

UNIVERSITE DE BOURGOGNE

Ecole doctorale E2S Environnement-Santé/STIC

THESE

**Pour obtenir le grade de
DOCTEUR de l'UNIVERSITE DE BOURGOGNE**

Discipline : SCIENCES DE LA VIE

par

Cynthia FOURGEUX

le 19 décembre 2012

**Cholestérol-24S-hydroxylase (CYP46A1)
et homéostasie du cholestérol dans la rétine
en conditions physiologiques et pathologiques**

Directeur de thèse : Lionel BRETILLON

Membres du jury de thèse :

Rapporteurs : Serge PICAUD (DR INSERM, Paris)

Isabelle MUS-VETEAU (CR CNRS, Sophia Antipolis)

Examineurs : Cécile DELCOURT (CR INSERM, Bordeaux)

Alain BRON (PU-PH, Dijon)

Lionel BRETILLON (DR INRA, Dijon)

« Fais ce dont tu as peur, et tu vaincras ta peur »

Sénèque, Lettres à Lucilius

*à Victor et Mathilda, mes enfants chéris,
à Martial, mon mari,
à Frantz, mon frère,
à Purdey et Sandie, mes deux sœurs,
à ma mère et à tous mes proches,*

à mes fidèles amis, toujours là,

à Marie-Christine que je n'ai jamais oubliée,

Remerciements

Cette thèse s'est déroulée dans l'Unité CSGA (Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation), au sein de l'équipe 6 « Oeil, Nutrition et Signalisation cellulaire », à l'Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), 17 rue Sully, 21000 DIJON.

Je remercie Thierry RIGAUD, président de l'Ecole Doctorale E2S (Environnement et Santé/STIC) d'avoir donné un avis favorable pour mon inscription en doctorat de l'Université de Bourgogne.

Je tiens à remercier sincèrement tous les membres de mon jury de thèse, Mme Isabelle MUS-VETEAU et Monsieur Serge PICAUD, rapporteurs, ainsi que Mme Cécile DELOURT et Monsieur Alain BRON, examinateurs, qui ont accepté de m'honorer de leur présence et de juger mon travail.

Mme Elisabeth GUICHARD, ancienne directrice de l'Unité FLAVIC et Monsieur Luc PENICAUD, directeur actuel de l'Unité CSGA, je vous remercie de m'avoir accordé la réalisation de cette thèse au sein de l'Unité.

Merci à Alain BRON et Catherine CREUZOT-GARCHER pour les échanges constructifs que nous avons eus et pour votre intérêt dans mon travail de thèse et la relecture de mes articles avant soumission.

A toute l'équipe 6, je n'aurai pas assez de mots pour vous montrer combien j'ai été ravie de collaborer avec vous tout au long de ce travail de thèse, d'apprendre, d'évoluer et d'avancer parmi vous ! Et ce n'est pas fini !

Un petit mot pour chacun d'entre vous, parce que j'y tiens....et pis parce que j'apprécie cette équipe et sa thématique « œil » :

Je remercie Lionel BRETILLON, directeur de l'équipe « Oeil, Nutrition et Signalisation cellulaire », en l'occurrence mon directeur de thèse, d'avoir accédé favorablement à ma requête de me lancer dans un doctorat. Merci, Lionel pour ta confiance, pour ta patience (parce qu'il t'en a fallu !), pour tes petits coups de pression (quand il fallait que ça avance !) et pour ton soutien inconditionnel (les nombreuses fois où je disais que je n'y arriverai pas...). Oui, en plus, on n'a pas été d'accord en tout et sur tout (ah...tes reformulations !) mais tout cela m'aura été très instructif. Merci, Chef !

Lucy, ouh là là là, que te dire...?! Merci pour ta bienveillance, ta grande capacité d'écoute, nos très longues discussions, ton soutien moral, ton amitié...Sans toi, je n'aurai pas vaincu mes insomnies par l'acupuncture (pourvu que ça dure !)...et puis, bien sûr, merci Lucy, pour ton aide technique et précieuse pour les analyses de 24S-OH et de cholestérol.

Bénédicte, merci à toi, pour ton coup de main en Bio Mol, et pis, parce que t'es ma co-loc' de bureau et que t'es toute gentille et toute discrète ! Et que j'admire ta passion pour les chevaux...

Laurent, Ah, ces petites Müller ! Quelles cellules passionnantes et... gourmandes ! Heureusement que tu m'as aidée pour les repiquages, parce qu'en G4, qu'est-ce qu'il y en avait beaucoup, des flasks ! Merci à toi.

Niyazi, une citation, parce qu'elle est bien accordée à notre thématique, mais devine d'abord de qui elle est : « *Y a-t-il, au fond de ses yeux, sur la rétine, un miroir, un petit coin que la tendresse ne voile pas, et où je ne me reflète pas en beau?* »...Ouais, c'est joliment écrit, ça ! Hé, c'est juste parce que c'est un écrivain sarcastique qu'on connaît bien qui l'a écrite, et que nous, on a été à bonne école, au lycée Jules Renard à Nevers ! Merci Niyazi de m'avoir initiée aux ERG !

Olivier, Stéphanie, Elodie et Stéphane, merci pour votre bonne humeur, votre soutien, votre entrain (surtout Oli, pour ce qui est du sport et de ta façon d'articuler !) et pour tous ces fous-rires (n'est-ce pas, Stef !)

Merci à toi aussi Marie-Annick, même si...ah là là, qu'est-ce qu'on en a du mal à se comprendre !

Un grand merci à toute l'équipe des animaliers de l'INRA pour leur disponibilité, leur coup de main et puis parce qu'ils prennent bien soin de nos petits rongeurs !

Emilie, p'tite Mimi, déjà Docteure ! Merci, petite « Mme Irma des cœurs », pour ces nombreux fous-rires, pour ton pep's et ton sourire légendaires et pour tes blagounettes que tu me répètes à chaque fois !...Et vous aussi, les doctorantes, petite Princesse Sarah et très grande Magalie, notre ambassadrice de charme, je vous dis merci et bon courage pour la suite de votre thèse qu'elle vous apporte tout plein de bonnes choses (comme à moi !)...Bon allez, les filles, quand est ce qu'on va courir ? Allez, go, go, go...! Merci à toutes les trois pour votre bonne humeur, vos conseils beauté (chut !), nos rigolades, et...à quand le shopping ?

Et toi aussi Narjès, je te remercie pour ta gentillesse, reviens donc me faire un thé à la menthe bien de chez toi, et cette fois avec des pignons de pin, stp ..!

Un petit mot aux derniers arrivés, Rodolphe et Ségolène, peut-être aurons-nous l'occasion, en tout cas je l'espère, de collaborer ensemble... « Blot, blot Western, baby ! ».

Et pis parce que les pauses-café sans Nespresso n'auraient pas la même saveur si Georges n'y mettait pas son grain de sel, eh ben j'te dis merci, Nico ! (sans vouloir vexer les adeptes du café basique !).

A tous ceux de l'équipe 6, oui, j'avoue, avec les *Yeux Revolver* (et pas grave si ça n'a rien à y voir !) que y a bien des fois où je voudrais bien que vous y mettiez tous du vôtre, chacun à tour de rôle, pour me répéter tout c'qui s'dit en pause-café, aux déjeuners, aux réunions...Eh oui, oui, pour ne plus avoir à vous demander : « Quel est le sujet de la conversation ? », mais oui, j'vous l'dit tout l'temps avec les yeux, quand je vous fixe, c'est en espérant ne pas retourner, bredouille, dans mes pensées ! Allez, un petit voire gros *clin d'œil* à tousssss...

Et puis aussi, un petit mot à mon mari qui, bien que déboussolé, m'a bien aidé à la maison ces derniers temps pour la rude tâche de la gestion du quotidien, alors Merci !...Et puis, regarde, Martial, nos enfants sont géniaux, on ne peut qu'en être fiers ! Et à vous aussi, Victor et Mathilda, mes petits z'amours, Maman vous aime et tâchera d'être plus disponible pour que...triviales soient nos poursuites !...et pour que...longues soient nos balades à vélo, ma petite Mathilda !...et pour que...Géant soit ton Légorland, Victor ! (pourvu qu'on puisse circuler dans ta chambre !).

Résumé

Le cholestérol est le principal stérol présent dans la rétine. Dans sa forme libre, le cholestérol est distribué dans toutes les couches cellulaires de la rétine, alors que le cholestérol estérifié s'accumule essentiellement à la base de l'épithélium pigmentaire rétinien. La capacité intrinsèque de la rétine à synthétiser le cholestérol paraît limitée, ce qui implique nécessairement que des voies extra-rétiniennes participent activement à suppléer la rétine en cholestérol. Les cellules gliales de Müller contribueraient à l'apport de cholestérol aux neurones de la rétine, en particulier pour la formation des synapses. Les conséquences délétères d'une accumulation ou à l'inverse d'un déficit en cholestérol dans les neurones sur leur survie souligne l'importance de maintenir l'équilibre entre l'apport et la néosynthèse du cholestérol d'une part et son élimination d'autre part. Pour cela, la rétine neurale a en particulier la capacité de convertir, pour l'éliminer, le cholestérol en 24S-hydroxycholestérol. En effet, le transport du 24S-hydroxycholestérol au travers des membranes est facilité par la présence d'un groupe hydroxyle supplémentaire, lui conférant une polarité plus importante par rapport au cholestérol. L'enzyme qui catalyse cette réaction est la cholestérol-24S-hydroxylase (CYP46A1). Des liens ont été établis entre CYP46A1, 24S-hydroxycholestérol et processus neurodégénératifs dans le cerveau, suggérant un rôle potentiel dans certaines pathologies comme la maladie d'Alzheimer. CYP46A1 est exprimée dans la rétine neurale, et plus particulièrement dans les cellules ganglionnaires de la rétine. Le rôle de CYP46A1 dans la rétine reste pour l'instant inconnu. Cependant, par analogie avec le cerveau, nous pouvons supposer une fonction dans le contrôle de l'homéostasie du cholestérol dans les neurones et envisager une association avec des pathologies dégénératives de la rétine comme la Dégénérescence Maculaire Liée à l'Âge (DMLA) ou le glaucome. Dans ce contexte, l'objectif de nos travaux a consisté à évaluer le rôle de la cholestérol-24S-hydroxylase dans la rétine en conditions physiologiques et pathologiques.

Par une approche clinique, nous avons trouvé qu'un polymorphisme génétique dans CYP46A1 était un facteur de risque de glaucome (Risque relatif=1,26, intervalle de confiance à 95%=1,006-1,574, $p<0,05$) (Fourgeux *et al.* 2009, *Invest Ophthalmol Vis Sci* 50:5712-7). Par contre, ce polymorphisme génétique n'a pas été retrouvé, en tant que tel, comme facteur de risque chez des patients DMLA, mais pourrait l'être chez les patients non porteurs d'allèles à risque dans les gènes CFH et LOC387715 (Fourgeux *et al.* 2012, *Invest Ophthalmol Vis Sci*

53:7026-33). Deux approches expérimentales nous ont permis de suggérer qu'il existe un lien entre le stress des cellules de la rétine et le 24S-hydroxycholestérol. En effet, dans une étude *in vivo* faite chez le rat, après avoir reproduit une caractéristique principale du glaucome par l'augmentation de la pression intraoculaire, nous avons suggéré le rôle crucial de la glie dans le maintien de l'expression de CYP46A1 au cours de la neurodégénérescence de la rétine (Fourgeux *et al.* 2012, *Acta Ophthalmol*, Sep 23 ; doi: 10.1111/j.1755-3768.2012.02490.x.). Enfin, l'inhibition pharmacologique de l'activité CYP46A1 dans la rétine par le voriconazole injecté *in vivo* chez le rat nous a permis de mettre en évidence que la diminution du contenu en 24S-hydroxycholestérol de la rétine était associée à une dysfonction des cellules ganglionnaires, évaluée par électrorétinographie. En parallèle, nous avons observé une activation gliale, dont l'amplitude était amplifiée par l'inhibition de l'activation microgliale induite par la minocycline.

En conclusion, par une double approche à la fois clinique et expérimentale, nos travaux suggèrent le rôle important de CYP46A1 dans le maintien de l'homéostasie du cholestérol dans la rétine en conditions physiologiques et en conditions pathologiques. L'intervention des cellules gliales de Müller dans ce rôle peut être évoquée, en particulier en condition pathologique comme au cours du glaucome.

Mots-clés: rétine, pathologie, cholestérol, glaucome, dégénérescence maculaire liée à l'âge, neurone, glie, métabolisme, cholestérol-24S-hydroxylase, CYP46A1, 24S-hydroxycholestérol, polymorphisme génétique.

Abstract

Cholesterol is the major sterol found in the retina. In its free form, cholesterol is present in all cell layers of the retina, whereas cholesteryl esters mainly accumulate at the basement of the retinal pigment epithelium. The intrinsic capacity of the retina to synthesize cholesterol appears limited. Some extra-retinal pathways actively participate to cholesterol uptake to the retina. Müller glial cells may contribute to cholesterol supply to retinal neurons, especially for synaptic formation. Cholesterol accumulation or conversely deficiency has deleterious consequences on neuron survival. Maintaining the equilibrium between cholesterol supply and neosynthesis in the one hand and cholesterol elimination in the other hand is crucial. For that purpose, the inner retina converts cholesterol into 24S-hydroxycholesterol. The transport of 24S-hydroxycholesterol across membranes is facilitated by the addition of the hydroxyl group to cholesterol at position 24 of carbon chain since it renders cholesterol more hydrophilic. CYP46A1 (cholesterol 24S-hydroxylase) is the enzyme which catalyzes this reaction. Some links between CYP46A1, 24S-hydroxycholesterol and neurodegenerative processes have been reported in the brain, suggesting a potential role in several pathologies such as Alzheimer's disease. CYP46A1 is expressed in the neural retina and specifically in retinal ganglion cells. The contribution of CYP46A1 in the retina remains unknown. Moreover by analogy with the brain, we can suggest a function for CYP46A1 in the regulation of cholesterol homeostasis in retinal neurons. Possible associations between CYP46A1 and Age-related Macular Degeneration (AMD) and glaucoma were suspected. In this context, we aimed to evaluate the role of CYP46A1 in the retina in physiological and pathological conditions.

Through a clinical approach, we found that a genetic polymorphism in CYP46A1 was a risk factor for glaucoma (Odd Ratio = 1.26; 95% CI=1.006-1.574, $p<0.05$) (Fourgeux et al. 2009, *Invest Ophthalmol Vis Sci* 50:5712-7). By contrast, this genetic polymorphism was not found as a risk factor in AMD patients, but may become an additional risk factor in patients who do not carry risk allele in CFH and LOC387715 genes (Fourgeux et al. 2012, *Invest Ophthalmol Vis Sci* 53:7026-33). Two experimental approaches suggested that a link between retinal stress and 24S-hydroxycholesterol does exist. Indeed, in a rat model of glaucoma of elevated intraocular pressure, we suggested the crucial role of CYP46A1 in maintaining CYP46A1 expression in the course of retinal neurodegeneration (Fourgeux et al. 2012, *Acta*

Ophthalmol, Sep 23; doi: 10.1111/j.1755-3768.2012.02490.x.). Pharmacological inhibition of CYP46A1 activity in the retina by voriconazole administered *in vivo* in the rat highlighted that the decrease in retinal 24S-hydroxycholesterol levels was associated with RGC dysfunction evaluated by electroretinography. In parallel, we observed glial activation in which magnitude was exacerbated when microglia activation was inhibited by minocycline at the same time.

In conclusion, by a dual clinical and experimental approach, our works suggest a crucial role for CYP46A1 in maintaining cholesterol homeostasis in the retina in physiological and pathological conditions. Müller glial cell intervention in this process may be suspected especially in pathological conditions of glaucoma.

Key- words: retina, pathology, cholesterol, glaucoma, age-related macular degeneration, neuron, glia, metabolism, cholesterol-24S-hydroxylase, CYP46A1, 24S-hydroxycholesterol, gene polymorphism.

Table des matières

Abréviations	13
Liste des tableaux	16
Liste des figures	17
Introduction.....	19
Contexte bibliographique.....	23
I. Structure de l'œil humain et de la rétine	24
A. Aspects structuraux	24
B. Les cellules du feuillet externe de la rétine.....	26
C. Les cellules du feuillet interne de la rétine neurale	27
i. Les différentes couches	27
ii. Les cellules gliales de Müller de la rétine	29
iii. Modulation de l'activité neurale rétinienne par les cellules de Müller-Interactions physiologiques entre neurones et CGM.....	31
iv. Les photorécepteurs.....	34
v. La réception du signal lumineux est assurée par les pigments visuels.....	36
vi. Les circuits neuronaux.....	38
vii. Explorations de la rétine neurale.....	41
Le principe de l'ERG flash.....	42
II. Le vieillissement de la rétine et ses pathologies.....	44
A. Vieillissement et DMLA.....	44
1. Epidémiologie de la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA).....	44
2. Signes cliniques de la DMLA	45
1. Facteurs de risque de DMLA	48
B. Glaucome et gliose	51
1. Epidémiologie des glaucomes.....	51
2. Facteurs de risque des glaucomes	53
3. Signes cliniques des glaucomes	54
4. La gliose des cellules de Müller.....	58
i. Définitions et origine de la glie.....	58
ii. La gliose réactive des cellules de Müller.....	58
ii.a. Effets protecteurs de la gliose des cellules de Müller	59
ii.b. Effets délétères de la gliose des cellules de Müller	60
ii.c. Le gonflement osmotique des CGM	63
5. Glaucome et gliose	66
6. Glaucome, gliose, stress oxydatif et inflammation	67

III.	Cholestérol, oxystérols et enzymes à cytochrome P450	70
A.	Métabolisme du cholestérol.....	70
1.	Fonctions et métabolisme général du cholestérol	70
2.	Synthèse et régulation du cholestérol chez l'homme	71
i.	Synthèse, absorption du cholestérol et régulation de la prise alimentaire.....	71
ii.	Régulation endogène du cholestérol cellulaire par les protéines liant les éléments régulateurs des stérols (SREBPs)	75
3.	Transport du cholestérol par les lipoprotéines	79
i.	Les différentes voies métaboliques empruntées par les lipoprotéines	79
ii.	Transport du cholestérol dans la circulation sanguine par les lipoprotéines	80
iii.	Les protéines de transfert du cholestérol	83
iv.	Les récepteurs membranaires aux lipoprotéines	84
v.	Les apolipoprotéines.....	86
vi.	Les enzymes du métabolisme des lipoprotéines	89
B.	Les oxystérols et les CYPs P450	93
1.	Définition, structure et origine des principaux oxystérols.....	93
i.	Origine exogène des oxystérols circulants	93
ii.	Origine endogène des oxystérols circulants.....	95
2.	La voie de synthèse enzymatique des oxystérols.....	98
i.	Origine et rôle des enzymes à cytochrome P450	98
ii.	Cycle catalytique et réactions catalysées par les enzymes à cytochrome P450 (CYPs)	99
iii.	Fonctions métaboliques des cytochromes P450.....	102
iii.a.	Oxystérols et CYPs P450 : les voies d'élimination du cholestérol en excès.....	105
iii.b.	La cholestérol 24S-hydroxylase ou CYP46A1.....	107
3.	Les oxystérols dans l'inflammation et l'immunité.....	109
i.	Cytotoxicité des oxystérols	109
ii.	Les oxystérols, modulateurs immuns dans les processus inflammatoires.....	110
4.	Les récepteurs nucléaires aux oxystérols.....	111
i.	Récepteurs cellulaires au foie (LXR)	111
ii.	Autres récepteurs aux oxystérols	114
5.	Oxystérols et pathologies (autres que SNC).....	114
IV.	Cholestérol et système nerveux central.....	116
1.	Les différentes fonctions du cholestérol cérébral.....	116
2.	Les interactions neurones-astrocytes dans le maintien de l'homéostasie du cholestérol.....	120
3.	CYP46A1, une enzyme-clé de l'homéostasie cérébrale et rétinienne du cholestérol..	123
4.	Métabolisme du cholestérol dans la rétine.....	128
5.	Implication des oxystérols dans les pathologies du SNC et les rétinopathies	131
i.	Le 24S-OH et la maladie d'Alzheimer	131
ii.	Oxystérols et rétinopathies.....	132
	Objectifs de la thèse.....	133
	Résultats.....	135

A.	Association entre polymorphisme génétique dans CYP46A1 et glaucome.....	136
B.	Association entre polymorphisme CYP46A1 et DMLA	146
C.	Conséquences d'un stress rétinien associé au glaucome sur l'expression de CYP46A1 et les teneurs en 24S-hydroxycholestérol dans la rétine.....	159
D.	Conséquences de l'inhibition de CYP46A1 sur la fonction et l'homéostasie du cholestérol dans la rétine	174
	Discussion générale et perspectives	205
	Bibliographie.....	210
	Annexes	234
	Productions	240

Abréviations

7-KC : 7céto-cholestérol
7 α -OH : 7 α -hydroxycholestérol
7 β -OH : 7 β -hydroxycholestérol
7 α ,27-OH : 7 α , 27hydroxycholestérol
24S-OH : 24S-hydroxycholestérol
25-OH : 25-hydroxycholestérol
27-OH : 27-hydroxycholestérol
 α -2M : macroglobuline alpha-2
ABCA1: transporteurs de l'ATP (ATP-*binding* cassette) de type A1
ABCG1, 5, 8 : transporteurs de l'ATP (ATP-*binding* cassette) de type G1, G5, G8
ACAT 1/2 : Acyl-CoA transférase, isoformes 1 et 2
AMPA : agoniste du récepteur ionotrope au glutamate
AMPc : adénosine monophosphate cyclique (c)
AMPk : adénosine monophosphate kinase (k)
ApoA1 : apolipoprotéine A1
ApoB : apolipoprotéine B
ApoCI, ApoCII, Apo CIII : apolipoprotéines CI, CII, CIII
ApoE : apolipoprotéine E
APP : protéine précurseur d'amyloïde β
AQP4 : aquaporine 4, protéine membranaire intégrale
ATP, ATPase : adénosine triphosphate, adénosine triphosphatase
A β : plaques d'amyloïde β
BDNF : facteur neurotrophique dérivé du cerveau
BHE : barrière hémato-encéphalique
BHR : barrière hémato-rétinienne
BrM : membrane de Bruch
CA : acide cholique
CD36 : récepteur membranaire à la thrombospondine de type « scavenger »
CDCA : acide chénodéoxycholique
CE : esters de cholestérol
CETP : protéine de transfert du cholestérol estérifié
CFH : facteur H du complément
CGM : cellules gliales de Müller
CGR : cellules ganglionnaires de la rétine
CMH classe II : complexe majeur d'histocompatibilité de classe II
CNE : couche nucléaire externe
CNI : couche nucléaire interne
CPE : couche plexiforme externe
CPI : couche plexiforme interne
CRALBP : protéine se liant aux rétinaldéhydes
CYP P450 : cytochrome P450
DCA : acide déoxycholique
DHA : acide docosohéxaénoïque
DMLA : dégénérescence maculaire liée à l'âge
EAAT2 (ou GLT1 ou Slc2) : transporteur glial d'acides aminés excitateurs
EAAT5 (ou Slc1a7) : transporteur neuronal d'acides aminés excitateurs (rétine)

EPR : épithélium pigmentaire rétinien
 ERG : électrorétinogramme
 ERK1/2 : kinases régulant le signal extracellulaire, type 1 ou 2
 ERO : espèces réactives de l'oxygène
 GABA : acide γ -aminobutyrique
 GFAP : protéine gliale fibrillaire
 GLAST (ou EAAT1) : transporteur glial du glutamate et de l'aspartate
 GS : glutamine synthétase
 H_2O_2 : peroxyde d'oxygène
 HDL : lipoprotéines de haute densité
 HMGCoA : 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-CoA
 HMGCR : 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-CoA réductase
 $\text{HO}^\cdot$: radical hydroxyle
 HTRA1 : HtrA sérine protéase 1
 ICAM-1 : molécule d'adhésion intracellulaire, type 1
 IDL : lipoprotéines de densité intermédiaire
 IL-1 β : interleukine-1 β
 IL-6 : interleukine-6
 iNOs : oxyde nitrique synthétase
 INSIG : protéine induite par le gène de l'insuline
 JAK/STAT1 (*janus activated kinase/ signal transducer and activator of transcription*)
 JNK : protéine janus kinase
 Kir4.1 : canaux potassium (cellules gliales)
 LCAT : lécithine-cholestérol-acyl-transférase
 LCS : liquide céphalo-rachidien
 LDL : lipoprotéines de faible densité,
 LDL-R : récepteur aux lipoprotéines de faible densité
 LH : lipase hépatique
 LOC 387715 protéine de susceptibilité à la DMLA (aussi appelée ARMS2)
 Lp(a) : LDL avec une Apo(a) liée de manière covalente à l'ApoB sur la LDL (appartenant à la sous-classe des lipoprotéines).
 LPL : lipase lipoprotéique
 LRP-1 : protéine apparentée au LDL-R, aussi appelée récepteur à α -2-macroglobulin (α 2M-R), ou récepteur à l'Apo E (ApoE-R)
 LXR- α , LXR- β : récepteur cellulaire au foie (Liver X receptor), isoformes α ou β
 MA : maladie d'Alzheimer
 MAPK : voie de signalisation des protéines kinases activées par les mitogènes
 MCP-1 : protéine chimio-attractrice des monocytes
 NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
 NF- κ B : facteur nucléaire (de transcription) kappa-B
 NMDA : agoniste du récepteur ionotrope N-méthyl-D-aspartate
 NO : oxyde nitrique
 NPC1, NPC2 : protéine Niemann-Pick type C1 ou 2
 $\text{O}_2^{\cdot-}$: ion superoxyde
 O_3 : ozone
 OATP2 : polypeptide transportant un anion organique, isoforme 2.
 ONOO $^-$: anion peroxydinitrite
 Ox-LDL : LDL oxydées

p(75)NTR : récepteur aux neurotrophines
 P2Y₁ : récepteur purinergique couplé à la protéine-G
 PI3K/AKT : voie de signalisation phosphatidylinositol-3 kinase / protéine kinase B
 PIO : pression intra-oculaire
 PKA : protéine kinase A
 PPAR- α , PPAR- β : récepteur aux peroxyssomes, isoformes α ou β)
 Ptc : récepteur membranaire Patched
 RE : réticulum endoplasmique
 S-100 : protéine à motif double hélice « EF-Hand », marquant les neutrophiles
 SCAP : protéine de clivage de SREBP
 SERPING1 : inhibiteur facteur C1 du complément
 SHH : facteur morphogénique Sonic Hedgehog
 SLOs : Syndrome de Smith-Lemli-Opitz
 Smo : récepteur membranaire Smoothened
 SNC : système nerveux central
 SNP : polymorphisme nucléotidique
 SR-BI : récepteur aux HDL de type 'scavenger' de classe B (aussi appelé SCARB1)
 SR-BII : isoforme de SR-BI
 SRE : éléments régulateurs des stérols
 SREBP 1a, 1c, 2 : protéines liant les éléments régulateurs des stérols, isoformes 1a, 1c, 2
 TGF- β : facteur de croissance des tumeurs, isoforme β
 TNFAIP3 : TNF- α induit par la protéine 3, aussi appelé protéine à doigt zinc A20
 TNF- α : facteur de nécrose des tumeurs, isoforme α
 TrkA : agonsite du récepteur à tyrosine kinase
 VEGF : facteur de croissance endothélial vasculaire
 VLDL : lipoprotéines de très faible densité

Liste des tableaux

Tableau 1 : <i>Fonctions physiologiques des cellules de Müller. D'après [26, 31].</i>	31
Tableau 2 : <i>Caractéristiques des CGM au cours de diverses pathologies. D'après [26, 31].</i> ...	63
Tableaux 3 (A) et (B) : <i>Principales classes de lipoprotéines plasmatiques.</i>	81
Tableau 4 : <i>Identité, expression tissulaire, distribution plasmatique et fonction des principales apolipoprotéines humaines.</i>	88
Tableau 5 : <i>Principales enzymes du métabolisme des lipoprotéines.</i>	89
Tableau 6 : <i>Nomenclature de certains oxystérols. D'après [195].</i>	95
Tableau 7 : <i>Enzymes impliquées dans la synthèse d'oxystérols. 24S-OH: 24S-hydroxycholestérol; 25-OH: 25-hydroxycholestérol; 27-OH: 27-hydroxycholestérol; 7α-OH: 7α-hydroxycholestérol; 4β-OH: 4β-hydroxycholestérol; 7β-OH: 4β-hydroxycholestérol.</i>	102
Tableau 8 : <i>Fonctions métaboliques des cytochromes P450.</i>	103

Liste des figures

Figure 1 : Structure chimique de la molécule de cholestérol.....	21
Figure 2 : Structure de l'œil humain et de la rétine.	26
Figure 3 : Structure et organisation des différentes couches de la rétine pigmentaire et neurale. D'après [27].....	28
Figure 4 : Représentation de l'intégration de la cellule gliale autour des neurones. A: cellule amacrine; H: cellule horizontale; G: cellule ganglionnaire; B: cellule bipolaire; M: cellule de Müller ; b: bâtonnets ; c: cônes. D'après [30].	30
Figure 5 : Interactions physiologiques entre cellules de Müller et neurones dans la rétine saine. (A): Clairance spatiale des ions K^+ et de l'eau. (B) Recyclage des médiateurs. (C) Symbiose métabolique. (D) Piégeage des radicaux libres / métabolisme GSH. CA: anhydrase carbonique; cyst: cystéine; GABA: acide gamma-aminobutyrique; glut: glutamate; GS: glutamine synthétase; GSH, glutathion; LDH: lactate déshydrogénase; PK: pyruvate kinase;	33
Figure 6 : Photo d'une cellule de Müller (d'après [66]) suivie de son schéma fonctionnel. EF (Endfoot) : pied. D'après [67].	34
Figure 7 : Représentation schématique des cellules photoréceptrices à cônes et à bâtonnets. D'après www.lecerveaumcgill.ca	35
Figure 8 : Interactions photons lumineux et photorécepteurs. Le cycle rétinien dans l'EPR.	37
Figure 9 : Vision trichromatique des couleurs.....	37
Figure 10 : La phototransduction des photorécepteurs.....	38
Figure 11 : La transduction du signal depuis les photorécepteurs jusqu'aux cellules ganglionnaires de la rétine. D'après : www.lecerveaumcgill.ca	39
Figure 12 : Organisation centre-périphérie des champs récepteurs des neurones de la rétine. D'après : www.lecerveaumcgill.ca	40
Figure 13 : Tracé typique d'un électro-rétinogramme obtenu chez un animal de laboratoire. a, onde a ; b, onde b ; PO, potentiels oscillatoires.	43
Figure 14 : Vision évolutive d'un patient ayant une DMLA.	46
Figure 15 : Images en fond d'œil et grilles d'Amsler correspondantes représentant les deux formes avancées de la DMLA : a) rétine saine et grille d'Amsler normale; b) forme sèche ou atrophique avec drusens séreux et anomalies pigmentaires et scotome central et grille d'Amsler présentant un « trou » central; c) forme humide ou exsudative avec scotome central et métamorphopsies et grille d'Amsler présentant une déformation centrale et périphérique. Source des images en fond d'œil : Service d'ophtalmologie, CHU de Dijon.	47
Figure 16 : Vision d'un patient atteint de glaucome (à gauche). Le champ visuel est réduit. Image en fond d'œil d'un patient atteint de glaucome (à droite).....	56
Figure 17 : Représentation graphique de la perte axonale et ganglionnaire en fonction de l'âge. D'après [112] et [113].....	57
Figure 18 : le modèle classique du processus excitotoxique dû à l'excès de glutamate. D'après [129].....	62
Figure 19 : Gonflement osmotique des cellules de Müller dans la rétine saine et pathologique. D'après [132, 133].....	65
Figure 20 : Mécanismes conduisant à la mort des cellules ganglionnaires après élévation de la PIO. BDNF : facteur neurotrophique dérivé du cerveau. NMDA : récepteur ionotrope N-méthyl-D-aspartate. D'après [138].	67

Figure 21 : Origines exogène et endogène du cholestérol.....	71
Figure 22 : La synthèse du cholestérol par la voie de l'hydroxy-méthyl-coenzyme A réductase.	72
Figure 23 : Vue d'ensemble du métabolisme du cholestérol.....	73
Figure 24 : Formation d'esters de cholestérol.....	75
Figure 25 : Mécanismes d'action et conséquences du clivage du complexe SREBP/SCAP/INSIG.	76
Figure 26 : Régulation de l'HMGCR par les voies de signalisation AMPk et AMPc.....	77
Figure 27 : Mécanismes d'action de la protéine INSIG. D'après [176].....	78
Figure 28 : Structure d'une lipoprotéine.	87
Figure 29 : Schéma de la voie métabolique du transport des lipides alimentaires dans le plasma : voie des chylomicrons.	90
Figure 30 : Schéma de la voie métabolique du transport endogène des lipides : voie des lipoprotéines contenant de l'ApoB100 (VLDL, IDL et LDL) dans le plasma.	90
Figure 31 : Schéma de la voie métabolique du transport inverse du cholestérol : voie des HDL.	91
Figure 32 : Schéma général du transport des lipoprotéines dans le sang et les tissus.	92
Figure 33 : Représentation schématique de l'origine des oxystérols circulants.	94
Figure 34 : Rôles des oxystérols dans la régulation des voies du métabolisme lipidique.....	96
Figure 35 : Structure et origine de quelques oxystérols. Les oxystérols dérivés de la voie enzymatique sont indiqués en vert, les produits de l'auto-oxydation du cholestérol sont indiqués en rouge, et les espèces dérivées d'un aiguillage de la biosynthèse du cholestérol sont indiqués en bleu. Nb : le 25-hydroxycholestérol (ici en vert) est produit à la fois par voie enzymatique et par auto-oxydation du cholestérol. D'après [198].	97
Figure 36 : Cycle catalytique du cytochrome P450.	100
Figure 37 : Représentation du complexe monooxygénasique dans la membrane du RE.	101
Figure 38 : Représentation schématique des deux voies de la biosynthèse des acides biliaires.	106
Figure 39 : Régulation de l'efflux de cholestérol dans les macrophages.	113
Figure 40 : Représentation schématique résumant les fonctions majeures des oxystérols. D'après [198].	115
Figure 41 : Homéostasie du cholestérol dans le cerveau et le reste du corps. La BHE empêche le transfert des lipoprotéines au SNC. En bleu : sources de cholestérol, en rouge : voies d'élimination du cholestérol en excès, en noir : voie de transfert intercellulaire des lipoprotéines. D'après [227].	117
Figure 42 : (A) et (B): La voie de signalisation SHH. D'après [304].....	119
Figure 43 : Représentation schématique du transfert de cholestérol entre astrocytes et neurones. Chol : cholestérol ; HDL : lipoprotéine de haute densité ; LDL : lipoprotéine de faible densité ; PL : phospholipides. D'après [320].	122
Figure 44 : Interactions neurones-astrocytes. D'après [322] avec modifications.	123
Figure 45 : Conversion enzymatique du cholestérol en 24S-hydroxycholestérol.	124
Figure 46 : Modélisation du passage du 24S-OH à travers une membrane. D'après [289]. .	125
Figure 47 : Interactions du 24S-OH à travers la BHE. D'après [222].	125
Figure 48 : Quantité de cholestérol cérébral produite et éliminée sous forme de 24S-OH chez la souris sauvage et knockout pour CYP46A. D'après [288, 327].	127
Figure 49: Schéma hypothétique de la prise en charge et du transport intra-rétinien du cholestérol et des lipides par la rétine des vertébrés. D'après [352].	130

Introduction

La rétine neurale est une structure riche en lipides et constitue un élément à part du système nerveux central (SNC). La couche de l'épithélium pigmentaire rétinien (EPR), par sa richesse en jonctions étroites entre les cellules qui la composent, crée la barrière hémato-rétinienne à la base de la rétine neurale. A cette barrière physique s'ajoute une barrière métabolique qui limite l'entrée de molécules exogènes, l'export de molécules endogènes et les mouvements intercellulaires. La rétine neurale est constituée de 25% de lipides dont 90% de phospholipides et 10% de cholestérol [1].

Le cholestérol (**Figure 1**) est le principal stérol présent dans la rétine [2]. Il y est retrouvé sous deux formes : libre ou associé à un acide gras donnant lieu alors à du cholestérol dit estérifié ou ester de cholestérol. La forme libre est exclusivement présente dans la rétine neurale [1] et est distribuée dans toutes les couches cellulaires de la rétine [3]. Les teneurs en cholestérol dans la rétine augmentent significativement avec l'âge après 20 ans, et ce principalement en région maculaire au niveau de la lame basale de l'EPR et de la membrane de Bruch. Ces dépôts de cholestérol libre et d'esters de cholestérol (CE) sont des conséquences, chez l'homme, du vieillissement et s'amplifient au cours de la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) [4, 5]. La capacité intrinsèque de la rétine à synthétiser le cholestérol *in situ* est faible, ce qui implique nécessairement que des voies extra-rétiniennes participent activement à suppléer la rétine en cholestérol [6]. Les données relatives à la capacité de la rétine à synthétiser le cholestérol ont été rapportées par Fliesler *et al.* d'après des marquages radioactifs des précurseurs du cholestérol [7-9]. Cette technique avait été mise en évidence, dès 1953, par Gould *et al.* [10] pour mesurer la diminution de l'incorporation de [^{14}C]acétate en [^{14}C]cholestérol lors de la synthèse hépatique de cholestérol chez le chien nourri avec un régime riche en cholestérol.

La contribution relative du cholestérol provenant de la circulation d'une part et de la biosynthèse locale d'autre part reste néanmoins inconnue [11]. La part de cholestérol synthétisé localement par la rétine est fournie par les cellules de l'EPR, les cellules de Müller et les bâtonnets. Les lipoprotéines de haute densité (HDL) et de faible densité (LDL) sont les transporteurs circulants du cholestérol libre et estérifié.

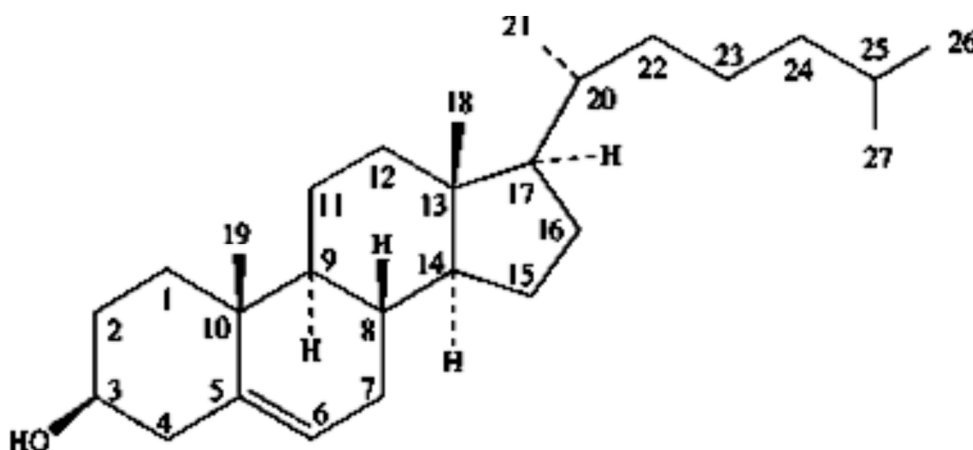


Figure 1 : *Structure chimique de la molécule de cholestérol.*

Le cholestérol exogène à la rétine lui est apporté principalement par les LDL. L'apport en cholestérol pour la rétine neurale nécessite la reconnaissance des particules de LDL par l'EPR par le biais de récepteurs aux lipoprotéines et récepteurs dits « *scavenger* » qui contribuent alors à l'entrée du cholestérol dans la rétine neurale [6, 12]. Plus précisément, l'hypothèse la mieux admise suggère que l'interaction entre l'apolipoprotéine B100 (ApoB100) présente sur les LDL et le récepteur aux LDL localisé sur le pôle basal de l'EPR permet le transfert du contenu des LDL, dont le cholestérol, vers l'EPR [6]. D'autres voies comme celle impliquant le CD36 pour l'internalisation des lipides circulants sont avancées [6]. Un remodelage des lipoprotéines au niveau de l'EPR serait un préalable au transfert du cholestérol vers la rétine [5, 13].

Compte-tenu que l'HMGcoA réductase (HMGCR) est l'enzyme limitante de la voie de biosynthèse du cholestérol [6], l'analyse de l'expression de l'HMGCR permet de renseigner sur la nature des cellules qui sont capables de synthétiser le cholestérol. Ainsi, il a été montré que les cellules gliales de Müller expriment l'HMGCR. Les cellules gliales sont connues pour leur contribution dans la formation et le maintien des synapses neuronales [14] pour lesquelles le rôle du cholestérol est crucial [15]. Ceci suggère que les cellules gliales de Müller contribueraient également à l'apport de cholestérol aux neurones de la rétine.

Le maintien de l'équilibre entre l'apport/néosynthèse d'une part et l'élimination du cholestérol d'autre part semble être une constante des structures neuronales, au moins dans le cerveau [16, 17]. A l'instar des neurones du cerveau, on peut penser que la rétine doit également maintenir un certain équilibre en cholestérol. Pour ce faire, la rétine neurale a en

particulier la capacité de convertir le cholestérol en 24S-hydroxycholestérol (24S-OH) [18]. La formation de ce métabolite pourrait représenter un mécanisme d'élimination du cholestérol de la rétine, ce qui garantirait à la rétine l'équilibre de ses teneurs en cholestérol. En effet, par la présence d'un groupe hydroxyle supplémentaire, le 24S-OH présente par rapport au cholestérol une polarité plus importante qui facilite son passage au travers de la barrière hémato-encéphalique dans le cerveau (BHE), ou hémato-rétinienne (BHR) dans l'œil. L'enzyme qui catalyse cette réaction spécifique est la cholestérol-24S-hydroxylase (CYP46A1). Il s'agit d'une enzyme à cytochrome P450 qui est codée par le gène *cyp46a1* [19]. CYP46A1 est exprimée dans la rétine neurale, et plus particulièrement dans les cellules ganglionnaires de la rétine [18, 20].

Outre leur implication supposée dans la régulation de l'homéostasie du cholestérol dans les neurones, le 24S-OH et la CYP46A1 pourraient intervenir en conditions pathologiques. Des études *in vitro* ont montré que le 24S-OH induit une réponse inflammatoire et un stress oxydatif dans l'épithélium pigmentaire [21]. Des données chez l'homme suggèrent que le 24S-OH serait impliqué dans des processus neurodégénératifs dans le cerveau comme dans la maladie d'Alzheimer [22-25].

La neurodégénérescence de la rétine est un trait caractéristique des rétinopathies, incluant celles associées au glaucome, qui est le modèle pathologique de référence de ce travail de thèse. Les mécanismes du maintien de l'homéostasie du cholestérol au cours de la dégénérescence des neurones de la rétine en constituent le sujet-clé. Dans ce manuscrit, la structure cellulaire de la rétine sera rapportée, ainsi que son vieillissement et ses pathologies (incluant la dégénérescence liée à l'âge (DMLA) et le glaucome) et le métabolisme du cholestérol circulant et cérébral. Une deuxième partie du manuscrit sera consacrée à la présentation des études et résultats expérimentaux obtenus dans le cadre du travail de thèse. Enfin, une conclusion permettra de rassembler les données de nos études et les mettra en perspective sur l'importance du cholestérol et du maintien de son homéostasie dans la rétine en conditions physiologiques et pathologiques.

Contexte bibliographique

I. Structure de l'œil humain et de la rétine

A. Aspects structuraux

L'œil ou globe oculaire a une forme sphérique. Il est l'organe responsable de la vision. Sa paroi est composée d'une tunique fibreuse, d'une tunique vasculaire et d'une tunique sensorielle ou nerveuse composée de la rétine.

La tunique fibreuse, la plus externe, est la sclérotique, qui est formée d'un tissu conjonctif dense et peu vascularisé, qui remplit ainsi un rôle de protection de l'œil. Du côté antérieur, cette sclérotique est remplacée par la cornée, transparente.

La tunique vasculaire ou uvée, est formée de trois parties : la choroïde, le corps ciliaire et l'iris. La choroïde est une membrane fortement vascularisée, et pigmentée en brun par la mélanine.

La transduction visuelle s'effectue au niveau de la rétine, tunique nerveuse, par la transformation du signal lumineux en signal électrique. Afin de permettre ce codage de l'information, la lumière traverse différentes structures (**Figure 2**) :

-d'abord, la cornée, qui constitue la barrière entre l'environnement extérieur et l'intérieur de l'œil, et permet de concentrer les rayons lumineux sur la rétine, Elle est de plus riche en fibres nerveuses nociceptives : le contact avec un objet induit le clignement de l'œil et la sécrétion lacrymale, protégeant ainsi l'œil des contacts et des attaques bactériennes,

-l'iris est la partie colorée et visible de l'œil, il est composé de muscles lisses. L'iris permet de contrôler la taille de la pupille (qui est son ouverture centrale) et délimite un orifice par lequel passe la lumière, et dont le diamètre varie de manière à réguler les rayons lumineux pénétrant dans le globe oculaire : il joue un rôle de diaphragme,

-le cristallin, structure responsable de la finesse de l'image dans la rétine, baigne entre l'humeur aqueuse et l'humeur vitrée. Le cristallin est une capsule mince et élastique, composée de cellules anucléées et de fibres spécifiques. Il joue le rôle d'une lentille biconvexe. La chambre antérieure, partie située entre la cornée et l'iris, est remplie d'un liquide, l'humeur aqueuse, qui est continuellement sécrétée par les procès ciliaires. La

chambre postérieure, partie située entre le cristallin et la rétine, contient les ligaments suspenseurs du cristallin. L'humeur aqueuse est retrouvée dans ces deux chambres. Elle a un rôle optique et métabolique nutritionnel vis-à-vis de la cornée, du cristallin et du trabéculum scléral. Sa régulation entraîne une pression oculaire d'environ 15 mm Hg. Le phénomène clef est la sécrétion des ions Na^+ dans la chambre postérieure par une pompe métabolique à sodium située au niveau des cellules non pigmentées de l'épithélium ciliaire. L'humeur aqueuse est éliminée au niveau de l'angle irido-cornéen. Le blocage de l'élimination de l'humeur aqueuse peut avoir pour conséquence l'apparition d'un glaucome. Le corps ciliaire est essentiellement formé de muscles lisses qui, grâce à leurs contractions, modifient la forme du cristallin et permettent ainsi l'accommodation,

-le segment postérieur de l'œil est rempli d'une substance gélatineuse transparente, le corps vitré, ou humeur vitrée. Le corps vitré est formé de 95 % d'eau, il donne à l'œil sa forme et sa consistance. Il représente ainsi 90 % du volume de l'œil. Son rôle est de garantir la rigidité du globe oculaire, et de maintenir la rétine en place contre la paroi de l'œil. Le corps vitré constitue un des quatre dioptries de l'œil. Par sa nature, il absorbe également une grande partie du rayonnement ultraviolet, ce qui protège dans une certaine mesure la rétine contre les expositions trop violentes,

-la rétine, qui est la tunique la plus interne, est le tissu nerveux de l'œil. La rétine est le tissu neurosensoriel photosensible. Elle intègre le signal lumineux et le transforme en signal électrique nerveux. La rétine est composée de deux feuillets. Le feuillet externe de la rétine est constitué de l'épithélium pigmentaire rétinien (EPR) qui, entre autres fonctions, empêche la lumière de diffuser dans l'œil. Le feuillet interne de la rétine est une structure nerveuse, composée de nombreux photorécepteurs (cônes et bâtonnets) et de cellules traitant et acheminant l'information visuelle vers le cerveau. Cette structure fait partie du système nerveux central, d'où son nom de rétine neurale ou neuro-sensorielle. Les axones efférents des cellules ganglionnaires de la rétine (CGR) forment le nerf optique.

Ce point de sortie de la rétine se nomme la papille optique, c'est-à-dire la naissance du nerf optique. Cette zone est aussi appelée tache aveugle car ne pouvant capter aucun *stimulus* lumineux, de par l'absence de photorécepteurs au niveau de la tête du nerf optique. A proximité de cette tache aveugle, chez l'homme et les primates, se trouve la tache jaune ou macula, comportant une fossette centrale, la *fovéa centralis*, qui est le point focal postérieur

du système optique avec la meilleure acuité visuelle. C'est au niveau de la *fovéa* que les rayons lumineux arrivent directement, avec le plus d'incidence, et c'est là que la densité de photorécepteurs est la plus importante. Ces photorécepteurs sont essentiellement de type cônes et sont responsables de la vision diurne.

B. Les cellules du feuillet externe de la rétine

Le feuillet externe de la rétine (ou rétine pigmentaire) est formé par un épithélium simple, fait de cellules pavimenteuses, hexagonales, synthétisant de la mélanine. Leur noyau est situé au pôle basal de la cellule, les grains pigmentés au pôle apical. Ces cellules sont rendues jointives par des systèmes de jonction inter-cellulaire (*zonula occludens*, *zonula adherens* et parfois desmosomes). La face apicale de ces cellules présente des expansions qui enveloppent le segment externe des photorécepteurs. La face basale repose sur la membrane de Bruch. Il existe une mélanogénèse active dans ces cellules tout au long de la vie. Cet épithélium pigmentaire de la rétine se poursuit en avant de l'œil au niveau de l'iris (**Figure 3 ; n°1**).

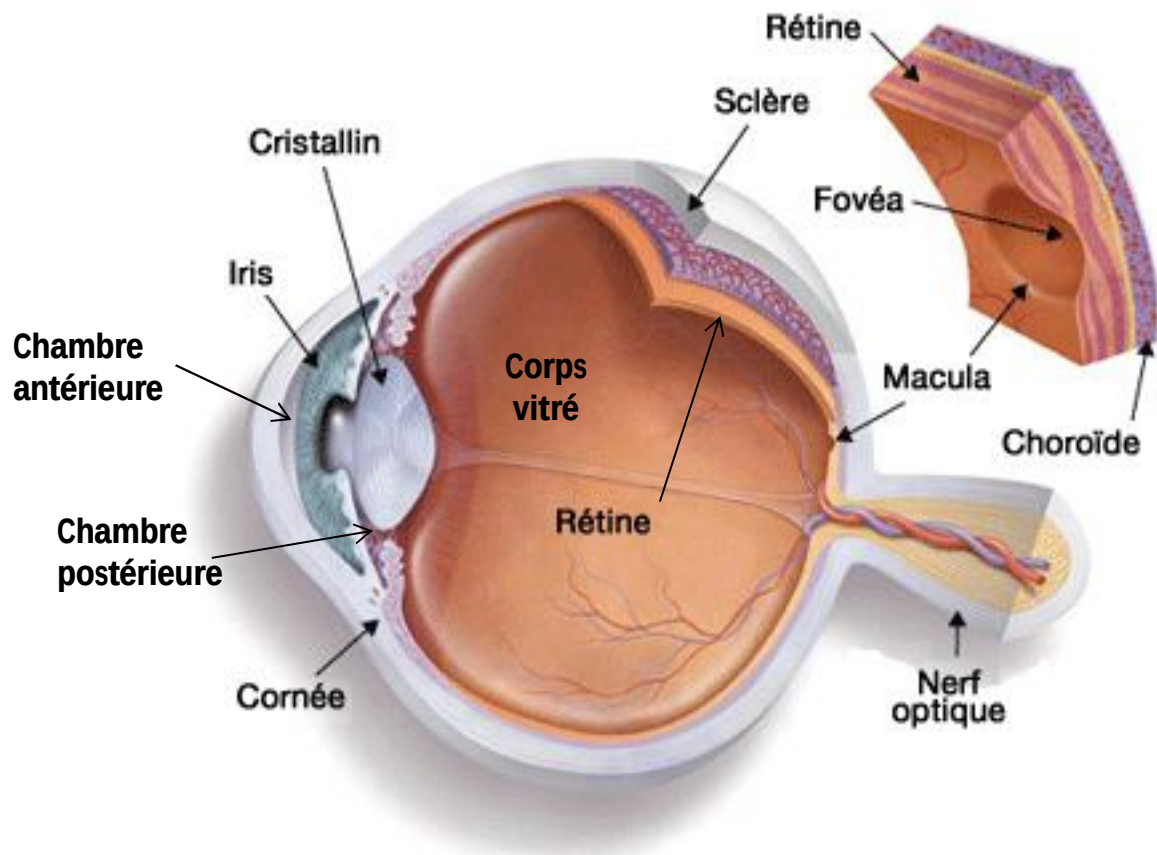


Figure 2 : Structure de l'œil humain et de la rétine.

C. Les cellules du feuillet interne de la rétine neurale

i. Les différentes couches

Le feuillet interne de la rétine, partie qui constitue la rétine nerveuse ou neurale, est la structure qui traite l'information lumineuse. Ce feuillet est composé de sept couches successives adossées à l'épithélium pigmentaire. Ces couches sont numérotées de 2 à 9 sur la **Figure 3**. La transduction du signal lumineux est initiée par les photorécepteurs.

- La couche la plus externe de la rétine visuelle est formée par les segments externes des cellules photoréceptrices (cônes et bâtonnets) (n°2 et 3).
- La couche sous-jacente (ou couche granulaire externe) représente les noyaux des photorécepteurs (n°4).
- Dans la couche plexiforme externe (CPE), les cellules photoréceptrices réalisent des synapses avec les cellules bipolaires (n°5).
- La couche nucléaire interne (CNI) est formée par les noyaux des cellules bipolaires, des cellules horizontales et des cellules interplexiformes (n°6).

Le signal atteint les cellules ganglionnaires de la rétine (CGR) et la propagation se poursuit le long du nerf optique.

- Les cellules bipolaires contractent des synapses avec les cellules ganglionnaires de la rétine (CGR) dans la couche plexiforme interne (CPI) (n°7).
- La couche CGR est formée par les noyaux de ces cellules (n°8) et la majorité des cellules amacrines se trouvent au niveau des somas des CGR.
- Enfin, la couche la plus interne est constituée, chez l'homme, par les prolongements axonaux non myélinisés des CGR qui se dirigent vers la papille pour former le nerf optique (n°9). C'est à partir de la lame criblée de la papille que les axones des CGR se myélinisent pour former les fibres du nerf optique.

Par ailleurs, la rétine des mammifères contient trois types de cellules gliales : les cellules de Müller (CGM), les astrocytes, les cellules microgliales [26].

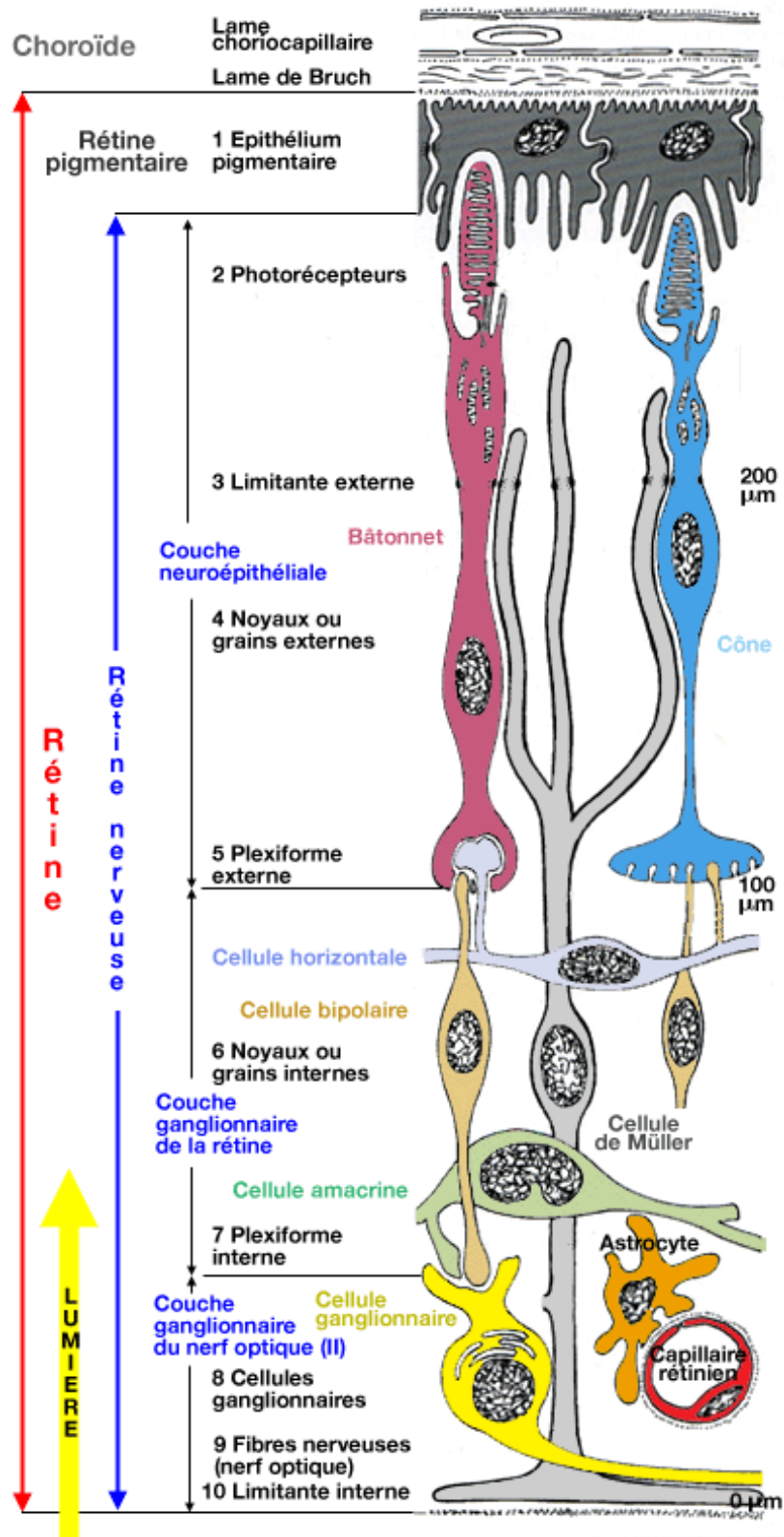


Figure 3 : Structure et organisation des différentes couches de la rétine pigmentaire et neurale. D'après [27].

ii. Les cellules gliales de Müller de la rétine

Les cellules gliales jouent un rôle central dans les fonctions du système nerveux : elles fournissent un soutien métabolique direct par l'approvisionnement en nutriments, incluant le cholestérol. Ces cellules régulent le microenvironnement neuronal et contribuent activement à l'activité neuronale. Alors que leurs corps cellulaires se situent dans la CNI, les CGM traversent les couches de la rétine interne de part en part.

