroxycholesterol (27-OHC) nor 27-COOH, the common CYP27A1 products, were found in Müller cells. On the contrary, non-enzymatic oxysterols, including 7-ketocholesterol (7 KC) and 7 β -hydroxycholesterol (7 β -OHC) were detected in significant amounts.

Using RT-qPCR we also analyzed the expression of 10 genes involved in cholesterol metabolism, covering aspects of biosynthesis (HMGCR), uptake (LDL-R and SR-B1), export and elimination (ApoE, ABCA1 and CYP27A1) as well as regulation (SREBP2 and LXR α , β).

Table 2

Internal standards and ions for sterol quantification using mass-spectrometry in SIM mode.

			Internal standards				
			Desmosterol (d6)	Lathosterol (d7)	24S-OHC (d7)	27-COOH (d5)	Betulin
	m/z		333	465	152	417	496
Target molecules	Lanosterol	393		x			
	Desmosterol	327	x				
	Zymosterol	456		x			
	Lathosterol	458		x			
	24S-OHC	145			x		
	27-OHC	456					x
	27-COOH	412				x	
	7 KC	472					x
	7 β -OHC	456					x

Table 3

Sterol composition of Müller cell cultures.

	Sterols	Quantity/mg protein $\pm$ SD
Cholesterol precursors	Cholesterol	$45.8 \mu\text{g} \pm 12.3$
	Lanosterol	$1.1 \text{ ng} \pm 0.4$
	Zymosterol	$1.4 \mu\text{g} \pm 0.6$
	Desmosterol	$365.8 \text{ ng} \pm 80.4$
	Lathosterol	$287.8 \text{ ng} \pm 77.1$
Oxysterols	24S-OHC	nd
	27-OHC	nd
	27-COOH	nd
	7 KC	$274.9 \text{ ng} \pm 127$
	7 β -OHC	$49.8 \text{ ng} \pm 2.3$

Results presented in Fig. 2 classified these genes according to their level of expression relative to a housekeeping gene (Gusb) used as an endogenous control. Every gene of interest exhibited a measurable expression in our Müller cell cultures, but LXR α and CYP46A1 expression were very low ($\Delta\text{Ct} > 4$). This is in accordance with the literature, reporting that CYP46A1 exhibits a neuronal pattern (Bretillon et al., 2007) and that LXR α expression is very low in the retina (Zheng et al., 2012, 2015). CYP27A1 gene expression appeared to be slightly higher ($\Delta\text{Ct} = 3.6$) followed by ABCA1 ($\Delta\text{Ct} = 2.9$). With a ΔCt lower than 1.5, LXR β , SR-B1, HMGCR, SREBP2, ApoE and LDL-R genes were the most highly expressed among the tested targets in Müller cells.

Collectively, these data indicate that Müller cells possess the necessary cholesterol metabolism machinery suggesting that they could participate in cholesterol maintenance in the retina.

3.2. Effect of 24S-OHC on cholesterol metabolism in Müller cells

To determine the impact of 24S-OHC exposure on cholesterol metabolism in Müller cells, cultures were incubated with 0.5 μM or 1.5 μM 24S-OHC for 48 h and used to perform sterol quantitation using GC-FID/MS (Fig. 3) or gene expression analysis using RT-qPCR (Fig. 4). The concentrations used for 24S-OHC treatments were not cytotoxic for Müller cells, as evaluated by cell viability assay (data not shown). First, we confirmed the efficacy of our treatment conditions to increase 24S-OHC levels in Müller cultures: undetected in untreated cells, it reached 333 ± 72 and $1338 \pm 309 \text{ ng}/\text{mg}$ protein, following 0.5 and 1.5 μM treatment, respectively (Fig. 3). Secondly, we measured a significant decrease in cholesterol levels in cells following 24S-OHC exposure at 1.5 μM (-37% compared to control), while a smaller reduction was observed at 0.5 μM (-15%). These observations demonstrate that 24S-OHC has a strong hypocholesterolemic effect on Müller cells in a dose-dependent manner.

We further investigated the mechanisms underlying this effect, especially endogenous cholesterol biosynthesis and cholesterol uptake/

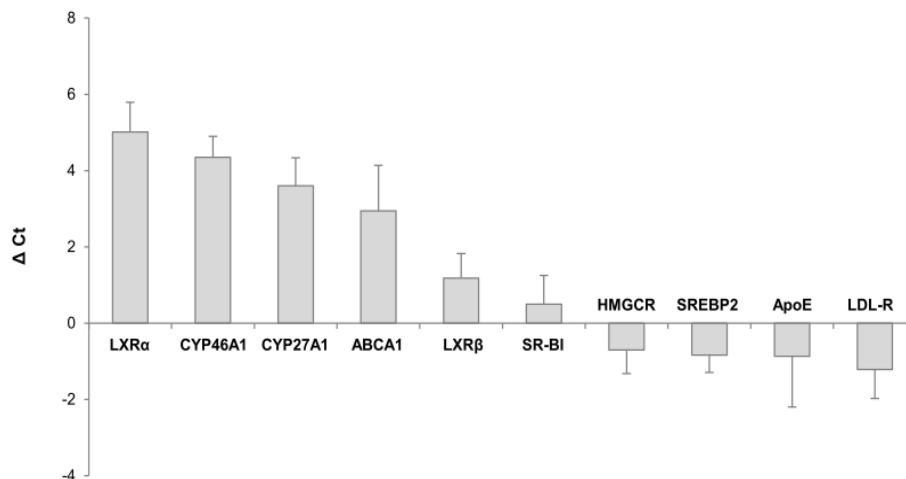


Fig. 2. Müller cells express cholesterol metabolism machinery. RT-qPCR was performed on Müller cell total cDNA. Gusb was chosen as the reference gene and ΔCt (Ct (gene of interest)-Ct(Gusb)) were calculated for each gene. The higher the ΔCt is, the lower the expression of the gene of interest. Every cholesterol-related gene was found to be expressed. The highest expression levels were measured for *LDL-R*, *ApoE*, *SREBP2*, *HMGCR*, *SR-BI* and *LXRβ*. *ABCA1* and *CYP27A1* gene expression occurred at lower levels. *LXRα* and *CYP46A1* transcripts were detected but their ΔCt values suggest very low expression in Müller cells. Each bar represents the mean $\pm$ S.D. of 8 cultures. For each culture, triplicates were submitted to independent reverse transcription.

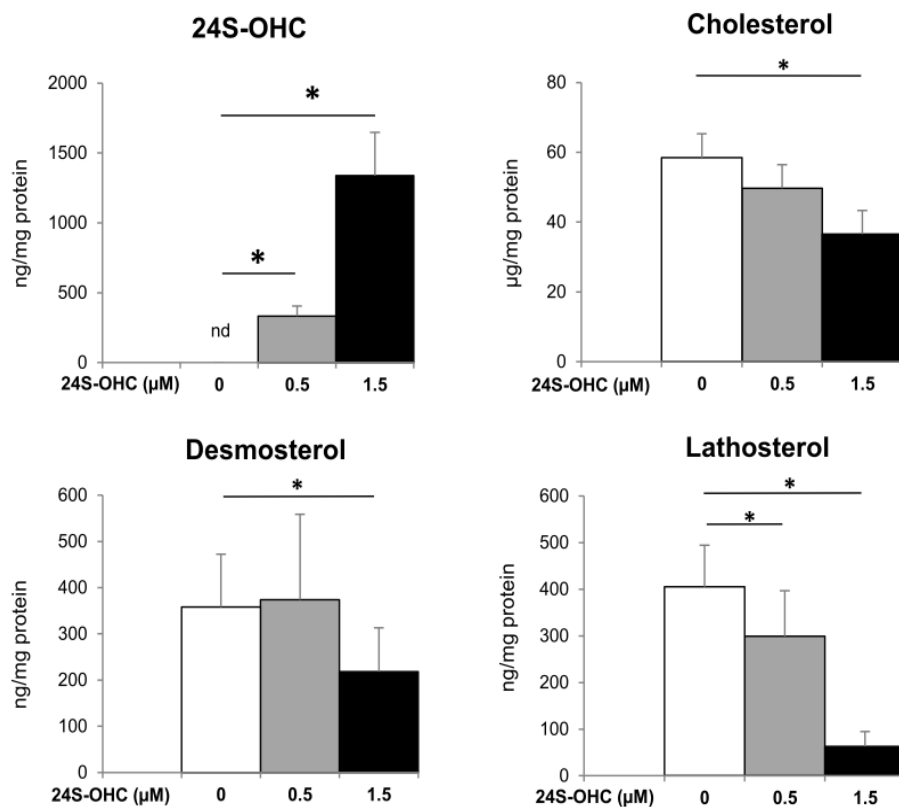


Fig. 3. 24S-OHC has a strong hypocholesterolemic effect in Müller cells. Cultures were incubated with EtOH vehicle (control) or 24S-OHC at 0.5 μM or 1.5 μM for 48 h. Sterols were quantified in cell pellets by GC-FID (cholesterol) or GC-MS (precursors and 24S-OHC). Cholesterol and its precursors, desmosterol and lathosterol, were significantly reduced following 24S-OHC treatment at 1.5 μM $n = 7$ cultures in each group. Data are represented as mean $\pm$ S.D. * $p < 0.05$ vs 24S-OHC at 0 μM (control) (Wilcoxon matched-pairs signed rank test). nd: not detected.

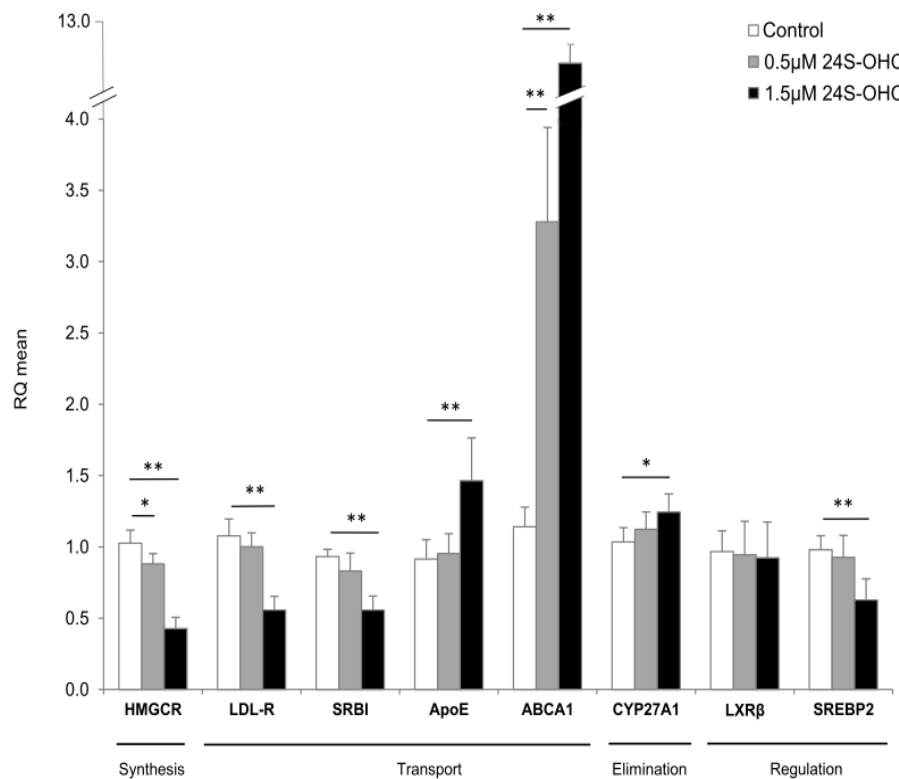


Fig. 4. 24S-OHC activates a range of cholesterol lowering pathways in Müller cells. Cultures were incubated with EtOH vehicle (control) or 24S-OHC at 0.5 μ M or 1.5 μ M for 48 h. Gene expression of cholesterol-related genes was assessed by RT-qPCR and data were analyzed using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. Genes involved in cholesterol synthesis and cholesterol uptake were downregulated in cells treated with 24S-OHC at 1.5 μ M. On the contrary, genes involved in cholesterol efflux were upregulated following 24S-OHC exposure. Each bar represents the mean $\pm$ S.D. of 8 cultures. For each culture, triplicates were submitted to independent reverse transcription. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs control (Wilcoxon matched-pairs signed rank test).

elimination pathways. We first looked at 2 major cholesterol precursors, typical of the different cholesterol biosynthetic pathways. As shown in Fig. 3, the incubation of cells with 1.5 μ M 24S-OHC led to a significant decrease in both desmosterol (–38%) and lathosterol (–84%). As evidenced by the considerable reduction in lathosterol levels, the Kandutsch-Russel pathway is more impacted than the Bloch pathway by 24S-OHC. This is also supported by the fact that 24S-OHC at 0.5 μ M was able to decrease lathosterol but not desmosterol levels. The decrease in cholesterol precursor levels was associated with a strong downregulation of HMGCR gene expression (2.4 fold decrease at 1.5 μ M compared to control) (Fig. 4), confirming the inhibitory effect of 24S-OHC on cholesterol synthesis in Müller cells. Furthermore, in response to 1.5 μ M 24S-OHC treatment *LDL-R* and *SR-BI* gene expression were reduced 2 fold and 1.6 fold respectively, suggesting decreased lipoprotein uptake by cells. This was concomitant with a dramatic increase in expression of *ABCA1* as well as increased *ApoE* gene expression (10 fold and 1.5 fold increase at 1.5 μ M, respectively), supporting enhanced cholesterol efflux via ApoE-rich lipoproteins. 24S-OHC induced a small but significant overexpression of *CYP27A1*, also supporting an increase in cholesterol elimination. We also analyzed the expression of *LXRβ* and *SREBP2* genes, transcription factors which were found to be significantly expressed in our in vitro Müller glia model. While *LXRβ* expression was not altered by 24S-OHC exposure, *SREBP2* was down-regulated in 1.5 μ M 24S-OHC-treated cells (1.5 fold decrease), suggesting the possible involvement of this transcription factor in the observed modulation of cholesterol metabolism. Exposure to the lower dose of 24S-OHC (0.5 μ M) showed similar tendencies to 1.5 μ M but exhibited statistical significance only for decreased *HMGCR*, and increased *ABCA1*, gene expression. These results suggest that these two genes, and particularly *ABCA1*, are more responsive to transcriptional

regulation by 24S-OHC.

Altogether these data indicate that 24S-OHC is a potent signaling molecule in Müller cells, decreasing cholesterol levels via both down-regulation in cholesterol biosynthesis and uptake, and upregulation in cellular cholesterol efflux.

4. Discussion

While it has been shown clearly that the neural retina is able to synthesize cholesterol (Fliesler et al., 1993; Zheng et al., 2015), it is still unclear which cells are responsible for this production. As proposed by Pfrieger for astrocytes in the brain (Nieweg et al., 2009; Pfrieger, 2003), it is plausible that retinal glial cells could be providers of cholesterol for neurons. However literature data concerning expression of HMGCR, the rate-limiting enzyme of cholesterol biosynthetic pathway, in the principal glial population of the retina (Müller cells) are scarce. One study reports expression of this enzyme in rat retinal Müller cells, as well as rod inner segments and RPE, using immunohistochemistry and *in situ* hybridization (Fliesler and Bretilon, 2010). Two others showed HMGCR expression throughout the mouse and human retina, with the exception of the photoreceptor outer segments (Zheng et al., 2012, 2015). We report here in Müller cell cultures the expression of *HMGCR* gene and high amounts of cholesterol, associated with the presence of several cholesterol precursors (lanosterol, zymosterol, desmosterol, and lathosterol), supporting the idea that these cells have the capacity to efficiently synthesize cholesterol. From the precursor lanosterol, cholesterol biosynthesis is known to occur through the Bloch and Kandutsch-Russell pathways, two enzymatic routes respectively characterized by desmosterol and lathosterol compounds. In our cultures, desmosterol and lathosterol were found in similar amounts, suggesting

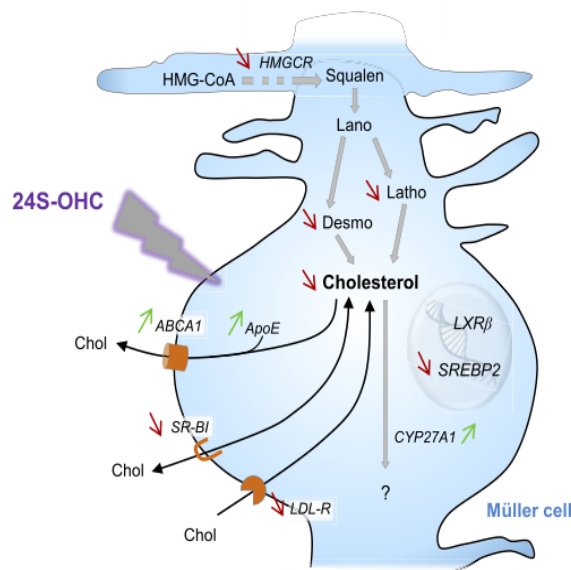


Fig. 5. Schematic representation of 24S-OHC effects on Müller cell cholesterol metabolism. We showed that 24S-OHC at 1.5 μ M leads to strongly decreased cholesterol content in Müller cells. This occurs through decreased cholesterol synthesis, via *HMGCR* gene downregulation and reduction of cholesterol precursor amounts, an increase in cholesterol efflux, suggested by *ABCA1*, *ApoE* and *CYP27A1* gene upregulation, and a decrease in lipoprotein uptake via down-regulation of *LDL-R* and *SR-BI* gene expression. *SREBP2* gene expression is also downregulated suggesting that this transcription factor could participate in the above regulations. *CYP27A1* gene was found to be expressed, and was upregulated following 24S-OHC exposure, but the typical products of the enzyme (27-OHC, 27-COOH) were not detected. Chol: cholesterol, Lano: lanosterol, Desmo: desmosterol, Latho: lathosterol.

that Müller cells use the two pathways equally, contrary to brain astrocytes which mainly use the Bloch pathway (Nieweg et al., 2009). Furthermore, we detected robust gene expression of *ApoE* and its partner *ABCA1* transporter, suggesting that Müller cells are able to export the cholesterol they synthesize by releasing nascent HDL-like particles, analogous to astrocytes in the brain (Ito et al., 2014). This is consistent with the idea developed by Tserentsoodol et al. (2006a) that HDL-like particles mediate intra-retinal cholesterol trafficking. These cholesterol-rich particles can be subsequently captured by surrounding neurons, which express LDL-R family receptors according to their cholesterol need.

Our Müller cell cultures also showed high expression of *LDL-R* and *SR-BI* genes, suggesting their ability to uptake or to remodel exogenous lipoprotein particles. LDL-R has already been localized in the retina by immunohistochemistry, especially within the retinal ganglion cell layer, which includes Müller cell processes, as well as in the outer plexiform layer, the retinal pigment epithelium and the choriocapillaries. In the same study, it was shown that the retina is able to take up blood-borne LDL (Tserentsoodol et al., 2006b). Our observations support the fact that Müller cells play a role in this process. SR-BI is a membrane receptor binding many lipoproteins, including high density lipoproteins (HDL), very low-density lipoproteins (VLDL) and LDL (Shen et al., 2014). Contrary to LDLR family receptors, SR-BI mediates bi-directional transport of cholesterol, depending on the cell type and demand. In liver and steroidogenic tissues, it enables cholesterol transport from lipoproteins to cells (Landschulz et al., 1996). On the contrary, in macrophages SR-BI enhances cellular cholesterol efflux to HDL (Ji et al., 1997). In nervous tissues, the role of SR-BI is still unclear. In the

retina, it has been shown to be principally expressed by Müller cells (Tserentsoodol et al., 2005), consistent with the significant expression of SR-BI we observed in our cultures.

Altogether, these results support the idea developed by Fliesler and Bretillon (2010) that “Müller cells may participate in remodeling the lipid core of lipoproteins and delivery of lipids and nutrients to retinal neurons”.

Exposure of Müller cultures to 24S-OHC led to increased intracellular amounts of this oxysterol proportional to the concentration of 24S-OHC added to the culture medium. This indicates that, in our model, 24S-OHC is readily incorporated by the cells. Due to their additional hydroxy group, side-chain oxysterols have a higher capacity to pass phospholipid bilayers than cholesterol (Bjorkhem, 2006; Meaney et al., 2002). A specific mechanism for oxysterol translocation through biological membranes, termed “bobbing”, has recently been proposed by Kulig et al. (2018). In the retina, free 24S-OHC released by neurons into the extracellular matrix, could therefore readily diffuse into neighboring cells, especially Müller cells which ensheath the neurons. Moreover, it is known that oxysterols are transported in lipoproteins in the systemic circulation, mainly as HDL in a free and esterified form (Burkard et al., 2007). As suggested by others and the current results, Müller cells express the molecular machinery, notably *ABCA1* and *ApoE* genes, to secrete discoid apoE and HDL-like particles, which thus surround retinal neurons. 24S-OHC could be included in these particles, thus being available for capture by cells, especially Müller cells, which express lipoprotein receptors.

Interestingly, we show that Müller cells can adjust their cholesterol metabolism in response to 24S-OHC. This oxysterol is an elimination product of cholesterol produced by neurons. It is also considered as a signaling molecule used by brain neurons to inform astrocytes of cholesterol status which in turn downregulate cholesterol synthesis. In line with this, our results show that Müller cells strongly downregulate cholesterol synthesis after 24S-OHC exposure. We found a higher reduction in lathosterol than desmosterol, indicating that the Kandutsch-Russell pathway is more sensitive to cholesterol metabolism regulation. This contrasts with a study on Chinese hamster ovary cells in which the Kandutsch-Russell pathway was shown to be constitutively active whereas the Bloch pathway was flexible in response to cholesterol availability and demand (Mitsche et al., 2015), indicating cellular specificities in cholesterol biosynthetic pathways.

In addition, our results indicate that Müller cells exposed to 24S-OHC decrease cholesterol uptake via LDL-R, and increase cholesterol efflux via ApoE-containing lipoproteins. Especially, the *ABCA1* transporter is dramatically upregulated in response to 24S-OHC. This is in agreement with data showing that 24S-OHC induces ApoE-mediated efflux of cholesterol in a human astrocytoma cell line (Abildayeva et al., 2006). Since the blood-retina barrier, contrary to the blood-brain barrier, is permeable to lipoproteins this cholesterol efflux via ApoE-rich lipoproteins could be a pathway to eliminate cholesterol from the retina and avoid toxic overload. By contrast, oxysterol synthesis does not appear to be a major route for cholesterol elimination in Müller cells. Compared to *ApoE* or *ABCA1*, gene expression of *CYP27A1*, the principal cholesterol hydroxylase in the retina, was only slightly increased. And despite this increase, we were unable to detect either of its products, 27-OHC and 27-COOH. This could be due to the fact that *CYP27A1* protein levels and/or activity remain too low to translate into detectable products because of post-transcriptional and post-translational regulation, which have been described in the retina (Pikuleva and Curcio, 2014). Moreover, a study performed on monkey retina using immunohistochemistry detected *CYP27A1* protein predominantly in the inner segment of photoreceptors, while Müller cells were only faintly stained (Lee et al., 2006). Nevertheless, one cannot exclude the possibility that 27-COOH synthesized by Müller cells is further converted into other unidentified oxysterol compound as has been described in neuroblastoma cells (Meaney et al., 2007). The absence of 24S-OHC, synthesized by CYP46A1, the other cholesterol hydroxylase

found in the retina, is consistent with the very low gene expression we measured in our cells, and with the strictly neuronal origin of this compound (Bretillon et al., 2007; Ramirez et al., 2008). *SR-BI* gene expression was reduced in response to 24S-OHC. As we mentioned above, this receptor mediates bi-directional transport of cholesterol depending on cell type. Since 24S-OHC exposure activates hypocholesterolemic pathways in our Müller cells, this implies that *SR-BI* has a role in cholesterol-rich lipoprotein uptake rather than lipoprotein efflux in these cells.

As 24S-OHC-induced regulation occurred at the transcriptional level in our model, it suggests that 24S-OHC is able to modulate gene expression, most likely through interaction with nuclear receptors and transcription factors as has been described previously (Mutemberezi et al., 2016). We did not observe any upregulation of *LXR* gene expression in response to 24S-OHC, but this does not preclude upregulation of transcriptional activity, as has been shown in published data. However, we did see decreased *SREBP2* transcript levels, a transcription factor which exerts hypercholesterolemic effects. This decrease could therefore contribute to the downregulation of cholesterol biosynthesis we observe in response to 24S-OHC exposure, since *HMGCR* is one of its targets (Burg and Espenshade, 2011). Typically, regulation of *SREBP* by oxysterols implicates two mediators, *INSIG* and *SCAP*, and is achieved through the prevention of its translocation to the Golgi and consecutive activation in the nucleus (Mutemberezi et al., 2016). Interestingly, in our model, it seems that 24S-OHC is able to regulate *SREBP2* at the gene expression level.

Overall, the effects of 24S-OHC we observed suggest that Müller cells could participate in cholesterol homeostatic feedback in the retina, previously proposed by Pfrieger with astrocytes and neurons in the brain (Pfrieger and Ungerer, 2011). It corroborates the observations previously made using various *in vitro* models, that oxysterols are able to strongly regulate cholesterol (Abildayeva et al., 2006; An et al., 2017; Fu et al., 2001; Walzl et al., 2013). From these observations the idea arose that oxysterols are central players in cholesterol homeostasis maintenance. However, their importance *in vivo* remains under debate and studies conducted on animal models are not as concordant. For instance, Rosen et al. (1998) observed normal blood plasma levels of cholesterol in mice lacking the *CYP27A1* enzyme, suggesting that 27-OHC is not necessary to maintain cholesterol homeostasis in the body. On the other hand, a study conducted by Chen et al. (2007) reported that the induction of *LXR*-target genes by a cholesterol-enriched diet was impaired by the deletion of 3 *CYP* enzymes related to oxysterol synthesis, in a transgenic mouse model. In a comprehensive review, Gill et al. (2008) proposed a revised hypothesis about the role of oxysterols in the regulation of cholesterol metabolism. They suggested that “while cholesterol is central to achieving its own balance, oxysterols play an important role in smoothing this regulation in the short term”.

5. Conclusions

We show that Müller cells express the necessary machinery to synthesize and regulate cholesterol as well as lipoprotein remodeling, suggesting that they could play the role of cholesterol providers in the retina. We also demonstrate the capacity of Müller cells to activate a range of pathways lowering cholesterol levels in response to neuronal 24S-OHC (Fig. 5), supporting the idea that they actively participate in the maintenance of retinal cholesterol homeostasis via neuron-glia crosstalk. A better understanding of perturbations in this communication could offer new insights into the pathogenesis of neurodegenerative diseases.

Sources of funding

This work was supported by grants from the Institut National de la Recherche Agronomique; the Conseil Régional Bourgogne, Franche-Comté (PARI grant); the FEDER (European Funding for Regional Economical Development); the Fondation de France/Fondation de l'œil; the Ministère de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche et de l'Innovation; the Université de Bourgogne Franche-Comté; and the Nouvelle Société Française d'Athérosclérose.

The funders had no role in study design, data collection and interpretation, or the decision to submit the work for publication.

Declaration of competing interest

None.

Acknowledgments

The authors are grateful to the animal facility of Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation (CSGA) for animal care. We also thank Claire Fenech and Claire Chabanet of CSGA for technical assistance regarding RT-qPCR analyses and statistical analysis of the data, respectively. We thank Elisabeth Dubus who performed the immunostaining experiments in order to confirm the purity of the Müller cell cultures.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.exer.2019.107857>.

References

- Abildayeva, K., Jansen, P.J., Hirsch-Reinshagen, V., Bloks, V.W., Bakker, A.H., Ramaekers, F.C., de Vente, J., Groen, A.K., Wellington, C.L., Kuipers, F., Mulder, M., 2006. 24(S)-hydroxycholesterol participates in a liver X receptor-controlled pathway in astrocytes that regulates apolipoprotein E-mediated cholesterol efflux. *J. Biol. Chem.* 281, 12799–12808.
- 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 Müller glial cells, secreted into the vitreous, and rapidly transported into the optic nerve by retinal ganglion cells. *J. Biol. Chem.* 271, 5628–5632.
- An, Y., Zhang, D.D., Yu, H.L., Ma, W.W., Lu, Y.H., Liu, Q.R., Xiao, R., 2017. 27-Hydroxycholesterol regulates cholesterol synthesis and transport in C6 glioma cells. *Neurotoxicology* (Little Rock) 59, 88–97.
- Ayciriex, S., Djelti, F., Alves, S., Regazzetti, A., Gaudin, M., Varin, J., Langui, D., Bieche, I., Hudry, E., Dargere, D., Aubourg, P., Auzeil, N., Laprevote, O., Cartier, N., 2017. Neuronal cholesterol accumulation induced by *Cyp46a1* down-regulation in mouse Hippocampus disrupts brain lipid homeostasis. *Front. Mol. Neurosci.* 10, 211.
- Bjorkhem, I., 2006. Crossing the barrier: oxysterols as cholesterol transporters and metabolic modulators in the brain. *J. Intern. Med.* 260, 493–508.
- Bloch, K., 1965. The biological synthesis of cholesterol. *Science* 150, 19–28.
- Bretillon, L., Diczfalussy, U., Bjorkhem, I., Maire, M.A., Martine, L., Joffre, C., Acar, N., Bron, A., Creuzot-Garcher, C., 2007. Cholesterol-24S-hydroxylase (*CYP46A1*) is specifically expressed in neurons of the neural retina. *Curr. Eye Res.* 32, 361–366.
- Burg, J.S., Espenshade, P.J., 2011. Regulation of *HMG-CoA* reductase in mammals and yeast. *Prog. Lipid Res.* 50, 403–410.
- Burkard, I., von Eckardstein, A., Waeber, G., Vollenweider, P., Rentsch, K.M., 2007. Lipoprotein distribution and biological variation of 24S- and 27-hydroxycholesterol in healthy volunteers. *Atherosclerosis* 194, 71–78.

- Chen, W., Chen, G., Head, D.L., Mangelsdorf, D.J., Russell, D.W., 2007. Enzymatic reduction of oxysterols impairs LXR signaling in cultured cells and the livers of mice. *Cell Metabol.* 5, 73–79.
- Dietschy, J.M., Turley, S.D., 2004. Thematic review series: brain Lipids. Cholesterol metabolism in the central nervous system during early development and in the mature animal. *J. Lipid Res.* 45, 1375–1397.
- Fliesler, S.J., Bretillon, L., 2010. The ins and outs of cholesterol in the vertebrate retina. *J. Lipid Res.* 51, 3399–3413.
- Fliesler, S.J., Florman, R., Rapp, L.M., Pittler, S.J., Keller, R.K., 1993. In vivo biosynthesis of cholesterol in the rat retina. *FEBS Lett.* 335, 234–238.
- Folch, J., Lees, M., Sloane Stanley, G.H., 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226, 497–509.
- Fourgeux, C., Martine, L., Pasquis, B., Maire, M.A., Acar, N., Creuzot-Garcher, C., Bron, A., Bretillon, L., 2012. Steady-state levels of retinal 24S-hydroxycholesterol are maintained by glial cells intervention after elevation of intraocular pressure in the rat. *Acta Ophthalmol.* 90, e560–567.
- Fu, X., Menke, J.G., Chen, Y., Zhou, G., MacNaul, K.L., Wright, S.D., Sparrow, C.P., Lund, E.G., 2001. 27-hydroxycholesterol is an endogenous ligand for liver X receptor in cholesterol-loaded cells. *J. Biol. Chem.* 276, 38378–38387.
- Gill, S., Chow, R., Brown, A.J., 2008. Sterol regulators of cholesterol homeostasis and beyond: the oxysterol hypothesis revisited and revised. *Prog. Lipid Res.* 47, 391–404.
- Hicks, D., Courtois, Y., 1990. The growth and behaviour of rat retinal Müller cells in vitro. 1. An improved method for isolation and culture. *Exp. Eye Res.* 51, 119–129.
- Ito, J.I., Nagayasu, Y., Miura, Y., Yokoyama, S., Michikawa, M., 2014. Astrocytes endogenous apoE generates HDL-like lipoproteins using previously synthesized cholesterol through interaction with ABCA1. *Brain Res.* 1570, 1–12.
- Ji, Y., Jian, B., Wang, N., Sun, Y., Moya, M.L., Phillips, M.C., Rothblat, G.H., Swaney, J.B., Tall, A.R., 1997. Scavenger receptor BI promotes high density lipoprotein-mediated cellular cholesterol efflux. *J. Biol. Chem.* 272, 20982–20985.
- Kandutsch, A.A., Russell, A.E., 1960. Preputial gland tumor sterols. 3. A metabolic pathway from lanosterol to cholesterol. *J. Biol. Chem.* 235, 2256–2261.
- Kulig, W., Mikkolainen, H., Olzyska, A., Jurkiewicz, P., Cwiklik, L., Hof, M., Vattulainen, L., Jungwirth, P., Rog, T., 2018. Bobbing of oxysterols: molecular mechanism for translocation of tail-oxidized sterols through biological membranes. *J. Phys. Chem. Lett.* 9, 1118–1123.
- Landschulz, K.T., Pathak, R.K., Rigotti, A., Krieger, M., Hobbs, H.H., 1996. Regulation of scavenger receptor, class B, type I, a high density lipoprotein receptor, in liver and steroidogenic tissues of the rat. *J. Clin. Invest.* 98, 984–995.
- Lee, J.W., Fuda, H., Javitt, N.B., Strott, C.A., Rodriguez, I.R., 2006. Expression and localization of sterol 27-hydroxylase (CYP27A1) in monkey retina. *Exp. Eye Res.* 83, 465–469.
- Liang, Y., Lin, S., Beyer, T.P., Zhang, Y., Wu, X., Bales, K.R., DeMattos, R.B., May, P.C., Li, S.D., Jiang, X.C., Eacho, P.L., Cao, G., Paul, S.M., 2004. A liver X receptor and retinoid X receptor heterodimer mediates apolipoprotein E expression, secretion and cholesterol homeostasis in astrocytes. *J. Neurochem.* 88, 623–634.
- Lin, J.B., Mast, N., Bederman, I.R., Li, Y., Brunengraber, H., Bjorkhem, I., Pikuleva, I.A., 2016. Cholesterol in mouse retina originates primarily from in situ de novo biosynthesis. *J. Lipid Res.* 57, 258–264.
- Meaney, S., Bodin, K., Diczfalussy, U., Bjorkhem, I., 2002. On the rate of translocation in vitro and kinetics in vivo of the major oxysterols in human circulation: critical importance of the position of the oxygen function. *J. Lipid Res.* 43, 2130–2135.
- Meaney, S., Heverin, M., Panzenboeck, U., Ekstrom, L., Axelsson, M., Andersson, U., Diczfalussy, U., Pikuleva, I., Wahren, J., Sattler, W., Bjorkhem, I., 2007. Novel route for elimination of brain oxysterols across the blood-brain barrier: conversion into 7 α -hydroxy-3-oxo-4-cholestenoic acid. *J. Lipid Res.* 48, 944–951.
- Mitsche, M.A., McDonald, J.G., Hobbs, H.H., Cohen, J.C., 2015. Flux analysis of cholesterol biosynthesis in vivo reveals multiple tissue and cell-type specific pathways. *Elife* 4, e07999.
- Mutemberezi, V., Guillemot-Legris, O., Muccioli, G.G., 2016. Oxysterols: from cholesterol metabolites to key mediators. *Prog. Lipid Res.* 64, 152–169.
- Nieweg, K., Schaller, H., Pfrieger, F.W., 2009. Marked differences in cholesterol synthesis between neurons and glial cells from postnatal rats. *J. Neurochem.* 109, 125–134.
- Olkkonen, V.M., Beaslas, O., Nissila, E., 2012. Oxysterols and their cellular effectors. *Biomolecules* 2, 76–103.
- Pfrieger, F.W., 2003. Outsourcing in the brain: do neurons depend on cholesterol delivery by astrocytes? *Bioessays* 25, 72–78.
- Pfrieger, F.W., Ungerer, N., 2011. Cholesterol metabolism in neurons and astrocytes. *Prog. Lipid Res.* 50, 357–371.
- Pikuleva, I.A., Curcio, C.A., 2014. Cholesterol in the retina: the best is yet to come. *Prog. Retin. Eye Res.* 41, 64–89.
- Pugliese, L., Tanzi, R.E., Kovacs, D.M., 2003. Alzheimer's disease: the cholesterol connection. *Nat. Neurosci.* 6, 345–351.
- Ramirez, D.M., Andersson, S., Russell, D.W., 2008. Neuronal expression and subcellular localization of cholesterol 24-hydroxylase in the mouse brain. *J. Comp. Neurol.* 507, 1676–1693.
- Reichenbach, A., Bringmann, A., 2013. New functions of Müller cells. *Glia* 61, 651–678.
- Rosen, H., Reshef, A., Maeda, N., Lippold, A., Shpizen, S., Triger, L., Eggertsen, G., Bjorkhem, I., Leitersdorf, E., 1998. Markedly reduced bile acid synthesis but maintained levels of cholesterol and vitamin D metabolites in mice with disrupted sterol 27-hydroxylase gene. *J. Biol. Chem.* 273, 14805–14812.
- Russell, D.W., Halford, R.W., Ramirez, D.M., Shah, R., Kotti, T., 2009. Cholesterol 24-hydroxylase: an enzyme of cholesterol turnover in the brain. *Annu. Rev. Biochem.* 78, 1017–1040.
- Shen, W.J., Hu, J., Hu, Z., Kraemer, F.B., Azhar, S., 2014. Scavenger receptor class B type I (SR-BI): a versatile receptor with multiple functions and actions. *Metabolism* 63, 875–886.
- Subczynski, W.K., Pasenkiewicz-Gierula, M., Widomska, J., Mainali, L., Raguz, M., 2017. High cholesterol/low cholesterol: effects in biological membranes: a review. *Cell Biochem. Biophys.* 75, 369–385.
- Tserentsoodol, N., Gordiyenko, N.V., Pascual, I., Lee, J.W., Fliesler, S.J., Rodriguez, I.R., 2006a. Intraretinal lipid transport is dependent on high density lipoprotein-like particles and class B scavenger receptors. *Mol. Vis.* 12, 1319–1333.
- Tserentsoodol, N., Szein, J., Campos, M., Gordiyenko, N.V., Fariss, R.N., Lee, J.W., Fliesler, S.J., Rodriguez, I.R., 2006b. Uptake of cholesterol by the retina occurs primarily via a low density lipoprotein receptor-mediated process. *Mol. Vis.* 12, 1306–1318.
- Tserentsoodol, N., Gordiyenko, N.V., Lee, J.W., Rodriguez, I.R., 2005. Localization of scavenger receptors class B (SRB1 and SRB2) responsible for lipid transport in the retina. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 46, 2992 (ARVO annual meeting abstract).
- Walt, S., Patankar, J.V., Fauler, G., Nushold, C., Ullen, A., Eibinger, G., Wintersperger, A., Kratky, D., Malle, E., Sattler, W., 2013. 25-Hydroxycholesterol regulates cholesterol homeostasis in the murine CATH.a neuronal cell line. *Neurosci. Lett.* 539, 16–21.
- Zheng, W., Mast, N., Saadane, A., Pikuleva, I.A., 2015. Pathways of cholesterol homeostasis in mouse retina responsive to dietary and pharmacologic treatments. *J. Lipid Res.* 56, 81–97.
- Zheng, W., Reem, R.E., Omarova, S., Huang, S., DiPatre, P.L., Charvet, C.D., Curcio, C.A., Pikuleva, I.A., 2012. Spatial distribution of the pathways of cholesterol homeostasis in human retina. *PLoS One* 7, e37926.

III. Principaux résultats et conclusion

Ce travail, mené sur des cultures primaires, a tout d'abord permis de montrer que les cellules de Müller possèdent la machinerie moléculaire pour synthétiser et exporter le cholestérol. En effet, nous avons décrit une expression significative du gène codant pour la HMG-CoA réductase, enzyme limitante de la biosynthèse du cholestérol, et mesuré des taux importants de cholestérol ainsi que certains de ses précurseurs (desmostérol, lathostérol et zymostérol). Nous avons mis en évidence que les cellules de Müller expriment le couple ApoE - ABCA1, impliqué dans l'export du cholestérol, ainsi que les récepteurs aux lipoprotéines LDL-R et SR-BI, suggérant des capacités de remodelage des lipoprotéines. Ces résultats renforcent l'hypothèse selon laquelle les cellules de Müller puissent jouer le rôle de fournisseurs de cholestérol dans la rétine, à l'instar des astrocytes dans le cerveau.

Nos résultats démontrent également la capacité des cellules de Müller à activer un éventail de mécanismes hypocholestérolémiant en réponse au 24S-OHC. La diminution des taux de cholestérol observée semble être la conséquence d'une réduction de synthèse du cholestérol (chute des taux des précurseurs, sous-expression du gène de la HMG-CoA réductase) associée à une augmentation de son efflux (forte surexpression du gène du transporteur ABCA1 et de l'ApoE) et à une baisse de sa captation par les cellules (diminution de l'expression du gène du LDL récepteur). Le récepteur nucléaire SREBP2 étant connu pour être impliqué dans l'activation de la transcription de gènes hypercholestérolémiants, comme celui de la HMGCR, sa sous-expression pourrait participer à médier les effets du 24S-OHC.

Ces observations indiquent que le 24S-OHC, produit par les neurones, pourrait constituer une molécule signal pour les cellules de Müller qui, en diminuant la synthèse du cholestérol et en facilitant son élimination de la rétine, participeraient activement au maintien de l'homéostasie du cholestérol dans ce tissu. Une meilleure compréhension des perturbations pouvant affecter cette communication entre les neurones et la glie pourrait offrir de nouvelles perspectives concernant la pathogenèse des maladies neurodégénératives.

Chapitre | 3

Caractérisation du métabolisme du cholestérol au cours du glaucome

I. Problématique

Le glaucome est une maladie neurodégénérative de la rétine caractérisée par la mort progressive des cellules ganglionnaires (RGC), neurones impliqués dans la transmission du signal visuel au cerveau. Malgré de nombreuses recherches conduites sur le sujet, les mécanismes pathologiques conduisant à l'apoptose des RGC sont encore mal compris. Plusieurs maladies neurodégénératives du cerveau, comme la maladie d'Alzheimer et celle de Huntington, ont été associées à des altérations du métabolisme du cholestérol dans ce tissu. Qu'en est-il au cours du glaucome ? Notre équipe a mis en évidence qu'un polymorphisme dans le gène codant pour CYP46A1, enzyme neuronale impliquée dans l'élimination du cholestérol, est un facteur de risque de développer cette pathologie oculaire. Une surexpression de CYP46A1 et une élévation du taux de son métabolite, le 24S-hydroxycholestérol, ont été mises en évidence dans des modèles expérimentaux de glaucome. A notre connaissance, aucune caractérisation plus large du métabolisme du cholestérol et de son homéostasie dans la rétine, au cours du glaucome, n'est rapportée dans la littérature.

Le but de notre étude, présentée ci-après, est de mettre en évidence de potentielles altérations du métabolisme du cholestérol au cours du glaucome. Pour mener à bien ce projet, une stratégie expérimentale *in vivo* chez le rat a été adoptée. Il s'agit d'un modèle par hyperpression oculaire, premier facteur de risque de développer un glaucome chez l'Homme.

L'hypertonie a été induite par photocoagulation laser de structures impliquées dans le recyclage de l'humeur aqueuse (trabéculum, veines épisclérales, plexus limbal), selon la méthode décrite par Salinas-Navarro et al. (2010). Le métabolisme du cholestérol et la mort des RGC ont été analysés à trois temps : 18 heures, 3 jours et 1 mois après la photocoagulation laser. Le glaucome étant connu pour être associé à une forte inflammation et une gliose, nous avons également évalué l'intensité de ces phénomènes aux trois temps expérimentaux présentés ci-dessus. Le métabolisme du cholestérol a été exploré par dosage des stérols (cholestérol, précurseurs et oxystérols) en chromatographie gazeuse (GC-FID ou GC-MS), ainsi que par l'analyse de l'expression de gènes clés, en RT-qPCR. La mort des RGC a été évaluée par analyse de l'expression de marqueurs spécifiques (Brn3a, Brn3b, Thy-1 et

Rbpms) par RT-qPCR ou par immunomarquage (Brn3a uniquement) sur rétines mises à plat, ainsi que par immuno-détection, sur coupes de rétine, de la caspase 3, marqueur de l'apoptose. L'activation gliale a été investiguée par immunomarquage des protéines Iba-1, spécifique de la microglie, et GFAP, spécifique des cellules macrogliales, sur des coupes de rétines. Enfin, l'inflammation a été évaluée par l'analyse de l'expression des gènes codant pour le $\text{TNF}\alpha$, la protéine adaptatrice TRADD et le marqueur phagocytaire CD68, en RT-qPCR

Ce travail fait l'objet d'un article présenté ci-après qui sera soumis prochainement au journal *Experimental Eye Research*.

II. Article

“Changes in retinal cholesterol metabolism in a rat model of ocular hypertension”

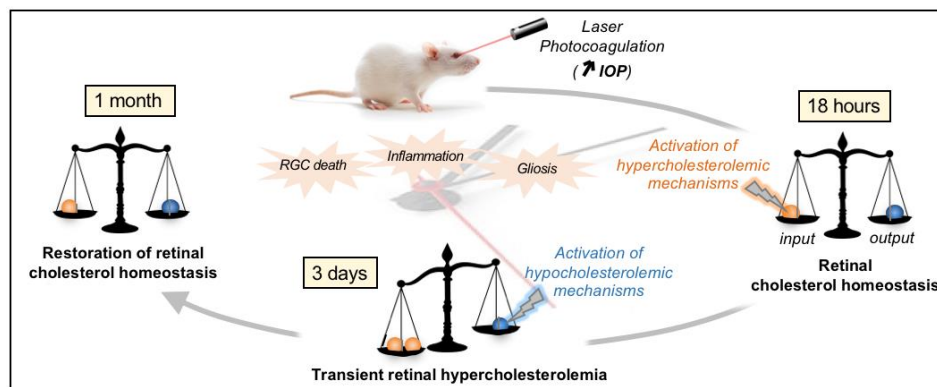
Elise LEGER-CHARNAY¹; Ségolène GAMBERT^{1,2}; Lucy MARTINE¹; Elisabeth DUBUS¹; Marie-Annick MAIRE¹; Bénédicte BUTEAU¹; Tristan MORALA¹; Alain M. BRON^{1,3}; Lionel BRETILLON¹; Elodie A.Y. MASSON¹

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

² Laboratoire de Biochimie Médicale, Plateforme de Biologie Hospitalo-Universitaire, F-21000 Dijon, France

³ Département d'Ophtalmologie, Centre Hospitalo-Universitaire de Dijon, F-21000 Dijon, France.

Graphical Abstract



Abstract

Cholesterol metabolism alterations have been described for many neurodegenerative pathologies, such as Alzheimer's disease in the brain and age-related macular degeneration in the retina. Recent evidence suggests that glaucoma, an ocular condition characterized by progressive retinal ganglion cell death, could also be linked to cholesterol homeostasis disruption. Herein, we proposed to investigate cholesterol metabolism in a rat model of intraocular hypertension, the main risk factor for glaucoma. Intraocular pressure (IOP) was increased by laser photocoagulation of ocular structures involved in aqueous humor outflow. Cholesterol metabolism was thoroughly characterized by measuring sterol levels using gas-chromatography and cholesterol-related gene expression by RT-qPCR, at various time-points (18 hours, 3 days and 1 month post-laser). We report for the first time that ocular hypertension is associated with major changes in retinal cholesterol metabolism. At the earliest time point, genes implicated in cholesterol biosynthesis and uptake were upregulated (+ 49 % and + 100 % for HMGCR and LDL-R genes respectively, vs. naive eyes). On the contrary genes involved in efflux were downregulated (-26 % and -37 % for ApoE and CYP27A1 genes respectively). Cholesterol and precursor levels were consecutively and transiently elevated (+14 %, +40 % and +194 % for cholesterol, desmosterol and lathosterol respectively, at 3 days post-laser). An important component of our work was to demonstrate that, in response to these initial dysregulations, counter-regulatory mechanisms were transcriptionally activated, which enabled the maintenance of retinal cholesterol homeostasis one month after-IOP elevation and likely participated in ganglion cell survival.

1. Introduction

Retinal cholesterol is gaining more and more attention since studies accumulate showing that dysregulations of cholesterol metabolism are associated with various retinal diseases. In the Smith-Lemli Opitz syndrome (SLOS), a mutation in the gene coding for the enzyme catalyzing the last step of cholesterol biosynthesis leads to an accumulation of 7-dehydrocholesterol and to abnormally low levels of cholesterol. Among other dramatic symptoms, this syndrome induces a progressive and irreversible degeneration of the retina (Fliesler et al., 2018). Cholesterol abnormalities have also been linked to age-related macular degeneration (AMD). Cholesterol has been shown to accumulate in the aging Bruch's membrane and to be a major component of the lipid-rich deposits typical of AMD, including drusen (2014 Pikuleva and Curcio, 2014). Besides, the discovery of variants in the cholesterol-related genes (CETP, ABCA1, LIPC, ApoE...) as risk factors for AMD strengthened the role of cholesterol in the pathophysiology of the disease (Klaver et al., 1998; Chen et al., 2010). Similarly, a single nucleotide polymorphism in the gene coding for CYP46A1, a cholesterol hydroxylase, was found to be associated with a higher risk of developing glaucoma, a neurodegenerative disease of the retina and the optic nerve (Fourgeux et al., 2009). In the brain, it is already well documented that cholesterol disturbances are linked to neurodegenerative diseases (Vance, 2012; Arenas et al., 2017). For some of them like SLOS, lathosterolosis and desmosterolosis, the initial defect stands in an enzyme of the cholesterol biosynthetic pathway. For the lysosomal disorder Niemann-Pick type C disease, a protein associated to intracellular cholesterol trafficking is affected. For others, the causal link and the mechanisms by which defects in the cholesterol metabolism could contribute to the pathophysiology of the disease remain unclear. Some recent studies focusing on Alzheimer and Huntington diseases are in favor of the toxicity of high levels of cholesterol for neurons (Djelti et al., 2015; Boussicault et al., 2016).

As an essential structural component of cell membranes, cholesterol is crucial in the central nervous system where neurons need to build up large amounts of membrane for their axons, dendrites and synapses. Well-balanced inputs and outputs of cholesterol, tuned to fit with the needs, are therefore fundamental for central nervous system functioning (Dietschy and Turley, 2004; Zhang and Liu, 2015). In the brain, cholesterol originates primarily from *de novo* biosynthesis since the brain blood barrier prevents lipoprotein uptake from the circulation. Astrocytes, the major cholesterol providers for adult neurons (Nieweg et al., 2009; Pfrieger and Ungerer, 2011), secrete cholesterol in apolipoprotein E-containing HDL-like particles (ApoE/HDL), via ABCA1 transporters. Cholesterol is subsequently captured by neurons via low-density lipoprotein (LDL) family receptors (LDLR/LRP1) (Ishiguro et al., 1995). Unlike the blood brain barrier, the blood retina barrier allows cholesterol uptake from the circulation. The retinal pigment epithelium, facing choriocapillaries, is involved in this process, due to the expression of LDL-R and scavenger-receptor BI (SR-BI) at its basal membrane (Tserentsoodol et al., 2006). Cholesterol comes also from an *in situ* biosynthesis, involving probably Müller cells, the major macroglial cells of the retina. Indeed, Müller cells highly express hydroxymethylglutaryl CoA reductase (HMGCR), the rate limiting enzyme of cholesterol synthesis, ApoE and its partner ABCA1 (Amaratunga et al., 1996; Fliesler and Bretillon, 2010; Léger-Charnay et al., 2019; Lin et al., 2016). To be eliminated, cholesterol can be directly excreted into the circulation, via reverse cholesterol transport, or be converted into oxysterols. 24(S)-hydroxycholesterol (24S-OHC) and 5-cholestenoic acid (27-COOH), synthesized respectively by the retinal ganglion cells (RGCs) specific CYP46A1 and the more ubiquitous CYP27A1, are a major route for retinal cholesterol output (Pikuleva and Curcio, 2014). Cholesterol metabolism in the retina is illustrated in Figure 1.

Intraocular pressure (IOP) is the main and only modifiable risk factor for glaucoma, a leading cause of blindness worldwide (Jonas et al., 2017). Glaucoma is a group of several conditions characterized by the progressive degeneration of a specific population of neurons in the retina, the RGCs. Until now, there is no curative treatment and IOP reduction, by drugs or surgery, is the first-line approach to slow down disease progression (Cohen and Pasquale, 2014). Interestingly, elevated IOP has been shown to induce an increase in the levels of CYP46A1 and its product 24S-OHC in an *ex-vivo* model of glaucoma (Ishikawa et al., 2016). A transient increase in CYP46A1 expression and 24S-OHC levels have also been reported, in association with glial activation, in the rat retina following laser-induced elevation of IOP (Fourgeux et al., 2012). However, there is no published data characterizing comprehensively cholesterol metabolism *in vivo*, in response to this glaucoma related stress. In the present study, we report the dysregulations of various aspects of cholesterol metabolism in the rat retina after laser-induced elevation of IOP, with a time course approach to capture changes at early and later stages.

2. Material and methods

2.1. Animals

Experiments were conducted on eight-week male Sprague-Dawley rats (Janvier, Le Genest Saint Isle, France). Animals were housed under controlled temperature ($22\pm1^{\circ}\text{C}$), hygrometry (55-60%) and light (50lux, 12h:12h dark/light cycles) conditions. Food and water were provided *ab libitum*. All procedures were approved by the local ethic committee (University of Burgundy, Dijon, France) and the French ministry of Higher Education and Research. They were also in accordance with the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) statement for the use of animals in Ophthalmic and Vision Research.

2.2. Intraocular pressure elevation by laser photocoagulation

At day 0, animals were anesthetized with an intraperitoneal injection of a ketamine (50mg/kg, Imalgène®1000, Merial, Lyon, France) and xylazine (6mg/kg, Rompun® 2%, Bayer, Puteau, France) mix. The right eye of rats received local anaesthesia (Tetracaine 1% Théa, Clermont-Ferrand, France) and was submitted to laser photocoagulation, according to a protocol adapted from Salinas-Navarro et al. (2010) and Levkovitch-Verbin et al. (2002). Briefly, episcleral veins (20-30 spots), limbus (50-60 spots) and trabecular meshwork (50-60 spots) were photocoagulated with a 532nm laser (Vitra-Quantel Medical, Clermont-Ferrand, France) connected to a slit lamp. The laser was set at 400mW for 0.5s with a beam diameter set at 260 μm . Left eyes, which were not subjected to the laser procedure, were considered as contralateral eyes. The eyes of the rats that were not subjected to the laser procedure were considered as naive eyes. Thirty minutes after the end of the procedure, animals were injected with atipamezole (0.1 mg/kg, Narcostop®, Ceva, Libourne, France) to counteract the sedative effect of xylazin. Eye drops (Optive fusion™, Allergan, Courbevoie, France) were topically applied during and after the surgery to prevent excessive dryness of the cornea. IOP was monitored, with a rebound tonometer (Tonolab®, Tiolat, Helsinki, Finland), 18 hours after the laser procedure and then at day 1, 3 14 and 30. To facilitate animal handling and avoid excessive stress during the measurement, rats were slightly sedated with isoflurane (Vetflurane®, Virbac, Carros. France).

2.3. Gene expression analysis by Taqman™ real time polymerase chain reaction

Rats were sacrificed by rising concentration of CO_2 . Eyes were dissected on ice, retinas were snap frozen in liquid nitrogen without delay and then stored at -80°C . RNA isolation was performed using the Nucleospin® RNA/protein kit (Macherey-Nagel, Hoerd, France) according to manufacturer's instructions. Reverse transcription was operated with the Quantitec® Reverse Transcription Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) with 500ng RNA per reaction. Quantitative real-time PCR (qPCR) were prepared with 20ng cDNA, TaqMan® Gene Expression Master Mix and TaqMan® probes (TaqMan® Gene Expression-Single tube assays, Thermofisher scientific, Life technologies, Courtaboeuf, France). Plates were run on a StepOnePlus™ Real-Time PCR system (Applied biosystem, Thermofisher scientific) with the following cycle profile: denaturing at 95°C for 20 s followed by 40 cycles at 95°C for 1 s and 60°C for 20 s. β -glucuronidase (Gusb) expression was used as a reference to normalize cDNA amounts. Relative quantification (RT) values were calculated by the StepOne v2.3 software from automatic threshold and baseline.

2.4. Sterol quantitation by gas chromatography

Retinas were collected as described for the gene expression analysis and stored at -80°C until used. Samples were homogenized in water and small aliquots were collected for DNA normalisation. Total lipids were extracted according to the Moilanen and Nikkari (1981) protocol. Concisely, proteins were precipitated with a solution of chloroform-methanol (1:1, v/v). A chloroform-acidic NaCl solution was mixed with the supernatant and total lipids were collected in the chloroform-rich-lower phase. For sterol and oxysterol quantification, except 27-COOH, assays were carried out following the procedure described in Fourgeux et al. (2012). In brief, total lipids were submitted to alkaline hydrolysis. Material that could not be saponified, containing sterols, was extracted in chloroform. Cholesterol was quantified from 1/10 of the total non-saponified material, after trimethylsilyl ether derivation and addition of 2 μg 5 α -cholestane as a standard, by gas chromatography coupled to a flame ionization detector (GC-FID) (HP4890A, Hewlett-Packard, DB-5MS column, Agilent, Santa Clara, CA). In the remaining 9/10 of the non-saponified fraction, deuterated standards and betulin were added: 200 ng [26,26,26,27,27,27- $^2\text{H}_6$] desmosterol, 100 ng [25,26,26,26,27,27,27- $^2\text{H}_7$] lathosterol, 50 ng

[25,26,26,26,27,27,27-²H₇] 24S-OHC. Samples were purified on silica columns (Supelco®, Sigma, St Quentin-Fallavier, France) and derivatized to trimethylsilyl ethers. Cholesterol precursors and oxysterols were quantified by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) (5973N, Agilent; DB-5MS column, Agilent, Santa Clara, CA). Sterols were identified in SCAN mode according to their specific spectra and retention times defined by unlabelled standards. Sterols were quantified in SIM mode with the ions (m/z) listed in Table 2. For 27-COOH quantitation, 300 ng [25,25,26,26,26-²H₅] 27-COOH were added to total lipids. Samples were not submitted to alkaline hydrolysis but directly purified on silica columns, according to the protocol mentioned above for cholesterol precursor and oxysterol quantitation. After diazomethane and trimethylsilyl ether derivations, 27-COOH was quantified using GC-MS.

2.5. Immunohistofluorescence on flat-mounted retinas and frozen sections

Rats were deeply anesthetized with an intraperitoneal injection of pentobarbital (1mL/kg, Doletal, Vetoquinol®, Lure, France). After a saline rinse, animals were perfused transcardially with 400mL of 4% paraformaldehyde in 0.1M phosphate buffer, for 20 minutes.

2.5.1. Flat-mounted retinas.

Eyes were collected and post-fixed for one hour at 4°C. Retinas were dissected, cut radially to allow them to flatten, and post-fixed again for one hour at 4°C. After a gentle brushing, to get rid of the vitreous body, retinas were incubated overnight at 4°C with Brn3a antibody (1:100, mouse sc-8429, Santa Cruz Biotechnologies, Heidelberg, Germany) diluted in blocking buffer (PBS, 2% normal goat serum (Dako, Glostrup, Denmark), 2% triton X100). Retinas were washed three times in 0.5% triton-PBS and incubated with anti-mouse Alexa 488 antibody (1:500, A11-001, Thermofisher scientific, Reinach, Switzerland) in blocking buffer, for 2 hours at room temperature. After two washes in 0.5% triton- PBS, retinas were rinsed in PBS, and then mounted vitreal side up in an anti-fading solution (FluoMounting Medium, Dako, Carpinteria, CA).

2.5.2. Retinal cross-sections.

Eyes were post-fixed for 30 minutes at 4°C. Cornea and lens were removed and eyecups were post-fixed one additional hour at 4°C. After progressive cryoprotection in 15 - 30% sucrose in 0.1M phosphate buffer, eyecups were embedded in optimal cutting temperature compound (Tissue-Tek®, Sakura, Finetek, Torrance, CA) and frozen in cold liquid nitrogen. Samples were stored at -80°C before and after cryosectioning. Immunolabelling was operated as follows. Sections (10µm) were rehydrated for 5 min in PBS, permeated/saturated in 1% BSA-PBS, 0.1% Triton X100, 0.05% tween[®] 20, for 1 hour at room temperature, then incubated overnight at 4°C in primary antibody (mouse anti-GFAP, 1:100, AYZ280, Interchim; mouse anti CD68, 1:200, mca341r, AbDserotec Biorad; rabbit anti Iba1, 1:200, PA5-27436, Thermofisher scientific; rabbit anti caspase 3a, 1:500, 9661S, Cell Signaling Technology) diluted in saturating buffer. Sections were rinsed three-times in PBS and incubated with the species-specific Alexa fluor-conjugated secondary antibody (Goat anti-mouse 488, A11001; goat anti mouse 594, A11005; goat anti-rabbit 488, A11008; goat anti rabbit 594, A11012 Thermofisher scientific; 1:500) in saturating buffer, for 1 hour at room temperature. After washing, sections were mounted in anti-fading solution. Cell nuclei were visualized with DAPI (4', 6-diamidino-2-phenylindole).

2.5.3. Image acquisition and analysis.

Images were acquired with a SP8 Leica confocal laser-scanning microscope connected to Leica Application Suite X (LasX) software. For flat-mounted retinas, they were captured as multi-frame acquisitions, using an hybrid detector, a x20 objective and a 1.12 zoom with a 2048x2048 resolution. Focus correction was manually applied on strategic points to guarantee a clear view of RGC layer in each tile. Images were combined automatically into single tiled image by LasX software. RGC counting was operated with a script developed by us on ImageJ 1.52g. Automatic counting was supplemented by manual counting when necessary. For retinal sections, images were captured, using an hybrid detector, a x40 objective with a 1024x1024 resolution.

2.6. Statistical analysis

Statistical analyses were run with GraphPad Prism6 software. All the tests were two-tailed. A paired t- test was applied, at each experimental time point, to compare IOP in laser *versus* contralateral eyes. An unpaired t- test was used to compare IOP in laser or contralateral eyes *versus* naive eyes (n=25 animals minimum per group). Because standard deviation (SD) was different between laser and naive, the Welch's correction was applied to these groups. Data are represented as mean ± SEM. Regarding gene expression analyses, sterol

quantitation and RGC counting, we performed Wilcoxon matched-pair tests to compare laser *versus* contralateral eyes, and Mann-Whitney tests to compare laser or contralateral eyes *versus* naive ones (n=6-8 in each group for the gene expression analysis and immunolabelling, n=7-8 for sterol quantitation, n= 4 for RGC counting). Data are represented as mean $\pm$ S.D.

3. Results

3.1. Laser photocoagulation induced IOP elevation, glial activation and inflammation

The time-course of IOP, following laser photocoagulation of the limbus, episcleral veins and trabecular meshwork is presented in Figure 2. IOP of contralateral and naive eyes, corresponding to pressure baseline, remained steady at 9 mmHg $\pm$ 0.2 all over the experimental time period. On the contrary, IOP was clearly increased in the laser-treated eyes as early as 18h after the procedure (33 mmHg $\pm$ 1.5, $p < 0.0001$ vs. contralateral or naive) and was maintained until day 3 (34 mmHg $\pm$ 1.4, $p < 0.0001$). Thereafter the IOP of laser-treated eyes progressively returned to baseline, however remaining significantly higher than control eyes during 21 days.

This ocular hypertension was associated with a strong inflammation demonstrated by an increase in CD68, TNF α and Tradd gene expression in the retina of the laser-treated eyes as compared to controls (Fig. 3). This increase, initiated as early as 18h post-laser, was especially important for CD68 at 3 days post-laser and remained significant at 1 month although not as strong.

IOP elevation was also associated with an activation of macroglial cells as shown by a rise in GFAP expression measured using RT-qPCR, as early as 18h post-laser and especially important at 3 days post-laser (Fig. 4A). GFAP expression was not as robust at the 1-month time point but remained much higher in the retina of laser-treated eyes than in contralateral or naïve eyes. Gliosis was also illustrated by a strong GFAP staining on the retinal sections of laser-treated eyes (Fig 4B). In naive eyes, GFAP staining was low and restricted to the nerve fiber layer. Following laser treatment, activated Müller cells appeared clearly at 18 hours, and especially prominently from day 3, crossing the retina from the nerve fiber layer to the outer nuclear layer. Moreover, a characteristic Iba-1 staining (Fig. 4C) indicated the activation of microglial cells. Indeed, while we detected only a few Iba-1 positive resting cells with long and ramified processes, resident of the ganglion cell and plexiform layers under control conditions, they largely proliferated in response to laser treatment differentiating into amoeboid cells indicative of a “phagocytic” microglia. At first concentrated into the ganglion cell layer, they migrated towards the outer nuclear layer from day 3. At 1 month, most of the Iba-1 positive cells of the ganglion cell and plexiform layers appeared with an intermediate morphology, less rounded and with truncated processes and some activated cells had migrated up to the photoreceptor segment layer. Iba-1 staining was also performed in combination with CD68. It appeared that CD68 staining co-localized with Iba-1 (Suppl Fig 1), suggesting that the phagocytic cells present in the retina following laser treatment were activated microglial cells.