Leurs prolongements vont entourer aussi bien les corps cellulaires que les prolongements et les synapses des neurones de la rétine, permettant l'isolement électrique et neurochimique de ces neurones (**Figure 4**). Ces prolongements vont également entourer les vaisseaux sanguins, ce qui fait que les CGM participent à la barrière hémato-rétinienne (BHR).

La membrane limitante externe est formée par les extrémités distales des CGM autour des photorécepteurs. Sur ce plan, les CGM communiquent entre elles par les jonctions de type *zonulae adherens* chez les primates et par des jonctions Gap chez les vertébrés inférieurs [28]. Des extensions membranaires, les *microvilli*, sont émises par les CGM dans l'espace sous-rétinien, permettant une facilitation du passage des ions et des métabolites.

L'extrémité proximale des CGM est appelée le « pied » (**Figure 6**). C'est à ce niveau que les CGM arrivent au contact du vitré et qu'elles forment la couche limitante interne (n°10) (**Figure 3, Figure 4**).

Les CGM sont les principales cellules gliales de la rétine. Elles s'étendent sur toute l'épaisseur de la rétine d'où leur qualificatif de cellules gliales radiales et leurs prolongements dendritiques s'enveloppent fermement autour des neurones jusqu'aux axones des cellules ganglionnaires de la rétine (CGR) (**Figure 4**).

Les CGM participent au maintien de l'homéostasie des zones intercellulaires. Ces cellules entretiennent des relations symbiotiques (**Figure 4**) avec les neurones en fournissant des substrats énergétiques [29]. Les CGM sont riches en mitochondries et en glycogène. Leur fonction de support métabolique est hautement développée, aussi bien pour l'apport en nutriments incluant le cholestérol que pour la détoxification de la rétine.

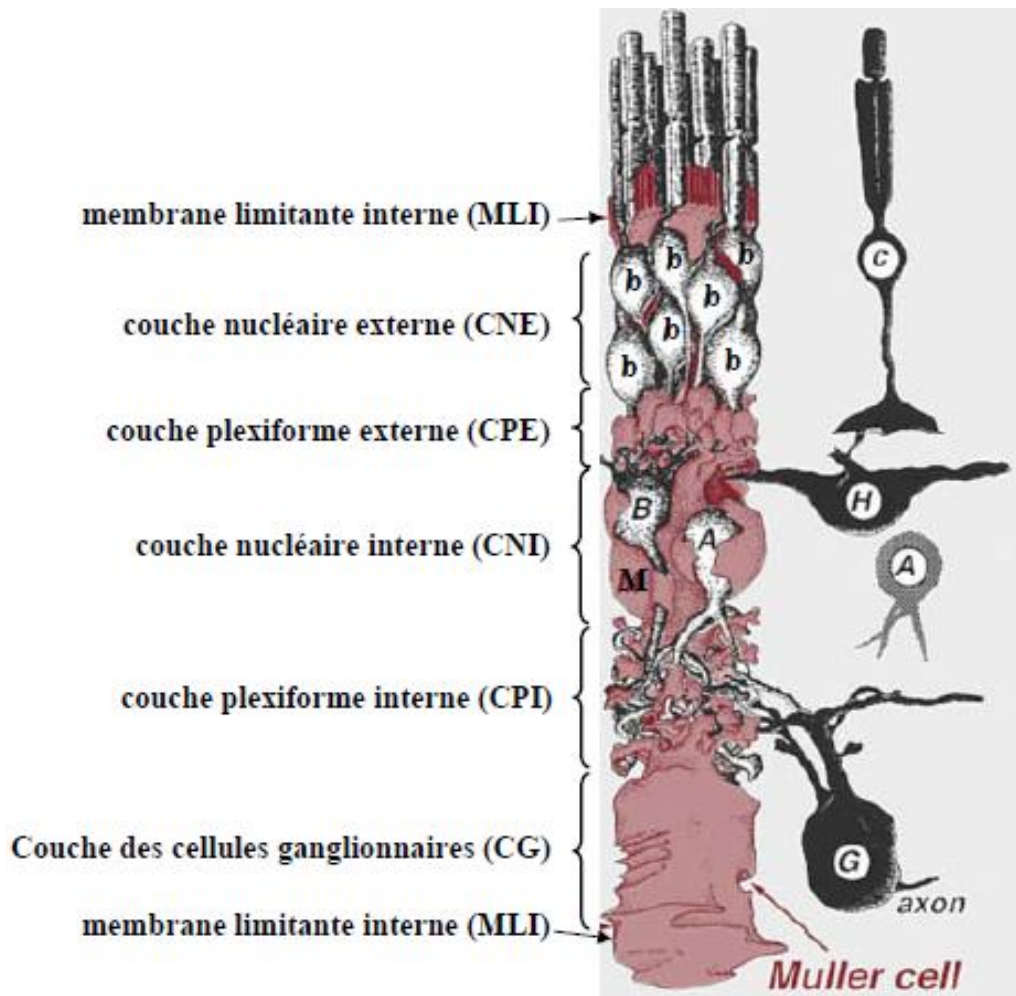


Figure 4 : Représentation de l'intégration de la cellule gliale autour des neurones. A: cellule amacrine; H: cellule horizontale; G: cellule ganglionnaire; B: cellule bipolaire; M: cellule de Müller ; b: bâtonnets ; c: cônes. D'après [30].

Ainsi, les CGM détoxifient la rétine en éliminant le dioxyde de carbone, en recyclant le glutamate, en rééquilibrant les concentrations en K^+ et en participant avec l'EPR à la phagocytose des neurones en voie de dégénérescence (**Tableau 1**).

Dans le **Tableau 1** sont résumés les différents processus physiologiques dans lesquels sont impliquées les CGM. Les fonctions précises des CGM et les protéines entrant en jeu dans ces processus sont indiquées.

Tableau 1 : *Fonctions physiologiques des cellules de Müller.* D'après [26, 31].

Processus physiologique	Fonction des cellules de Müller	Protéine ou peptide spécifique	Références
Support métabolique et nutrition des neurones	Distribution de lactate/Pyruvate	Lactate deshydrogénase	[32]
	Stockage de glycogène et Glycogénolyse	Glycogène phosphorylase	[33, 34]
		Carboanhydrase	[35]
Homéostasie K ⁺ et de l'eau	Tampon CO ₂ . Suppression des ions K ⁺ (tampon spatial)	Canaux Kir4.1	[36, 37]
	Déshydratation de la rétine interne	Canaux AQP4	[38]
Protection contre Le stress oxydatif	Elimination des radicaux libres	Glutathion	[39-41]
Contribution à la signalisation neuronale	Consommation de neuromédiateurs	Transporteur du glutamate Transporteur du GABA	[42-45]
	Recyclage de neuromédiateurs	Glutamine synthétase	[46, 47]
Recyclage des photopigments	Transport et conversion des photopigments	CRALBP	[48]
			[48]
Relargage de substances neuroactives	Stockage et relargage de D-sérine, glutamate, ATP		[49-51]
Relargage de substances vasoactives	Synthèse et relargage de VEGF, PEGF, TGF-β		[52-54]
Développement rétinien	Chaperon d'orientation pour cellules gliales radiales immatures		[55]

iii. Modulation de l'activité neurale rétinienne par les cellules de Müller-Interactions physiologiques entre neurones et CGM

La glie a une origine neurale. Il a été établi que les cellules gliales dérivent de la même lignée progénitrice que les neurones [56]. En effet, les cellules gliales occupent la plus grande partie du SNC, où les neurones s'accumulent. Dans cet environnement complexe, la glie périssynaptique est essentielle à la transmission synaptique [57]. La transmission du signal via

les synapses chimiques est spécifique à la substance neuro-active relarguée par le neurone pré-synaptique qui arrive au neurone post-synaptique. Cette substance neuro-active agit comme le *stimulus* qui induit la réponse synaptique.

Une fois que les CGM détectent une augmentation de l'activité neuronale, leurs voies de signalisation (en particulier par des mouvements du Ca^{2+}) peuvent cibler une variété de réactions cellulaires qui peuvent alors moduler l'activité des neurones (**Figure 5**). En effet, une petite variation de leurs nombreuses fonctions homéostatiques ou neuro-supportrices peut affecter le fonctionnement neuronal.

La concentration de glutamate dans la fente synaptique peut être modulée en fonction de différents *stimuli* comme par exemple l'intensité du signal de lumineux. Elle est régulée par trois facteurs : la libération, la recapture et la diffusion du neuromédiateur. Il s'avère que les cellules gliales, et en particulier les CGM sont impliquées dans ces trois phénomènes. Ce type de signalisation glie/neurones est appelé « relargage de gliomédiateurs » [58, 59].

La libération, comme la recapture des neuromédiateurs sont dépendantes de l'apport énergétique. Bien que la plupart neurones expriment un transporteur du glucose à leur surface, leur permettant ainsi d'avoir une source d'énergie via la glycolyse, il a été montré que les neurones (par exemple les cellules bipolaires, premiers neurones de la chaîne visuelle), mais aussi les photorécepteurs (qui sont des cellules différenciées), vont utiliser préférentiellement le lactate libéré par les CGM comme source d'énergie [32].

Les CGM jouent un rôle très actif dans le contrôle de l'activité neuronale et de la transmission synaptique [60]. En relarguant des « gliomédiateurs », particulièrement le glutamate ou l'ATP, les CGM activées engendrent des effets excitateurs ou inhibiteurs sur les neurones avoisinants. L'excitation est médiée par le glutamate tandis que l'ATP entraîne l'inhibition de neurones [49, 61]. Les modulations de l'activité neuronale ont été observées dans des préparations d'explants rétiniens de rats. Dans ces travaux, des vagues calciques sont induites dans les cellules gliales rétinienne par une stimulation mécanique. Ce calcium cause un relargage de glutamate par les CGM qui active les interneurones inhibiteurs (probablement par les cellules amacrine glycinergiques ou GABAergiques) via l'activation de

AMPA/kainate et des mGluRs. Ceci a pour conséquence l'inhibition de la réponse à la lumière d'une population de CGR [50].

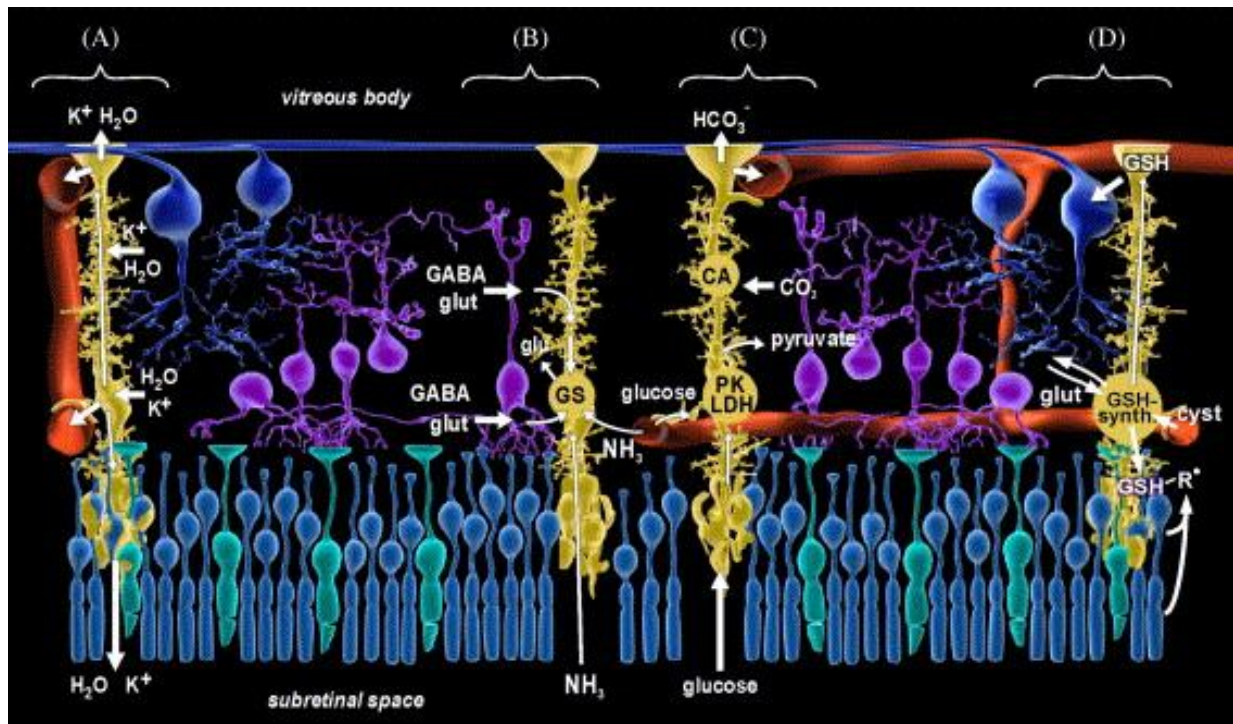


Figure 5 : Interactions physiologiques entre cellules de Müller et neurones dans la rétine saine. (A): Clairance spatiale des ions K^+ et de l'eau. (B) Recyclage des médiateurs. (C) Symbiose métabolique. (D) Piégeage des radicaux libres / métabolisme GSH. CA: anhydrase carbonique; cyst: cystéine; GABA: acide gamma-aminobutyrique; glut: glutamate; GS: glutamine synthétase; GSH, glutathion; LDH: lactate déshydrogénase; PK: pyruvate kinase; $R_\bullet$: radicaux libres. D'après [26, 62].

Les CGM sont aussi impliquées dans le recyclage des neuromédiateurs, glutamate et GABA, libérés par les neurones lors de la transmission synaptique. Les CGM vont récupérer le glutamate libéré via le transporteur spécifique GLAST, puis le convertir en glutamine via la glutamine synthétase [63]. Les CGM peuvent également synthétiser du glutamate ou de la glutamine. La glutamine va alors pouvoir être relarguée dans l'espace extracellulaire afin d'être récupérée par les neurones via un transporteur des acides aminés. De son côté, le GABA peut être récupéré par les cellules gliales via un transporteur dépendant des ions Cl^- et Na^+ , avant d'être converti via la GABA transaminase [64]. Les cellules gliales sont non

seulement responsables de la régulation des concentrations en neuromédiateurs, mais aussi de la régulation de l'homéostasie des ions.

De plus, l'un des rôles principaux des CGM dans la rétine est de participer à la clairance du K^+ , c'est-à-dire son transport depuis l'environnement synaptique, où il est libéré par les neurones lors de leur activation, vers la circulation sanguine ou le vitré [36, 37]. Ceci permet de réguler la concentration du K^+ . L'une des protéines essentielles dans ce phénomène est le canal potassique appelé Kir4.1 (**Figure 6**) localisé dans la membrane limitante interne et autour des vaisseaux sanguins, permettant ainsi la libération du K^+ vers le vitré et la circulation sanguine [65].

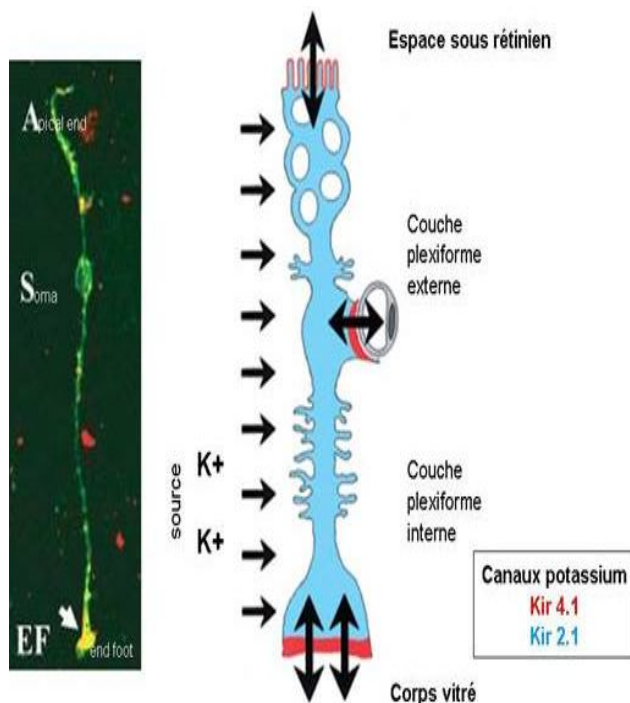


Figure 6 : Photo d'une cellule de Müller (d'après [66]) suivie de son schéma fonctionnel. EF (Endfoot) : pied. D'après [67].

iv. Les photorécepteurs

Qu'il s'agisse des cônes ou des bâtonnets, les photorécepteurs ont une structure analogue, allant de la périphérie vers le centre du globe oculaire :

- l'article externe est très allongé et cylindrique pour les bâtonnets, plus court et conique pour les cônes. Il est fait de disques membranaires aplatis empilés dans les bâtonnets. S'agissant des cônes, ces disques sont constitués des replis de la membrane plasmique. L'article externe contient les pigments visuels (rhodopsine pour les bâtonnets ; iodopsine pour les cônes) ;
- le cil connecteur, reliant l'article externe à l'article interne sous-jacent ;
- l'article interne, contenant le corpuscule basal d'où naît le cil connecteur, un centriole, de nombreuses mitochondries et un volumineux appareil de Golgi ;
- le corps cellulaire avec en son centre le noyau ;
- l'expansion interne, fine et plus ou moins longue, se terminant par un renflement pré-synaptique qui s'articule avec les dendrites des cellules bipolaires.

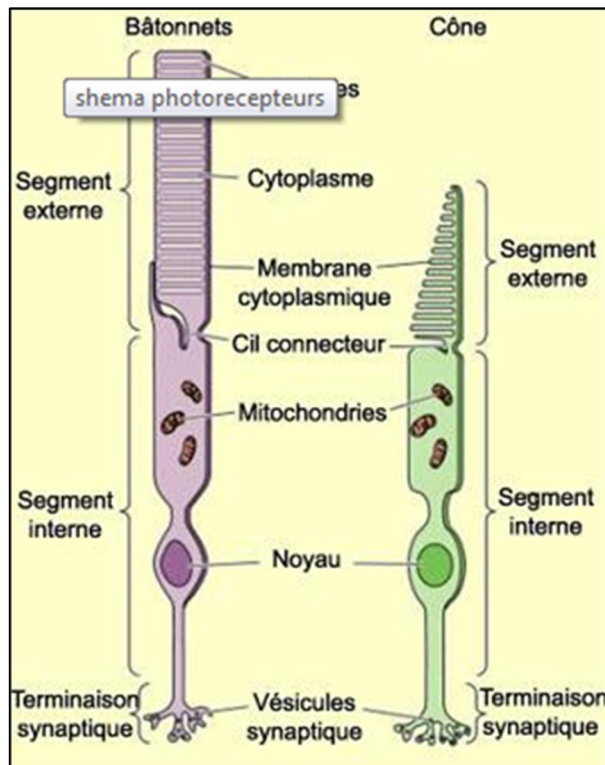


Figure 7 : Représentation schématique des cellules photoréceptrices à cônes et à bâtonnets.

D'après www.lecerveaumcgill.ca.

La nutrition des couches périphériques de la rétine (épithélium pigmentaire et photorécepteurs) est assurée par l'intermédiaire des capillaires de la choroïde (couche de tissu

conjonctif lâche très vascularisé située entre la face profonde de la sclérotique et la membrane de Bruch). Celle des autres couches est assurée par des capillaires rétiens issus des branches de l'artère centrale de la rétine qui circulent dans l'épaisseur de la rétine, près de sa face profonde (**Figure 3**).

Chez l'homme, il existe 92 millions de bâtonnets répartis sur l'ensemble de la rétine. Les bâtonnets sont sensibles aux basses intensités lumineuses et ont un mauvais pouvoir séparateur (3/10^e). Ils sont responsables de la vision nocturne (**Figure 7**).

Environ 4,6 millions de cônes sont localisés autour de la *fovéa*. Ils sont sensibles aux fortes luminosités (100 fois moins sensibles que les bâtonnets). Ils sont responsables de la vision diurne et de la vision des couleurs (**Figure 7**).

v. La réception du signal lumineux est assurée par les pigments visuels

La transduction de l'énergie lumineuse en variation de potentiel de membrane des photorécepteurs commence avec l'absorption de photons par un pigment photosensible appelé opsine. Dans le cas des bâtonnets, il s'agit d'une protéine appelée rhodopsine, et dans le cas des cônes, des iodopsines. Un seul bâtonnet peut compter jusqu'à 100 millions de molécule de rhodopsine sur les disques de son segment externe. La rhodopsine est constituée par l'association de l'opsine, protéine à sept domaines transmembranaires, et d'un chromophore, le 11-cis retinal (**Figure 8**).

Chez l'homme, il existe quatre pigments différents définis par quatre protéines différentes associées au même chromophore. Tous les photorécepteurs possèdent un pigment visuel qui absorbe certaines radiations du spectre et c'est cette absorption de photons qui est à l'origine du message nerveux qu'ils initient. Les différences entre les pigments visuels portent uniquement sur la protéine qui détermine les caractéristiques physiques de la lumière perçue. Chaque photorécepteur ne synthétise qu'un seul type de pigment. La rhodopsine est spécifiquement portée par les bâtonnets, elle a un maximum d'absorption à 496 nm. Par contre, les cônes possèdent des pigments sensibles à des longueurs d'onde différentes et permettent ainsi la vision des couleurs (**Figure 9**).

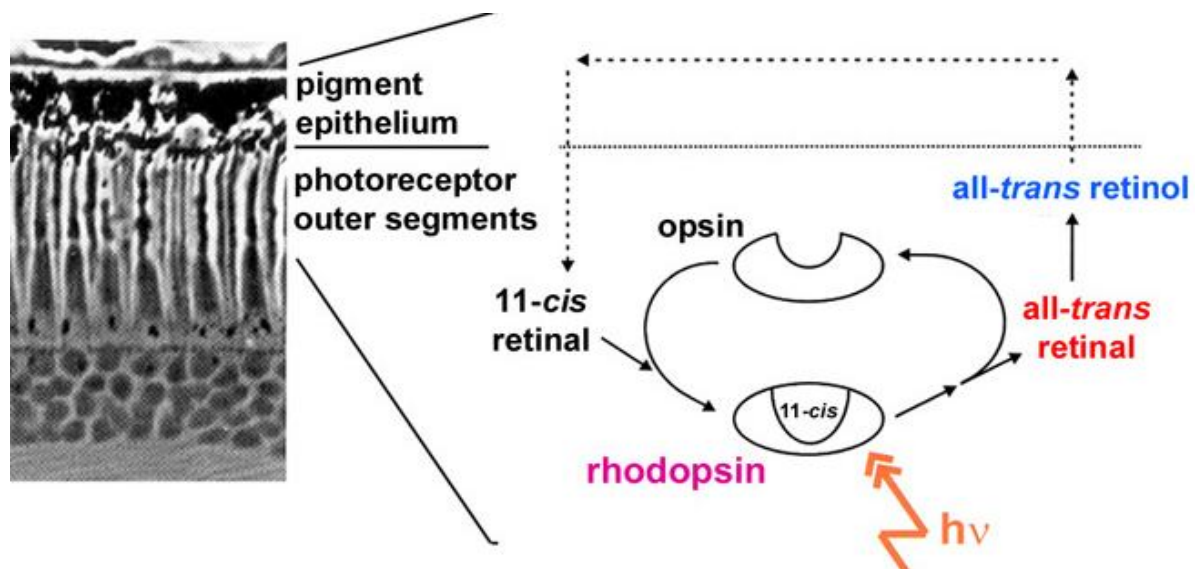


Figure 8 : Interactions photons lumineux et photorécepteurs. Le cycle rétinol dans l'EPR.

Chaque cône n'exprime qu'un seul des trois pigments : il existe 3 types de cônes, chacun ayant une protéine (opsine) différente. Ces cônes sont qualifiés de S, M et L d'après les caractéristiques du spectre d'absorption de l'opsine qu'ils possèdent. On connaît un pigment sensible au bleu (opsine S ou bleue : maximum d'absorption à 420 nm), au vert (opsine M ou verte : maximum d'absorption à 530 nm), au rouge (opsine L ou rouge : maximum d'absorption à 560 nm). Cette disposition est appelée vision trichromatique. Pour un cône bleu, il y a 20 cônes verts et 40 cônes rouges (**Figure 9**).

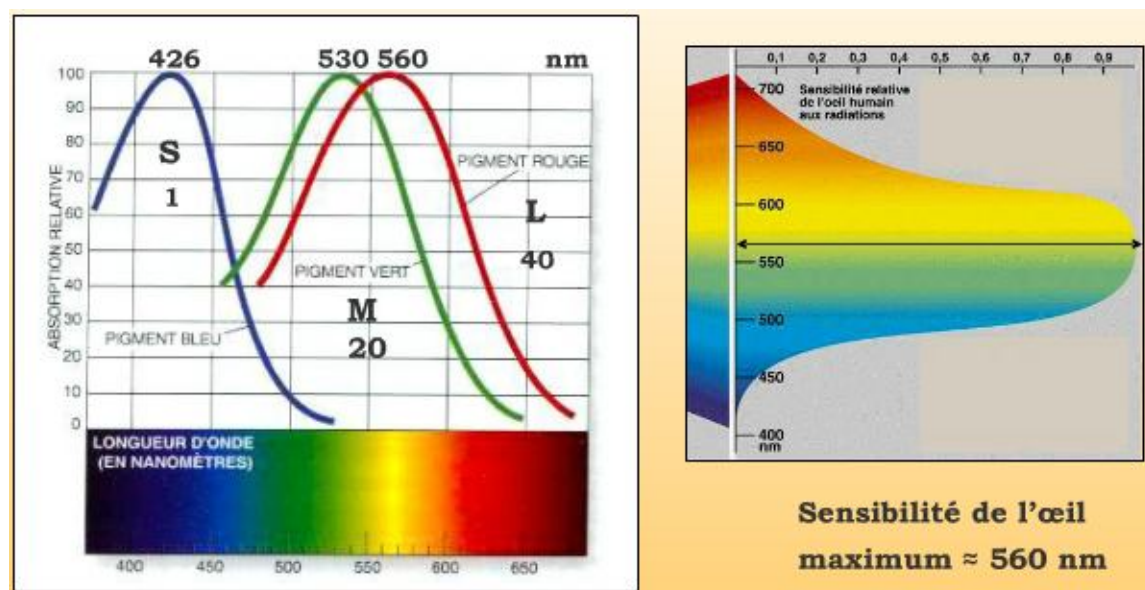


Figure 9 : Vision trichromatique des couleurs.

Quand un photon arrive au niveau des photorécepteurs, il entraîne l'isomérisation du 11-cis rétinale en tout-trans rétinale (**Figure 8**). L'opsine est ensuite activée et entraîne l'activation d'une autre protéine, la transducine, apparentée à la famille des protéines G. La transducine à son tour active une phosphodiésterase (PDE) qui entraîne l'hydrolyse du GMP cyclique. La chute de la concentration intracellulaire de GMP cyclique conduit à la fermeture des canaux sodiques, et par suite à une hyperpolarisation cellulaire (**Figure 10**).

Le résultat de cette hyperpolarisation est une diminution de la transmission synaptique avec les cellules bipolaires (ceci est l'objet du paragraphe suivant). Le photon entraîne donc une inhibition de la transmission synaptique, c'est-à-dire un message négatif.

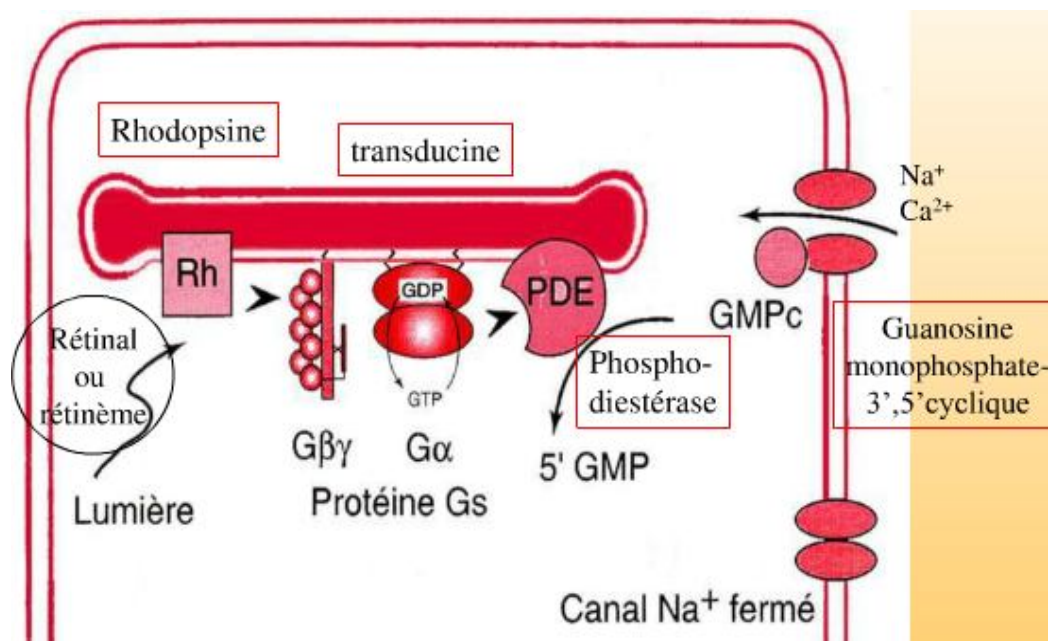


Figure 10 : La phototransduction des photorécepteurs.

La rétine n'est pas seulement un lieu de réception d'un signal extérieur, elle constitue un véritable système nerveux assurant le pré-traitement du signal lumineux.

vi. Les circuits neuronaux

D'un point de vue schématique, il existe plusieurs circuits neuronaux au sein de la rétine neuro-sensorielle. Le circuit principal conduit le message du photorécepteur à la cellule bipolaire, puis à la cellule ganglionnaire qui le transmet via le nerf optique jusqu'au cerveau (**Figure 11**).

À l'instar des cônes et des bâtonnets dont la structure et la fonction sont toutes entières orientées vers la transformation de l'énergie lumineuse en influx nerveux, chaque type de cellule de la rétine possède une localisation et une connectivité visant à effectuer un premier traitement de l'information. Les autres cellules nerveuses sont des interneurons qui ont un rôle régulateur de ce circuit : cellules horizontales agissant au niveau de la synapse entre les photorécepteurs et les cellules bipolaires, cellules amacrines au niveau de la synapse entre les cellules bipolaires et les cellules ganglionnaires, cellules interplexiformes régulant les interactions entre les deux synapses précédentes.

En fait, comme nous allons le voir, du moins en partie, ce système est beaucoup plus complexe. En effet, l'analyse des neuromédiateurs synthétisés par les cellules nerveuses de la rétine a mis en évidence la grande diversité des cellules horizontales et amacrines et les études neurophysiologiques ont montré la diversité de fonctionnement des cellules bipolaires et ganglionnaires.

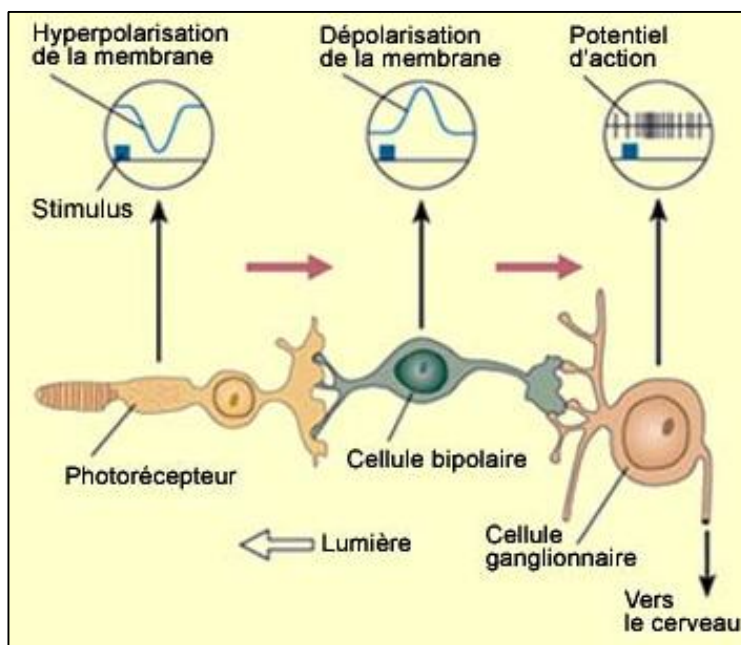


Figure 11 : La transduction du signal depuis les photorécepteurs jusqu'aux cellules ganglionnaires de la rétine. D'après : www.lecerveaumcgill.ca.

La rétine n'utilise pas seulement la neurotransmission classique avec des synapses chimiques pour transmettre l'information dans ses réseaux. La plus grosse partie de l'information lumineuse se transmet rapidement par des synapses électriques, surtout dans les

voies partant des bâtonnets. De plus, il existe des substances neuro-actives (le glutamate, par exemple) diffusant à distance et qui influencent un grand nombre de neurones à la fois.

Les cellules bipolaires, comme tous les neurones de la rétine sauf les CGR, transmettent l'influx nerveux non pas avec des potentiels d'action mais sous la forme de simples potentiels gradués. On parle de réponse ON lorsqu'une dépolarisation amène une augmentation de la concentration intersynaptique de neuromédiateurs (ex : glutamate) et de réponse OFF quand une hyperpolarisation diminue la quantité de neuromédiateurs relargués (**Figure 12**). La connexion reliant les photorécepteurs aux cellules bipolaires peut alors être de nature, excitatrice ou inhibitrice.

Dans le circuit neuronal rétinien, le champ récepteur des cellules neuronales rétiniennes, depuis les photorécepteurs jusqu'aux CGR, est organisé selon un type d'opposition centre-périphérie.

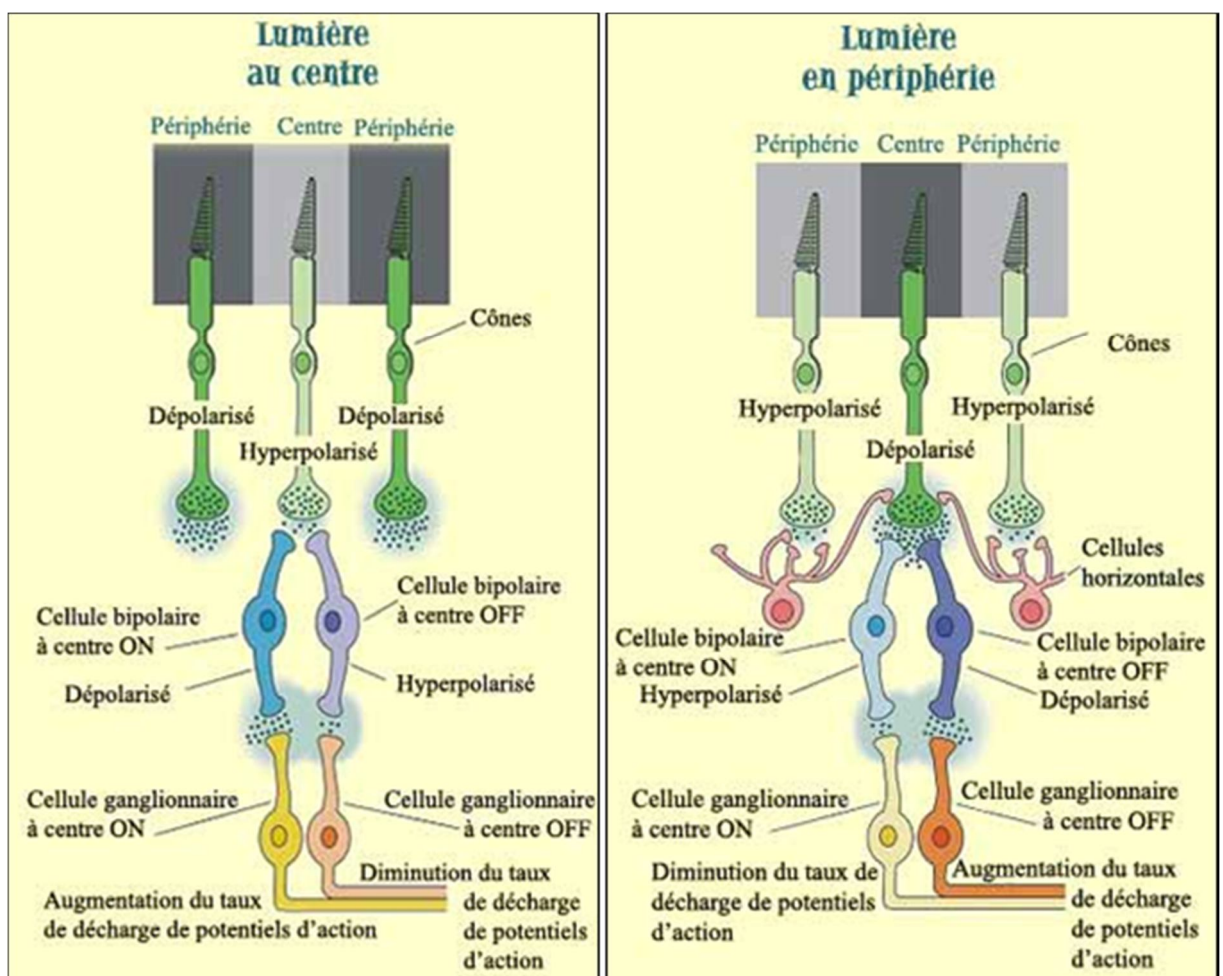


Figure 12 : Organisation centre-périphérie des champs récepteurs des neurones de la rétine.

D'après : www.lecerveau.mcgill.ca.

Pour certaines cellules bipolaires dites à centre ON, l'éclairement du centre d'un champ récepteur entraîne d'abord une hyperpolarisation du photorécepteur, hyperpolarisation qui se transforme en dépolarisation dans le neurone bipolaire à cause du caractère inhibiteur de la synapse qui les relie. Le résultat sur La CGR qui suit est une excitation qui se traduit par une augmentation de la fréquence des potentiels d'action qu'il émet (**Figure 12**).

Par ailleurs, la même cellule bipolaire à centre ON subit une hyperpolarisation si la lumière atteint la périphérie de son champ récepteur. Et à l'inverse, d'autres neurones bipolaires subissent une dépolarisation quand c'est une zone d'obscurité qui frappe le centre de leur champ récepteur et une hyperpolarisation quand cette zone atteint la périphérie. On parle alors de neurones bipolaires à centre OFF (**Figure 12**).

Cette organisation centre-périphérie des champs récepteurs des cellules bipolaires va se transmettre aux CGR par des synapses situées dans la CPI.

Les CGR ont le même type de champs récepteurs circulaire à opposition centre-périphérie que les cellules bipolaires. Ainsi, des synapses relient les cellules bipolaires à centre ON aux CGR à centre ON, et les cellules bipolaires à centre OFF aux CGR à centre OFF (**Figure 12**).

Alors que les autres neurones de la rétine n'émettent que des potentiels électriques gradués, les CGR sont les seules à transmettre le signal nerveux sous forme de potentiels d'action. Ces potentiels d'action générés de façon spontanée et c'est leur fréquence de décharge qui est amplifiée ou diminuée par l'apparition de lumière dans leur champ récepteur (**Figure 12**).

Notre vision dépend en grande partie de notre capacité à discerner les contrastes entre un objet et le fond devant lequel il se trouve. L'établissement de voies de traitement de l'information visuelle parallèles à partir de la rétine est un des moyens qui permet cette discrimination.

Dans le traitement de l'information visuelle, trois voies indépendantes prennent en charge chacune un aspect différent de la vision (forme, mouvement, couleur). Ces voies impliquent l'intervention d'autres cellules neuronales, les cellules simples, complexes et hypercomplexes. Elles activent différentes aires du cortex visuel occipital et aires associées. Ainsi, la perception visuelle est la résultante de tous les phénomènes visuels et cognitifs qui aboutissent, par exemple, à la reconnaissance d'une forme.

vii. Explorations de la rétine neurale

La rétine neurale est essentiellement photosensible et est organisée en 2 systèmes : photopique et scotopique. Elle est capable de convertir les photons lumineux en influx visuels transmis jusqu'aux différentes aires visuelles du cortex pour aboutir à la vision.

Le système photopique a pour origine les photorécepteurs de type cônes qui codent les stimulations de niveaux lumineux élevés ou photopiques. Le système scotopique a pour origine les photorécepteurs de type bâtonnets qui codent les stimulations de niveaux lumineux faibles ou scotopiques.

La rétine neurale peut être explorée par des tests fonctionnels d'électrophysiologie visuelle, comme par exemple :

- l'électro-rétinographie (ERG) « plein champ » ou *Ganzfeld*, qui permet d'évaluer l'intégralité de la réponse de la rétine aux stimuli lumineux. Ce type d'analyse permet également de tester séparément les réponses du système photopique et scotopique des différents strates (réceptoral ou post-réceptoral) et les réponses des voies ON et/ou OFF,

- le pattern-ERG (p-ERG) et les potentiels évoqués visuels (PEV) pour tester la réponse des CGR et l'intégration centrale du signal visuel.

En complément des explorations fonctionnelles rétinienne par électrophysiologie, l'imagerie anatomique rétinienne par tomographie (OCT, *Optical Coherence Tomography*) est de pratique courante surtout en clinique, et permet de mettre en parallèle les images obtenues des différentes structures rétinienne (récepteurs, couches nucléaires, EPR) avec les atteintes fonctionnelles observées.

Le principe de l'ERG flash

Ainsi, il est possible de suivre et d'enregistrer les potentiels d'action produits dans la rétine à la suite d'une stimulation lumineuse, sous la forme d'un électro-rétinogramme (ERG). Il s'agit d'un test non invasif utilisé couramment en recherche fondamentale, mais aussi en clinique afin d'étudier l'état fonctionnel de la rétine. La rétine est stimulée par un flash de niveau lumineux donné délivré à toute la surface rétinienne : la stimulation est dite plein champ, *full field* ou *Ganzfeld*, dans une ambiance lumineuse photopique (après adaptation à la lumière) ou scotopique (après adaptation à l'obscurité). L'ERG flash correspond à la réponse

globale de toute la surface de la neurorétine, par sommation des variations de polarisation des différentes cellules excitables de la rétine à la suite d'un flash.

Selon les conditions initiales de stimulation, l'ERG flash se compose de plusieurs ondes de polarités différentes qui se succèdent dans le temps et dont l'origine est différente :

- l'onde a, qui est la première partie de la réponse, est négative et représente essentiellement l'activité des photorécepteurs. Son amplitude est proportionnelle au nombre de photorécepteurs qui répondent initialement,

- l'onde b est une réponse positive qui semble être directement produite par les cellules bipolaires, probablement sans intervention directe des CGM,

- les potentiels d'action sont des oscillations ayant lieu au cours de l'apparition de l'onde b, et qui semblent correspondre à l'activité dans la CPI.

La **Figure 13** montre le tracé type d'un ERG obtenu chez un animal de laboratoire.

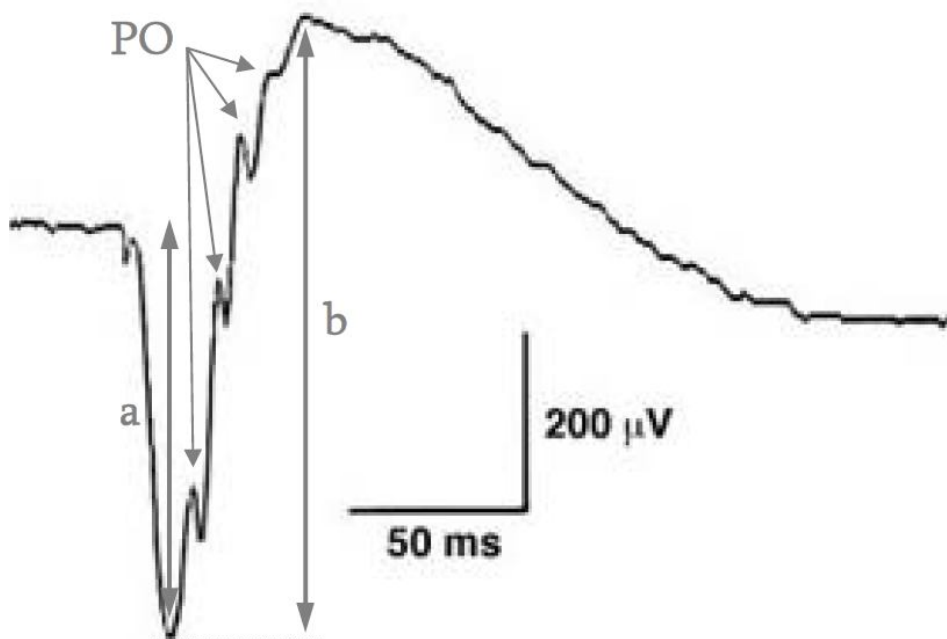


Figure 13 : *Tracé typique d'un électro-rétinogramme obtenu chez un animal de laboratoire. a, onde a ; b, onde b ; PO, potentiels oscillatoires.*

L'ERG permet de détecter des altérations pathologiques de la fonctionnalité de la rétine. Récemment, il a été montré, chez la souris, qu'une déficience en taurine, qui est un

dérivé d'acide aminé soufré retrouvé en grande quantité dans le SNC, a des conséquences dramatiques au niveau de la rétine. En effet, la taurine représente pratiquement la moitié du contenu en acides aminés libres de la rétine [68]. La réponse l'ERG est modifiée chez les animaux déficients en taurine : les ondes-a et -b sont altérées, et les auteurs ont montré que les cellules neuronales rétinienne touchées par la déficience en taurine sont les photorécepteurs et les CGR [69]. De plus, le voriconazole, un antifongique, couramment utilisé médicalement, altère transitoirement le tracé de l'ERG simien par son action sur la rétine interne, notamment sur les cellules bipolaires [70].

II. Le vieillissement de la rétine et ses pathologies

A. Vieillissement et DMLA

En France, près de 1,3 million de personnes sont atteintes de dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA), cette pathologie est la première cause de malvoyance des plus de 50 ans, provoquant un affaiblissement important des capacités visuelles, sans toutefois les anéantir.

1. Epidémiologie de la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA)

La dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) est une affection rétinienne concernant la région maculaire, d'évolution progressive, débutant vers 55 ans ou plus tard, liée à de nombreux facteurs environnementaux et génétiques.

La plupart des études publiées concernent des populations européennes, américaines ou australiennes et mettent en avant l'importance des ethnies et des facteurs environnementaux.

Deux études épidémiologiques européennes nous renseignent sur la prévalence de la DMLA : l'étude POLA et l'étude EUREYE.

L'étude POLA [71] a été réalisée sur les résidents de la ville de Sète entre 1995 et 1997, âgés de 60 ans et plus, soient 2584 personnes. L'utilisation de critères internationaux

de classification de la DMLA (*The international APM Epidemiological Study Group*, 1995) rendait possible la comparaison avec les autres grandes études épidémiologiques réalisées au niveau mondial. La prévalence globale a été de 1,87% dans une population de 60 ans et plus. Il n'y avait pas de différences de prévalence entre hommes et femmes.

L'étude EUREYE [72] est une étude épidémiologique multicentrique incluant 7 centres dans toute l'Europe, le centre français se situant à Créteil. Parmi les 703 sujets de plus de 65 ans recrutés en France, 3,02% étaient atteints de DMLA. La forme néovasculaire correspondait à 65% dans cas de DMLA, les 35% restants étant attribués à l'atrophie géographique isolée. Parmi les 158 cas, 42% étaient bilatéraux. De manière parallèle à l'étude POLA, la prévalence de la DMLA augmentait très fortement avec l'âge, jusqu'à 12,3% chez les sujets âgés d'au moins 80 ans. De même que dans l'étude POLA, il n'y avait pas de différence significative entre hommes et femmes.

D'après une méta-analyse [73] incluant les six plus grandes études en population réalisées à ce jour dans les populations blanches des pays industrialisés, la prévalence passe de moins de 0,5% avant 65 ans à près de 15% après 80 ans. Les taux de prévalence ne montraient pas de différence statistiquement significative entre hommes et femmes. La prévalence de DMLA néovasculaire (1,02%) était légèrement plus élevée que celle de l'atrophie géographique (0,81%), le nombre de cas représentant une combinaison des deux formes n'étant pas précisé.

En France, en extrapolant les taux de prévalence de la méta-analyse à la population française en 2005, on estime à 608 000 le nombre de patients atteint de DMLA, correspondant globalement à 3% des 21 millions de personnes âgées d'au moins 50 ans. La prévalence de la DMLA augmente exponentiellement avec l'âge, et atteint une personne sur dix âgée de 80 ans et plus.

Compte-tenu de l'augmentation de l'espérance de vie, les estimations prévoyaient alors une augmentation de 50% dans les années à venir et de 100% dans les 30 ans, portant le nombre de cas prévisibles de DMLA à 1,2 millions vers 2035, sur le seul territoire français.

2. Signes cliniques de la DMLA

La DMLA est une maladie dégénérative progressive qui affecte la partie centrale de la rétine appelé macula (Erreur ! Source du renvoi introuvable.). La vision périphérique ou

latérale reste intacte. La Société française d'ophtalmologie (SFO) définit la DMLA comme un « ensemble des lésions de la région maculaire, dégénératives, non inflammatoires, acquises, survenant sur un œil auparavant normal, apparaissant après l'âge de cinquante ans et entraînant une altération de la fonction maculaire et de la vision centrale ». Très complexe, la pathogénèse de la DMLA est loin d'être parfaitement élucidée. La **Figure 14** montre l'altération progressive de la vision d'un patient atteint de DMLA. On voit la tâche noire centrale. La vision périphérique est intacte.



Figure 14 : *Vision évolutive d'un patient ayant une DMLA.*

Lorsque la pathologie est dépistée aux stades précoces, elle est diagnostiquée comme maculopathie liée à l'âge (MLA) par la présence de *drusens* séreux et d'anomalies pigmentaires. Ce stade évolue ensuite vers une forme plus avancée, qui est la DMLA. Le drusen est un dépôt rétinien constitué d'amas de petites tailles et visualisées sous forme de taches jaunâtres au fond d'œil. Il fait partie du processus normal du vieillissement oculaire.

Les lésions initiales dues à la DMLA semblent se trouver au niveau de l'épithélium pigmentaire rétinien (EPR), ce qui va entraîner progressivement une altération définitive des cellules visuelles à cônes et à bâtonnets. Les stades précoces sont caractérisés par une vision normale et la présence de *drusens* et/ou d'altération de l'épithélium pigmentaire dans la région maculaire, ils comportent un risque variable d'évolution vers un stade tardif. Les stades tardifs sont caractérisés par une mauvaise acuité visuelle : on voit alors apparaître des plages d'atrophie, ce stade est appelé forme sèche ou atrophique ; ou l'apparition de néovaisseaux choroïdiens ou sous-réiniens ou un décollement de l'EPR, ce stade est appelé forme exsudative (**Figure 15**).

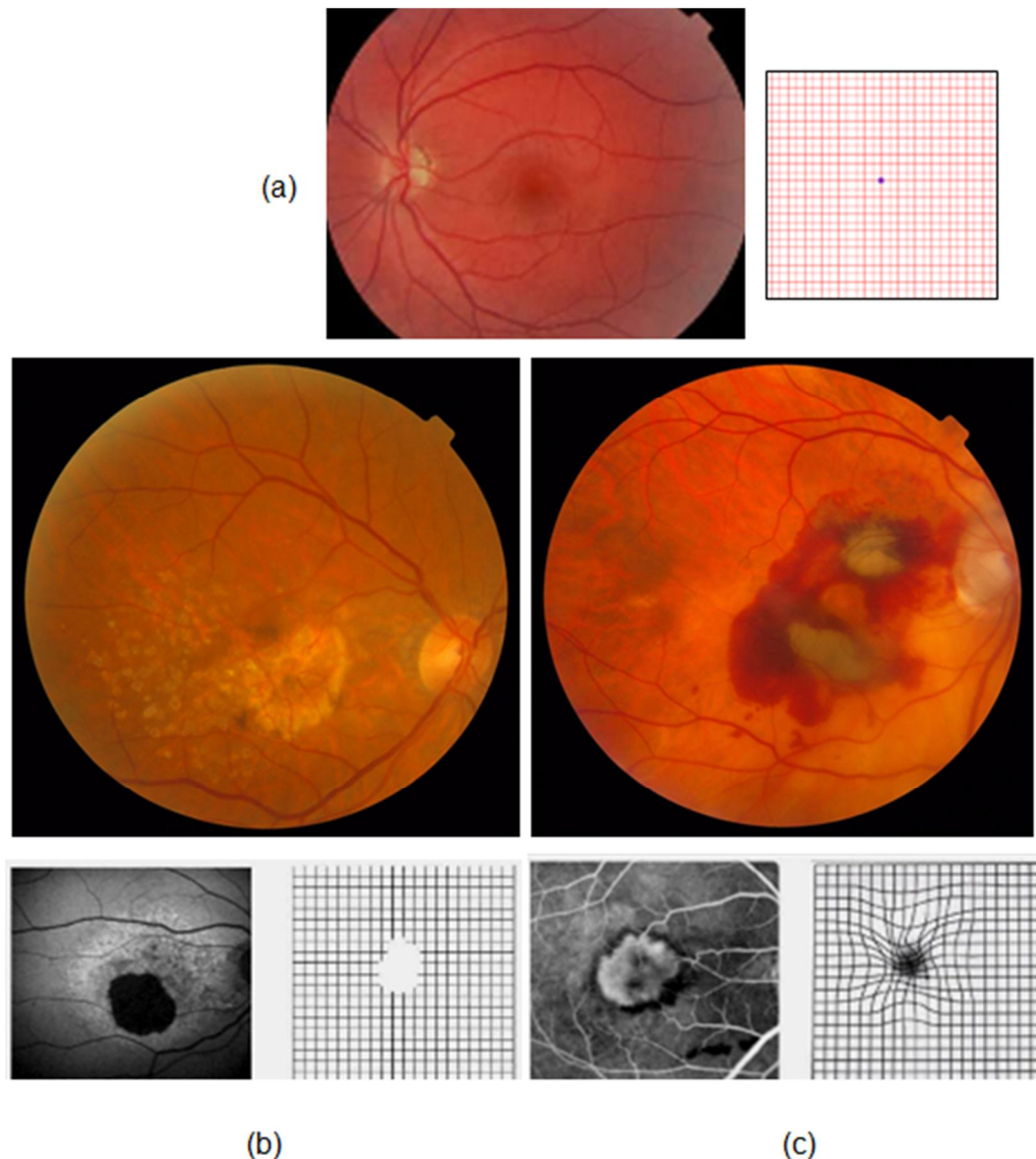


Figure 15 : Images en fond d'œil et grilles d'Amsler correspondantes représentant les deux formes avancées de la DMLA : a) rétine saine et grille d'Amsler normale; b) forme sèche ou atrophique avec drusens séreux et anomalies pigmentaires et scotome central et grille d'Amsler présentant un « trou » central; c) forme humide ou exsudative avec scotome central et métamorphopsies et grille d'Amsler présentant une déformation centrale et périphérique. Source des images en fond d'œil : Service d'ophtalmologie, CHU de Dijon.

Chez les patients ayant développé une DMLA, les *drusens* sont notablement plus abondants avec un phénomène inflammatoire conduisant à une destruction plus large de la rétine. Cette dernière stimulerait la sécrétion d'une protéine, le facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF, *Vascular Endothelial Growth Factor*), induisant la croissance

de vaisseaux capillaires fragiles, phénomène appelé néovascularisation. Dans la forme exsudative (**Figure 15**), la néovascularisation est à l'origine des complications contre lesquelles les ophtalmologistes luttent : micro-hémorragies, œdème rétinien, décollement de rétine, d'exsudation de liquides pouvant conduire à une fibrose [74].