Immunostaining of retinal cryosections were performed on both naive and contralateral eyes. It is noticeable that no major difference was observed between these two groups (Suppl Fig 2) regarding inflammation or gliosis. This is in accordance with the RT-qPCR results (Fig.3 and Fig. 4A) and indicates that the disturbances induced by the laser procedure were not transferred from the treated eye to the contralateral one under our experimental conditions.

3.2. Cholesterol metabolism undergoes early changes in response to the laser-induced IOP elevation

The expression of various genes involved in cholesterol metabolism (synthesis, uptake, efflux and elimination, as well as regulation) was measured using RT-qPCR. As early as 18 hours following laser treatment, the expression of several genes was strongly modified. As shown in Figure 5A, the transcript levels of HMGCR, the rate-limiting enzyme of cholesterol biosynthesis, was increased by 49 % in the retina of laser-treated eyes, compared to naive eyes. The gene expression of LDL-R, a lipoprotein receptor used by the cells for the uptake of cholesterol, was also strongly increased (2-fold compared to naive eyes). The gene expression of SR-BI, a membrane receptor mediating a bi-directional transport of cholesterol, was slightly increased. Conversely, the transcript levels of ApoE, an apolipoprotein implicated in cholesterol efflux, were decreased by 26 % in laser-treated eyes, compared to naive eyes. The gene expression of CYP27A1, an enzyme playing a major role in cholesterol elimination from the retina, was also decreased by 37 % in response to laser treatment. By contrast, the gene expression of CYP46A1, the other main cholesterol hydroxylase of the retina, appeared to be unaffected

by the laser treatment. The transcript levels of SREBP2, a transcription factor implicated in the activation of hypercholesterolemic mechanisms were also increased. All the modifications we observed were therefore directed towards an increase in cholesterol levels.

However, at this 18 hour post-laser experimental time point, results showed that retinal cholesterol levels were not different between laser-treated eyes and non-treated eyes (Fig. 6A). Two major precursors of cholesterol, desmosterol and lathosterol, were also quantified and did not show any change (Fig. 6B). The levels of 24S-OHC seemed to be slightly decreased, although not significantly (Fig. 6C). Neither 27-OHC nor 27-COOH could be detected.

3.3. Counter-regulatory mechanisms of cholesterol metabolism are activated 3 days after laser treatment

Three days after laser treatment, the levels of cholesterol were slightly but significantly increased (Fig. 6A). The levels of cholesterol precursors, desmosterol and especially lathosterol, were strongly increased in the retina of laser-treated eyes as compared to controls (Fig. 6B) (+40 % and +194 % compared to naive, respectively). These modifications appeared to be consecutive to the hypercholesterolemic mechanisms described above and activated 18 hours following the laser procedure, especially the strong overexpression of HMGCR gene. The levels of the oxysterol 24S-OHC appeared to be unaffected by the laser procedure at this time point (Fig. 6C).

Regarding the expression of the genes implicated in cholesterol metabolism, our results showed a reversion of the modifications observed at 18 hours post-laser (Fig. 5B). Indeed, the expression of HMGCR and LDL-R genes were significantly decreased in the retina of laser-treated eyes as compared to non-treated eyes (-32 % for both, compared to naive eyes). SR-BI gene was also decreased without reaching statistical significance. The gene expression of ApoE was back to control levels and the expression of its partner, ABCA1, a transporter used to lipidate apolipoproteins and export cholesterol from the cells, was strongly increased (x2,4 fold compared to naive eyes). In addition, the gene expression of LXR α , a transcription factor implicated in activating hypocholesterolemic mechanisms, was increased while the gene expression of SREBP2 was decreased in the retina of laser-treated eyes as compared to non-treated eyes. These changes are in line with an activation of mechanisms aiming at decreasing retinal cholesterol levels, except for CYP27A1, whose transcript levels were still decreased in the laser-treated eyes compared to naive eyes (-26 % vs. naive) and LXR β , the more ubiquitous isoform of LXR, whose transcript levels were also decreased. Again, the expression of CYP46A1 gene was unaffected by the intervention.

3.4. Cholesterol status is recovered 1 month after laser treatment

At the later time point of 1 month post-laser, retinal cholesterol levels of treated eyes were back to normal (Fig. 6A). The levels of the cholesterol precursors, desmosterol and lathosterol, were decreased in laser-treated eyes as compared to naive eyes (-27 % and -34 %, respectively) (Fig. 6B). These changes appeared to be consecutive to the hypocholesterolemic mechanisms described above and activated 3 days after the laser procedure. The levels of 24S-OHC were unchanged (Fig. 6C).

Most of the modifications of the expression of genes involved in cholesterol metabolism between treated and non-treated eyes turned out to be similar at 1 month and 3 days post-laser (Fig. 5C). Indeed, the expression of HMGCR gene was decreased (-27 % compared to naive eyes), although not significantly, as well as the expression of LDL-R gene (-47 %), while the expression of ABCA1 gene was increased (x2 fold). Regarding the main transcription factors regulating cholesterol metabolism, the gene expression of LXR α was increased while the gene expression of SREBP2 was decreased. Again, the gene expression of LXR β was decreased, contrary to LXR α . In addition, the transcript levels of ApoE and CYP27A1 were significantly increased in the retina of laser-treated eyes as compared to control eyes (+41 % and +46 % compared to naive, respectively). Similarly to what was observed at the previous time points, the expression of CYP46A1 gene appeared to be unaffected by laser treatment. Overall, these results indicate that the hypocholesterolemic mechanisms activated from 3 days post-laser were maintained and even reinforced 1 month later.

It is noticeable that IOP was back to its normal level at that experimental time point (Fig. 2).

3.5. Laser-induced IOP elevation triggers RGC death

The viability of RGCs was evaluated by measuring the gene expression of specific markers: Brn3a, Brn3b, Rbpms and Thy1. Eighteen hours following the laser procedure, Brn3b transcript levels were the only ones to show a slight decrease in response to the laser procedure (-23 % vs. naive) (Fig 7A), indicating that the RGCs might undergo some stress. At day 3 post-laser, we observed a substantial down-regulation of Brn3a and Brn3b gene expression in response to laser-induced IOP elevation, by 39 % and 51 % compared to naive eyes, respectively. The expression of Rbpms and Thy1 genes were also decreased, but to a lower extent in the retina of laser-treated eyes compared to naive eyes (-23 % and -26 %, respectively). One month later, the gene expression of the RGC markers were similar in laser-treated eyes and non-treated eyes. RGC death was also evaluated by counting Brn3a+ cells on flatmounted retinas. Results indicated a loss of RGCs of about 15 % 3 days after the laser treatment, which did not seem to be aggravated 1month later (Fig. 7B). In addition, staining for activated caspase 3, an important executioner of apoptosis, was performed on retina sections. We observed a clear staining in the ganglion cell layer at 18 h and 3 days post-laser (Fig. 7C) indicative of dying RGCs. This staining was not present 1 month later suggesting that dead RGCs had been eliminated from the retina.

4. Discussion

Overall our results show that laser photocoagulation, which rapidly induces increased IOP, inflammation, glial activation, as well as RGC death, is associated with early and transient disturbances in sterol levels. These results are summarized in Figure 8.

The initial disturbances resulting from the laser procedure were able to significantly modify cholesterol metabolism as shown by the changes in the gene expression of cholesterol related genes as early as 18 hours post-laser. The causing trigger(s) and the mechanisms underlying such modifications remain to be determined. Very few data have been published on that matter. There are a couple of studies reporting on a link between increased IOP and cholesterol metabolism. The first one was performed in an *ex vivo* rat retina (Ishikawa et al., 2016). The authors showed that pressure elevation increased the expression of CYP46A1 gene and protein as well as the levels of 24S-OHC, while decreasing cholesterol levels. The other one was performed in our laboratory in a rat model of laser-induced IOP elevation (Fourgeux et al., 2012). A transient increase in CYP46A1 enzyme retinal expression was measured 3 days following the laser procedure, as well as an increase in 24S-OHC peaking at 1 month. This was associated with retinal gliosis and a systemic inflammation indicated by increased MCP-1 and ICAM-1 plasma levels. On the contrary, in the present study, CYP46A1 gene expression and the 24S-OHC levels were unchanged at all experimental time points tested. The CYP46A1 gene expression is known to be very stable and faintly regulated at the post-transcriptional level (Ohya et al., 2006). This could explain why we did not measure any change in transcript levels. A few studies suggest that hypercholesterolemia and cholesterol derivatives could generate neuro-inflammation associated with glial activation. There is no data to our knowledge to support the idea that, conversely, inflammation and gliosis could result in disturbances of cholesterol metabolism. However, there is evidence that Müller cells are major players of cholesterol metabolism in the retina (Amaratunga et al., 1996; Fliesler and Bretillon, 2010; Léger-Charnay et al., 2019) especially of cholesterol biosynthesis, uptake via LDL-R and efflux via ApoE and ABCA1. It is therefore not surprising that the activation of these cells we observed in our model result in global changes in cholesterol metabolism in the retina. Moreover, similarly to what has been proposed in the brain (Pfrieger and Ungerer, 2011), cholesterol homeostasis in the retina might rely on a close cooperation between glial cells, acting as cholesterol providers and neurons, acting as cholesterol consumers. One can thus expect that the RGC stress we observed from 18 hours to 3 days post-laser can also generate some changes in cholesterol metabolism.

Interestingly, it appears that counter-regulatory mechanisms are activated 3 days post-laser in response to the early disturbances in cholesterol metabolism, leading to the restoration of cholesterol homeostasis. Our *in vivo* model does not permit to decipher precisely the contribution of each cell type to the observed modifications of the cholesterol metabolism. Indeed, the changes measured in the expression of cholesterol-related genes or the sterol levels reflect the retina as a whole. However, immunohistochemistry gives us some insight, by highlighting a large activation of macroglial but also microglial cells in response to the laser procedure, which clearly appeared more dramatic at day 3. It is reasonable to hypothesize that the microglial cells, considered as the macrophage-like cells of the retina, actively participate in the modifications of cholesterol metabolism we

measured. Since literature data tend to indicate that cholesterol overload may be neurotoxic (Ayciriex et al., 2017), we hypothesize that the hypocholesterolemic mechanisms we observed may prevent side effects of abnormal sterol levels and limit the extent of RGC death. Indeed, our model of laser-induced IOP elevation resulted in moderate loss of RGCs. Apoptosis could be observed at 18 hours and day 3, but no longer at 1 month, leading to about 15% RGC loss, which is small compared to previously published studies (60% loss 3 weeks post-laser for Salinas-Navarro et al. (2010) and 68% after 3 months for Schnebelen et al. (2009)). The variability in the severity of RGC or axonal loss and IOP profile between laboratories might be due to laser specifications and technical use: spot size and number, power, use of slit lamp or endoscopic probes (Johnson et al., 2010; Levkovitch-Verbin et al., 2002; Salinas-Navarro et al., 2010; Schnebelen et al., 2009; Soto et al., 2011). Moreover, it is likely that in our experimental model, the strong and sustained inflammation triggered a robust glial activation that contributed to protect RGCs against IOP-induced damages. Indeed, it is well documented that inflammatory reactions help RGCs survive injuries. The beneficial effects of intraocular inflammation are usually attributed to activated macrophages but the contribution of retinal astrocytes and Müller cells has also been proposed (Hauck et al., 2007; Hauk et al., 2008).

It is striking that a panel of genes implicated in hyper and afterward hypocholesterolemic mechanisms were modulated in a coordinated manner in our model. Contrary to the findings made by Zheng et al. (2015) in other models, suggesting that non transcriptional mechanisms regulate cholesterol input and output in the retina, we show here a strong transcriptional regulation of the major players of cholesterol homeostasis in this tissue. Indeed, the authors reported that changes in sterol (cholesterol and precursors) levels using various models: high cholesterol diet, CYP27A1^{-/-} or simvastatin-treated mice did not significantly affect the transcription of retinal cholesterol-related genes (Zheng et al., 2015). We think that, in our model of laser-induced IOP elevation, a common regulator of cholesterol metabolism could be modulated. SREBP2 could be this regulator since it is known to upregulate the expression of cholesterologenic genes, especially his main targets *HMGCR* and *LDLR* (Madison, 2016) which are strongly regulated in our model. Our results show that the gene expression of SREBP2 itself can be regulated and it is generally considered that its activity is subjected to regulation (Mutemberezi et al., 2016). LXR α , which is a transcription factor known to activate hypocholesterolemic mechanisms, might be implicated as well, since it was also responsive to our experimental model. *ApoE* and *ABCA1*, highly regulated under our conditions, are among its major targets (Zhao and Dahlman-Wright, 2010). The robust regulation of *LDLR*, *ApoE* and *ABCA1* gene expression we observed in our model is consistent with the fact that lipoprotein trafficking is a major way to maintain cholesterol homeostasis in the retina. The overexpression of *ABCA1* and *ApoE* is indicative of a reverse efflux of cholesterol to HDL particles that contribute to eliminate cholesterol from the retina and avoid an overload that would result from the large increase in cholesterol biosynthesis and precursor levels measured in response to the laser procedure. As we previously reported using primary rat Müller cell cultures, it seems that oxysterol biosynthesis is not a major player for cholesterol homeostasis maintenance in the retina, when compared to cholesterol transport and synthesis (Léger-Charnay et al., 2019). Neither the gene expression nor the levels of 24S-OHC were regulated in our experimental model. Only the gene expression of CYP27A1 was at first downregulated following laser treatment then upregulated after the activation of hypocholesterolemic mechanisms. Despite this upregulation, we could not detect 27-COOH levels in the rat retina. This is not in accordance with a previous study reporting significant levels of 27-COOH in post-mortem bovine and human retinas (Mast et al., 2011). However, in mouse retinas, Omarova et al. (2012) did not detect the presence of this oxysterol. This discrepancy could be due to species specificities or to the time elapsed between the death of the animal and the collect of the retina. Mast et al. (2011) indeed showed an increase in retinal 27-COOH content during this period.

Figures

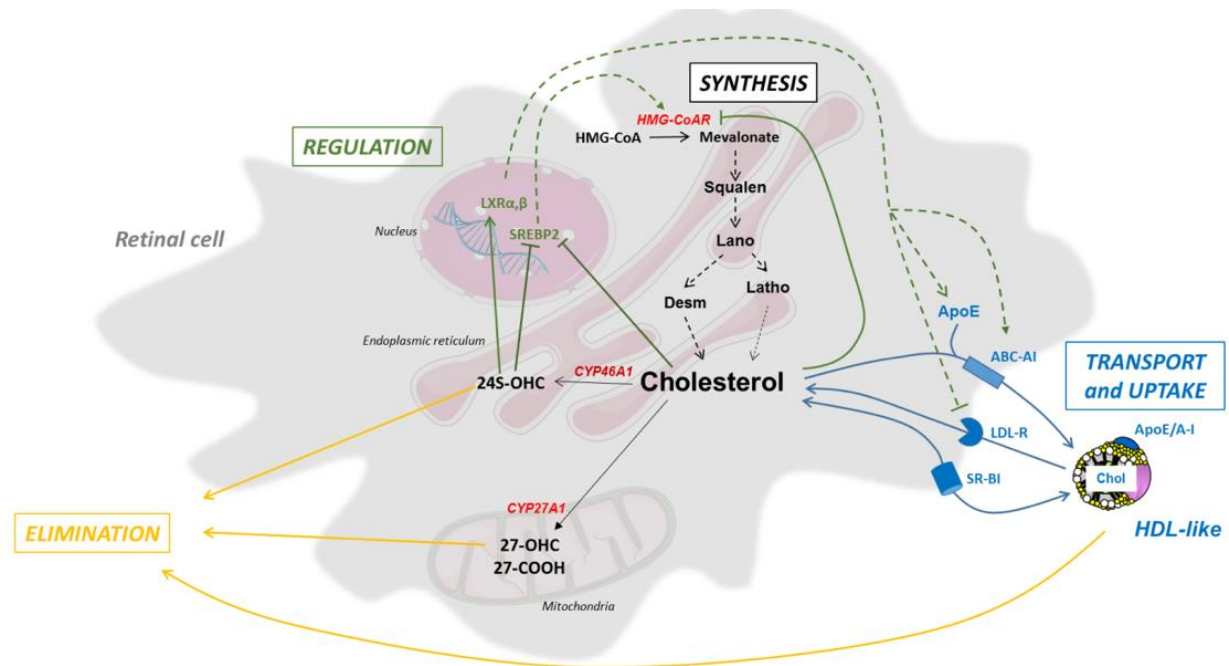


Figure 1. Key actors of cholesterol metabolism in the neuroretina. Retinal cells acquire cholesterol by the uptake of HDL-like particles present in their environment, due to LDL-R family and SR-BI receptors. Cells can also synthesize cholesterol, HMG-CoA reductase catalyzing the limiting step of the process. The biosynthesis may occur primarily in glial cells. Cholesterol export is achieved by HDL-like synthesis, notably via ABC transporters. These lipoparticles are subsequently captured by neighboring cells, especially neurons. They can also cross the inner blood-retina barrier to reach the systemic circulation and be eliminated. Moreover, cholesterol output involves its conversion into oxysterols, the main two being 24S-OHC and 27-COOH, produced by CYP46A1 and CYP27A1 enzymes, respectively. Cholesterol metabolism is finely tuned by several regulatory mechanisms, LXR and SREBP2 being probably the major players.

Chol: cholesterol, 24S-OHC: 24(S)-hydroxycholesterol, 27-COOH: 3 β -hydroxy-5-cholestenoic acid.

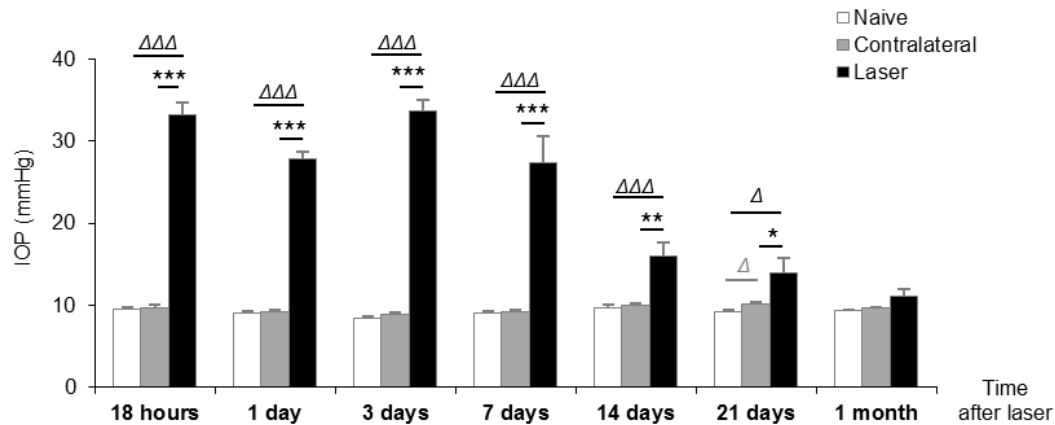


Figure 2. Laser procedure induces a sustained ocular hypertension. The right eye of Sprague-Dawley rats was submitted to laser photocoagulation of the trabecular meshwork, episcleral veins and limbal plexus. The left eye was considered as contralateral eye. The intraocular pressure was monitored regularly on both eyes as well as on naive eyes (of rats which were not subjected to the laser procedure on any eye), under gas anaesthesia, with a rebound tonometer (Icare®TonoLab). Ocular hypertension occurred as early as 18 hours after laser surgery and was maintained for 21 days. The results are presented as mean $\pm$ SEM of a minimum of 25 animals. Δ $p < 0.05$, $\Delta\Delta$ $p < 0.01$, $\Delta\Delta\Delta$ $p < 0.001$ vs naive (unpaired t test). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs contralateral (paired t test).

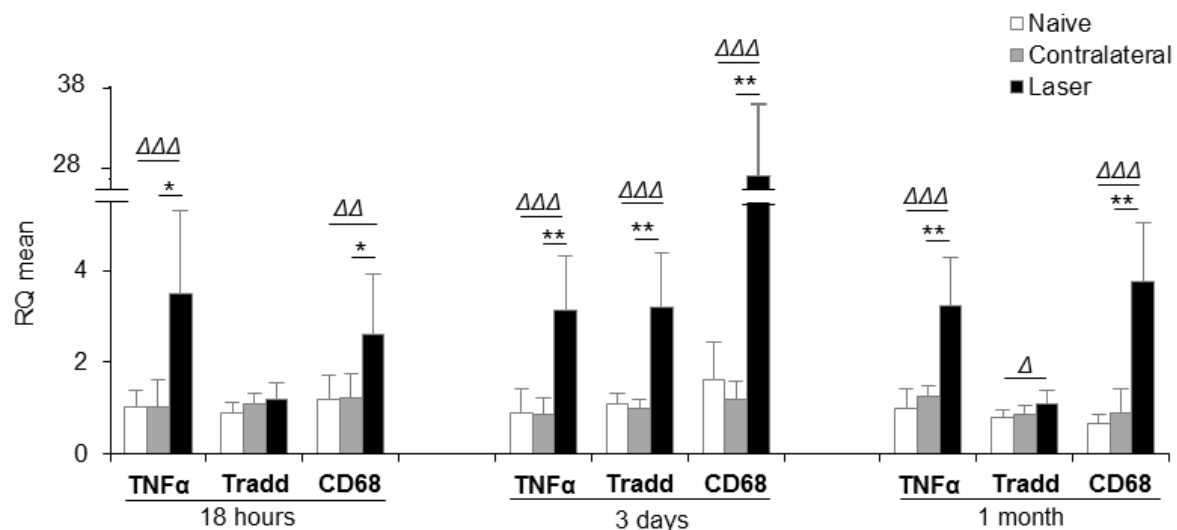


Figure 3. Laser procedure induces a strong retinal inflammation. Gene expression was assessed using RT-qPCR on retinas collected at 18 hours, 3 days or 1 month after laser photocoagulation. Data were analysed using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. A strong inflammation was measured as early as 18 hours post-laser. It reached a peak at 3 days and was still significant at 1 month in spite of a decrease. The results are presented as mean $\pm$ S.D. $n = 6-8$. Δ $p < 0.05$, $\Delta\Delta$ $p < 0.01$, $\Delta\Delta\Delta$ $p < 0.001$ vs naive (Mann-Whitney test), * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs contralateral (Wilcoxon matched-pairs signed rank test).

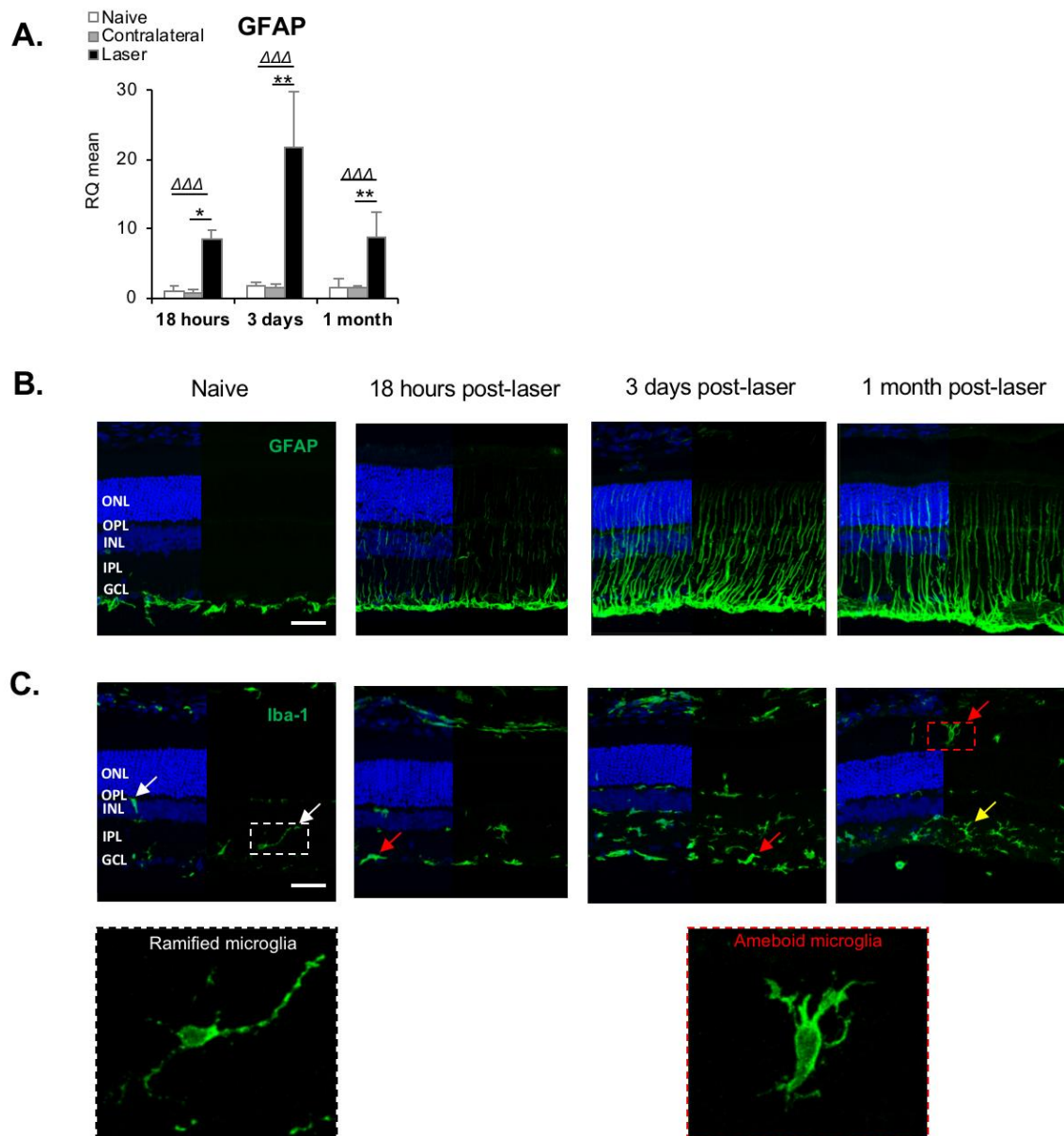


Figure 4. The laser procedure is associated with a persistent gliosis in the retina. Activation of macroglial cells was monitored by measuring GFAP gene expression using RT-qPCR (**A**) and by immunolabeling for GFAP (**B**). From 18 hours to one month post-laser, GFAP signal was strongly increased in laser eyes compared to naive eyes. Microgliosis was assessed by immunostaining for Iba-1 (**C**). In naive eyes, there are few microglial cells, localised in the ganglion cell and plexiform layers. The cells are ramified (white arrows), indicating that they are in a resting state. As early as 18 h post-laser, microglial cells are activated, as illustrated by their amoeboid morphology (red arrows). From day 3, microglia proliferates and migrates into all retinal layers. At 1 month, microglia is still reactive but many cells are no more amoeboid (yellow arrows). Nuclei were stained with Dapi (blue). Scale bar: 50 μ m. Images shown are representative of n=6-8. ONL: Outer Nuclear Layer, INL: Inner Nuclear Layer, GCL: Ganglion cell layer. For gene expression analyses: Δ $p < 0.05$, $\Delta\Delta$ $p < 0.01$, $\Delta\Delta\Delta$ $p < 0.001$ vs naive (Mann-Whitney test), * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs contralateral (Wilcoxon matched-pairs signed rank test). n=6-8 retinas.

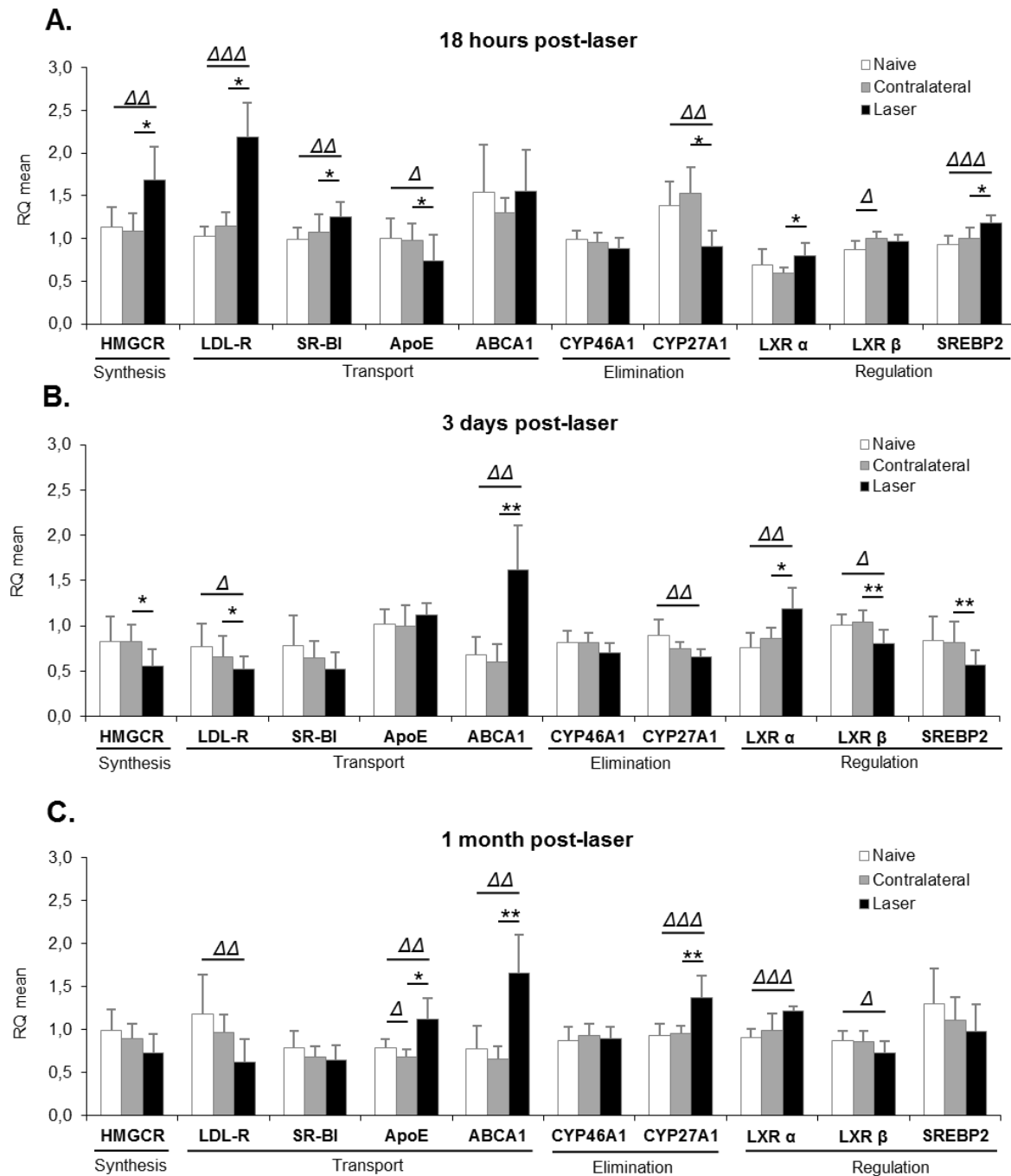


Figure 5. Hypercholesterolemic mechanisms activated 18 hours following laser procedure are rapidly compensated by the activation of hypocholesterolemic mechanisms from 3 days post-laser. Gene expression was assessed using RT-qPCR on retinas collected at 18 hours (A), 3 days (B) or 1 month (C) after laser photocoagulation. Data were analysed using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. Results are presented as mean $\pm$ S.D. n=6-8 retinas. Δ $p < 0.05$, $\Delta\Delta$ $p < 0.01$, $\Delta\Delta\Delta$ $p < 0.001$ vs naïve (Mann-Whitney test), * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs contralateral (Wilcoxon matched-pairs signed rank test).

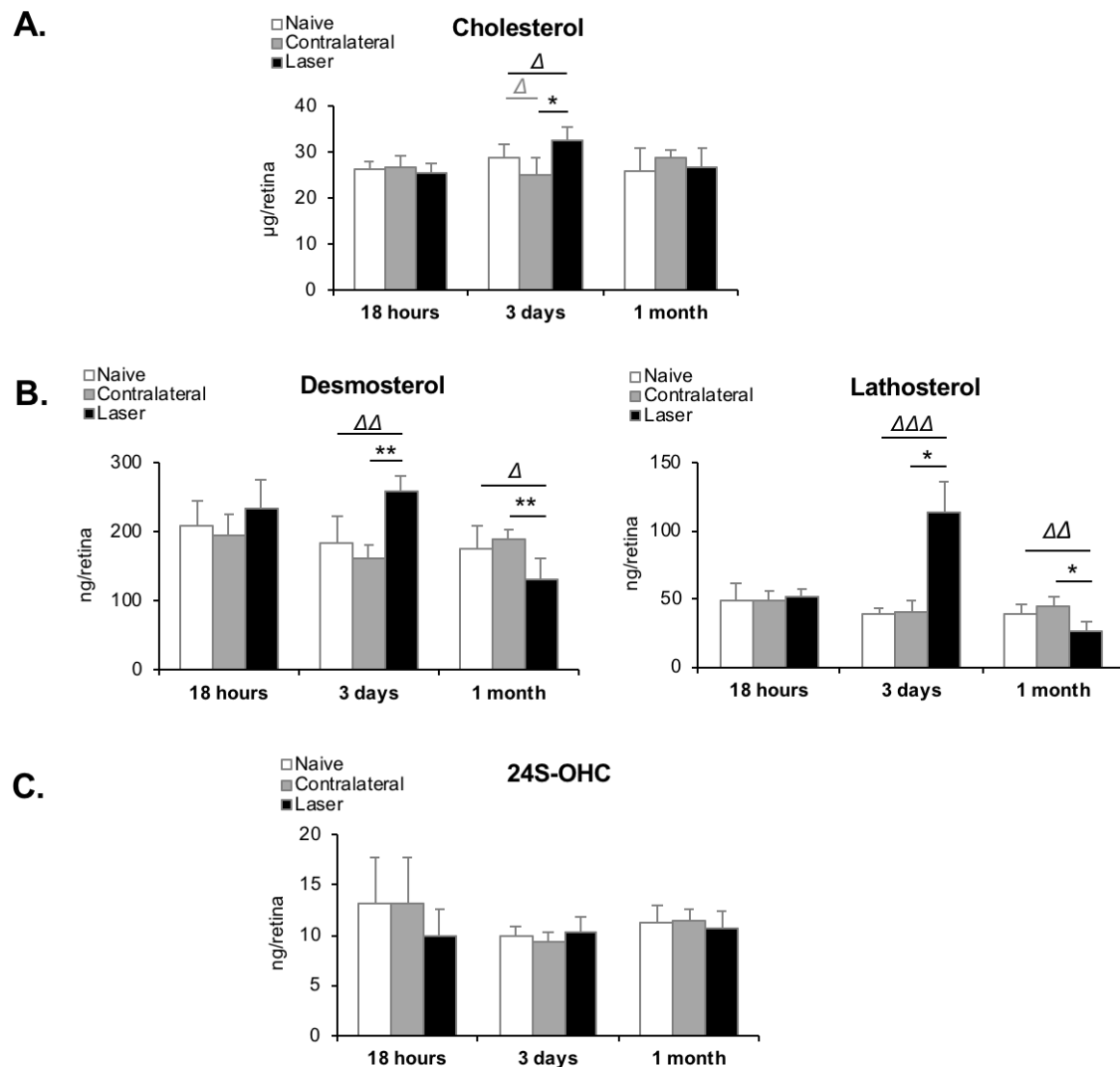


Figure 6. Laser procedure induces a transient increase in cholesterol and cholesterol precursors levels in the retina. (A) Cholesterol was quantified using GC-FID. Cholesterol levels were slightly increased at day 3 after laser photocoagulation and returned to baseline at 1 month. (B) Cholesterol precursor levels, desmosterol and lathosterol, were measured using GC-MS. They were strongly increased at day 3 and decreased at 1 month post-laser. (C) Levels of 24S-hydroxycholesterol (24S-OHC) were measured using GC-MS. They were not affected by laser procedure. Results are presented as mean $\pm$ S.D. $n=7-8$ retinas in each group. Δ $p<0.05$, $\Delta\Delta$ $p<0.01$, $\Delta\Delta\Delta$ $p<0.001$ vs naïve (Mann-Whitney test), * $p<0.05$, ** $p<0.01$ vs contralateral (Wilcoxon matched-pairs signed rank test).

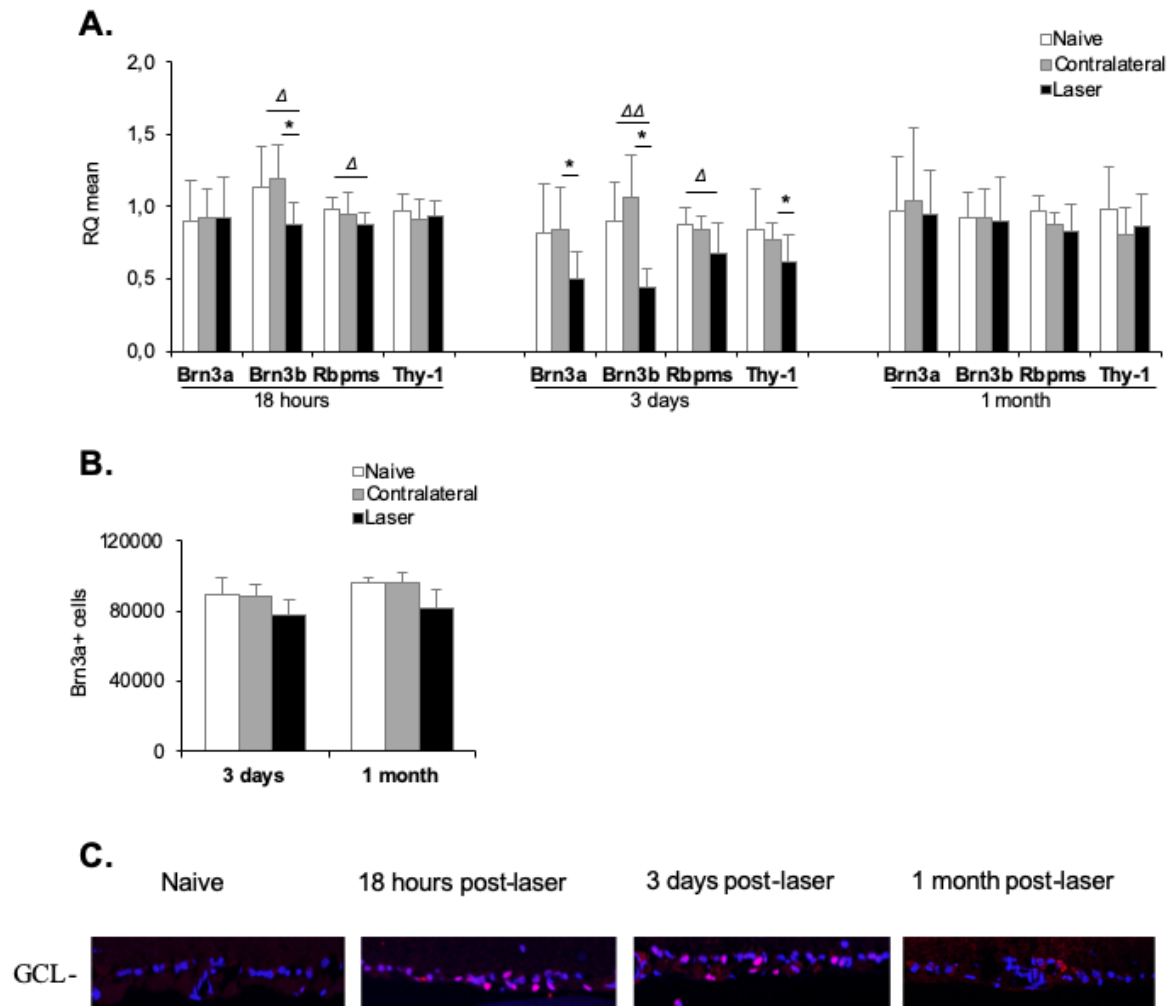


Figure 7. Laser-induced IOP elevation triggers retinal ganglion cell death. (A) Gene expression was assessed using RT-qPCR on retinas collected at 18 hours, 3 days or 1 month after laser photocoagulation. Data were analysed using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. The expression of every RGC specific marker was decreased at 3 days post-laser, especially Brn3a and Brn3b. Results are presented as mean $\pm$ S.D. $n=6-8$ retinas. Δ $p < 0.05$, $\Delta\Delta$ $p < 0.01$ vs naive (Mann-Whitney test), * $p < 0.05$ vs contralateral (Wilcoxon matched-pairs signed rank test). (B) The number of RGC was assessed by counting the number of Brn3a-positive cells on flatmounted retinas 3 days or 1 month post-laser. Results are presented as mean $\pm$ S.D. Preliminary data obtained on 4 retinas (no statistical analysis performed so far). (C) Activated caspase 3 immunostaining was performed on retina cryosections showing apoptotic cells in the RGC layer at 18 hours and 3 days post-laser. Scale bar: 50 μ m. Images shown are representative of $n=6-8$ retinas.

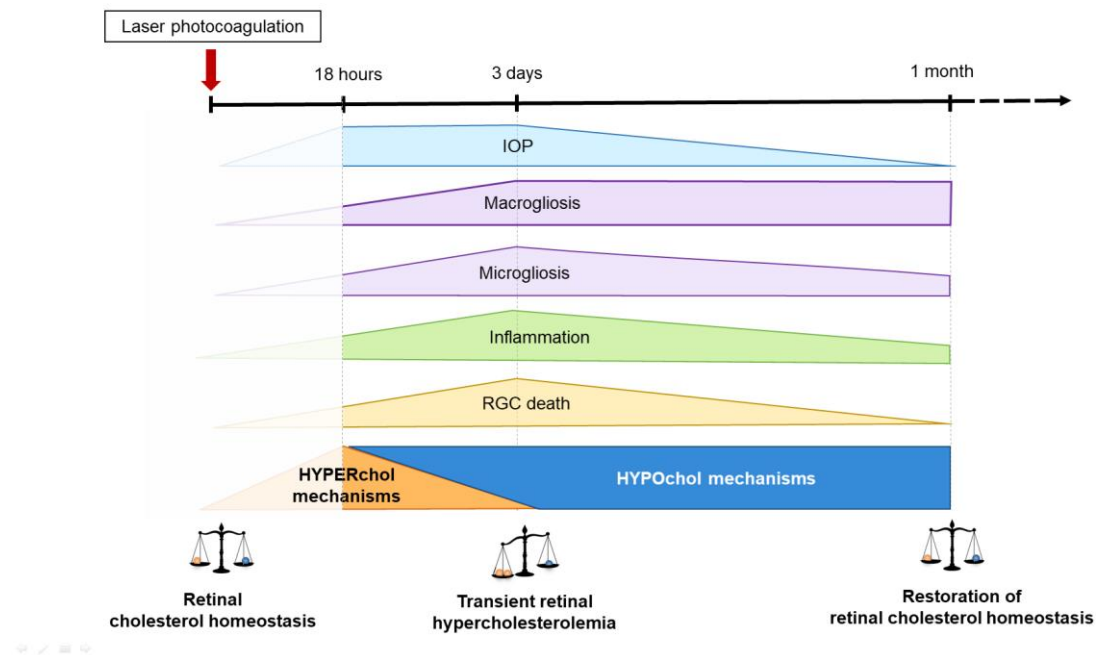
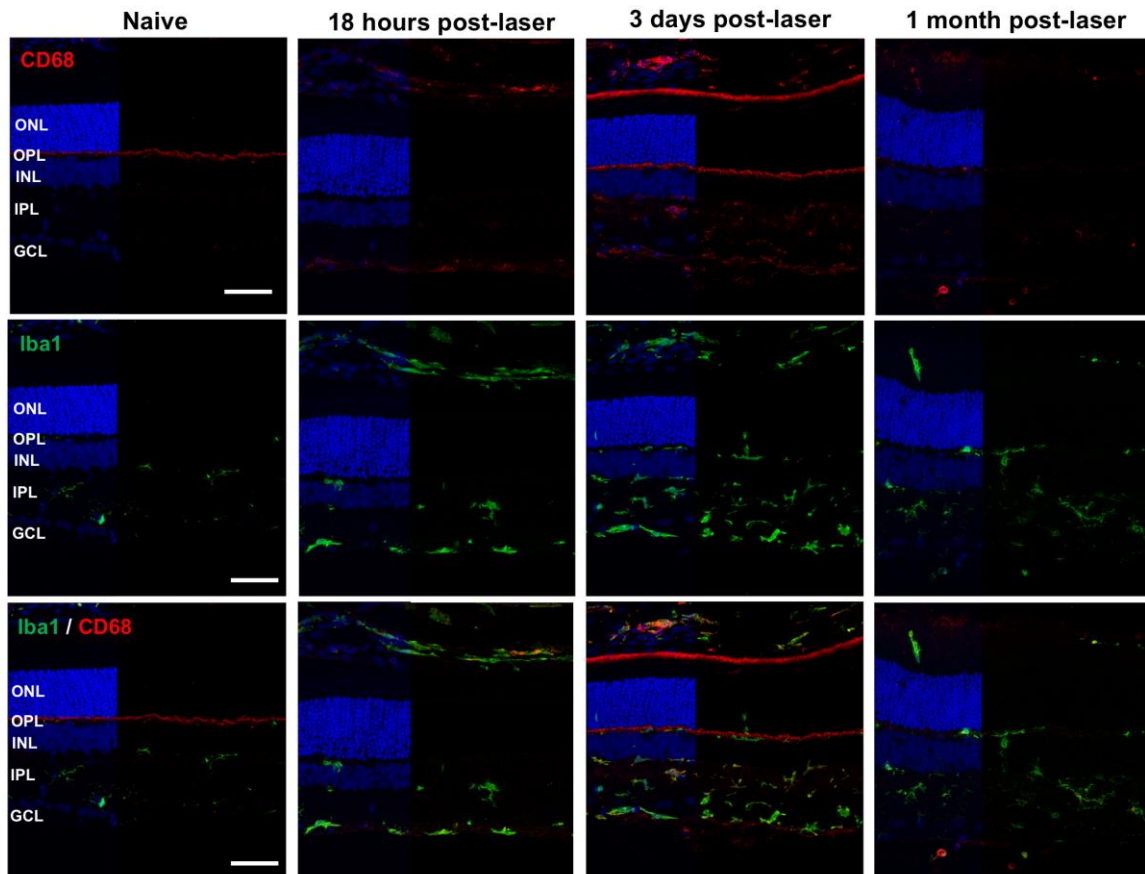
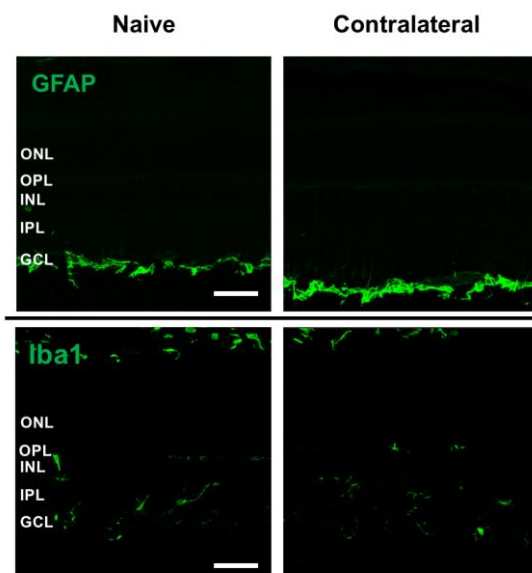


Figure 8. A dynamic scheme summarizing the changes observed in our ocular hypertensive model of glaucoma. The laser procedure induced increased IOP, inflammation, activation of glial cells and RGC death. The activation of hypercholesterolemic mechanisms resulted in transient retinal hypercholesterolemia. Activation of hypocholesterolemic feedback mechanisms then enabled the restoration of cholesterol homeostasis. No additional RGC death was observed.



Supplementary Figure.1. The phagocytic cells detected in response to the laser procedure appeared to be activated microglial cells. Immunostaining for Iba-1, a specific marker of microglial cells and CD68, a marker of phagocytic cells, was performed on retinal cryosections. The co-staining observed at the different time points suggested that the phagocytic cells present in the retina following laser treatment were activated microglial cells. Scale bar: 50 μ m. Images shown are representative of n= 6-8 retinas



Supplementary Figure 2. Glial activation was not detected in the contralateral retinas in response to the laser procedure. Immunostaining for GFAP and Iba-1 was performed on retinal cryosections of naïve and contralateral eyes. No major difference was observed between these two untreated groups regarding activation of macro and microglial cells under our experimental conditions. Scale bar: 50 μ m. Images shown are representative of n= 6-8 retinas

References

- 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. *J Biol Chem* 271, 5628-5632.
- Arenas, F., Garcia-Ruiz, C., Fernandez-Checa, J.C., 2017. Intracellular Cholesterol Trafficking and Impact in Neurodegeneration. *Front Mol Neurosci* 10, 382.
- Ayciriex, S., Djelti, F., Alves, S., Regazzetti, A., Gaudin, M., Varin, J., Langui, D., Bieche, I., Hudry, E., Dargere, D., Aubourg, P., Auzeil, N., Laprevote, O., Cartier, N., 2017. Neuronal Cholesterol Accumulation Induced by Cyp46a1 Down-Regulation in Mouse Hippocampus Disrupts Brain Lipid Homeostasis. *Front Mol Neurosci* 10, 211.
- Boussicault, L., Alves, S., Lamaziere, A., Planques, A., Heck, N., Moumne, L., Despres, G., Bolte, S., Hu, A., Pages, C., Galvan, L., Pigué, F., Aubourg, P., Cartier, N., Caboche, J., Betuing, S., 2016. CYP46A1, the rate-limiting enzyme for cholesterol degradation, is neuroprotective in Huntington's disease. *Brain* 139, 953-970.
- Chen, W., Stambolian, D., Edwards, A.O., Branham, K.E., Othman, M., Jakobsdottir, J., Tosakulwong, N., Pericak-Vance, M.A., Campochiaro, P.A., Klein, M.L., Tan, P.L., Conley, Y.P., Kanda, A., Kopplin, L., Li, Y., Augustaitis, K.J., Karoukis, A.J., Scott, W.K., Agarwal, A., Kovach, J.L., Schwartz, S.G., Postel, E.A., Brooks, M., Baratz, K.H., Brown, W.L., Complications of Age-Related Macular Degeneration Prevention Trial Research, Group, Brucker, A.J., Orlin, A., Brown, G., Ho, A., Regillo, C., Donoso, L., Tian, L., Kaderli, B., Hadley, D., Hagstrom, S.A., Peachey, N.S., Klein, R., Klein, B.E., Gotoh, N., Yamashiro, K., Ferris Iii, F., Fagerness, J.A., Reynolds, R., Farrer, L.A., Kim, I.K., Miller, J.W., Corton, M., Carracedo, A., Sanchez-Salorio, M., Pugh, E.W., Doheny, K.F., Brion, M., Deangelis, M.M., Weeks, D.E., Zack, D.J., Chew, E.Y., Heckenlively, J.R., Yoshimura, N., Iyengar, S.K., Francis, P.J., Katsanis, N., Seddon, J.M., Haines, J.L., Gorin, M.B., Abecasis, G.R., Swaroop, A., 2010. Genetic variants near TIMP3 and high-density lipoprotein-associated loci influence susceptibility to age-related macular degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 7401-7406.
- Cohen, L.P., Pasquale, L.R., 2014. Clinical characteristics and current treatment of glaucoma. *Cold Spring Harb Perspect Med* 4.
- Dietschy, J.M., Turley, S.D., 2004. Thematic review series: brain Lipids. Cholesterol metabolism in the central nervous system during early development and in the mature animal. *J Lipid Res* 45, 1375-1397.
- Djelti, F., Braudeau, J., Hudry, E., Dhenain, M., Varin, J., Bieche, I., Marquer, C., Chali, F., Ayciriex, S., Auzeil, N., Alves, S., Langui, D., Potier, M.C., Laprevote, O., Vidaud, M., Duyckaerts, C., Miles, R., Aubourg, P., Cartier, N., 2015. CYP46A1 inhibition, brain cholesterol accumulation and neurodegeneration pave the way for Alzheimer's disease. *Brain* 138, 2383-2398.
- Fliesler, S.J., Bretillon, L., 2010. The ins and outs of cholesterol in the vertebrate retina. *J Lipid Res* 51, 3399-3413.
- Fliesler, S.J., Peachey, N.S., Herron, J., Hines, K.M., Weinstock, N.I., Ramachandra Rao, S., Xu, L., 2018. Prevention of Retinal Degeneration in a Rat Model of Smith-Lemli-Opitz Syndrome. *Sci Rep* 8, 1286.
- Fourgeux, C., Martine, L., Bjorkhem, I., Diczfalussy, U., Joffre, C., Acar, N., Creuzot-Garcher, C., Bron, A., Bretillon, L., 2009. Primary open-angle glaucoma: association with cholesterol 24S-hydroxylase (CYP46A1) gene polymorphism and plasma 24-hydroxycholesterol levels. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 50, 5712-5717.
- Fourgeux, C., Martine, L., Pasquis, B., Maire, M.A., Acar, N., Creuzot-Garcher, C., Bron, A., Bretillon, L., 2012. Steady-state levels of retinal 24S-hydroxycholesterol are maintained by glial cells intervention after elevation of intraocular pressure in the rat. *Acta Ophthalmol* 90, e560-567.
- Hauck, S.M., Schoeffmann, S., Amann, B., Stangassinger, M., Gerhards, H., Ueffing, M., Deeg, C.A., 2007. Retinal Mueller glial cells trigger the hallmark inflammatory process in autoimmune uveitis. *J Proteome Res* 6, 2121-2131.
- Hauk, T.G., Muller, A., Lee, J., Schwendener, R., Fischer, D., 2008. Neuroprotective and axon growth promoting effects of intraocular inflammation do not depend on oncomodulin or the presence of large numbers of activated macrophages. *Exp Neurol* 209, 469-482.
- Ishiguro, M., Imai, Y., Kohsaka, S., 1995. Expression and distribution of low density lipoprotein receptor-related protein mRNA in the rat central nervous system. *Brain Res Mol Brain Res* 33, 37-46.
- Ishikawa, M., Yoshitomi, T., Zorumski, C.F., Izumi, Y., 2016. 24(S)-Hydroxycholesterol protects the ex vivo rat retina from injury by elevated hydrostatic pressure. *Sci Rep* 6, 33886.
- Johnson, T.V., Bull, N.D., Hunt, D.P., Marina, N., Tomarev, S.I., Martin, K.R., 2010. Neuroprotective effects of intravitreal mesenchymal stem cell transplantation in experimental glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 51, 2051-2059.
- Jonas, J.B., Aung, T., Bourne, R.R., Bron, A.M., Ritch, R., Panda-Jonas, S., 2017. Glaucoma. *Lancet*.
- Klaver, C.C., Kliffen, M., van Duijn, C.M., Hofman, A., Cruts, M., Grobbee, D.E., van Broeckhoven, C., de Jong, P.T., 1998. Genetic association of apolipoprotein E with age-related macular degeneration. *Am J Hum Genet* 63, 200-206.

- Léger-Charnay, E., Masson, E.A.Y., Morala, T., Martine, L., Buteau, B., Leclere, L., Bretillon, L., Gamber, S., 2019. Is 24(S)-hydroxycholesterol a potent modulator of cholesterol metabolism in Müller cells? An in vitro study about neuron to glia communication in the retina. *Experimental Eye Research* 189, 107857.
- Levkovitch-Verbin, H., Quigley, H.A., Martin, K.R.G., Valenta, D., Baumrind, L.A., Pease, M.E., 2002. Translimbal Laser Photocoagulation to the Trabecular Meshwork as a Model of Glaucoma in Rats. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 43, 402-410.
- Lin, J.B., Mast, N., Bederman, I.R., Li, Y., Brunengraber, H., Bjorkhem, I., Pikuleva, I.A., 2016. Cholesterol in mouse retina originates primarily from in situ de novo biosynthesis. *J Lipid Res* 57, 258-264.
- Madison, B.B., 2016. Srebp2: A master regulator of sterol and fatty acid synthesis. *J Lipid Res* 57, 333-335.
- Mast, N., Reem, R., Bederman, I., Huang, S., DiPatre, P.L., Bjorkhem, I., Pikuleva, I.A., 2011. Cholestenoic Acid is an important elimination product of cholesterol in the retina: comparison of retinal cholesterol metabolism with that in the brain. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 52, 594-603.
- Mutemberezi, V., Guillemot-Legris, O., Muccioli, G.G., 2016. Oxysterols: From cholesterol metabolites to key mediators. *Prog Lipid Res* 64, 152-169.
- Nieweg, K., Schaller, H., Pfrieger, F.W., 2009. Marked differences in cholesterol synthesis between neurons and glial cells from postnatal rats. *J Neurochem* 109, 125-134.
- Ohyama, Y., Meaney, S., Heverin, M., Ekstrom, L., Brafman, A., Shafir, M., Andersson, U., Olin, M., Eggertsen, G., Diczfalussy, U., Feinstein, E., Bjorkhem, I., 2006. Studies on the transcriptional regulation of cholesterol 24-hydroxylase (CYP46A1): marked insensitivity toward different regulatory axes. *J Biol Chem* 281, 3810-3820.
- Omarova, S., Charvet, C.D., Reem, R.E., Mast, N., Zheng, W., Huang, S., Peachey, N.S., Pikuleva, I.A., 2012. Abnormal vascularization in mouse retina with dysregulated retinal cholesterol homeostasis. *J Clin Invest* 122, 3012-3023.
- Pfrieger, F.W., Ungerer, N., 2011. Cholesterol metabolism in neurons and astrocytes. *Prog Lipid Res* 50, 357-371.
- Pikuleva, I.A., Curcio, C.A., 2014. Cholesterol in the retina: the best is yet to come. *Prog Retin Eye Res* 41, 64-89.
- Salinas-Navarro, M., Alarcon-Martinez, L., Valiente-Soriano, F.J., Jimenez-Lopez, M., Mayor-Torroglosa, S., Aviles-Trigueros, M., Villegas-Perez, M.P., Vidal-Sanz, M., 2010. Ocular hypertension impairs optic nerve axonal transport leading to progressive retinal ganglion cell degeneration. *Exp Eye Res* 90, 168-183.
- Schnebelen, C., Pasquis, B., Salinas-Navarro, M., Joffre, C., Creuzot-Garcher, C.P., Vidal-Sanz, M., Bron, A.M., Bretillon, L., Acar, N., 2009. A dietary combination of omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids is more efficient than single supplementations in the prevention of retinal damage induced by elevation of intraocular pressure in rats. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 247, 1191-1203.
- Soto, I., Pease, M.E., Son, J.L., Shi, X., Quigley, H.A., Marsh-Armstrong, N., 2011. Retinal ganglion cell loss in a rat ocular hypertension model is sectorial and involves early optic nerve axon loss. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 52, 434-441.
- Tserentsoodol, N., Szein, J., Campos, M., Gordiyenko, N.V., Fariss, R.N., Lee, J.W., Fliesler, S.J., Rodriguez, I.R., 2006. Uptake of cholesterol by the retina occurs primarily via a low density lipoprotein receptor-mediated process. *Mol Vis* 12, 1306-1318.
- Vance, J.E., 2012. Dysregulation of cholesterol balance in the brain: contribution to neurodegenerative diseases. *Dis Model Mech* 5, 746-755.
- Zhang, J., Liu, Q., 2015. Cholesterol metabolism and homeostasis in the brain. *Protein Cell* 6, 254-264.
- Zhao, C., Dahlman-Wright, K., 2010. Liver X receptor in cholesterol metabolism. *J Endocrinol* 204, 233-240.
- Zheng, W., Mast, N., Saadane, A., Pikuleva, I.A., 2015. Pathways of cholesterol homeostasis in mouse retina responsive to dietary and pharmacologic treatments. *J Lipid Res* 56, 81-97.

III. Principaux résultats et conclusion

Ce travail *in vivo* a tout d'abord permis de montrer que le métabolisme du cholestérol est largement affecté dans un modèle de glaucome par augmentation de la PIO. Dès 18h, des mécanismes hypercholestérolémians sont mis en œuvre (augmentation de l'expression des gènes codant pour la HMGCR, le LDL-R et SR-B1 ; diminution de l'expression des gènes codant pour l'ApoE et CYP27A1) qui se manifestent, à 3 jours post-laser, par une augmentation importante des taux de précurseurs du cholestérol et une légère augmentation des taux de cholestérol lui-même. La rétine est préservée d'une surcharge en cholestérol grâce à l'induction, dès 3 jours post-laser et jusqu'à 1 mois, de mécanismes hypocholestérolémians : diminution de l'expression des gènes codant pour des protéines impliquées dans la synthèse (HMGCR) et la captation de cholestérol (LDL-R et SR-BI), et au contraire augmentation de l'expression des gènes codant pour des protéines permettant son efflux (ApoE, ABCA1, CYP27A1).

Nos résultats montrent également pour la première fois que, dans la rétine, les acteurs clés du métabolisme du cholestérol sont soumis à un ensemble de régulations transcriptionnelles coordonnés permettant de maintenir l'homéostasie du cholestérol. Ce type de régulations vient compléter les régulations post-traductionnelles déjà suspectées dans ce tissu (Zheng et al., 2105, Charvet et al., 2013).

Enfin, nos résultats suggèrent que l'export de lipoprotéines serait la voie principale d'élimination du cholestérol de la rétine, contrairement au cerveau dans lequel la synthèse d'oxystérols, en particulier de 24S-OHC, est majeure. Ceci est en cohérence avec les résultats de notre étude *in vitro* sur cultures primaires de cellules de Müller où nous avons constaté que les gènes impliqués dans la synthèse et le transport du cholestérol sont plus sujet à régulation que son élimination par la voie des oxystérols.

Notre modèle de glaucome est associé à une gliose et une inflammation importantes, qui se mettent en place précocement et perdurent plus ou moins dans le temps. L'activation de la macroglie et de la microglie est déjà visible à 18 h et semble maximale à 3 jours post-laser. Alors que la

macroglieuse se maintient fortement jusqu'à 1 mois, la microglieuse semble progressivement régresser. Cette dernière est associée à la présence de marqueurs inflammatoires, dont l'expression est maximale à trois jours et diminue à un mois. Enfin, un stress et une mort des RGC sont détectables dès 18h et jusqu'à 3 jours mais plus observés à 1 mois.

Cette étude *in vivo* suscite plusieurs questions dont celles de l'origine des perturbations initiales du métabolisme du cholestérol, de la nature précise des acteurs cellulaires impliqués dans les régulations observées ou du lien causal existant entre les modifications du métabolisme du cholestérol et l'équilibre entre la mort et la survie des RGC. Cela étant, ce travail renforce l'idée que le métabolisme du cholestérol pourrait être ajouté à la liste des acteurs proposés comme important dans la physiopathologie du glaucome.

Chapitre | 4

Discussion générale et perspectives

Régulation du métabolisme du cholestérol dans la rétine par les oxystérols

Notre étude menée *in vitro* portait sur l'effet d'un oxystérol d'origine neuronale, le 24S-OHC, sur le métabolisme du cholestérol dans les cellules de Müller, macroglie prépondérante de la rétine. L'application de 24S-OHC exogène entraîne, dans nos conditions expérimentales, l'activation d'un éventail de mécanismes hypocholestérolémians dans les cellules. Nos résultats confortent l'hypothèse selon laquelle le 24S-OHC puisse participer à la communication entre les neurones et la glie dans le cadre du maintien de l'homéostasie du cholestérol dans la rétine.

Dans un modèle de glaucome expérimental chez le rat, par induction laser d'une hyperpression oculaire, nous avons décrit des altérations de l'expression génique de différents acteurs impliqués dans le métabolisme du cholestérol dans la rétine. De manière précoce, 18 heures après la procédure laser, nous avons observé l'activation de mécanismes hypercholestérolémians dans la rétine, compensée par l'induction, dès 3 jours, de mécanismes hypocholestérolémians permettant d'éviter une surcharge en cholestérol dans ce tissu. Ces perturbations ne concernent pas l'enzyme CYP46A1, dont l'expression reste stable à tous les points de temps analysés. De manière cohérente, les taux de son métabolite, le 24S-OHC, sont également inchangés dans les yeux expérimentaux. Ces observations ouvrent deux pistes de réflexion :

- D'une part, que CYP46A1 semble constitutivement exprimée dans les neurones, suggérant que sa fonction est essentielle à leur survie. La mise en évidence, par Ohyama et al. (2006), de caractéristiques communes entre le promoteur de CYP46A1 et celui des gènes de ménage, ainsi que l'observation, par Djelti et al (2015), d'une mort neuronale suite à l'inhibition de l'expression de cette enzyme dans le cerveau sont en accord avec cette hypothèse. Nous avons prévu, au laboratoire, de réaliser une expérience similaire à celle menée par Djelti et al. (2015), mais dans la rétine. Par une approche d'interférence à ARN médiée par des AAV, nous inhiberons l'expression de CYP46A1 dans les RGC. Nous analyserons, en plus de la mort neuronale, l'expression de différents acteurs du métabolisme du cholestérol. L'objectif est donc non seulement de voir si CYP46A1 est comme dans le cerveau indispensable pour la survie des neurones, mais également de mettre en évidence la mise en

place de potentiels mécanismes de compensation dans la rétine, faisant intervenir par exemple la synthèse de 27-COOH via CYP27A1 ou l'efflux de cholestérol via le couple ABCA1-ApoE.