1. Facteurs de risque de DMLA

Les causes précises de cette pathologie sont inconnues, mais il est établi que les causes sont multifactorielles (origine génétique et facteurs environnementaux). Aucun remède n'a pour le moment été trouvé car l'implication individuelle de ces facteurs est difficile à faire ressortir. Cependant, les traitements existants permettent de ralentir son évolution. Il existe plusieurs facteurs de risque liés à la DMLA :

- l'âge : le risque augmente de manière significative à partir de 50 ans ;
- le tabagisme ;
- l'hypertension artérielle : elle augmente le risque d'environ un cinquième ;
- l'exposition au soleil augmenterait sensiblement le risque, même s'il demeure difficile d'évaluer avec précision et de façon objective le niveau d'exposition réelle au soleil ;
- le surpoids est également un facteur de risque reconnu ;
- le sexe : il n'y a pas d'évidence que les femmes soient plus atteintes que les hommes, en revanche, leur longévité accrue explique le plus grand nombre de femmes vues en consultation souffrant de DMLA. Il n'y a donc pas de risque accru chez les femmes. Cependant, la BDES et l'AREDS constatent une prévalence accrue chez les femmes pour les stades précoces de DMLA ;
- les antécédents familiaux et les facteurs génétiques : les études de jumeaux et de parent au premier degré de sujets atteints mettent en évidence un risque accru certain de développer la maladie, suggérant une prédisposition génétique. Si un frère ou une sœur est atteint, le risque est multiplié par 4. Vingt pour cent des cas seraient familiaux. Ces dix dernières années, des progrès importants ont été réalisés pour identifier des gènes éventuellement impliqués dans le processus pathologique. De très nombreux gènes candidats se sont révélés jouer un rôle dans le risque de transmission ou de survenue d'une DMLA. Le gène codant la protéine ABCR (*adenosine triphosphate binding transporter protein*) fut l'un des premiers identifiés. Plusieurs

mutations sont corrélées avec un risque accru de développer la maladie. Les principales se situent sur les gènes codant *CFH* (facteur H du complément), *LOC387715* (protéine polymorphique de susceptibilité à la DMLA). Une mutation sur le gène codant la protéine C3 du complément [78] semble, par ailleurs, entraîner une progression plus rapide de la maladie [76], de même pour celui de la fraction C2 du complément [79] ou sur le *SERPING1* (protéine inhibant C1), codant également une enzyme régulatrice du complément [80]. D'autres mutations ont été décrites, avec une influence probablement moindre, comme celle sur le gène codant pour l'apolipoprotéine E (ApoE), qui transporte les lipides et le cholestérol dans le système nerveux [81], il y a un effet protecteur de l'allèle $\epsilon 4$ et un effet délétère du gène E2 de l'ApoE. D'autres travaux sont nécessaires pour clarifier le rôle de l'inflammation et de la CFH dans la survenue d'une DMLA. Néanmoins, les données actuelles suggèrent que les sujets ayant hérité d'un parent du gène CFH modifié auraient 2 à 4 fois plus de risque de développer la pathologie, si les deux parents transmettent le gène modifié, le risque est accru de 5 à 7 fois. Les modifications du gène CFH pourraient être responsables de 20 à 50 % du risque global de développer une DMLA. Une identification des personnes à risque pourrait être proposée dans les familles de sujets atteints. Les études portant sur les aspects génétiques de la DMLA soulignent l'intérêt de définir avec précision les différents phénotypes de la maladie, le rôle des mutations de certains gènes et le rôle des facteurs environnementaux ;

- la présence de radicaux libres et les facteurs nutritionnels : le corps produit naturellement des substances appelées des radicaux libres qui peuvent se multiplier anormalement en vieillissant ou en présence d'un système immunitaire affaibli. Lorsqu'ils deviennent trop nombreux dans l'organisme, les radicaux libres peuvent engendrer la DMLA. En effet, ils peuvent provoquer l'inflammation des cellules. Pour contrer ces phénomènes d'oxydation et d'inflammation, certains nutriments peuvent servir d'alliés : les antioxydants. En effet, les antioxydants ont la capacité de bloquer plusieurs réactions d'oxydation. Deux antioxydants ont reçus beaucoup d'attention pour leur rôle bénéfique sur la DMLA : la lutéine et la zéaxanthine. Un apport alimentaire élevé d'aliments riches en ces antioxydants permettrait de ralentir la progression de la maladie. Concrètement, ils diminuent les risques de passer d'un stade modéré à un stade avancé de la DMLA. Toutefois, le rôle de ces 2 antioxydants dans la prévention de la DMLA demeure encore incertain. Ainsi, les antioxydants (vitamine C, vitamine E et les caroténoïdes) interviendraient dans la survenue de la

DMLA, en raison de leur rôle physiologique et de leur présence dans la rétine. En France, l'étude POLA (pathologies oculaires liées à l'âge), conduite par le Dr Delcourt a été l'une des premières à montrer une corrélation entre une faible concentration plasmatique en antioxydants et en lutéine et zéaxanthine (caroténoïdes associées au pigment maculaire) et la DMLA [82-84]. Ces résultats viennent d'être confirmés par l'étude PIMAVOSA qui a aussi montré que la densité du pigment maculaire était significativement associée aux oméga-3 à longue chaîne tels que l'acide docosohéxaénoïque (DHA), acide docosapentaénoïque (DPA) et l'acide eicosapentaénoïque (EPA) [85]. De nombreuses études, comme l'étude Rotterdam ont effectivement permis d'associer les oméga-3 au risque d'apparition de la DMLA, ces derniers ralentiraient la progression de la pathologie [86, 87]. En effet, la supplémentation en oméga-3 a des effets bien connus sur la distribution et la composition des lipoprotéines, il est donc possible que les oméga-3 aient des effets sur les transporteurs rétinien de la lutéine et de la zéaxanthine [88]. Les minéraux à l'état de trace, tels que le zinc, le sélénium, le cuivre et le manganèse sont également impliqués comme antioxydants dans la rétine. Les lésions des photorécepteurs rétinien pourraient être dues à une photo-oxydation ou à peroxydation des lipides induits par les radicaux libres. Une supplémentation en antioxydants et en zinc diminue le risque de progression de la DMLA et de diminution de la vision selon l'AREDS. L'étude ALIENOR (antioxydants, lipides essentiels, nutrition et maladies oculaires) a permis de montrer l'association de ces facteurs nutritionnels avec les maladies oculaires. Pour la DMLA au stade précoce, la prévalence était de 28,4% et pour la DMLA au stade tardif, elle était de 5,6% [89].

La DMLA est une pathologie d'origine multifactorielle. Les stades précoces et les stades tardifs de la DMLA doivent être distingués, car leur retentissement fonctionnel est très différent. En effet, le risque d'évolution vers une forme tardive (exsudative ou atrophique) n'est pas le même pour tous les stades précoces. On ne sait pas pourquoi certains stades précoces de DMLA évoluent rapidement et d'autres lentement. Trop souvent, les études présentent des chiffres globaux, tous stades de DMLA confondus, non interprétables. Certaines mesures préventives semblent efficaces (arrêt du tabac, alimentation riche en oméga-3 et en légumes), mais les thérapeutiques curatives sont balbutiantes. Les travaux en cours sur l'origine génétique de cette pathologie associées à une définition précise des phénotypes permettront vraisemblablement de mieux définir les populations à risque.

B. Glaucome et gliose

Le glaucome est la deuxième cause de cécité dans le monde après la cataracte. On estime que plus de 68 millions de personnes sont touchées par le glaucome et que plus de 7 millions de personnes présentent une cécité bilatérale causée par cette maladie [90]. Il est actuellement prévu que 80 millions de personnes seront touchées par le glaucome en 2020 [90].

1. Epidémiologie des glaucomes

On estime en France à plus d'un million le nombre de personnes atteintes d'un glaucome à angle ouvert (GAO) ; environ 2 % des Français âgés de plus de 40 ans, soit 650 000 patients, bénéficieraient d'un suivi ophtalmologique, et environ 400 000 ignoreraient leur maladie en raison de l'absence de signes fonctionnels évocateurs avant un stade très tardif (source : Direction Générale de la Santé. Rapport du Groupe Technique National de Définition des Objectifs : élaboration de la loi relative à la politique de santé publique. Troubles de la vision). Plus récemment une enquête téléphonique sur 5726 sujets a permis d'évaluer le nombre de personnes traitées de façon durable par des solutions oculaires hypotonisantes dans notre pays à 1,2 million [91].

La prévalence du glaucome, c'est-à-dire la proportion de personnes concernées par cette pathologie dans une population donnée à un moment donné, augmente avec l'âge. Elle est variable chez les caucasiens selon les publications : de 1,8 % dans l'étude de Baltimore réalisée chez des caucasiens de plus de 60 ans [92], à 3,4 % dans l'étude de Beaver Dam chez des patients de plus de 65 ans [93]. Pour une définition moins restrictive du glaucome (glaucome défini ou probable), la prévalence passe à 4,2 % [92], et 7,0 % [93] dans ces 2 études.

Les données épidémiologiques sur le glaucome contribuent à une meilleure connaissance de la maladie que ce soit pour la fréquence et la répartition de la maladie, la recherche des facteurs de risque, l'identification des populations à risque, les causes de la maladie, l'évaluation des procédures de dépistage et leur faisabilité, la comparaison des traitements.

Les résultats de l'enquête française « glaucome et hypertension 1 jour » (EFGH1J), sont parus en 2003 et cette étude, réalisée en partenariat avec le Comité de Lutte contre le

Glaucome, les ophtalmologistes français et le laboratoire Pfizer, témoigne de l'intérêt d'une meilleure connaissance épidémiologique du glaucome [94]. Il s'agissait d'une enquête descriptive transversale de type 1 jour donné, effectuée auprès de l'ensemble des ophtalmologistes de France métropolitaine. Ceux-ci devaient inclure tous leurs patients âgés de 18 ans et plus, atteints d'un glaucome ou d'une hypertension oculaire, examinés dans la journée du 25 novembre 2003. Le taux de participation a été de 24,0 % (1173 ophtalmologistes). Parmi les 3919 patients inclus, 3896 (99,0 %) avaient des données utilisables pour l'analyse statistique. Lors de la promulgation des résultats, les ophtalmologistes ont déclaré voir en moyenne 16 patients atteints d'hypertension ou de glaucome par semaine. Les patients étaient atteints pour 29,5 % d'une hypertension oculaire, 61,7 % d'un glaucome à angle ouvert, 3,4 % d'un glaucome à pression normale et 5,5 % d'un glaucome par fermeture de l'angle. L'ophtalmologiste a eu recours à la chirurgie ou au laser dans 74,1 % des cas de glaucome par fermeture de l'angle, tandis que le traitement par des solutions oculaires hypotonisantes utilisées seules a dominé pour les autres pathologies. Au total, 87,0 % des patients étaient traités par un ou plusieurs solutions oculaires hypotonisantes, principalement des bêtabloquants (59,3 %), des prostaglandines (50,1 %), ou des inhibiteurs de l'anhydrase carbonique (21,6 %) et des mydriatiques sympathomimétiques (6,3 %). En conclusion de l'enquête « EFGH1J », les caractéristiques du glaucome et de l'hypertension oculaire correspondaient à celles des autres populations occidentales. Les attitudes thérapeutiques des ophtalmologistes français correspondaient aux recommandations internationales actuelles.

D'après Quigley [90] la répartition mondiale du glaucome à angle ouvert est identique à celle du glaucome par fermeture de l'angle, avec environ 33 millions de patients atteints pour chacun des deux états. Cependant, la répartition de ces deux types de glaucomes est différente selon les ethnies. Pour les caucasiens, la répartition est de 1 patient atteint de glaucome par fermeture de l'angle pour 11 atteints de glaucome à angle ouvert. Pour les africains, la fréquence des glaucomes par fermeture de l'angle est d'environ 1 pour 150 glaucomes. Trois-quarts des chinois atteints de glaucome présentent un glaucome par fermeture de l'angle [95]. Par contre, les japonais atteints de glaucome présentent surtout des glaucomes à angle ouvert, avec près de 70 % de glaucome à pression normale, alors qu'ils ne présentent pas des cornées particulièrement fines [96]. La proportion des glaucomes

secondaires (traumatisme, inflammation, corticothérapie) serait de 20 % [90]. Parmi les 66 millions de patients atteints de glaucome près de 10 % auraient une cécité bilatérale [90].

2. Facteurs de risque des glaucomes

Parmi les facteurs de risque majeurs de glaucome, l'âge et une pression intraoculaire (PIO) élevée sont reconnus et recherchés à l'examen clinique. Les images en fond d'œil permettent de déterminer s'il y a atteinte du nerf optique (excavation ou atrophie de la papille optique).

Des études épidémiologiques ont été lancées afin de déterminer quels facteurs de risques peuvent être associés au glaucome. L'étude ALIENOR (introduite dans le chapitre DMLA) a permis de confirmer l'association des facteurs nutritionnels avec le glaucome à angle ouvert (GAO) et l'hypertonie oculaire. La prévalence de ces facteurs de risque était de 4,8% et 10%, respectivement [89]. Une étude exploratoire a permis d'associer au glaucome des facteurs de risque potentiels, c'est-à-dire la fumée de cigarette, les habitudes alimentaires, le mode de vie et l'exposition aux pesticides. Dans cette étude récente, des cas répertoriés de patients atteints de glaucomes primaires à angle ouvert (GPAO) ($n=339$) ont été comparés à des patients atteints d'hypertonie oculaire, c'est-à-dire les contrôles appariés afin de les discriminer [97].

L'ethnie et les antécédents familiaux de glaucome (glaucomes congénitaux) sont également reconnus comme facteurs de risque. Cependant, l'existence d'antécédents familiaux de glaucome ne semble pas être un facteur de progression de la maladie. Différents gènes ont été identifiés, mais leur rôle apparaît complexe. Les mutations du gène de la myociline sont plus fréquentes chez les patients atteints de glaucome (4,1 %) que chez les sujets sains (0,8 %) [98]. Certaines combinaisons alléliques de cette mutation ont été reliées à des formes plus sévères et plus résistantes au traitement [99].

L'épaisseur de la cornée est également un facteur d'apparition du glaucome [100]. L'étude OHTS (*Ocular Hypertension Treatment group Study*) a retrouvé un risque d'apparition du glaucome augmenté avec la diminution de l'épaisseur cornéenne : par rapport à un groupe de patients à l'épaisseur cornéenne supérieure à 588 μm , les patients avec une épaisseur cornéenne entre 555 et 588 μm présentaient un risque d'apparition du glaucome

multiplié par 1,7 ; et les patients dont l'épaisseur cornéenne était inférieure à 555 μm , un risque multiplié par 3,4 [101].

Au-delà de la pression oculaire elle-même, d'autres facteurs vasculaires représentent des facteurs de risque de glaucome. Ils affectent en particulier la régulation de la pression sanguine au niveau du disque optique [102]. Il s'agit alors bien plus de la pression de perfusion que de la PIO elle-même. Cette pression de perfusion se définit comme la différence entre la pression artérielle au niveau de l'œil et la PIO. Elle est associée au flux sanguin au niveau de l'œil, et en particulier au niveau de la lame criblée, c'est-à-dire la structure riche en collagène qui, à la façon d'un tamis, sépare les fibres des axones des cellules ganglionnaires non myélinisées de leur partie myélinisée au sein du nerf optique. Une pression élevée à ce niveau est susceptible de créer une ischémie des structures vasculaires (veines et artères) [103]. La fluidité des membranes des érythrocytes est également un paramètre qui est suspecté intervenir dans leur déformabilité, leur aggrégabilité, et par voie de conséquence leur capacité à assurer le transport des éléments nutritifs aux tissus. Une étude de notre laboratoire a ainsi décrit que la composition des membranes des érythrocytes est modifiée chez des patients glaucomateux par rapport à des sujets témoins. En particulier la teneur en plasmalogènes des globules rouges, qui est un paramètre qui modifie la fluidité des membranes, a été inversement associée à la sévérité des altérations du champ visuel chez ces patients [104].

L'existence de chacun de ces facteurs pourrait déterminer un risque individuel de développer un glaucome, mais ces facteurs n'en sont pas forcément la cause. Par exemple, bien qu'une forte PIO soit commune chez les patients atteints de GAO, seule une petite partie de ces patients développeront un GAO [105].

Bien qu'une PIO élevée soit un risque majeur de la dégénérescence des CGR, l'élévation de la PIO n'est pas significativement retrouvée dans les différents glaucomes. En effet, il existe des glaucomes à pression normale pour lesquels il a été proposé d'autres facteurs de risque conduisant à la mort des CGR par apoptose. La toxicité liée au glutamate et à l'acide nitrique (NO) [106, 107] en sont des exemples.

3. Signes cliniques des glaucomes

L'hypertonie oculaire, le facteur de risque le mieux identifié pour les glaucomes, se caractérise par une pression intra-oculaire supérieure à 21 mmHg. L'hypertonie oculaire peut être primitive ou secondaire, et nécessite pour sa définition un champ visuel blanc/blanc normal et une papille optique jugée normale. Les glaucomes sont caractérisés par une neuropathie optique progressive, avec des altérations périmétriques et/ou des anomalies glaucomateuses de la papille.

Plusieurs essais cliniques existent depuis quelques années, prennent en compte la PIO et proposent des traitements médicaux dont la cible est de limiter la progression de la PIO. Le glaucome doit être traité très précocement, car une fois qu'il est en progression, il est très difficile de le traiter. Les patients pour lesquels les tous premiers signes du glaucome apparaissent sont à traiter différemment de ceux qui ont un glaucome déjà installé et qui progresse lentement. En effet la perte visuelle peut être bien plus importante dès les premières variations de pression ou être moins avancée chez les patients qui ont déjà une PIO élevée.

Dans la plupart des études prospectives, l'impact de l'élévation de la PIO est difficilement évaluable puisque les patients sont sous traitement hypotonisant. On retrouve dans ces études une relation faible entre le niveau moyen initial de PIO et la détérioration du champ visuel. Deux exemples d'études prospectives sont désignés ci-dessous :

-EMGT (*Early Manifest Glaucoma Trial*) : cette étude a suivi deux groupes de patients traités et non traités [108]. Cette étude montre d'une part que la PIO initiale est un facteur de risque important d'aggravation avec un risque majoré de 70 % chez les patients avec une PIO supérieure à 21 mmHg par rapport aux patients avec une PIO inférieure à 21 mmHg. D'autre part, elle confirme clairement l'efficacité du traitement par des solutions hypotoniques sur le risque de progression avec une diminution de 10 % du risque de détérioration du champ visuel par baisse d'unité de pression (mmHg). Néanmoins, chez certains patients, une détérioration du champ visuel survient malgré un contrôle jugé satisfaisant de la PIO mesurée à la consultation. Cette détérioration pourrait être la conséquence de variations nycthémérales de la PIO non mesurables pendant les heures de visite ;

-CIGTS (*Collaborative Initial Glaucoma Treatment Study*) : cette étude a permis de comparer l'efficacité d'une thérapie médicale standard versus intervention chirurgicale pour traiter les patients chez qui un GPAO débutant a été diagnostiqué. Les résultats de l'étude ont

montré qu'après 5 ans de suivi, la PIO des deux groupes était diminuée. Dans le groupe traité chirurgicalement, la PIO était de 2 à 3 points plus faible que le groupe traité médicalement. Mais les risques de cataractes sont plus élevés dans le groupe traité chirurgicalement [109].

Concernant les tests mono-oculaires, les deux yeux doivent avoir la même PIO au début des tests, et il ne doit pas y avoir d'influence du traitement sur l'œil qui n'est pas traité. Ces tests mono-oculaires sont prédictifs de la réponse de l'œil qui n'est pas traité, mais il n'y a pas de différence avec le fait de traiter les deux yeux indépendamment. En fait, plutôt que l'élévation de PIO, les spécialistes se demandent s'il ne faut pas plutôt analyser les fluctuations nyctémérales de PIO, et si ces dernières ne seraient pas un facteur de risque. Cependant les fluctuations diurnes et nocturnes de PIO ont déjà été étudiées [110] et sont étroitement liées à la PIO et à l'heure actuelle, elles ne sont pas considérées comme un facteur de risque indépendant de la PIO.

Le champ visuel d'un patient glaucomateux est progressivement réduit jusqu'à la cécité (**Figure 16**). La perte du champ visuel corrèle avec la perte des cellules ganglionnaires de la rétine (CGR) [111].

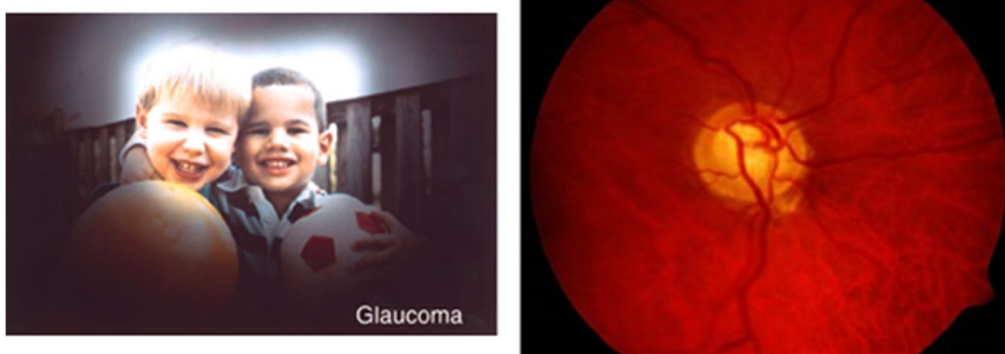


Figure 16 : *Vision d'un patient atteint de glaucome (à gauche). Le champ visuel est réduit. Image en fond d'œil d'un patient atteint de glaucome (à droite).*

Les modifications de la papille peuvent être considérées comme des facteurs d'aggravation ou comme des signes annonciateurs d'une détérioration du nerf optique, mais ils sont fortement prédictifs d'une altération future du champ visuel.

Une caractéristique commune à tous ces types de glaucomes est la mort des CGR. On estime que la perte liée à l'âge des CGR s'élève de 0,25 à 0,75% de la population de CGR totale par an ; cette valeur atteint 4 à 7% en condition de glaucome [112]. La perte des CGR et de leurs axones est dépendante de l'âge [112]. La perte axonale naturelle est de 2 500 axones par an jusqu'à 50 ans, puis passe à 7 500 après 50 ans. L'épaisseur de la couche des fibres du nerf optique diminue aussi avec l'âge [113] (**Figure 17**).

Au cours du GPAO, les connections entre les astrocytes et les capillaires sont rompues. Le tissu connecteur est épaissi, et la densité capillaire (vasculaire) est réduite, ce qui peut être à l'origine de blessures « mécaniques ».

Les recherches sur le glaucome sont focalisées en tenant compte des aspects suivants :

- les photorécepteurs interagissent avec la couche de l'EPR,
- les axones meurent indépendamment du corps cellulaire,
- les CGR interagissent avec les cellules gliales.

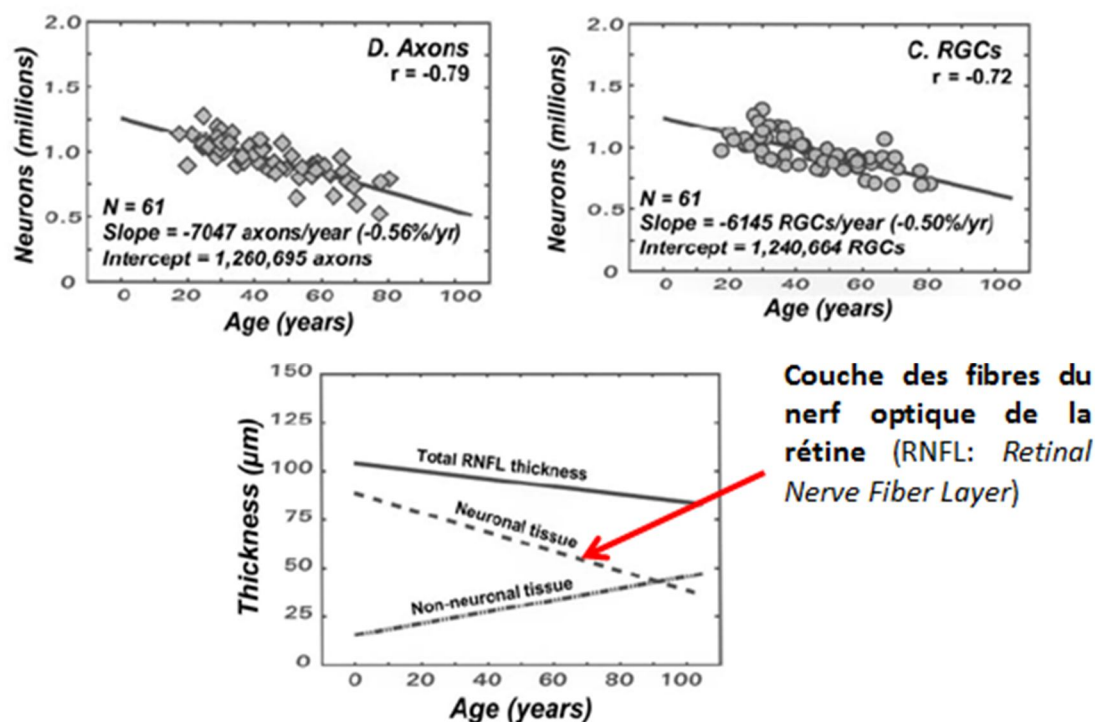


Figure 17 : Représentation graphique de la perte axonale et ganglionnaire en fonction de l'âge. D'après [112] et [113].

4. La gliose des cellules de Müller

i. Définitions et origine de la glie

Le terme « neuroglie » (du grec qui signifie « glue nerveuse ») a été introduit en 1858 par le pathologiste Rudolf Virchow. Au cours de ses recherches sur le SNC, il a découvert des cellules qui, apparemment, n'étaient pas des cellules nerveuses comme le sont les neurones, et les a appelées « glie » ou « cellules gliales ». Ce nom peu attractif, ajouté au fait qu'il leur attribuait un rôle très mineur dans les fonctions du SNC, a contribué au fait que pendant une centaine d'années ces cellules ont été négligées [56]. Des neuro-pathologistes, fascinés par la sculpture complexe de l'appareil de Golgi des cellules gliales dans des coupes de cerveau, ont réalisé que ces cellules étaient impliquées dans la quasi-totalité des altérations et pathologies du cerveau [114].

Ces trente dernières années, des méthodologies innovantes et avancées en neurosciences ont montré qu'il n'y a pratiquement aucun événement durant le développement ontogénétique, fonctionnel (maturité) ou pathologique du SNC qui n'implique pas les cellules gliales [114].

ii. La gliose réactive des cellules de Müller

Les cellules gliales répondent aux *stimuli* de stress par un mécanisme appelé « gliose ». La gliose représente une stratégie que le tissu ou l'organe va mettre en place dans le but de protéger les tissus des lésions collatérales, et de promouvoir et inhiber simultanément la réparation tissulaire et le remodelage cellulaire. Ceci permet d'achever la régénération des fonctions cellulaires et le maintien de la constance fonctionnelle des circuits, respectivement. Cependant, ces effets bénéfiques de la gliose réactive ne sont pas toujours dominants. En effet, en réponse à toute altération pathologique de la rétine (incluant les lésions photopiques, les traumatismes réiniens, l'ischémie, le décollement rétinien, le glaucome, la rétinopathie diabétique, et la DMLA), les CGM deviennent activées [26, 115]. La glie réactive inclut des changements morphologiques, biochimiques et physiologiques des CGM. Ces altérations varient avec le type et la sévérité du dommage ou de la pathologie. Les bénéfices précoces de la gliose peuvent alors devenir nuisibles quand la lésion est prononcée ou lors d'une pathologie chronique comme cela se produit dans la plupart des dégénérescences de la rétine, comme au cours du glaucome. En effet, des données indiquent

que les CGM surexprimant la protéine gliale fibrillaire (GFAP) peuvent aggraver la mort neuronale dans un état pathologique.

Ainsi, cette réactivité gliale peut avoir, à la fois, des effets cytoprotecteurs et cytotoxiques sur les neurones de la rétine [31, 115].

ii.a. Effets protecteurs de la gliose des cellules de Müller

La gliose est une stratégie cellulaire permettant de limiter l'expansion des lésions collatérales. Aux temps précoces, en particulier, la gliose est neuroprotectrice.

Les réponses des CGM impliquent un grand nombre de mécanismes différents incluant la clairance des niveaux élevés de potassium [26], l'utilisation du glutamate en excès qui est neurotoxique en particulier pour la rétine interne [116, 117], le relargage d'anti-oxydants [26, 115, 118] et la production de facteurs neurotrophiques, facteurs de croissance, cytokines et erythropoïétine qui protègent les photorécepteurs et les neurones de la mort cellulaire [119-122].

Dans le modèle de dégénérescence rétinienne induite par des injections intravitréennes de récepteur ionotrope N-méthyl-D-aspartate (NMDA), une dégénérescence des cellules ganglionnaires de la rétine (CGR) et des cellules de la CNI est observée [123]. L'invalidation du gène codant la protéine ERK1 (kinase régulant le signal extracellulaire, type 1) chez les souris entraîne une apoptose plus importante dans les deux populations (5 fois plus dans les CGR et 2 fois plus dans la CNI), suggérant un effet neuroprotecteur de l'activation de la protéine de signalisation ERK1 contre la neurotoxicité liée au NMDA.

En conditions hypoxiques, la sécrétion du facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF) par les CGM en culture est associée à une inhibition de l'apoptose des cellules endothéliales vasculaires rétiniennes bovines [124].

De plus, l'application de VEGF et d'erythropoïétine sur des explants de rétine de rats favorise la croissance axonale des CGR [125].

Le traitement de neurones corticaux de rat avec du VEGF entraîne une augmentation de la survie de ces neurones [126]. Cette augmentation de la survie est associée à une augmentation dose-dépendante de l'expression du facteur anti-apoptotique Bcl-2, et à une diminution de l'activation de la caspase-3 dans ces neurones. Dans cette étude, le VEGF

induit une diminution dose-dépendante de la libération du peptide neurotoxique amyloïde- β par les neurones corticaux.

Ces données suggèrent que le VEGF peut également avoir un effet trophique sur la survie des cellules de la rétine.

La gliose des CGM viserait avant tout à préserver l'homéostasie de la rétine.

De récentes recherches ont montré qu'en présence de glutamate, les CGM peuvent se multiplier et se différencier en cellules souches pour produire d'autres cellules rétinienne. Ceci pourrait être un axe de recherche prometteur pour les rétinopathies dégénératives.

ii.b. Effets délétères de la gliose des cellules de Müller

Des altérations gliotiques impliquent la rupture des mécanismes homéostatiques normalement maintenus par les CGM et peuvent contribuer à des effets cytotoxiques directs ou indirects. De plus, une altération des fonctions de support des CGM pourrait avoir des effets additionnels sur le dysfonctionnement et la perte neuronale en augmentant la susceptibilité aux *stimuli* de stress de la rétine pathologique [26].

En effet, une diminution de l'expression des protéines impliquées dans des fonctions spécifiques (résumées dans le **Tableau 1**, partie I.C. paragraphe ii : les cellules de Müller) telles que : le recyclage des neuromédiateurs (par la glutamine synthétase (GS)), la détoxification de l'ammoniaque (NH_4^+), le recyclage des photopigments (CRALBP), l'osmohoméostasie (Kir4.1, AQP4) a un impact sur les CGM. On peut supposer que la dérégulation des fonctions assurées par ces protéines rompt l'interaction neurone-glie et contribue au développement d'œdèmes rétiens, à l'hyper-excitation neuronale et à la toxicité par le glutamate, qui est une cause majeure de la neurodégénérescence de la rétine [116].

Les effets cytotoxiques directs des CGM sont observés par le relargage de facteurs solubles tels que les cytokines pro-inflammatoires comme le facteur de nécrose des tumeurs (TNF- α). Ceci exacerbe l'inflammation locale. Cette action cytotoxique des CGM contribue à

la dégénérescence rétinienne dans de nombreuses rétinoopathies telles que la rétinoopathie diabétique ou le glaucome.

La production excessive d'oxyde nitrique (NO) par les CGM et la formation de radicaux libres entraîne la nitrosylation des protéines, ce qui a pour conséquence des effets toxiques sur les neurones avoisinants.

Dans un modèle d'excitotoxicité dû à l'excès de glutamate, il est montré que les CGM causent la mort des CGR selon un mécanisme cellulaire non autonome. Le glutamate entraîne l'activation des récepteurs au NMDA, puis active la voie NF- κ B (facteur nucléaire kappaB), d'où la sécrétion de TNF- α qui augmente la susceptibilité des CGR par activation des récepteurs AMPA (récepteur ionotrope au glutamate induisant la perméabilité au Ca^{2+}) [127]. Les vagues calciques induisent le stress des organelles (RE, mitochondries) et l'activation des voies pro-apoptotiques. Le processus excitotoxique se propage et prend le dessus sur les facteurs neurotrophiques. Les CGM sont responsables de la récupération du glutamate en excès via les transporteurs au glutamate et à l'aspartate (GLAST), et un déficit dans leur fonction de transport contribue aux lésions des CGR (**Figure 18**).

Dans un modèle de dégénérescence des photorécepteurs au cours du décollement rétinien, l'invalidation des gènes codant la GFAP et la vimentine est associée à une diminution de l'activation des CGM (démontrée par une diminution de la phosphorylation de ERK1/2) [123]. Dans ce modèle, MCP-1 (protéine chimio-attractrice des monocytes) promeut l'infiltration des cellules immunes, ce qui entraîne l'apoptose des photorécepteurs. Or, la diminution de l'activation des CGM est aussi associée à une diminution de la sécrétion de MCP-1 et à une inhibition de l'infiltration des cellules microgliales dans l'espace sous-rétinien. Ceci démontre le lien entre la gliose des CGM et l'inflammation dans la rétine [123].

La formation d'une cicatrice gliale après une atteinte de la rétine peut contribuer à la dégénérescence rétinienne et entraver la régénération du tissu rétinien. Ainsi, dans un modèle de décollement rétinien chez le chat, les prolongements des CGM activées forment un tissu fibreux et contractile induisant de façon mécanique la dégénérescence des segments externes des photorécepteurs [128].

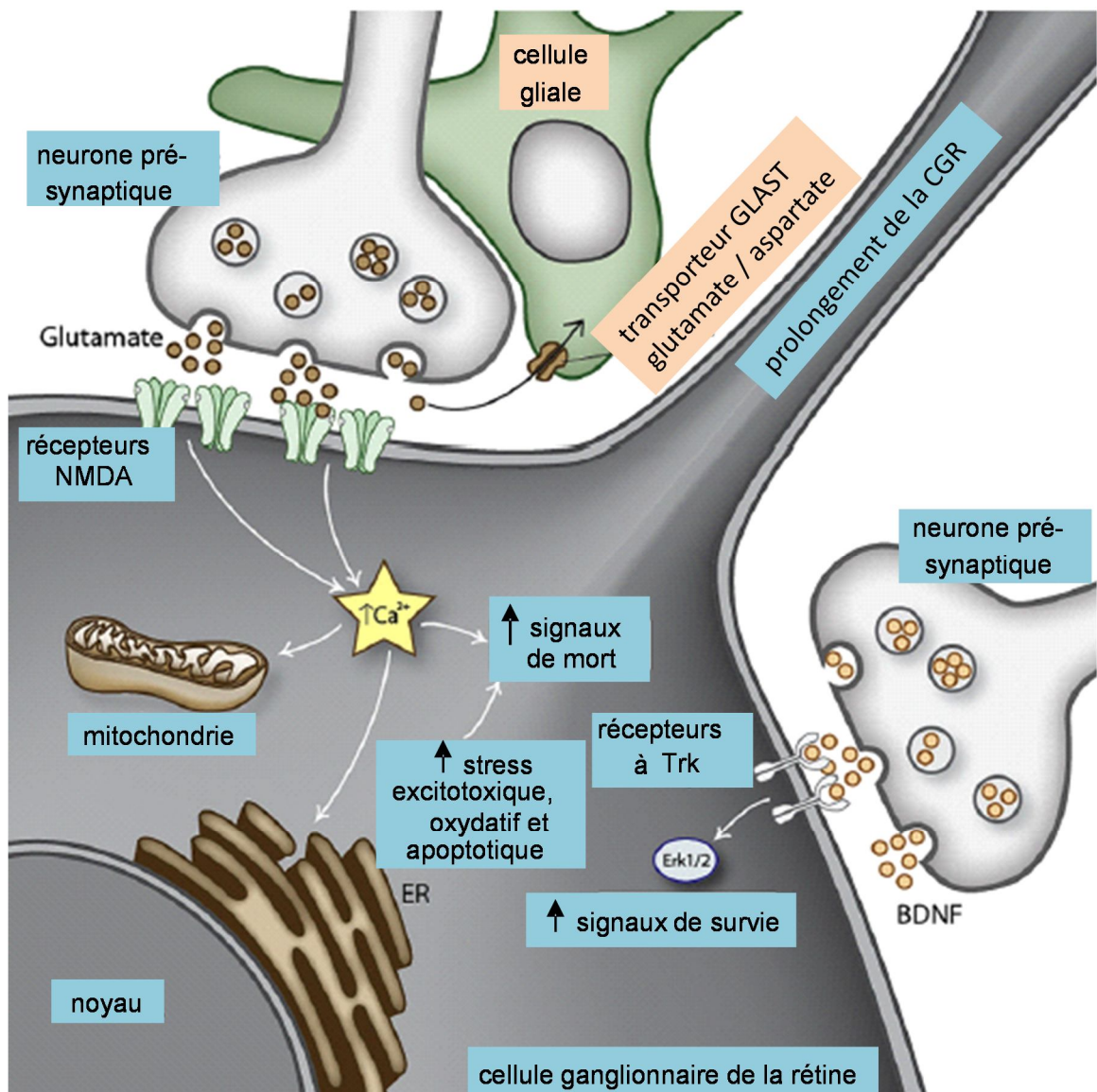


Figure 18 : le modèle classique du processus excitotoxique dû à l'excès de glutamate.
D'après [129].

Le **Tableau 2** récapitule l'implication de différents mécanismes mettant en jeu les CGM au cours de diverses pathologies rétiniennes.

Tableau 2 : Caractéristiques des CGM au cours de diverses pathologies. D'après [26, 31].

	Décollement rétinien	Rétinopathies prolifératives	Rétinopathies diabétiques	Ischémie Reperfusion	Inflammation	Glaucome
Expression de :						
• GFAP	↑	↑	↑	↑	↑	↑
• Glutamine Synthétase	↓	nd	nd	nd	nd	nd
• facteurs de transcription	↑	nd	nd	nd	nd	nd
• Phosphorylation d'ERK	↑	nd	nd	●	●	●
Conductance K ⁺	↓	↓	↓	↓	↓	↓
Potentiel de membrane	↓	↓	nd	↓	↓	↓
Réponses P2Y médiées par Ca ²⁺	↑	↑	nd	nd	nd	nd
Dislocation des canaux Kir4.1	✦	nd	●	●	●	nd
Relargage de facteurs angiogéniques	nd	nd	●	●	nd	nd
Apoptose	nd	nd	●	nd	nd	nd

Expression :
 nd : non déterminée ↑ augmentée ↓ diminuée ✦ modifiée ● pas de modification

Le glutamate relargué par les CGM suite à l'exposition au VEGF peut activer directement les récepteurs AMPA/kainate dans les CGR, ce qui a pour conséquence le gonflement osmotique des corps cellulaires neuronaux [130] (**Figure 19**).

De plus, le relargage calcium-dépendant du glutamate des CGM peut avoir un impact fonctionnel en conditions pathologiques, lorsque la réponse au calcium sous l'activation de récepteurs purinergiques (récepteurs à P2Y₁) est augmentée, par exemple lors d'un décollement de la rétine ou dans les rétinopathies prolifératives (**Tableau 2**).

ii.c. Le gonflement osmotique des CGM

Le gonflement osmotique est un procédé cellulaire employé par les CGM pour maintenir l'osmohoméostasie cellulaire (**Figure 19**). C'est par ce procédé que les CGM

détoxifient l'environnement cellulaire, notamment, par exemple, suite au relargage massif de glutamate par les neurones.

Cependant, ce mécanisme est utilisé également par les CGM en conditions pathologiques. En effet, les CGM utilisent l'acide arachidonique, afin de pouvoir inhiber des vagues calciques (Ca^{2+}) libérées lors d'un *stimulus* de stress, et cela passe par le mécanisme de gonflement osmotique [131].

Le mécanisme du gonflement osmotique illustré sur les images de la **Figure 19** est expliqué ci-dessous :

- En (A) : Dans la rétine saine, les CGM déshydratent le tissu rétinien sous la dépendance de l'activité neuronale. Pour cela, les neurones activés relarguent le K^+ dans l'espace extracellulaire, ce K^+ est récupéré par les CGM via les canaux K^+ exprimés dans leur membrane plasmique. Ce K^+ est aussi relargué dans la circulation sanguine à travers les canaux Kir4.1 exprimés par les prolongements périvasculaires des CGM. Les courants K^+ trans-gliaux sont osmotiquement couplés, ce qui permet à l'eau de circuler à travers les corps cellulaires des CGM depuis le parenchyme rétinien jusqu'à la circulation sanguine. Le transport trans-gliale de l'eau est facilité par les canaux aquaporine-4 exprimés dans la membrane plasmique des CGM.
- En (B) : Les CGM des rétines inflammées, ischémiques ou diabétiques sous-expriment les canaux Kir4.1 qui sont normalement exprimés dans les feuillets plasmiques périvasculaires, ce qui résulte dans l'inhibition du relargage de K^+ dans la circulation et l'interruption des courants K^+ déshydratants au travers des CGM, tandis que les cellules continuent à puiser le K^+ depuis les canaux K^+ (Kir2.1) exprimés dans les domaines membranaires des CGM qui jouxtent les neurones rétinien. Ce mécanisme augmente la pression osmotique dans les cellules, ce qui entraîne une différence de pression à l'interface glio-vasculaire qui est favorable à l'entrée de l'eau dans la cellule à travers les canaux aquaporine-4 (AQP-4) qui sont toujours exprimés. En plus de cela, le stress osmotique de la membrane périvasculaire active la phospholipase A_2 , et la production d'acide arachidonique, et de ses dérivés tels que les prostaglandines (PG) et des leucotriènes (LT). Ceci entraîne un flux important de Na^+ dans la

cellule qui va forcer l'entrée de l'eau dans la cellule, d'où le gonflement osmotique des CGM. Puisque la déshydratation de la rétine par les CGM est dérégulée dans la rétine pathologique, ceci pourrait aussi exacerber l'accumulation extracellulaire des fluides dérivés des vaisseaux éclatés.

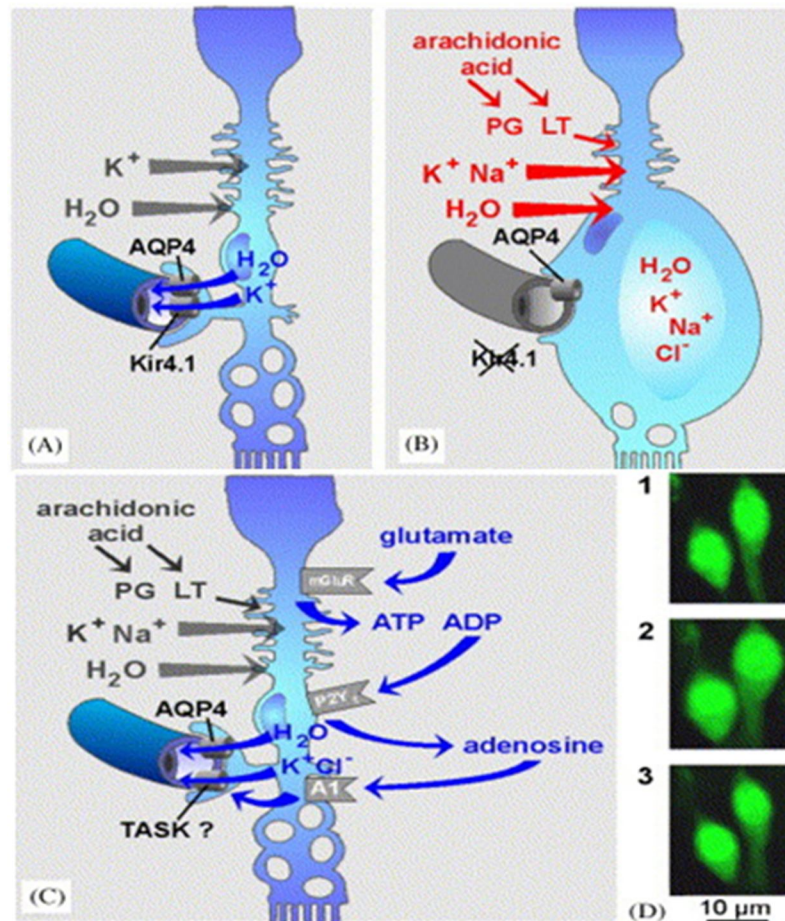


Figure 19 : Gonflement osmotique des cellules de Müller dans la rétine saine et pathologique. D'après [132, 133].

- En (C) : Le relargage de glutamate par les neurones rétiens passe par une cascade purinergique qui inhibe le gonflement osmotique des CGM. Cette voie implique le relargage d'ATP endogène et d'adénosine, et l'activation consécutive des récepteurs à P2Y₁ et à l'adénosine A1. L'activation du récepteur A1 entraîne l'ouverture des canaux K^+ (appelés canaux TASK) [134] des prolongements périvasculaires membranaires des CGM. Ceci permet le

relargage d'ions K^+ dans la circulation sanguine et la déshydratation de la rétine, ce qui va inhiber le gonflement cellulaire.

- En (D) : Exemple de gonflement osmotique des CGM dans une coupe mince (10µm) de rétine ischémique chez le rat. Le soma cellulaire a été observé avant (1), pendant (2) et après (3) l'application d'une solution hypotonique à 60% d'osmolarité [132, 133].

5. Glaucome et gliose

L'élévation de la PIO entraîne des changements délétères des astrocytes au niveau de la tête du nerf optique. L'activation des astrocytes pourrait représenter un événement initial primaire ayant pour but de limiter l'extension des lésions neuronales et de promouvoir la réparation tissulaire, mais les astrocytes réactifs peuvent aussi avoir des effets nocifs sur les axones du nerf optique en créant un dommage mécanique et en changeant le microenvironnement neuronal, résultant dans l'activation de l'auto-destruction autonome des axones des CGR et la mort par apoptose du soma des CGR [135]. Les CGR qui dégénèrent peuvent de manière adverse affecter les cellules avoisinantes dans une vague de dégénérescence secondaire impliquant l'exposition au glutamate [135]. Ces altérations sont associées avec des lésions collatérales au niveau des capillaires dans la couche du nerf optique, suggérant que l'ischémie est un facteur pathogénique secondaire (et tardif) au cours du glaucome [136]. La perte de CGR et de fibres nerveuses (nerfs optiques) est remplacée par les prolongements des CGM qui forment une cicatrice gliale [135, 136].

Les CGM réactives exercent des effets à la fois protecteurs et délétères sur les CGR en détresse. Dans les yeux de patients glaucomateux, les CGM montrent une activation persistante comme indiqué par leur morphologie hypertrophiée, une expression croissante de GFAP et de S-100, une augmentation de la phosphorylation de ERK 1/2 et de l'expression de la capsase-3 [137-139]. Chez les patients glaucomateux, l'activation des astrocytes de la rétine est corrélée à la dérégulation vasculaire, et est en rapport avec le stade d'avancement du glaucome [140].

6. Glaucome, gliose, stress oxydatif et inflammation

Les CGM peuvent moduler la seconde vague de mort des CGR en protégeant ces derniers de la toxicité due au glutamate et du stress oxydatif ou NO [141]. Cette toxicité conduit à la privation cellulaire de BDNF, et à l'apoptose des CGR (**Figure 20**).

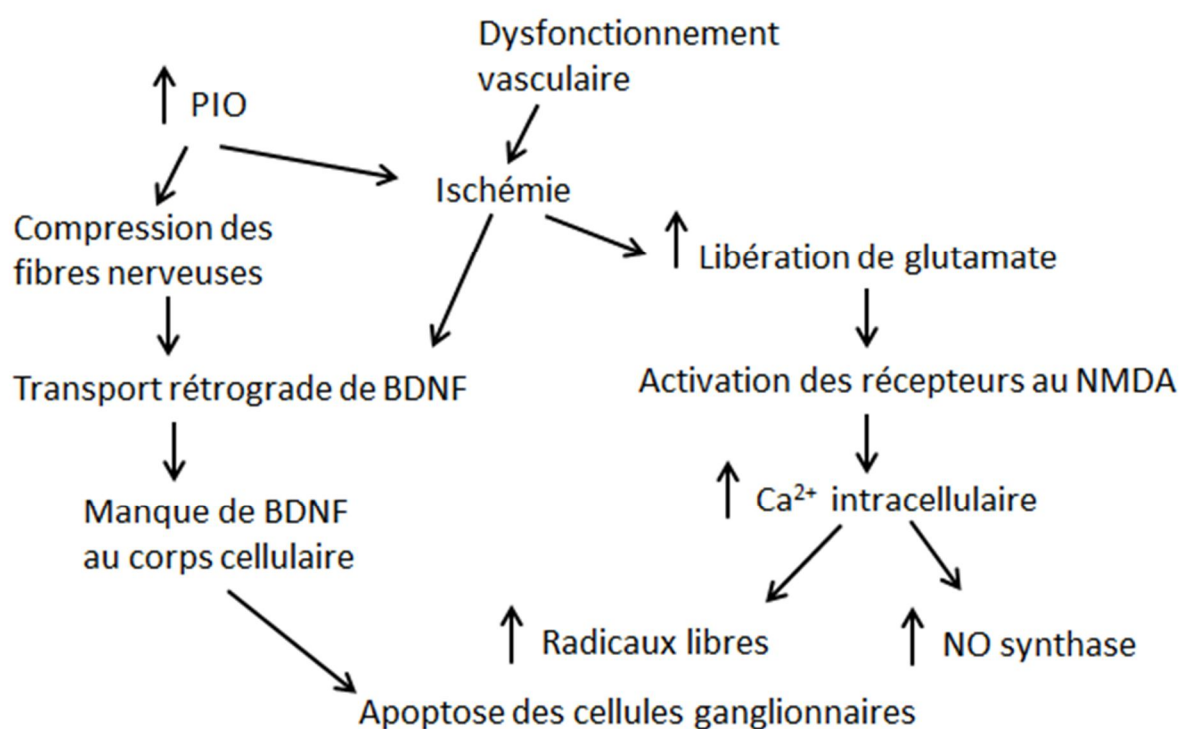


Figure 20 : Mécanismes conduisant à la mort des cellules ganglionnaires après élévation de la PIO. BDNF : facteur neurotrophique dérivé du cerveau. NMDA : récepteur ionotrope N-méthyl-D-aspartate. D'après [138].

Ceci pourrait particulièrement être conduit par le recyclage du glutamate, le relargage d'anti-oxydants comme le glutathion ou la céruloplasmine ferroxidase, ou encore par un mécanisme protecteur de contact contre l'activité NO [115]. Les CGM sont les sources principales d'érythropoïétine de la rétine [120]. L'érythropoïétine vient à la rescousse des CGR après l'hypertonie chronique oculaire [120]. Dans les yeux glaucomateux, les astrocytes et CGM augmentent l'expression d'éphrine B1 tandis que les CGR augmentent l'expression du récepteur à l'éphrine B1 [142]. L'activation de la voie Eph/éphrine pourrait jouer un rôle protecteur en limitant le dommage axonal et ganglionnaire et en limitant également l'invasion de cellules inflammatoires [142].

Dans les yeux glaucomateux, les CGM présentent un niveau élevé de glutamine, reflétant la nécessité de détoxifier le niveau élevé de glutamate qui en résulte [143]. Les désordres fonctionnels liés à la consommation de glutamate des CGM pourraient être une des étiologies de la seconde vague de mort des CGR au cours du glaucome, particulièrement chez des patients avec un contrôle satisfaisant de la PIO [106, 141]. Puisque les CGM expriment la protéine GLAST-5 (transporteur glial du glutamate), particulièrement dans les processus impliquant les CGR [144, 145], une diminution de l'expression et de l'activité de la glutamine synthétase (GS) par les CGM entraîne une efficacité moindre du recyclage de glutamate. Ceci exacerbe le dommage excitotoxique neuronal [146, 147]. Il a été montré que les diminutions de la consommation de glutamate et de l'activité de la GS précédaient les altérations fonctionnelles et histologiques induites par l'hypertonie oculaire, ce qui suggère que les altérations du cycle glutamate/glutamine apportées par les CGM contribuent à la mort des CGR au cours du glaucome [148]. La diminution de l'activité de GLAST lors d'un glaucome expérimental coïncide avec l'entrée en hypoxie de cellules de la rétine interne, induisant alors des lésions histologiques [149]. En effet, l'inhibition de l'activité de GLAST provoque l'entrée de glutamate dans les CGR [149]. Les souris knock-out pour GLAST démontrent une dégénérescence spontanée des CGR et du nerf optique sans élévation de la PIO, et une diminution du niveau de glutathion dans les CGM [147]. Le stress oxydatif stimule la présentation antigénique des cellules gliales de la rétine par le biais de l'augmentation des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH II). En conséquence, les cellules gliales rétinienne médient l'activation du système immunitaire qui accompagne la dégénérescence associée au glaucome [150].

Dans les yeux glaucomateux, les CGM sur-expriment un composant du complément (C1q). Cette surexpression a lieu bien avant que les lésions infligées aux CGR ne se propagent, suggérant que certains facteurs du complément exprimés par les CGM jouent un rôle dans la pathogénèse du glaucome [151]. En réponse à l'élévation de la pression hydrostatique, les CGM produisent l'oxyde nitrique (NO) et le facteur de nécrose des tumeurs (TNF- α) qui également contribuent à la mort par apoptose des CGR [152].

La balance homéostatique de la rétine est influencée par des signaux positifs (neuroprotecteurs) ou négatifs (neurotoxiques), par exemple :

-des travaux montrent que chez les souris $TNF^{-/-}$, la perte neuronale est significativement moins importante [153]. Cependant, il peut y avoir un effet positif de la neurotoxicité du $TNF-\alpha$ puisqu'il peut indirectement promouvoir des voies de survie cellulaire. En effet, la voie de signalisation $TNF-\alpha$ / $TNFR1$ est une voie très complexe. Cette voie implique la surexpression de nombreuses molécules de signalisation et protéines régulatrices. L'équipe de Tezel a présenté un travail réalisé à partir de rétines de donneurs humains (glaucomeux ou sains) sur la régulation négative de $TNF-\alpha$ et de la voie $NF-\kappa B$ par le $TNFAIP3$ (*tumor necrosis factor alpha induced protein 3*) qui est aussi appelé « protéine à doigt zinc A20 ». Le rôle de cette protéine régulatrice a été déterminé par une étude bioinformatique et protéomique [154]. $TNFAIP3$ est soumis à des variations épigénétiques. En effet, la méthylation des cytosines dans la région du promoteur du gène codant $TNFAIP3$ révèle une très grande variabilité parmi les patients glaucomateux,

-les récepteurs à activité thréonine kinase (Trk) jouent un rôle dans le maintien et la survie des CGR (**Figure 18**). Leur surexpression n'entraîne pas la mort des CGR puisque l'activation des récepteurs TrkA serait protectrice pour les CGR. En effet, la co-expression de TrkA et p75(NTR) par les CGM augmente la liaison du facteur de croissance NGF (*nerve growth factor*) au récepteur TrkA [155], ce qui promeut la survie des CGR. Cependant, lorsque le rapport TrkA/p75(NTR) est faible, c'est-à-dire lorsqu'il y a une forte activation des récepteurs à p75(NTR), ceci est un signal que la glie perçoit comme négatif [156]. Au cours du glaucome, la surexpression d' α -2 macroglobuline (α -2M) par les cellules gliales positives pour p75(NTR) cause la mort des CGR. Le $TNF-\alpha$ est co-localisé avec α -2M dans les cellules gliales. En conditions normales, α -2M est un médiateur de mort cellulaire pour les CGR dépendantes de p75(NTR). Dans l'humeur aqueuse des patients glaucomateux, l' α -2M soluble est retrouvée à des taux plus importants que chez les patients opérés pour une cataracte. L' α -2M pourrait être utilisée comme biomarqueur du glaucome.

Ces travaux mènent à des stratégies pharmacologiques neuroprotectrices pour passer outre la neurotoxicité : trouver des agonistes spécifiques de TrkA qui ne se lient pas à p75(NTR) ou qui ne sont pas neutralisés par l' α -2M [157, 158].

III. Cholestérol, oxystérols et enzymes à cytochrome P450

A. Métabolisme du cholestérol

1. Fonctions et métabolisme général du cholestérol

Le cholestérol est le stérol le plus important chez l'homme et les animaux. C'est une molécule multi-fonctionnelle. C'est un composant majeur et un élément critique des membranes cellulaires qui contribue à leur stabilité et au maintien de leurs structures en s'intercalant entre les phospholipides qui forment la bicouche de la membrane. Les interactions du cholestérol avec les membranes dépendent de la nature de ces phospholipides [159]. Le cholestérol ordonne les membranes, ce qui a pour effet de rigidifier la paroi membranaire. Le desmostérol et le 7-déhydrocholestérol (7-DHC) sont des précurseurs directs du cholestérol, et leur capacité à former des régions ordonnées dans une bicouche lipidique saturée en phospholipides a été observée. L'ordre relatif à cette capacité est : cholestérol > 7-DHC > desmostérol. Ceci démontre l'importance du rôle du cholestérol dans un environnement membranaire saturé [159]. L'enrichissement en cholestérol de la membrane diminue la perméabilité membranaire aux molécules hydrosolubles [160]. De plus, le cholestérol a un rôle de "tampon thermique" puisqu'à 37°C, il limite le mouvement des phospholipides et par conséquent diminue la fluidité membranaire. Cette capacité d'organisation membranaire permet également au cholestérol d'augmenter la résistance mécanique et de diminuer la diffusion des gaz [159].

Dans les zones riches en cholestérol de la membrane, il permet la formation de cavéoles et de radeaux lipidiques autrement appelés rafts. Ces zones essentielles à l'ancrage de protéines fonctionnelles sont impliquées dans des processus semblables à l'endocytose, à la présentation de protéines, au trafic membranaire et à la transduction du signal [161].

Le cholestérol a également une influence sur les nombreuses protéines présentes dans les membranes. Il module l'activité de ces protéines soit de manière spécifique en influençant la dynamique membranaire, soit de manière spécifique en interagissant directement avec les protéines et/ou les ligands de ces protéines pour modifier leur structure tridimensionnelle

[162]. Ces propriétés sont spécifiques du cholestérol et de sa structure tridimensionnelle puisque son remplacement par le desmostérol (différencié par une seule double liaison en position 24/25) modifie de manière drastique la structure membranaire et l'activation des protéines [163, 164].

Outre ses nombreuses fonctions membranaires, le cholestérol agit également comme un précurseur des hormones stéroïdes. Il est éliminé de la circulation sous forme de sels biliaires.

2. Synthèse et régulation du cholestérol chez l'homme

Un adulte normal et en bonne santé synthétise approximativement 1g / jour de cholestérol. Dans le cas d'une alimentation équilibrée, la proportion de cholestérol d'origine endogène est estimée entre 50 % et 80 % (environ 700 mg/j), le reste du cholestérol étant d'origine alimentaire, soit entre 50 % et 20 % (**Figure 21**). La consommation de cholestérol s'élève à 0,4 à 0,5 g / jour [165].

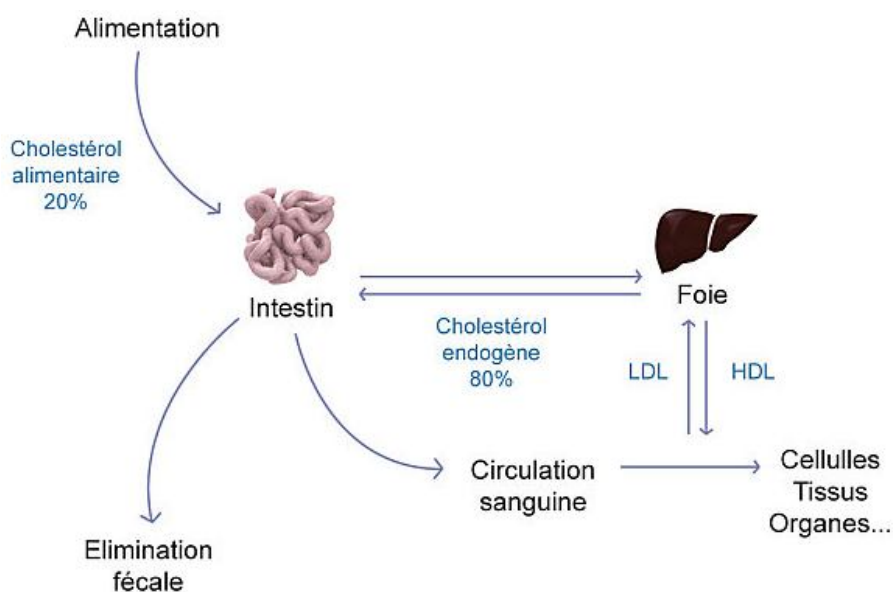


Figure 21 : Origines exogène et endogène du cholestérol.

i. Synthèse, absorption du cholestérol et régulation de la prise alimentaire

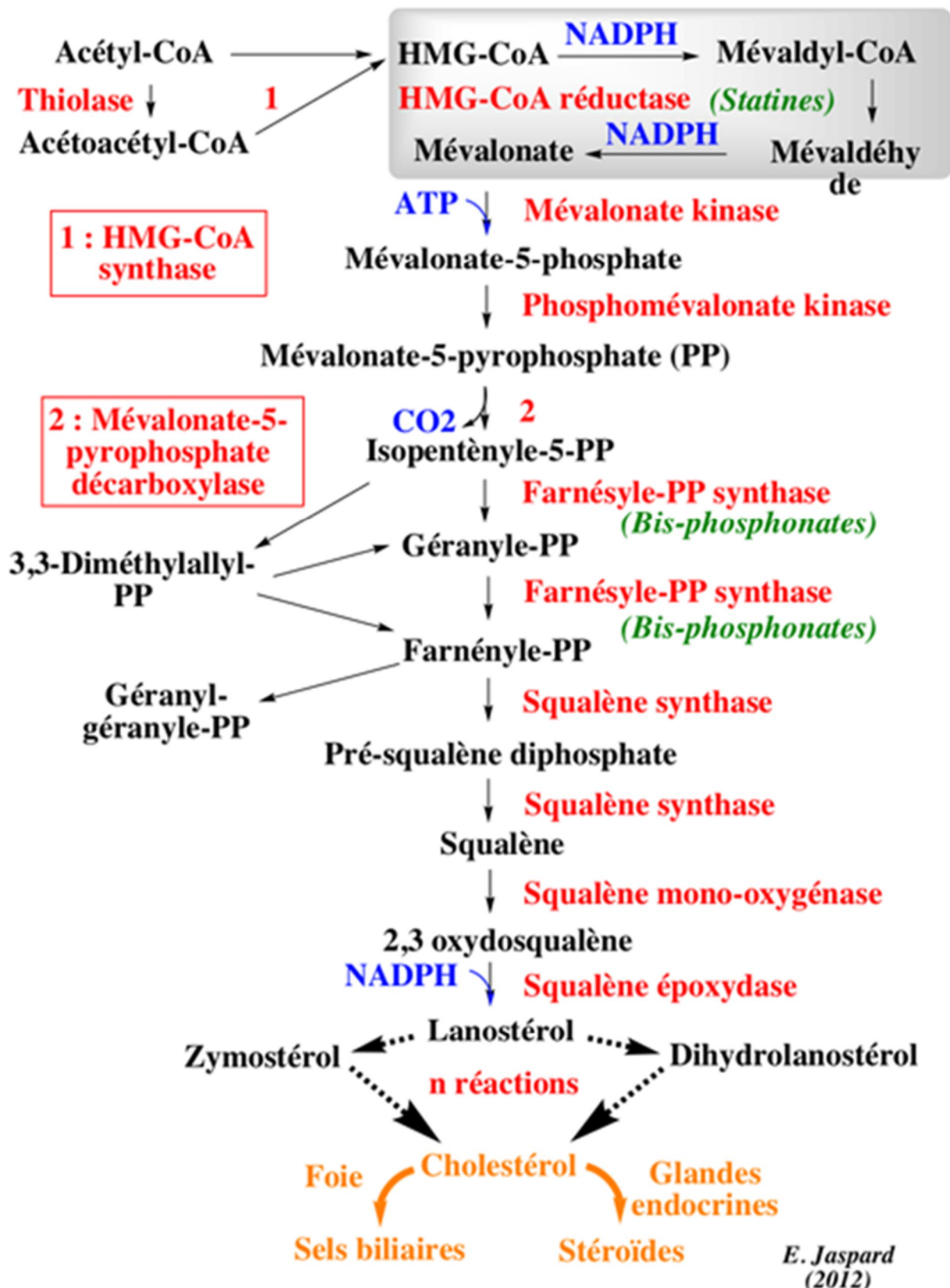


Figure 22 : La synthèse du cholestérol par la voie de l'hydroxy-méthyl-coenzyme A réductase.

- 1- condensation de trois unités d'acétate pour former une molécule intermédiaire à six carbones, le mévalonate,
- 2- conversion du mévalonate en unités activées d'isopentènes (ou isoprènes),
- 3- polymérisation des unités isoprènes à cinq carbones pour former les molécules de squalène,
- 4- cyclisation du squalène pour former les quatre anneaux du noyau stéroïde suivie par des séries d'oxydations / réductions et la perte des groupes méthyles menant à la formation du cholestérol.

Le cholestérol nouvellement synthétisé est utilisé dans la formation des membranes cellulaires, dans la synthèse d'hormones stéroïdes, de cholécalciférol (précurseur de la vitamine D₃) et d'acides biliaires [165] (**Figure 23**).

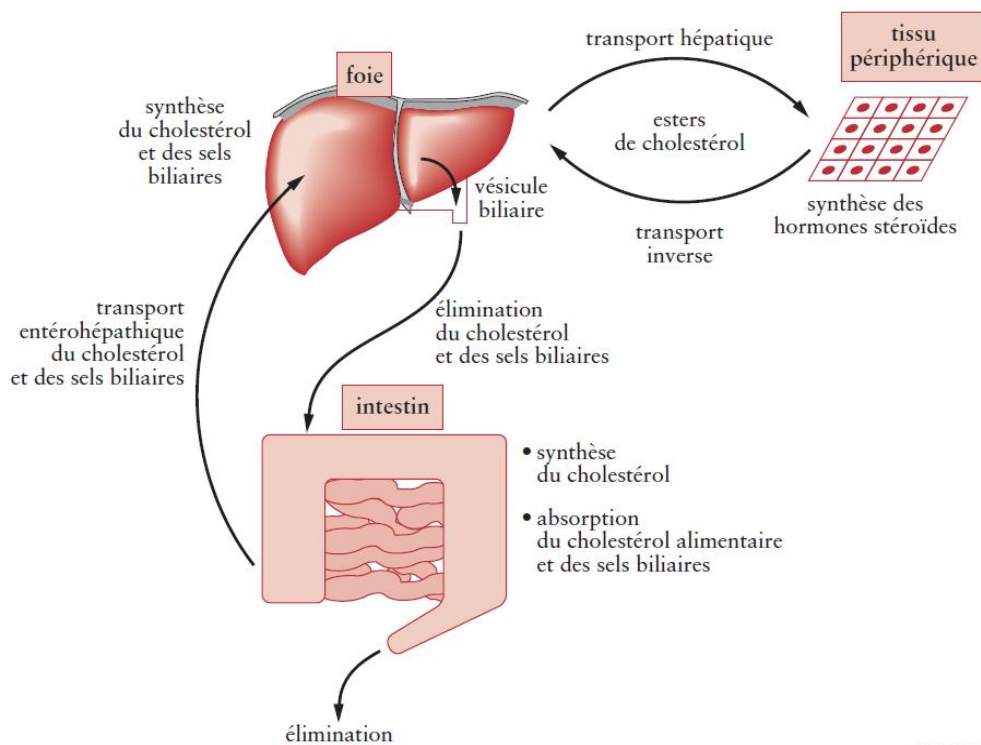


Figure 23 : Vue d'ensemble du métabolisme du cholestérol.

Dans le plasma humain, le cholestérol est maintenu à un niveau constant de 1,5 à 2 g/L⁻¹ (soit 4 à 5 mM). Le taux du cholestérol est très régulé et dépend à la fois de sa synthèse, du contrôle de sa propre synthèse, de son transport mais aussi de son métabolisme et de son catabolisme :

- sa synthèse est contrôlée par l'HMGCR, enzyme-clé de la voie de synthèse du cholestérol à partir de l'acétate et son absorption digestive est dépendante des acides gras et des sels biliaires présents dans le tube digestif ;
- son transport est assuré par les lipoprotéines : les LDL qui le transportent dans le sang vers les cellules des tissus périphériques, mais aussi les HDL qui le recaptent au niveau de ces cellules pour le conduire au foie;
- son catabolisme est contrôlé par la cholestérol-7 α -hydroxylase (CYP7A1) et la cholestérol-27-hydroxylase (CYP27A1), enzymes-clés de la transformation du cholestérol en acides biliaires et par le taux de réabsorption des sels biliaires par le cycle entérohépatique. L'activation de la transcription des gènes codant les transporteurs ABCG5 et ABCG8 par le récepteur nucléaire du foie (LXR) augmente l'excrétion de cholestérol sous forme de sels biliaires [166].

Une partie du cholestérol peut être éliminée lors de la digestion. Par exemple, une bactérie intestinale présente chez l'homme transforme le cholestérol en coprostanol. Cette molécule stable et non absorbable est éliminée dans les selles [167].

Quant à la fraction de cholestérol absorbée ou produite par l'organisme, il existe trois niveaux de régulation du cholestérol, le but étant de diminuer le taux de cholestérol de la cellule quand il est en excès :

- le cholestérol libre dans la cellule inhibe la transcription du gène codant le récepteur aux LDL (LDL-R), récepteur qui permet la reconnaissance de l'apolipoprotéine B100 (ApoB100) présente sur les LDL et favorise l'entrée du contenu des LDL dans les cellules. Le cholestérol libre inhibe l'HMGCR, ce qui limite la synthèse du cholestérol, enfin, le cholestérol libre stimule l'acyl-transférase (ACAT), enzyme catalysant son estérification en esters de cholestérol. Ceci participe à limiter les teneurs en cholestérol libre, les esters de cholestérol (CE) pouvant être considérés comme une forme de stockage du cholestérol (**Figure 24**).

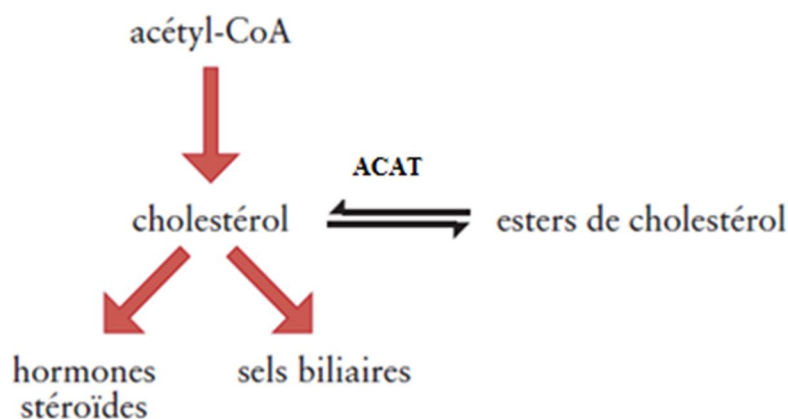


Figure 24 : Formation d'esters de cholestérol.

Comme mentionné précédemment, la synthèse de mévalonate, deuxième étape de la synthèse du cholestérol, est très régulée par le métabolisme. L'activité de l'HMGCR, enzyme catalysant cette synthèse, est diminuée lorsque l'apport alimentaire en cholestérol est élevé ou par des médicaments de la famille des statines [167]. L'augmentation des apports en cholestérol d'origine alimentaire inhibe la synthèse du cholestérol d'origine endogène. Ainsi, le cholestérol provenant de la prise alimentaire influe très peu sur la cholestérolémie.

Les inhibiteurs de l'HMGCR, les régimes alimentaires (aliments pauvres en cholestérol, riches en fibres), le taux de lipoprotéines responsables du transport « reverse » (via les HDL contenant l'ApoA-I ou lipoparticules LpA-I), les activateurs de la synthèse des acides biliaires et les inhibiteurs de la réabsorption des sels biliaires ont tous, et surtout ensemble, un effet hypocholestérolémiant.

ii. Régulation endogène du cholestérol cellulaire par les protéines liant les éléments régulateurs des stérols (SREBPs)

Les protéines liant les facteurs régulant les stérols (*sterol regulatory element factor binding proteins*, SREBPs) sont une famille de facteurs de transcription qui régulent le cholestérol cellulaire et l'homéostasie des acides gras en répondant aux niveaux cellulaires de cholestérol libre.

Les SREBPs se lient sous forme de dimères aux protéines régulant les stérols (SREs, *sterol regulatory elements*) dans la région du promoteur d'un large nombre de gènes pour en augmenter la transcription. Il existe trois isoformes des SREBPs : SREBP-1a, -1c et -2.

Il est actuellement admis que SREBP-1a et -1c sont impliquées dans la biosynthèse des acides gras, tandis que SREBP-2 régulerait principalement les gènes impliqués dans la synthèse du cholestérol. Seule SREBP-1a activerait ces deux processus. SREBP-2 activerait sa propre transcription en combinaison avec le facteur nucléaire Y [168, 169].

Dans la régulation de la synthèse du cholestérol, les SREBPs interagissent avec deux autres protéines : la protéine induite par l'insuline (INSIG) et la protéine clivant les SREBPs, appelée (SCAP, pour *SREBP-cleavage activating protein*). SCAP est une protéine membranaire ayant un domaine stérol-senseur similaire à celui de HMGCR. En présence de fortes concentrations de stérols les SREBPs restent liés au RE au moyen d'un complexe INSIG-1 / SCAP (**Figure 25**).

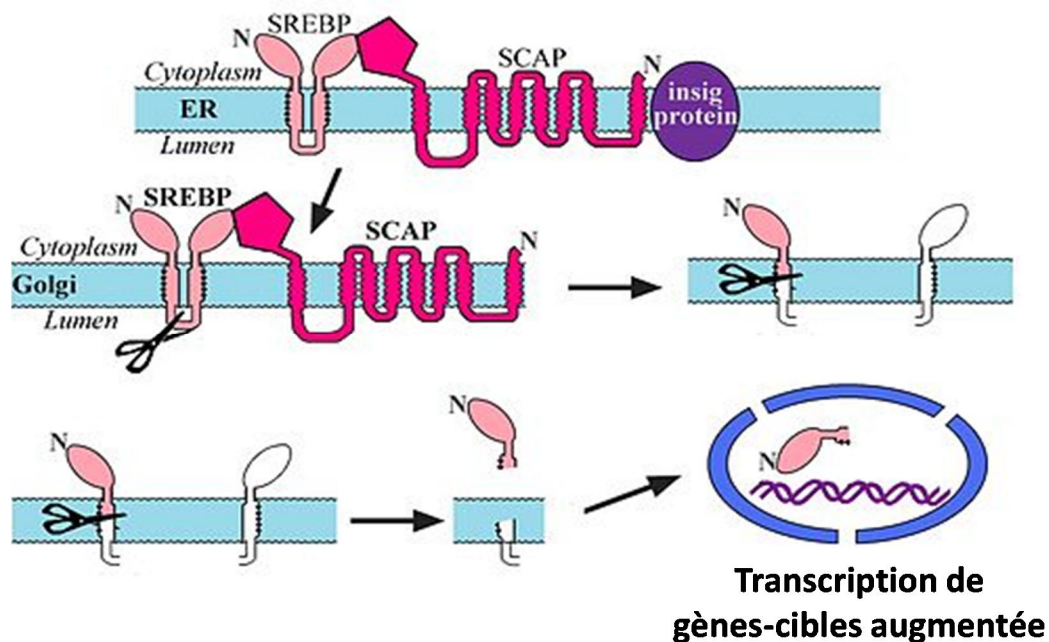


Figure 25 : Mécanismes d'action et conséquences du clivage du complexe SREBP/SCAP/INSIG.

La diminution des niveaux de cholestérol mène à un changement conformationnel de SCAP, libérant INSIG-1 (**Figure 25**). Ceci est la conséquence enzymatique du clivage protéique du complexe SCAP / SREBP-2 par un processus en deux étapes initié par deux protéases membranaires : protéase du site 1 et protéase du site 2. Le domaine actif N-(amino)-terminal de SREBP-2 ainsi relargué se déplace jusqu'au noyau où il se fixe aux promoteurs contenant les SREs [170-173] (**Figure 25**).

L'HMGCR peut aussi être régulée par des étapes de phosphorylation ou déphosphorylation. L'enzyme est plus active sous sa forme non modifiée et la phosphorylation fait diminuer son activité. L'HMGCR est phosphorylée par l'adénosine monophosphate kinase activée (AMPk). L'activité de l'HMGCR est aussi contrôlée par la voie de signalisation adénosine monophosphate cyclique (AMPc). L'augmentation d'AMPc mène à l'activation de la protéine kinase dépendante de l'AMPc (**Figure 26**). Puisque les niveaux intracellulaires d'AMPc dépendent des stimuli hormonaux, la régulation de la voie de biosynthèse du cholestérol est très largement contrôlée par les hormones [174].

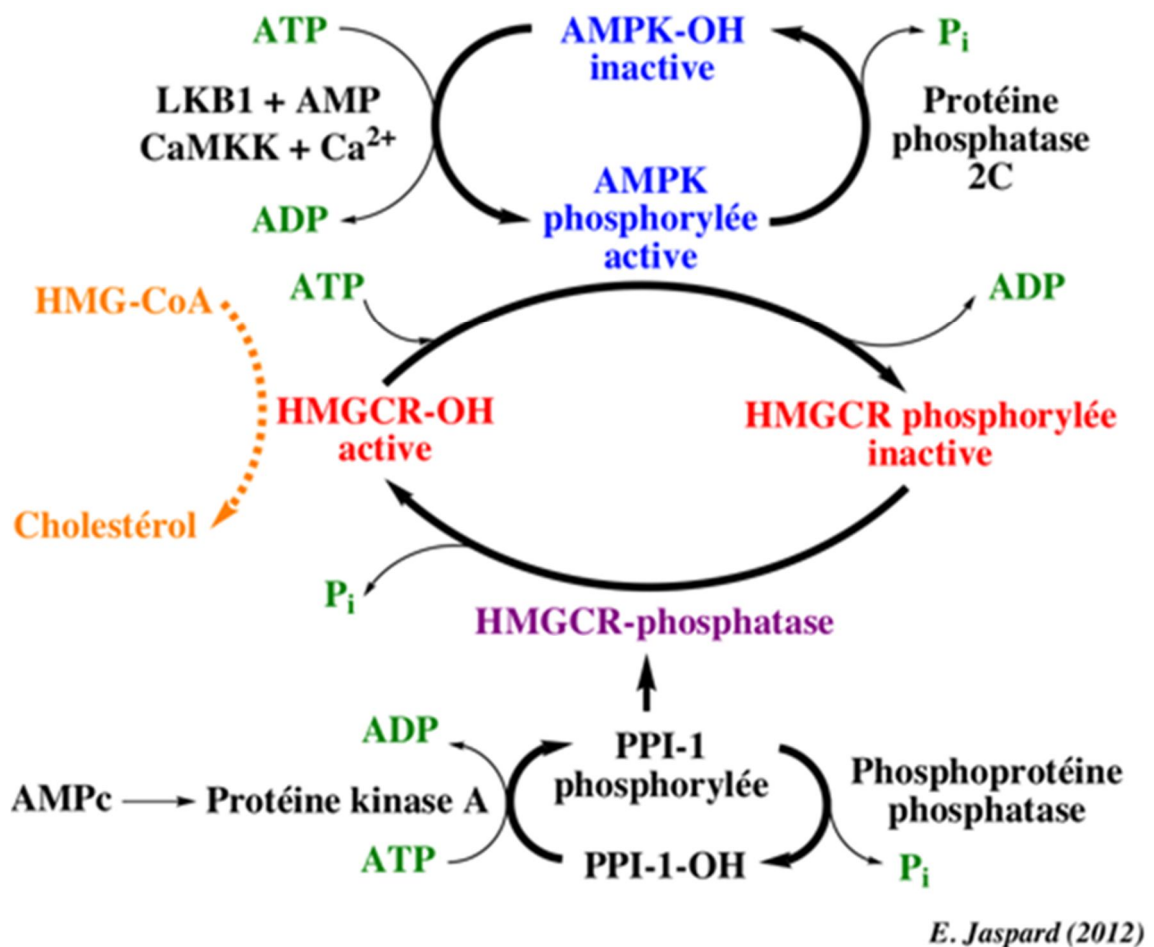


Figure 26 : Régulation de l'HMGCR par les voies de signalisation AMPk et AMPc.

La capacité de l'insuline à stimuler et celle du glucagon à inhiber l'HMGCR est en rapport avec les effets de ces hormones sur l'activation d'autres voies métaboliques. En effet, l'HMGCR est active lorsque le taux de glucose dans le sang est élevé. Les fonctions basiques du glucagon et de l'insuline sont de maintenir l'homéostasie du glucose. Ainsi, en contrôlant

les taux sanguin de sucre, ils affectent indirectement l'activité de l'HMGCR. Or, une diminution de l'activité de l'enzyme est causée par une protéine kinase dépendante de l'AMPc, qui répond par une augmentation de la concentration en AMPc et en leptine. La leptine est l'hormone peptidique qui régule les réserves de graisses dans l'organisme et module l'appétit en contrôlant la sensation de satiété.

Le contrôle à long terme de l'activité de l'HMGCR est exercé essentiellement à travers la synthèse et la dégradation de l'enzyme. Un sujet controversé est que des niveaux réduits de cholestérol activent l'expression du gène. L'insuline régule aussi le métabolisme du cholestérol en augmentant le niveau de synthèse de l'HMGCR. L'HMGCR est localisée dans le réticulum endoplasmique (RE) et contient un domaine stérol-senseur, comme SCAP. Des niveaux élevés de stérols conduisent à la fixation de la protéine INSIG sur le domaine stérol-senseur de l'HMGCR (**Figure 25** et **Figure 27**).

Une ligase ubiquitinée (gp78) est recrutée au niveau du RE et ubiquitine l'HMGCR afin de permettre la dégradation protéique de cette enzyme par le protéasome [175] (**Figure 27**).

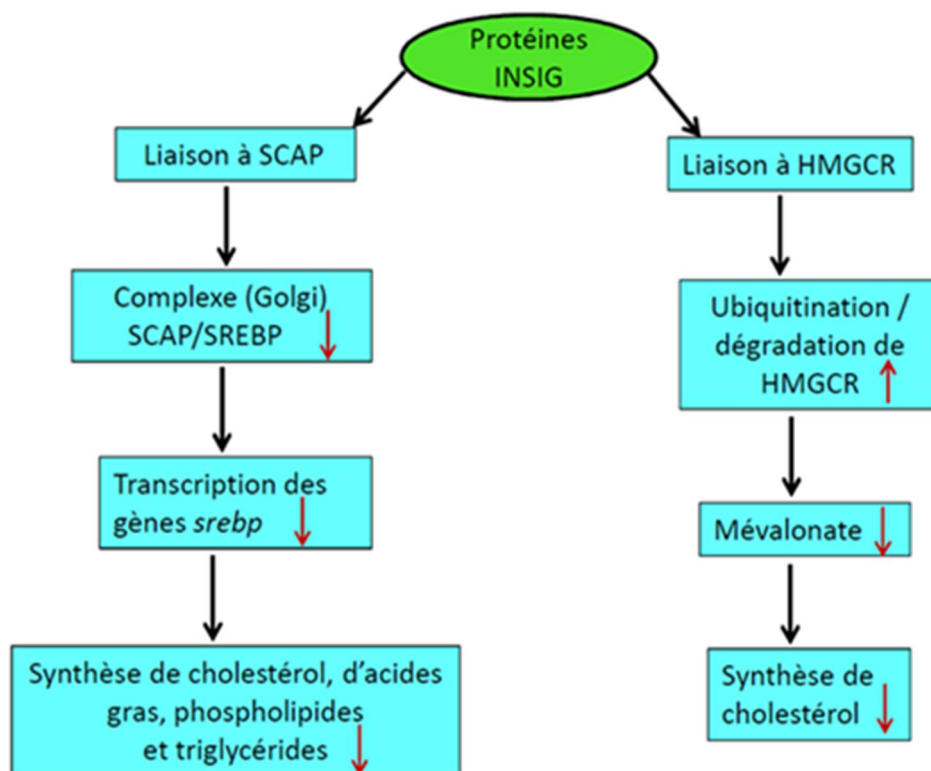


Figure 27 : Mécanismes d'action de la protéine INSIG. D'après [176].

Le stérol à l'origine de la dégradation de l'HMGCR semble être le cholestérol lui-même. En effet, lorsque les niveaux de cholestérol libre augmentent dans les cellules, le taux de dégradation de l'HMGCR augmente.

3. Transport du cholestérol par les lipoprotéines

i. Les différentes voies métaboliques empruntées par les lipoprotéines

Les lipides constituent une famille hétérogène de molécules hydrophobes, insolubles dans les milieux biologiques aqueux. Ils sont véhiculés à travers les divers compartiments extracellulaires de l'organisme (plasma, lymphe et liquide interstitiel) au sein d'édifices macromoléculaires complexes : les lipoprotéines.

Dans la circulation sanguine, le cholestérol est transporté sous forme libre ou estérifié par les lipoprotéines. Comme nous l'avons vu précédemment, le cholestérol circulant est indispensable pour de nombreuses cellules qui le captent et l'utilisent pour la synthèse de leurs membranes. Le cholestérol issu des lipoprotéines est aussi le substrat de la synthèse des hormones stéroïdes dans les glandes endocrines ou de la vitamine D dans la peau.

Les apolipoprotéines, les enzymes lipolytiques, les protéines de transfert et les récepteurs cellulaires (récepteurs éboueurs ou "scavenger") vont agir de concert afin de permettre le transport et la distribution des lipides au sein de l'organisme. Les lipoprotéines subissent des remaniements constants durant leur transit dans l'espace intravasculaire. Elles forment trois classes principales correspondant à trois voies métaboliques essentielles :

- la voie entéro-hépatique, permettant le transport des lipides exogènes (issus des graisses alimentaires) de l'intestin vers le foie et le tissu adipeux ;
- la voie d'apport ou voie endogène (**Figure 23**) qui représente le transport centrifuge des lipides du foie vers les tissus périphériques (contrôle du transport des lipides hépatiques vers les tissus périphériques) ;
- et la voie de retour dite du transport inverse, permettant le transport centripète du cholestérol (c'est-à-dire l'épuration du cholestérol) des tissus périphériques vers le foie et son excrétion biliaire.

ii. Transport du cholestérol dans la circulation sanguine par les lipoprotéines

En tant que composé hydrophobe, le cholestérol n'est pas soluble dans le sang. Le cholestérol requiert donc un moyen de transport spécial afin d'être correctement délivré aux tissus par la circulation. Les lipoprotéines sont des molécules hydrosolubles qui assurent le transport de lipides, dont le cholestérol et ses dérivés oxydés, dans le compartiment plasmatique. Ce sont des macromolécules de taille et de composition variable (**Tableaux 3 ; A et B**).

Les diamètres moyens des lipoprotéines diminuent en relation inverse avec la densité (**Tableau 3 ; B**). Mais dans chaque zone de densité, la taille des lipoprotéines est très hétérogène. Les lipoprotéines peuvent être isolées par ultracentrifugation. En effet, l'ultracentrifugation permet de séparer les lipoprotéines en fonction de leur densité. Ainsi, dans un sérum normal à jeun les lipoprotéines se répartissent dans un gradient de concentration saline en quatre zones de densité. L'électrophorèse sur gel d'agarose sépare les lipoprotéines en fonction de leur charge électrique (α , $\text{pr}\beta$ et β). D'où la classification des lipoprotéines selon leur mobilité électrophorétique (**Tableau 3 ; B**).

Le transport du cholestérol est assuré par quatre types de lipoprotéines, décrites ci-dessous par ordre croissant de taille et décroissant de densité : HDL, LDL, VLDL, chylomicrons :

- les lipoprotéines de haute densité ou HDL (*High Density Lipoproteins*) : elles représentent 30 % des lipoprotéines du plasma à jeun. Les HDL déchargent les artères et les tissus extra-hépatiques du cholestérol libre (et de ses dérivés oxydés) et le ramènent vers le foie où il est dégradé. A des fins de vulgarisation, on parle souvent de « bon » cholestérol. Les HDL possèdent très peu de lipides neutres surtout des esters de cholestérol, et leurs composants de surface sont importants (phospholipides, cholestérol libre et apolipoprotéines) (**Tableau 3 ; A**). Elles sont constituées d'un corps lipidique hydrophobe fait de triglycérides et d'esters de cholestérol enrobés d'une monocouche polaire de phospholipides et de cholestérol libre (**Tableau 3 ; A**). Les HDL sont subdivisées en trois zones d'importance inégale :

-les HDL1 les plus légères représentent une fraction mineure contenant une entité lipoprotéinique appelée Lp(a),

Tableaux 3 (A) et (B) : Principales classes de lipoprotéines plasmatiques.

Classe	Densité (g/L)	Mobilité électrophorétique	Diamètre (nm)	Masse 10 ⁶ Da
chylomicrons	0,93	Origine	75-1 200	> 150
VLDL	0,93-1,006	préβ	30-80	5-130
IDL	1,006-1,019	pré ββ	25-35	4
LDL	1,019-1,063	β	18-25	3
HDL ₂	1,063-1,125	α	9-12	10
HDL ₃	1,125-1,21	α	5-9	8
Lp(a)	1,055-1,12	pré-β	25-30	25

(B)

Complexe	Protéines (%)	Apolipoprotéines acquière l'apoE et l'apoC des HDL en leur cédant leur apoA1 / apoB-48 / apoC / apoE	% TG	% PL	% CE	% CL
Chylomicron	1 - 2		85 - 88	8	3	1
VLDL	7 - 10	apoB-100 / apoC / apoE	50 - 55	18 - 20	12 - 15	8 - 10
IDL	10 - 12	apoB-100 / apoE	25 - 30	25 - 27	32 - 35	8 - 10
LDL	20 - 22	apoB-100 / vitamine E et caroténoïdes	10 - 15	20 - 28	37 - 48	8 - 10
HDL2	33 - 35		5 - 15	32 - 43	20 - 30	5 - 10
HDL3	55 - 57	apoA / apoC / apoE	3 - 13	26 - 46	15 - 30	2 - 6

(A)

-les HDL2 plus denses ont une concentration variable. Cette fraction est habituellement beaucoup plus importante chez l'enfant et la femme que chez l'homme,

-les HDL3 représentent la fraction la plus dense et quantitativement la plus importante des HDL, de concentration à peu près identique dans les deux sexes.

- les lipoprotéines de basse densité ou LDL (*Low Density Lipoproteins*) : elles représentent 55 % des lipoprotéines du plasma à jeun. Les LDL transportent le cholestérol des lieux de sécrétion vers les cellules de l'organisme. Les LDL sont des VLDL maturés qui permettent de transporter diverses substances (triglycérides, cholestérol, vitamines liposolubles) jusqu'aux organes périphériques. Le cholestérol transporté par les LDL sera recapté par la suite par les HDL maturés. Des taux importants de LDL conduiraient au dépôt de cholestérol sur les parois des artères. En effet, les LDL sont susceptibles d'être modifiées : oxydées (ox-LDL) ou glycosylées. Ce phénomène se produit au niveau d'un endothélium vasculaire préalablement lésé, présentant un tissu sous endothélial. Du fait d'une oxydation ou d'une dégradation liée à la fumée de cigarette ou à d'autres facteurs, la reconnaissance des LDL par les LDL-R est perturbée. Les ox-LDL ne sont plus reconnus par les récepteurs aux LDL (LDL-R), mais par les récepteurs éboueurs ("scavenger"). Ces derniers sont présents à la surface des macrophages et des cellules musculaires lisses. Ils ne sont pas régulés par le contenu intracellulaire en cholestérol, donc ils peuvent se surcharger si le phénomène pathologique perdure (excès de sucres, pollution, tabagisme, etc.). L'accumulation de LDL dans les macrophages conduirait à des cellules spumeuses, caractéristiques de la plaque d'athérome. Ce phénomène accroît le risque de maladies cardiovasculaires et a contribué au nom de « mauvais » cholestérol donné aux LDL. Les LDL contiennent peu de composants moléculaires de surface et beaucoup de lipides neutres comme le cholestérol et les esters de cholestérol ;

Une zone de faible amplitude appelée IDL (*Intermediate Density Lipoproteins*) représente une sous-fraction de densité intermédiaire entre celle des LDL et

des VLDL quantitativement mineure à jeun. Les IDL contiennent surtout des triglycérides,

- les lipoprotéines de très basse densité ou VLDL (*Very Low Density Lipoproteins*) : elles représentent moins de 15 % des lipoprotéines du plasma à jeun. Les VLDL transportent le cholestérol du foie aux tissus extra-hépatiques (en effet, le cholestérol peut être converti en sels biliaires ou bien sécrété aux tissus extra-hépatiques sous forme de VLDL). Les VLDL contiennent surtout des triglycérides ;
- les chylomicrons s'isolent à une densité inférieure à celle des VLDL. Ils existent chez le sujet normal pendant les périodes post-prandiales expliquant la turbidité du sérum. Les chylomicrons sont produits par les entérocytes et sont constitués à 90 % de triglycérides d'origine alimentaire. Ce sont les lipoprotéines assurant le transport des lipides (cholestérol inclus) de l'intestin vers les autres tissus, et en particulier le foie.

iii. Les protéines de transfert du cholestérol

Dans le compartiment sanguin, les lipides des lipoprotéines sont échangés entre les différentes lipoprotéines. Des protéines de transfert assurent ces échanges.

La protéine de transfert du cholestérol estérifié (CETP) assure un transfert de cholestérol estérifié des HDL vers les VLDL. CETP assure aussi un échange réciproque de triglycérides des VLDL vers les HDL. Cette protéine est transportée dans le plasma par les HDL, permet un remodelage permanent des lipoprotéines circulantes et pourrait participer ainsi à la voie de retour du cholestérol [177, 178]. La synthèse de CETP a lieu principalement au niveau hépatique mais également dans l'intestin, le tissu adipeux et les surrénales. La CETP est surtout associée aux HDL dont elle modifie la composition en réduisant le rapport cholestérol/triglycérides. Au cours de ce processus certaines HDL peuvent être déstabilisées et perdre une molécule d'ApoA-I, ce qui forme une HDL naissante [179]. *In vivo*, l'activité de CETP entraîne une diminution du cholestérol lié aux HDL et un enrichissement en cholestérol estérifié des lipoprotéines contenant de l'ApoB. La CETP est ainsi susceptible de jouer un rôle

dans l'athérosclérose puisqu'elle contribue à redistribuer le cholestérol des lipoprotéines associées avec une protection vis-à-vis de l'athérosclérose (les HDL) vers les lipoprotéines athérogènes contenant de l'ApoB en modifiant la composition et donc la structure des lipoprotéines. Différents travaux suggèrent que l'effet de la CETP est d'autant plus marqué qu'il existe une accumulation des lipoprotéines acceptrices (situation d'hypertriglycémie) et, dans ces conditions, la CETP contribuerait à réduire le cholestérol lié aux HDL. Les inhibiteurs de la CETP sont des médicaments hypolipémiants en cours de développement. Ils augmentent le taux de HDL. Chez l'homme, la concentration et l'activité de CETP sont corrélées positivement avec le cholestérol des VLDL et des LDL.

La PLTP (protéine de transfert des phospholipides) assure le transfert rapide et spécifique des phospholipides entre les lipoprotéines. Son expression est ubiquitaire suggérant des fonctions dans de nombreuses voies métaboliques. La CETP participe en conjonction avec la PLTP, au remodelage permanent des lipoprotéines circulantes.

Contrairement à la CETP et à la PLTP qui sont présentes dans le compartiment sanguin, la protéine microsomiale de transfert des triglycérides (MTP) est une protéine intracellulaire. Elle assure, dans le foie et l'intestin, la formation intracellulaire des lipoprotéines. Elle catalyse la formation des VLDL en réunissant l'ApoB sécrétée par le RE, les triglycérides endogènes et les esters de cholestérol [180]. Dans les déficits congénitaux de cette protéine (abetalipoprotéïnémie), les concentrations plasmatiques de VLDL, de LDL et d'ApoB s'effondrent [181].

iv. Les récepteurs membranaires aux lipoprotéines

Plusieurs récepteurs membranaires interviennent dans le métabolisme des lipoprotéines.

Le LDL-récepteur (ou récepteur B/E ou LDL-R) est synthétisé dans la cellule et après une glycosylation, il migre au niveau membranaire dans des zones spécialisées appelées "puits recouverts". Le LDL-R reconnaît l'ApoB100 et l'ApoE des LDL et IDL. L'ApoB48 n'est pas reconnue par ce récepteur. L'interaction du récepteur avec une lipoprotéine stimule l'internalisation du complexe ainsi formé. Les lipoprotéines captées par le récepteur sont dégradées et leurs différents composants sont recyclés. Les esters de cholestérol ainsi libérés

sont hydrolysés en cholestérol libre dont le niveau intracellulaire provoque une série de réaction de régulation. Le LDL-R bloque l'activité de l'HMGCR, il active l'ACAT permettant ainsi de stocker l'excès de cholestérol libre sous forme d'esters de cholestérol et il réprime l'expression du gène *ldlr*. L'ensemble de ces mécanismes assure l'homéostasie du cholestérol intracellulaire. Les mutations du gène *ldlr* sont responsables de l'hypercholestérolémie familiale [182, 183].

Les récepteurs éboueurs ou récepteurs “*scavenger*” de classe A par exemple (CD36) sont essentiellement présents sur les macrophages. Il en existe différents types qui peuvent capter les LDL essentiellement lorsqu'elles sont modifiées par des phénomènes d'oxydation (ox-LDL). Ces récepteurs présentent la particularité, contrairement aux LDL-R, de ne pas être régulés par le contenu intracellulaire de cholestérol. Ils sont ainsi toujours présents et fonctionnels à la surface des cellules, ce qui peut conduire à un excès d'accumulation lipidique à l'origine des cellules spumeuses, point de départ de l'athérosclérose ;

Les lipoprotéines résultant du catabolisme des chylomicrons et des VLDL par la lipoprotéine lipase (les “remnants”) sont rapidement captées par le foie par l'intermédiaire de l'ApoE et de récepteurs cellulaires spécifiques. Le LRP-1 (*LDL-Receptor Related Protein-1*) qui reconnaît l'ApoE mais pas l'ApoB100 contribue à cette épuration. En revanche, les rôles physiologiques du LDL-R et du récepteur aux VLDL dans ce processus ne sont pas clairement établis.

Un récepteur permet aux HDL naissantes de capter le cholestérol libre des cellules des parois artérielles et des macrophages. Il s'agit du récepteur ABCA1 qui est un transporteur transmembranaire dépendant de l'ATP. Deux récepteurs de la même classe ont été décrits récemment, ABCG5 et ABCG8 au niveau des entérocytes. Dans les modèles expérimentaux, l'altération d'ABCA1 inhibe les mécanismes d'efflux cellulaire de cholestérol.

Enfin, un autre récepteur intervient dans le métabolisme des HDL. Il s'agit d'un récepteur “*scavenger*” de classe B et de type 1 (SR-B1) qui contrôle l'épuration sélective des HDL au niveau hépatique. Il permet essentiellement le transfert des esters de cholestérol dans la cellule hépatique sans nécessité l'internalisation des HDL et de l'ApoA-I. L'HDL dépourvue d'ester de cholestérol est remise en circulation.

v. Les apolipoprotéines

Des protéines spécifiques, les apolipoprotéines (Apos) sont les protéines constitutives des lipoprotéines, structures chargées de transporter des molécules hydrophobes (triglycérides, cholestérol) dans le sang et le milieu aqueux. Les Apos (**Tableau 3 (A)** et **Figure 28**) assurent, à la surface des lipoprotéines, la cohésion du complexe lipidique et contrôlent son développement ainsi que le métabolisme des lipoprotéines. Les Apos ont un rôle dans la régulation métabolique puisqu'elles agissent comme cofacteurs ou activateurs de nombreuses enzymes plasmatiques, servent de ligands aux protéoglycanes endothéliaux et aux récepteurs cellulaires spécifiques.

Selon les lipoprotéines, les Apos ne sont pas les mêmes. Ainsi en fonction des Apos présentes à leur surface, les lipoprotéines seront captées par des cellules différentes (possédant des différents récepteurs aux Apos). Leurs caractéristiques sont résumées dans le **Tableau 4**.

L'ApoB100 est la principale apolipoprotéine des VLDL, IDL et des LDL. Dans l'hépatocyte, elle est sécrétée par le RE rugueux et s'associe aux lipides endogènes pour former une VLDL. Chaque molécule de VLDL contient un seul exemplaire de l'ApoB100. L'ApoB100 fait partie intégrante de la lipoprotéine sécrétée par l'hépatocyte (VLDL) jusqu'à son catabolisme final. Des techniques de précipitation permettent de fractionner les lipoprotéines contenant ou non de l'ApoB100.

L'ApoB48 est la principale apolipoprotéine des chylomicrons. Elle est synthétisée dans l'entérocyte. Elle est constituée des 2152 premiers acides aminés (aa), soit 48% des aa de l'ApoB100. Chaque molécule de chylomicron contient une seule molécule d'ApoB48.

Ainsi, le transport inverse de cholestérol, par lequel les cellules des différents organes éliminent l'excès de cholestérol est médié par les HDL. La fonction de l'ApoA-II n'est pas bien connue.

Contrairement aux ApoBs et à l'ApoA-I, l'ApoE et les ApoCs sont des protéines transférables entre les lipoprotéines. Elles sont sécrétées par le foie et l'intestin, probablement sous forme libre. Dans le compartiment plasmatique, elles s'associent aux VLDL et aux HDL.

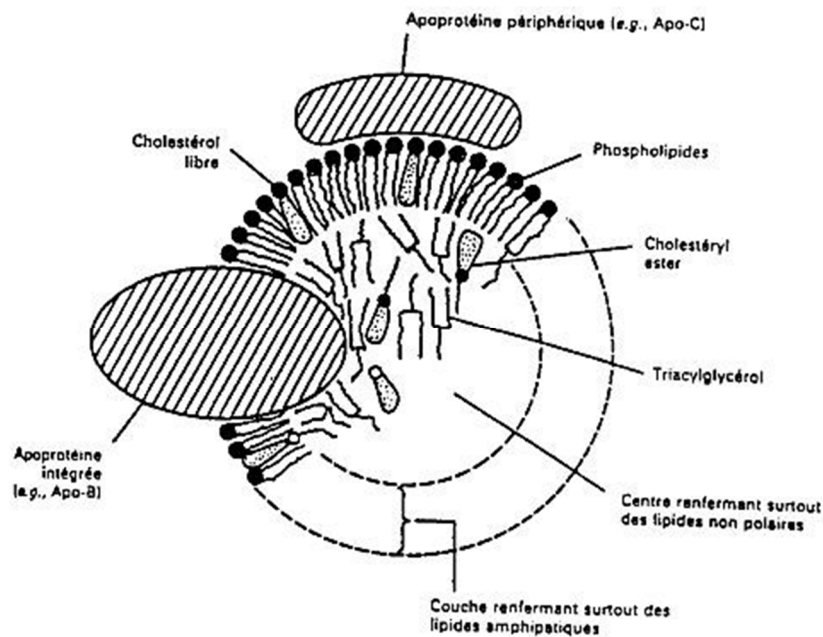


Figure 28 : *Structure d'une lipoprotéine.*

L'ApoE a un rôle essentiel dans la clairance des chylomicrons et des VLDL. Elle assure l'ancrage des protéoglycanes endothéliaux. Après l'hydrolyse des triglycérides, les lipoprotéines se lient aux récepteurs cellulaires par l'intermédiaire de l'ApoE. L'ApoE est une protéine multifonctionnelle jouant notamment un rôle-clé dans l'apparition des maladies cardiovasculaires [184].

Le gène *apoe* est polymorphe avec 3 allèles principaux : E2, E3 et E4 et un allèle E1 très rare. La présence de l'allèle E2 du gène *apoe* permet de confirmer un diagnostic d'hyperlipoprotéïnémie de type 3 (HPL III) [185]. L'allèle E3 est majoritaire, tandis que les allèles E2 et E4 peuvent être associés à des pathologies. Des tests génétiques permettent la détection qualitative des allèles E2, E3 et E4 du gène *apoe* [186, 187].

L'ApoC-II est le cofacteur de la lipoprotéine lipase. L'ApoC-III a un rôle inhibiteur de la lipolyse des triglycérides des VLDL et des chylomicrons.

Tableau 4 : *Identité, expression tissulaire, distribution plasmatique et fonction des principales apolipoprotéines humaines.*

NOM	TISSU	DISTRIBUTION	FONCTION
Apo AI	foie, intestin	chylomicrons, HDL	Structurelle ; activateur physiologique de la LCAT ; efflux de cholestérol
Apo AII	foie (intestin)	HDL	Structurelle ; activateur/ inhibiteur de la HL ; efflux de cholestérol
Apo AIV	foie, intestin	chylomicrons, HDL	Transport reverse du cholestérol; activateur de la LCAT; métabolisme des lipoprotéines riches en triglycérides
Apo AV	foie		Métabolisme des lipoprotéines riches en triglycérides
Apo B100	foie	VLDL, IDL, LDL	Structurelle ; synthèse et sécrétion des VLDL ; ligand du récepteur LDLR
Apo B48	intestin	chylomicrons	Structurelle ; synthèse et sécrétion des chylomicrons ; ligand du récepteur B48R
Apo CI	foie (intestin)	chylomicrons, VLDL, HDL	Inhibiteur physiologique de la CETP ; activateur de la LCAT ; inhibiteur de la liaison aux LDLR LRP et VLDLR
Apo CII	foie (intestin)	chylomicrons, VLDL, HDL	Activateur physiologique de la LPL
Apo CIII	foie (intestin)	chylo, VLDL, HDL	Inhibiteur physiologique de la LPL ; inhibiteur de la captation hépatique des lipoprotéines riches en triglycérides
Apo D (apo AIII)	foie, intestin, rate, pancréas, cerveau, surrénales, rein	HDL, LDL, VLDL	Transport reverse du cholestérol (?)
Apo E	foie, macrophage, cerveau	chylo, VLDL, IDL, HDL	Ligand des récepteurs LDLR et LRP
Apo F	foie	LDL (VLDL, HDL)	Inhibiteur de la CETP

vi. Les enzymes du métabolisme des lipoprotéines

Trois enzymes ont un rôle central dans le métabolisme des lipoprotéines plasmatiques : la lipoprotéine lipase (LPL), la lipase hépatique (LH) et la lécithine-cholestérol-acyl-transférase (LCAT). Les principales caractéristiques de ces enzymes sont résumées dans le **Tableau 5**.

Tableau 5 : Principales enzymes du métabolisme des lipoprotéines.

Enzyme	Masse (kDa)	Origine	Substrats
Lipoprotéine lipase (LPL)	50	Tissu adipeux, muscle strié	Triglycérides et phospholipides des chylomicrons et VLDL
Lipoprotéine hépatique (LH)	53	Foie	Triglycérides et phospholipides des petites VLDL, IDL et HDL2
Lécithine cholestérol acyl tranférase (LCAT)	47	Foie	Cholestérol et phosphatidyl-choline des HDL

La LPL est une enzyme plasmatique. Elle est abondante à la surface des épithéliums vasculaires. Cette enzyme est synthétisée au niveau du muscle strié squelettique et surtout au niveau du tissu adipeux. Elle sort des cellules et se fixe sur les cellules endothéliales des capillaires qui irriguent les tissus qui utilisent les acides gras libres comme nutriments. Sa principale fonction est d'hydrolyser les triglycérides du core des VLDL et des chylomicrons pour former des résidus de chylomicrons pauvres en triglycérides appelés remnants de VLDL (ou de chylomicrons) (**Figure 29**).

Les acides gras libérés par l'hydrolyse des triglycérides sont captés pour être métabolisés ou stockés. La sérumalbumine fixe les acides gras libérés par la LPL et permet leur transport jusqu'aux cellules qui les utilisent (cellules musculaires ou adipocytes).

Les altérations moléculaires de la LPL conduisent à l'accumulation de chylomicrons riches en triglycérides, dans la circulation, qui se traduisent par une hyperchylomicronémie.

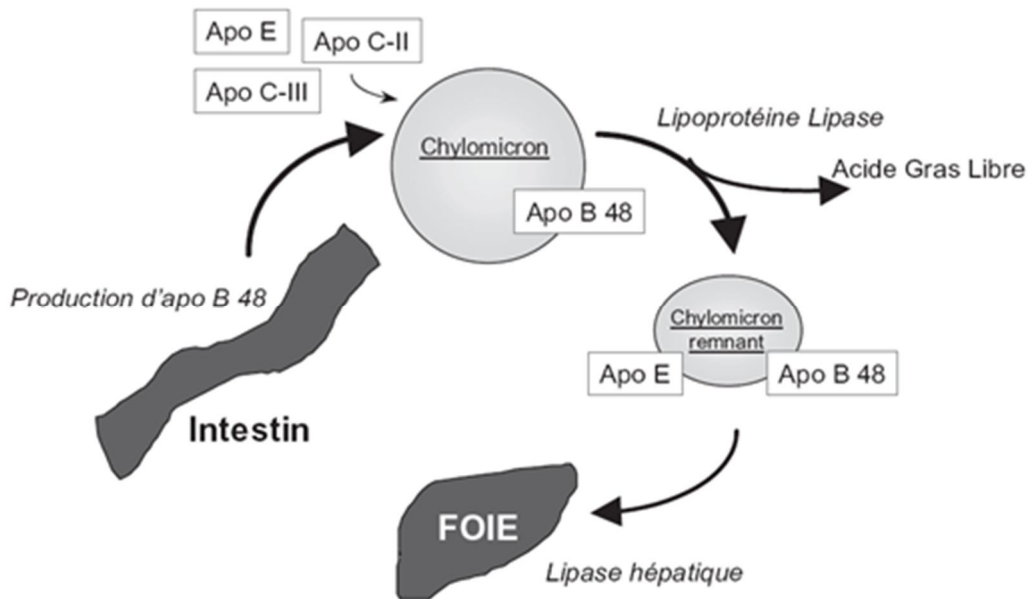


Figure 29 : Schéma de la voie métabolique du transport des lipides alimentaires dans le plasma : voie des chylomicrons.

Dans le foie, les VLDL sont modulés par l'action de la LPL. L'étape finale du processus résulte dans la formation des LDL qui apportent le cholestérol aux tissus périphériques (**Figure 30**). L'absorption cellulaire de LDL est étroitement régulée via le LDL-R et l'ApoB100 (**Figure 30**).

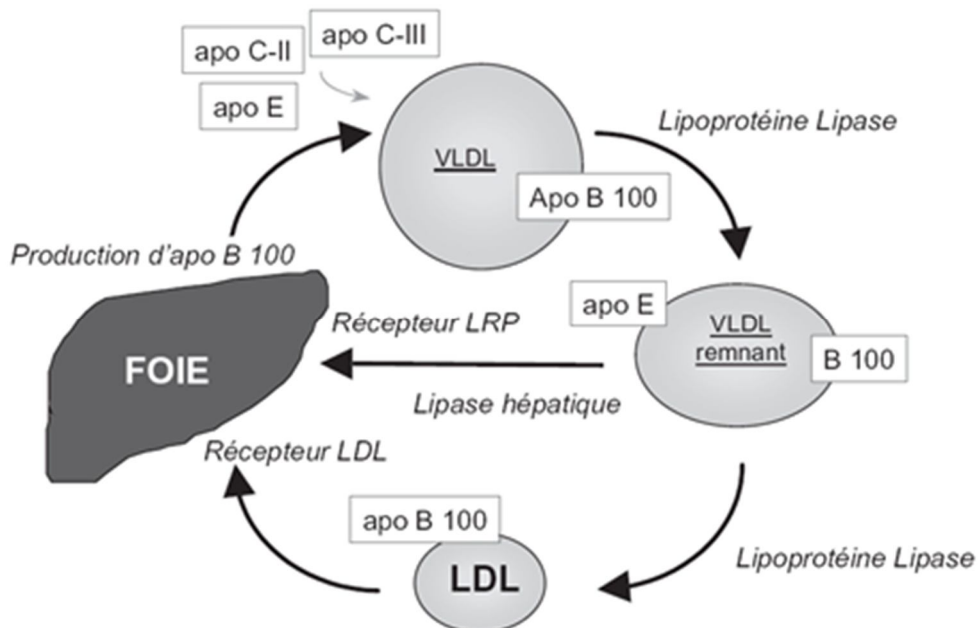


Figure 30 : Schéma de la voie métabolique du transport endogène des lipides : voie des lipoprotéines contenant de l'ApoB100 (VLDL, IDL et LDL) dans le plasma.

La LH a une structure semblable à la LPL. Elle est synthétisée par le foie dans les capillaires hépatiques où elle exerce son action. La LH assure l'hydrolyse des IDL en LDL et celle des HDL2 en HDL3 et/ou pré- β 1 (**Figure 31**).

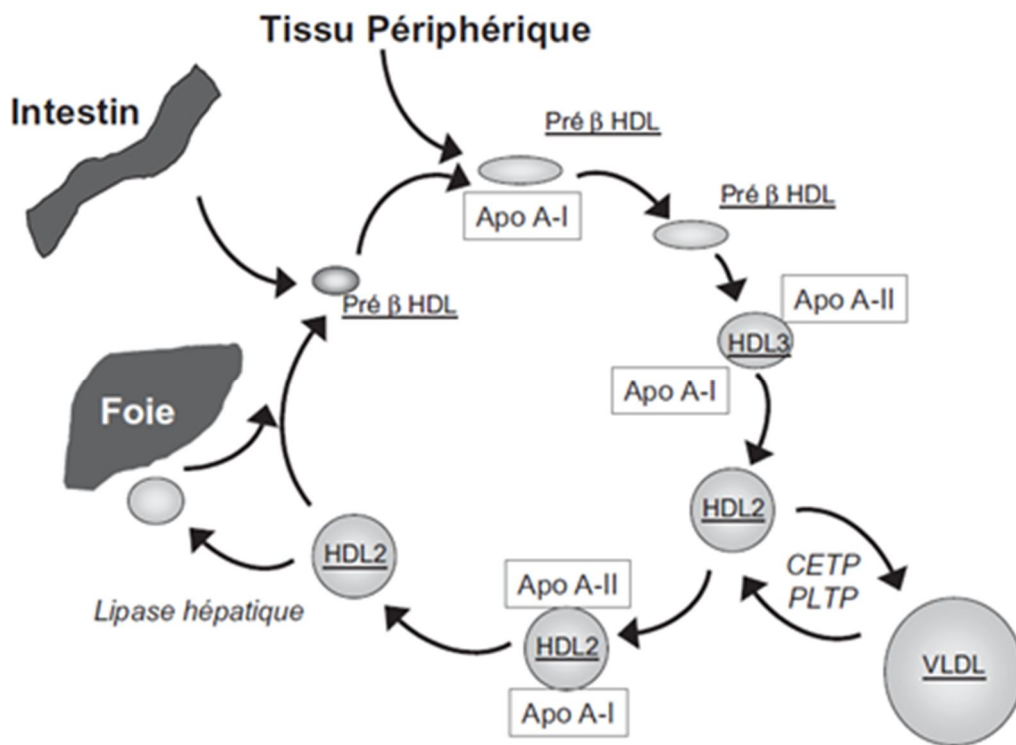


Figure 31 : Schéma de la voie métabolique du transport inverse du cholestérol : voie des HDL.

Dans le compartiment sanguin, la LCAT est associée aux LDL. Elle est synthétisée par le foie. Cette enzyme estérifie le cholestérol libre des HDL (capté à la surface des cellules provenant des tissus périphériques) en transférant un acide gras en position 2 de la phosphatidyl-choline sur le cholestérol. Les ApoA-I, A-IV et C-I activent cette réaction. L'ester de cholestérol (CE) formé est incorporé dans le corps de l'HDL, contribuant ainsi à sa maturation.

La **Figure 32** schématise, de façon générale, le transport des lipoprotéines dans le sang et les tissus.