- D'autre part, que l'expression de CYP46A1, et donc la synthèse de 24S-OHC, ne sont pas inductibles dans nos conditions expérimentales de glaucome. Ceci implique que la production de 24S-OHC n'est pas la voie d'élimination du cholestérol qui permet de compenser les perturbations hypercholestérolémiantes précocement observées après la procédure laser. Il semble que ce rôle soit assuré par la voie des lipoprotéines, comme le suggère la surexpression du transporteur ABCA1 constatée dès 3 jours post-laser. Ceci implique également que le 24S-OHC n'est pas la molécule signal à l'origine de l'activation des mécanismes hypocholestérolémiants observée à 3 jours post-laser. Cependant, ces observations n'excluent pas que, en condition physiologique, la synthèse de 24S-OHC soit une voie majeure d'élimination du cholestérol et que ce composé joue également le rôle de molécule signal pour la régulation du métabolisme du cholestérol dans les cellules gliales. Puisque l'expression de CYP46A1 semble peu régulée, il en découle que la synthèse de 24S-OHC dépend directement de la quantité de cholestérol présente dans les neurones (Björkhem, 2006), ceci étant valable pour une gamme de concentrations restreintes correspondant sans doute aux variations physiologiques. Ainsi, si le 24S-OHC est une molécule signal, elle est sans doute impliquée dans des régulations fines du métabolisme du cholestérol, mais ne semble pas pouvoir permettre de répondre à de fortes variations des quantités de cholestérol, comme potentiellement observées en condition pathologique.

Qu'en est-il de l'enzyme CYP27A1 et de ses métabolites, le 27-OHC et le 27-COOH ? De sous exprimé à 18 heures et 3 jours post-laser, le gène codant pour CYP27A1 est surexprimé à un mois. Nous n'avons pas détecté ses produits, le 27-OHC et le 27-COOH, dans la rétine. L'absence d'association entre le taux de métabolite et la quantité d'enzyme peut probablement expliquer qu'en dépit de l'induction du gène, les métabolites de CYP27A1 n'ont pas été détectés (Liao et al., 2011). Nous pouvons également émettre l'hypothèse que l'induction du gène ne s'est pas traduite en surexpression de l'enzyme. Nos résultats suggèrent tout de même que CYP27A1 serait impliquée dans les perturbations hypercholestérolémiantes observées précocement dans notre modèle de glaucome. De manière intéressante, Omarova et al. (2012) ont décrit que la perte de CYP27A1 dans un modèle

knock-out conduit à des dérégulations du métabolisme du cholestérol, dont une augmentation de sa biosynthèse dans la rétine. Par ailleurs, nos résultats suggèrent que le métabolite de la CYP27A1, le 27-COOH, n'est pas la molécule signal permettant l'activation des mécanismes hypocholestérolémians à 3 jours post-laser. Enfin, l'induction tardive de CYP27A1 participe sans doute à l'élimination du cholestérol de la rétine.

En conclusion, l'ensemble de nos résultats conforte l'idée selon laquelle le cholestérol lui-même, et ses précurseurs, soient principalement à l'origine du maintien de son homéostasie dans la rétine. Les oxystérols permettraient, comme le proposent Gill et al. (2008), d'affiner les régulations mises en place.

Des mécanismes de régulation coordonnés permettant de maintenir l'homéostasie du cholestérol dans la rétine

Dans une étude publiée en 2012, Zheng et al. ont décrit que l'administration d'un régime enrichi en cholestérol à des souris conduit à une augmentation plus modérée des taux de cholestérol dans la rétine ($\times 1,2$) que dans le sang ($\times 1,4$ par rapport aux souris nourries avec un régime contrôle). Ces observations suggèrent une résistance de la rétine à l'hypercholestérolémie, phénomène qui, dans leurs conditions expérimentales, n'est pas associé à des régulations transcriptionnelles des acteurs clés du métabolisme du cholestérol. Ainsi, les auteurs proposent que le maintien de l'homéostasie du cholestérol dans la rétine repose principalement sur des mécanismes post-traductionnels, concernant notamment la HMG-CoA réductase connue pour être sujette à ce type de régulation.

Dans notre modèle expérimental de glaucome, en réponse à une perturbation précoce potentiellement hypercholestérolémiant, nous décrivons la mise en place d'un ensemble de régulations transcriptionnelles coordonnées permettant de maintenir l'homéostasie du cholestérol dans la rétine. Les mécanismes mis en jeu sont notamment une sous-expression de la HMG-CoA réductase et du LDL-R, gènes cibles du facteur SREBP2, et au contraire une surexpression du couple ApoE-ABCA1, cible des LXRs.

Ce que nous appelons « perturbation hypercholestérolémiant précoce » recouvre la surexpression de la HMG-CoA réductase et du LDL-R et au contraire la sous-expression de la CYP27A1, observées 18 heures après la procédure laser. Nous pouvons émettre l'hypothèse que ce phénomène, d'aspect coordonné, puisse être la conséquence de la dérégulation d'un acteur qui chapeaute l'expression de ces gènes, comme SREBP2 pour la HMG-CoA réductase et le LDL-R. Les liens entre la procédure laser et cette dérégulation resteraient à déterminer. Nous pouvons également proposer que le phénomène que nous prenons pour une perturbation initiale corresponde en fait à un ensemble de régulations mises en œuvre, pour protéger la rétine, en réponse à une altération encore antérieure. Dans ce cadre, il semblerait intéressant de réitérer nos expériences en sacrifiant les animaux à des temps plus précoces que 18h, comme 3, 6 et 12 h post-laser.

Les mécanismes hypocholestérolémiants mis en jeu à 3 jours sont encore maintenus 1 mois et même 2 mois (données non présentées) après la procédure laser. Ceci est surprenant sachant qu'à ces points de temps le taux de cholestérol dans la rétine est à sa valeur basale et que ceux de ses précurseurs sont même diminués. Ces observations pourraient suggérer qu'une entrée de cholestérol, indépendante d'une biosynthèse endogène ou d'une captation active de lipoprotéines sanguines, puisse avoir lieu dans la rétine. Entre autres hypothèses, nous pouvons proposer qu'une fuite des barrières hémato-rétiniennes, dont la perméabilité serait altérée, en soit à l'origine. De telles perturbations ont en effet déjà été décrites au cours du glaucome (Mangan et al., 2007), mais également, pour la barrière hémato-méningée, au cours de nombreuses pathologies neurodégénératives du cerveau (Sweeney et al., 2018).

Implication de l'hyperpression oculaire, de l'inflammation, de la gliose et de la souffrance des RGC

Notre modèle de glaucome, par hyperpression oculaire, est associé à un stress des RGC, une gliose et une inflammation importantes, comme classiquement observé dans cette pathologie. Il serait hasardeux de faire des liens directs entre ces phénomènes et les modifications du métabolisme du

cholestérol observées de manière concomitante, mais nous allons proposer ici quelques pistes de réflexion.

Dans un modèle de glaucome *ex vivo*, correspondant à placer des rétines de rats dans des conditions hyperbariques intenses (75mmHg) pendant 24 heures, Ishikawa et al., 2016 ont décrit une surexpression de l'enzyme CYP46A1 et une élévation des taux de 24S-OHC. *In vivo*, par induction laser d'une hyperpression chez le rat, Fourgeux et al., (2012) ont obtenu des résultats similaires. Les auteurs proposent que l'hyperpression, à l'origine d'une ischémie rétinienne, soit associée à la production de ROS, un des rares facteurs connus pour stimuler la transcription de CYP46A1. La surexpression de cette enzyme pourrait avoir lieu dans les RGC en souffrance et même dans la glie activée. Dans ces deux études, les auteurs n'ont malheureusement pas caractérisé plus largement le métabolisme du cholestérol. De manière surprenante dans notre modèle expérimental, alors que le profil de pression que nous observons est comparable à celui de Fourgeux et al., 2012, l'expression de CYP46A1 n'est pas modifiée. Cette divergence pourrait être associée à la mort moins importante des RGC observée dans notre présente étude.

Concernant l'impact que pourrait avoir l'inflammation sur le métabolisme du cholestérol, nous n'avons pas trouvé de données dans la littérature à ce sujet. Il serait intéressant d'évaluer l'effet d'une inhibition de l'inflammation dans notre modèle de glaucome. Nous pourrions à cet effet utiliser des d'agents anti-inflammatoires ou limiter l'activation microgliale, par exemple par l'utilisation de minocycline (Scholz et al., 2015). La relation inverse est en revanche bien documentée, puisque la réponse inflammatoire serait modulée par le métabolisme du cholestérol, et plus précisément par les oxystérols (Töröcsik et al., 2009). Il a en effet été montré que les LXRs atténuent les processus inflammatoires, notamment en inhibant la production de cytokines, comme l'interleukine 1- β , dans les macrophages et la microglie (A-González et Castrillo., 2011, Churchward et Todd., 2014).

Les cellules micro et macrogliales étant des acteurs importants du maintien des homéostasies dans les tissus nerveux, dont probablement celle du cholestérol, il ne fait pas de doute que leur activation soit impliquée dans les modulations du métabolisme du cholestérol que nous observons dans notre modèle. Dans ce cadre, il serait judicieux d'inhiber l'activation de la microglie ou de dépléter spécifiquement cette population cellulaire (Spangenberg et al., 2019) dans notre modèle de

glaucome, puis d'analyser l'impact d'une telle approche sur le métabolisme du cholestérol et les autres paramètres que nous avons étudiés. La littérature sur les liens existant entre la gliose et le métabolisme du cholestérol est encore peu abondante. Dans un modèle de souris Alzheimer, Orre et al. (2014) ont décrit une altération très significative de l'expression de nombreux gènes du métabolisme du cholestérol dans les astrocytes et la microglie activés.

Notre hypothèse initiale était que le glaucome soit associé à une surcharge en cholestérol dans la rétine, phénomène connu pour être neurotoxique (Ayciriex et al., 2017), et nous pensions que l'enzyme CYP46A1 pourrait intervenir pour limiter ce phénomène. Dans nos conditions expérimentales, nous avons observé la mise en place de régulations fortes et efficaces, indépendantes de CYP46A1, permettant de maintenir l'homéostasie du cholestérol dans la rétine. Dans quelle mesure ce phénomène est-il favorable à la survie des RGC ? Pour apporter des éléments d'information, il serait profitable d'étudier le métabolisme du cholestérol dans un modèle de glaucome similaire au notre mais associé à une mort plus importante des RGC, comme pratiqué par l'équipe du professeur Vidal-Sanz (Salinas-Navarro et al., 2010). Il serait également pertinent d'utiliser des antagonistes des facteurs LXRs, tel que l'agent GSK2033 (Zuercher et al., 2010), afin de maintenir un stress hypercholestérolémiant dans la rétine, puis d'analyser l'effet d'un tel stress sur la survie des RGC.

Un modèle de glaucome par hyperpression oculaire induite par une procédure laser, chez le rat

Le modèle de glaucome employé dans notre étude se base sur le maintien d'une hyperpression oculaire, premier facteur de risque de développer la maladie chez l'Homme. Le glaucome touchant principalement les individus âgés, il serait intéressant d'évaluer l'impact de ce second facteur de risque sur le métabolisme du cholestérol. Les mécanismes de régulation dans la rétine seraient-ils aussi performants chez des sujets âgés ? En d'autres termes, est-ce que l'homéostasie du cholestérol serait maintenue ? Enfin, quelles seraient les conséquences sur la survie des RGC ? Dans un modèle d'atteinte du nerf optique par transection, Wang et al. (2007) ont observé une mort plus rapide chez les animaux âgés que chez les jeunes.

Nous avons choisi un modèle d'hyperpression oculaire par photocoagulation laser. L'avantage de cette procédure réside notamment dans la précision du faisceau lumineux délivré, permettant de photocoaguler les structures oculaires souhaitées en affectant le moins possible les structures annexes. En pratique, nous pensons tout de même que l'intervention conduit à une inflammation supplémentaire par rapport à celle induite par l'hyperpression *per se*. La procédure laser est également associée à une sécheresse cornéenne importante qu'il est difficile d'enrayer, malgré l'application quotidienne de collyres hydratants. Cet effet secondaire nous amène à envisager que la procédure a exacerbé l'inflammation locale.

La perte de RGC que nous obtenons 1 mois après l'intervention laser est beaucoup plus modeste que celle annoncée par plusieurs équipes travaillant sur un modèle similaire au nôtre, malgré des profils de pression analogues (Levkovitch-Verbin et al., 2002, Salinas-Navarro et al., 2010). A 3 semaines, Salinas-Navarro et al (2010) indiquent une perte de 80 % contre 15 % dans notre cas. Ces observations suggèrent fortement qu'en plus de l'hyperpression d'autres facteurs participent à la mort neuronale, comme l'inflammation. Étant moins drastique, notre modèle de glaucome nous permet sans doute de mettre en évidence des mécanismes de survie mis en place dans les RGC et plus généralement dans la rétine.

L'extrapolation de nos résultats à la physiopathologie du glaucome chez l'Homme doit être considérée avec précaution eu égard des différences entre l'Homme et l'animal d'une part et à aux limites de notre modèle d'induction de l'hyperpression d'autre part.

L'espèce animale utilisée dans notre étude est le rat. Du point de vue du métabolisme du cholestérol, l'Homme et les rongeurs ont un fonctionnement similaire, mais présentent tout de même certaines différences notables. Parmi elle, l'absence de CETP plasmatique chez le rat et la souris (Hogarth et Ebert, 2003), se traduisant par un ratio HDL/LDL plus élevé dans ces espèces que chez l'Homme (Camus et al., 1983). Les lipoprotéines étant les pourvoyeurs de lipides aux organes, on peut envisager que les flux de cholestérol chez le rat obéissent à des régulations un peu différentes. Enfin, il est important de garder à l'esprit que les rongeurs sont des animaux herbivores, rencontrant donc peu de cholestérol dans leur alimentation, contrairement à l'Homme qui, dans les pays industrialisés,

ingère de grandes quantités de produits carnés et donc de cholestérol. Il en résulte sans aucun doute des différences métaboliques non négligeables.

Concernant le modèle d'induction de l'hyperpression oculaire chez le rat, celle-ci est observée sur une durée relativement limitée (pendant 21 jours) avec une amplitude importante (jusqu'à 3 fois la valeur normale) qui nous amène à considérer notre modèle comme aigu. La physiopathologie du glaucome chez l'Homme est relativement différente puisque l'hypertonie oculaire est observée avec une amplitude plus réduite et sur une durée plus longue.

Conclusions

En conclusion, les résultats acquis au cours de ce projet de thèse contribuent à une meilleure compréhension du métabolisme du cholestérol et sa régulation dans la rétine. *In vitro*, nos résultats suggèrent que les cellules de Müller sont impliquées dans la synthèse et l'export de cholestérol sous forme de lipoparticules riches en apoE. Nous avons également montré que le 24S-OHC pourrait, comme dans le cerveau, participer à la communication entre les neurones et la glie afin de maintenir des taux adéquats de cholestérol. *In vivo*, nos résultats mettent en évidence pour la première fois l'existence de mécanismes de régulations transcriptionnels coordonnés dans la rétine, permettant un maintien efficace de l'homéostasie du cholestérol. Nos résultats suggèrent de plus qu'une hyperpression oculaire est associée à des altérations du métabolisme de ce composé. L'importance de telles perturbations dans la mort des RGC et, au contraire, l'implication d'un maintien de l'homéostasie sur leur survie, resteraient encore à déterminer. Les résultats acquis dans notre étude sont à confirmer dans d'autres modèles de glaucome puis, dans un avenir sans doute plus lointain, chez l'Homme.

Références bibliographiques

- Abildayeva, K., Jansen, P.J., Hirsch-Reinshagen, V., Bloks, V.W., Bakker, A.H., Ramaekers, F.C., de Vente, J., Groen, A.K., Wellington, C.L., Kuipers, F., Mulder, M., 2006. 24(S)-hydroxycholesterol participates in a liver X receptor-controlled pathway in astrocytes that regulates apolipoprotein E-mediated cholesterol efflux. *J Biol Chem* 281, 12799-12808.
- Acott, T.S., Westcott, M., Passo, M.S., Van Buskirk, E.M., 1985. Trabecular meshwork glycosaminoglycans in human and cynomolgus monkey eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 26, 1320-1329.
- Acton, S., Rigotti, A., Landschulz, K.T., Xu, S., Hobbs, H.H., Krieger, M., 1996. Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor. *Science* 271, 518-520.
- Afonso, M.S., Machado, R.M., Lavrador, M.S., Quintao, E.C.R., Moore, K.J., Lottenberg, A.M., 2018. Molecular Pathways Underlying Cholesterol Homeostasis. *Nutrients* 10.
- A-Gonzalez, N., Castrillo, A., 2011. Liver X receptors as regulators of macrophage inflammatory and metabolic pathways. *Biochim Biophys Acta* 1812, 982-994.
- Ahmed, Z., Aslam, M., Lorber, B., Suggate, E.L., Berry, M., Logan, A., 2010. Optic nerve and vitreal inflammation are both RGC neuroprotective but only the latter is RGC axogenic. *Neurobiol Dis* 37, 441-454.
- Ahnelt, P.K., Kolb, H., 2000. The mammalian photoreceptor mosaic-adaptive design. *Prog Retin Eye Res* 19, 711-777.
- Ahram, D.F., Alward, W.L., Kuehn, M.H., 2015. The genetic mechanisms of primary angle closure glaucoma. *Eye (Lond)* 29, 1251-1259.
- Aihara, M., Lindsey, J.D., Weinreb, R.N., 2003. Ocular hypertension in mice with a targeted type I collagen mutation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44, 1581-1585.
- Aktas, Z., Rao, H., Slauson, S.R., Gabelt, B.T., Larsen, I.V., Sheridan, R.T.C., Herrnberger, L., Tamm, E.R., Kaufman, P.L., Brandt, C.R., 2018. Proteasome Inhibition Increases the Efficiency of Lentiviral Vector-Mediated Transduction of Trabecular Meshwork. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 59, 298-310.
- Albert, A., Alexander, D., Boesze-Battaglia, K., 2016. Cholesterol in the rod outer segment: A complex role in a "simple" system. *Chem Phys Lipids* 199, 94-105.
- Allingham, R.R., Liu, Y., Rhee, D.J., 2009. The genetics of primary open-angle glaucoma: a review. *Exp Eye Res* 88, 837-844.
- Alm, A., 2000. Uveoscleral outflow. *Eye (Lond)* 14 (Pt 3B), 488-491.
- Almasieh, M., Wilson, A.M., Morquette, B., Cueva Vargas, J.L., Di Polo, A., 2012. The molecular basis of retinal ganglion cell death in glaucoma. *Prog Retin Eye Res* 31, 152-181.
- Alonso, A.D., Cohen, L.S., Corbo, C., Morozova, V., ElIdrissi, A., Phillips, G., Kleiman, F.E., 2018. Hyperphosphorylation of Tau Associates With Changes in Its Function Beyond Microtubule Stability. *Front Cell Neurosci* 12, 338.
- Altmann, S.W., Davis, H.R., Jr., Zhu, L.J., Yao, X., Hoos, L.M., Tetzloff, G., Iyer, S.P., Maguire, M., Golovko, A., Zeng, M., Wang, L., Murgolo, N., Graziano, M.P., 2004. Niemann-Pick C1 Like 1 protein is critical for intestinal cholesterol absorption. *Science* 303, 1201-1204.
- 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. *J Biol Chem* 271, 5628-5632.
- Ananth, S., Gnana-Prakasam, J.P., Bhutia, Y.D., Veeranan-Karmegam, R., Martin, P.M., Smith, S.B., Ganapathy, V., 2014. Regulation of the cholesterol efflux transporters ABCA1 and ABCG1 in retina in hemochromatosis and by the endogenous siderophore 2,5-dihydroxybenzoic acid. *Biochim Biophys Acta* 1842, 603-612.
- Anderson, J.M., Van Itallie, C.M., 2009. Physiology and function of the tight junction. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 1, a002584.

- Andersson, S., Davis, D., Dahlbäck, H., Jörnvall, H., Russell, D.W.J.J.o.B.C., 1989. Cloning, structure, and expression of the mitochondrial cytochrome P-450 sterol 26-hydroxylase, a bile acid biosynthetic enzyme. 264, 8222-8229.
- Arenas, F., Garcia-Ruiz, C., Fernandez-Checa, J.C., 2017. Intracellular Cholesterol Trafficking and Impact in Neurodegeneration. *Front Mol Neurosci* 10, 382.
- Aretz, S., Krohne, T.U., Kammerer, K., Warnken, U., Hotz-Wagenblatt, A., Bergmann, M., Stanzel, B.V., Kempf, T., Holz, F.G., Schnolzer, M., Kopitz, J., 2013. In-depth mass spectrometric mapping of the human vitreous proteome. *Proteome Sci* 11, 22.
- Asefa, N.G., Neustaeter, A., Jansonius, N.M., Snieder, H., 2018. Heritability of glaucoma and glaucoma-related endophenotypes: systematic review and meta-analysis protocol. *BMJ Open* 8, e019049.
- Aycirix, S., Djelti, F., Alves, S., Regazzetti, A., Gaudin, M., Varin, J., Langui, D., Bieche, I., Hudry, E., Dargere, D., Aubourg, P., Auzeil, N., Laprevote, O., Cartier, N., 2017. Neuronal Cholesterol Accumulation Induced by Cyp46a1 Down-Regulation in Mouse Hippocampus Disrupts Brain Lipid Homeostasis. *Front Mol Neurosci* 10, 211.
- Babiker, A., Andersson, O., Lindblom, D., van der Linden, J., Wiklund, B., Lutjohann, D., Diczfalusy, U., Bjorkhem, I., 1999. Elimination of cholesterol as cholestenoic acid in human lung by sterol 27-hydroxylase: evidence that most of this steroid in the circulation is of pulmonary origin. *J Lipid Res* 40, 1417-1425.
- Babiker, A., Andersson, O., Lund, E., Xiu, R.J., Deeb, S., Reshef, A., Leitersdorf, E., Diczfalusy, U., Bjorkhem, I., 1997. Elimination of cholesterol in macrophages and endothelial cells by the sterol 27-hydroxylase mechanism. Comparison with high density lipoprotein-mediated reverse cholesterol transport. *J Biol Chem* 272, 26253-26261.
- Badea, T.C., Cahill, H., Ecker, J., Hattar, S., Nathans, J., 2009. Distinct roles of transcription factors brn3a and brn3b in controlling the development, morphology, and function of retinal ganglion cells. *Neuron* 61, 852-864.
- Baden, T., Berens, P., Franke, K., Roman Roson, M., Bethge, M., Euler, T., 2016. The functional diversity of retinal ganglion cells in the mouse. *Nature* 529, 345-350.
- Bae, S.H., Paik, Y.K., 1997. Cholesterol biosynthesis from lanosterol: development of a novel assay method and characterization of rat liver microsomal lanosterol delta 24-reductase. *Biochem J* 326 (Pt 2), 609-616.
- Barnstable, C.J., Drager, U.C., 1984. Thy-1 antigen: a ganglion cell specific marker in rodent retina. *Neuroscience* 11, 847-855.
- Becker, B., Christensen, R.E., Keskey, G.R., 1956. Hypersecretion glaucoma. *AMA Arch Ophthalmol* 56, 180-187.
- Benozzi, J., Nahum, L.P., Campanelli, J.L., Rosenstein, R.E., 2002. Effect of hyaluronic acid on intraocular pressure in rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43, 2196-2200.
- Bettters, J.L., Yu, L., 2010. NPC1L1 and cholesterol transport. *FEBS Lett* 584, 2740-2747.
- Bhattacharya, S.K., Annangudi, S.P., Salomon, R.G., Kuchtey, R.W., Peachey, N.S., Crabb, J.W., 2005. Cochlin deposits in the trabecular meshwork of the glaucomatous DBA/2J mouse. *Exp Eye Res* 80, 741-744.
- Bhutto, I.A., Amemiya, T., 2001. Microvascular architecture of the rat choroid: corrosion cast study. *Anat Rec* 264, 63-71.
- Biermann, J., van Oterendorp, C., Stoykow, C., Volz, C., Jehle, T., Boehringer, D., Lagreze, W.A., 2012. Evaluation of intraocular pressure elevation in a modified laser-induced glaucoma rat model. *Exp Eye Res* 104, 7-14.
- Bignami, A., Dahl, D., 1979. The radial glia of Muller in the rat retina and their response to injury. An immunofluorescence study with antibodies to the glial fibrillary acidic (GFA) protein. *Exp Eye Res* 28, 63-69.
- Biswas, S., Wan, K.H., 2019. Review of rodent hypertensive glaucoma models. *Acta Ophthalmol* 97, e331-e340.
- Bjorkhem, I., 2006. Crossing the barrier: oxysterols as cholesterol transporters and metabolic modulators in the brain. *J Intern Med* 260, 493-508.
- Bjorkhem, I., Andersson, O., Diczfalusy, U., Sevastik, B., Xiu, R.J., Duan, C., Lund, E., 1994. Atherosclerosis and sterol 27-hydroxylase: evidence for a role of this enzyme in elimination of cholesterol from human macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 8592-8596.

- Bjorkhem, I., Araya, Z., Rudling, M., Angelin, B., Einarsson, C., Wikvall, K., 2002. Differences in the regulation of the classical and the alternative pathway for bile acid synthesis in human liver. No coordinate regulation of CYP7A1 and CYP27A1. *J Biol Chem* 277, 26804-26807.
- Bjorkhem, I., Lutjohann, D., Diczfalussy, U., Stahle, L., Ahlborg, G., Wahren, J., 1998. Cholesterol homeostasis in human brain: turnover of 24S-hydroxycholesterol and evidence for a cerebral origin of most of this oxysterol in the circulation. *J Lipid Res* 39, 1594-1600.
- Bloch, K., 1965. The biological synthesis of cholesterol. *Science* 150, 19-28.
- Boesze-Battaglia, K., Hennessey, T., Albert, A.D., 1989. Cholesterol heterogeneity in bovine rod outer segment disk membranes. *J Biol Chem* 264, 8151-8155.
- Boije, H., Shirazi Fard, S., Edqvist, P.H., Hallbook, F., 2016. Horizontal Cells, the Odd Ones Out in the Retina, Give Insights into Development and Disease. *Front Neuroanat* 10, 77.
- Booij, J.C., Baas, D.C., Beisekeeva, J., Gorgels, T.G., Bergen, A.A., 2010. The dynamic nature of Bruch's membrane. *Prog Retin Eye Res* 29, 1-18.
- Bosco, A., Inman, D.M., Steele, M.R., Wu, G., Soto, I., Marsh-Armstrong, N., Hubbard, W.C., Calkins, D.J., Horner, P.J., Vetter, M.L., 2008. Reduced retina microglial activation and improved optic nerve integrity with minocycline treatment in the DBA/2J mouse model of glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 49, 1437-1446.
- Boussicault, L., Alves, S., Lamaziere, A., Planques, A., Heck, N., Moumne, L., Despres, G., Bolte, S., Hu, A., Pages, C., Galvan, L., Piguet, F., Aubourg, P., Cartier, N., Caboche, J., Betuing, S., 2016. CYP46A1, the rate-limiting enzyme for cholesterol degradation, is neuroprotective in Huntington's disease. *Brain* 139, 953-970.
- Bretillon, L., Diczfalussy, U., Bjorkhem, I., Maire, M.A., Martine, L., Joffre, C., Acar, N., Bron, A., Creuzot-Garcher, C., 2007. Cholesterol-24S-hydroxylase (CYP46A1) is specifically expressed in neurons of the neural retina. *Curr Eye Res* 32, 361-366.
- Bretillon, L., Thuret, G., Gregoire, S., Acar, N., Joffre, C., Bron, A.M., Gain, P., Creuzot-Garcher, C.P., 2008. Lipid and fatty acid profile of the retina, retinal pigment epithelium/choroid, and the lacrimal gland, and associations with adipose tissue fatty acids in human subjects. *Exp Eye Res* 87, 521-528.
- Bringmann, A., Pannicke, T., Biedermann, B., Francke, M., Iandiev, I., Grosche, J., Wiedemann, P., Albrecht, J., Reichenbach, A., 2009. Role of retinal glial cells in neurotransmitter uptake and metabolism. *Neurochem Int* 54, 143-160.
- 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., Reichenbach, A., 2001. Role of Muller cells in retinal degenerations. *Front Biosci* 6, E72-92.
- Brown, M.S., Goldstein, J.L., 1975. Regulation of the activity of the low density lipoprotein receptor in human fibroblasts. *Cell* 6, 307-316.
- Brown, M.S., Goldstein, J.L., 2009. Cholesterol feedback: from Schoenheimer's bottle to Scap's MELADL. *J Lipid Res* 50 Suppl, S15-27.
- Burg, J.S., Espenshade, P.J., 2011. Regulation of HMG-CoA reductase in mammals and yeast. *Prog Lipid Res* 50, 403-410.
- Burger, K., Gimpl, G., Fahrenholz, F., 2000. Regulation of receptor function by cholesterol. *Cell Mol Life Sci* 57, 1577-1592.
- Burkard, I., von Eckardstein, A., Waeber, G., Vollenweider, P., Rentsch, K.M., 2007. Lipoprotein distribution and biological variation of 24S- and 27-hydroxycholesterol in healthy volunteers. *Atherosclerosis* 194, 71-78.
- Burns, M.E., Arshavsky, V.Y., 2005. Beyond counting photons: trials and trends in vertebrate visual transduction. *Neuron* 48, 387-401.
- Cabrera, C.L., Wagner, L.A., Schork, M.A., Bohr, D.F., Cohan, B.E., 1999. Intraocular pressure measurement in the conscious rat. *Acta Ophthalmol Scand* 77, 33-36.
- Camus, M.C., Chapman, M.J., Forgez, P., Laplaud, P.M., 1983. Distribution and characterization of the serum lipoproteins and apoproteins in the mouse, *Mus musculus*. *J Lipid Res* 24, 1210-1228.

- Cerqueira, N.M., Oliveira, E.F., Gesto, D.S., Santos-Martins, D., Moreira, C., Moorthy, H.N., Ramos, M.J., Fernandes, P.A., 2016. Cholesterol Biosynthesis: A Mechanistic Overview. *Biochemistry* 55, 5483-5506.
- Cesareo, M., Martucci, A., Ciuffoletti, E., Mancino, R., Cerulli, A., Sorge, R.P., Martorana, A., Sancesario, G., Nucci, C., 2015. Association Between Alzheimer's Disease and Glaucoma: A Study Based on Heidelberg Retinal Tomography and Frequency Doubling Technology Perimetry. *Front Neurosci* 9, 479.
- Chang, T.Y., Li, B.L., Chang, C.C., Urano, Y., 2009. Acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferases. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 297, E1-9.
- Charvet, C.D., Laird, J., Xu, Y., Salomon, R.G., Pikuleva, I.A., 2013. Posttranslational modification by an isolevuglandin diminishes activity of the mitochondrial cytochrome P450 27A1. *J Lipid Res* 54, 1421-1429.
- Chauhan, B.C., Levatte, T.L., Garnier, K.L., Tremblay, F., Pang, I.H., Clark, A.F., Archibald, M.L., 2006. Semiquantitative optic nerve grading scheme for determining axonal loss in experimental optic neuropathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47, 634-640.
- Chen, H., Weber, A.J., 2001. BDNF enhances retinal ganglion cell survival in cats with optic nerve damage. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42, 966-974.
- Chen J., Liu CH., Sapieha P., 2016. Retinal Vascular Development. In: Stahl A. (eds) *Anti-Angiogenic Therapy in Ophthalmology. Essentials in Ophthalmology*. Springer, Cham
- Chen, J., Zhang, X., Kusumo, H., Costa, L.G., Guizzetti, M., 2013. Cholesterol efflux is differentially regulated in neurons and astrocytes: implications for brain cholesterol homeostasis. *Biochimica et biophysica acta* 1831, 263-275.
- Chen, L., Yang, P., Kijlstra, A., 2002. Distribution, markers, and functions of retinal microglia. *Ocul Immunol Inflamm* 10, 27-39.
- Chen, S.H., Habib, G., Yang, C.Y., Gu, Z.W., Lee, B.R., Weng, S.A., Silberman, S.R., Cai, S.J., Deslypere, J.P., Rosseneu, M., et al., 1987. Apolipoprotein B-48 is the product of a messenger RNA with an organ-specific in-frame stop codon. *Science* 238, 363-366.
- Cheng, X., Li, J., Guo, D., 2018. SCAP/SREBPs are Central Players in Lipid Metabolism and Novel Metabolic Targets in Cancer Therapy. *Curr Top Med Chem* 18, 484-493.
- Chiang, J.Y., 2017. Recent advances in understanding bile acid homeostasis. *F1000Res* 6, 2029.
- Chiasseu, M., Cueva Vargas, J.L., Destroismaisons, L., Vande Velde, C., Leclerc, N., Di Polo, A., 2016. Tau Accumulation, Altered Phosphorylation, and Missorting Promote Neurodegeneration in Glaucoma. *J Neurosci* 36, 5785-5798.
- Chidlow, G., Casson, R., Sobrado-Calvo, P., Vidal-Sanz, M., Osborne, N.N., 2005. Measurement of retinal injury in the rat after optic nerve transection: an RT-PCR study. *Mol Vis* 11, 387-396.
- Chidlow, G., Wood, J.P.M., Casson, R.J., 2017. Investigations into Hypoxia and Oxidative Stress at the Optic Nerve Head in a Rat Model of Glaucoma. *Front Neurosci* 11, 478.
- Churchward, M.A., Todd, K.G., 2014. Statin treatment affects cytokine release and phagocytic activity in primary cultured microglia through two separable mechanisms. *Mol Brain* 7, 85.
- Clark, A.F., Wordinger, R.J., 2009. The role of steroids in outflow resistance. *Experimental Eye Research* 88, 752-759.
- Claudepierre, T., Paques, M., Simonutti, M., Buard, I., Sahel, J., Maue, R.A., Picaud, S., Pfrieger, F.W., 2010. Lack of Niemann-Pick type C1 induces age-related degeneration in the mouse retina. *Mol Cell Neurosci* 43, 164-176.
- Cohen, D.E., 2016. Of TICE in Men. *Cell Metab* 24, 773-774.
- Cohen, L.P., Pasquale, L.R., 2014. Clinical characteristics and current treatment of glaucoma. *Cold Spring Harb Perspect Med* 4.
- Conlon, R., Saheb, H., Ahmed, II, 2017. Glaucoma treatment trends: a review. *Can J Ophthalmol* 52, 114-124.
- Constable, P.A., Lawrenson, J.G., 2009. Glial cell factors and the outer blood retinal barrier. *Ophthalmic Physiol Opt* 29, 557-564.
- Cordeiro, M.F., Guo, L., Luong, V., Harding, G., Wang, W., Jones, H.E., Moss, S.E., Sillito, A.M., Fitzke, F.W., 2004. Real-time imaging of single nerve cell apoptosis in retinal neurodegeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 13352-13356.