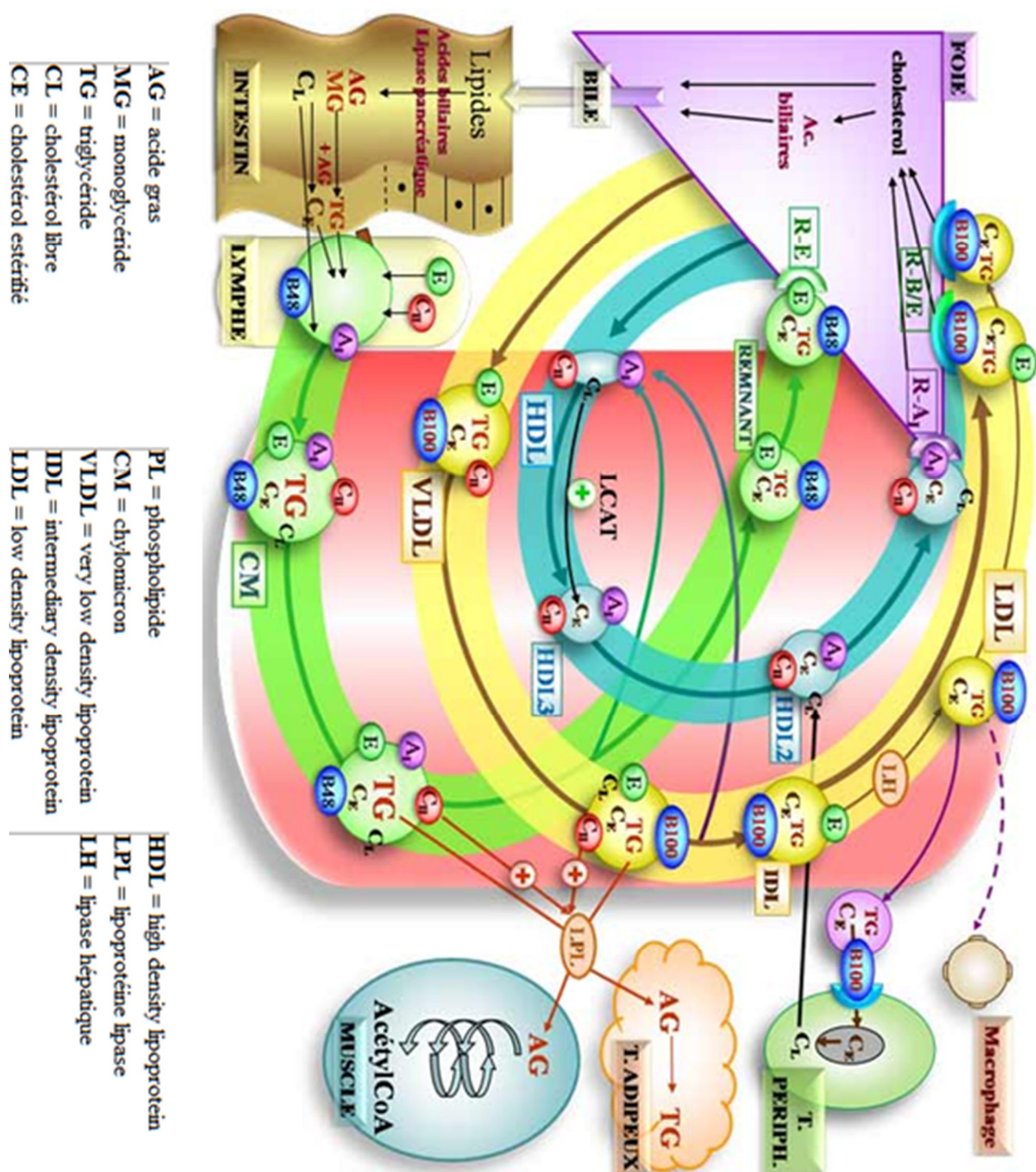


Figure 32 : Schéma général du transport des lipoprotéines dans le sang et les tissus.

B. Les oxystérols et les CYPs P450

1. Définition, structure et origine des principaux oxystérols

Les oxystérols sont des dérivés oxydés du cholestérol, possédant comme lui 27 atomes de carbone et une structure à quatre noyaux appelée cycloperhydrophénatrène. L'oxydation peut avoir lieu sur le noyau stérol et plus particulièrement sur les positions 4, 5, 6 et 7 qui sont les plus sensibles à l'oxydation. Les oxydations peuvent également se produire sur les positions 24, 25 et 27 de la chaîne latérale ce qui conduit à une grande diversité de molécules créant ainsi la famille des oxystérols (que nous verrons plus loin, sur la **Figure 35**, paragraphe B.1. : La voie de synthèse enzymatique des oxystérols).

Parmi ces composés, plusieurs sont détectables dans le sang et la bile et dans des organes comme le foie, les poumons ou le cerveau où leur présence pourrait induire bon nombre d'effets biologiques.

Dans la littérature, les oxystérols peuvent être désignés sous différents noms. Le **Tableau 6** présente la nomenclature de certains oxystérols.

Les oxystérols plasmatiques présents chez les mammifères peuvent avoir deux origines différentes : une origine exogène par un apport alimentaire [188, 189] et une origine endogène en étant générés *in vivo* par voie enzymatique et chimique par auto-oxydation [190] (**Figure 33**).

i. Origine exogène des oxystérols circulants

Les produits d'auto-oxydation du cholestérol peuvent être présents dans les aliments riches en cholestérol (par exemple, les œufs et la poudre d'œuf séchée [191], les produits laitiers et la poudre de lait présente dans la composition de produits pour enfants [192]).

Tous les produits contenant du cholestérol sont sujets à l'oxydation, spécialement ceux qui sont déshydratés, sujets à des radiations ou à des hautes températures et ceux qui sont cuisinés en présence d'oxygène [193, 194]. Sous ces conditions, les aliments sont exposés à des espèces réactives de l'oxygène (ERO) : O_2^- , H_2O_2 (peroxyde d'oxygène), $HO^\bullet$ (radical hydroxyle), O_3 (ozone). Le stockage sur de longues périodes, peut aussi favoriser la production d'oxystérols par les mêmes effets décrits précédemment [193].

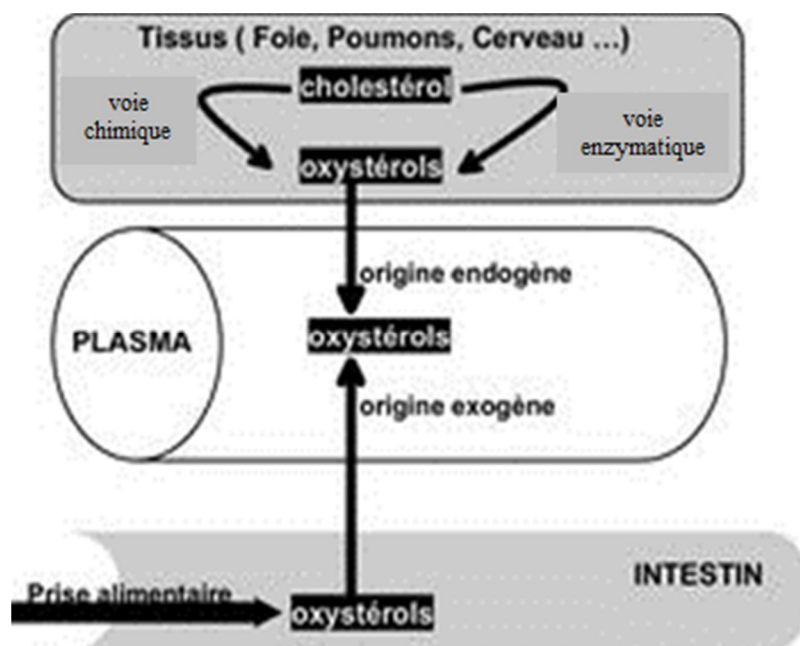


Figure 33 : Représentation schématique de l'origine des oxystérols circulants.

Les oxystérols les plus communément détectés sont oxydés en position 7 tels que les 7-cétocholestérol (7-KC), 7 α -hydroxycholestérol (7 α -OH), 7 β -hydroxycholestérol (7 β -OH), et ceux oxydés en position 5,6 tels que les 5 α , 6 α -époxycholestérol, 5 β , 6 β -époxycholestérol, cholestan-3 β , 5 α , 6 β -triol. On trouve également, en petite quantité, des oxystérols oxydés en position 25, 19 et 20 α , ainsi que le 3 β -hydroxy-5 α -cholestan-6-one et le 3 β , 5 α -dihydroxycholestan-6-one [193, 195].

Les oxystérols d'origine alimentaire sont principalement absorbés sous forme d'esters au niveau du tractus intestinal supérieur et transportés ensuite dans le plasma à l'intérieur de chylomicrons. Le 7-KC est l'oxystérol le moins absorbé alors que le 7 β -OH est celui qui l'est le plus. Ensuite, ils sont transportés par les lipoprotéines dans le plasma. Tous les types de lipoprotéines (LDL, VLDL, HDL) peuvent véhiculer des oxystérols.

La majeure partie des oxystérols se trouve dans les LDLs [196]. Différentes études ont démontré que les oxystérols non-estérifiés peuvent également être transportés dans le plasma, liés à l'albumine [196]. Des études *in vivo* démontrent également que comparés avec le cholestérol, les oxystérols sont absorbés plus rapidement et plus complètement au niveau de l'intestin et possèdent une clairance plasmatique plus rapide [197]. Ils sont ensuite rapidement captés par les tissus et les organes [197].

Tableau 6 : Nomenclature de certains oxystérols. D'après [195].

Nom trivial	Nom Systématique
4 α -hydroxycholestérol	Cholest-5-en-3 β ,4 α -diol
4 β -hydroxycholestérol	Cholest-5-en-3 β ,4 β -diol
6 β -hydroxycholestérol	Cholest-5-en-3 β ,6 β -diol
7 α -hydroperoxycholestérol	3 β -hydroxycholest-5-en-7 α -hydroperoxide
7 β -hydroperoxycholestérol	3 β -hydroxycholest-5-en-7 β -hydroperoxide
7α-hydroxycholestérol	Cholest-5-en-3 β ,7 α -diol
7β-hydroxycholestérol	Cholest-5-en-3 β ,7 β -diol
7-cétocholestérol	3 β -hydroxycholest-5-en-7-one
Cholestérol-5 α ,6 α -époxyde	5,6 α -Epoxy-5 α -cholestan-3 β -ol
Cholestérol-5 β ,6 β -époxyde	5,6 β -Epoxy-5 β -cholestan-3 β -ol
Cholestanetriol	5 α -Cholestan-3 β ,5,6 β -triol
20 α -hydroxycholestérol	Cholest-5-en-3 β ,20 α -diol
22-hydroxycholestérol	Cholest-5-en-3 β ,22 ξ -diol
(24S)-hydroxycholestérol	(24S)-Cholest-5-en-3 β ,24-diols
Cholestérol-(24S),25-époxyde	(24S),25-Epoxy-5 α -cholestan-3 β -ol
25-hydroxycholestérol	Cholest-5-en-3 β ,25-diols
27-hydroxycholestérol	(25R)-Cholest-5-en-3 β ,26-diols
7 α ,27-dihydroxycholestérol	(25R)-Cholest-5-en-3 β ,7 α ,26-triols
7 α ,24-dihydroxycholestérol	(24S)-Cholest-5-en-3 β ,7 α ,24-triols

ii. Origine endogène des oxystérols circulants

Dans des conditions physiologiques, la grande majorité des oxystérols circulants provient de la transformation du cholestérol en oxystérols sous l'action d'enzymes de type cytochrome P450 présentes dans différents organes :

- le 27-OH provient des cellules endothéliales, des macrophages, de l'intestin, des reins, des muscles, de l'utérus, des poumons ;
- le 24S-OH provient du cerveau, des glandes surrénales et de la rétine ;
- le 7 α -OH et le 4 β -OH proviennent essentiellement du foie.

Ainsi, les oxystérols ont une origine hépatique et extra-hépatique. Les oxystérols circulants sont transportés par les lipoprotéines à l'exception de l'acide 3 β -OH-5-cholesténoïque qui est véhiculé principalement par l'albumine. Ils sont alors rapidement épurés par le foie pour être ensuite essentiellement transformés en acides biliaires.

Tout ce processus contribue à maintenir l'homéostasie du cholestérol dans l'organisme en facilitant son élimination lorsqu'il se trouve en excès. Les oxystérols pourraient également jouer un rôle important dans la régulation de certaines voies du métabolisme lipidique, incluant la régulation d'expression des gènes, la synthèse d'acides biliaires dans le foie, et le transport d'un tissu à l'autre (**Figure 34**).

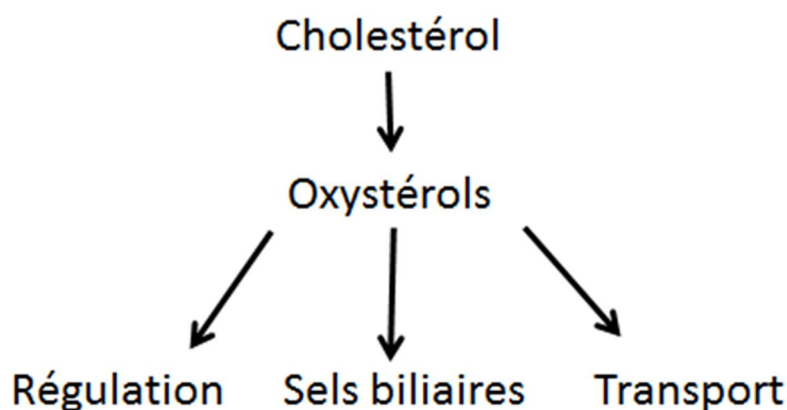


Figure 34 : Rôles des oxystérols dans la régulation des voies du métabolisme lipidique.

Parmi les oxystérols produits *in vivo* et que l'on retrouve au niveau plasmatique de manière significative, il y a ceux synthétisés exclusivement par voie enzymatique comme le 27-OH, l'acide 3 β -OH-5-cholesténoïque, le 7 α -OH, le 24S-OH et le 4 β -OH. D'autres, comme le 25-hydroxycholestérol (25-OH), peuvent être produits à la fois par voie enzymatique et par auto-oxydation du cholestérol. D'autres enfin, comme le 7-KC et le 7 β -OH sont produits presque exclusive par auto-oxydation (**Figure 35**).

Ainsi, la synthèse endogène des oxystérols par auto-oxydation du cholestérol fait intervenir les radicaux libres d'origine physiologique. Les radicaux libres sécrétés par différents types cellulaires (macrophages, cellules endothéliales lésées, cellules musculaires lisses) induisent l'oxydation des LDL, ainsi que celle du cholestérol qu'elles contiennent.

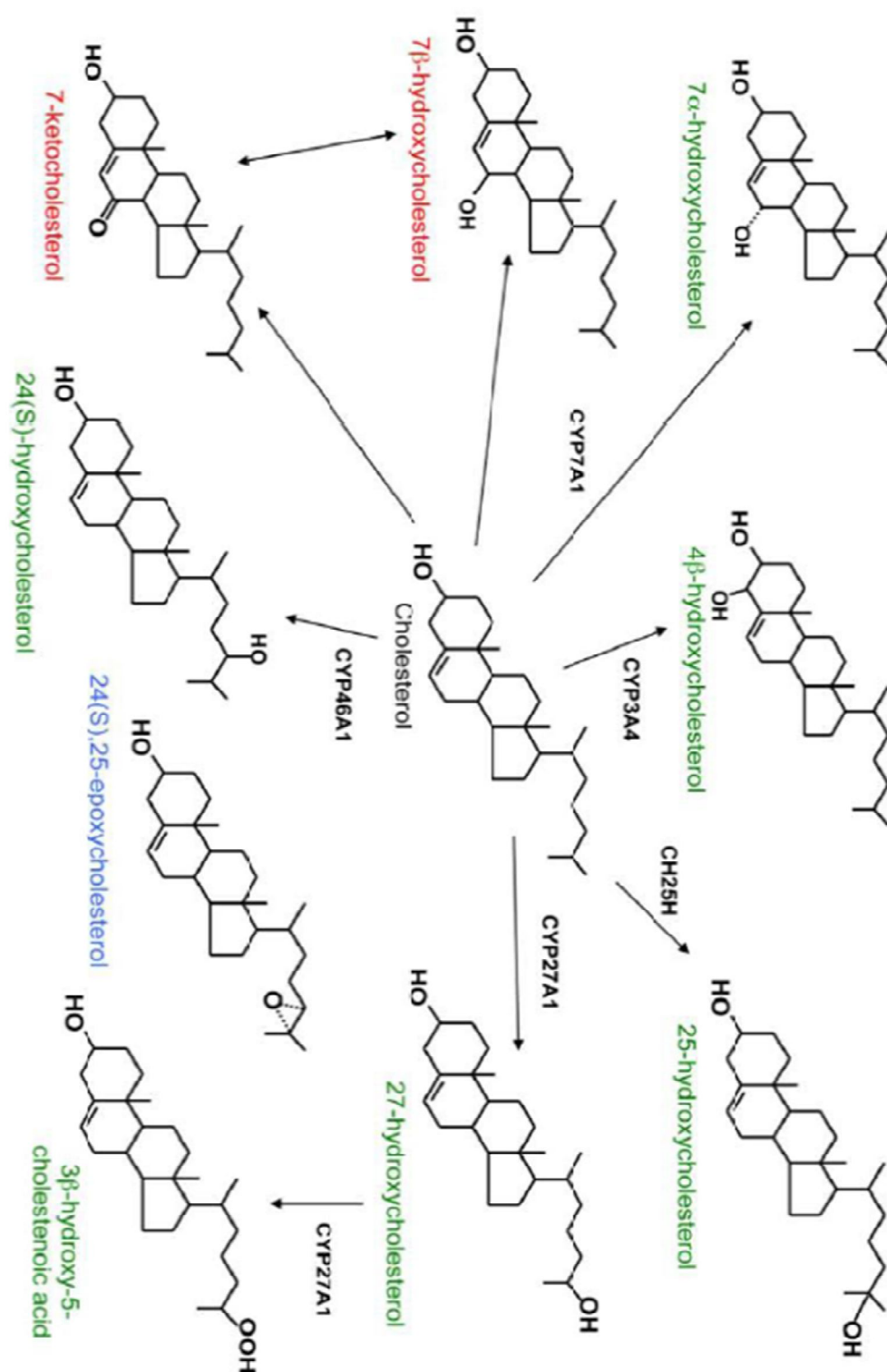


Figure 35 : Structure et origine de quelques oxystérols. Les oxystérols dérivés de la voie enzymatique sont indiqués en vert, les produits de l'auto-oxydation du cholestérol sont indiqués en rouge, et les espèces dérivées d'un aiguillage de la biosynthèse du cholestérol sont indiqués en bleu. Nb : le 25-hydroxycholestérol (ici en vert) est produit à la fois par voie enzymatique et par auto-oxydation du cholestérol. D'après [198].

Les principaux oxystérols formés sont également ceux oxydés en position 7 (comme ceux produits par synthèse exogène). L'oxydation *in vivo* est provoquée via les formes radicalaires actives par le contact entre les LDLs, certaines cellules vasculaires (monocytes/macrophages et cellules endothéliales) et des composants sanguins comme la myoglobine. Ces réactions d'oxydation peuvent avoir lieu dans les différents tissus.

Le paragraphe suivant détaille les mécanismes de la voie de synthèse enzymatique des oxystérols.

2. La voie de synthèse enzymatique des oxystérols

i. Origine et rôle des enzymes à cytochrome P450

L'histoire des cytochromes P450 (CYP P450) [199] commence en 1955 par la découverte d'un pigment jaune orangé (le « P ») capable de fixer une molécule d'oxyde de carbone dans les microsomes de foie de rat. Cette fixation entraîne la modification du spectre d'absorption de la molécule à 450 nm, d'où sa dénomination actuelle de P450 [200, 201]. A cette longueur d'onde, le fer de l'hème, à l'état réduit, est complexé au monoxyde de carbone.

Les CYPs P450 ne sont pas en réalité des cytochromes, mais leur nom persiste encore aujourd'hui. Le comité de nomenclature leur préfère le terme de « protéine hème-thiolate » [202]. Les CYPs sont une importante famille d'enzymes dont la principale fonction est de catalyser l'oxydation d'un grand nombre de composés organiques (hormones stéroïdiennes, acides gras, vitamines D, prostanoïdes, alcaloïdes, terpènes...). Leurs substrats peuvent être des métabolites intermédiaires, des médicaments, des drogues ou des composés chimiques provenant de l'environnement.

Ces hémoprotéines [203] sont des mono-oxygénases. Elles catalysent une mono-oxygénation à partir du dioxygène O₂, un atome d'oxygène étant transféré au substrat (RH) et l'autre étant réduit en eau : $\text{RH} + \text{O}_2 + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow \text{ROH} + \text{H}_2\text{O}$.

Une hémoprotéine, ou protéine à hème, est une protéine contenant un hème du groupe prosthétique, soit en lien covalent, soit non-covalent à la protéine elle-même. Le fer dans l'hème est capable de subir oxydation et réduction (aboutissant à Fe⁺² et Fe⁺³), quoique les composés ferriyl stabilisés [Fe⁺⁴] sont bien connus dans les peroxydases) (**Figure 36**).

Les hémoprotéines peuvent intervenir dans le transport ou la fixation d'oxygène (hémoglobine, myoglobine, neuroglobine, cytoglobine et leghémoglobine), des catalyses (peroxydases), comme membranes de transport active (cytochromes) ou lors du transfert d'électrons (cytochrome c).

Chez les vertébrés, les cytochromes P450 sont principalement exprimés au niveau du foie. Les composés qu'ils oxydent deviennent plus polaires et peuvent être ainsi éliminés, en particulier au niveau des reins. Il existe plusieurs cytochromes P450, qui ont une importance particulière en pharmacologie. En effet, ces hémoprotéines sont très impliquées dans la dégradation des molécules exogènes (xénobiotiques), en particulier des médicaments en catalysant la première étape de leur biotransformation. Les CYPs sont ainsi appelés enzymes de phase 1. Plus les cytochromes P450s sont actifs, et plus les médicaments sont rapidement métabolisés. Cela supprime l'activité de médicaments directement actifs, mais cela peut aussi augmenter leur transformation en métabolites actifs (comme pour la codéine avec le CYP2D6 par exemple).

A la fin de l'année 2006, 3000 séquences de gènes de P450s, tous règnes confondus, ont été identifiés, appartenant à toutes les espèces. Chez l'homme, 57 gènes et 47 pseudo-gènes ont été séquencés (<http://drnelson.utmem.edu/P450lect.html>). Ils sont répertoriés et désignés selon une nomenclature basée uniquement sur le pourcentage d'homologie entre les séquences en acides aminés. Il existe des centaines de cytochromes différents, répartis dans trois familles (CYP1, CYP2 et CYP3). On distingue également des sous-familles (CYP1A, CYP2D, etc.) et des isoenzymes distinctes (CYP3A4, CYP2D6, etc.).

ii. Cycle catalytique et réactions catalysées par les enzymes à cytochrome P450 (CYPs)

L'insertion d'un atome d'oxygène dans un substrat est l'aboutissement de la réaction d'hydroxylation catalysée par le cytochrome P450. La séquence d'événements qui conduit à cette réaction peut s'écrire suivant le bilan global : $\text{RH} + \text{NADPH} + \text{H}^+ + \text{O}_2 = \text{ROH} + \text{NADP}^+ + \text{H}_2\text{O}$.

La **Figure 36** schématise les réactions du cycle catalytique des CYPs et le détail des événements du cycle réactionnel est détaillé ci-dessous :

- 1- Fixation du substrat sur le site actif de l'enzyme dont le fer hémique est sous la forme ferrique avec expulsion des molécules d'eau présentes dans le site actif et rupture de la liaison fer-H₂O,
- 2- Réduction du fer ferrique (Fe³⁺) en fer ferreux (Fe²⁺) par transfert d'un électron de la NADPH-P450 réductase sur le fer ferrique,
- 3- Fixation de l'oxygène moléculaire sur la sixième liaison du fer hémique,
- 4- Incorporation d'un électron supplémentaire provenant soit du cytochrome b5 soit directement de la NADPH-P450 réductase, et réduction du dioxygène ferreux en complexe activité capable de réagir avec le substrat. A ce stade, on peut avoir production de peroxyde d'hydrogène suivant la réaction :

$$(\text{Fe}^{2+} - \text{O}_2)(\text{RH}) + 2\text{H}^+ = (\text{Fe}^{3+})(\text{RH}) + \text{H}_2\text{O}_2,$$
- 5- Première protonation nécessaire à la libération d'H₂O de l'étape suivante,
- 6- Libération d'une molécule d'eau après une deuxième protonisation et clivage hétérolytique de la liaison dioxygène,
- 7- Transfert de proton du substrat vers l'oxygène et formation d'intermédiaires radicalaires OH et R,

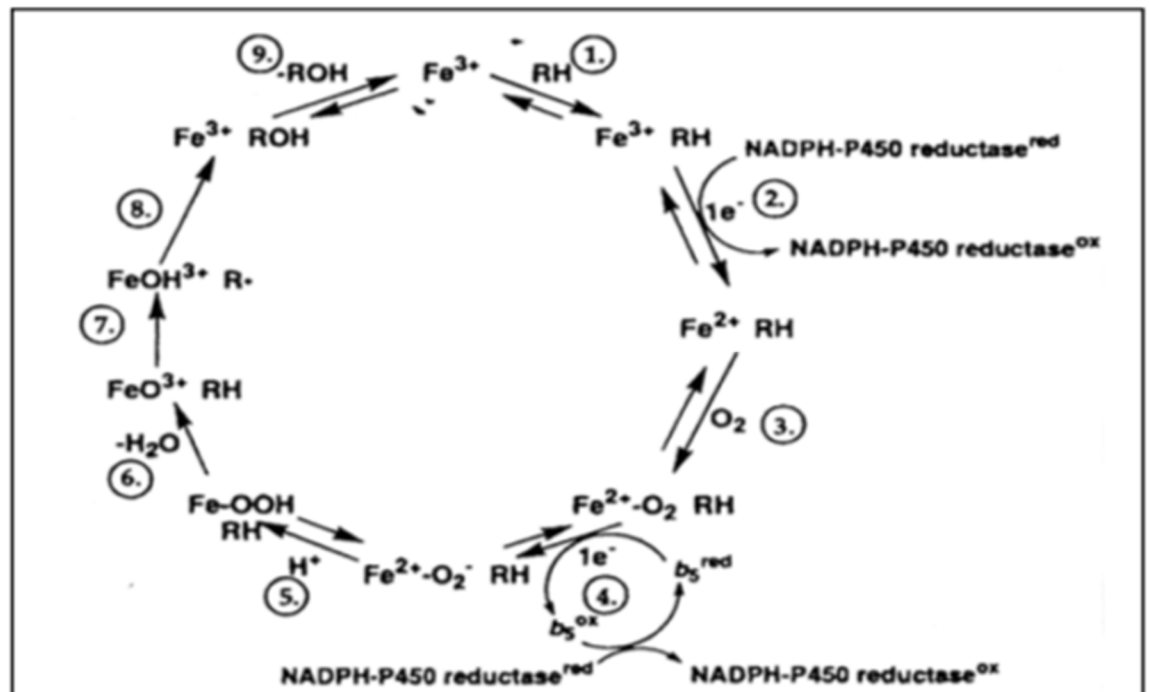


Figure 36 : Cycle catalytique du cytochrome P450.

- 8- Addition du radical hydroxyle (OH) sur le radical R. A ce stade, il peut y avoir libération de radicaux libres dans la cellule, pouvant générer un stress oxydant,
- 9- Libération du produit.

L'ensemble du processus catalytique se déroule selon une cascade d'événements conduisant à la libération du produit et à la régénération de l'enzyme.

Chaque type de cytochrome P450 a une fonction différente. Les différents types de réactions pouvant être catalysées par les enzymes à cytochrome P450 sont des activités monooxygénases (incluant l'hydroxylation, l'époxydation, la N-hydroxylation, la O-déalkylation), oxydase, réductase, peroxydase [204].

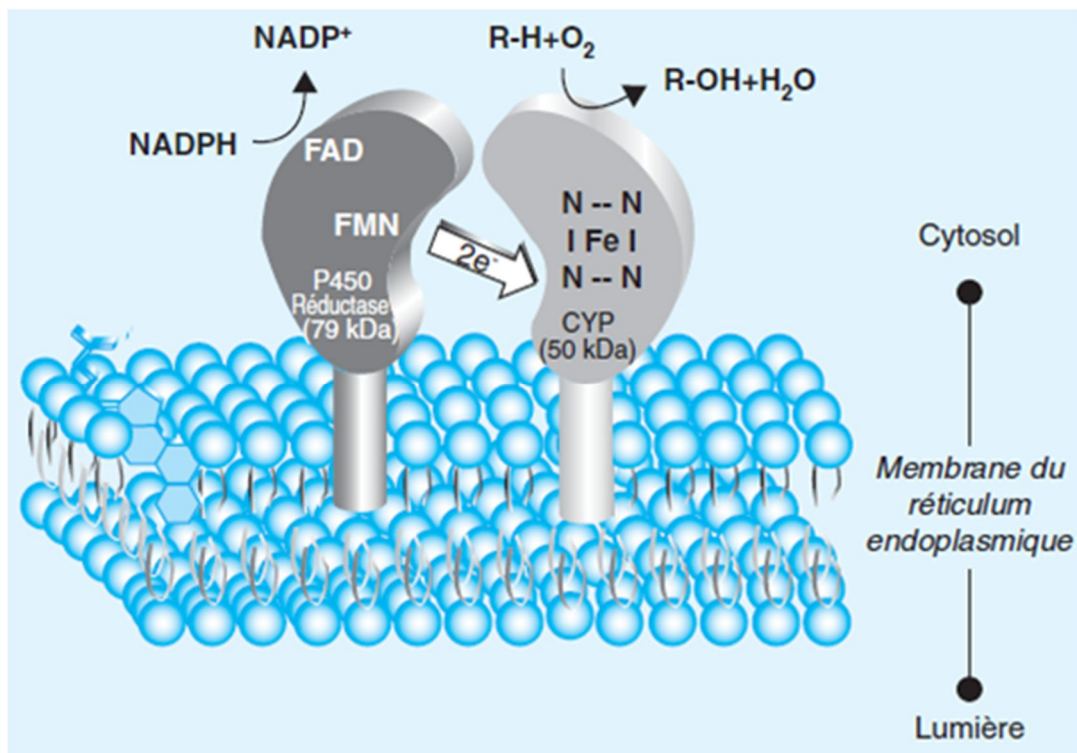


Figure 37 : Représentation du complexe monooxygénasique dans la membrane du RE.

La transformation d'un composé chimique par les enzymes à cytochrome P450 a lieu sur la face externe du RE où est ancrée l'enzyme, à son extrémité N-terminale [205] (**Figure 37**). Certaines réactions sont toutefois localisées dans la face interne des mitochondries ou dans les microsomes (**Figure 37**). Le site actif du cytochrome P450 contient un atome de fer fixé par des liaisons de coordinances. Deux électrons, provenant d'une molécule de NADPH, sont transférés à l'hémoprotéine par une flavoprotéine (FAD-FMN) en présence d'une molécule organique (R-H) et d'un atome d'oxygène. Le composé organique

est oxydé et un atome d'oxygène moléculaire est incorporé au produit chimique (R-OH). Le radical R peut être un xénobiotique (médicament, polluant, drogue) ou bien un acide gras, un stéroïde ou le cholestérol (**Figure 37**).

Le **Tableau 7** montre la distribution, la localisation cellulaire et le métabolite formé par l'action de quelques enzymes des CYPs P450. Chaque enzyme possède une fonction différente, et l'oxystérol synthétisé lui est propre.

Tableau 7 : Enzymes impliquées dans la synthèse d'oxystérols. 24S-OH: 24S-hydroxycholestérol; 25-OH: 25-hydroxycholestérol; 27-OH: 27-hydroxycholestérol; 7 α -OH: 7 α -hydroxycholestérol; 4 β -OH: 4 β -hydroxycholestérol; 7 β -OH: 7 β -hydroxycholestérol.

Enzyme	Distribution cellulaire	Localisation subcellulaire	Oxystérol formé	Références
24S-hydroxylase (CYP46A1)	neurones, rétine neurale, hépatocytes, surrénales	RE	24S-OH	[18, 195]
25-hydroxylase	hépatocytes macrophages	RE, Golgi	25-OH	[195, 206]
27-hydroxylase (CYP27A1)	hépatocytes, macrophages cellules endothéliales	mitochondries	27-OH	[195]
7 α -hydroxylase (CYP7A1)	hépatocytes, cellules ovariennes	RE	7 α -OH	[195]
CYP3A4	hépatocytes	microsomes	4 β -OH	[195]
11 β -hydroxystéroïde déshydrogénase	hépatocytes	microsomes	7-kétocholestérol, 7 β -OH	[195, 207]

iii. Fonctions métaboliques des cytochromes P450

Les CYPs sont impliqués dans la détoxification de xénobiotiques, mais également dans celui de molécules endogènes. Le **Tableau 8** montre les voies empruntées par les CYPs catalysant les molécules endogènes. De nombreuses interrelations entre le métabolisme des molécules endogènes et celui des xénobiotiques existent, notamment au cours de la stéroïdogénèse.

Certains CYPs métabolisent l'acide arachidonique. Au moins 14 CYPs appartenant à plusieurs familles participent directement ou secondairement à ce métabolisme. Les prostaglandines D, -E, -F, éicosanoïdes (EET, HETE), leucotriènes (LT) et thromboxane A₂ ainsi générés jouent un rôle dans de nombreux processus biologiques : vasoconstriction et

vasodilatation, réponse allergique, agrégation plaquettaire, transport ionique, hyperthermie [208-210].

Ce sont essentiellement les mono-oxygénases à CYPs P450 des familles 4 à 51 qui présentent des fonctions de biotransformation de molécules endogènes, telles que la biosynthèse des hormones stéroïdiennes, des stérols, des prostaglandines, des acides gras et de la vitamine D3 [211]. Les familles 1 à 3 participent au catabolisme de ces substances endogènes (**Tableau 8**).

Tableau 8 : *Fonctions métaboliques des cytochromes P450.*

Cytochrome P450	Fonctions métaboliques
CYP1	Métabolisme des xénobiotiques et des stéroïdes
CYP2	Métabolisme des xénobiotiques et des stéroïdes
CYP3	Métabolisme des xénobiotiques et des stéroïdes
CYP4	Métabolisme des acides gras, eicosanoïdes, acide arachidonique et médicaments
CYP5	Thromboxane A2 synthase
CYP7	Synthèse des acides biliaires
CYP8	Synthèse des acides biliaires, prostacycline synthase
CYP11	Stéroïdogénèse
CYP17	Stéroïde 17-alpha hydroxylase
CYP19	Aromatase (synthèse des œstrogènes)
CYP21	Stéroïdogénèse, stéroïde 21-hydroxylase
CYP24	Dégradation de la vitamine D, vitamine D-24 hydroxylase
CYP26	Hydroxylation de l'acide rétinique
CYP27	Synthèse des acides biliaires, hydroxylations de la vitamine D3
CYP39	7 α -hydroxylation du 24S-hydroxycholestérol
CYP46	Cholestérol 24S-hydroxylase
CYP51	Lanostérol 14-alpha déméthylase (biosynthèse du cholestérol)

Les cytochromes P450 sont des enzymes inductibles par différentes molécules endogènes ou exogènes. L'induction des CYPs peut être due à une régulation transcriptionnelle, post-transcriptionnelle (stabilisation de l'ARNm) ou post-traductionnelle (stabilisation de la protéine). Dans la plupart des cas, ces inducteurs sont également substrats de ces enzymes.

Cette inductibilité est régulée par l'intervention de récepteurs nucléaires qui activent la transcription des gènes codant les CYPs P450.

Ces récepteurs sont des régulateurs de CYPs et jouent également le rôle de transporteurs membranaires régulant la détoxification des acides biliaires. Ces récepteurs peuvent être des PPAR- α ou - γ (pour les acides gras poly-insaturés), PXR, FXR ou LXR. LXR est notamment un ligand pour CYP46A1 (nous reverrons ce point plus loin, dans le chapitre IV « Cholestérol et SNC »).

C'est à partir de l'utilisation de souris dont les gènes endogènes ont été invalidés, ainsi que celles de souris « humanisées », c'est-à-dire dont le gène a été remplacé par la forme humaine, qu'ont été identifiées les cibles moléculaires de ces récepteurs nucléaires et leurs ligands agonistes endogènes ou exogènes (xénobiotiques). Les effets de ces ligands sur les animaux « humanisés » peuvent donc être étudiés avant d'envisager leur utilisation en thérapeutique humaine.

Les cytochromes P450 sont parmi les enzymes les plus étudiées sur le plan génétique car il existe une forte variabilité individuelle des activités basales et induites. Le polymorphisme est défini comme une variabilité génétique présente dans plus de 1% de la population. Dans certains cas, ces variations génétiques (génotype) peuvent être associées à des modifications de l'activité enzymatique (phénotype).

Il existe deux types de polymorphismes des CYPs :

- le polymorphisme d'activité. Dans ce cas, l'expression du gène et la quantité de protéines sont inchangées, seule l'activité enzymatique est modifiée : il peut y avoir une augmentation ou une diminution de l'activité. Ces modifications d'activité vont altérer la biodisponibilité des médicaments en augmentant ou diminuant leur métabolisme dépendant des CYPs.

- le polymorphisme de régulation. L'action des facteurs de transcription sur la régulation transcriptionnelle des gènes étant dépendante de la séquence d'ADN dans les promoteurs, on peut concevoir que des mutations et/ou polymorphismes géniques de ces régions puissent entraîner des modifications de leur régulation. En retour, le niveau des protéines peut être affecté.

Certaines pathologies sont associées à un polymorphisme génétique ou une mutation de CYP P450. Ceci est dû à des modifications de séquences.

Par exemple, un polymorphisme du gène codant :

- CYP1B1 est à l'origine du glaucome [212],
- CYP7A1 induit l'hypercholestérolémie [213] ,
- CYP27A1 est à l'origine de la xanthomatose cérébro-tendineuse [214].

iii.a. Oxystérols et CYPs P450 : les voies d'élimination du cholestérol en excès

Le métabolisme du cholestérol et la biosynthèse des acides biliaires sont fortement dépendants d'enzymes à cytochrome P450. Le CYP51A joue un rôle-clé dans la synthèse du cholestérol et est l'un des CYPs P450 les mieux conservés de l'évolution.

La synthèse des acides biliaires à partir du cholestérol est la principale voie catabolique conduisant à l'élimination du cholestérol de l'organisme. Cette transformation métabolique est catalysée par au moins sept cytochromes P450 différents, dont les membres des familles CYP3, CYP7, CYP8, CYP27, CYP39 et CYP46 [215].

Le 27-hydroxycholestérol (27-OH) et l'acide cholesténoïque sont synthétisés *in vivo* par voie enzymatique (**Figure 35**). En effet, plusieurs équipes [216, 217] ont observé la formation de 27-OH en incubant du cholestérol marqué au carbone 14 avec des mitochondries hépatiques. L'équipe de Björkhem a mis au point une méthode sous atmosphère enrichie en $^{18}\text{O}_2$ permettant d'analyser *in vivo* la formation d'oxystérols dans le plasma et le foie [190]. Ceci a permis de discriminer la formation *in vivo* d'oxystérols de celle produite par auto-oxydation du cholestérol et d'éviter les artéfacts. En effet, le niveau d'oxystérols mesuré *in vivo* est de 1000 à 10000 plus faible que les teneurs en cholestérol.

L'enzyme qui permet l'hydroxylation en position 27 du cholestérol est la cholestérol 27-hydroxylase (CYP27A1) [188, 189]. CYP27A1 est localisée dans la membrane interne des mitochondries. Cette enzyme est présente chez tous les mammifères et dans la plupart des tissus [218]. Elle contribue à un mécanisme d'élimination ou de détoxification du cholestérol pour les cellules qui contiennent ce composé en excès.

Les acides biliaires jouent un rôle important dans la formation de micelles avec les lipides alimentaires dans la lumière intestinale, paramètre qui permettra leur hydrolyse et leur absorption par l'entérocyte. Les sels biliaires ont une fonction de détergent, en favorisant la

solubilisation des triglycérides et du cholestérol, des vitamines liposolubles et des certaines drogues lipophiles. Il y a deux voies majeures pour la synthèse d'acides biliaires : la voie centrale est initiée par l'enzyme limitante de la synthèse du cholestérol, la cholestérol7- α -hydroxylase (CYP7A1) tandis que la voie alternative (ou acide) est initiée par la cholestérol-27-hydroxylase (CYP27A1). Approximativement 1g de cholestérol est éliminé du corps humain chaque jour, et la moitié environ est excrétée dans les selles après avoir été converti en acides biliaires.

En conditions normales, chez l'homme adulte en bonne santé, la voie centrale domine [219]. Le pool d'acides biliaires est constitué de la bile primaire, l'acide cholique (CA), hydrophile et d'acide chénodésoxycholique (CDCA), hydrophobe et aussi des acides secondaires, acides déoxycholique (DCA) et lithocholique. L'acide cholique (CA) est considérée comme un produit de la voie classique tandis que CDCA est le principal produit final de la voie alternative (**Figure 38**). Dans l'hépatocyte, CYP27A1 joue un rôle clef dans le métabolisme des acides biliaires, en transformant le cholestérol en composés intermédiaires de ce métabolisme, le 27-OH et l'acide cholesténoïque.

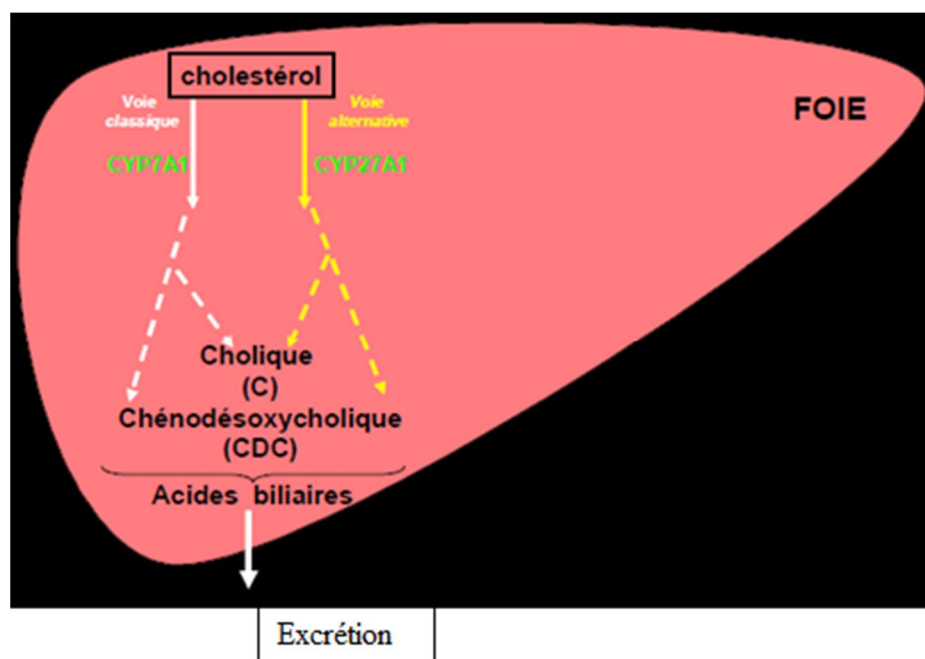


Figure 38 : Représentation schématique des deux voies de la biosynthèse des acides biliaires.

Récemment, il a été montré que cette enzyme participe aussi au métabolisme extra-hépatique des acides biliaires puisque les poumons, l'endothélium vasculaire et les macrophages synthétisent ces oxystérols. Ils sont transportés essentiellement dans le sang par

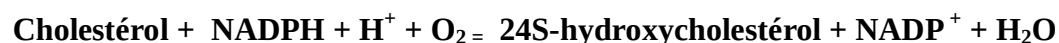
les HDL pour le 27-OH et par l'albumine pour l'acide 3 β -hydroxy-5-cholesténoïque. Ces oxystérols plus hydrophiles que le cholestérol vont être plus rapidement captés par le foie pour y être métabolisés en acides biliaires.

La colestyramine, un médicament utilisé pour traiter l'hypercholestérolémie, diminue l'absorption intestinale des acides biliaires, et par conséquent leur concentration dans les cellules hépatiques. Ceci entraîne une activation de CYP7A1 favorisant la dégradation du cholestérol.

Outre son rôle dans le métabolisme des acides biliaires, il a été montré que le 27-OH a des propriétés hormonales. Il se comporte comme un antagoniste de l'œstradiol au niveau des récepteurs des estrogènes de la paroi artérielle. Il empêche notamment l'œstradiol d'induire la libération de NO qui exerce, entre autres, un effet vasodilatateur. Sur d'autres types de récepteurs aux estrogènes, le 27-hydroxycholestérol peut avoir un effet pro-estrogénique, ce qui fait qu'on le classe parmi les SERM (*Selective Estrogen Receptor Modulator*) [220].

iii.b. La cholestérol 24S-hydroxylase ou CYP46A1

Le 24S-hydroxycholestérol (24S-OH) est synthétisé *in vivo* par voie enzymatique (**Figure 35**). L'enzyme qui permet cette conversion, la cholestérol 24S-hydroxylase appartient à la famille des enzymes à cytochrome P450 [221] d'où son appellation abrégée, CYP46A1. CYP46A1 est localisée dans le réticulum endoplasmique et est constituée d'environ 500 acides aminés (~56kDa). L'activité monooxygénase de CYP46A1 permet l'hydroxylation en position 24S du cholestérol. CYP46A1 a été détectée chez l'homme mais également chez les mammifères comme la souris [221] ou le rat [18]. CYP46A1 contient un groupement hème positionné entre deux hélices α et lié à la cystéine 437 de la protéine [222]. Cette enzyme réalise la réaction d'oxydo-réduction suivante en utilisant le complexe monooxygénasique intracellulaire (**Figure 37**) :



Cette réaction est permise par le groupement hème contenant un atome de fer qui est réduit ($\text{Fe}^{3+} + \text{e}^- = \text{Fe}^{2+}$) (**Figure 36**). Des données montrent que l'hydratation du site actif du substrat de CYP46A1 est dépendante de la liaison de partenaires redox [223].

Il existe des mutations du gène CYP46A1 humain conduisant à la présence d'un autre acide aminé en position 437 : la cystéine devient une glycine. Dans ce cas, la liaison à l'hème n'est plus possible, ce qui inactive complètement l'enzyme. Elle ne peut alors plus se lier au cholestérol, ni le métaboliser. Ceci a permis l'établissement de modèles animaux, notamment pour la recherche sur la maladie d'Alzheimer (MA). Par exemple, l'équipe de Russell a mis au point la souche murine transgénique B6;129S7-Cyp46a1tm1Rus/J [224].

CYP46A1 est exprimée essentiellement dans les neurones du cerveau et les cellules ganglionnaires de la rétine [18]. L'induction d'expression de CYP46A1 par les cellules gliales a été montrée chez des patients atteints de MA [22]. Cependant, l'hydroxylation en position 24 de la chaîne carbonée du cholestérol semble ne pas avoir lieu exclusivement au niveau cérébral. En effet, CYP46A1 est décelée également au niveau hépatique [225].

Le contrôle de l'expression de CYP46A1 passe par une régulation épigénétique. Outre l'héritage génétique, ce mécanisme est sous l'influence des facteurs environnementaux. Dans ce type de régulation, la variabilité tissulaire de l'expression génique peut venir de modifications de la structure de la chromatine. L'état de la chromatine est dicté par les modifications post-traductionnelles des protéines histones liées à l'ADN. Pour *cyp46a1*, la régulation épigénétique a lieu par l'acétylation des histones [225]. Ce processus permet l'ouverture de la chromatine et donc la transcription. Si les effets de cette régulation épigénétique de *cyp46a1* montrent une augmentation de son activité, sa réalité physiologique et ses conséquences restent pour l'instant inconnues.

La concentration plasmatique de 24S-OH est considérée comme le reflet à la fois de la capacité du cerveau à le synthétiser et de l'activité du foie à le métaboliser [226]. Le 24S-OH est transporté au niveau plasmatique par les HDL et les LDL puis rapidement épuré par le foie. Il entre ensuite dans la biosynthèse des acides biliaires grâce à l'action d'une 7 α -hydroxylase spécifique, la 24S-hydroxycholestérol 7 α -hydroxylase ou CYP39A1 [218]. La moitié du 24S-OH hépatique se retrouve dans la bile et la moitié sera excrétée sous forme d'acides biliaires. De petites quantités d'esters de 24S-OH, 3-sulfate et 3-glucuronide sont détectés dans les selles, l'urine et le plasma, ce qui suggère que la sulfation et la glucuronidation pourraient représenter d'autres voies du catabolisme du 24S-OH [227].

3. Les oxystérols dans l'inflammation et l'immunité

i. Cytotoxicité des oxystérols

De nombreux travaux effectués essentiellement *in vitro* sur différentes lignées cellulaires ont fait la démonstration de la cytotoxicité de certains oxystérols. Il s'avère que les oxystérols qui présentent la plus grande toxicité sont essentiellement produits par voie d'auto-oxydation du cholestérol. Ainsi, les 5-,6-epoxycholestérols, le 7 β -OH, le 7-KC sont cytotoxiques pour les cellules endothéliales de l'aorte de différentes espèces animales [228-230]. De même, le 25-OH est toxique pour les cellules endothéliales d'aorte bovines [229] et les cellules musculaires lisses d'aorte humaines, conduisant à la mort de ces dernières [231]. Cependant, des études effectuées *in vivo* chez l'animal ont montré que le 25-OH [232] ou le 27-OH [189] ajoutés dans l'alimentation ne sont pas toxiques aux doses utilisées et sont capables de jouer un rôle important dans la régulation du métabolisme hépatique et intestinal du cholestérol.

La cytotoxicité des oxystérols vis-à-vis des cellules nerveuses a également été décrite dans des expérimentations utilisant des concentrations élevées et non physiologiques de ces composés. Ainsi le 24S-OH et le 25-OH peuvent être toxiques pour les cellules neuronales en culture [233-235]. De même, le 7 β -OH, le 7-KC, et le 22-OH sont néfastes pour les cellules neuronales de rat [236].

La cytotoxicité de certains oxystérols peut provoquer la mort de plusieurs types cellulaires. Il semble que deux processus différents soient mis en cause : l'apoptose ou la nécrose. Ainsi le 7 β -OH et le 7-KC induisent l'apoptose de cellules endothéliales de cordon ombilical humain et de cellules musculaires lisses d'artères humaines alors qu'ils provoquent la nécrose des fibroblastes [237]. Cette toxicité sur les cellules de la paroi vasculaire suggère que certains oxystérols et plus particulièrement ceux synthétisés par voie chimique interviennent dans le processus de l'athérosclérose.

Les détails des mécanismes responsables de la cytotoxicité ne sont pas connus, mais il semble que l'incorporation d'oxystérols dans la membrane plasmique des cellules puisse initier l'apoptose. Cependant il est reconnu que certains oxystérols augmentent la fragmentation de l'ADN et diminuent l'expression des protéines de la famille Bcl-2 qui sont des facteurs anti-apoptotiques. D'autres études ont suggéré l'activation du système Fas/Fas ligand et la voie des MAPK (voie des protéines kinases activées par les mitogènes) dans l'induction de l'apoptose par les oxystérols. Toutes les observations qui ont été citées ci-

dessus proviennent essentiellement d'études *in vitro*. Il est à remarquer que pour toutes ces données, la nature chimique de l'oxystérol, la dose utilisée et le type cellulaire impliqué constituent autant d'éléments déterminants des effets observés. Des travaux *in vivo* sont nécessaires et essentiels pour repérer, parmi tous les oxystérols, ceux qui présentent une réelle toxicité et ceux qui sont utiles comme molécules régulatrices dans différents métabolismes.

En plus de leur action cytotoxique, les oxystérols apparaissent aussi capables de jouer un rôle dans les processus inflammatoires. De nombreuses études menées *in vitro* sur des cellules de la paroi vasculaire ou les cellules de l'EPR ont prouvé que les oxystérols augmentant la production de facteurs pro-inflammatoires [21, 237-239]. Dans des cas pathologiques, les oxystérols apparaissent comme des molécules permissives ou aggravantes dans le développement de la lithiase biliaire cholestérolique ou de l'athérosclérose. La formation d'oxystérols dans le cristallin est associée aux processus oxydatifs qui participent au développement de la cataracte [240].

ii. Les oxystérols, modulateurs immuns dans les processus inflammatoires

En 2002, Rosklint *et al.* [241] ont montré que le 25-OH stimule la production d'IL1 β par les macrophages humains en culture et amplifie leur réponse au LPS. Précédemment, la même équipe avait observé un effet inverse pour le TNF- α et IL-1 β [242]. Suite à ces données obtenues *in vitro*, il était difficile de conclure sur les effets pro- ou anti-inflammatoires des oxystérols. Peu de temps après, une étude *in vivo* a clairement montré que le 22R-OH et le 25-OH qui activent le récepteur LXR- β réduisent l'inflammation dans un modèle animal de dermatite, en diminuant la production des cytokines pro-inflammatoires [243].

De nombreuses études ont démontré la capacité de certains oxystérols administrés de manière exogène, principalement le 7-KC, le 7 β -OH et le 25-OH à augmenter l'expression des médiateurs inflammatoires tels que IL-8, TNF- α ou MCP-1 (protéine chimio-attractrice des monocytes) par les macrophages et d'autres types cellulaires n'appartenant pas à des cellules immunes spécialisées [244].

De manière intéressante, il a été suggéré que le 25-OH endogène était sécrété par les cellules dendritiques et les macrophages en réponse à l'activation des récepteurs *Toll-like*, l'expression du gène de la cholestérol 25-hydroxylase étant régulée par les interférons de type

I via la signalisation du récepteur à l'interféron- α et par la voie JAK/STAT1 (*Janus activated kinase / signal transducer and activator of transcription*). Par ailleurs, dans cette étude, il a été montré que le 25-OH secrété supprimait la commutation de classe des lymphocytes B en IgA, ce qui démontre une fonction cruciale du 25-OH dans le contrôle de l'immunité [245].

Dans la même optique, deux études récentes ont identifié le récepteur orphelin de la protéine G couplée de l'EBI2 (virus induit par le gène 2 d'Epstein-Barr) comme un récepteur membranaire aux oxystérols. Ce récepteur est fortement exprimé dans la rate et guide la migration des lymphocytes B [246]. Récemment, le 7 α ,25-OH généré par le 25-OH par la 7 α -hydroxylase (CYP7B1) a été identifié comme le ligand le plus actif de ce récepteur [247].

Ces données montrent le potentiel des oxystérols endogènes comme modulateurs immuns et soulèvent l'idée que les analogues aux oxystérols pourraient offrir des bénéfices thérapeutiques lorsqu'ils sont utilisés comme adjuvants des modulateurs immuns dans le traitement de l'inflammation et des maladies auto-immunes. Par exemple le 24S-OH a été proposé dans le traitement de l'encéphalomyélite auto-immune. La formation d'auto-anticorps ciblant les épitopes contenus dans les particules lipoprotéiques est étudiée dans la recherche de traitements contre le lupus erythomateux, qui est une conséquence de l'athérosclérose précoce [248, 249].

4. Les récepteurs nucléaires aux oxystérols

i. Récepteurs cellulaires au foie (LXR)

Les récepteurs LXR (*Liver X receptors*) sont des facteurs de transcription qui forment des hétérodimères fonctionnels avec RXR (*Retinoid X Receptor*) et activent ou répriment l'expression de gènes cibles dans le noyau des cellules. Cette régulation transcriptionnelle varie en réponse à différents ligands [250]. Ce complexe LXR/RXR est appelé hétérodimère permissif car il peut être activé ou inhibé par les ligands de LXR ou de RXR. Les sous-types de LXR sont d'importants composants d'un système régulateur complexe qui anticipent les niveaux de cholestérol et modifient en conséquence l'expression des gènes [251]. Les isoformes LXR- α et - β ont été identifiées et sont connues pour être activées *in vitro* par les oxystérols. LXR- α possède une expression restreinte aux organes viscéraux, intestin, foie, rein, rate mais également dans les macrophages. Contrairement à LXR- α , LXR- β est exprimé de manière ubiquitaire à des niveaux faibles dans tous les tissus. Les hétérodimères LXR-

α /RXR- α et LXR- β /RXR- α se lient à une séquence LXRE qui est une variante de la séquence idéale AGGTCA NNNN AGGTCA. Les oxystérols sont les principaux ligands de LXR. Ils se lient aux LXR. Les ligands les plus efficaces de l'isoforme α sont ceux oxydés sur la chaîne latérale tels que le 22R-OH, le 20S-OH, le 24S,25-epoxycholestérol, le 24S-OH, le 25-OH, ainsi que le 27-OH [252, 253]. Quant au 7-KC, au 7 α -OH, et au 7 β -OH ce sont des ligands moins efficaces des LXR [252].

Les différents oxystérols activent les LXR à des concentrations physiologiques similaires à celles rencontrées dans les tissus [254]. Il existe également des agonistes capables de lier les LXR, tels que le glucose [255]. De plus, les acides gras insaturés, tels que l'acide arachidonique peuvent agir comme antagonistes des récepteurs LXR et inhiber l'activation de gènes cibles.

Ainsi les LXRs liés à des oxystérols endogènes sont capables de diminuer leur cytotoxicité. En effet, il a été montré que l'activation des récepteurs LXR dans les macrophages permet de diminuer la réponse inflammatoire due à l'athérosclérose en inhibant l'expression des gènes liés à l'inflammation, tel que les interleukines et la cyclo-oxygénase-2 [256].

Il a aussi été montré récemment que dans les macrophages, des agonistes de LXR tels que le 22R-OH induisent la liaison de la protéine activatrice-1 (AP-1) à des séquences de reconnaissance présentes dans les régions régulatrices des gènes *apoe* et *abca1*. AP-1 est un facteur de transcription-clé régulé par la JNK (protéine Janus kinase). Ceci révèle un nouveau rôle de LXR dans la régulation de l'expression de gènes-clés impliqués dans l'athérosclérose, et implique l'activation des voies de signalisation JNK et PI3K/AKT (phosphadityl-inositol-3 kinase / protéine kinase B) [257].

D'autres pathologies sont liées à une diminution ou à une augmentation de l'expression des LXR dans l'organisme. Les LXR seraient impliqués dans les maladies cardiovasculaires, les hypercholestérolémies [258], les dyslipidémies, l'infarctus du myocarde [258], l'obésité, l'inflammation [256]. De nouvelles recherches sur les LXR suggèrent qu'un dysfonctionnement des récepteurs LXR pourrait causer une insulino-résistance et les diabètes de type 1 et 2 [259-262].

De plus, les gènes cibles des LXR codent des protéines qui ont des rôles critiques en régulant le catabolisme du cholestérol en acides biliaires (CYP7A1), la synthèse des acides gras à partir de précurseurs (SREBP1c, acide gras synthétase), le métabolisme des lipoprotéines plasmatiques (CETP, LPL), le transport transmembranaire des phospholipides

(PLTP) et/ou des stérols (ABCA1, ABCG1, ABCG5, ABCG8 (*ATP-Binding Cassette*)), et l'inflammation (NO synthase inductible, IL-1 β , IL-6, COX-2 (cyclo-oxygénase 2), MMP-9 (métallo-protéinase 9) [250, 253, 263].

Dans les macrophages, les LXR sont responsables, entre autres, du transport reverse du cholestérol [256] (**Figure 39**). Le transporteur cellulaire ABCA1, exprimé par les macrophages, transporte le cholestérol en excès en dehors de la cellule. ABCA1 est un transporteur monomérique qui se trouve dans la membrane plasmique des tissus incluant le foie, l'intestin, le placenta, le tissu adipeux, la rate et le cerveau. ABCA1 transporte les phospholipides et le cholestérol, tandis que ABCG1 a été impliqué dans le trafic intracellulaire des stérols dans les macrophages [166]. Ce transport est effectué par les pré- β -HDL via l'ApoA-I (**Figure 39**). Ce cholestérol en excès est transporté des tissus périphériques vers le foie où il est transformé en acides biliaires.

L'ApoE permet également de favoriser l'efflux du cholestérol stocké dans les macrophages vers le foie [264, 265].

Puisque les oxystérols cellulaires (provenant des macrophages) générés à partir du cholestérol libre sont des ligands endogènes des LXR, ils promeuvent également la transcription de *abca1*. La transcription du gène *abca1* est médiée par ApoE, et est régulée par le complexe LXR/RXR [264, 266, 267]. Les macrophages sont donc capables eux-mêmes d'éliminer leur propre cholestérol en excès. La transcription des gènes LXR est aussi influencée par les récepteurs aux peroxyosomes PPAR- α [266] et PPAR- γ [268, 269].

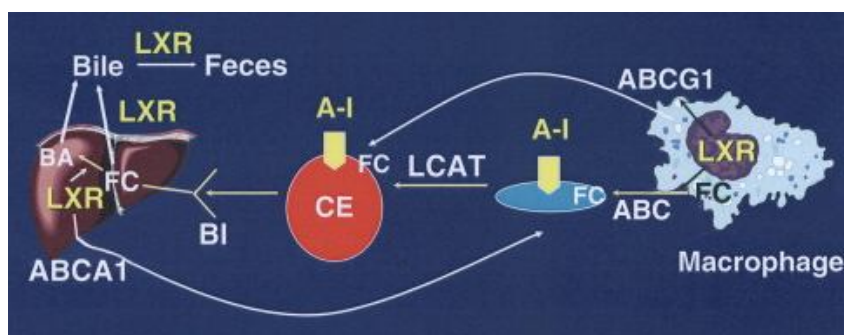


Figure 39 : Régulation de l'efflux de cholestérol dans les macrophages.

ii. Autres récepteurs aux oxystérols

De nouveaux récepteurs aux oxystérols ont été identifiés et ouvrent de nouvelles pistes pour la recherche biomédicale. Les principales actions et les différentes voies empruntées par ces récepteurs (impliqués dans le métabolisme du cholestérol ou dans la signalisation ou l'inflammation) sont résumées dans la **Figure 40** (d'après la revue de V. M. Olkkonen « *Oxysterols and their cellular effectors* », *Biomolecules*, 2012, référence non disponible).

Parmi eux:

- les OSBP (protéines liant les oxystérols) et ORPs (protéines apparentées aux oxystérols). Ces récepteurs cytoplasmiques jouent un rôle dans la régulation de l'homéostasie des lipides, du transport vésiculaire et la signalisation cellulaire [270-272],
- INSIG : C'est un récepteur impliqué dans la maturation des SREBP, dans la biosynthèse des acides gras et l'expression des récepteurs aux LDL [273, 274],
- StarD5 : récepteur impliqué dans le métabolisme et le transport du cholestérol cellulaire. StarD5 est sur-exprimé en conditions de stress du RE [275, 276],
- NPC1 : récepteur Niemann-Pick type 1, impliqué dans la sortie du cholestérol des vésicules d'endocytose hors des compartiments endocytiques tardifs [277, 278],
- ROR α , ROR γ : récepteurs à l'acide rétinoïque impliqués dans la régulation transcriptionnelle des gènes impliqués dans le développement, le métabolisme et l'immunité. Régulé par le 24S-OH et oxystérols oxydés en position 7 [279, 280].
- EBI2/GPR183 : récepteurs impliqués dans le contrôle de la migration des lymphocytes B [246, 281],
- Smoothened : oncoprotéine impliquée dans la signalisation Hedgehog (SHH) [282].

5. Oxystérols et pathologies (autres que SNC)

La présence des oxystérols a été rapportée en conditions pathologiques. Les effets cytotoxiques et pro-apoptotiques des oxystérols sont supposés jouer un rôle dans ces processus pathologiques. Aucune donnée ne permet actuellement de déterminer si les modifications de teneur en oxystérols dans différents tissus pathologiques sont une cause ou une conséquence de l'apparition d'une pathologie. En effet, l'implication directe des oxystérols dans la survenue de maladies n'a jamais encore été démontrée.

Par contre, un ensemble d'observations suggère un lien potentiel entre oxystérols et lithiase biliaire [283] et entre oxystérols, macrophages et athérosclérose [284, 285].

En conclusion de ce chapitre dédié aux oxystérols, la **Figure 40** résume les principales fonctions des oxystérols.

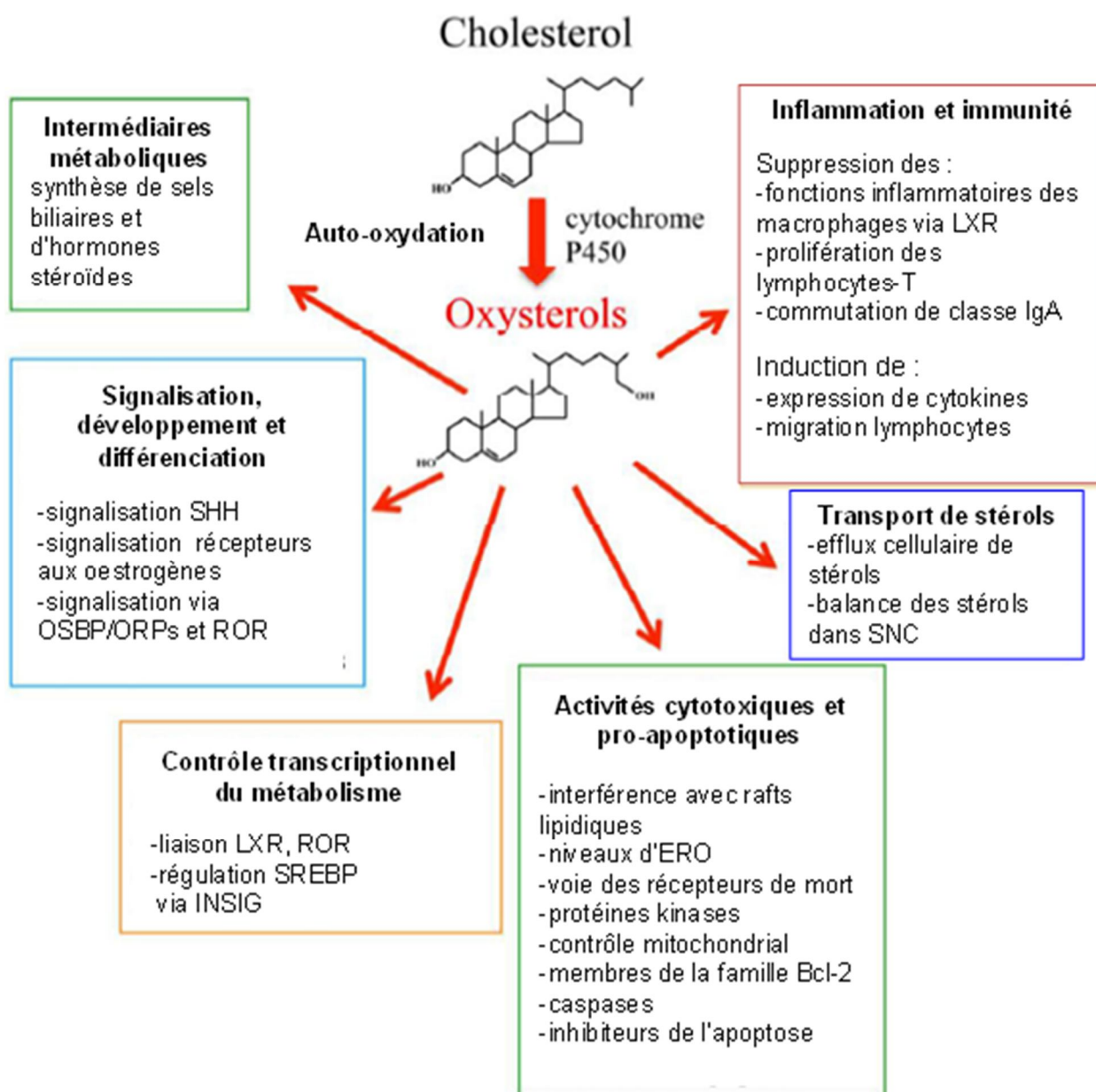


Figure 40 : Représentation schématique résumant les fonctions majeures des oxystérols.
D'après [198].

IV. Cholestérol et système nerveux central

1. Les différentes fonctions du cholestérol cérébral

Le cerveau représente 2 à 3% du poids corporel mais correspond à environ 25% de la quantité totale de cholestérol (et de ses dérivés) présente chez l'homme et les animaux.

Le cholestérol cérébral est principalement retrouvé sous forme estérifiée dans la myéline (70 à 80%), c'est un élément crucial de la formation de la gaine myélinique. La myéline, constituée essentiellement de lipides (sphingomyélines, glycosphingolipides, cholestérol) est essentielle pour isoler et protéger les fibres nerveuses. Grâce à la conductivité saltatoire et aux nœuds de Ranvier, la gaine de myéline permet la transmission de l'influx nerveux. Celle-ci améliore les propriétés électriques de l'axone et permet une vitesse de conduction plus élevée du signal (jusqu'à 120 m/s). Au cours de l'évolution, l'adaptation de la membrane plasmique riche en cholestérol pour former la myéline compacte, l'a rendue capable de connecter le cerveau sous la forme d'une structure très condensée sous un diamètre axonal étroit [286]. Due à un déficit en sphingomyélinase acide lysosomiale, la maladie de Niemann-Pick (type A ou B) aboutit à l'accumulation de sphingomyéline, puis de cholestérol dans les monocytes, voire dans le cerveau [287]. Dietschy *et al.* ont calculé que la quantité de cholestérol cérébral augmentait de 1,5 à 10,6 mg quelques semaines après la naissance chez la souris, et de 6 à 23 mg chez l'homme [288]. Cette augmentation est due au processus de myélinisation qui a lieu après la naissance.

La teneur en cholestérol du cerveau est indépendante de la prise alimentaire et de la synthèse hépatique. Ce cholestérol cérébral est produit *in situ* et donc non puisé dans la circulation. Comme nous l'avons vu précédemment, la voie endogène de synthèse cellulaire du cholestérol requiert plus d'une vingtaine d'enzymes (**Figure 22**, chapitre III.A.2.). Le pool de cholestérol du cerveau lui est spécifique. En effet, le cholestérol cérébral est isolé des autres pools de cholestérol circulant par la barrière hémato-encéphalique (BHE) [288-290]. Cette barrière est constituée de cellules endothéliales étroitement serrées qui jouxtent les cellules vasculaires des tissus qui se trouvent entre elles.

Plusieurs études montrent que le cholestérol du cerveau ne provient pas du cholestérol plasmatique par le transfert des HDL ou LDL à travers la BHE. En particulier, l'invalidation

des récepteurs HDL ou ABCA1 chez la souris n'altère pas la concentration, ni la synthèse du cholestérol dans le cerveau [291, 292]. Moins de 1% du cholestérol radiomarqué périphérique entre dans le cerveau [227]. Ces résultats montrent que les lipoprotéines sont peu, voire pas capables de traverser la BHE, et ne sont pas la source de cholestérol dans le cerveau (**Figure 41**). Très peu d'échanges ont lieu entre le cholestérol périphérique et le cholestérol du cerveau.

La synthèse de cholestérol durant le développement du système nerveux central est relativement importante, mais elle décline jusqu'à atteindre des niveaux très faibles à l'âge adulte [288]. Ceci est probablement dû à l'efficacité de recyclage du cholestérol cérébral. Consécutivement à cela, et aussi du fait que la myéline soit presque exclue du métabolisme général, le cholestérol cérébral a une durée de vie extrêmement longue [289]. Le renouvellement du cholestérol du cerveau est très faible, de l'ordre d'une demi-année dans le cerveau de rat [293]. Malgré ce mécanisme de réutilisation du cholestérol cérébral, il existe des voies spécifiques pour l'élimination du cholestérol du cerveau (paragraphe suivant sur CYP46A1). En effet, un excès de synthèse du cholestérol dans le cerveau entraîne une augmentation de son efflux vers le plasma sous forme de 24S-OH.

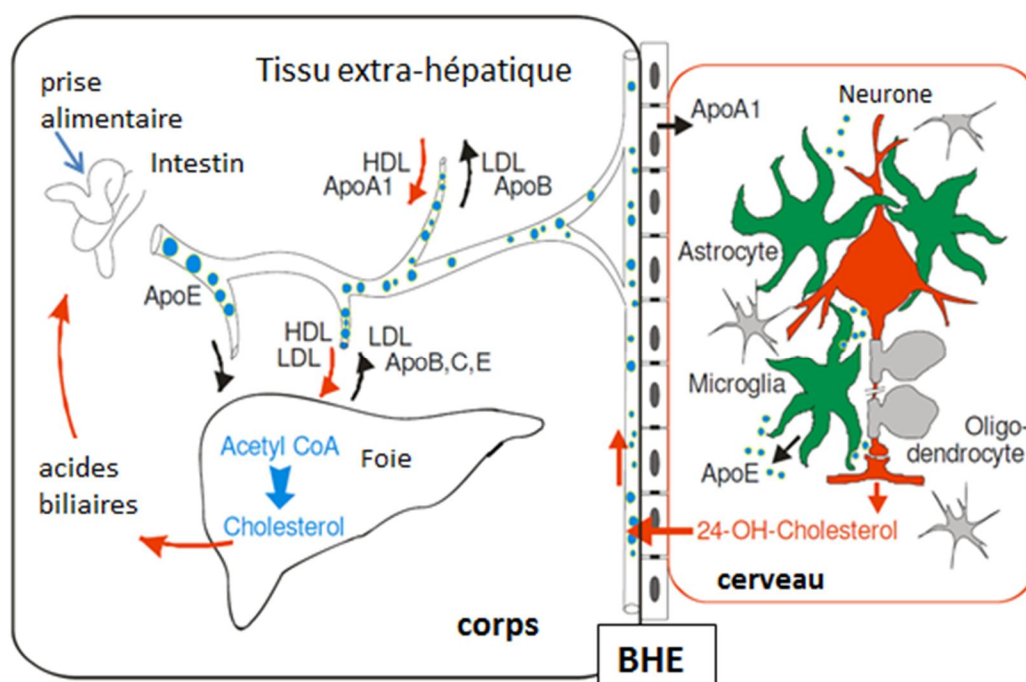


Figure 41 : Homéostasie du cholestérol dans le cerveau et le reste du corps. La BHE empêche le transfert des lipoprotéines au SNC. En bleu : sources de cholestérol, en rouge : voies d'élimination du cholestérol en excès, en noir : voie de transfert intercellulaire des lipoprotéines. D'après [227].

Le cholestérol est aussi important pour le développement normal du cerveau et est un élément critique pour activer le facteur morphogénique Sonic hedgehog (SHH). SHH est une oncoprotéine impliquée dans le développement de cancers [294], mais aussi dans le développement embryonnaire, dans le maintien des cellules souches [295] et dans la régénération tissulaire à l'âge adulte. SHH permet l'expansion de la plus grande population de neurones du cerveau. L'inhibition de SHH conduit à un développement anormal du cerveau [296]. Au cours du développement embryonnaire, SHH fait partie des facteurs qui sont recyclés par l'embryon dans le guidage axonal le long de l'axe longitudinal du cordon spinal. SHH permet de réguler la mise en place de la connectivité du système nerveux.

La voie de signalisation SHH est impliquée dans le métabolisme du cholestérol. Le cholestérol réalise un clivage protéolytique de SHH, libérant la partie N-terminale qui est impliquée dans la signalisation et est couplée de manière covalente au cholestérol (**Figure 42 ; A**) [297]. Les deux récepteurs membranaires de SHH, *Smoothed* (Smo) et *Patched* (Ptc) ont été identifiés. La cavéoline-1 présente dans les microdomaines riches en cholestérol de la membrane plasmique est régulée par le complexe SHH. La cavéoline-1 est associée à Ptc [298]. La production et la purification de Smo et Ptc en système levure (*Saccharomyces cerevisiae*) a permis de mieux caractériser leurs interactions avec la membrane plasmique et le cholestérol [299, 300].

Smo est responsable de la transmission du signal SHH à l'intérieur de la cellule réceptrice. Il est admis que Smo est constitutivement inhibée par Ptc en l'absence de SHH et que la liaison du ligand SHH sur son récepteur Ptc engendre l'activation de Smo qui à son tour va activer des facteurs de transcription à doigts de zinc, appelés facteurs Gli (**Figure 42 ; B**).

Ptc est une protéine membranaire qui traverse 12 fois la membrane et interagit avec SHH au niveau des deux larges boucles extracellulaires. Il a été montré qu'une augmentation de la concentration en cholestérol intracellulaire peut activer le récepteur Smo et la voie SHH. Ptc, connu comme répresseur de la voie SHH et comme récepteur de la protéine SHH, interagit avec le cholestérol et permet l'efflux de cholestérol (**Figure 42 ; B**). Sous l'influence de Ptc, le cholestérol intracellulaire est transporté à l'extérieur de la cellule.

Smo et Ptc peuvent être à l'origine de dysfonctionnements de la voie de signalisation SHH [301, 302]. En effet :

-l'interaction du complexe SHH/cholestérol avec Ptc inhibe la liaison de Ptc au cholestérol. Ptc pourrait contribuer à l'efflux de cholestérol des cellules et être un modulateur de la concentration intracellulaire de cholestérol. En effet, l'augmentation de cholestérol intracellulaire est responsable de l'enrichissement de Smo dans la membrane plasmique. Or, la surexpression de Smo est une étape importante de l'activation de la voie SHH [301] ;

-Smo appartient à la famille des récepteurs couplés à la protéine G et est responsable de la transduction du signal Hedgehog aux effecteurs intracellulaires de la voie de signalisation SHH. La dérégulation de Smo est impliquée dans de nombreux cancers mais aussi dans les désordres neurodégénératifs (syndrome de Gorlin, holoprosencéphalie) [303]. De plus, comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, Smo serait également un récepteur aux oxystérols [282].

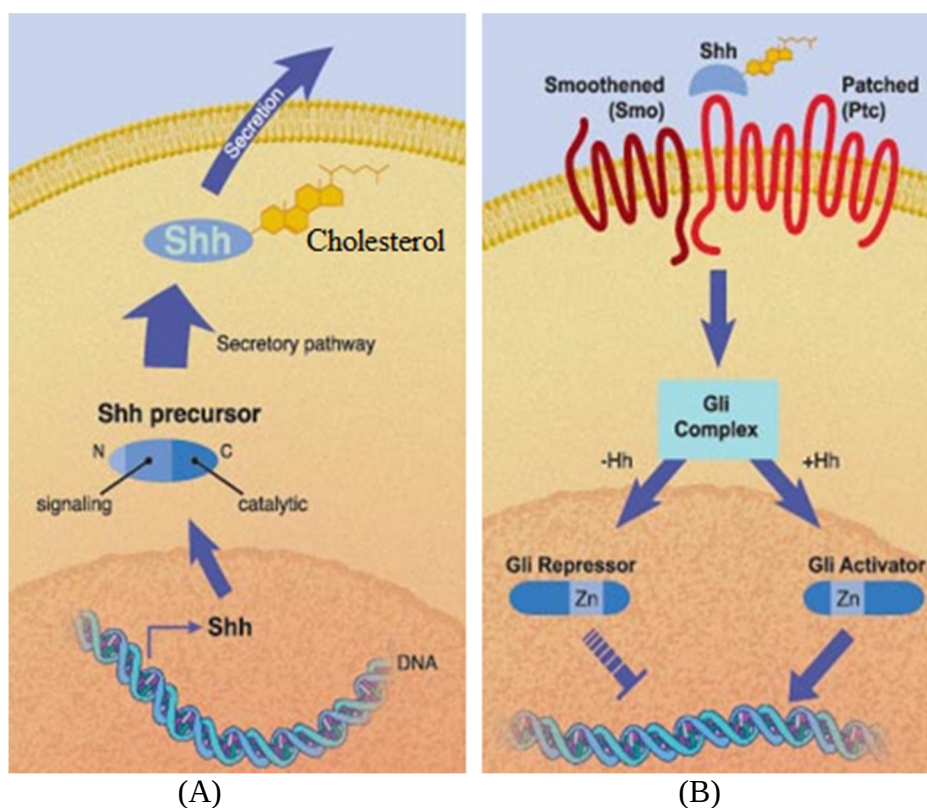


Figure 42 : (A) et (B): La voie de signalisation SHH. D'après [304].

D'autres éléments mettent en évidence les différences entre le métabolisme du cholestérol circulant et cérébral. En effet, les lipoprotéines circulantes diffèrent de celles du cerveau. L'estérification du cholestérol cérébral est essentiellement identique à celle décrite dans le foie excepté sur deux points : d'une part la très faible proportion de cholestérol estérifié dans le cerveau, qui représente seulement 0,5 à 1 % du cholestérol total [289], et

d'autre part, l'isoforme majoritaire de l'ACAT dans le cerveau, qui est l'ACAT-1 et non l'ACAT-2 [305, 306].

De plus, de nombreuses molécules impliquées dans le transport du cholestérol dans les tissus extra-cérébraux sont également exprimées dans le cerveau. C'est par exemple le cas du LDL-R, du SR-BI, des ABCA1 et G1 et des ApoE et A-I [307]. D'autres molécules sont exprimées en particulier dans le cerveau comme ABCG4 et ABCA2 [289]. Ainsi, les éléments pour un transport du cholestérol via les lipoprotéines sont réunis. C'est à ceci près que les lipoprotéines cérébrales sont distinctes de celles de la circulation générale [308].

L'ApoE est la lipoprotéine cérébrale majeure. C'est un élément important du métabolisme du cholestérol cérébral de par son implication dans la maladie d'Alzheimer (MA). En effet, la possession de l'allèle E4 de l'ApoE est considérée comme un facteur de risque pour les pathologies neurodégénératives comme la MA. En effet, l'allèle E4 est moins efficace que les allèles E2 et E3 dans certains processus physiologiques comme le transport de cholestérol, la plasticité et la réparation synaptiques [309]. L'ApoE est une glycoprotéine de 34kDa qui est très importante dans le métabolisme cérébral des lipoprotéines. Jusqu'à présent, on pensait que l'origine de la synthèse d'ApoE provenait de la production hépatique. En effet, comme l'ApoE est détectée dans la circulation et le cerveau, on pensait que la part d'ApoE retrouvée dans le cerveau ou le LCR était importée depuis la circulation. Ceci impliquait donc que l'ApoE pouvait passer la BHE pour être prise en charge par les cellules du cerveau. Très récemment, Liu *et al.* ont montré que finalement l'ApoE du LCR n'est pas dérivée du pool plasmatique, mais est synthétisée *in situ* dans le cerveau et ne passe pas la BHE [310].

Le cholestérol et l'ApoE sont des éléments cruciaux impliqués dans la formation de synapses et le contrôle de la fonction synaptique [289]. Un cycle normal de biosynthèse, de transport et de turn-over du cholestérol est requis pour la formation normale, la stabilisation, la fonction et la plasticité des synapses. Nous allons maintenant voir comment est maintenue l'homéostasie du cholestérol dans le cerveau.

2. Les interactions neurones-astrocytes dans le maintien de l'homéostasie du cholestérol

Dans le SNC, le cholestérol est présent sous forme de deux pools majeurs : le cholestérol myélinique qui est produit par les oligodendrocytes (un type de cellules gliales) et celui qui est présent dans les membranes plasmiques des neurones et des astrocytes. Les

astrocytes sont responsables de la plus grosse partie de la synthèse *de novo* du cholestérol requise par les neurones. En effet, il a été montré que les astrocytes en culture secrètent deux à trois fois plus de cholestérol que les neurones [311].

La dépendance neuronale en cholestérol extérieur varie en fonction des régions cérébrales considérées et des différents types de neurones. Cet apport permet aux neurones de croître [312] et de développer leurs réseaux synaptiques [313].

Puisque la synthèse des stérols dans le cerveau mature requiert un coût énergétique élevé dû à l'implication d'une batterie enzymatique (**Figure 22**, chapitre III.A.2.), les neurones sous-expriment leur propre synthèse de cholestérol afin de se consacrer à leur activité synaptique.

Ainsi les cellules neuronales sont dépendantes d'un flux de cholestérol qu'elles importent à partir de celui qui est synthétisé par les astrocytes [15]. En effet, les cellules gliales expriment HMGCR, l'enzyme limitante de la voie de biosynthèse du cholestérol. L'expression gliale de HMGCR est régulée par l'inhibition du rétro-contrôle de HMGCR via les SREBPs qui se lient à SRE-1 sur le gène *hmgcr*.

On distingue les pseudo-LDLs localisées dans le fluide cérébro-spinal des pseudo-HDLs synthétisées par les astrocytes. Les pseudo-HDLs sont synthétisées par les astrocytes selon un processus similaire à celui mis en jeu dans le foie. Les astrocytes synthétisent et secrètent l'ApoE qui permet de transporter le cholestérol via les lipoprotéines [314]. Le complexe cholestérol-ApoE est associé grâce à l'action d'ABCA1 (**Figure 43**), puis est relargué dans le milieu extracellulaire sous forme de particules lipoprotéiques sphériques et discoïdales contenant l'HDL, semblables à celles retrouvées dans la circulation. Ces lipoprotéines sont ensuite captées par les neurones (ou d'autres cellules) via le LDL-R ou le SR-BI ainsi que d'autres récepteurs aux lipoprotéines.

Dans les neurones, ces récepteurs aux lipoprotéines cérébrales (et, en particulier, le LDL-R) permettent donc l'apport du cholestérol, mais ils jouent également d'autres rôles. En particulier, ils modulent la transduction du signal (par exemple, lors de la liaison de l'ApoE avec HDL ou LDL), le développement cérébral, la croissance neuronale ou encore la régulation de la plasticité synaptique [315].

Une fois dans le neurone, le cholestérol passe la voie des lysosomes (post-), et le système endosomique tardif via les protéines de Niemann–Pick type C type 1 (NPC1) et 2 (NPC2). NPC1 est une large protéine membranaire se trouvant dans l'endosome, et NPC2 est une petite protéine luminale qui se fixe au cholestérol avec une haute affinité. Le cholestérol

peut alors être transporté à la membrane plasmique par les vésicules de transport ou bien distribué aux organelles [316]. Ensuite, le neurone peut utiliser ce cholestérol pour la formation des radeaux lipidiques à la membrane plasmique. L'APP, la β -sécrétase et la γ -sécrétase sont localisés dans les radeaux lipidiques [317, 318] (**Figure 43**).

Enfin, l'excès de cholestérol est transformé en 24S-OH qui est excrété des neurones via ABCG1 et ABCG4 vers les molécules d'ApoE ou vers le LCS [319]. Ce flux de 24S-OH peut être recapté par les astrocytes où il régule la synthèse de cholestérol et celle d'ApoE via LXR [15, 319]. L'ApoE est alors secrété des astrocytes via ABCA1. Puis le cycle recommence. Quant au 24S-OH en excès, qui n'est pas recapté, il passe la BHE pour être éliminé dans la circulation [320] (**Figure 41, Figure 43**).

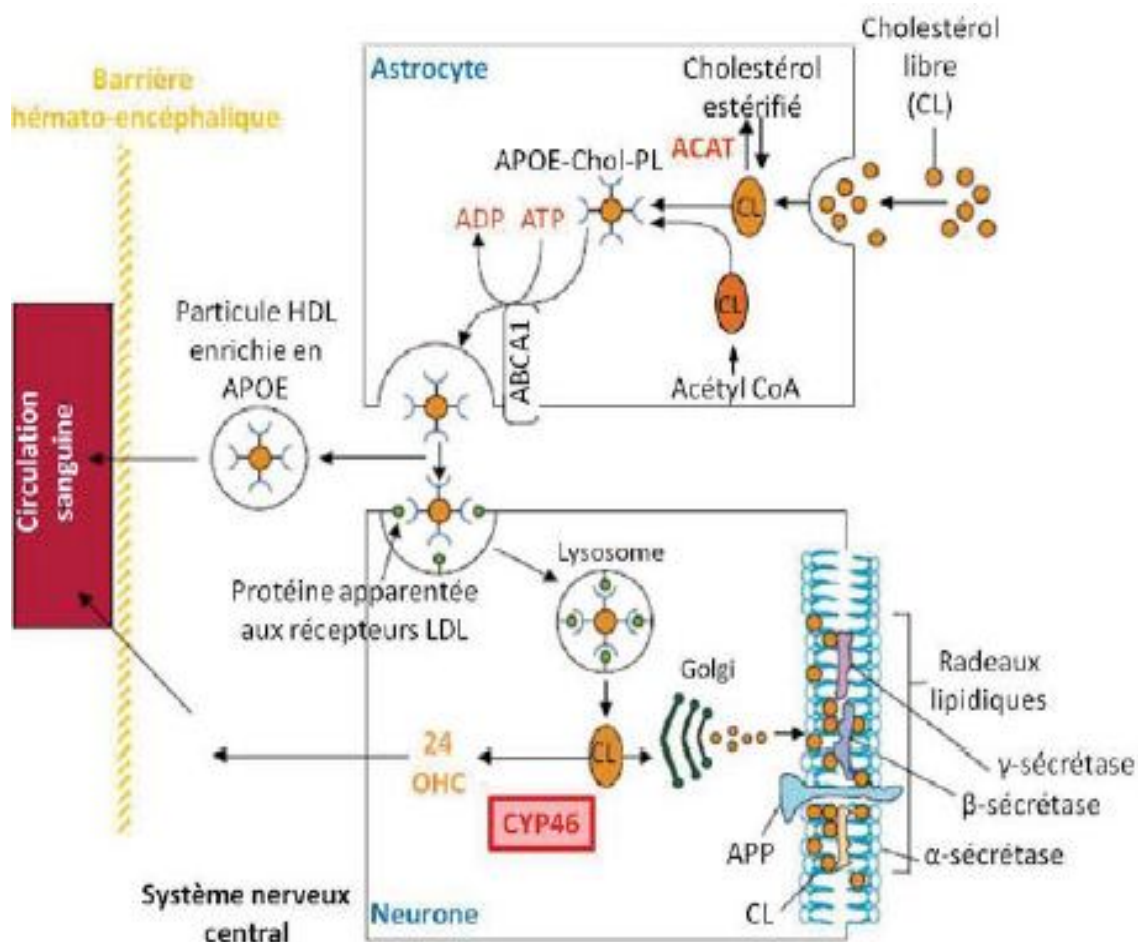


Figure 43 : Représentation schématique du transfert de cholestérol entre astrocytes et neurones. Chol : cholestérol ; HDL : lipoprotéine de haute densité ; LDL : lipoprotéine de faible densité ; PL : phospholipides. D'après [320].

Les deux isoformes de LXR, LXR- α et LXR- β sont exprimées dans le SNC, et elles sont impliquées dans le métabolisme du cholestérol cérébral. Les niveaux de LXR- β sont de 2 à 5 fois plus importants dans le cerveau par rapport aux niveaux retrouvés dans le foie. Les niveaux de LXR dans les neurones en culture et la glie sont de 2% et 17% respectivement, comparés au foie, tandis que les niveaux de LXR- β sont de 110% et 380% respectivement [321]. Les gènes cibles de LXR incluent *abca1*, *abcg1* et *srebp1*. Or, le 24S-OH et les autres oxystérols sont des ligands pour LXR. Ces récepteurs nucléaires [251] transmigrent vers le noyau et peuvent induire à la fois l'expression des gènes *apoe* et *abca1* dans les astrocytes [319] (Figure 44).

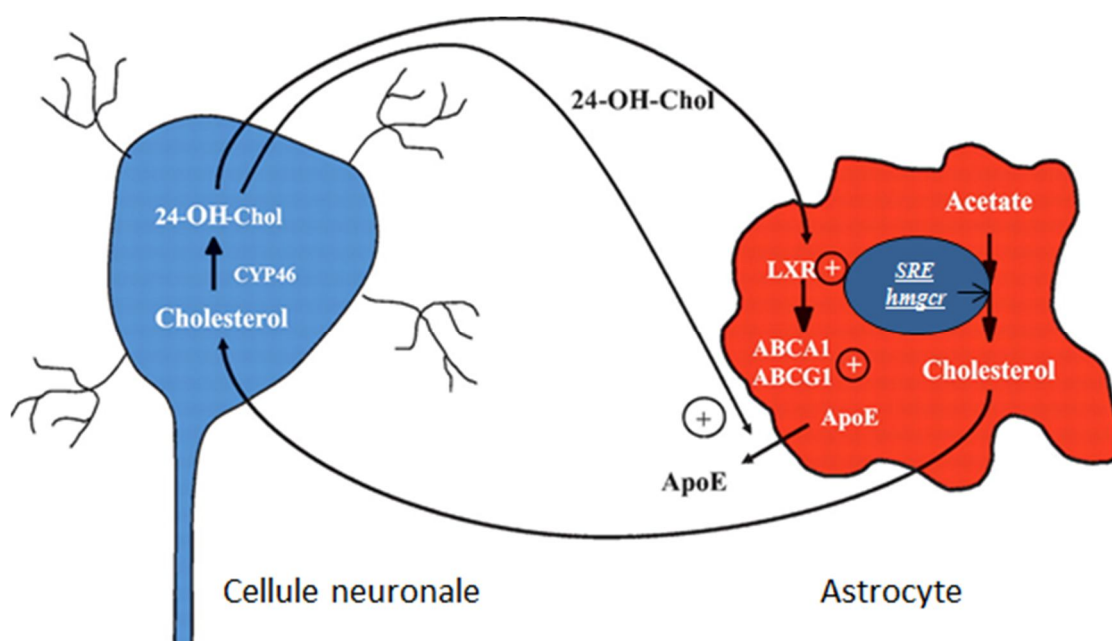


Figure 44 : Interactions neurones-astrocytes. D'après [322] avec modifications.

Cependant, si les faibles niveaux de 24S-OH retrouvés au niveau du foie témoignent d'un métabolisme efficace du 24S-OH via LXR, cela ne semble pas être le cas au niveau cérébral. En effet, bien qu'il ait été montré *in vitro* [319] une régulation de LXR par 24S-OH dans les astrocytes, le 24S-OH ne semble pas être, *in vivo*, le régulateur majeur de LXR au niveau cérébral [323]. Cette voie reste à explorer.

3. CYP46A1, une enzyme-clé de l'homéostasie cérébrale et rétinienne du cholestérol

Le cerveau est isolé de la circulation sanguine par la BHE et est donc privé d'une voie d'élimination rapide du cholestérol. Or un excès de cholestérol peut s'avérer cytotoxique.

Ainsi, dans le cerveau adulte, la concentration intra-neuronale en cholestérol doit être finement régulée. Le cholestérol en excès dans le cerveau ne peut être directement excrété, car il ne passe pas la BHE. Il doit être d'abord métabolisé en 24S-OH [16].

Comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, cette étape-clé est catalysée par la cholestérol-24S-hydroxylase (CYP46A1), (**Figure 45**) appartenant à la famille des cytochromes P450, et exprimé essentiellement par les neurones [324], mais aussi par les cellules ganglionnaires de la rétine (CGR) [18].

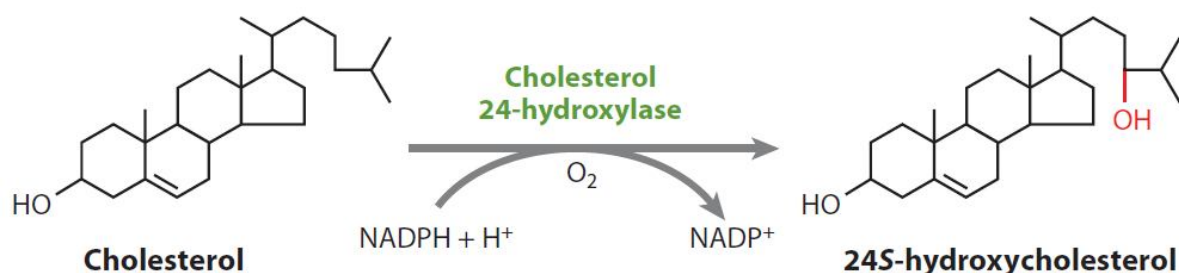


Figure 45 : Conversion enzymatique du cholestérol en 24S-hydroxycholestérol.

Comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent sur les oxystérols et CYP P450 (III.B.2.iii), le 24S-OH est une molécule monooxygénée. Elle est plus hydrophile et est capable de passer cette barrière qu'est la BHE, constituée d'une membrane hautement lipophile [289, 325]. L'hydroxylation du cholestérol permet donc d'augmenter son flux hors de la BHE (**Figure 46**, **Figure 47**).

Le cholestérol natif est orienté parallèlement aux phospholipides, de telle sorte que le groupement OH en position 3 interagit avec la tête polaire des phospholipides. Le groupement OH en position 24 du 24S-OH induit une réorganisation de la chaîne latérale des phospholipides, créant ainsi un 'canal' par lequel le 24S-OH peut transiter jusqu'au feuillet opposé d'où il peut être facilement extrait par un accepteur qui est une lipoprotéine.

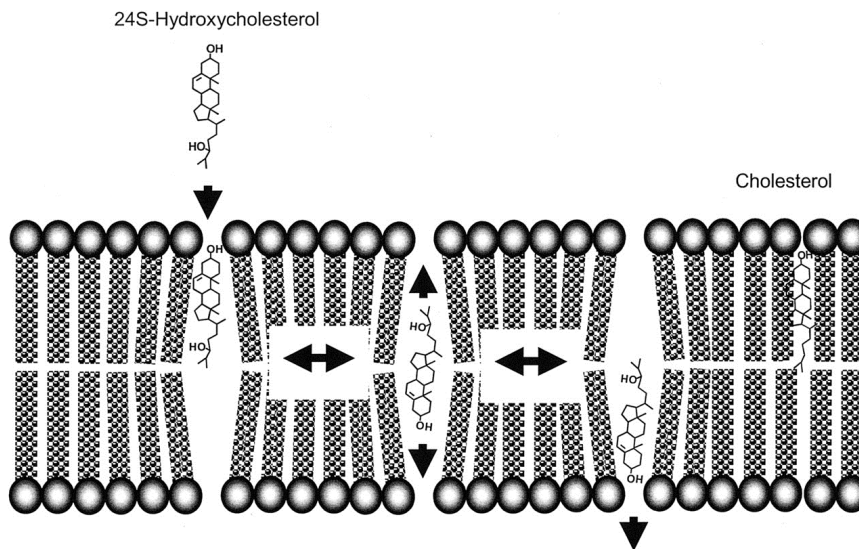


Figure 46 : Modélisation du passage du 24S-OH à travers une membrane. D'après [289].

Le sens du flux à travers la membrane est probablement déterminé par le gradient de concentration du 24S-OH [289]. Le 24S-OH traverse les membranes lipidiques beaucoup plus facilement et rapidement que le cholestérol. En effet, l'ajout du groupement hydroxyle au bout de la chaîne aliphatique permet une interaction beaucoup plus favorable avec les phospholipides membranaires. De plus, l'intervention du transporteur OATP2 (*organic anion transporting polypeptide 2*) comme molécule 'cargo' dans le passage du 24S-OH à travers la BHE a été démontrée chez le rat [326].

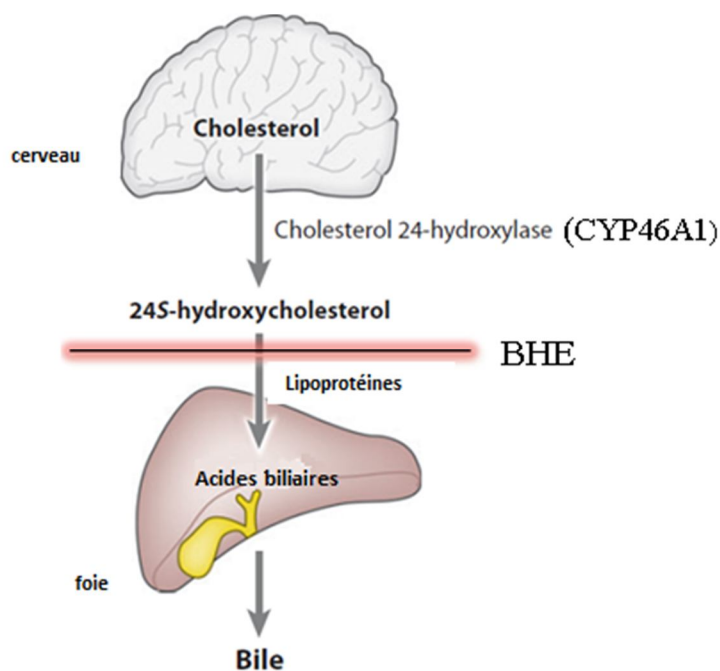


Figure 47 : Interactions du 24S-OH à travers la BHE. D'après [222].

La formation de 24S-OH permettrait d'éviter l'accumulation de cholestérol dans le cerveau, accumulation qui a été associée à des désordres neurodégénératifs incluant la maladie d'Alzheimer (MA) [289]. Il a été montré que l'élimination du cholestérol du cerveau des rats [16] et des souris [327] correspond à environ 2/3 de la synthèse de cholestérol de cet organe (**Figure 48**). Chez la souris, il est estimé que, pour un turn-over normal du liquide céphalo-rachidien (LCR), 1 à 2 mg de cholestérol pourraient être éliminés du cerveau chaque jour via le LCR sous forme de lipoprotéines (HDL ou LDL) contenant l'ApoE [288, 327]. 64% du cholestérol cérébral éliminé est soumis à l'action de la CYP46A1 [328]. Le 24S-OH ainsi relargué dans la circulation générale est ensuite capté par le foie pour être intégré dans la biosynthèse des acides biliaires.

Dès 1995, le développement des mesures du 24S-OH plasmatique en spectrométrie de masse, réalisées avec du 24S-OH deutéré utilisé comme standard interne ont été mises en place [329]. Chez l'homme, le flux de 24S-OH est de 6mg/jour (0,09mg/jour/kg). La clairance hépatique du 24S-OH est de 7,6mg/jour, ce qui est pratiquement égal à celui qui est mesuré dans le cerveau [330]. De plus, Bretillon *et al.* (2000) ont comparé les niveaux physiologiques du 24S-OH plasmatique aux volumes estimés du foie et du cerveau. Ces travaux ont montré que le flux du 24S-OH plasmatique était inversement proportionnel à la surface corporelle de l'individu [226]. Chez l'homme, les niveaux plasmatiques de 24S-OH reflètent la balance entre sa production cérébrale et son métabolisme hépatique. Ainsi, le rapport entre le poids du cerveau et le volume du foie est un bon marqueur des variations du 24S-OH au cours de la vie. La corrélation est établie en déterminant si les variations des teneurs en 24S-OH en fonction de l'âge suivent les variations du rapport de la taille du foie et du poids du cerveau calculé chez les sujets [226].

Le rôle de CYP46A1 dans la régulation du métabolisme intracérébral du cholestérol est confirmé par l'existence de sévères défauts d'apprentissage spatial, associatif et moteur chez des souris KO pour le gène [331]. Dans une expérience de thérapie génique chez la souris, où des injections cérébrales de vecteur viral contenant CYP46A1, ont été effectuées, il a été montré que la surexpression de CYP46A1 réduisait la pathologie due à l'accumulation de peptides d'amyloïde β [332].

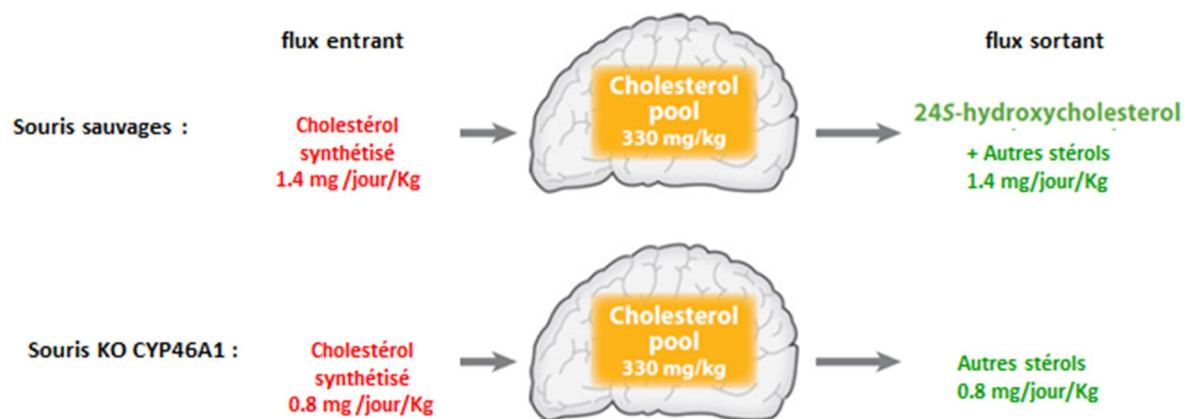


Figure 48 : Quantité de cholestérol cérébral produite et éliminée sous forme de 24S-OH chez la souris sauvage et knockout pour CYP46A. D'après [288, 327].

En conditions pathologiques, une étude réalisée chez des patients atteints de la maladie d'Alzheimer (MA) a montré l'induction d'expression de CYP46A1 par les cellules astrogliales [22, 333]. De plus, il a été montré que la surexpression de CYP46A1 dans les astrocytes réduit l'utilisation du glutamate (en dissociant EAAT2 (transporteur du glutamate exprimé à la surface des cellules gliales) des rafts lipidiques [334], ce qui amplifie l'excitotoxicité du glutamate. Le stress oxydatif est un élément puissant qui augmente l'expression des ARNm de CYP46A1 [335].

La suppression de CYP46A1 diminue le 24S-OH de 75% dans le sérum et de 98% dans le cerveau. La synthèse de cholestérol diminue de 40% alors que le taux de cholestérol cérébral n'est pas altéré [327]. CYP46A1 est donc responsable de 40% du renouvellement du cholestérol. Des mutations du gène codant CYP46A1 peuvent faire varier la concentration en 24S-OH [336].

Le 24S-OH représente la pièce maîtresse d'un mécanisme favorisant l'élimination du cholestérol cérébral [25]. Cependant, en trop grande quantité, il peut s'avérer neurotoxique comme cela est suggéré dans des études *in vitro* [337, 338]. En effet, le 24S-OH peut augmenter les dépôts de peptides d'amyloïde β dans les neurones, et potentialise les effets apoptotiques de l'amyloïde β [339].

Cependant, le flux de 24S-OH du cerveau vers la circulation sanguine n'est pas le seul mécanisme de détoxification de stérols cérébraux par les enzymes du métabolisme du cholestérol. En effet, d'autres mouvements d'oxystérols à travers la BHE ont été identifiés. Un flux « entrant » (de la circulation vers le cerveau) de 27-OH, ainsi qu'un flux « sortant »

d'acide 7-hydroxy-3-oxo-4-cholesténoïque ont été mesurés par l'équipe de Björkhem [227, 340]. Celui-ci est formé à partir du 27-OH par l'enzyme qui catalyse cette réaction, CYP27A1. Il ne semble pas y avoir de flux de 27-OH du cerveau vers le sang. Les rôles exacts du 27-OH dans le cerveau ne sont pas bien connus. Cependant, le 27-OH pourrait influencer la synthèse de cholestérol, par exemple en activant LXR- β [341]. Le 27-OH semble aussi être impliqué dans des mécanismes cognitifs, ce qui fait un lien entre la MA et l'hypercholestérolémie qui en est un de ses risques avérés [342]. Cependant, la production de 27-OH cérébrale est faible : elle représente moins de 10% du taux de 24S-OH [343]. Puisque le 27-OH n'est pas formé exclusivement dans le cerveau mais dans le foie, il est donc probable que le 27-OH soit prioritairement transformé par CYP7B1 au niveau du foie. Pour cela, CYP7B1 catalyse la conversion du 27-OH en 7 α , 27-hydroxycholestérol (7 α ,27-OH). CYP27A1 est exprimée dans tous les types cellulaires du cerveau, notamment dans la microglie, alors que l'expression de CYP7B1 est retrouvée dans les neurones en faibles quantités, et dans les astrocytes [341]. De plus, il a été rapporté que les cellules neuronales progénitrices éliminent le cholestérol par la voie CYP27A1 [344]. Tandis que lors de la différenciation neuronale, la voie CYP46A1 est régulée par les facteurs de transcription Sp recrutés au niveau du promoteur du gène *cyp46a1* [345].

4. Métabolisme du cholestérol dans la rétine

La capacité de la rétine à synthétiser des particules de type lipoprotéines a été démontrée [346, 347]. Des travaux portant sur la DMLA ont notamment caractérisés cette synthèse en région maculaire [348]. Comme nous l'avons vu précédemment les lipoprotéines sont riches en lipides, particulièrement en cholestérol et en esters de cholestérol [347]. Ces lipides s'accumulent avec l'âge dans la membrane de Bruch (BrM). L'accumulation de ces lipides crée une barrière physique qui limite les échanges entre la choroïde et la couche de l'EPR [349]. Une des conséquences de l'accumulation des esters de cholestérol au niveau de la lame basale de l'EPR pourrait être une diminution de la captation des nutriments par la rétine interne, ce qui compromettrait la fonction rétinienne, comme l'a suggéré notre équipe en associant l'accumulation des esters de cholestérol (CE) dans la BrM et la réponse électrorétinographique [3].

La couche de l'EPR est l'interface cellulaire et métabolique entre la rétine neurale et la choroïde. Les cellules de l'EPR expriment une variété de récepteurs spécifiques aux lipoprotéines (récepteurs aux VLDL et aux LDL) et récepteurs 'scavenger' (CD36, SR-BRI et

SR-BRII) [350] (**Figure 49**). Chaque jour, l'EPR ingère et métabolise des milliers de segments externes (riches en lipides) des photorécepteurs. Le CD36 et l'intégrine $\alpha\beta 5$ sont impliqués dans l'internalisation de ces segments externes par les cellules de l'EPR [350].

Le récepteur aux LDL (LDL-R) est aussi localisé au niveau des cellules endothéliales des choriocapillaires, des segments internes des photorécepteurs et des cellules de Müller (CGM) [12, 351] (**Figure 49**).

La localisation, dans la couche de l'EPR ou dans celle des CGR, d'un ensemble de protéines impliquées dans le transport des lipides (ABCA1, ApoA-I, ApoE, LCAT et CETP) suggère que la rétine emploie un mécanisme de transport lipidique interne qui implique le développement et la maturation des HDL [352]. Dans la rétine, les HDL et LDL pénètrent depuis le réseau vasculaire choroïdien, traversent la membrane de Bruch et utiliseraient les récepteurs 'scavenger' (SR-BI, SR-BII et CD36) et les LDL-R localisés au niveau de l'EPR (**Figure 49**).

Il est suggéré que les particules de LDL dégradées dans l'EPR seraient ré-assemblées en particules apparentées aux lipoprotéines (*HDL-like*) en recrutant l'ApoA-I et l'ApoE. Ces HDL seraient des pré-HDL, elles peuvent être secrétées depuis le pôle apical de l'EPR jusqu'à la CPI via le transporteur ABCA1. Les pré-HDL arrivent à maturité grâce à l'intervention de deux transporteurs du cholestérol : LCAT et CETP dans la CPI [352] (**Figure 49**).

Le cholestérol, les esters de cholestérol et les autres lipides traversent la couche de l'EPR et des photorécepteurs (des segments internes (IS) et externes (OS)), et passent entre les CGM et les photorécepteurs, en tant que molécules « cargo » sur les particules pré-HDL. L'EPR pourrait aussi exporter le cholestérol (ou les oxystérols) sous forme de particules apparentées aux lipoprotéines dans le réseau choroïdien, ce qui maintiendrait l'homéostasie du cholestérol dans la rétine (**Figure 49**).

Comme les neurones du cerveau, les cellules ganglionnaires de la rétine (CGR) sont capables d'éliminer le cholestérol en excès puisqu'elles expriment CYP46A1 [17]. Le 24S-OH formé est éliminé dans la circulation par la BHR.

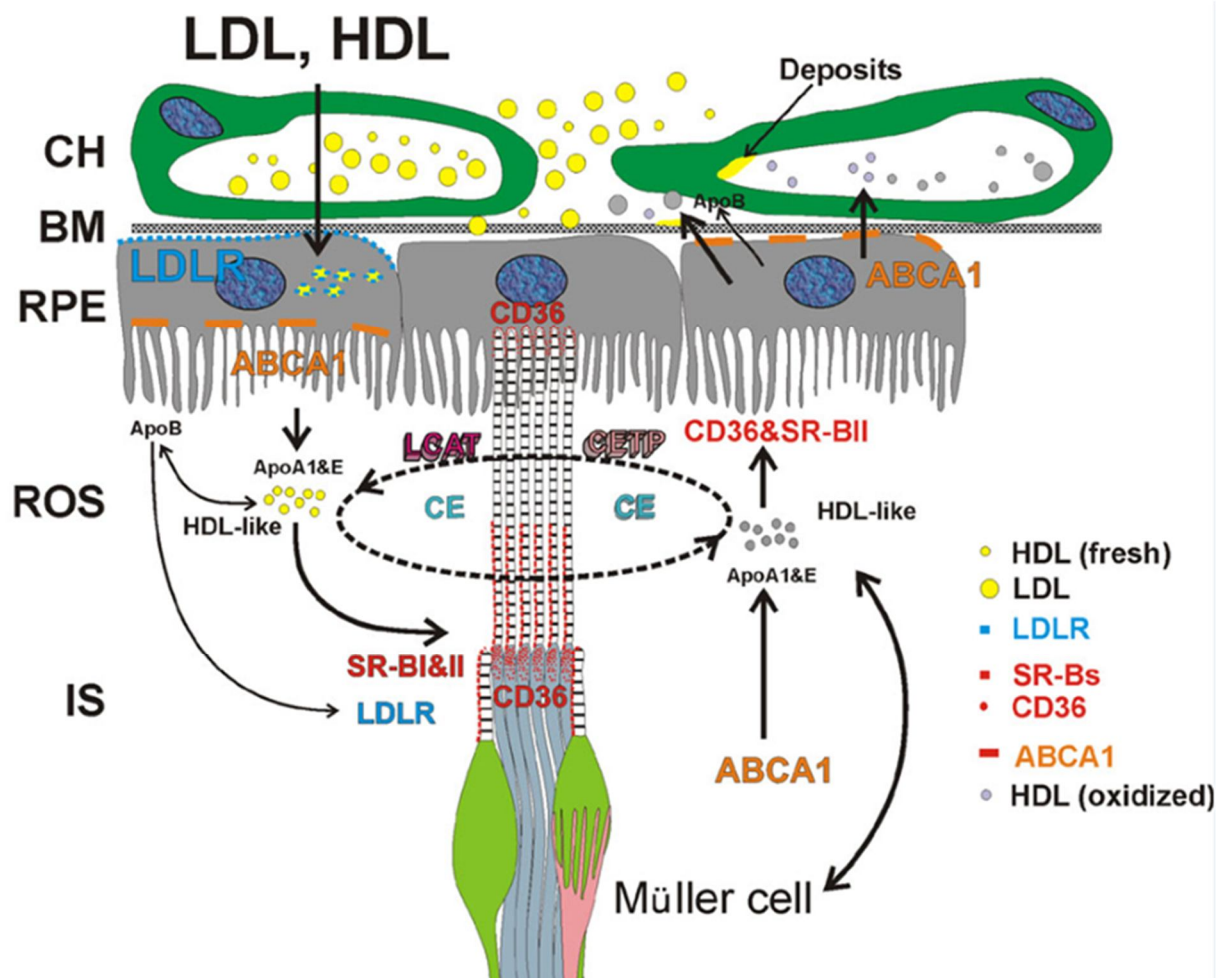


Figure 49: Schéma hypothétique de la prise en charge et du transport intra-rétinien du cholestérol et des lipides par la rétine des vertébrés. D'après [352].