- Cordeiro, M.F., Normando, E.M., Cardoso, M.J., Miodragovic, S., Jeylani, S., Davis, B.M., Guo, L., Ourselin, S., A'Hern, R., Bloom, P.A., 2017. Real-time imaging of single neuronal cell apoptosis in patients with glaucoma. *Brain* 140, 1757-1767.
- Corder, E.H., Saunders, A.M., Strittmatter, W.J., Schmechel, D.E., Gaskell, P.C., Small, G.W., Roses, A.D., Haines, J.L., Pericak-Vance, M.A., 1993. Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science* 261, 921-923.
- Costet, P., Luo, Y., Wang, N., Tall, A.R., 2000. Sterol-dependent transactivation of the ABC1 promoter by the liver X receptor/retinoid X receptor. *J Biol Chem* 275, 28240-28245.
- Cueva Vargas, J.L., Osswald, I.K., Unsain, N., Aurousseau, M.R., Barker, P.A., Bowie, D., Di Polo, A., 2015. Soluble Tumor Necrosis Factor Alpha Promotes Retinal Ganglion Cell Death in Glaucoma via Calcium-Permeable AMPA Receptor Activation. *J Neurosci* 35, 12088-12102.
- Cunha-Vaz, J., Bernardes, R., Lobo, C., 2011. Blood-retinal barrier. *Eur J Ophthalmol* 21 Suppl 6, S3-9.
- Curcio, C.A., Allen, K.A., 1990. Topography of ganglion cells in human retina. *J Comp Neurol* 300, 5-25.
- Curcio, C.A., Johnson, M., Huang, J.D., Rudolf, M., 2010. Apolipoprotein B-containing lipoproteins in retinal aging and age-related macular degeneration. *J Lipid Res* 51, 451-467.
- Cutler, R.G., Kelly, J., Storie, K., Pedersen, W.A., Tammara, A., Hatanpaa, K., Troncoso, J.C., Mattson, M.P., 2004. Involvement of oxidative stress-induced abnormalities in ceramide and cholesterol metabolism in brain aging and Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 2070-2075.
- Dai, Y., Lindsey, J.D., Duong-Polk, X., Nguyen, D., Hofer, A., Weinreb, R.N., 2009. Outflow facility in mice with a targeted type I collagen mutation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 50, 5749-5753.
- Day, A.C., Baio, G., Gazzard, G., Bunce, C., Azuara-Blanco, A., Munoz, B., Friedman, D.S., Foster, P.J., 2012. The prevalence of primary angle closure glaucoma in European derived populations: a systematic review. *Br J Ophthalmol* 96, 1162-1167.
- De Berardinis, E., Tieri, O., Iuglio, N., Polzella, A., 1966. The composition of the aqueous humour of man in aphakia. *Acta Ophthalmol (Copenh)* 44, 64-68.
- DeBose-Boyd, R.A., 2008. Feedback regulation of cholesterol synthesis: sterol-accelerated ubiquitination and degradation of HMG CoA reductase. *Cell Res* 18, 609-621.
- Defesche, J.C., 2004. Low-density lipoprotein receptor--its structure, function, and mutations. *Semin Vasc Med* 4, 5-11.
- Dehouck B., Fenart L., Dehouck M. P., Pierce A., Torpier G., Cecchelli R. (1997). A new function for the LDL receptor: transcytosis of LDL across the blood-brain barrier. *J. Cell Biol.* 138, 877-889.
- DeMattos, R.B., Brendza, R.P., Heuser, J.E., Kierson, M., Cirrito, J.R., Fryer, J., Sullivan, P.M., Fagan, A.M., Han, X., Holtzman, D.M., 2001. Purification and characterization of astrocyte-secreted apolipoprotein E and J-containing lipoproteins from wild-type and human apoE transgenic mice. *Neurochem Int* 39, 415-425.
- Dewundara, S.S., Wiggs, J.L., Sullivan, D.A., Pasquale, L.R., 2016. Is Estrogen a Therapeutic Target for Glaucoma? *Semin Ophthalmol* 31, 140-146.
- Dhande, O.S., Huberman, A.D., 2014. Retinal ganglion cell maps in the brain: implications for visual processing. *Curr Opin Neurobiol* 24, 133-142.
- Diaz-Coranguéz, M., Ramos, C., Antonetti, D.A., 2017. The inner blood-retinal barrier: Cellular basis and development. *Vision Res* 139, 123-137.
- Dietschy, J.M., 2009. Central nervous system: cholesterol turnover, brain development and neurodegeneration. *Biol Chem* 390, 287-293.
- Dietschy, J.M., Gamel, W.G., 1971. Cholesterol synthesis in the intestine of man: regional differences and control mechanisms. *J Clin Invest* 50, 872-880.
- Dietschy, J.M., Turley, S.D., 2004. Thematic review series: brain Lipids. Cholesterol metabolism in the central nervous system during early development and in the mature animal. *J Lipid Res* 45, 1375-1397.
- Dietschy, J.M., Turley, S.D., Spady, D.K., 1993. Role of liver in the maintenance of cholesterol and low density lipoprotein homeostasis in different animal species, including humans. *J Lipid Res* 34, 1637-1659.

- Djelti, F., Braudeau, J., Hudry, E., Dhenain, M., Varin, J., Bieche, I., Marquer, C., Chali, F., Aycirix, S., Auzeil, N., Alves, S., Langui, D., Potier, M.C., Laprevote, O., Vidaud, M., Duyckaerts, C., Miles, R., Aubourg, P., Cartier, N., 2015. CYP46A1 inhibition, brain cholesterol accumulation and neurodegeneration pave the way for Alzheimer's disease. *Brain* 138, 2383-2398.
- Doozandeh, A., Yazdani, S., 2016. Neuroprotection in Glaucoma. *J Ophthalmic Vis Res* 11, 209-220.
- Duncan, K.G., Bailey, K.R., Kane, J.P., Schwartz, D.M., 2002. Human retinal pigment epithelial cells express scavenger receptors BI and BII. *Biochemical and biophysical research communications* 292, 1017-1022.
- Duncan, K.G., Hosseini, K., Bailey, K.R., Yang, H., Lowe, R.J., Matthes, M.T., Kane, J.P., LaVail, M.M., Schwartz, D.M., Duncan, J.L., 2009. Expression of reverse cholesterol transport proteins ATP-binding cassette A1 (ABCA1) and scavenger receptor BI (SR-BI) in the retina and retinal pigment epithelium. *Br J Ophthalmol* 93, 1116-1120.
- Dunn, F.A., Wong, R.O., 2014. Wiring patterns in the mouse retina: collecting evidence across the connectome, physiology and light microscopy. *J Physiol* 592, 4809-4823.
- Ebneter, A., Casson, R.J., Wood, J.P., Chidlow, G., 2010. Microglial activation in the visual pathway in experimental glaucoma: spatiotemporal characterization and correlation with axonal injury. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 51, 6448-6460.
- Eckert, G.P., Cairns, N.J., Maras, A., Gattaz, W.F., Muller, W.E., 2000. Cholesterol modulates the membrane-disordering effects of beta-amyloid peptides in the hippocampus: specific changes in Alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord* 11, 181-186.
- Ehrlich, R., Harris, A., Wentz, S., Moore, N., Siesky, B., 2017. Anatomy and Regulation of the Optic Nerve Blood Flow.
- Elkington, A.R., Inman, C.B., Steart, P.V., Weller, R.O., 1990. The structure of the lamina cribrosa of the human eye: an immunocytochemical and electron microscopical study. *Eye (Lond)* 4 (Pt 1), 42-57.
- Elliott, D.A., Weickert, C.S., Garner, B., 2010. Apolipoproteins in the brain: implications for neurological and psychiatric disorders. *Clin Lipidol* 51, 555-573.
- Ellis, E.M., Gauvain, G., Sivyer, B., Murphy, G.J., 2016. Shared and distinct retinal input to the mouse superior colliculus and dorsal lateral geniculate nucleus. *J Neurophysiol* 116, 602-610.
- Elmore, S., 2007. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 35, 495-516.
- Elnor, V.M., 2002. Retinal pigment epithelial acid lipase activity and lipoprotein receptors: effects of dietary omega-3 fatty acids. *Trans Am Ophthalmol Soc* 100, 301-338.
- Euler, T., Haverkamp, S., Schubert, T., Baden, T., 2014. Retinal bipolar cells: elementary building blocks of vision. *Nat Rev Neurosci* 15, 507-519.
- Fausett, B.V., Goldman, D., 2006. A role for alpha1 tubulin-expressing Muller glia in regeneration of the injured zebrafish retina. *J Neurosci* 26, 6303-6313.
- Faust, P.L., Kovacs, W.J., 2014. Cholesterol biosynthesis and ER stress in peroxisome deficiency. *Biochimie* 98, 75-85.
- Field, G.D., Chichilnisky, E.J., 2007. Information processing in the primate retina: circuitry and coding. *Annu Rev Neurosci* 30, 1-30.
- Filomenko, R., Fourgeux, C., Bretillon, L., Gambert-Nicot, S., 2015. Oxysterols: Influence on plasma membrane rafts microdomains and development of ocular diseases. *Steroids* 99, 259-265.
- Fingert, J.H., 2011. Primary open-angle glaucoma genes. *Eye (Lond)* 25, 587-595.
- Fliesler, S.J., 2015. Cholesterol homeostasis in the retina: seeing is believing. *J Lipid Res* 56, 1-4.
- Fliesler, S.J., Bretillon, L., 2010. The ins and outs of cholesterol in the vertebrate retina. *J Lipid Res* 51, 3399-3413.
- Fliesler, S.J., Schroepfer, G.J., Jr., 1982. Sterol composition of bovine retinal rod outer segment membranes and whole retinas. *Biochim Biophys Acta* 711, 138-148.
- Fog, C.K., Kirkegaard, T., 2019. Animal models for Niemann-Pick type C: implications for drug discovery & development. *Expert Opin Drug Discov* 14, 499-509.
- Fortune, B., 2015. In vivo imaging methods to assess glaucomatous optic neuropathy. *Exp Eye Res* 141, 139-153.

- Fourgeux, C., Martine, L., Bjorkhem, I., Diczfalusy, U., Joffre, C., Acar, N., Creuzot-Garcher, C., Bron, A., Bretillon, L., 2009. Primary open-angle glaucoma: association with cholesterol 24S-hydroxylase (CYP46A1) gene polymorphism and plasma 24-hydroxycholesterol levels. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 50, 5712-5717.
- Fourgeux, C., Martine, L., Pasquis, B., Maire, M.A., Acar, N., Creuzot-Garcher, C., Bron, A., Bretillon, L., 2012. Steady-state levels of retinal 24S-hydroxycholesterol are maintained by glial cells intervention after elevation of intraocular pressure in the rat. *Acta Ophthalmol* 90, e560-567.
- 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.
- Fruttiger, M., 2002. Development of the mouse retinal vasculature: angiogenesis versus vasculogenesis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43, 522-527.
- Fu, B.Y., Ma, S.L., Tang, N.L., Tam, C.W., Lui, V.W., Chiu, H.F., Lam, L.C., 2009. Cholesterol 24-hydroxylase (CYP46A1) polymorphisms are associated with faster cognitive deterioration in Chinese older persons: a two-year follow up study. *Int J Geriatr Psychiatry* 24, 921-926.
- Fung, K.Y., Wang, C., Nyegaard, S., Heit, B., Fairn, G.D., Lee, W.L., 2017. SR-BI Mediated Transcytosis of HDL in Brain Microvascular Endothelial Cells Is Independent of Caveolin, Clathrin, and PDZK1. *Front Physiol* 8, 841.
- Gamba, P., Testa, G., Gargiulo, S., Staurengi, E., Poli, G., Leonarduzzi, G., 2015. Oxidized cholesterol as the driving force behind the development of Alzheimer's disease. *Front Aging Neurosci* 7, 119.
- Gamba, P., Testa, G., Sottero, B., Gargiulo, S., Poli, G., Leonarduzzi, G., 2012. The link between altered cholesterol metabolism and Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci* 1259, 54-64.
- Ganesan, L.P., Mates, J.M., Cheplowitz, A.M., Avila, C.L., Zimmerer, J.M., Yao, Z., Maiseyeu, A., Rajaram, M.V., Robinson, J.M., Anderson, C.L., 2016. Scavenger receptor B1, the HDL receptor, is expressed abundantly in liver sinusoidal endothelial cells. *Sci Rep* 6, 20646.
- Garcia-Valenzuela, E., Shareef, S., Walsh, J., Sharma, S.C., 1995. Programmed cell death of retinal ganglion cells during experimental glaucoma. *Exp Eye Res* 61, 33-44.
- Gautier, T., Masson, D., Lagrost, L., 2011. Métabolisme des lipoprotéines de haute densité (HDL). *Archives of Cardiovascular Diseases Supplements* 3, 267-272.
- Geeraerts, E., Dekeyster, E., Gaublumme, D., Salinas-Navarro, M., De Groef, L., Moons, L., 2016. A freely available semi-automated method for quantifying retinal ganglion cells in entire retinal flatmounts. *Exp Eye Res* 147, 105-113.
- Gill, S., Chow, R., Brown, A.J., 2008. Sterol regulators of cholesterol homeostasis and beyond: the oxysterol hypothesis revisited and revised. *Prog Lipid Res* 47, 391-404.
- Gimpl, G., Burger, K., Fahrenholz, F., 1997. Cholesterol as Modulator of Receptor Function. *Biochemistry* 36, 10959-10974.
- Go, G.W., Mani, A., 2012. Low-density lipoprotein receptor (LDLR) family orchestrates cholesterol homeostasis. *Yale J Biol Med* 85, 19-28.
- Goel, M., Picciani, R.G., Lee, R.K., Bhattacharya, S.K., 2010. Aqueous humor dynamics: a review. *Open Ophthalmol J* 4, 52-59.
- Goldberg, A.F., Moritz, O.L., Williams, D.S., 2016. Molecular basis for photoreceptor outer segment architecture. *Prog Retin Eye Res* 55, 52-81.
- Goldstein, J.L., Brown, M.S., 2009. The LDL receptor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 29, 431-438.
- Gordiyenko, N., Campos, M., Lee, J.W., Fariss, R.N., Szein, J., Rodriguez, I.R., 2004. RPE cells internalize low-density lipoprotein (LDL) and oxidized LDL (oxLDL) in large quantities in vitro and in vivo. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45, 2822-2829.
- Gosselet, F., Candela, P., Sevin, E., Berezowski, V., Cecchelli, R., Fenart, L., 2009. Transcriptional profiles of receptors and transporters involved in brain cholesterol homeostasis at the blood-brain barrier: use of an in vitro model. *Brain Res* 1249, 34-42.
- Gosselet, F., Saint-Pol, J., Fenart, L., 2014. Effects of oxysterols on the blood-brain barrier: implications for Alzheimer's disease. *Biochem Biophys Res Commun* 446, 687-691.

- Guo, L., Salt, T.E., Luong, V., Wood, N., Cheung, W., Maass, A., Ferrari, G., Russo-Marie, F., Sillito, A.M., Cheetham, M.E., Moss, S.E., Fitzke, F.W., Cordeiro, M.F., 2007. Targeting amyloid-beta in glaucoma treatment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 13444-13449.
- Gutierrez-Pajares, J.L., Ben Hassen, C., Chevalier, S., Frank, P.G., 2016. SR-BI: Linking Cholesterol and Lipoprotein Metabolism with Breast and Prostate Cancer. *Front Pharmacol* 7, 338.
- Guymer, C., Wood, J.P., Chidlow, G., Casson, R.J., 2019. Neuroprotection in glaucoma: recent advances and clinical translation. *Clin Exp Ophthalmol* 47, 88-105.
- Halfter, W., Dong, S., Dong, A., Eller, A.W., Nischt, R., 2008. Origin and turnover of ECM proteins from the inner limiting membrane and vitreous body. *Eye (Lond)* 22, 1207-1213.
- Handelman, G.J., Dratz, E.A., 1986. The role of antioxidants in the retina and retinal pigment epithelium and the nature of prooxidant-induced damage. *Advances in Free Radical Biology & Medicine* 2, 1-89.
- Harik, S.I., Kalara, R.N., Whitney, P.M., Andersson, L., Lundahl, P., Ledbetter, S.R., Perry, G., 1990. Glucose transporters are abundant in cells with "occluding" junctions at the blood-eye barriers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 4261-4264.
- Hartveit, E., 1997. Functional organization of cone bipolar cells in the rat retina. *J Neurophysiol* 77, 1716-1730.
- He, M., Foster, P.J., Johnson, G.J., Khaw, P.T., 2006. Angle-closure glaucoma in East Asian and European people. Different diseases? *Eye (Lond)* 20, 3-12.
- Hecht, S., Schlaer, S., Pirenne, M.H., 1942. Energy, Quanta, and Vision. *J Gen Physiol* 25, 819-840.
- Heidelberger, R., Thoreson, W.B., Witkovsky, P., 2005. Synaptic transmission at retinal ribbon synapses. *Prog Retin Eye Res* 24, 682-720.
- Heidrich, J.E., Contos, L.M., Hunsaker, L.A., Deck, L.M., Vander Jagt, D.L., 2004. Inhibition of pancreatic cholesterol esterase reduces cholesterol absorption in the hamster. *BMC Pharmacol* 4, 5.
- Herz, J., Bock, H.H., 2002. Lipoprotein receptors in the nervous system. *Annu Rev Biochem* 71, 405-434.
- Heverin, M., Meaney, S., Lutjohann, D., Diczfalusy, U., Wahren, J., Bjorkhem, I., 2005. Crossing the barrier: net flux of 27-hydroxycholesterol into the human brain. *J Lipid Res* 46, 1047-1052.
- Hirsch-Reinshagen, V., Donkin, J., Stukas, S., Chan, J., Wilkinson, A., Fan, J., Parks, J.S., Kuivenhoven, J.A., Lutjohann, D., Pritchard, H., Wellington, C.L., 2009. LCAT synthesized by primary astrocytes esterifies cholesterol on glia-derived lipoproteins. *J Lipid Res* 50, 885-893.
- Hogarth, C.A., Roy, A., Ebert, D.L., 2003. Genomic evidence for the absence of a functional cholesteryl ester transfer protein gene in mice and rats. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 135, 219-229.
- Holtzman, D.M., Herz, J., Bu, G., 2012. Apolipoprotein E and apolipoprotein E receptors: normal biology and roles in Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2, a006312.
- Hosoya, K., Tomi, M., Tachikawa, M., 2011. Strategies for therapy of retinal diseases using systemic drug delivery: relevance of transporters at the blood-retinal barrier. *Expert Opin Drug Deliv* 8, 1571-1587.
- Huang, W., Fileta, J., Guo, Y., Grosskreutz, C.L., 2006. Downregulation of Thy1 in retinal ganglion cells in experimental glaucoma. *Curr Eye Res* 31, 265-271.
- Hulsman, C.A., Westendorp, I.C., Ramrattan, R.S., Wolfs, R.C., Witteman, J.C., Vingerling, J.R., Hofman, A., de Jong, P.T., 2001. Is open-angle glaucoma associated with early menopause? The Rotterdam Study. *Am J Epidemiol* 154, 138-144.
- Hussain, M.M., 2000. A proposed model for the assembly of chylomicrons. *Atherosclerosis* 148, 1-15.
- Hussain, M.M., 2014. Intestinal lipid absorption and lipoprotein formation. *Curr Opin Lipidol* 25, 200-206.
- Iqbal, J., Hussain, M.M., 2009. Intestinal lipid absorption. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 296, E1183-1194.
- Ishiguro, M., Imai, Y., Kohsaka, S., 1995. Expression and distribution of low density lipoprotein receptor-related protein mRNA in the rat central nervous system. *Brain Res Mol Brain Res* 33, 37-46.
- Ishikawa, M., Yoshitomi, T., Covey, D.F., Zorumski, C.F., Izumi, Y., 2018. Additive neuroprotective effects of 24(S)-hydroxycholesterol and allopregnanolone in an ex vivo rat glaucoma model. *Sci Rep* 8, 12851.

Ishikawa, M., Yoshitomi, T., Zorumski, C.F., Izumi, Y., 2016. 24(S)-Hydroxycholesterol protects the ex vivo rat retina from injury by elevated hydrostatic pressure. *Sci Rep* 6, 33886.

Ito, J., Michikawa, M., 2014. ApoA-I/HDL Generation and Intracellular Cholesterol Transport through Cytosolic Lipid-Protein Particles in Astrocytes. *J Lipids* 2014, 530720.

Ito, J., Nagayasu, Y., Miura, Y., Yokoyama, S., Michikawa, M., 2014. Astrocytes endogenous apoE generates HDL-like lipoproteins using previously synthesized cholesterol through interaction with ABCA1. *Brain Res* 1570, 1-12.

Janowski, B.A., Willy, P.J., Devi, T.R., Falck, J.R., Mangelsdorf, D.J., 1996. An oxysterol signalling pathway mediated by the nuclear receptor LXR alpha. *Nature* 383, 728-731.

Jeon, H., Blacklow, S.C., 2005. Structure and physiologic function of the low-density lipoprotein receptor. *Annu Rev Biochem* 74, 535-562.

Jia, L., Betters, J.L., Yu, L., 2011. Niemann-pick C1-like 1 (NPC1L1) protein in intestinal and hepatic cholesterol transport. *Annu Rev Physiol* 73, 239-259.

Jia, L., Cepurna, W.O., Johnson, E.C., Morrison, J.C., 2000. Patterns of intraocular pressure elevation after aqueous humor outflow obstruction in rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41, 1380-1385.

John, S.W., Smith, R.S., Savinova, O.V., Hawes, N.L., Chang, B., Turnbull, D., Davisson, M., Roderick, T.H., Heckenlively, J.R., 1998. Essential iris atrophy, pigment dispersion, and glaucoma in DBA/2J mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39, 951-962.

Johnson, E.C., Morrison, J.C., 2009. Friend or foe? Resolving the impact of glial responses in glaucoma. *J Glaucoma* 18, 341-353.

Johnson, T.V., Bull, N.D., Hunt, D.P., Marina, N., Tomarev, S.I., Martin, K.R., 2010. Neuroprotective effects of intravitreal mesenchymal stem cell transplantation in experimental glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 51, 2051-2059.

Johnstone, M.A., 2014. Intraocular pressure regulation: findings of pulse-dependent trabecular meshwork motion lead to unifying concepts of intraocular pressure homeostasis. *J Ocul Pharmacol Ther* 30, 88-93.

Jonas, A., Phillips, M.C., 2008. CHAPTER 17 - Lipoprotein structure, in: Vance, D.E., Vance, J.E. (Eds.), *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes* (Fifth Edition). Elsevier, San Diego, pp. 485-506.

Kabouridis, P.S., Janzen, J., Magee, A.L., Ley, S.C., 2000. Cholesterol depletion disrupts lipid rafts and modulates the activity of multiple signaling pathways in T lymphocytes. *Eur J Immunol* 30, 954-963.

Kametani, T., Furuyama, H., 1987. Synthesis of vitamin D3 and related compounds. *Med Res Rev* 7, 147-171.

Kanamori, A., Nakamura, M., Nakanishi, Y., Yamada, Y., Negi, A., 2005. Long-term glial reactivity in rat retinas ipsilateral and contralateral to experimental glaucoma. *Exp Eye Res* 81, 48-56.

Kandutsch, A.A., Russell, A.E., 1960. Preputial gland tumor sterols. 3. A metabolic pathway from lanosterol to cholesterol. *J Biol Chem* 235, 2256-2261.

Karten, B., Campenot, R.B., Vance, D.E., Vance, J.E., 2006. Expression of ABCG1, but not ABCA1, correlates with cholesterol release by cerebellar astroglia. *J Biol Chem* 281, 4049-4057.

Kefalov, V.J., 2012. Rod and cone visual pigments and phototransduction through pharmacological, genetic, and physiological approaches. *J Biol Chem* 287, 1635-1641.

Kermer, P., Ankerhold, R., Klocker, N., Krajewski, S., Reed, J.C., Bahr, M., 2000. Caspase-9: involvement in secondary death of axotomized rat retinal ganglion cells in vivo. *Brain Res Mol Brain Res* 85, 144-150.

Kermer, P., Klocker, N., Labes, M., Thomsen, S., Srinivasan, A., Bahr, M., 1999. Activation of caspase-3 in axotomized rat retinal ganglion cells in vivo. *FEBS Lett* 453, 361-364.

Kerrigan, L.A., Zack, D.J., Quigley, H.A., Smith, S.D., Pease, M.E., 1997. TUNEL-positive ganglion cells in human primary open-angle glaucoma. *Arch Ophthalmol* 115, 1031-1035.

Ketomaki, A., Gylling, H., Siimes, M.A., Vuorio, A., Miettinen, T.A., 2003. Squalene and noncholesterol sterols in serum and lipoproteins of children with and without familial hypercholesterolemia. *Pediatr Res* 53, 648-653.

Khaw, P.T., Shah, P., Elington, A.R., 2004. Glaucoma--1: diagnosis. *BMJ* 328, 97-99.

- Khawaja, A.P., Cooke Bailey, J.N., Wareham, N.J., Scott, R.A., Simcoe, M., Igo, R.P., Jr., Song, Y.E., Wojciechowski, R., Cheng, C.Y., Khaw, P.T., Pasquale, L.R., Haines, J.L., Foster, P.J., Wiggs, J.L., Hammond, C.J., Hysi, P.G., Eye, U.K.B., Vision, C., Consortium, N., 2018. Genome-wide analyses identify 68 new loci associated with intraocular pressure and improve risk prediction for primary open-angle glaucoma. *Nat Genet* 50, 778-782.
- Kim, W.S., Guillemin, G.J., Glaros, E.N., Lim, C.K., Garner, B., 2006. Quantitation of ATP-binding cassette subfamily-A transporter gene expression in primary human brain cells. *Neuroreport* 17, 891-896.
- Kivipelto, M., Helkala, E.L., Laakso, M.P., Hanninen, T., Hallikainen, M., Alhainen, K., Soininen, H., Tuomilehto, J., Nissinen, A., 2001. Midlife vascular risk factors and Alzheimer's disease in later life: longitudinal, population based study. *BMJ* 322, 1447-1451.
- Kiriyama, Y., Nochi, H., 2019. The Biosynthesis, Signaling, and Neurological Functions of Bile Acids. *Biomolecules* 9.
- Klein, B.E., Klein, R., Lee, K.E., 2004. Heritability of risk factors for primary open-angle glaucoma: the Beaver Dam Eye Study. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45, 59-62.
- Knepper, P.A., Goossens, W., Hvizd, M., Palmberg, P.F., 1996. Glycosaminoglycans of the human trabecular meshwork in primary open-angle glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37, 1360-1367.
- Kolb, H., Dekorver, L., 1991. Midget ganglion cells of the parafovea of the human retina: a study by electron microscopy and serial section reconstructions. *J Comp Neurol* 303, 617-636.
- Korade, Z., Kenworthy, A.K., 2008. Lipid rafts, cholesterol, and the brain. *Neuropharmacology* 55, 1265-1273.
- Kosoko-Lasaki, O., Gong, G., Haynatzki, G., Wilson, M.R., 2006. Race, ethnicity and prevalence of primary open-angle glaucoma. *J Natl Med Assoc* 98, 1626-1629.
- Kramer, R.H., Davenport, C.M., 2015. Lateral Inhibition in the Vertebrate Retina: The Case of the Missing Neurotransmitter. *PLoS Biol* 13, e1002322.
- Kryger, Z., Galli-Resta, L., Jacobs, G.H., Reese, B.E., 1998. The topography of rod and cone photoreceptors in the retina of the ground squirrel. *Vis Neurosci* 15, 685-691.
- 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.
- Kur, J., Newman, E.A., Chan-Ling, T., 2012. Cellular and physiological mechanisms underlying blood flow regulation in the retina and choroid in health and disease. *Prog Retin Eye Res* 31, 377-406.
- Kwong, J.M., Quan, A., Kyung, H., Piri, N., Caprioli, J., 2011. Quantitative analysis of retinal ganglion cell survival with Rbpms immunolabeling in animal models of optic neuropathies. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 52, 9694-9702.
- Kwong, J.M., Vo, N., Quan, A., Nam, M., Kyung, H., Yu, F., Piri, N., Caprioli, J., 2013. The dark phase intraocular pressure elevation and retinal ganglion cell degeneration in a rat model of experimental glaucoma. *Exp Eye Res* 112, 21-28.
- LaDu, M.J., Pederson, T.M., Frail, D.E., Reardon, C.A., Getz, G.S., Falduto, M.T., 1995. Purification of apolipoprotein E attenuates isoform-specific binding to beta-amyloid. *J Biol Chem* 270, 9039-9042.
- Laffitte, B.A., Repa, J.J., Joseph, S.B., Wilpitz, D.C., Kast, H.R., Mangelsdorf, D.J., Tontonoz, P., 2001. LXRs control lipid-inducible expression of the apolipoprotein E gene in macrophages and adipocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 507-512.
- Lake, S., Liverani, E., Desai, M., Casson, R., James, B., Clark, A., Salmon, J.F., 2004. Normal tension glaucoma is not associated with the common apolipoprotein E gene polymorphisms. *Br J Ophthalmol* 88, 491-493.
- Langer, K.B., Ohlemacher, S.K., Phillips, M.J., Fligor, C.M., Jiang, P., Gamm, D.M., Meyer, J.S., 2018. Retinal Ganglion Cell Diversity and Subtype Specification from Human Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell Reports* 10, 1282-1293.
- Larsson, M., Vorrso, E., Talmud, P., Lookene, A., Olivecrona, G., 2013. Apolipoproteins C-I and C-III inhibit lipoprotein lipase activity by displacement of the enzyme from lipid droplets. *J Biol Chem* 288, 33997-34008.
- Lavanya, R., Wong, T.Y., Friedman, D.S., Aung, H.T., Alfred, T., Gao, H., Seah, S.K., Kashiwagi, K., Foster, P.J., Aung, T., 2008. Determinants of angle closure in older Singaporeans. *Arch Ophthalmol* 126, 686-691.
- Le Goff, M.M., Bishop, P.N., 2008. Adult vitreous structure and postnatal changes. *Eye (Lond)* 22, 1214-1222.