Comme nous l'avons vu précédemment, le nombreuses voies d'élimination du cholestérol passant par la voie enzymatique existent dans les tissus extra-oculaires (foie, glandes surrénales, cerveau). Mais il existe peu de données sur l'élimination du cholestérol dans la rétine interne et la couche de l'EPR. L'équipe de Pikuleva a mesuré lesquels de ces métabolites pouvaient également être quantifiés dans la rétine et l'EPR, et les a comparés aux valeurs retrouvées dans le cerveau. Le 27-OH n'a pas été détecté dans la rétine, mais l'acide 5-cholesténoïque, qui est son produit d'oxydation, a été détecté en quantité, et ce avec des variabilités inter-individuelles importantes (jusqu'à un facteur trois) [353]. D'autres métabolites du 27-OH peuvent être suspectés, comme le 7α , 27-OH. Le 24S-OH et la prégnénolone (métabolite de CYP11A1) ont également été détectés dans la rétine, mais à des niveaux plus faibles que l'acide 5-cholesténoïque. Ainsi, les voies extra-oculaires d'élimination du cholestérol sont également actives dans la rétine. Si CYP27A1 et CYP11A1

semblent être exprimés dans de nombreux types cellulaires de la rétine, CYP46A1 apparaît en revanche spécifique des neurones [18]. Le mécanisme d'oxydation du 27-OH en acide 5-cholesténoïque semble être la voie prédominante d'élimination du cholestérol de la rétine [353] où, par analogie avec des données sur le thymus, il pourrait y être pro-apoptotique [354].

5. Implication des oxystérols dans les pathologies du SNC et les rétinopathies

Des études ont montré qu'il existe un lien entre les oxystérols et les désordres neurodégénératifs incluant la maladie d'Alzheimer (MA), la sclérose en plaques et les paraplégies spastiques [355] ; ainsi qu'entre les oxystérols et le syndrome de Smith-Lemli-Opitz (sSLO) [356-359]. Il existe également un lien entre les oxystérols et les rétinopathies.

i. Le 24S-OH et la maladie d'Alzheimer

Plusieurs oxystérols sont naturellement formés dans le cerveau, dont notamment le 24S-OH, le 25-OH et le 27-OH.

Le métabolisme du cholestérol et de ses dérivés pourrait être impliqué dans la maladie d'Alzheimer (MA). La quantité de 24S-OH mesurée dans la circulation de patients atteints de différentes maladies neurodégénératives, notamment la maladie d'Alzheimer (MA) est significativement augmentée par rapport à des individus sains [360-362]. La concentration en 24S-OH est également augmentée le LCR des malades atteints de MA [25, 363, 364].

La concentration plasmatique en 24S-OH serait donc proportionnelle à la masse de neurones métaboliquement actifs. Le taux de 24S-OH plasmatique est un indicateur de diagnostic de certaines pathologies neuro-dégénératives comme la MA [364], et est donc utilisé en tant que marqueur d'atrophie cérébrale chez des patients atteints de MA [365]. Certains proposent le rapport 24S-OH /cholestérol comme marqueur de MA [366].

Le 24S-OH et dans une moindre mesure, le 27-OH, inhibent la formation de peptides d'amyloïde β en augmentant l'activité de l' α -secrétase et en diminuant celle de la β -secrétase. La CYP46A1 aurait une influence positive de deux façons : d'abord en produisant le 24S-OH, puis en diminuant le cholestérol des membranes, ce qui défavorise aussi l'action de la β -secrétase [317, 333].

L'induction de gènes-cibles comme *abca1*, transporteur membranaire impliqué dans l'efflux cellulaire de cholestérol, peut avoir des effets délétères. En effet, ABCA1 peut

également intervenir dans la sécrétion des peptides A β , constituants protéiniques des plaques séniles de la MA [367]. Ce mécanisme fait intervenir le 24S-OH qui est un ligand des LXR, donc le 24S-OH peut induire une altération de l'expression d'ABCA1 [322].

De plus, les souris double knock-out pour LXR (le 24S-OH est un ligand de LXR) montrent une variété de défauts du SNC incluant l'accumulation de lipides, la prolifération astrocytaire et la désorganisation des gaines de myéline. Un dysfonctionnement des récepteurs LXR est impliqué dans les maladies neurodégénératives telles que la MA [368].

ii. Oxystérols et rétinopathies

Concernant le lien entre oxystérols et rétinopathies, peu de données existent dans la littérature. Dans une étude *in vitro*, Joffre et al. ont montré, chez le porc, que les oxystérols, notamment le 24S-OH, le 25-OH et le 7-cétocholestérol (7-KC) sont de puissants inducteurs de l'oxydation et de l'inflammation des cellules de l'EPR [21].

Des données récentes associent la pathogénèse de la DMLA à l'accumulation de 7-KC dans la rétine. Le 7-KC est un oxystérol pro-inflammatoire présent en grande quantité dans les dépôts d'Ox-LDL associés à la plaque d'athérome. Le 7-KC est produit *in situ* dans ces dépôts lipoprotéiques où il s'accumule. Or, dans la paroi des vaisseaux, les Ox-LDL activent la réponse immune innée et adaptative, et peuvent créer, avec le 7-KC un environnement cellulaire toxique. Dans la rétine normale, le 7-KC a été retrouvé associé à des dépôts de lipoprotéines dans le choriocapillaire, la BrM et l'EPR. Chez le rat ayant subi un stress lumineux, le 7-KC est retrouvé dans la rétine interne, au niveau de zones riches en mitochondries, dans les CGR, dans le segment interne des photorécepteurs et des synapses et dans l'EPR. Le 7-KC est formé par un mécanisme impliquant les radicaux libres, catalysé par le fer. De plus, le 7-KC pourrait activer plusieurs voies de signalisation impliquant les kinases et associé au NF- κ B, indépendamment de la formation d'ERO. Ces voies induisent la sécrétion de molécules pro-inflammatoires telles que le VEGF, l'IL-6 et l'IL-8. Le 7-KC induit également la synthèse de métalloprotéinases [369]. Ainsi, le 7-KC, formé de façon permanente dans la rétine tout en ayant des propriétés neurotoxiques pourrait être un facteur de risque de pathologies liées à l'âge telles que la DMLA et la MA [370-373].

Objectifs de la thèse

L'objectif principal des travaux rapportés dans cette thèse est d'élucider en quoi la synthèse de 24S-hydroxycholestérol dans la rétine neurale et l'activité de CYP46A1 participent à l'homéostasie du cholestérol en conditions physiologiques et pathologiques. En effet, le rôle de CYP46A1 dans la rétine et les mécanismes par lesquels le 24S-hydroxycholestérol et CYP46A1 moduleraient l'homéostasie du cholestérol en conditions physiologiques et en conditions pathologiques associées au développement du glaucome et de la DMLA restent pour l'instant énigmatiques.

Pour répondre à cette question, nous avons eu, d'une part, une approche clinique basée sur l'évaluation de patients atteints de glaucome ou de DMLA et, d'autre part, une approche expérimentale réalisée chez le rat.

La cholestérol-24S-hydroxylase (CYP46A1) est exprimée dans les cellules ganglionnaires de la rétine qui sont les cellules dont la mort est responsable de la perte du champ visuel, notamment au cours du glaucome. CYP46A1 serait par conséquent suspectée participer à l'homéostasie du cholestérol dans les cellules ganglionnaires. Nous avons donc recherché si un polymorphisme de CYP46A1 (SNP rs754203) pouvait être un facteur de risque du glaucome ([article 1 publié](#)).

Afin de renforcer notre hypothèse, nous nous sommes questionnés sur la possibilité qu'à l'inverse ce même polymorphisme de CYP46A1 puisse ne pas être associé au risque de développer une pathologie dans laquelle la neurodégénérescence des cellules ganglionnaires n'est pas retrouvée. Ceci a justifié l'étude rapportée dans l'[article 2 \(publié\)](#) sur la DMLA.

Nous nous sommes alors interrogés sur les conséquences de la dégénérescence des cellules ganglionnaires de la rétine sur l'homéostasie du cholestérol sur CYP46A1 et son produit métabolique, le 24S-hydroxycholestérol. Ainsi, pour étudier les conséquences de la neurodégénérescence des cellules ganglionnaires sur l'expression de CYP46A1, nous avons choisi un modèle animal qui s'apparente au glaucome en provoquant une hypertonie oculaire, qui a pour conséquence la perte des cellules ganglionnaires rétinienne ([article 3 publié](#)).

En catalysant l'addition d'un groupement hydroxyle en position 24 du cholestérol, CYP46A1 participe à l'élimination du cholestérol du système nerveux central, incluant la rétine. CYP46A1 participerait ainsi à limiter l'accumulation de cholestérol dans les neurones qui est reconnu comme délétère. Inhiber CYP46A1 pourrait donc s'avérer néfaste et ce particulièrement en condition de stress rétinien, comme au cours du glaucome. Nous avons

donc testé, chez le rat, l'effet sur la rétine du voriconazole, qui se révèle être un inhibiteur de l'activité de CYP46A1, au moins dans le cerveau. Le rôle inhibiteur du voriconazole sur le métabolisme du cholestérol et son effet sur la fonction de la rétine sur l'expression de la glie et de CYP46A1 ont été recherchés (article 4 soumis).

Ainsi, dans le contexte de cette thèse, 2 axes de recherche ont été suivis :

- 1- Quel est le rôle de CYP46A1 dans l'homéostasie du cholestérol dans la rétine, en conditions pathologiques ? Le 24S-hydroxycholestérol peut-il être utilisé comme biomarqueur de la neurodégénérescence de la rétine ? Comment la neurodégénérescence modifie-t-elle l'homéostasie du cholestérol dans la rétine, en nous focalisant sur le rôle de CYP46A1 ?
- 2- Le 24S-hydroxycholestérol participe-t-il aux interactions neurone-glie lors de la neurodégénérescence de la rétine ? Le 24S-hydroxycholestérol a été envisagé comme molécule signal dans la rétine, participant à la communication entre neurones. En effet, une des hypothèses de la thèse a été de vérifier que les cellules gliales suppléent la perte des neurones consécutive à la pathologie dans le cadre du glaucome, et permettent ainsi de maintenir l'équilibre entre synthèse et élimination de 24S-hydroxycholestérol dans la rétine.

Résultats

A. Association entre polymorphisme génétique dans CYP46A1 et glaucome

Fourgeux, C., et al., *Primary open-angle glaucoma: association with cholesterol 24S-hydroxylase (CYP46A1) gene polymorphism and plasma 24-hydroxycholesterol levels*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2009. **50**(12): p. 5712-7.

N.B. : Les figures mentionnées dans le texte font référence à celles qui sont parues dans cet article.

La génétique a apporté une contribution significative dans l'étude du glaucome ces dernières décennies. La cholestérol-24S-hydroxylase (CYP46A1) est une enzyme spécifiquement exprimée dans les cellules ganglionnaires de la rétine (CGR) qui métabolise le cholestérol en un composé plus hydrophile, le 24S-hydroxycholestérol (24S-OH). Or, le 24S-OH et CYP46A1 sont impliqués dans les mécanismes conduisant à la neurodégénérescence. Un certain type de polymorphisme allélique (SNP) dans l'intron 2 du gène CYP46A1, désigné rs754203, est associé à la maladie d'Alzheimer. Ce SNP a été suggéré comme facteur de risque du glaucome primaire à angle ouvert (GPAO). Les taux plasmatiques de 24S-OH ont également été évalués dans le but d'envisager le 24S-OH comme biomarqueur du glaucome. L'objectif de ce travail, publié en 2009, a consisté à évaluer la fréquence de ce SNP rs754203 dans CYP46A1 dans une population de patients présentant un GPAO par rapport à une population de sujets témoins, puis de calculer le risque associé de GPAO. En effet, cette association, si elle était confirmée, permettrait la classification de ce facteur génétique parmi les facteurs de risque du GPAO et d'évaluer le rôle de CYP46A1 dans la rétine.

Méthode

Pour cela, par une approche clinique, nous avons recherché la fréquence des allèles CYP46*C (= CC ou CT) et CYP46*T (= TT) chez des patients suivis au service d'ophtalmologie du CHU de Dijon (projet soutenu par un Programme Hospitalier de Recherche Clinique, Direction de la Recherche Clinique, CHU Dijon). Pour le groupe pathologique, 150 patients GPAO ont été analysés et comparés au groupe témoin constitué de 118 sujets. Chez les 150 patients glaucomateux, le stade d'avancement du glaucome a été déterminé par la classification de Hoddap (Clinical Decisions in glaucomas, Saint-Louis, MO : Mosby Year Book ; 1993:53). Cette classification a montré qu'il y avait, sur les 150 patients, 31 patients avec un glaucome précoce, 49 avec un glaucome modéré et 70 avec un glaucome avancé. De plus, 18 patients avaient un glaucome à pression normale (GPN), 4

patients avaient un glaucome exfoliatif. Les sujets témoins ont été sélectionnés parmi des patients du CHU volontaires pour participer à l'étude. Ceux-ci étaient suivis après une opération de la cataracte ou après chirurgie de la paupière. Les cellules nucléées circulantes ont été prélevées pour déterminer le génotype de CYP46A1 de ces patients et sujets témoins par amplification de l'ADN par PCR suivie d'une analyse du polymorphisme à l'aide d'une endonucléase de restriction (*MspI*). L'allèle CYP46*T correspond au fragment de 285pb non digéré, tandis que l'allèle CYP46*C est caractérisé par deux fragments de 209pb et 76pb. Les niveaux plasmatiques de 24S-OH ont été quantifiés par spectrométrie de masse couplée à la chromatographie gazeuse à l'aide d'un standard interne de 24S-OH deutéré. Les patients GPAO et témoins ont été comparés en fonction de l'âge, du sexe, de la fréquence des allèles et du génotype.

Pour établir une comparaison statistique, nous avons utilisé le test *t* de Student et celui de χ^2 . Les Odds ratios (OR) et les intervalles de confiance à 95% (IC 95%) ont été calculés par régression logistique pour confirmer l'association relative de la pathologie avec l'âge, le sexe et le génotype. Le pourcentage de la population portant l'allèle à risque (TT) a été calculé avec la formule $f(R-1)/R$ où *f* est la fraction des cas portant l'allèle TT et R est la mesure de l'OR. Le logiciel SAS a été utilisé pour les analyses statistiques en conférant une valeur de *p* inférieure à 0,05 (*p* < 0,05) pour attester la significativité des résultats obtenus lors des tests.

Résultats

Nos travaux ont montré une fréquence plus élevée du génotype TT dans le polymorphisme rs754203 du gène CYP46A1 chez les patients présentant GPAO par rapport aux patients témoins (61,3% et 48,3% respectivement, **tableau 1**). Ce polymorphisme dans l'intron 2 du gène CYP46A1 est associé à un risque plus élevé d'apparition du GPAO (tous stades confondus), calculé à 1,26 (intervalle de confiance à 95% = 1,006-1,574 ; *p* < 0,05). La fréquence du génotype TT était même plus élevée chez les patients avec un GPN (**tableau 1**).

Dans cette étude, nous avons recherché si le 24S-OH pouvait être un biomarqueur du glaucome. Les résultats montrent qu'il n'y a pas de différence entre les niveaux plasmatiques du 24S-OH des sujets témoins et ceux des patients GPAO. De même, il n'y a pas de différence entre les ratios 24S-OH/cholestérol calculés chez les patients et les témoins. De façon similaire, les niveaux de 24S-OH plasmatique, et les ratios 24S-OH/cholestérol n'étaient pas différents entre les porteurs TT, CT, CC lorsqu'on a considéré les patients et les

témoins indépendamment ou ensemble. Par contre, nous avons observé que les sujets porteurs du génotype TT présentent des teneurs plasmatiques en 24S-OH plus élevées que les porteurs du génotype CC ou CT (**tableau 2**).

Discussion

Les glaucomes représentent un groupe de pathologies qui sont génétiquement hétérogènes. Différents gènes du glaucome ont été identifiés, mais ces gènes ne sont impliqués que dans une petite partie des glaucomes [374]. Des mutations de la myociline ont été associées au GPAO, et associées à 10% de cas juvéniles de GPAO et à 4% de cas adultes [103, 375]. Cependant des données contradictoires ont été obtenues pour d'autres gènes tels que l'ApoE [376, 377]. Un grand nombre de glaucomes sont multifactoriels et sont probablement affectés par des interactions multiples de *loci*. Plusieurs facteurs de susceptibilité génétique contribuent au glaucome. Ces facteurs entrent dans deux groupes : ceux qui affectent la PIO, et ceux qui modulent la viabilité des CGR. Des données récentes ont suggéré que le métabolisme du cholestérol était impliqué dans la pathogénèse du glaucome [378]. CYP46A1 est impliqué dans l'élimination du cholestérol des structures neuronales [330]. Parmi les nombreux SNPs du gène CYP46A1, il a été montré que le génotype TT dans l'intron 2 de CYP46A1, désigné rs754203, était un facteur de risque de MA [379, 380]. De nombreuses observations ont suggéré un lien entre la MA et le glaucome [381], avec de possibles similarités pathogéniques. La surexpression de peptides A β figure parmi les caractéristiques communes de ces deux pathologies. En effet, les peptides A β ont été retrouvés dans l'humeur aqueuse des patients glaucomateux [382], ce qui suggère un lien avec la dégénérescence rétinienne [383]. De plus, Brown *et al.* [333] ont montré que le 24S-OH inhibe la formation de peptides A β et la sécrétion du précurseur amyloïde des peptides A β (APP) via l'activation de LXR. L'augmentation du 24S-OH circulant pourrait donc diminuer la dégénérescence neuronale.

Bretillon *et al.* [226] ont montré, chez l'homme, que les niveaux plasmatiques de 24S-OH reflètent la balance entre sa production cérébrale et son métabolisme hépatique. Ainsi, le rapport entre le poids du cerveau et le volume du foie est un bon marqueur des variations du 24S-OH au cours de la vie. Nous avons réalisé ce type d'analyse chez nos patients GPAO et témoins. Les variations des teneurs en 24S-OH en fonction de l'âge suivent les variations du rapport de la taille du foie et du poids du cerveau calculé chez nos témoins et patients GPAO en fonction de l'âge (**figure 2**). Compte tenu de la taille des rétines bien plus faible que celle du cerveau, les quantités de 24S-OH relarguées par la dégénérescence des cellules

ganglionnaires au cours du glaucome sont insignifiantes par rapport aux flux de 24S-OH provenant du cerveau. Ceci peut expliquer pourquoi le 24S-OH ne peut pas être un biomarqueur du glaucome et probablement des autres rétinopathies.

En conclusion, dans notre population de patients et témoins, le génotype TT sur le SNP rs754203 du gène CYP46A1 a été identifié comme un facteur de risque du GPAO et le 24S-OH n'est pas un biomarqueur du glaucome. Le glaucome est considéré comme une neuropathie optique avec des mécanismes neurodégénératifs. Parmi les différents sous-types de glaucomes, le GPN semble avoir les caractéristiques les plus proches de la maladie d'Alzheimer (MA). Des données supplémentaires sont nécessaires pour confirmer la fréquence du génotype TT. Puisqu'il n'a pas été retrouvé de corrélation entre les niveaux de 24S-OH et le SNP rs754203 de CYP46A1 que nous avons étudié, il est difficile d'obtenir une explication mécanistique du lien qui unit le glaucome au polymorphisme de CYP46A1. Cependant, ce polymorphisme peut être classé parmi les facteurs de risque du glaucome.

Primary Open-Angle Glaucoma: Association with Cholesterol 24S-Hydroxylase (CYP46A1) Gene Polymorphism and Plasma 24-Hydroxycholesterol Levels

Cynthia Fourgeux,¹ Lucy Martine,¹ Ingemar Björkhem,² Ulf Diczfalussy,² Corinne Joffre,¹ Niyazi Acar,¹ Catherine Creuzot-Garcher,^{3,4} Alain Bron,^{3,4} and Lionel Bretillon¹

PURPOSE. Genetics has made significant contributions to the study of glaucoma over the past few decades. Cholesterol-24S-hydroxylase (CYP46A1) is a cholesterol-metabolizing enzyme that is especially expressed in retinal ganglion cells. CYP46A1 and its metabolic product, 24S-hydroxycholesterol, have been linked to neurodegeneration. A single-nucleotide polymorphism (SNP) in the *CYP46A1* gene, designated as rs754203 and associated with Alzheimer disease, was evaluated as a genetic risk factor for primary open-angle glaucoma (POAG), as well as plasma 24S-hydroxycholesterol levels.

METHODS. The frequency of the *CYP46**C and *CYP46**T alleles was analyzed in 150 patients with POAG and 118 control subjects. Plasma 24S-hydroxycholesterol levels were quantified. Sex, age, alleles, and genotype frequencies between patients with POAG and control subjects were compared by using the χ^2 and Student's *t*-tests. Odds ratios (ORs) and 95% confidence intervals (CIs) were calculated by logistic regression to assess the relative association between disease and age, sex, and genotypes.

RESULTS. The frequency of the TT genotype was significantly higher in patients with POAG than in control subjects (61.3% versus 48.3%, respectively, OR = 1.26; 95% CI = 1.006–1.574, *P* < 0.05). Plasma 24S-hydroxycholesterol levels did not differ between control subjects and patients with POAG. The ratio of estimated brain weight to liver volume as an estimate of the capacity of the human body to synthesize and metabolize 24S-hydroxycholesterol was found to correlate to plasma 24S-hydroxycholesterol in control subjects and patients with POAG.

CONCLUSIONS. The rs754203 SNP in *CYP46A1* was associated with a risk for POAG. This polymorphism was not associated with changes in plasma 24S-hydroxycholesterol, highlighting

that despite its retinal origin, 24S-hydroxycholesterol cannot be used as a biomarker for POAG. (*Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2009;50:5712–5717) DOI:10.1167/iops.09-3655

Glaucoma is the second leading cause of blindness worldwide, affecting more than 50 million people.¹ Glaucoma is a progressive optic neuropathy characterized by optic nerve head changes and visual field loss.² Improving case identification and providing a better understanding of the causes of glaucoma has brought about great progress in defining risk factors such as high intraocular pressure, age, familial history, ethnicity, and myopia, which have been associated frequently with primary open-angle glaucoma (POAG).³ Genetics has substantially contributed to the study of glaucoma over the past few decades. Myocilin has been identified and validated as the first gene linked to more than 10% of juvenile-onset POAG cases and 4% of adult-onset POAG cases.^{4,5} Other genes such as optineurin, WDR36, and CYP11B1 have been found more frequently in certain clinical presentations of glaucoma. Nevertheless, the link between the genes and the development of the disease is not always clearly demonstrated.⁶ Other associations such as diabetes or systemic hypertension are still being debated. The links between dyslipidemia and particularly cholesterol abnormalities have already been described.⁷ Recent studies have reported the efficacy of statins and nonstatin cholesterol-lowering drugs in the treatment of POAG.^{8–10} Although the mechanism underlying this association remains unclear, these data suggest that reducing cholesterol biosynthesis may be a target for POAG treatment. Increasing cholesterol efflux and/or enhancing cholesterol catabolism may also be critical.

We¹¹ and others¹² recently reported that cholesterol 24S-hydroxylase (CYP46A1) is exclusively expressed in the neuronal part of the retina, most particularly in retinal ganglion cells. This finding consistently supports the possible role played by CYP46A1 in cholesterol homeostasis in ocular structures. Cholesterol-24S-hydroxylase was initially identified as a cholesterol-metabolizing enzyme in the brain. Therein, it catalyzes the formation of 24S-hydroxycholesterol, a polar metabolite of cholesterol that can cross the blood–brain barrier.^{13–17} In addition to their role in disease-free conditions, cholesterol-24S-hydroxylase (CYP46A1) and 24S-hydroxycholesterol have been linked to neurologic disorders of the central nervous system^{18–20} and potentially to neuronal death.¹⁹ Single-nucleotide polymorphisms (SNPs) have been identified in the *CYP46A1* gene. In some^{21–32} but not all^{28,33–39} studies, this type of polymorphism has been associated with increased risk for late-onset Alzheimer disease. Surprisingly, whether this intronic polymorphism affects the P450 mRNA and protein levels has not yet been studied. Therefore, today the mechanistic relation between the polymorphism and the apparent effect on the risk of Alzheimer disease remains unknown.

The purpose of this study was to explore the association of rs754203 SNP in intron 2 of the *CYP46A1* gene with the risk of POAG in a population from a single center in France and to

From the ¹Eye and Nutrition Research Group, UMR1129 FLAVIC (Flavours, vision et comportement du consommateur; Flavor, Vision, and Consumer Behavior), INRA (French National Institute for Agricultural Research), Dijon, France; the ²Department of Laboratory Medicine, Division of Clinical Chemistry, Karolinska University Hospital Huddinge, Stockholm, Sweden; the ³Department of Ophthalmology, University Hospital, Dijon, France; and the ⁴Eye and Nutrition Research Group, UMR1129 FLAVIC, University de Bourgundy, Dijon, France.

Supported by a grant from the University Hospital in Dijon, France (Programme Hospitalier de Recherche Clinique, Direction de la Recherche Clinique).

Submitted for publication March 3, 2009; revised May 14, 2009; accepted August 19, 2009.

Disclosure: C. Fourgeux, None; L. Martine, None; I. Björkhem, None; U. Diczfalussy, None; C. Joffre, None; N. Acar, None; C. Creuzot-Garcher, None; A. Bron, None; L. Bretillon, None.

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. This article must therefore be marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. §1734 solely to indicate this fact.

Corresponding author: Lionel Bretillon, INRA, UMR1129 FLAVIC, Equipe Oeil et Nutrition, 17 rue Sully, BP86510, F-21065 Dijon, France; lionel.bretillon@dijon.inra.fr.

evaluate plasma levels of the cholesterol metabolite formed by CYP46A1 activity, 24S-hydroxycholesterol.

METHODS

Subjects

The protocol adhered to the tenets of the Declaration of Helsinki. This cross-sectional study was approved by the Ethics Committee of Burgundy (France). Informed consent was obtained from all subjects before participation.

Blood samples were collected from 150 patients with glaucoma and 118 control subjects after an overnight fast at the Department of Ophthalmology, Dijon University Hospital, Dijon, France. None of the subjects was related to any other. All patients included in the study were examined by a glaucoma specialist and underwent a thorough ocular examination. The patients had been observed in our clinic for several years. They did not have a history of neurologic disease or dyslipidemia. Those with angle-closure glaucomas and secondary glaucomas were excluded. POAG was defined by an open angle on gonioscopy, characteristic glaucomatous optic nerve head abnormalities, and corresponding reliable visual field defects recorded with SITA standard white-on-white perimetry (Humphrey Field Analyzer HFA-II; Carl Zeiss Meditec, Paris, France). Among the 150 patients, 18 had normal-tension glaucoma and four had exfoliative glaucoma. The glaucoma stages were defined according to the classification of Hodapp et al.⁴⁰ The control subjects were age matched and recruited among patients operated on for cataract or lid surgery and willing to participate in the study. They had an IOP below 21 mm Hg, no evidence of glaucoma on optic disc examination, and a normal frequency-doubling technique screening test result. The brain weight and liver volume were calculated using size and weight data and established formulas from the literature.^{41–43}

CYP46A1 Genotyping

Buffy coats were placed on DNA-preserving paper (FTA; Whatman, Kent, UK) and stored at room temperature in the dark according to the manufacturer's instructions. A 1.25-mm sample disc was taken for each PCR reaction. A 285-bp PCR product was amplified by using specific primers for rs754203 SNP (forward primer: 5'-TGAAAACGAGTTTC-CCGTCC-3'; reverse primer: 5'-GTGTGACACAGGTAACAGTCA-3') in a 12.5- μ L volume reaction with 1.25 U of DNA polymerase, 1.5 mM of MgCl₂, 1.25 μ L of 10 $\times$ NH₄ buffer, 200 μ M dNTPs (BioTaq; Bionline GmbH, Luckenwalde, Germany).

After initial denaturation at 95°C for 8 minutes, the reaction mixture was subjected to 50 cycles of 1-minute denaturation at 95°C, 1-minute annealing at 53°C, and a 2-minute extension at 72°C, followed by a final extension at 72°C for 5 minutes. The PCR products were digested by *MspI* (Promega, Charbonnières, France). The fragment amplification and digestion results were revealed by 1.8% agarose gel electrophoresis and ethidium bromide staining. The CYP46A1**T* allele corresponded to the uncut 285-bp fragment, whereas the CYP46A1**C* allele was characterized by two fragments of 209 and 76 bp.

Quantification of Plasma 24S-hydroxycholesterol Levels

Plasma 24S-hydroxycholesterol levels were assayed by isotope dilution mass spectrometry using racemic [23,23,24-²H₃]-24-hydroxycholesterol, as previously described.^{14,17,18,44} Briefly, deuterated 24-hydroxycholesterol (200 ng, [23,23,24-²H₃]-24-hydroxycholesterol) was added to 0.5 mL of plasma. After alkaline hydrolysis with 1 N KOH in 90% ethanol for 2 hours, the solution was neutralized with 65 μ L of phosphoric acid, and the sterols were extracted with 9 mL of chloroform in the presence of 3 mL of 0.9% sodium chloride. The organic phase was removed, and the solvent was evaporated to dryness. The sterols were dissolved in 1 mL of toluene. A 100 μ L aliquot was

removed for quantification of the cholesterol concentration. For this purpose, 30 μ g of 5 α -cholestane was added, the solvents were evaporated to dryness, and the sterols were derivatized to trimethylsilyl ethers by heating at 60°C after the addition of 200 μ L of pyridine and 200 μ L of BSTFA (Supelco, Bellefonte, PA). The solvents were evaporated under nitrogen gas, and the samples were resuspended in hexane and analyzed on a gas chromatography-electron ionization mass spectrometer (HP6890 series II; Agilent, Palo Alto, CA) plus a chromatograph combined with a mass selective detector (HP; Agilent) operated in selected ion monitoring mode. A 1- μ L aliquot was injected by automated injection in a splitless mode at an injection temperature of 300°C on a fused silica capillary column (30 m $\times$ 0.25 mm ID; 0.25 μ m film thickness; DB-5MS; J&W Scientific, Agilent Technologies, Massy, France). The initial oven temperature was kept at 50°C for 1 minute; then it was increased at a rate of 20°C $\cdot$ min⁻¹ to 250°C and thereafter at 5°C $\cdot$ min⁻¹ to a final temperature of 300°C. The temperature of the transfer line was kept at 300°C. Electron impact ionization was used at 70 eV ionization energy. Trimethylsilyl-cholesterol and 5 α -cholestane were measured at *m/z* 368 and 372 atomic mass units (amu), respectively. Absolute amounts of cholesterol were determined by interpolation from a standard curve generated in each experiment.

The remainder of the saponified sterols was purified on silica columns (Supelco) for quantification of 24S-hydroxycholesterol. Cholesterol was eluted with 8 mL of 0.5% isopropanol in hexane. Purified oxysterols were subsequently eluted with 5 mL of 30% isopropanol in hexane and derivatized to trimethylsilyl ether as just described. The samples were analyzed by gas chromatography-mass spectrometry as described. Both 24S-hydroxycholesterol and deuterated 24-hydroxycholesterol were measured at *m/z* 413 and 416 amu, respectively. Absolute amounts of 24S-hydroxycholesterol were determined by interpolation from a standard curve generated in each experiment. A typical mass spectrometry-gas chromatogram obtained from a plasma sample is displayed in Figure 1, as well as a typical standard curve in the inset in Figure 1.

Statistical Analysis

The Student's *t*-test and the χ^2 test were performed to compare sex, age, alleles, and genotype frequencies between POAG cases and controls. Odds ratios (ORs) and 95% confidence intervals (CIs) were calculated by logistic regression analysis to assess the relative association between disease and age, sex, and genotypes. The percentage of population-attributable risk of carrying the TT genotype was calculated with the formula $f(R - 1)/R$, where *f* is the fraction of cases with the TT-genotype and *R* is the measure of OR. The SAS Software (SAS Institute, Cary, NC) was used for statistical analysis. *P* < 0.05 was considered to be statistically significant.

RESULTS

The clinical characteristics of control subjects and patients with POAG are presented in Table 1. Both groups were similar except for the female-to-male ratio in moderate POAG compared with control subjects and other POAG subgroups (Table 1). The genotypic OR and 95% CI for POAG were estimated assuming a dominant genetic model (major TT homozygote versus the others). The frequency of the TT-genotype and T-allele in the CYP46A1 intron 2 rs754203 polymorphism was significantly higher in the population of patients with POAG than in the control group: 61.3% versus 48.3%, respectively, for the TT genotype (*P* < 0.05). This frequency was even greater in patients with normal-tension glaucoma since 13 of the 18 carried the TT genotype. The rs754203 SNP in intron 2 of CYP46A1 was associated with a significant risk for POAG (OR = 1.26; 95% CI = 1.006–1.574, *P* < 0.05, Table 1).

Patients with POAG had no significant differences in plasma 24S-hydroxycholesterol levels and the 24S-hydroxycholesterol-to-cholesterol ratio compared with control subjects (*P* > 0.05,

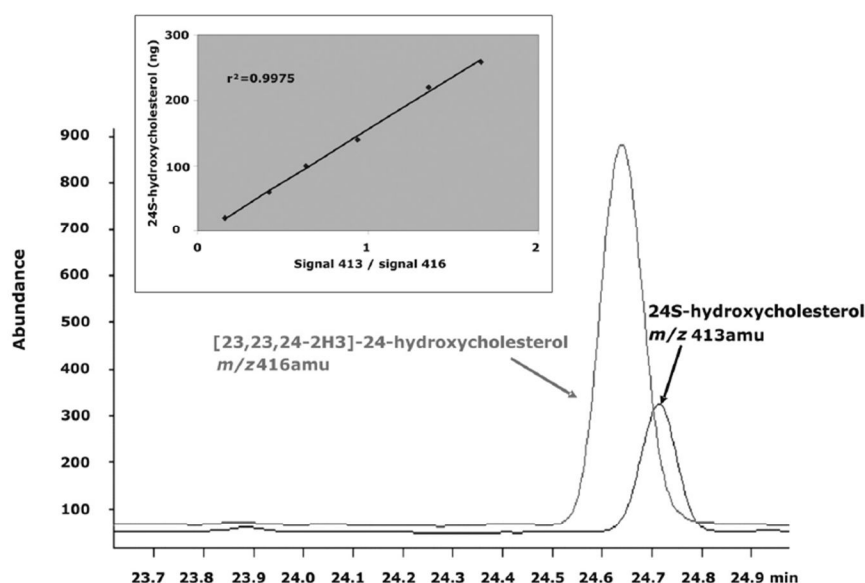


FIGURE 1. Typical trace obtained by gas chromatography-mass spectrometry for quantification of 24S-hydroxycholesterol in a human plasma sample using an internal deuterated standard of 24-hydroxycholesterol. Inset: a standard curve.

Table 1). Similarly, the plasma 24S-hydroxycholesterol levels and the 24S-hydroxycholesterol-to-cholesterol ratio were not different between CC, CT, and TT carriers when considering patients with POAG and control subjects independently ($P > 0.05$, Table 2) or together ($P > 0.05$, data not shown). Plasma absolute and cholesterol-related 24S-hydroxycholesterol levels did not correlate to visual field parameters such as MD (mean defect) or PSD (pattern standard deviation) (data not shown). The subjects' ages, corresponding to the age when blood was sampled, were used as the cofactor. Figure 2 shows the plasma cholesterol-related levels of 24S-hydroxycholesterol in control subjects (Fig. 2A) and patients with POAG (Fig. 2B) from the age of 44 years onward. The ratio between brain weight and liver volume for the different ages, based on data from the literature,^{41–43} is also indicated in the figure. The levels of 24S-hydroxycholesterol closely followed the brain weight-to-liver volume ratio during the different decades of life. The only exception was observed in patients with POAG older than 80 years who had lower plasma 24S-hydroxycholesterol levels than expected from their brain weight-to-liver volume ratio.

DISCUSSION

Glaucoma encompasses a group of diseases that appear to be genetically heterogeneous. Different glaucoma genes have been identified, but these genes account for only a small proportion of glaucomas.⁴⁵ Myocilin mutations have been linked to POAG and associated with 10% of juvenile-onset and 4% of adult-onset cases of POAG.^{4,5} Nevertheless, contradictory data have been obtained on other genes such as apolipoprotein E.^{46–56} Most glaucoma cases appear to be multifactorial and are probably affected by multiple interacting loci. Several genetic susceptibility factors have been suggested to contribute to glaucoma. These factors fit into two broad groups, those affecting intraocular pressure and those that are important in modulating retinal ganglion cell viability.⁴⁵ Recent data suggest that cholesterol and cholesterol metabolism may be involved in the pathogenesis of glaucoma.^{8,9,57} Cholesterol-24S-hydroxylase (CYP46A1) is a cholesterol-metabolizing enzyme involved in the removal of cholesterol from neuronal structures.^{13,14,17} Among various SNPs in the CYP46A1

TABLE 1. Clinical Characteristics, Plasma 24S-Hydroxycholesterol Levels and SNP in Intron 2 of the CYP46A1 Gene in the Study Subjects

	Control Subjects	Patients with POAG			
		All	Early*	Moderate*	Advanced*
<i>n</i>	118	150	31	49	70
Female-male ratio	1.3	1.1	1.1	1.6	0.9
Age, y (mean $\pm$ SEM)	70.9 $\pm$ 1.1	69.5 $\pm$ 1	66.1 $\pm$ 0.9	68.4 $\pm$ 0.9	71.5 $\pm$ 1
Plasma 24S-hydroxycholesterol					
ng $\cdot$ mL of plasma ⁻¹ (mean $\pm$ SEM)	97.4 $\pm$ 3.7	94 $\pm$ 2.6	102.8 $\pm$ 3.2	92.1 $\pm$ 2.5	91.5 $\pm$ 2.5
ng $\cdot$ mg of cholesterol ⁻¹ (mean $\pm$ SEM)	123.1 $\pm$ 5.1	126 $\pm$ 5.6	120.6 $\pm$ 4.9	124.6 $\pm$ 5.7	129 $\pm$ 5.8
rs754203 SNP in CYP46A1 gene (percentage of total samples in each category)					
CC	2.5	3.3	3.2	4.1	2.9
CT	49.2	35.3	29	42.9	32.9
TT	48.3	61.3	67.7	53.1	64.3
Allele frequency					
CYP46A1°C	0.27	0.19	0.18	0.26	0.19
CYP46A1*T	0.73	0.81	0.82	0.74	0.81

* Stages of glaucoma were defined according to the classification of Hoddap et al.⁴⁰

TABLE 2. 24S-hydroxycholesterol Levels as a Function of rs754203 SNP in Intron 2 of the *CYP46A1* Gene in Control Subjects and Patients with POAG

	Plasma 24S-hydroxycholesterol		Age (y)
	ng · mL plasma ⁻¹	ng · mg cholesterol ⁻¹	
Control subjects (n = 118)	97.4 ± 3.7	123.1 ± 5.1	70.9 ± 1.1
TT (n = 57)	104 ± 6.6	123 ± 7.5	71.2 ± 1.6
CC+CT (n = 61)	91 ± 3.5	123.2 ± 6.7	71 ± 1.4
All POAG patients	94.2 ± 2.6	124.8 ± 5.5	69.5 ± 0.9
TT (n = 92)	98.3 ± 3.4	123.7 ± 6.9	68 ± 1.2
CC+CT (n = 58)	87.9 ± 3.1	126.5 ± 9.7	68.2 ± 1.6
Classified in early glaucoma*	103.4 ± 1.3	122.8 ± 11.1	66.3 ± 0.4
TT (n = 21)	106.8 ± 9.8	126.35 ± 14.6	65.2 ± 2.3
CC+CT (n = 10)	94.9 ± 7.2	109.15 ± 15.6	67.8 ± 3.7
Moderate glaucoma*	92.1 ± 2.1	124.6 ± 10	68.3 ± 1.6
TT (n = 26)	96.8 ± 6.9	127.7 ± 14.1	70.3 ± 2.1
CC+CT (n = 23)	86.9 ± 5.1	121.2 ± 14.5	66 ± 2.3
Advanced glaucoma*	91.4 ± 4.6	128.9 ± 8.5	71.5 ± 1.2
TT (n = 45)	94.4 ± 5	122.4 ± 9.9	72.2 ± 1.8
CC+CT (n = 25)	86.5 ± 4.9	139.9 ± 15.7	70.2 ± 2.7

Results are expressed as the mean ± SEM.

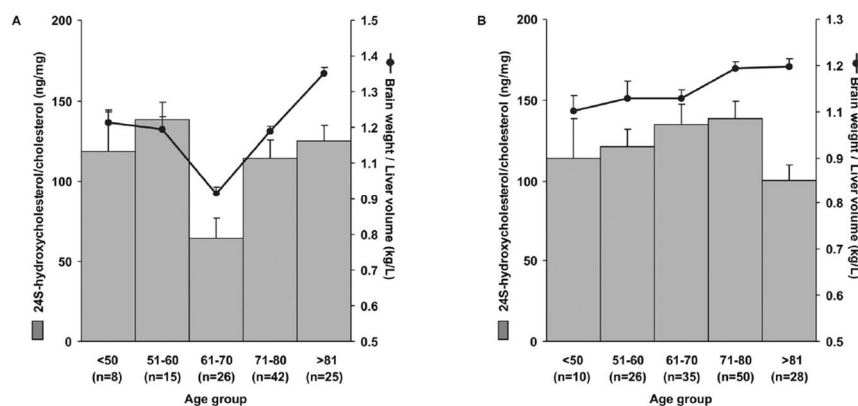
* Stages of glaucoma were defined according to the classification of Hoddap et al.⁴⁰

gene,^{21–39,58} the TT genotype in intron 2 of *CYP46A1*, designated as rs754203 SNP, has been found to be a risk factor for Alzheimer disease.^{25,26,30,32} Several observations have suggested a possible relationship between Alzheimer disease and glaucoma,^{47,59–63} with possible pathogenic similarities. Among the common features of these two diseases are overproduction of Alzheimer- $A\beta$ peptide, which has been reported in the aqueous humor of patients with glaucoma,⁶⁴ and deposition of which has been associated with retinal degeneration.⁶⁵ Brown et al.⁶⁶ reported that 24S-hydroxycholesterol inhibits $A\beta$ and amyloid precursor protein secretion in cortical neurons via LXR activation. Increased 24S-hydroxycholesterol production would therefore be expected to decrease neuron degeneration.

Most 24S-hydroxycholesterol in human circulation originates from the brain^{14,17} and is metabolized in the liver.^{14,67} Hence, the ratio of brain weight-to-liver volume has been found to be a powerful indicator of the age-related variations of plasma 24S-hydroxycholesterol levels in humans.¹⁸ In our population of patients with POAG and control subjects, we also found a correlation between plasma 24S-hydroxycholesterol and subject age (Fig. 2), suggesting that even though the neural retina also expresses *CYP46A1* and is enriched in 24S-hydroxycholesterol,¹¹ it accounts for only a minor part of the plasma 24S-hydroxycholesterol levels. Furthermore, our data showed that 24S-hydroxycholesterol was not a relevant glaucoma biomarker.

The biological importance of 24S-hydroxycholesterol in the eye has not been clearly elucidated until now. We¹¹ and others¹² have found that the neural retina exclusively expresses *CYP46A1* and is enriched in 24S-hydroxycholesterol.¹¹ Of note, Ikeda et al.⁶⁸ reported the existence of an enzyme in the nonpigmented ciliary epithelium capable of converting 24S-hydroxycholesterol into 7 α ,24S-dihydroxycholesterol. 24S-hydroxycholesterol may also bind oxysterol-binding protein, which has already been reported to be expressed in the retina,⁶⁹ and thereby participate in cellular signaling. As in the brain,^{13,14,17} production of 24S-hydroxycholesterol may be considered a metabolic pathway for neurons to eliminate cholesterol. Indeed, by triggering the addition of a hydroxyl group, *CYP46A1* renders the cholesterol molecule more hydrophilic and facilitates its flux through biological membranes. Based on data from animal models and human observations, other mechanisms involving lipoproteins are also crucial for cholesterol metabolism in the retina.^{70–74}

In view of the present controversy with respect to the possible link between the intronic polymorphism in the *CYP46A1* gene and Alzheimer disease,^{21–31,33–39} it is important that the results of the present study be confirmed in other populations of patients with glaucoma. Indeed, glaucoma can be considered an optic nerve neuropathy characterized by neurodegenerative processes.² But among the various subtypes of glaucoma, normal-tension glaucoma may share the closest

FIGURE 2. Plasma cholesterol-related 24S-hydroxycholesterol levels in normal subjects (A) and patients with POAG (B) as a function of age. Results are expressed as the mean ± SEM. Estimated ratio between brain weight and liver volume is indicated.

features with Alzheimer disease. Therefore, further investigations of CYP46 polymorphisms in those patients are warranted to verify the higher frequency of the TT genotype. Since we did not find a correlation between the levels of 24S-hydroxycholesterol in the circulation and the polymorphism, we do not have a mechanistic explanation for the apparent link between glaucoma and the polymorphism. If the present results can be confirmed, however, the polymorphism can be added as an additional risk factor for the disease.

Acknowledgments

The authors thank Linda Northrup (PhD, ELS; English Solutions, Viron, France) for skillful assistance in English language editing.

References

- Quigley HA, Broman AT. The number of people with glaucoma worldwide in 2010 and 2020. *Br J Ophthalmol*. 2006;90:262–267.
- Weinreb RN, Khaw PT. Primary open-angle glaucoma. *Lancet*. 2004;363:1711–1720.
- Quigley HA. Glaucoma: macrocosm to microcosm: The Friedenwald Lecture. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2005;46:2663–2670.
- Kwon YH, Fingert JH, Kuehn MH, Alward WL. Primary open-angle glaucoma. *New Engl J Med*. 2009;360:1113–1124.
- Resch ZT, Fautsch MP. Glaucoma-associated myocilin: a better understanding but much more to learn. *Exp Eye Res*. 2009;88:704–712.
- Wiggs JL. Genetic etiologies of glaucoma. *Arch Ophthalmol*. 2007;125:30–37.
- Stewart WC, Sine C, Sutherland S, Stewart JA. Total cholesterol and high-density lipoprotein levels as risk factors for increased intraocular pressure. *Am J Ophthalmol*. 1996;122:575–577.
- McGwin G Jr, McNeal S, Owsley C, Girkin C, Epstein D, Lee PP. Statins and other cholesterol-lowering medications and the presence of glaucoma. *Arch Ophthalmol*. 2004;122:822–826.
- Song J, Deng PF, Stinnett SS, Epstein DL, Rao PV. Effects of cholesterol-lowering statins on the aqueous humor outflow pathway. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2005;46:2424–2432.
- De Castro DK, Punjabi OS, Bostrom AG, et al. Effect of statin drugs and aspirin on progression in open-angle glaucoma suspects using confocal scanning laser ophthalmoscopy. *Clin Exp Ophthalmol*. 2007;35:506–513.
- Bretillon L, Diczfalussy U, Björkhem I, et al. Cholesterol-24S-hydroxylase (CYP46A1) is specifically expressed in neurons of the neural retina. *Curr Eye Res*. 2007;32:361–366.
- Ramirez DM, Andersson S, Russell DW. Neuronal expression and subcellular localization of cholesterol 24-hydroxylase in the mouse brain. *J Comp Neurol*. 2008;507:1676–1693.
- Björkhem I, Lütjohann D, Breuer O, Sakinis A, Wennmalm A. Importance of a novel oxidative mechanism for elimination of brain cholesterol. Turnover of cholesterol and 24(S)-hydroxycholesterol in rat brain as measured with $^{18}\text{O}_2$ techniques in vivo and in vitro. *J Biol Chem*. 1997;272:30178–30184.
- Björkhem I, Lütjohann D, Diczfalussy U, Stahle L, Ahlberg G, Wahren J. 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*. 1998;39:1594–1600.
- Lund EG, Guileyardo JM, Russell DW. cDNA cloning of cholesterol 24-hydroxylase, a mediator of cholesterol homeostasis in the brain. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999;96:7238–7243.
- Lund EG, Xie C, Kotti T, Turley SD, Dietschy JM, Russell DW. Knockout of the cholesterol 24-hydroxylase gene in mice reveals a brain-specific mechanism of cholesterol turnover. *J Biol Chem*. 2003;278:22980–22988.
- Lütjohann D, Breuer O, Ahlberg G, et al. Cholesterol homeostasis in human brain: evidence for an age-dependent flux of 24S-hydroxycholesterol from the brain into the circulation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996;93:9799–9804.
- Bretillon L, Lütjohann D, Stahle L, et al. Plasma levels of 24S-hydroxycholesterol reflect the balance between cerebral production and hepatic metabolism and are inversely related to body surface. *J Lipid Res*. 2000;41:840–845.
- Kolsch H, Lütjohann D, Tulke A, Björkhem I, Rao ML. The neurotoxic effect of 24-hydroxycholesterol on SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *Brain Res*. 1999;818:171–175.
- Lütjohann D, Papassotiropoulos A, Björkhem I, et al. Plasma 24S-hydroxycholesterol (cerebrosterol) is increased in Alzheimer and vascular demented patients. *J Lipid Res*. 2000;41:195–198.
- Borroni B, Archetti S, Agosti C, et al. Intronic CYP46 polymorphism along with ApoE genotype in sporadic Alzheimer Disease: from risk factors to disease modulators. *Neurobiol Aging*. 2004;25:747–751.
- Combarros O, Infante J, Llorca J, Berciano J. Genetic association of CYP46 and risk for Alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 2004;18:257–260.
- Johansson A, Katzov H, Zetterberg H, et al. Variants of CYP46A1 may interact with age and APOE to influence CSF Aβ42 levels in Alzheimer's disease. *Hum Genet*. 2004;114:581–587.
- Kolsch H, Lütjohann D, Ludwig M, et al. Polymorphism in the cholesterol 24S-hydroxylase gene is associated with Alzheimer's disease. *Mol Psychiatry*. 2002;7:899–902.
- Papassotiropoulos A, Streffer JR, Tsolaki M, et al. Increased brain beta-amyloid load, phosphorylated tau, and risk of Alzheimer disease associated with an intronic CYP46 polymorphism. *Arch Neurol*. 2003;60:29–35.
- Wang B, Zhang C, Zheng W, et al. Association between a T/C polymorphism in intron 2 of cholesterol 24S-hydroxylase gene and Alzheimer's disease in Chinese. *Neurosci Lett*. 2004;369:104–107.
- Helisalmi S, Vepsäläinen S, Koivisto AM, et al. Association of CYP46 intron 2 polymorphism in Finnish Alzheimer's disease samples and a global scale summary. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2006;77:421–422.
- Ma SL, Tang NL, Lam LC, Chiu HF. Polymorphisms of the cholesterol 24-hydroxylase (CYP46A1) gene and the risk of Alzheimer's disease in a Chinese population. *Int Psychogeriatr*. 2006;18:37–45.
- Fernandez Del Pozo V, Alvarez Alvarez M, Fernandez Martinez M, et al. Polymorphism in the cholesterol 24S-hydroxylase gene (CYP46A1) associated with the APOEε3 allele increases the risk of Alzheimer's disease and of mild cognitive impairment progressing to Alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 2006;21:81–87.
- Li Y, Chu LW, Chen YQ, et al. Intron 2 (T/C) CYP46 Polymorphism Is associated with Alzheimer's disease in Chinese patients. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 2006;22:399–404.
- Papassotiropoulos A, Wollmer MA, Tsolaki M, et al. A cluster of cholesterol-related genes confers susceptibility for Alzheimer's disease. *J Clin Psychiatry*. 2005;66:940–947.
- Fu BY, Ma SL, Tang NL, et al. 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*. Published online February 11, 2009.
- Vega GL, Weiner M, Kolsch H, et al. The effects of gender and CYP46 and apoE polymorphism on 24S-hydroxycholesterol levels in Alzheimer's patients treated with statins. *Curr Alzheimer Res*. 2004;1:71–77.
- Tedde A, Rotondi M, Cellini E, et al. Lack of association between the CYP46 gene polymorphism and Italian late-onset sporadic Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 2006;27:773 e771–e773.
- Ingelsson M, Jesneck J, Irizarry MC, Hyman BT, Rebeck GW. Lack of association of the cholesterol 24-hydroxylase (CYP46) intron 2 polymorphism with Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*. 2004;367:228–231.
- Kabbara A, Payet N, Cottel D, Frigard B, Amouyel P, Lambert JC. Exclusion of CYP46 and APOM as candidate genes for Alzheimer's disease in a French population. *Neurosci Lett*. 2004;363:139–143.
- Chalmers KA, Culpan D, Kehoe PG, Wilcock GK, Hughes A, Love S. APOE promoter, ACE1 and CYP46 polymorphisms and beta-amyloid in Alzheimer's disease. *Neuroreport*. 2004;15:95–98.
- Desai P, DeKosky ST, Kamboh MI. Genetic variation in the cholesterol 24-hydroxylase (CYP46) gene and the risk of Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*. 2002;328:9–12.

39. Juhasz A, Rimanoczy A, Boda K, et al. CYP46 T/C polymorphism is not associated with Alzheimer's dementia in a population from Hungary. *Neurochem Res.* 2005;30:943-948.
40. Hoddap E, Parrish R, Anderson D. *Clinical Decisions in Glaucoma*. Saint Louis, MO: Mosby Year Book; 1993:53.
41. Dekaban AS. Changes in brain weights during the span of human life: relation of brain weights to body heights and body weights. *Ann Neurol.* 1978;4:345-356.
42. Urata K, Kawasaki S, Matsunami H, et al. Calculation of child and adult standard liver volume for liver transplantation. *Hepatology.* 1995;21:1317-1321.
43. Wynne HA, Cope LH, Mutch E, Rawlins MD, Woodhouse KW, James OF. The effect of age upon liver volume and apparent liver blood flow in healthy man. *Hepatology.* 1989;9:297-301.
44. Bretillon L, Sidén A, Wahlund LO, et al. Plasma levels of 24S-hydroxycholesterol in patients with neurological diseases. *Neurosci Lett.* 2000;293:87-90.
45. Libby RT, Gould DB, Anderson MG, John SW. Complex genetics of glaucoma susceptibility. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2005;6:15-44.
46. Lam CY, Fan BJ, Wang DY, et al. Association of apolipoprotein E polymorphisms with normal tension glaucoma in a Chinese population. *J Glaucoma.* 2006;15:218-222.
47. Tamura H, Kawakami H, Kanamoto T, et al. High frequency of open-angle glaucoma in Japanese patients with Alzheimer's disease. *J Neurol Sci.* 2006;246:79-83.
48. Fan BJ, Wang DY, Fan DS, et al. SNPs and interaction analyses of myocilin, optineurin, and apolipoprotein E in primary open angle glaucoma patients. *Mol Vis.* 2005;11:625-631.
49. Mabuchi F, Tang S, Ando D, et al. The apolipoprotein E gene polymorphism is associated with open angle glaucoma in the Japanese population. *Mol Vis.* 2005;11:609-612.
50. Ressiniotis T, Griffiths PG, Birch M, Keers SM, Chinnery PF. Apolipoprotein E promoter polymorphisms do not have a major influence on the risk of developing primary open angle glaucoma. *Mol Vis.* 2004;10:805-807.
51. Junemann A, Bleich S, Reulbach U, et al. Prospective case control study on genetic association of apolipoprotein epsilon2 with intraocular pressure. *Br J Ophthalmol.* 2004;88:581-582.
52. Lake S, Liverani E, Desai M, et al. Normal tension glaucoma is not associated with the common apolipoprotein E gene polymorphisms. *Br J Ophthalmol.* 2004;88:491-493.
53. Ressiniotis T, Griffiths PG, Birch M, Keers S, Chinnery PF. The role of apolipoprotein E gene polymorphisms in primary open-angle glaucoma. *Arch Ophthalmol.* 2004;122:258-261.
54. Tomarev SI, Wistow G, Raymond V, Dubois S, Malyukova I. Gene expression profile of the human trabecular meshwork: NEIBank sequence tag analysis. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2003;44:2588-2596.
55. Vickers JC, Craig JE, Stankovich J, et al. The apolipoprotein epsilon4 gene is associated with elevated risk of normal tension glaucoma. *Mol Vis.* 2002;8:389-393.
56. Copin B, Brezin AP, Valtot F, Descotte JC, Bechetoille A, Garchon HJ. Apolipoprotein E-promoter single-nucleotide polymorphisms affect the phenotype of primary open-angle glaucoma and demonstrate interaction with the myocilin gene. *Am J Hum Genet.* 2002;70:1575-1581.
57. Yucel I, Akar Y, Yucel G, Gifcioglu MA, Keles N, Aslan M. Effect of hypercholesterolemia on inducible nitric oxide synthase expression in a rat model of elevated intraocular pressure. *Vision Res.* 2005;45:1107-1114.
58. Wang F, Jia J. Polymorphisms of cholesterol metabolism genes CYP46 and ABCA1 and the risk of sporadic Alzheimer's disease in Chinese. *Brain Res.* 2007;1147:34-38.
59. Bayer AU, Ferrari F. Severe progression of glaucomatous optic neuropathy in patients with Alzheimer's disease. *Eye.* 2002;16:209-212.
60. Bayer AU, Ferrari F, Erb C. High occurrence rate of glaucoma among patients with Alzheimer's disease. *Eur Neurol.* 2002;47:165-168.
61. Karseras AG. Progressive glaucoma in patients with Alzheimer's disease. *Eye.* 2004;18:229.
62. Neshet R, Trick GL. The pattern electroretinogram in retinal and optic nerve disease: a quantitative comparison of the pattern of visual dysfunction. *Doc Ophthalmol.* 1991;77:225-235.
63. Parisi V. Correlation between morphological and functional retinal impairment in patients affected by ocular hypertension, glaucoma, demyelinating optic neuritis and Alzheimer's disease. *Semin Ophthalmol.* 2003;18:50-57.
64. Janciauskiene S, Krakau T. Alzheimer's peptide: a possible link between glaucoma, exfoliation syndrome and Alzheimer's disease. *Acta Ophthalmol Scand.* 2001;79:328-329.
65. Ning A, Cui J, To E, Ashe KH, Matsubara J. Amyloid-beta deposits lead to retinal degeneration in a mouse model of Alzheimer disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2008;49:5136-5143.
66. Brown J, 3rd, Theisler C, Silberman S, et al. Differential expression of cholesterol hydroxylases in Alzheimer's disease. *J Biol Chem.* 2004;279:34674-34681.
67. Bjorkhem I, Andersson U, Ellis E, et al. From brain to bile: evidence that conjugation and omega-hydroxylation are important for elimination of 24S-hydroxycholesterol (cerebrosterol) in humans. *J Biol Chem.* 2001;276:37004-37010.
68. Ikeda H, Ueda M, Ikeda M, Kobayashi H, Honda Y. Oxysterol 7alpha-hydroxylase (CYP39A1) in the ciliary nonpigmented epithelium of bovine eye. *Lab Invest.* 2003;83:349-355.
69. Moreira EF, Jaworski C, Li A, Rodriguez IR. Molecular and biochemical characterization of a novel oxysterol-binding protein (OSBP2) highly expressed in retina. *J Biol Chem.* 2001;276:18570-18578.
70. Gordiyenko N, Campos M, Lee JW, Fariss RN, Szein J, Rodriguez IR. RPE cells internalize low-density lipoprotein (LDL) and oxidized LDL (oxLDL) in large quantities in vitro and in vivo. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2004;45:2822-2829.
71. Li CM, Chung BH, Presley JB, et al. Lipoprotein-like particles and cholesteryl esters in human Bruch's membrane: initial characterization. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2005;46:2576-2586.
72. Li CM, Presley JB, Zhang X, et al. Retina expresses microsomal triglyceride transfer protein: implications for age-related maculopathy. *J Lipid Res.* 2005;46:628-640.
73. Tserentsoodol N, Szein J, Campos M, et al. Uptake of cholesterol by the retina occurs primarily via a low density lipoprotein receptor-mediated process. *Mol Vision.* 2006;12:1306-1318.
74. Bretillon L, Acar N, Seeliger MW, et al. ApoB₁₀₀, LDLR^{-/-} mice exhibit reduced electroretinographic response and cholesteryl esters deposits in the retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2008;49:1307-1314.