- Lehmann, J.M., Kliewer, S.A., Moore, L.B., Smith-Oliver, T.A., Oliver, B.B., Su, J.L., Sundseth, S.S., Winegar, D.A., Blanchard, D.E., Spencer, T.A., Willson, T.M., 1997. Activation of the nuclear receptor LXR by oxysterols defines a new hormone response pathway. *J Biol Chem* 272, 3137-3140.
- Leske, M.C., 2007. Open-Angle Glaucoma—An Epidemiologic Overview. *Ophthalmic Epidemiology* 14, 166-172.
- Levkovitch-Verbin, H., Kalev-Landoy, M., Habot-Wilner, Z., Melamed, S., 2006. Minocycline delays death of retinal ganglion cells in experimental glaucoma and after optic nerve transection. *Arch Ophthalmol* 124, 520-526.
- Levkovitch-Verbin, H., Quigley, H.A., Martin, K.R., Valenta, D., Baumrind, L.A., Pease, M.E., 2002. Translimbal laser photocoagulation to the trabecular meshwork as a model of glaucoma in rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43, 402-410.
- Li, H., Turley, S.D., Liu, B., Repa, J.J., Dietschy, J.M., 2008. GM2/GD2 and GM3 gangliosides have no effect on cellular cholesterol pools or turnover in normal or NPC1 mice. *J Lipid Res* 49, 1816-1828.
- Li, L., Eter, N., Heiduschka, P., 2015. The microglia in healthy and diseased retina. *Experimental Eye Research* 136, 116-130.
- Liao, R., Ye, M., Xu, X., 2014. An updated meta-analysis: apolipoprotein E genotypes and risk of primary open-angle glaucoma. *Mol Vis* 20, 1025-1036.
- Liao, W.L., Heo, G.Y., Dodder, N.G., Reem, R.E., Mast, N., Huang, S., Dipatre, P.L., Turko, I.V., Pikuleva, I.A., 2011. Quantification of cholesterol-metabolizing P450s CYP27A1 and CYP46A1 in neural tissues reveals a lack of enzyme-product correlations in human retina but not human brain. *J Proteome Res* 10, 241-248.
- Libby, R.T., Anderson, M.G., Pang, I.H., Robinson, Z.H., Savinova, O.V., Cosma, I.M., Snow, A., Wilson, L.A., Smith, R.S., Clark, A.F., John, S.W., 2005. Inherited glaucoma in DBA/2J mice: pertinent disease features for studying the neurodegeneration. *Vis Neurosci* 22, 637-648.
- Lin, J.B., Mast, N., Bederman, I.R., Li, Y., Brunengraber, H., Bjorkhem, I., Pikuleva, I.A., 2016. Cholesterol in mouse retina originates primarily from in situ de novo biosynthesis. *J Lipid Res* 57, 258-264.
- Liscum, L., Ruggiero, R.M., Faust, J.R., 1989. The intracellular transport of low density lipoprotein-derived cholesterol is defective in Niemann-Pick type C fibroblasts. *J Cell Biol* 108, 1625-1636.
- Liu, B., Neufeld, A.H., 2000. Expression of nitric oxide synthase-2 (NOS-2) in reactive astrocytes of the human glaucomatous optic nerve head. *Glia* 30, 178-186.
- Long, J.M., Holtzman, D.M., 2019. Alzheimer Disease: An Update on Pathobiology and Treatment Strategies. *Cell* 179, 312-339.
- Lorber, B., Berry, M., Douglas, M.R., Nakazawa, T., Logan, A., 2009. Activated retinal glia promote neurite outgrowth of retinal ganglion cells via apolipoprotein E. *J Neurosci Res* 87, 2645-2652.
- Lorber, B., Guidi, A., Fawcett, J.W., Martin, K.R., 2012. Activated retinal glia mediated axon regeneration in experimental glaucoma. *Neurobiol Dis* 45, 243-252.
- Luna, C., Li, G., Huang, J., Qiu, J., Wu, J., Yuan, F., Epstein, D.L., Gonzalez, P., 2012. Regulation of trabecular meshwork cell contraction and intraocular pressure by miR-200c. *PLoS One* 7, e51688.
- Lund, E.G., Guileyardo, J.M., Russell, D.W., 1999. cDNA cloning of cholesterol 24-hydroxylase, a mediator of cholesterol homeostasis in the brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 7238-7243.
- Lund, E.G., Xie, C., Kotti, T., Turley, S.D., Dietschy, J.M., Russell, D.W., 2003. Knockout of the cholesterol 24-hydroxylase gene in mice reveals a brain-specific mechanism of cholesterol turnover. *J Biol Chem* 278, 22980-22988.
- Lutjen-Drecoll, E., Rohen, J., Ritch, R., Shields, M., Krupin, T., 1996. The glaucomas.
- Mabuchi, F., Lindsey, J.D., Aihara, M., Mackey, M.R., Weinreb, R.N., 2004. Optic nerve damage in mice with a targeted type I collagen mutation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45, 1841-1845.
- MacNeil, M.A., Heussy, J.K., Dacheux, R.F., Raviola, E., Masland, R.H., 1999. The shapes and numbers of amacrine cells: matching of photofilled with Golgi-stained cells in the rabbit retina and comparison with other mammalian species. *J Comp Neurol* 413, 305-326.
- MacNeil, M.A., Masland, R.H., 1998. Extreme diversity among amacrine cells: implications for function. *Neuron* 20, 971-982.

- Mancino, R., Martucci, A., Cesareo, M., Giannini, C., Corasaniti, M.T., Bagetta, G., Nucci, C., 2018. Glaucoma and Alzheimer Disease: One Age-Related Neurodegenerative Disease of the Brain. *Curr Neuropharmacol* 16, 971-977.
- Mangan, B.G., Al-Yahya, K., Chen, C.T., Gionfriddo, J.R., Powell, C.C., Dubielzig, R.R., Ehrhart, E.J., Madl, J.E., 2007. Retinal pigment epithelial damage, breakdown of the blood-retinal barrier, and retinal inflammation in dogs with primary glaucoma. *Vet Ophthalmol* 10 Suppl 1, 117-124.
- Marx-Gross, S., Laubert-Reh, D., Schneider, A., Hohn, R., Mirshahi, A., Munzel, T., Wild, P.S., Beutel, M.E., Blettner, M., Pfeiffer, N., 2017. The Prevalence of Glaucoma in Young People. *Dtsch Arztebl Int* 114, 204-210.
- Mason, R.P., Shoemaker, W.J., Shajenko, L., Chambers, T.E., Herbert, L.G., 1992. Evidence for changes in the Alzheimer's disease brain cortical membrane structure mediated by cholesterol. *Neurobiol Aging* 13, 413-419.
- Mast, N., Lin, J.B., Anderson, K.W., Bjorkhem, I., Pikuleva, I.A., 2017. Transcriptional and post-translational changes in the brain of mice deficient in cholesterol removal mediated by cytochrome P450 46A1 (CYP46A1). *PLoS One* 12, e0187168.
- Mast, N., Norcross, R., Andersson, U., Shou, M., Nakayama, K., Bjorkhem, I., Pikuleva, I.A., 2003. Broad substrate specificity of human cytochrome P450 46A1 which initiates cholesterol degradation in the brain. *Biochemistry* 42, 14284-14292.
- Mast, N., Reem, R., Bederman, I., Huang, S., DiPatre, P.L., Bjorkhem, I., Pikuleva, I.A., 2011. Cholestenoic Acid is an important elimination product of cholesterol in the retina: comparison of retinal cholesterol metabolism with that in the brain. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 52, 594-603.
- Mast, N., White, M.A., Bjorkhem, I., Johnson, E.F., Stout, C.D., Pikuleva, I.A., 2008. Crystal structures of substrate-bound and substrate-free cytochrome P450 46A1, the principal cholesterol hydroxylase in the brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 9546-9551.
- Maulik, M., Westaway, D., Jhamandas, J.H., Kar, S., 2013. Role of cholesterol in APP metabolism and its significance in Alzheimer's disease pathogenesis. *Mol Neurobiol* 47, 37-63.
- Maus, T.L., Brubaker, R.F., 1999. Measurement of aqueous humor flow by fluorophotometry in the presence of a dilated pupil. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40, 542-546.
- McFarlane, M.R., Liang, G., Engelking, L.J., 2014. Insig proteins mediate feedback inhibition of cholesterol synthesis in the intestine. *J Biol Chem* 289, 2148-2156.
- McNamara, D.J., Kolb, R., Parker, T.S., Batwin, H., Samuel, P., Brown, C.D., Ahrens, E.H., Jr., 1987. Heterogeneity of cholesterol homeostasis in man. Response to changes in dietary fat quality and cholesterol quantity. *J Clin Invest* 79, 1729-1739.
- Mead, B., Thompson, A., Scheven, B.A., Logan, A., Berry, M., Leadbeater, W., 2014. Comparative evaluation of methods for estimating retinal ganglion cell loss in retinal sections and wholemounts. *PLoS One* 9, e110612.
- Mead, B., Tomarev, S., 2016. Evaluating retinal ganglion cell loss and dysfunction. *Exp Eye Res* 151, 96-106.
- Meaney, S., 2014. Epigenetic regulation of cholesterol homeostasis. *Front Genet* 5, 311.
- Meaney, S., Bodin, K., Diczfalussy, U., Bjorkhem, I., 2002. On the rate of translocation in vitro and kinetics in vivo of the major oxysterols in human circulation: critical importance of the position of the oxygen function. *J Lipid Res* 43, 2130-2135.
- Meaney, S., Heverin, M., Panzenboeck, U., Ekstrom, L., Axelsson, M., Andersson, U., Diczfalussy, U., Pikuleva, I., Wahren, J., Sattler, W., Bjorkhem, I., 2007. Novel route for elimination of brain oxysterols across the blood-brain barrier: conversion into 7 α -hydroxy-3-oxo-4-cholestenoic acid. *J Lipid Res* 48, 944-951.
- Mendivil, C.O., Rimm, E.B., Furtado, J., Sacks, F.M., 2013. Apolipoprotein E in VLDL and LDL with apolipoprotein C-III is associated with a lower risk of coronary heart disease. *J Am Heart Assoc* 2, e000130.
- Millar, J.C., Kaufman, P.L., 1995. PGF2 α /pilocarpine interactions on IOP and accommodation in monkeys. *Exp Eye Res* 61, 677-683.
- Miller, W.L., 2017. Steroidogenesis: Unanswered Questions. *Trends Endocrinol Metab* 28, 771-793.
- Mitchell, P., Hourihan, F., Sandbach, J., Wang, J.J., 1999. The relationship between glaucoma and myopia: the Blue Mountains Eye Study. *Ophthalmology* 106, 2010-2015.
- Mitsche, M.A., McDonald, J.G., Hobbs, H.H., Cohen, J.C., 2015. Flux analysis of cholesterol biosynthesis in vivo reveals multiple tissue and cell-type specific pathways. *Elife* 4, e07999.

- Mok, H.Y., von Bergmann, K., Grundy, S.M., 1979. Effects of continuous and intermittent feeding on biliary lipid outputs in man: application for measurements of intestinal absorption of cholesterol and bile acids. *J Lipid Res* 20, 389-398.
- Moreno, M.C., Marcos, H.J., Oscar Croxatto, J., Sande, P.H., Campanelli, J., Jaliffa, C.O., Benozzi, J., Rosenstein, R.E., 2005. A new experimental model of glaucoma in rats through intracameral injections of hyaluronic acid. *Exp Eye Res* 81, 71-80.
- Morrison, J.C., Cepurna, W.O., Johnson, E.C., 2015. Modeling glaucoma in rats by sclerosing aqueous outflow pathways to elevate intraocular pressure. *Exp Eye Res* 141, 23-32.
- Morrison, J.C., Johnson, E.C., Cepurna, W.O., 2018. Hypertonic Saline Injection Model of Experimental Glaucoma in Rats. *Methods Mol Biol* 1695, 11-21.
- Morrison, J.C., L'Hernault, N.L., Jerdan, J.A., Quigley, H.A., 1989. Ultrastructural location of extracellular matrix components in the optic nerve head. *Arch Ophthalmol* 107, 123-129.
- Morrison, J.C., Moore, C.G., Deppmeier, L.M., Gold, B.G., Meshul, C.K., Johnson, E.C., 1997. A rat model of chronic pressure-induced optic nerve damage. *Exp Eye Res* 64, 85-96.
- Munaut, C., Lambert, V., Noel, A., Frankenne, F., Deprez, M., Foidart, J.M., Rakic, J.M., 2001. Presence of oestrogen receptor type beta in human retina. *Br J Ophthalmol* 85, 877-882.
- Murgatroyd, H., Bembridge, J., 2008. Intraocular pressure. *BJA Education* 8, 100-103.
- Nadal-Nicolas, F.M., Jimenez-Lopez, M., Salinas-Navarro, M., Sobrado-Calvo, P., Albuquerque-Bejar, J.J., Vidal-Sanz, M., Agudo-Barriuso, M., 2012. Whole number, distribution and co-expression of brn3 transcription factors in retinal ganglion cells of adult albino and pigmented rats. *PLoS One* 7, e49830.
- Nadal-Nicolas, F.M., Jimenez-Lopez, M., Sobrado-Calvo, P., Nieto-Lopez, L., Canovas-Martinez, I., Salinas-Navarro, M., Vidal-Sanz, M., Agudo, M., 2009. Brn3a as a marker of retinal ganglion cells: qualitative and quantitative time course studies in naive and optic nerve-injured retinas. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 50, 3860-3868.
- Nakasone, N., Nakamura, Y.S., Higaki, K., Oumi, N., Ohno, K., Ninomiya, H., 2014. Endoplasmic reticulum-associated degradation of Niemann-Pick C1: evidence for the role of heat shock proteins and identification of lysine residues that accept ubiquitin. *J Biol Chem* 289, 19714-19725.
- Nakazawa, T., Nakazawa, C., Matsubara, A., Noda, K., Hisatomi, T., She, H., Michaud, N., Hafezi-Moghadam, A., Miller, J.W., Benowitz, L.I., 2006. Tumor necrosis factor-alpha mediates oligodendrocyte death and delayed retinal ganglion cell loss in a mouse model of glaucoma. *J Neurosci* 26, 12633-12641.
- Naumann, T., Hartig, W., Frotscher, M., 2000. Retrograde tracing with Fluoro-Gold: different methods of tracer detection at the ultrastructural level and neurodegenerative changes of back-filled neurons in long-term studies. *J Neurosci Methods* 103, 11-21.
- Nestel, P.J., Whyte, H.M., Goodman, D.S., 1969. Distribution and turnover of cholesterol in humans. *J Clin Invest* 48, 982-991.
- Neufeld, A.H., 1999. Microglia in the optic nerve head and the region of parapapillary chorioretinal atrophy in glaucoma. *Arch Ophthalmol* 117, 1050-1056.
- 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.
- Nguyen, J.V., Soto, I., Kim, K.Y., Bushong, E.A., Oglesby, E., Valiente-Soriano, F.J., Yang, Z., Davis, C.H., Bedont, J.L., Son, J.L., Wei, J.O., Buchman, V.L., Zack, D.J., Vidal-Sanz, M., Ellisman, M.H., Marsh-Armstrong, N., 2011. Myelination transition zone astrocytes are constitutively phagocytic and have synuclein dependent reactivity in glaucoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 1176-1181.
- Nickells, R.W., 2012. The cell and molecular biology of glaucoma: mechanisms of retinal ganglion cell death. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 53, 2476-2481.
- Nieweg, K., Schaller, H., Pfrieger, F.W., 2009. Marked differences in cholesterol synthesis between neurons and glial cells from postnatal rats. *J Neurochem* 109, 125-134.
- Nita, M., Grzybowski, A., 2016. The Role of the Reactive Oxygen Species and Oxidative Stress in the Pathomechanism of the Age-Related Ocular Diseases and Other Pathologies of the Anterior and Posterior Eye Segments in Adults. *Oxid Med Cell Longev* 2016, 3164734.

- Nuschke, A.C., Farrell, S.R., Levesque, J.M., Chauhan, B.C., 2015. Assessment of retinal ganglion cell damage in glaucomatous optic neuropathy: Axon transport, injury and soma loss. *Exp Eye Res* 141, 111-124.
- Nutzi, C., Schotzau, A., Grieshaber, M.C., 2017. Structure and Function Relationship of Activated Retinal Glia in Primary Open-Angle Glaucoma Patients. *J Ophthalmol* 2017, 7043752.
- Ohvo-Rekila, H., Ramstedt, B., Leppimäki, P., Slotte, J.P., 2002. Cholesterol interactions with phospholipids in membranes. *Prog Lipid Res* 41, 66-97.
- Ohyama, Y., Meaney, S., Heverin, M., Ekstrom, L., Brafman, A., Shafir, M., Andersson, U., Olin, M., Eggertsen, G., Diczfalussy, U., Feinstein, E., Björkhem, I., 2006. Studies on the transcriptional regulation of cholesterol 24-hydroxylase (CYP46A1): marked insensitivity toward different regulatory axes. *J Biol Chem* 281, 3810-3820.
- Olivecrona, G., Beisiegel, U., 1997. Lipid binding of apolipoprotein CII is required for stimulation of lipoprotein lipase activity against apolipoprotein CII-deficient chylomicrons. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17, 1545-1549.
- Omarova, S., Charvet, C.D., Reem, R.E., Mast, N., Zheng, W., Huang, S., Peachey, N.S., Pikuleva, I.A., 2012. Abnormal vascularization in mouse retina with dysregulated retinal cholesterol homeostasis. *J Clin Invest* 122, 3012-3023.
- Omri, S., Omri, B., Savoldelli, M., Jonet, L., Thillaye-Goldenberg, B., Thuret, G., Gain, P., Jeanny, J.C., Crisanti, P., Behar-Cohen, F., 2010. The outer limiting membrane (OLM) revisited: clinical implications. *Clin Ophthalmol* 4, 183-195.
- Orre, M., Kamphuis, W., Osborn, L.M., Jansen, A.H.P., Kooijman, L., Bossers, K., Hol, E.M., 2014. Isolation of glia from Alzheimer's mice reveals inflammation and dysfunction. *Neurobiol Aging* 35, 2746-2760.
- Ortin-Martinez, A., Nadal-Nicolas, F.M., Jimenez-Lopez, M., Albuquerque-Bejar, J.J., Nieto-Lopez, L., Garcia-Ayuso, D., Villegas-Perez, M.P., Vidal-Sanz, M., Agudo-Barriuso, M., 2014. Number and distribution of mouse retinal cone photoreceptors: differences between an albino (Swiss) and a pigmented (C57/BL6) strain. *PLoS One* 9, e102392.
- Osborne, A., Khatib, T.Z., Songra, L., Barber, A.C., Hall, K., Kong, G.Y.X., Widdowson, P.S., Martin, K.R., 2018. Neuroprotection of retinal ganglion cells by a novel gene therapy construct that achieves sustained enhancement of brain-derived neurotrophic factor/tropomyosin-related kinase receptor-B signaling. *Cell Death Dis* 9, 1007.
- Panzenboeck, U., Balazs, Z., Sovic, A., Hrzenjak, A., Levak-Frank, S., Wintersperger, A., Malle, E., Sattler, W., 2002. ABCA1 and scavenger receptor class B, type I, are modulators of reverse sterol transport at an in vitro blood-brain barrier constituted of porcine brain capillary endothelial cells. *J Biol Chem* 277, 42781-42789.
- Papassotiropoulos, A., Streffer, J.R., Tsolaki, M., Schmid, S., Thal, D., Nicosia, F., Iakovidou, V., Maddalena, A., Lutjohann, D., Ghebremedhin, E., Hegi, T., Pasch, T., Traxler, M., Bruhl, A., Benussi, L., Binetti, G., Braak, H., Nitsch, R.M., Hock, C., 2003. Increased brain beta-amyloid load, phosphorylated tau, and risk of Alzheimer disease associated with an intronic CYP46 polymorphism. *Arch Neurol* 60, 29-35.
- Pappolla, M.A., Bryant-Thomas, T.K., Herbert, D., Pacheco, J., Fabra Garcia, M., Manjon, M., Girones, X., Henry, T.L., Matsubara, E., Zambon, D., Wolozin, B., Sano, M., Cruz-Sanchez, F.F., Thal, L.J., Petanceska, S.S., Refolo, L.M., 2003. Mild hypercholesterolemia is an early risk factor for the development of Alzheimer amyloid pathology. *Neurology* 61, 199-205.
- Peichl, L., 2005. Diversity of mammalian photoreceptor properties: adaptations to habitat and lifestyle? *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 287, 1001-1012.
- Peinado-Ramon, P., Salvador, M., Villegas-Perez, M.P., Vidal-Sanz, M., 1996. Effects of axotomy and intraocular administration of NT-4, NT-3, and brain-derived neurotrophic factor on the survival of adult rat retinal ganglion cells. A quantitative in vivo study. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37, 489-500.
- Perdomo, G., Henry Dong, H., 2009. Apolipoprotein D in lipid metabolism and its functional implication in atherosclerosis and aging. *Aging (Albany NY)* 1, 17-27.
- Perez de Lara, M.J., Santano, C., Guzman-Aranguez, A., Valiente-Soriano, F.J., Aviles-Trigueros, M., Vidal-Sanz, M., de la Villa, P., Pintor, J., 2014. Assessment of inner retina dysfunction and progressive ganglion cell loss in a mouse model of glaucoma. *Exp Eye Res* 122, 40-49.
- Pfriege, F.W., 2003. Outsourcing in the brain: do neurons depend on cholesterol delivery by astrocytes? *Bioessays* 25, 72-78.
- Pfriege, F.W., Ungerer, N., 2011. Cholesterol metabolism in neurons and astrocytes. *Prog Lipid Res* 50, 357-371.
- Phillips, M.C., 2018. Is ABCA1 a lipid transfer protein? *J Lipid Res* 59, 749-763.

- Phulke, S., Kaushik, S., Kaur, S., Pandav, S.S., 2017. Steroid-induced Glaucoma: An Avoidable Irreversible Blindness. *J Curr Glaucoma Pract* 11, 67-72.
- Pi, S., Camino, A., Wei, X., Simonett, J., Cepurna, W., Huang, D., Morrison, J.C., Jia, Y., 2018. Rodent retinal circulation organization and oxygen metabolism revealed by visible-light optical coherence tomography. *Biomed Opt Express* 9, 5851-5862.
- Pike, L.J., 2009. The challenge of lipid rafts. *J Lipid Res* 50 Suppl, S323-328.
- Pikuleva, I.A., Curcio, C.A., 2014. Cholesterol in the retina: the best is yet to come. *Prog Retin Eye Res* 41, 64-89.
- Pitas, R.E., Boyles, J.K., Lee, S.H., Hui, D., Weisgraber, K.H., 1987. Lipoproteins and their receptors in the central nervous system. Characterization of the lipoproteins in cerebrospinal fluid and identification of apolipoprotein B,E(LDL) receptors in the brain. *J Biol Chem* 262, 14352-14360.
- Pow, D.V., Crook, D.K., 1995. Immunocytochemical evidence for the presence of high levels of reduced glutathione in radial glial cells and horizontal cells in the rabbit retina. *Neurosci Lett* 193, 25-28.
- Powell, L.M., Wallis, S.C., Pease, R.J., Edwards, Y.H., Knott, T.J., Scott, J., 1987. A novel form of tissue-specific RNA processing produces apolipoprotein-B48 in intestine. *Cell* 50, 831-840.
- Preiss-Landl, K., Zimmermann, R., Hammerle, G., Zechner, R., 2002. Lipoprotein lipase: the regulation of tissue specific expression and its role in lipid and energy metabolism. *Current opinion in lipidology* 13, 471-481.
- Pronin, A., Pham, D., An, W., Dvorianchikova, G., Reshetnikova, G., Qiao, J., Kozhekbaeva, Z., Reiser, A.E., Slepak, V.Z., Shestopalov, V.I., 2019. Inflammasome Activation Induces Pyroptosis in the Retina Exposed to Ocular Hypertension Injury. *Front Mol Neurosci* 12, 36.
- Pugh, E.N., Jr., 2018. The discovery of the ability of rod photoreceptors to signal single photons. *J Gen Physiol* 150, 383-388.
- Puglielli, L., Tanzi, R.E., Kovacs, D.M., 2003. Alzheimer's disease: the cholesterol connection. *Nat Neurosci* 6, 345-351.
- Puller, C., Haverkamp, S., Neitz, M., Neitz, J., 2014. Synaptic elements for GABAergic feed-forward signaling between HII horizontal cells and blue cone bipolar cells are enriched beneath primate S-cones. *PLoS One* 9, e88963.
- Qiu, M., Wang, S.Y., Singh, K., Lin, S.C., 2013. Association between myopia and glaucoma in the United States population. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 54, 830-835.
- Quigley, H.A., 2011. Glaucoma. *Lancet* 377, 1367-1377.
- Quigley, H.A., Broman, A.T., 2006. The number of people with glaucoma worldwide in 2010 and 2020. *Br J Ophthalmol* 90, 262-267.
- Quigley, H.A., McKinnon, S.J., Zack, D.J., Pease, M.E., Kerrigan-Baumrind, L.A., Kerrigan, D.F., Mitchell, R.S., 2000. Retrograde axonal transport of BDNF in retinal ganglion cells is blocked by acute IOP elevation in rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41, 3460-3466.
- Quigley, H.A., Nickells, R.W., Kerrigan, L.A., Pease, M.E., Thibault, D.J., Zack, D.J., 1995. Retinal ganglion cell death in experimental glaucoma and after axotomy occurs by apoptosis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 36, 774-786.
- Quina, L.A., Pak, W., Lanier, J., Banwait, P., Gratwick, K., Liu, Y., Velasquez, T., O'Leary, D.D., Goulding, M., Turner, E.E., 2005. Brn3a-expressing retinal ganglion cells project specifically to thalamocortical and collicular visual pathways. *J Neurosci* 25, 11595-11604.
- Quinn, C.M., Jessup, W., Wong, J., Kritharides, L., Brown, A.J., 2005. Expression and regulation of sterol 27-hydroxylase (CYP27A1) in human macrophages: a role for RXR and PPARgamma ligands. *Biochem J* 385, 823-830.
- Radhakrishnan, A., Ikeda, Y., Kwon, H.J., Brown, M.S., Goldstein, J.L., 2007. Sterol-regulated transport of SREBPs from endoplasmic reticulum to Golgi: oxysterols block transport by binding to Insig. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 6511-6518.
- Ramirez, D.M., Andersson, S., Russell, D.W., 2008. Neuronal expression and subcellular localization of cholesterol 24-hydroxylase in the mouse brain. *J Comp Neurol* 507, 1676-1693.
- Rao, P.V., Deng, P.F., Kumar, J., Epstein, D.L., 2001. Modulation of aqueous humor outflow facility by the Rho kinase-specific inhibitor Y-27632. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42, 1029-1037.

- Rao, Y.P., Vlahcevic, Z.R., Stravitz, R.T., Mallonee, D.H., Mullick, J., Avadhani, N.G., Hylemon, P.B., 1999. Down-regulation of the rat hepatic sterol 27-hydroxylase gene by bile acids in transfected primary hepatocytes: possible role of hepatic nuclear factor 1alpha. *J Steroid Biochem Mol Biol* 70, 1-14.
- Reeskamp, L.F., Meessen, E.C.E., Groen, A.K., 2018. Transintestinal cholesterol excretion in humans. *Curr Opin Lipidol* 29, 10-17.
- Reichenbach, A., Bringmann, A., 2013. New functions of Muller cells. *Glia* 61, 651-678.
- Reichenbach A., Bringmann A., 2010. Müller Cells in the Healthy Retina. In: Müller Cells in the Healthy and Diseased Retina. Springer, New York, NY.
- Reiner, A., Fitzgerald, M.E.C., Del Mar, N., Li, C., 2018. Neural control of choroidal blood flow. *Prog Retin Eye Res* 64, 96-130.
- Reingruber, J., Holcman, D., Fain, G.L., 2015. How rods respond to single photons: Key adaptations of a G-protein cascade that enable vision at the physical limit of perception. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 37, 1243-1252.
- Ressiniotis, T., Griffiths, P.G., Birch, M., Keers, S., Chinnery, P.F., 2004. The role of apolipoprotein E gene polymorphisms in primary open-angle glaucoma. *Arch Ophthalmol* 122, 258-261.
- Rizzolo, L.J., 2007. Development and role of tight junctions in the retinal pigment epithelium. *Int Rev Cytol* 258, 195-234.
- Rocha, M., Banuls, C., Bellod, L., Jover, A., Victor, V.M., Hernandez-Mijares, A., 2011. A review on the role of phytosterols: new insights into cardiovascular risk. *Curr Pharm Des* 17, 4061-4075.
- Rodriguez-Acebes, S., de la Cueva, P., Fernandez-Hernando, C., Ferruelo, A.J., Lasuncion, M.A., Rawson, R.B., Martinez-Botas, J., Gomez-Coronado, D., 2009. Desmosterol can replace cholesterol in sustaining cell proliferation and regulating the SREBP pathway in a sterol-Delta24-reductase-deficient cell line. *Biochem J* 420, 305-315.
- Rojas, B., Gallego, B.I., Ramirez, A.I., Salazar, J.J., de Hoz, R., Valiente-Soriano, F.J., Aviles-Trigueros, M., Villegas-Perez, M.P., Vidal-Sanz, M., Trivino, A., Ramirez, J.M., 2014. Microglia in mouse retina contralateral to experimental glaucoma exhibit multiple signs of activation in all retinal layers. *J Neuroinflammation* 11, 133.
- Rudnicka, A.R., Mt-Isa, S., Owen, C.G., Cook, D.G., Ashby, D., 2006. Variations in primary open-angle glaucoma prevalence by age, gender, and race: a Bayesian meta-analysis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47, 4254-4261.
- Russo, R., Cavaliere, F., Watanabe, C., Nucci, C., Bagetta, G., Corasaniti, M.T., Sakurada, S., Morrone, L.A., 2008. 17Beta-estradiol prevents retinal ganglion cell loss induced by acute rise of intraocular pressure in rat. *Prog Brain Res* 173, 583-590.
- Sabine, J.R., 1977. Cholesterol. M. Dekker.
- Sabol, S.L., Brewer, H.B., Jr., Santamarina-Fojo, S., 2005. The human ABCG1 gene: identification of LXR response elements that modulate expression in macrophages and liver. *J Lipid Res* 46, 2151-2167.
- Saher, G., Stumpf, S.K., 2015. Cholesterol in myelin biogenesis and hypomyelinating disorders. *Biochim Biophys Acta* 1851, 1083-1094.
- Sakakura, Y., Shimano, H., Sone, H., Takahashi, A., Inoue, N., Toyoshima, H., Suzuki, S., Yamada, N., 2001. Sterol regulatory element-binding proteins induce an entire pathway of cholesterol synthesis. *Biochem Biophys Res Commun* 286, 176-183.
- Salinas-Navarro, M., Alarcon-Martinez, L., Valiente-Soriano, F.J., Jimenez-Lopez, M., Mayor-Torroglosa, S., Aviles-Trigueros, M., Villegas-Perez, M.P., Vidal-Sanz, M., 2010. Ocular hypertension impairs optic nerve axonal transport leading to progressive retinal ganglion cell degeneration. *Exp Eye Res* 90, 168-183.
- Salinas-Navarro, M., Alarcon-Martinez, L., Valiente-Soriano, F.J., Ortin-Martinez, A., Jimenez-Lopez, M., Aviles-Trigueros, M., Villegas-Perez, M.P., de la Villa, P., Vidal-Sanz, M., 2009a. Functional and morphological effects of laser-induced ocular hypertension in retinas of adult albino Swiss mice. *Mol Vis* 15, 2578-2598.
- Salinas-Navarro, M., Mayor-Torroglosa, S., Jimenez-Lopez, M., Aviles-Trigueros, M., Holmes, T.M., Lund, R.D., Villegas-Perez, M.P., Vidal-Sanz, M., 2009b. A computerized analysis of the entire retinal ganglion cell population and its spatial distribution in adult rats. *Vision Res* 49, 115-126.
- Samsel, P.A., Kisiswa, L., Erichsen, J.T., Cross, S.D., Morgan, J.E., 2011. A novel method for the induction of experimental glaucoma using magnetic microspheres. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 52, 1671-1675.

Sanchez-Migallon, M.C., Nadal-Nicolas, F.M., Jimenez-Lopez, M., Sobrado-Calvo, P., Vidal-Sanz, M., Agudo-Barriuso, M., 2011. Brain derived neurotrophic factor maintains Brn3a expression in axotomized rat retinal ganglion cells. *Exp Eye Res* 92, 260-267.

Sanes, J.R., Masland, R.H., 2015. The types of retinal ganglion cells: current status and implications for neuronal classification. *Annu Rev Neurosci* 38, 221-246.

Sarup, V., Patil, K., Sharma, S.C., 2004. Ciliary neurotrophic factor and its receptors are differentially expressed in the optic nerve transected adult rat retina. *Brain Res* 1013, 152-158.

Sato, R., 2010. Sterol metabolism and SREBP activation. *Arch Biochem Biophys* 501, 177-181.

Schermer, A., Galvin, S., Sun, T.T., 1986. Differentiation-related expression of a major 64K corneal keratin in vivo and in culture suggests limbal location of corneal epithelial stem cells. *J Cell Biol* 103, 49-62.

Schlamp, C.L., Johnson, E.C., Li, Y., Morrison, J.C., Nickells, R.W., 2001. Changes in Thy1 gene expression associated with damaged retinal ganglion cells. *Mol Vis* 7, 192-201.

Schnebelen, C., Fourgeux, C., Pasquis, B., Creuzot-Garcher, C.P., Bron, A.M., Bretillon, L., Acar, N., 2011. Dietary polyunsaturated fatty acids reduce retinal stress induced by an elevation of intraocular pressure in rats. *Nutr Res* 31, 286-295.

Schnebelen, C., Pasquis, B., Salinas-Navarro, M., Joffre, C., Creuzot-Garcher, C.P., Vidal-Sanz, M., Bron, A.M., Bretillon, L., Acar, N., 2009. A dietary combination of omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids is more efficient than single supplementations in the prevention of retinal damage induced by elevation of intraocular pressure in rats. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 247, 1191-1203.

Scholz, R., Sobotka, M., Caramoy, A., Stempf, T., Moehle, C., Langmann, T., 2015. Minocycline counter-regulates pro-inflammatory microglia responses in the retina and protects from degeneration. *J Neuroinflammation* 12, 209.

Sebag, J., 2014. Vitreous: In health and disease.

Seitz, R., Ohlmann, A., Tamm, E.R., 2013. The role of Muller glia and microglia in glaucoma. *Cell Tissue Res* 353, 339-345.

Selvam, S., Kumar, T., Fruttiger, M., 2018. Retinal vasculature development in health and disease. *Prog Retin Eye Res* 63, 1-19.

Senthil, S., Garudadri, C., Khanna, R.C., Sannapaneni, K., 2010. Angle closure in the Andhra Pradesh Eye Disease Study. *Ophthalmology* 117, 1729-1735.

Shen, L., Melles, R.B., Metlapally, R., Barcellos, L., Schaefer, C., Risch, N., Herrinton, L.J., Wildsoet, C., Jorgenson, E., 2016. The Association of Refractive Error with Glaucoma in a Multiethnic Population. *Ophthalmology* 123, 92-101.

Shepard, A.R., Jacobson, N., Millar, J.C., Pang, I.H., Steely, H.T., Searby, C.C., Sheffield, V.C., Stone, E.M., Clark, A.F., 2007. Glaucoma-causing myocilin mutants require the Peroxisomal targeting signal-1 receptor (PTS1R) to elevate intraocular pressure. *Hum Mol Genet* 16, 609-617.

Simo, R., Villarroel, M., Corraliza, L., Hernandez, C., Garcia-Ramirez, M., 2010. The retinal pigment epithelium: something more than a constituent of the blood-retinal barrier--implications for the pathogenesis of diabetic retinopathy. *J Biomed Biotechnol* 2010, 190724.

Solomon, A., Kivipelto, M., Wolozin, B., Zhou, J., Whitmer, R.A., 2009. Midlife serum cholesterol and increased risk of Alzheimer's and vascular dementia three decades later. *Dement Geriatr Cogn Disord* 28, 75-80.

Song, P., Wang, J., Bucan, K., Theodoratou, E., Rudan, I., Chan, K.Y., 2017. National and subnational prevalence and burden of glaucoma in China: A systematic analysis. *J Glob Health* 7, 020705.

Sorci-Thomas, M.G., Bhat, S., Thomas, M.J., 2009. Activation of lecithin:cholesterol acyltransferase by HDL ApoA-I central helices. *Clin Lipidol* 4, 113-124.

Soto, I., Pease, M.E., Son, J.L., Shi, X., Quigley, H.A., Marsh-Armstrong, N., 2011. Retinal ganglion cell loss in a rat ocular hypertension model is sectorial and involves early optic nerve axon loss. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 52, 434-441.

Sotthibundhu, A., Sykes, A.M., Fox, B., Underwood, C.K., Thangnipon, W., Coulson, E.J., 2008. Beta-amyloid(1-42) induces neuronal death through the p75 neurotrophin receptor. *J Neurosci* 28, 3941-3946.

Souidi, M., Dubrac, S., Parquet, M., Volle, D.H., Lobaccaro, J.M., Mathe, D., Combes, O., Scanff, P., Lutton, C., Aigueperse, J., 2004. [Oxysterols: metabolism, biological role and associated diseases]. *Gastroenterol Clin Biol* 28, 279-293.

- Spangenberg, E., Severson, P.L., Hohsfield, L.A., Crapser, J., Zhang, J., Burton, E.A., Zhang, Y., Spevak, W., Lin, J., Phan, N.Y., Habets, G., Rymar, A., Tsang, G., Walters, J., Nespi, M., Singh, P., Broome, S., Ibrahim, P., Zhang, C., Bollag, G., West, B.L., Green, K.N., 2019. Sustained microglial depletion with CSF1R inhibitor impairs parenchymal plaque development in an Alzheimer's disease model. *Nat Commun* 10, 3758.
- Sparks, D.L., Scheff, S.W., Hunsaker, J.C., 3rd, Liu, H., Landers, T., Gross, D.R., 1994. Induction of Alzheimer-like beta-amyloid immunoreactivity in the brains of rabbits with dietary cholesterol. *Exp Neurol* 126, 88-94.
- Stone, J., Dreher, Z., 1987. Relationship between astrocytes, ganglion cells and vasculature of the retina. *J Comp Neurol* 255, 35-49.
- Strauss, O., 2005. The retinal pigment epithelium in visual function. *Physiol Rev* 85, 845-881.
- Subczynski, W.K., Pasenkiewicz-Gierula, M., Widomska, J., Mainali, L., Raguz, M., 2017. High Cholesterol/Low Cholesterol: Effects in Biological Membranes: A Review. *Cell Biochem Biophys* 75, 369-385.
- Sweeney, M.D., Sagare, A.P., Zlokovic, B.V., 2018. Blood-brain barrier breakdown in Alzheimer disease and other neurodegenerative disorders. *Nat Rev Neurol* 14, 133-150.
- Tachikawa, M., Okayasu, S., Hosoya, K., 2007. Functional involvement of scavenger receptor class B, type I, in the uptake of alpha-tocopherol using cultured rat retinal capillary endothelial cells. *Mol Vis* 13, 2041-2047.
- Tamm, E.R., 2002. Myocilin and glaucoma: facts and ideas. *Prog Retin Eye Res* 21, 395-428.
- Tan, N.Y.Q., Sng, C.C.A., Jonas, J.B., Wong, T.Y., Jansonius, N.M., Ang, M., 2019. Glaucoma in myopia: diagnostic dilemmas. *Br J Ophthalmol* 103, 1347-1355.
- Tanihara, H., Hangai, M., Sawaguchi, S., Abe, H., Kageyama, M., Nakazawa, F., Shirasawa, E., Honda, Y., 1997. Up-regulation of glial fibrillary acidic protein in the retina of primate eyes with experimental glaucoma. *Arch Ophthalmol* 115, 752-756.
- Tarr, P.T., Edwards, P.A., 2008. ABCG1 and ABCG4 are coexpressed in neurons and astrocytes of the CNS and regulate cholesterol homeostasis through SREBP-2. *J Lipid Res* 49, 169-182.
- Terakita, A., 2005. The opsins. *Genome Biol* 6, 213.
- Tezel, G., 2006. Oxidative stress in glaucomatous neurodegeneration: mechanisms and consequences. *Prog Retin Eye Res* 25, 490-513.
- Tezel, G., Li, L.Y., Patil, R.V., Wax, M.B., 2001. TNF-alpha and TNF-alpha receptor-1 in the retina of normal and glaucomatous eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42, 1787-1794.
- Tezel, G., Yang, X., Cai, J., 2005. Proteomic identification of oxidatively modified retinal proteins in a chronic pressure-induced rat model of glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46, 3177-3187.
- Tham, Y.C., Li, X., Wong, T.Y., Quigley, H.A., Aung, T., Cheng, C.Y., 2014. Global prevalence of glaucoma and projections of glaucoma burden through 2040: a systematic review and meta-analysis. *Ophthalmology* 121, 2081-2090.
- Thomas, C.N., Berry, M., Logan, A., Blanch, R.J., Ahmed, Z., 2017. Caspases in retinal ganglion cell death and axon regeneration. *Cell Death Discov* 3, 17032.
- Tielsch, J.M., Katz, J., Sommer, A., Quigley, H.A., Javitt, J.C., 1994. Family history and risk of primary open angle glaucoma. The Baltimore Eye Survey. *Arch Ophthalmol* 112, 69-73.
- Tielsch, J.M., Sommer, A., Katz, J., Royall, R.M., Quigley, H.A., Javitt, J., 1991. Racial variations in the prevalence of primary open-angle glaucoma. The Baltimore Eye Survey. *JAMA* 266, 369-374.
- Torocsik, D., Szanto, A., Nagy, L., 2009. Oxysterol signaling links cholesterol metabolism and inflammation via the liver X receptor in macrophages. *Mol Aspects Med* 30, 134-152.
- Tout, S., Chan-Ling, T., Hollander, H., Stone, J., 1993. The role of Muller cells in the formation of the blood-retinal barrier. *Neuroscience* 55, 291-301.
- Trautwein, E.A., Vermeer, M.A., Hiemstra, H., Ras, R.T., 2018. LDL-Cholesterol Lowering of Plant Sterols and Stanols-Which Factors Influence Their Efficacy? *Nutrients* 10.
- Trivli, A., Koliarakis, I., Terzidou, C., Goulielmos, G.N., Siganos, C.S., Spandidos, D.A., Dalianis, G., Detorakis, E.T., 2019. Normal-tension glaucoma: Pathogenesis and genetics. *Exp Ther Med* 17, 563-574.

- Trost, A., Lange, S., Schroedl, F., Bruckner, D., Motloch, K.A., Bogner, B., Kaser-Eichberger, A., Strohmaier, C., Runge, C., Aigner, L., Rivera, F.J., Reitsamer, H.A., 2016. Brain and Retinal Pericytes: Origin, Function and Role. *Front Cell Neurosci* 10, 20.
- Tsacopoulos, M., Magistretti, P.J., 1996. Metabolic coupling between glia and neurons. *J Neurosci* 16, 877-885.
- Tserentsoodol, N., Gordiyenko, N.V., Pascual, I., Lee, J.W., Fliesler, S.J., Rodriguez, I.R., 2006a. Intraretinal lipid transport is dependent on high density lipoprotein-like particles and class B scavenger receptors. *Mol Vis* 12, 1319-1333.
- Tserentsoodol, N., Szein, J., Campos, M., Gordiyenko, N.V., Fariss, R.N., Lee, J.W., Fliesler, S.J., Rodriguez, I.R., 2006b. Uptake of cholesterol by the retina occurs primarily via a low density lipoprotein receptor-mediated process. *Mol Vis* 12, 1306-1318.
- Tsui-Pierchala, B.A., Encinas, M., Milbrandt, J., Johnson, E.M., Jr., 2002. Lipid rafts in neuronal signaling and function. *Trends Neurosci* 25, 412-417.
- Tuccari, G., Trombetta, C., Giardinelli, M.M., Arena, F., Barresi, G., 1986. Distribution of glial fibrillary acidic protein in normal and gliotic human retina. *Basic Appl Histochem* 30, 425-432.
- Twisk, J., Hoekman, M.F., Muller, L.M., Iida, T., Tamaru, T., Ijzerman, A., Mager, W.H., Princen, H.M., 1995. Structural aspects of bile acids involved in the regulation of cholesterol 7 alpha-hydroxylase and sterol 27-hydroxylase. *Eur J Biochem* 228, 596-604.
- Urcola, J.H., Hernandez, M., Vecino, E., 2006. Three experimental glaucoma models in rats: comparison of the effects of intraocular pressure elevation on retinal ganglion cell size and death. *Exp Eye Res* 83, 429-437.
- Vajaranant, T.S., Nayak, S., Wilensky, J.T., Joslin, C.E., 2010. Gender and glaucoma: what we know and what we need to know. *Curr Opin Ophthalmol* 21, 91-99.
- van der Zypen, E., 1977. Experimental morphological study on structure and function of the filtration angel of the rat eye. *Ophthalmologica* 174, 285-298.
- Van Rens, G.H., Arkell, S.M., Charlton, W., Doesburg, W., 1988. Primary angle-closure glaucoma among Alaskan Eskimos. *Doc Ophthalmol* 70, 265-276.
- van Romunde, S.H., Thepass, G., Lemij, H.G., 2013. Is Hyperopia an Important Risk Factor for PACG in the Dutch Population?-A Case Control Study. *J Ophthalmol* 2013, 630481.
- Vance, J.E., 2012. Dysregulation of cholesterol balance in the brain: contribution to neurodegenerative diseases. *Dis Model Mech* 5, 746-755.
- Vance, J.E., Karten, B., 2014. Niemann-Pick C disease and mobilization of lysosomal cholesterol by cyclodextrin. *J Lipid Res* 55, 1609-1621.
- Vance, J.E., Peake, K.B., 2011. Function of the Niemann-Pick type C proteins and their bypass by cyclodextrin. *Curr Opin Lipidol* 22, 204-209.
- Vanier, M.T., 2010. Niemann-Pick disease type C. *Orphanet J Rare Dis* 5, 16.
- Varela, H.J., Hernandez, M.R., 1997. Astrocyte responses in human optic nerve head with primary open-angle glaucoma. *J Glaucoma* 6, 303-313.
- 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.
- Vidal-Sanz, M., Galindo-Romero, C., Valiente-Soriano, F.J., Nadal-Nicolas, F.M., Ortin-Martinez, A., Rovere, G., Salinas-Navarro, M., Lucas-Ruiz, F., Sanchez-Migallon, M.C., Sobrado-Calvo, P., Aviles-Trigueros, M., Villegas-Perez, M.P., Agudo-Barriuso, M., 2017. Shared and Differential Retinal Responses against Optic Nerve Injury and Ocular Hypertension. *Front Neurosci* 11, 235.
- Vidal-Sanz, M., Salinas-Navarro, M., Nadal-Nicolas, F.M., Alarcon-Martinez, L., Valiente-Soriano, F.J., de Imperial, J.M., Aviles-Trigueros, M., Agudo-Barriuso, M., Villegas-Perez, M.P., 2012. Understanding glaucomatous damage: anatomical and functional data from ocular hypertensive rodent retinas. *Prog Retin Eye Res* 31, 1-27.
- Viets, K., Eldred, K., Johnston, R.J., Jr., 2016. Mechanisms of Photoreceptor Patterning in Vertebrates and Invertebrates. *Trends Genet* 32, 638-659.
- Vitali C., Wellington C. L., Calabresi L. (2014). HDL and cholesterol handling in the brain. *Cardiovasc. Res.* 103, 405–413

- Vranka, J.A., Kelley, M.J., Acott, T.S., Keller, K.E., 2015. Extracellular matrix in the trabecular meshwork: intraocular pressure regulation and dysregulation in glaucoma. *Exp Eye Res* 133, 112-125.
- Wang, A.L., Yuan, M., Neufeld, A.H., 2007. Age-related changes in neuronal susceptibility to damage: comparison of the retinal ganglion cells of young and old mice before and after optic nerve crush. *Ann N Y Acad Sci* 1097, 64-66.
- Wang, B., Zhang, C., Zheng, W., Lu, Z., Zheng, C., Yang, Z., Wang, L., Jin, F., 2004. Association between a T/C polymorphism in intron 2 of cholesterol 24S-hydroxylase gene and Alzheimer's disease in Chinese. *Neurosci Lett* 369, 104-107.
- Wang, L., Cioffi, G.A., Cull, G., Dong, J., Fortune, B., 2002a. Immunohistologic evidence for retinal glial cell changes in human glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43, 1088-1094.
- Wang, S.W., Mu, X., Bowers, W.J., Kim, D.S., Plas, D.J., Crair, M.C., Federoff, H.J., Gan, L., Klein, W.H., 2002b. Brn3b/Brn3c double knockout mice reveal an unsuspected role for Brn3c in retinal ganglion cell axon outgrowth. *Development* 129, 467-477.
- Wang, X., Zhao, L., Zhang, J., Fariss, R.N., Ma, W., Kretschmer, F., Wang, M., Qian, H.H., Badea, T.C., Diamond, J.S., Gan, W.B., Roger, J.E., Wong, W.T., 2016. Requirement for Microglia for the Maintenance of Synaptic Function and Integrity in the Mature Retina. *J Neurosci* 36, 2827-2842.
- Wang, Y., Rogers, P.M., Su, C., Varga, G., Stayrook, K.R., Burris, T.P., 2008. Regulation of cholesterologenesis by the oxysterol receptor, LXRalpha. *J Biol Chem* 283, 26332-26339.
- Wang, Y., Zhou, Y.F., Zhao, B.Y., Gu, Z.Y., Li, S.L., 2014. Apolipoprotein E gene epsilon4epsilon4 is associated with elevated risk of primary open angle glaucoma in Asians: a meta-analysis. *BMC Med Genet* 15, 60.
- Warnecke, R.B., Oh, A., Breen, N., Gehlert, S., Paskett, E., Tucker, K.L., Lurie, N., Rebbeck, T., Goodwin, J., Flack, J., Srinivasan, S., Kerner, J., Heurtin-Roberts, S., Abeles, R., Tyson, F.L., Patmios, G., Hiatt, R.A., 2008. Approaching health disparities from a population perspective: the National Institutes of Health Centers for Population Health and Health Disparities. *Am J Public Health* 98, 1608-1615.
- Wassle, H., Puller, C., Muller, F., Haverkamp, S., 2009. Cone contacts, mosaics, and territories of bipolar cells in the mouse retina. *J Neurosci* 29, 106-117.
- Wattenberg, B.W., Silbert, D.F., 1983. Sterol partitioning among intracellular membranes. Testing a model for cellular sterol distribution. *J Biol Chem* 258, 2284-2289.
- Weinreb, R.N., 2007. Glaucoma neuroprotection: What is it? Why is it needed? *Can J Ophthalmol* 42, 396-398.
- Welge-Lussen, U., May, C.A., Neubauer, A.S., Priglinger, S., 2001. Role of tissue growth factors in aqueous humor homeostasis. *Curr Opin Ophthalmol* 12, 94-99.
- Whitmer, R.A., Sidney, S., Selby, J., Johnston, S.C., Yaffe, K., 2005. Midlife cardiovascular risk factors and risk of dementia in late life. *Neurology* 64, 277-281.
- Whitmore, A.V., Libby, R.T., John, S.W., 2005. Glaucoma: thinking in new ways-a role for autonomous axonal self-destruction and other compartmentalised processes? *Prog Retin Eye Res* 24, 639-662.
- Wilken, M.S., Reh, T.A., 2016. Retinal regeneration in birds and mice. *Curr Opin Genet Dev* 40, 57-64.
- Williamson, R., Sutherland, C., 2011. Neuronal membranes are key to the pathogenesis of Alzheimer's disease: the role of both raft and non-raft membrane domains. *Curr Alzheimer Res* 8, 213-221.
- Wilson, J. D. 1970. The measurement of the exchangeable pools of cholesterol in the baboon. *J. Clin. Invest.* 49: 655-665.
- Woldemussie, E., Wijono, M., Ruiz, G., 2004. Muller cell response to laser-induced increase in intraocular pressure in rats. *Glia* 47, 109-119.
- Wolfs, R.C., Klaver, C.C., Ramrattan, R.S., van Duijn, C.M., Hofman, A., de Jong, P.T., 1998. Genetic risk of primary open-angle glaucoma. Population-based familial aggregation study. *Arch Ophthalmol* 116, 1640-1645.
- Wormald, R.P.L., Jones, E., 2015. Glaucoma: acute and chronic primary angle-closure. *BMJ Clin Evid* 2015, 0703.
- Wu, D.M., Schneiderman, T., Burgett, J., Gokhale, P., Barthel, L., Raymond, P.A., 2001. Cones regenerate from retinal stem cells sequestered in the inner nuclear layer of adult goldfish retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42, 2115-2124.
- Wu, L., Zhao, L., 2016. ApoE2 and Alzheimer's disease: time to take a closer look. *Neural Regen Res* 11, 412-413.

- Xiong, H., Callaghan, D., Jones, A., Walker, D.G., Lue, L.F., Beach, T.G., Sue, L.I., Woulfe, J., Xu, H., Stanimirovic, D.B., Zhang, W., 2008. Cholesterol retention in Alzheimer's brain is responsible for high beta- and gamma-secretase activities and Abeta production. *Neurobiol Dis* 29, 422-437.
- Xu, L., You, Q.S., Jonas, J.B., 2010. Refractive error, ocular and general parameters and ophthalmic diseases. The Beijing Eye Study. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 248, 721-729.
- Yan, X., Ma, L., Hovakimyan, M., Lukas, J., Wree, A., Frank, M., Guthoff, R., Rolfs, A., Witt, M., Luo, J., 2014. Defects in the retina of Niemann-pick type C 1 mutant mice. *BMC Neurosci* 15, 126.
- Yang, C., McDonald, J.G., Patel, A., Zhang, Y., Umetani, M., Xu, F., Westover, E.J., Covey, D.F., Mangelsdorf, D.J., Cohen, J.C., Hobbs, H.H., 2006. Sterol intermediates from cholesterol biosynthetic pathway as liver X receptor ligands. *J Biol Chem* 281, 27816-27826.
- Yeonan-Kim, J., Bertalmio, M., 2016. Retinal Lateral Inhibition Provides the Biological Basis of Long-Range Spatial Induction. *PLoS One* 11, e0168963.
- Youngblood, H., Hauser, M.A., Liu, Y., 2019. Update on the genetics of primary open-angle glaucoma. *Exp Eye Res* 188, 107795.
- Yu L, Bharadwaj S, Brown JM, Ma Y, Du W, et al. Cholesterol-regulated translocation of NPC1L1 to the cell surface facilitates free cholesterol uptake. *J Biol Chem*. 2006;281:6616–24.
- Yu, L., Cao, G., Repa, J., Stangl, H., 2004. Sterol regulation of scavenger receptor class B type I in macrophages. *J Lipid Res* 45, 889-899.
- Yu, L., Li-Hawkins, J., Hammer, R.E., Berge, K.E., Horton, J.D., Cohen, J.C., Hobbs, H.H., 2002. Overexpression of ABCG5 and ABCG8 promotes biliary cholesterol secretion and reduces fractional absorption of dietary cholesterol. *J Clin Invest* 110, 671-680.
- Yuan, L., Neufeld, A.H., 2001. Activated microglia in the human glaucomatous optic nerve head. *J Neurosci Res* 64, 523-532.
- Yun, H., Lathrop, K.L., Yang, E., Sun, M., Kagemann, L., Fu, V., Stolz, D.B., Schuman, J.S., Du, Y., 2014. A laser-induced mouse model with long-term intraocular pressure elevation. *PLoS One* 9, e107446.
- Zannis, V.I., Koukos, G., Drosatos, K., Vezeridis, A., Zanni, E.E., Kypreos, K.E., Chroni, A., 2008. Discrete roles of apoA-I and apoE in the biogenesis of HDL species: lessons learned from gene transfer studies in different mouse models. *Ann Med* 40 Suppl 1, 14-28.
- Zarei, K., Scheetz, T.E., Christopher, M., Miller, K., Hedberg-Buenz, A., Tandon, A., Anderson, M.G., Fingert, J.H., Abramoff, M.D., 2016. Automated Axon Counting in Rodent Optic Nerve Sections with AxonJ. *Sci Rep* 6, 26559.
- Zelcer, N., Hong, C., Boyadjian, R., Tontonoz, P., 2009. LXR regulates cholesterol uptake through Idol-dependent ubiquitination of the LDL receptor. *Science* 325, 100-104.
- Zhang, C., McCall, M.A., 2012. Receptor targets of amacrine cells. *Vis Neurosci* 29, 11-29.
- Zhang, H., 2018. Lysosomal acid lipase and lipid metabolism: new mechanisms, new questions, and new therapies. *Curr Opin Lipidol* 29, 218-223.
- Zhang, C.P., Tian, Y., Zhang, M., Tuo, Q.H., Chen, J.X., Liao, D.F., 2016a. IDOL, inducible degrader of low-density lipoprotein receptor, serves as a potential therapeutic target for dyslipidemia. *Med Hypotheses* 86, 138-142.
- Zhang, D.D., Yu, H.L., Ma, W.W., Liu, Q.R., Han, J., Wang, H., Xiao, R., 2015. 27-Hydroxycholesterol contributes to disruptive effects on learning and memory by modulating cholesterol metabolism in the rat brain. *Neuroscience* 300, 163-173.
- Zhang, L., Reue, K., Fong, L.G., Young, S.G., Tontonoz, P., 2012. Feedback regulation of cholesterol uptake by the LXR-IDOL-LDLR axis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 32, 2541-2546.
- Zhang, L., Huang, X., Meng, Z., Dong, B., Shiah, S., Moore, D.D., Huang, W., 2009. Significance and mechanism of CYP7a1 gene regulation during the acute phase of liver regeneration. *Mol Endocrinol* 23, 137-145.
- Zhang, Y., Ma, K.L., Ruan, X.Z., Liu, B.C., 2016b. Dysregulation of the Low-Density Lipoprotein Receptor Pathway Is Involved in Lipid Disorder-Mediated Organ Injury. *Int J Biol Sci* 12, 569-579.
- Zhao, C., Dahlman-Wright, K., 2010. Liver X receptor in cholesterol metabolism. *J Endocrinol* 204, 233-240.

- Zheng, W., Mast, N., Saadane, A., Pikuleva, I.A., 2015. Pathways of cholesterol homeostasis in mouse retina responsive to dietary and pharmacologic treatments. *J Lipid Res* 56, 81-97.
- Zheng, W., Reem, R.E., Omarova, S., Huang, S., DiPatre, P.L., Charvet, C.D., Curcio, C.A., Pikuleva, I.A., 2012. Spatial distribution of the pathways of cholesterol homeostasis in human retina. *PLoS One* 7, e37926.
- Zhou, L., Li, C., Gao, L., Wang, A., 2015. High-density lipoprotein synthesis and metabolism (Review). *Mol Med Rep* 12, 4015-4021.
- Zidovetzki, R., Levitan, I., 2007. Use of cyclodextrins to manipulate plasma membrane cholesterol content: evidence, misconceptions and control strategies. *Biochim Biophys Acta* 1768, 1311-1324.
- Zuercher, W.J., Buckholz, R.G., Campobasso, N., Collins, J.L., Galardi, C.M., Gampe, R.T., Hyatt, S.M., Merrihew, S.L., Moore, J.T., Oplinger, J.A., Reid, P.R., Spearing, P.K., Stanley, T.B., Stewart, E.L., Willson, T.M., 2010. Discovery of tertiary sulfonamides as potent liver X receptor antagonists. *J Med Chem* 53, 3412-3416

Régulation du métabolisme du cholestérol dans la rétine en conditions expérimentales associées au glaucome

Mots-clés : Oxystérol, Œil, Dégénérescence, Cholestérol-24S-hydroxylase, Gliose, Communication neurone-glie.

Le cholestérol est un lipide présent dans toutes les cellules animales et indispensable à leur survie. Parmi les rôles multiples qu'il joue dans l'organisme, celui de composant des membranes cellulaires est essentiel pour le maintien de leur structure, de leur fluidité et donc clé dans la modulation de nombreuses voies de signalisation. A ce titre, les neurones sont particulièrement dépendants de l'apport en cholestérol car l'intégrité de la composition de leur membrane est requise pour l'exocytose vésiculaire des neurotransmetteurs et la transduction du signal post-synaptique. Ainsi, il a été montré qu'un excès ou un défaut de ce composé est neurotoxique. De nombreuses maladies neurodégénératives, comme la maladie d'Alzheimer, ont d'ailleurs été associées à des perturbations de l'homéostasie du cholestérol, soulignant la nécessité d'une régulation fine de son métabolisme dans les tissus nerveux. Dans ce cadre, l'existence de mécanismes de coordination entre les actions des neurones et de la glie, dont les fonctions sont complémentaires, semble indispensable. Dans le cerveau, les astrocytes, cellules macrogliales majoritaires, seraient le principal lieu de synthèse et d'export du cholestérol. Les neurones, plutôt consommateurs, seraient spécifiquement en charge de son élimination, via sa conversion en 24(S)-hydroxycholestérol (24S-OHC) par l'enzyme CYP46A1. Ce métabolite ne serait pas seulement un produit d'excrétion du cholestérol, mais jouerait également le rôle de molécule signal dans les cellules gliales. Il permettrait d'adapter le métabolisme de la glie aux besoins en cholestérol, afin d'éviter toute surcharge dans les tissus cérébraux. Dans la rétine, le métabolisme du cholestérol et sa régulation, en conditions physiologiques et pathologiques, sont encore peu décrits. Les cellules de Müller, macroglie majoritaire de la rétine, pourraient participer à la synthèse de cholestérol dans ce tissu, mais les arguments dans ce sens méritent d'être étoffés. Concernant le 24S-OHC, sa synthèse est essentiellement restreinte aux cellules ganglionnaires,

neurones chargés de transmettre l'influx nerveux de la rétine au cerveau. Les résultats de quelques études menées au laboratoire suggèrent d'ailleurs que l'enzyme CYP46A1 et son métabolite seraient impliqués dans la physiopathologie du glaucome, maladie liée à la dégénérescence des cellules ganglionnaires.

Le but de ce projet de thèse est de contribuer à une meilleure compréhension du métabolisme du cholestérol dans les cellules de Müller et son éventuelle régulation par le 24S-OHC. L'objectif était également de mettre en évidence de potentielles altérations du métabolisme du cholestérol au cours du glaucome en caractérisant, à différents points de temps, les acteurs moléculaires impliqués dans sa synthèse, son transport et son élimination.

Nos expériences menées sur des cultures primaires de cellules de Müller indiquent que ces cellules possèdent la machinerie moléculaire pour synthétiser et exporter le cholestérol, et pourraient donc participer activement à son métabolisme dans la rétine. Nous avons également décrit un effet hypocholestérolémiant du 24S-OHC dans les cellules de Müller, ce qui renforce l'hypothèse selon laquelle ce composé pourrait intervenir dans la régulation du métabolisme du cholestérol dans la rétine. Dans un modèle de glaucome expérimental, par hyperpression oculaire chez le rat, nous avons observé des modifications majeures du métabolisme du cholestérol. De manière très précoce, il s'agit d'une surexpression des gènes impliqués dans la synthèse et la captation de cholestérol dans la rétine, puis d'une élévation transitoire des taux de ses précurseurs. Un élément important de notre travail a été de montrer que ces perturbations initiales sont suivies de l'activation de mécanismes de contre-régulation coordonnés, permettant de maintenir l'homéostasie du cholestérol dans la rétine et participant donc sans doute positivement à la survie des cellules ganglionnaires.

Regulation of cholesterol metabolism in the retina under experimental conditions associated with glaucoma

Keywords: Oxysterol, Eye, Degeneration, Cholesterol-24S-Hydroxylase, Gliosis, Neuron-glia communication.

Cholesterol is a lipid found in every animal cell and is necessary for its survival. Among its multiple roles in the body, it is a component of cell membranes that is crucial for the maintenance of their structure, their fluidity and is thus implicated in the modulation of many signalling pathways. Neurons are especially dependant on cholesterol input since the proper composition of their plasma membrane is required for vesicular exocytosis of neurotransmitters and transduction of the post-synaptic signal. It has been shown that both an excess and a lack of cholesterol is neurotoxic. Moreover, many neurodegenerative diseases, such as Alzheimer's or Huntington's disease, have been associated with dysregulation of cholesterol homeostasis, highlighting the need for a fine regulation of its metabolism in nervous tissues. Coordinated actions of neurons and glia, that exhibit complementary functions, are mandatory in that respect. In the brain, astrocytes, the main macroglial cells, may be the major source of cholesterol biosynthesis and export. Neurons, acting as consumers, may be specifically in charge of cholesterol elimination via conversion into 24S-OHC by the CYP46A1 enzyme. This metabolite is likely not only an elimination product of cholesterol but also a signalling molecule in glial cells. It might enable glial cholesterol metabolism to adjust as needed and avoid an overload in brain tissues. In the retina, cholesterol metabolism and its regulation under physiological and pathological conditions remain largely unknown. Müller cells, the major macroglial cells of the retina, could participate in cholesterol synthesis in this tissue even though evidence is still needed. Regarding 24S-OHC, its synthesis is mainly restricted to retinal ganglion cells, neurons

responsible for nervous signal transmission from the retina to the brain. Studies performed in our laboratory suggest that CYP46A1 and its product could be implicated in the physiopathology of glaucoma, a disease characterized by ganglion cell degeneration. The present project aims to provide a better understanding of cholesterol metabolism in Müller cells and its potential regulation by 24S-OHC. The goal is also to unveil changes in cholesterol metabolism during the progression of glaucoma by characterizing, at different time points, the molecular players implicated in its biosynthesis, transport and elimination. Our experiments performed on primary Müller cell cultures indicate that these cells possess the molecular machinery to synthesize and export cholesterol and could therefore actively participate in its metabolism in the retina. We also reported a strong hypocholesterolemic effect of 24S-OHC in Müller cells, reinforcing the hypothesis that this compound could be a regulator of retinal cholesterol metabolism. In an experimental glaucoma model, induced by an elevation in intraocular pressure in rats, we observed major changes in cholesterol metabolism. At the earliest time points, genes implicated in cholesterol biosynthesis and uptake were upregulated in the retina, and cholesterol precursor levels were consecutively and transiently elevated. An important component of our work was to demonstrate that counter-regulatory mechanisms were activated in response to these initial dysregulations, that enabled the maintenance of cholesterol homeostasis in the retina and likely participated in ganglion cell survival