B. Association entre polymorphisme CYP46A1 et DMLA

Fourgeux, C., et al., Single Nucleotide Polymorphism in the Cholesterol-24S-Hydroxylase (CYP46A1) Gene and Its Association with CFH and LOC387715 Gene Polymorphisms in Age-Related Macular Degeneration. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2012. 53(11): p. 7026-7033.

N.B: Les figures mentionnées dans le texte font référence à celles qui sont parues dans cet article.

Une autre étude de SNP, de plus grande envergure, a été entreprise par notre équipe afin de rechercher, dans une population, les interactions de rs754203 (SNP gène *CYP46A1*) avec les gènes *CFH* (code un facteur du complément H), *LOC387715* (code une protéine mitochondriale de la rétine). Les gènes *CFH* et *LOC387715* sont reconnus comme facteurs génétiques de risque de la DMLA. Comme dans l'étude sur le GPAO, la concentration plasmatique de 24S-OH a été également évaluée dans notre population constituée de patients DMLA et de sujets témoins.

L'objectif de ce travail était d'apporter des données sur la possible implication du SNP rs754203 de *CYP46A1* dans la pathogénèse de la DMLA, et de considérer que ce SNP est un facteur de risque supplémentaire de DMLA. Pour cela, des patients DMLA avec une atrophie géographique (GA) et une néovascularisation choroïdienne (CNV) (correspondant à la forme exsudative de la DMLA) ont été génotypés pour le SNP rs754203 de *CYP46A1*, le SNP rs10490924 de *LOC387715* et le SNP rs1061170 de *CFH*.

Méthode

Les 1388 patients DMLA notre étude (qui avaient contracté une DMLA sur au moins un œil) et les 487 témoins ont été recrutés dans les services d'ophtalmologie des CHU de Dijon, Créteil et Bordeaux. Tous ces patients étaient d'origine caucasienne. Le diagnostic de DMLA a été confirmé chez les patients ou infirmé chez les témoins par un examen non mydriatique suivi d'une angiographie à la fluorescéine. Tous les patients inclus dans cette étude ont été examinés par un spécialiste de la rétine. Les sujets témoins ont été sélectionnés parmi des patients du CHU volontaires pour participer à l'étude. Ceux-ci étaient suivis après une opération de la cataracte ou après chirurgie de la paupière. Des photographies stéréoscopiques digitales du fond d'œil ont été prises au moment de l'examen, et les images ont été graduées selon les définitions du système Wisconsin de graduation de la DMLA. Les fonds d'œil des contrôles étaient dénués de *drusen*. Outre leur apparition avec l'âge, ils sont

également une caractéristique de la DMLA. Les patients DMLA ont été divisés en deux groupes : avec néovascularisation choroïdienne (CNV) et avec atrophie géographique (GA).

Les échantillons de sang (cellules nucléées) provenant de tous les patients ont été recueillis pour le génotypage. Bretillon *et al.* [226] ont montré, chez l'homme, que les niveaux plasmatiques de 24S-OH reflètent la balance entre sa production cérébrale et son métabolisme hépatique. Ainsi, le rapport entre le poids du cerveau et le volume du foie a été calculé en utilisant les données de poids corporel et de taille de l'individu. Cela a été fait pour 128 patients DMLA et 71 sujets témoins. Le plasma a été prélevé chez ces patients pour mesurer le cholestérol et le 24S-OH. La prise de médicaments diminuant le cholestérol (statines en particulier) a été prise en compte. Dans cette sous-population, nous avons évalué en quoi des différences interindividuelles dans les niveaux de 24S-OH pouvaient être expliquées par des différences similaires dans le rapport du poids du cerveau sur le volume du foie. Etant donné que le foie représente 80% de la production de 24S-OH chez l'homme, et que le foie est responsable de son élimination, nous assumons que ce rapport pourrait être le meilleur marqueur de la capacité de l'organisme à synthétiser et métaboliser le 24S-OH, et de refléter les niveaux plasmatiques de 24S-OH [226, 330, 384]. Les niveaux plasmatiques de 24S-OH ont été quantifiés par spectrométrie de masse couplée à la chromatographie gazeuse à l'aide d'un standard interne de 24S-OH déutééré.

L'assomption de Hardy-Weinberg a été établie par la méthode standard en comparant le nombre de sujets observés dans différentes catégories de génotypes avec le nombre attendu de sujets sous l'équilibre de Hardy-Weinberg, pour la fréquence estimée de l'allèle, et soumise au test d'ajustement statistique de Pearson en utilisant le χ^2 avec 1 degré de liberté. Le test χ^2 a été utilisé pour comparer les distributions génotypiques et les fréquences alléliques entre les patients et les témoins. Les modèles de régression logistique ont été utilisés pour estimer les Risques Relatifs (OR, pour *Odd Ratio*) avec un intervalle de confiance à 95% (IC 95%) pour le risque de DMLA. Les OR et les intervalles de confiance à 95% (IC 95%) ont été calculés par régression logistique pour confirmer l'association relative de la pathologie avec l'âge, le genre et le génotype. La significativité des résultats obtenus lors des tests les analyses statistiques a été obtenue en conférant une valeur de p inférieure à 0,05 ($p < 0,05$). Le logiciel SAS 9.02 a été utilisé pour effectuer ces tests.

Résultats

Le groupe témoin ($n=487$) était significativement plus jeune que le groupe DMLA ($n=1388$). Comme attendu, il y avait une majorité de femmes dans le groupe DMLA, étant

donné la moyenne d'âge. Les génotypes et les fréquences alléliques des 3 SNP sont présentés dans le **tableau 1**.

Le **tableau 1** montre que la présence de l'allèle à risque T dans le polymorphisme rs754203 de *CYP46A1* n'est pas un facteur de risque de la DMLA (OR brut =1,2; IC 95%=0,9-1,4 ; $p=0,2$; tableau 2). L'OR brut pour le risque de DMLA était de 2,9 (IC 95% =2,4-3,4 ; $p < 0,0001$) en tenant compte du nombre d'allèles T dans le rs10490924 du gène *LOC387715*, et 2,0 (IC95% =1,7-2,3 ; $p < 0,0001$) en tenant compte du nombre d'allèles C dans le rs1061170 du gène *CFH*. L'allèle à risque T dans le SNP rs10490924 de *LOC387715* et l'allèle C dans le SNP rs1061170 de *CFH* ont bien été retrouvés en tant que facteurs de risque de DMLA dans notre population ($p < 0,0001$) (**tableau 2**).

Nous avons ensuite cherché s'il y avait une association entre ces facteurs alléliques à risque et le phénotype clinique (**tableau 2**). Le SNP rs10490924 dans le gène *LOC387715* est significativement associé à la DMLA chez ces patients. L'OR ajusté pour l'âge et le sexe était de 13,9 (IC95% =7,9-24,2) pour l'homozygote TT et de 2,7 (IC95% =2,0-3,5) pour l'hétérozygote GT, comparé au génotype GG. Le SNP rs1061170 dans le gène *CFH* était significativement associé avec la DMLA. Comparé au génotype TT, l'OR ajusté pour l'âge et le sexe était de 4,8 (IC95% =3,2-7,0) pour l'homozygote CC, et de 2,4 (IC95% =2,0-3,5) pour l'hétérozygote CT.

Nous avons aussi établi les effets cumulés du SNP rs754203 de *CYP46A1* avec les SNP de *LOC387715* et *CFH*. Un OR de 2,2 (IC95% =1,1-4,4 ; $p=0,04$) a été obtenu chez les porteurs de l'allèle C dans le gène *CYP46A1* qui ne portent pas les allèles à risque dans les gènes *LOC387715* et *CFH* (**tableau 2**).

Les concentrations plasmatiques de 24S-OH et les ratios 24S-OH/cholestérol calculés sont présentés dans le **tableau 3**. Les patients DMLA ($n=128$) avec les trois génotypes de *CYP46A1* présentent une différence significative ($p < 0,01$) pour les taux de cholestérol plasmatique, pour les niveaux de 24S-OH ($p < 0,01$) et pour les ratios 24S-OH/cholestérol ($p=0,04$) comparé aux témoins ($n=71$).

Un effet du sexe (H/F) a été observé seulement dans les niveaux de cholestérol des témoins. Après ajustement sur le sexe, le SNP et l'utilisation de statines, la différence était à la limite de la significativité chez les sujets témoins ($p=0,0579$). Les femmes homozygotes TT pour *CYP46A1* ont des niveaux significativement plus faibles que les femmes avec l'allèle C ($p=0,0261$) et les hommes homozygotes TT ($p=0,042$).

Il n'a pas été trouvé de différence entre les sujets témoins et les patients DMLA bien qu'une faible, mais non significative augmentation du 24S-OH plasmatique ait été observée

chez les patients DMLA (voir la **figure**). Ceci est cohérent avec nos précédentes données [226] sur les fluctuations du 24S-OH plasmatiques au cours de la vie, et avec l'âge plus avancé de notre population DMLA comparée à la population témoin.

Discussion

La prévalence de la DMLA aux USA est de 6,5% [385]. L'impact du facteur génétique est important dans la DMLA et son héritabilité, démontrée par des études d'agrégation familiale, de ségrégation et d'études jumelles, est évidente [386].

Notre étude a confirmé l'association entre la DMLA exsudative et les SNP des gènes *CFH* et *LOC387715*. Le risque est plus grand avec l'allèle T pour *LOC387715*, et l'allèle C pour *CFH*.

L'ARNm de *LOC387715* est détecté dans la rétine humaine et l'EPR [387, 388]. *LOC387715* code une protéine membranaire mitochondriale de 12kDa se trouvant également dans la matrice extracellulaire. L'allèle T à risque du rs10490924 de *LOC387715* affecterait la fonction mitochondriale de la protéine et augmenterait la susceptibilité de dégénérescence des photorécepteurs associée à l'âge.

L'inflammation chronique locale participe à la formation de *drusen* dans la membrane de Bruch et est impliquée dans la physiopathologie de la DMLA. *CFH* est le gène codant un facteur du complément H et un des membres de la cascade du complément. *CFH* a un rôle dans le processus de l'inflammation. L'association du polymorphisme *CFH* Y402H avec la DMLA serait due à une diminution de la clairance des débris cellulaires et à l'augmentation de l'inflammation locale [389].

La fréquence de l'allèle C de *CYP46A1* dans notre population témoin était comparable à celle retrouvée dans les autres populations caucasiennes d'Europe (28%) [390].

L'allèle à risque C du SNP rs754203 de *CYP46A1* confère un risque plus élevé de DMLA exsudative, mais seulement chez les patients atteints de DMLA exsudative qui ne sont pas porteurs des allèles à risque des SNP de *CFH* et *LOC387715* étudiés ici. Bien que cette association soit significativement recevable, il est difficile d'émettre une conclusion car notre échantillon de population est relativement petit. Des études supplémentaires à plus grande échelle sont nécessaires pour confirmer ce résultat.

Le génotype TT dans l'intron 2 de *CYP46A1*, désigné par le SNP rs754203 a été identifié comme facteur de risque pour la MA, et plus récemment pour le GPAO [391]. *CYP46A1* et son métabolite, le 24S-OH sont spécifiques à la rétine neurale, et spécifiquement aux CGR. Puisque la perte de CGR est un trait caractéristique du glaucome, nous avons émis

l'hypothèse que nous allions trouver une association du SNP de CYP46A1 avec le glaucome [391], mais pas avec la DMLA. En effet, bien qu'il y ait une dégénérescence neuronale au cours de la DMLA, elle implique en premier lieu les photorécepteurs, et non pas les CGR.

Comme dans notre précédente étude sur le GPAO, nous avons suggéré que le 24S-OH n'était pas un biomarqueur de la DMLA. De façon intéressante, les valeurs de 24S-OH plasmatiques les plus élevées ont été retrouvées chez les patients porteurs de l'allèle C dans le SNP CYP46A1. Ceci est cohérent avec le fait que le plus grand risque pour la DMLA chez les patients ne portant pas l'allèle à risque de CFH et LOC387715 a été retrouvé chez les patients avec l'allèle C dans le SNP de CYP46A1. Il n'y a pas de différence dans les valeurs de 24S-OH plasmatiques entre les patients DMLA et les sujets témoins. La plus haute valeur de 24S-OH et en conséquence, le plus faible rapport 24S-OH/cholestérol retrouvée chez les patients DMLA par rapport aux sujets témoin pourrait être expliquée par le hasard plutôt que par un effet pathologique. En effet, l'association entre les niveaux de cholestérol et la DMLA n'a pas été clairement établie [392, 393] (voir la **figure**). Dans nos deux groupes de population, les niveaux de cholestérol sont faibles par rapport à ceux retrouvés dans la population générale. Des éléments ont pu biaiser les résultats de notre étude : notre population témoin était faible et la moyenne d'âge (68 ans pour les témoins, 78 ans pour les patients DMLA) était assez élevée si on tient compte de la tendance à la baisse du cholestérol total chez les personnes âgées [394]. Le mode de vie est aussi un facteur important qui modifie la composition lipidique du plasma, et notre échantillon de population était issu d'un seul centre ophtalmologique dijonnais. Il faudrait donc extrapoler à une population plus large.

Deux nouveaux polymorphismes des gènes *LIPC* (codant la lipase hépatique, LH) et *SCARB1* (codant le récepteur membranaire SR-BI) ont récemment été identifiés comme facteurs de risque potentiels pour la DMLA. La LH et SR-BI ont la particularité commune de moduler le métabolisme du cholestérol, en affectant les niveaux d'HDL et l'utilisation du cholestérol cellulaire. Ces deux gènes méritent d'être étudiés davantage en associant le cholestérol et la DMLA, indépendamment de leurs effets sur le niveau plasmatique de HDL.

Cet article a l'originalité d'analyser l'implication possible, bien que mineure, d'un polymorphisme T/C de *CYP46A1* dans la DMLA. Nos données montrent que le polymorphisme génétique rs754203 de *CYP46A1* n'a pas été retrouvé, en tant que tel, comme facteur de risque chez des patients DMLA, mais pourrait l'être chez les patients DMLA exsudative non porteurs d'allèles à risque dans le SNP rs1061170 du gène *CFH* et le SNP rs10490924 de *LOC387715*.

Single Nucleotide Polymorphism in the Cholesterol-24S-Hydroxylase (*CYP46A1*) Gene and Its Association with *CFH* and *LOC387715* Gene Polymorphisms in Age-Related Macular Degeneration

Cynthia Fourgeux,¹⁻³ Brice Dugas,⁴ Florence Richard,⁵ Ingemar Björkhem,⁶ Niyazi Acar,¹⁻³ Alain M. Bron,¹⁻⁴ Jean-François Korobelnik,⁷ Nicolas Leveziel,⁸ Jennyfer Zerbib,⁸ Nathalie Puche,⁸ Catherine P. Creuzot-Garcher,¹⁻⁴ Eric Souied,⁸ and Lionel Bretillon¹⁻³

PURPOSE. We investigated the association of single nucleotide polymorphism (SNP) in the *cholesterol-24S-hydroxylase* (*CYP46A1*) gene, according to *CFH* and *LOC387715* SNPs, with age-related macular degeneration (AMD).

METHODS. We enrolled 1388 AMD patients with neovascular AMD or geographic atrophy and 487 unrelated control subjects. SNPs were genotyped in the *CYP46A1* (rs754203), *LOC387715* (rs10490924), and *CFH* (rs1061170) genes. Plasma 24S-hydroxycholesterol, the metabolic product of *CYP46A1*, was quantified by gas chromatography-mass spectrometry using an authentic deuterated internal standard in subgroups of patients and controls. The χ^2 test was used to compare categoric allelic and genotype distributions between cases and controls. The odds ratio (OR) with a 95% confidence interval (95% CI) was calculated for AMD risk, and adjusted for age and gender. Significance levels were set at $P < 0.05$.

RESULTS. The rs754203 SNP in the *CYP46A1* gene was not associated with AMD (crude OR = 1.2, 95% CI = 0.9–1.4, $P = 0.2$). The crude OR for risk of AMD was 2.9 (95% CI = 2.4–3.4, $P < 0.0001$) according to the number of rs10490924 T alleles

in the *LOC387715* gene, and 2.0 (95% CI = 1.7–2.3, $P < 0.0001$) according to the number of rs1061170 C alleles in the *CFH* gene. After adjustment for age and gender, an OR of 2.2 (95% CI = 1.1–4.1, $P = 0.04$) was obtained for AMD cases with the C allele in the *CYP46A1* gene, and carrying no risk alleles in the *CFH* and *LOC387715* genes.

CONCLUSIONS. The rs754203 C allele in the *CYP46A1* gene may confer a higher risk for exudative AMD in patients who carry no risk alleles in the *CFH* and *LOC387715* genes. Additional studies with larger sample sizes are needed in AMD subjects at no risk in *CFH* and *LOC387715*. (*Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2012;53:7026–7033) DOI:10.1167/iovs.12.9652

Age-related macular degeneration (AMD) is the most common cause of irreversible visual loss in Western elderly populations. Its prevalence recently was estimated at 6.5% after 40 years of age in the United States.¹ AMD is a genetically complex disorder of the photoreceptor-RPE-Bruch's membrane (BrM)-choriocapillaris complex.²⁻⁵ Early AMD is characterized histopathologically by retinal pigment abnormalities and drusen between the RPE and choroid.^{6,7} Drusen are deposits of extracellular debris, enriched in neutral lipids, including cholesterol and cholesteryl esters (see the study of Curcio et al.⁸ for review). Drusen are classified as hard or soft. Although occurring frequent in elderly human subjects and found mainly in the macula,⁹ soft drusen at early stages are associated with a higher risk for late AMD.^{10,11} Late AMD includes geographic atrophy (GA) and choroidal neovascularization (CNV). AMD is a complex disease derived from inherited and environmental factors, such as advanced age, smoking habits, lifestyle, and dietary status.¹² Familial aggregation¹³⁻¹⁶ and twin studies¹⁷⁻²⁰ have shown that genetic propensity accounts for a large proportion in the prevalence of AMD.

Nevertheless, its etiology remains poorly understood. In the past few years, research into the genetics of AMD has been successful. Several studies have supported definitively the association between AMD and variants of genes coding for members of the complement cascade, including complement factor H (*CFH*).²¹ A single nucleotide polymorphism (SNP), rs1061170 (Y402H), in the *CFH* gene results in a missense mutation, and significantly increases the likelihood of AMD in European populations.^{22,23} Protective variants in the complement pathway subsequently were identified in the complement component 2/B factor locus.²⁴ Recently, two reports have indicated an association with variation in the complement component 3 locus.^{25,26} Genome-wide scans also support

From the ¹INRA, UMR1324 Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation, Eye & Nutrition Research Group, Dijon, France; the ²CNRS, UMR6265 Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation, Eye & Nutrition Research Group, Dijon, France; the ³Université de Bourgogne, Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation, Eye & Nutrition Research Group, Dijon, France; the ⁴CHU de Dijon, Service d'Ophthalmologie, Dijon, France; the ⁵Institut Pasteur de Lille, Lille, France; the ⁶Department of Laboratory Medicine, Division of Clinical Chemistry, Karolinska University Hospital Huddinge, Stockholm, Sweden; the ⁷Service d'Ophthalmologie, CHU de Bordeaux, Université Bordeaux Segalen, Bordeaux, France; and the ⁸Department of Ophthalmology, University Hospital, Créteil, France.

Supported by Programme Hospitalier de Recherche Clinique (Direction de la Recherche Clinique, University Hospital, Dijon, France) and Fournier/Solvay/Abbott Laboratory (Daix, France). The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

Submitted for publication February 7, 2012; revised May 31 and August 20, 2012; accepted September 5, 2012.

Disclosure: C. Fourgeux, None; B. Dugas, None; F. Richard, None; I. Björkhem, None; N. Acar, None; A.M. Bron, None; J.-F. Korobelnik, None; N. Leveziel, None; J. Zerbib, None; N. Puche, None; C.P. Creuzot-Garcher, None; E. Souied, None; L. Bretillon, None.

Corresponding author: Lionel Bretillon, CSGA, Eye & Nutrition Research Group, INRA Research Center, 17 rue Sully, BP 86510, F-21065 Dijon, France; lionel.bretillon@dijon.inra.fr.

linkage to chromosome loci.^{27,28} Two reports implicated *LOC387715* as a major contributor to AMD susceptibility,^{29,30} and recently *HTRA1* (which lies 6 kb distal to *LOC387715*) emerged as a leading contender for the second AMD susceptibility gene.^{31,32} The promoter SNP in *HTRA1*, a gene that encodes a heat-shock serine protease found in retinal tissues, produces a change in the expression level of the gene.^{31,32} *HTRA1* expression has been reported to increase with advancing age in human fibroblasts.³¹ In transgenic mice, overexpression of *HTRA1* induces changes in the elastic layer of Bruch's membrane, which appear fragmented with electron-dense spots³³ and polypoidal choroidal vasculopathy.³⁴ *LOC387715/ARMS2* has been suggested to encode a mitochondrial-associated protein that also is found in the retina. The common c.205G.T non-synonymous coding SNP (rs10490924), which changes alanine to serine at codon 69 of *LOC387715*, may result in misfolding of the protein.³⁵

Cholesterol is a key component of the neural retina and retinal pigment epithelium.^{36,37} In humans, it accounts for more than 10% of the lipids therein.³⁸ Similar to the brain,^{39–41} the neural retina expresses a cytochrome P450 enzyme called cholesterol-24S-hydroxylase (*CYP46A1*),^{42,43} which can convert cholesterol into 24S-hydroxycholesterol. This pathway has been suggested as a mechanism for controlling cholesterol homeostasis in neurons, at least in the brain.⁴⁴ In addition to 24S-hydroxycholesterol, the retina exhibits significant amounts of pregnenolone, which is produced by *CYP11A1*, 27-hydroxycholesterol, and 3 β -hydroxy-5-cholestenic acid, an oxidation product of 27-hydroxycholesterol, that are formed by *CYP27A1*.⁴⁵ Interestingly, the amount of 3 β -hydroxy-5-cholestenic acid exceeded that of 24S-hydroxycholesterol in the human retina and RPE, while 24S-hydroxycholesterol was absent from RPE.⁴⁵ Therefore, other mechanisms than 24S-hydroxylation of cholesterol likely may participate in the removal of cholesterol from the retina. Nevertheless, contrary to 27-hydroxycholesterol, which is produced mainly in photoreceptors and RPE, which are the primary sites of AMD, 24S-hydroxycholesterol appears to be neuron-specific.^{42,43,45} Assuming these site- and cell-differences, 24S-hydroxycholesterol thus may be associated less likely with AMD than other oxysterols, such as 7-ketcholesterol.⁴⁶ However, a link between *CYP46A1*, 24S-hydroxycholesterol, and neurodegeneration in Alzheimer's has been suggested. Overexpression of *CYP46A1* has been reported to reduce amyloid deposits in the hippocampus of transgenic mice carrying the Swedish APP23 mutation and APP/Presenilin 1 mice, as murine models of Alzheimer's disease.⁴⁷ A knock out in *CYP46A1* gene in a mouse model of Alzheimer's disease resulted in a prolonged lifespan.⁴⁸ SNPs in the *CYP46A1* gene have been identified. In some,^{49–60} but not all,^{56,61–67} studies, this type of polymorphism was associated with increased risk for late-onset Alzheimer disease. Recently, we found that the T allele in the *CYP46A1* rs754203 SNP was associated with a higher risk for primary open-angle glaucoma.⁶⁸

The aim of our investigation was to provide data on the possible involvement of the rs754203 SNP in *CYP46A1* as an additional risk factor for AMD. For that purpose, AMD patients with GA and CNV were genotyped for the rs754203 SNP in *CYP46A1*, rs10490924 in *LOC387715*, and rs1061170 in *CFH*.

MATERIALS AND METHODS

Subjects

The protocol adhered to the tenets of the Declaration of Helsinki. This case-control study was approved by the local Ethics Committee (Dijon,

Bordeaux, and Créteil, France). Informed written consent was obtained from all subjects before participation.

The population comprised 1388 unrelated patients with AMD in at least one eye and 487 unrelated control subjects recruited in the Department of Ophthalmology in Dijon, Créteil, and Bordeaux, France. All control subjects and patients were Caucasian. The diagnosis of AMD was confirmed in cases or infirmed in control subjects by clinical non-mydiatic examination followed by fluorescein angiography. All patients included in our study were examined by a retina specialist. The control subjects were recruited among patients operated on for cataract or lid surgery, and willing to participate in the study. Stereoscopic digital fundus photographs were recorded at the time of examination, and images were graded using the definitions of the Wisconsin Age-Related Maculopathy Grading System.¹¹ The fundi of controls were free of any drusen. AMD patients were divided into two groups: CNV and GA. Blood samples for genotyping were obtained from all the patients with AMD and from control individuals. The brain weight and liver volume were calculated using size and weight data, and established formulas from the literature,^{69–71} as used previously^{68,72} in 71 control subjects and 128 AMD patients. Plasma was taken in a fasting state from these subjects for measurements of cholesterol and 24S-hydroxycholesterol (see below). The use of cholesterol-lowering drugs was recorded. In this subpopulation we evaluated whether interindividual differences in 24S-hydroxycholesterol levels would be explained by similar differences in the ratio of brain weight to liver volume. Given that the brain accounts for about 80% of 24S-hydroxycholesterol production in humans,^{39,41} and the liver is responsible for its elimination,³⁹ we assumed that this ratio would be the best marker for the capacity of the organism to synthesize and metabolize 24S-hydroxycholesterol, and to reflect plasma 24S-hydroxycholesterol levels.⁷²

CYP46A1, CFH, and LOC387715 Genotyping

DNA samples were evaluated for the rs754203 SNP in *CYP46A1*, rs10490924 in *LOC387715*, and rs1061170 in *CFH* using either an Affymetrix 6.0 platform (Créteil, France) as previously described⁷³ or in our own facilities.⁶⁸

Quantification of Plasma 24S-Hydroxycholesterol Levels

Plasma 24S-hydroxycholesterol levels were assayed in a subset of 71 subjects and 128 AMD cases from the Department of Ophthalmology (University Hospital, Dijon, France) by isotope dilution mass spectrometry using racemic [23,23,24-³H₃]-24-hydroxycholesterol, as described previously.^{39,41,72,74} Briefly, deuterated 24-hydroxycholesterol (200 ng, [23,23,24-³H₃]-24-hydroxycholesterol) was added to 0.5 mL of plasma. After alkaline hydrolysis with 1 N KOH in 90% ethanol for 2 hours, the solution was neutralized with 65 μ L of phosphoric acid and the sterols were extracted with 9 mL of chloroform in the presence of 3 mL of 0.9% sodium chloride. The organic phase was removed and the solvent was evaporated to dryness. The sterols were dissolved in 1 mL of toluene. A 100 μ L aliquot was removed for quantification of the cholesterol concentration. For this purpose, 30 μ g of 5 α -cholestane were added, the solvents were evaporated to dryness, and the sterols were derivatized to trimethylsilyl ethers by heating at 60°C after the addition of 200 μ L of pyridine and 200 μ L of BSTFA (Supelco, Bellefonte, PA). The solvents were evaporated under nitrogen gas, and the samples were resuspended in hexane and analyzed by gas chromatography: electron ionization mass spectrometry using an HP6890 series II plus a chromatograph combined with an HP mass selective detector operated in selected ion monitoring mode. A 1 μ L aliquot was injected by automated injection in a splitless mode at an injection temperature of 300°C on a DB-5MS fused silica capillary column (30 m $\times$ 0.25 mm id, 0.25 μ m film thickness; J&W Scientific, Agilent Technologies, Massy, France). The initial oven temperature was kept at 50°C for 1 minute, then it was increased at a rate of 20°C/min to

250°C and thereafter at 5°C/min to a final temperature of 300°C. The temperature of the transfer line was kept at 300°C. Electron impact ionization was used at 70 eV ionization energy. Trimethylsilyl-cholesterol and 5 α -cholestane were measured at *m/z* 368 and 372 amu, respectively. Absolute amounts of cholesterol were determined by interpolation from a standard curve generated in each experiment.

The remainder of the saponified sterols was purified on silica columns (Supelco) for quantification of 24S-hydroxycholesterol. Cholesterol was eluted with 8 mL of 0.5% isopropanol in hexane. Purified oxysterols subsequently were eluted with 5 mL of 30% isopropanol in hexane and derivatized to trimethylsilyl ether as described above. The samples were analyzed by gas chromatography-mass spectrometry as described above. 24S-Hydroxycholesterol and deuterated 24-hydroxycholesterol were measured at *m/z* 413 and 416 amu, respectively. Absolute amounts of 24S-hydroxycholesterol were determined by interpolation from a standard curve generated in each experiment.

Statistical Analyses

The Hardy-Weinberg assumption was assessed by the standard method comparing the observed numbers of subjects in different genotype categories with the expected number under Hardy-Weinberg equilibrium for the estimated allele frequency, and testing with a Pearson goodness-of-fit statistic using the χ^2 with 1 degree of freedom. The χ^2 test was used to compare categorical allelic and genotype distributions between cases and controls. General linear models were used to compare means between cases and controls. Logistic regression models were used to estimate the odds ratio (OR) with a 95% confidence interval (95% CI) for AMD risk. ORs were adjusted for age and gender. Significance levels were set at $P < 0.05$. Analyses were performed with the SAS software release 9.02 (SAS Institute Inc., Cary, NC).

RESULTS

The clinical characteristics of control subjects and AMD patients are presented in Table 1. The control group was significantly younger than the AMD cases ($P < 0.01$). There was a preponderance of females over males in the AMD group, as expected for this age group.

TABLE 1. Characteristics of the Population of Control Subjects and AMD Cases, and Distribution of the Genotypes

	Controls	AMD Cases	P Value
<i>n</i>	487	1388	
Males (%)	39.8%	33.1%	0.008
Age (y $\pm$ SD)	68.3 $\pm$ 8.5	78.8 $\pm$ 7.4	<0.0001
<i>CFH</i> gene (rs1061170 SNP)			
TT	188 (38.6%)	291 (21.0%)	<0.0001
TC	234 (48.1%)	708 (51.0%)	
CC	65 (13.3%)	389 (28.0%)	
C allele frequency	0.374	0.535	<0.0001
<i>LOC387715</i> gene (rs10490924 SNP)			
GG	299 (61.4%)	449 (32.4%)	<0.0001
GT	171 (35.1%)	644 (46.4%)	
TT	17 (3.5%)	295 (21.2%)	
T allele frequency	0.211	0.444	<0.0001
<i>CYP46A1</i> gene (rs754203 SNP)			
TT	259 (53.2%)	691 (49.8%)	0.42
CT	188 (38.6%)	580 (41.8%)	
CC	40 (8.2%)	117 (8.4%)	
C allele frequency	0.280	0.293	0.45

The genotype and allelic frequencies for rs10490924 in *LOC387715*, rs1061170 in *CFH*, and rs754203 in *CYP46A1* are given in Table 1. The frequency of the rs10490924 risk T allele in the *LOC387715* gene and rs1161170 C allele in the *CFH* gene was significantly higher ($P < 0.0001$) in AMD patients than in control subjects (Table 1). There was no statistically significant difference between the frequency of the rs754203 risk C allele in the *CYP46A1* gene in control subjects and AMD cases ($P > 0.05$, Table 1).

We then determined whether there was any association between the risk alleles of rs754203 in *CYP46A1*, rs10490924 in *LOC387715*, and rs1061170 in *CFH* genes and the clinical phenotype. The allele and genotype ORs of the SNPs in AMD and control patients are given in Table 2.

The rs10490924 SNP in the *LOC387715* gene was significantly ($P < 0.0001$) associated with AMD patients. The age- and gender-adjusted OR was 13.9 (95% CI = 7.9–24.2) for the homozygous TT genotype and 2.7 (95% CI = 2.0–3.5) for the heterozygous GT genotype, compared to the GG genotype (Table 2).

The rs1061170 SNP in the *CFH* gene was associated significantly with increased risk of AMD ($P < 0.0001$, Table 2). Compared to the TT genotype, the age- and gender-adjusted OR for the risk of AMD was 4.8 (95% CI = 3.2–7.0) for the homozygous CC genotype and 2.4 (95% CI = 2.0–3.5) for the heterozygous CT genotype.

The rs754203 SNP in the *CYP46A1* gene was not associated with AMD (Table 2). No significant difference between *CYP46A1* genotypes in the AMD and control groups was observed.

We also assessed the joint effects of the rs754203 SNP in *CYP46A1* with the SNP in *LOC387715* and *CFH*. An OR of 2.2 (95% CI = 1.1–4.4, $P = 0.04$) was obtained for carriers of the C allele in the *CYP46A1* gene and no risk allele in the *CFH* and *LOC387715* genes (Table 2).

Plasma cholesterol, 24S-hydroxycholesterol and 24S-hydroxycholesterol/cholesterol levels for the three genotypes of *CYP46A1* in 71 control subjects and 128 AMD patients are given in Table 3. AMD patients presented a significant difference in plasma cholesterol ($P < 0.01$), 24S-hydroxycholesterol levels ($P < 0.01$), and the 24S-hydroxycholesterol-to-cholesterol ratio ($P = 0.04$) compared to control subjects (Table 3). A gender effect in plasma cholesterol levels was found in control subjects only. After adjusted by gender, SNP, and statin use, the difference remained at the limit of significance in controls ($P = 0.0579$), women homozygous for the T allele in *CYP46A1* gene SNP had significantly lower plasma cholesterol levels than women with the C allele ($P = 0.0261$) and men homozygous for the T allele ($P = 0.0042$).

The Figure shows the plasma cholesterol-related levels of 24S-hydroxycholesterol in control subjects (part A of Figure) and AMD patients (part B of Figure) from the age of 50 years onward. The ratio between calculated brain weight and liver volume for the different ages, based on data from the literature^{69–71} and calculated in each of the control subjects and patients, also is indicated in the Figure. As initially postulated⁷² and verified in glaucoma patients,⁶⁸ this ratio can be used as an index for the overall capacity of the body to synthesize and metabolize 24S-hydroxycholesterol, especially in infancy and adulthood and marginal changes in the elderly.⁷² The levels of 24S-hydroxycholesterol closely follow the brain weight-to-liver volume ratio during the different decades of life. No differences were found between control subjects and AMD patients, although a slight, but not significant increase in the plasma 24S-hydroxycholesterol level was observed in AMD patients at older ages, which is consistent with previous findings⁷² and with the more advanced age of our AMD population compared to controls.

TABLE 2. Crude and Adjusted ORs for rs1061170 in *CFH*, rs10490924 in *LOC387715*, and rs754203 in *CYP46A1* Gene in AMD Cases

	Crude OR (95% CI)	P Value	Adjusted for Gender and Age	P Value
<i>CFH</i> (rs1061170)				
TT	1 (ref)	<0.0001	1 (ref)	<0.0001
TC	2.0 (1.6–2.5)		2.4 (1.8–3.2)	
CC	3.9 (2.8–5.3)		4.8 (3.2–7.0)	
/n of C allele	2.0 (1.7–2.3)	<0.0001	2.2 (1.8–2.7)	<0.0001
<i>LOC387715</i> (rs10490924)				
GG	1 (ref)	<0.0001	1 (ref)	<0.0001
GT	2.5 (2.0–3.1)		2.7 (2.0–3.5)	
TT	11.6 (6.9–19.3)		13.9 (7.9–24.2)	
/n of T allele	2.9 (2.4–3.4)	<0.0001	3.2 (2.6–3.9)	<0.0001
<i>CYP46A1</i> (rs754203)				
Total population		0.42		0.32
TT	1 (ref)		1 (ref)	
CT	1.2 (0.9–1.4)		1.2 (0.9–1.4)	
CC	1.1 (0.8–1.6)		1.2 (0.8–1.6)	
CT+CC vs. TT	1.2 (0.9–1.4)	0.20	1.2 (0.9–1.5)	0.13
Patients at no risk in <i>CFH</i> (rs1061170) and <i>LOC387715</i> (rs10490924)				
CT+CC (n = 87) vs. TT (n = 102)	1.7 (0.9–3.1)	0.08	2.2 (1.1–4.4)	0.04
AMD cases with choroidal neovascularization				
CT+CC (n = 40) vs. TT (n = 33)	1.2 (0.9–1.4)	0.17	1.2 (0.9–1.6)	0.12

DISCUSSION

Familial aggregation studies, twin studies, and segregation analyses have provided strong evidence for the heritability of AMD.⁷⁵ Our data confirmed the association between exudative AMD and the rs10490924 SNP in the *LOC387715* gene and rs1061170 in the *CFH* gene. Consistent with previous findings in Caucasians and Chinese populations,^{32,76–78} our study showed that the exudative AMD risk is higher with the T allele of rs10490924 in *LOC387715* and the C allele of rs1061170 in the *CFH* gene. The *LOC387715* T allele frequency was 0.211 in control subjects, similar to that reported for a population of European descent.⁷⁹ In multiple studies examining linkage disequilibrium in the 10q26 region, the *HTRA1*, and *LOC387715* SNPs have been reported to be in almost complete linkage disequilibrium.^{76,78,80} *LOC387715* mRNA is detected in the human retina³⁵ and retinal pigment epithelium.^{35,81} It encodes a 12 kilodalton (kDa) protein, which localizes to the extracellular matrix,⁸² and mitochondrial outer membrane when expressed in mammalian cells.³⁵ The risk T allele of SNP rs10490924 maps to exon 1 of the hypothetical *LOC387715* gene and changes putative amino acid 69 from alanine to serine (A69S), affecting its function in mitochondria and increasing the susceptibility to ageing-associated degeneration of the macular photoreceptors.³⁵

As reviewed recently, chronic local inflammation participates in drusen formation within Bruch's membrane, and consequently in the pathophysiology of AMD.²¹ *CFH* is the gene encoding complement factor H and one of the members of the complement cascade that has a role in inflammatory processes. Laine et al. reported that the association of the *CFH* Y402H polymorphism with AMD could be due to reduced clearance of cellular debris and increased local inflammation.⁸³

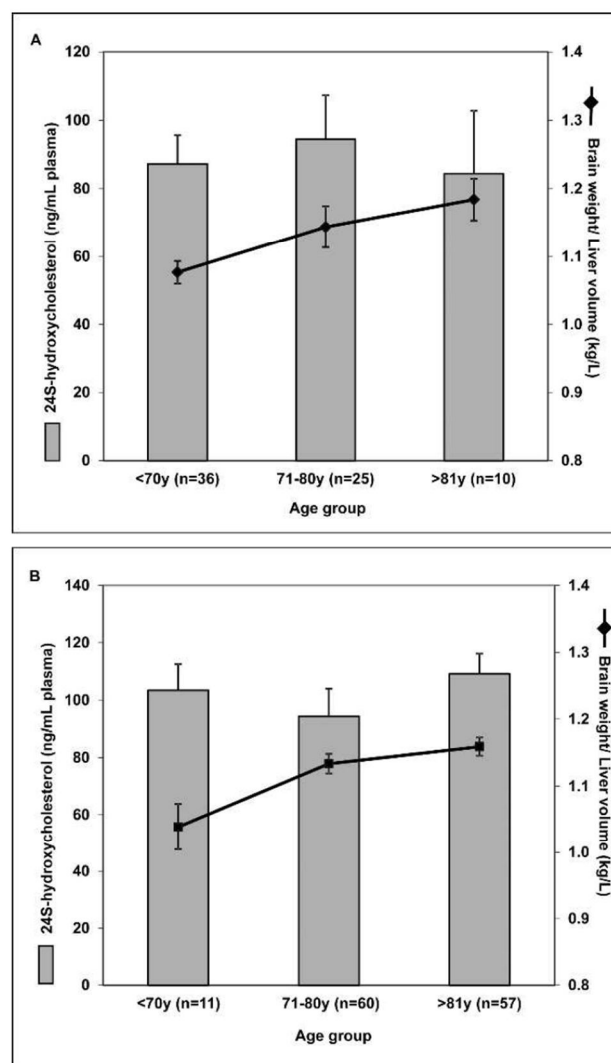
The main objective of our present study was to provide data on the *CYP46A1*-T/C polymorphism in patients with AMD. The frequency of the *CYP46A1* C allele in our control subject population (28%) was comparable with other Caucasian populations from Europe.^{50,64,67} Our finding provided evidence that the *CYP46A1* rs754203 polymorphism per se is not associated with AMD, but may be associated with AMD in cases

carrying no risk alleles in the *CFH* and *LOC387715* genes. Although the association reached statistical significance, it is difficult to draw firm conclusions due to the relatively small size of the present population. Further studies with larger populations may be needed to confirm our findings. Cholesterol-24S-hydroxylase (*CYP46A1*) is a cholesterol-metabolizing enzyme involved in the removal of cholesterol from neuronal structures.^{39–41,72,84} The TT genotype in intron 2 of *CYP46A1*, designated as the rs754203 SNP, has been identified as a risk factor for Alzheimer disease^{53,54,58,60} and, more recently, for primary open-angle glaucoma.⁶⁸ *CYP46A1* and its metabolic product 24S-hydroxycholesterol are specific for the neural retina, and especially for retinal ganglion cells.^{42,43} Since the loss of retinal ganglion cells is associated with glaucomatous retinopathy, it is, therefore, clearly understandable that we found a *CYP46A1* SNP association with glaucoma,⁶⁸ but not with AMD. Indeed, although there is neuronal degeneration in the course of AMD, it involves primarily photoreceptors and not retinal ganglion cells.

The relevance of circulating 24S-hydroxycholesterol levels has been questioned not only in neurodegenerative diseases,^{74,85} but also with oxidative stress.⁸⁶ However, the clinical value of this still is under discussion.⁸⁵ Similar to our previous data in glaucoma patients,⁶⁸ we suggest that 24S-hydroxycholesterol cannot be used as a biomarker for AMD. Interestingly, the highest levels of 24S-hydroxycholesterol were observed in patients with the C-allele in the *CYP46A1* SNP. These data somehow are consistent with the finding that the highest risk for AMD in patients not carrying a risk allele in rs1061170 SNP in the *CFH* gene and rs10490924 SNP in the *LOC387715* gene was found in patients with the C-allele in rs754203 SNP in the *CYP46A1* gene. As discussed previously, the ratio of 24S-hydroxycholesterol to cholesterol may be a better marker for the production of this oxysterol than the absolute amount.⁷² Based on this assumption, no difference was observed in plasma 24S-hydroxycholesterol between AMD and control subjects. The higher plasma cholesterol level and, as a consequence, the lower 24S-hydroxycholesterol-to-cholesterol ratio in AMD patients than in controls may be explained more likely by chance than a disease effect. Indeed, the association

TABLE 3. Plasma Cholesterol, 24S-Hydroxycholesterol and 24S-Hydroxycholesterol/Cholesterol Levels for the Genotypes in rs754203 SNP in *CYP46A1* Gene in 71 Control Subjects and 128 AMD Cases

	<i>n</i>		Plasma Cholesterol (mg/mL)			24S-Hydroxycholesterol (μg/mL)			24S-Hydroxycholesterol/Cholesterol (ng/mg)		
	Control	AMD	Control	AMD	<i>P</i> Value	Control	AMD	<i>P</i> Value	Control	AMD	<i>P</i> Value
All genotypes	71	128	0.81 ± 0.04	1.04 ± 0.04	<0.01	89.6 ± 4.9	102.0 ± 3.1	<0.01	126.3 ± 6.7	115.0 ± 5.6	0.04
Subjects using cholesterol-lowering drugs (<i>n</i> , %)	13, 18.3%	29, 22.7%									
<i>CYP46A1</i> genotypes											
CC+CT	37	65	0.78 ± 0.07	1.04 ± 0.06	0.0013	80.5 ± 4.6	103.1 ± 3.7	0.0025	125.5 ± 9.1	119.2 ± 7.8	ns
TT	34	63	0.85 ± 0.06	1.04 ± 0.06	0.031	99.2 ± 8.6	100.7 ± 5.7	ns	127.2 ± 9.9	110.4 ± 8.0	ns
			Control	AMD	All	Control	AMD	All	Control	AMD	All
Gender effect (<i>P</i> value)			0.0255	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
SNP effect (<i>P</i> value)			ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Statin effect (<i>P</i> value)			ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Gender and SNP interaction (<i>P</i> value)			0.0593	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Gender and SNP and statin interaction (<i>P</i> value)			0.0579	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns

Mean ± SEM. ns, not significant (*P* > 0.05).**FIGURE.** Plasma 24S-hydroxycholesterol levels (ng/mL) in normal subjects (A) and AMD cases (B) as a function of age. Results are expressed as means ± SEM. Estimated ratio between brain weight and liver volume is indicated.

of plasma cholesterol and AMD has not been established firmly.^{87,88} Moreover, we must point out the low levels of plasma cholesterol in our controls and AMD patients, compared to the general population. Several biases in our study may participate in this finding. First, and probably more likely, we cannot exclude a niche effect accounting for the limited number of subjects. Secondly, the advanced age of controls and AMD patients (68 and 78 years, respectively) may contribute to the low values, accounting the trend for a reduction of total cholesterol in the elderly.⁸⁹ Lifestyle is one of the more potent environmental factors that modifies plasma lipids. Controls and AMD patients, in whom plasma cholesterol was quantified, have been selected in one single ophthalmology center (Dijon, France). Therefore, the value of plasma cholesterol would not be representative of the general population, but of a restricted part of the population from a middle-size city.

AMD is a multifactorial disease in which the risk can be explained in half of the population of AMD cases by five polymorphisms in three genes: *CFH*, *LOC387715*, and *CFB*.

C2.⁹⁰ Two of these five SNPs have been analyzed in our study. Gene polymorphism in *LIPC*⁹¹ and *SCARB1*⁷³ recently have been identified as potential risk factors for AMD. Hepatic lipase and SRB1 are the products of *LIPC* and *SCARB1* genes, respectively. Hepatic lipase and SRB1 share the common property to modulate cholesterol metabolism by affecting HDL-cholesterol levels and cellular uptake of cholesterol. These two genes deserve further investigations in connection with cholesterol and AMD, independently from their effects on plasma HDL cholesterol levels. Indeed, variants in the *LIPC* gene have been associated with a greater risk for AMD.^{92,93} To our knowledge, our study is the first report providing data on the possible, although minor, involvement of the *CYP46A1* polymorphism in AMD cases who do not carry two potent SNPs. The link between the SNP and disease remains unknown. *CYP46A1* expression, and possibly activity, is susceptible to epigenetic regulation.⁹⁴ Further work is warranted to evaluate whether the SNP in rs754203 would be associated with differences in the response to epigenetic regulation.

Acknowledgments

Lucy Martine provided technical assistance in analyzing plasma 24S-hydroxycholesterol using the devices available on the analytical ChemoSens Platform (Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation, University of Burgundy, Dijon, France). Linda Northrup (English Solutions, Voiron, France) assisted with the English-language editing of the manuscript.

References

- Klein R, Chou CE, Klein BEK, et al. Prevalence of age-related macular degeneration in the US population. *Arch Ophthalmol*. 2011;129:75-80.
- Ambati J, Ambati BK, Yoo SH, Ianchulev S, Adamis AP. Age-related macular degeneration: etiology, pathogenesis, and therapeutic strategies. *Surv Ophthalmol*. 2003;48:257-293.
- Zarbin MA. Current concepts in the pathogenesis of age-related macular degeneration. *Arch Ophthalmol*. 2004;122:598-614.
- Holz FG, Pauleikhoff D, Klein R, Bird AC. Pathogenesis of lesions in late age-related macular disease. *Am J Ophthalmol*. 2004;137:504-510.
- de Jong PT. Age-related macular degeneration. *N Engl J Med*. 2006;355:1474-1485.
- Bird AC, Bressler NM, Bressler SB, et al. An international classification and grading system for age-related maculopathy and age-related macular degeneration. The International ARM Epidemiological Study Group. *Surv Ophthalmol*. 1995;39:367-374.
- Green WR, Enger C. Age-related macular degeneration histopathologic studies. The 1992 Lorenz E. Zimmerman Lecture. *Ophthalmology*. 1993;100:1519-1535.
- Curcio CA, Johnson M, Huang JD, Rudolf M. Aging, age-related macular degeneration, and the response-to-retention of apolipoprotein b-containing lipoproteins. *Progr Retin Eye Res*. 2009;28:393-422.
- Rudolf M, Clark ME, Chimento ME, et al. Prevalence and morphology of druse types in the macula and periphery of eyes with age-related maculopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2008;49:1200-1209.
- Klein R, Klein BE, Knudtson MD, et al. Fifteen-year cumulative incidence of age-related macular degeneration: the Beaver Dam Eye Study. *Ophthalmology*. 2007;114:253-262.
- Klein R, Davis MD, Magli YL, et al. The Wisconsin age-related maculopathy grading system. *Ophthalmology*. 1991;98:1128-1134.
- Klein R, Peto T, Bird A, Vannewkirk MR. The epidemiology of age-related macular degeneration. *Am J Ophthalmol*. 2004;137:486-495.
- Klaver CC, Kliffen M, van Duijn CM, et al. Genetic association of apolipoprotein E with age-related macular degeneration. *Am J Hum Genet*. 1998;63:200-206.
- Klein BE, Klein R, Lee KE, Moore EL, Danforth L. Risk of incident age-related eye diseases in people with an affected sibling: the Beaver Dam Eye Study. *Am J Epidemiol*. 2001;154:207-211.
- Seddon JM, Ajani UA, Mitchell BD. Familial aggregation of age-related maculopathy. *Am J Ophthalmol*. 1997;123:199-206.
- Smith W, Mitchell P. Family history and age-related maculopathy: the Blue Mountains Eye Study. *Aust N Z J Ophthalmol*. 1998;26:203-206.
- Hammond CJ, Webster AR, Snieder H, et al. Genetic influence on early age-related maculopathy: a twin study. *Ophthalmology*. 2002;109:730-736.
- Seddon JM, Cote J, Page WF, Aggen SH, Neale MC. The US twin study of age-related macular degeneration: relative roles of genetic and environmental influences. *Arch Ophthalmol*. 2005;123:321-327.
- Gottfredsdottir MS, Sverrisson T, Musch DC, Stefansson E. Age related macular degeneration in monozygotic twins and their spouses in Iceland. *Acta Ophthalmol Scand*. 1999;77:422-425.
- Grizzard SW, Arnett D, Haag SL. Twin study of age-related macular degeneration. *Ophthalmic Epidemiol*. 2003;10:315-322.
- Anderson DH, Radeke MJ, Gallo NB, et al. The pivotal role of the complement system in aging and age-related macular degeneration: hypothesis re-visited. *Progr Retin Eye Res*. 2010;29:95-112.
- Klein RJ, Zeiss C, Chew EY, et al. Complement factor H polymorphism in age-related macular degeneration. *Science*. 2005;308:385-389.
- Thakkeestian A, Han P, McEvoy M, et al. Systematic review and meta-analysis of the association between complement factor H Y402H polymorphisms and age-related macular degeneration. *Hum Mol Genet*. 2006;15:2784-2790.
- Gold B, Merriam JE, Zernant J, et al. Variation in factor B (BF) and complement component 2 (C2) genes is associated with age-related macular degeneration. *Nat Genet*. 2006;38:458-462.
- Maller JB, Fagerness JA, Reynolds RC, et al. Variation in complement factor 3 is associated with risk of age-related macular degeneration. *Nat Genet*. 2007;39:1200-1201.
- Yates JR, Sepp T, Matharu BK, et al. Complement C3 variant and the risk of age-related macular degeneration. *N Engl J Med*. 2007;357:553-561.
- Fisher SA, Abecasis GR, Yashar BM, et al. Meta-analysis of genome scans of age-related macular degeneration. *Hum Mol Genet*. 2005;14:2257-2264.
- Meyer K, Davis L, Schindler E, et al. Genome-wide analysis of copy number variants in age-related macular degeneration. *Hum Genet*. 2011;129:91-100.
- Jakobsdottir J, Conley YP, Weeks DE, et al. Susceptibility genes for age-related maculopathy on chromosome 10q26. *Am J Hum Genet*. 2005;77:389-407.
- Rivera A, Fisher SA, Fritsche LG, et al. Hypothetical LOC387715 is a second major susceptibility gene for age-related macular degeneration, contributing independently of complement factor H to disease risk. *Hum Mol Genet*. 2005;14:3227-3236.
- DeWan A, Bracken MB, Hoh J. Two genetic pathways for age-related macular degeneration. *Curr Opin Genet Dev*. 2007;17:228-233.

32. Yang Z, Camp NJ, Sun H, et al. A variant of the HTRA1 gene increases susceptibility to age-related macular degeneration. *Science*. 2006;314:992–993.
33. Vierkotten S, Muetter PS, Fauser S. Overexpression of HTRA1 leads to ultrastructural changes in the elastic layer of Bruch's membrane via cleavage of extracellular matrix components. *PLoS ONE*. 2011;6:e22959.
34. Jones A, Kumar S, Zhang N, et al. Increased expression of multifunctional serine protease, HTRA1, in retinal pigment epithelium induces polypoidal choroidal vasculopathy in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108:14578–14583.
35. Kanda A, Chen W, Othman M, et al. A variant of mitochondrial protein LOC387715/ARMS2, not HTRA1, is strongly associated with age-related macular degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104:16227–16232.
36. Fliesler SJ, Anderson RE. Chemistry and metabolism of lipids in the vertebrate retina. *Prog Lipid Res*. 1983;22:79–131.
37. Fliesler SJ, Bretillon L. The ins and outs of cholesterol in the vertebrate retina. *J Lipid Res*. 2010;51:3399–3413.
38. Bretillon L, Thuret G, Grégoire S, et al. Lipid and fatty acid profile of the retina, retinal pigment epithelium/choroid, and lacrimal gland, and associations with adipose tissue fatty acids in human subjects. *Exp Eye Res*. 2008;87:521–528.
39. Lütjohann D, Breuer O, Ahlborg G, et al. Cholesterol homeostasis in human brain: evidence for an age-dependent flux of 24S-hydroxycholesterol from the brain into the circulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93:9799–9804.
40. Björkhem I, Lütjohann D, Breuer O, Sakinis A, Wennmalm A. Importance of a novel oxidative mechanism for elimination of brain cholesterol. Turnover of cholesterol and 24(S)-hydroxycholesterol in rat brain as measured with $^{18}\text{O}_2$ techniques in vivo and in vitro. *J Biol Chem*. 1997;272:30178–30184.
41. Björkhem I, Lütjohann D, Diczfalussy U, et al. 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*. 1998;39:1594–1600.
42. Bretillon L, Diczfalussy U, Björkhem I, et al. Cholesterol-24S-hydroxylase (CYP46A1) is specifically expressed in neurons of the neural retina. *Curr Eye Res*. 2007;32:361–366.
43. Ramirez DM, Andersson S, Russell DW. Neuronal expression and subcellular localization of cholesterol 24-hydroxylase in the mouse brain. *J Comp Neurol*. 2008;507:1676–1693.
44. Björkhem I. Crossing the barrier: oxysterols as cholesterol transporters and metabolic modulators in the brain. *J Intern Med*. 2006;260:493–508.
45. Mast N, Reem R, Bederman I, et al. Cholestenic 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*. 2011;52:594–603.
46. Rodriguez IR, Larrayoz IM. Cholesterol oxidation in the retina: implications of 7KCh formation in chronic inflammation and age-related macular degeneration. *J Lipid Res*. 2010;51:2847–2862.
47. Hudry E, Van Dam D, Kulik W, et al. Adeno-associated virus gene therapy with cholesterol 24-hydroxylase reduces the amyloid pathology before or after the onset of amyloid plaques in mouse models of Alzheimer's disease. *Mol Ther*. 2010;18:44–53.
48. Halford RW, Russell DW. Reduction of cholesterol synthesis in the mouse brain does not affect amyloid formation in Alzheimer's disease, but does extend lifespan. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106:3502–3506.
49. Borroni B, Archetti S, Agosti C, et al. Intronic CYP46 polymorphism along with ApoE genotype in sporadic Alzheimer disease: from risk factors to disease modulators. *Neurobiol Aging*. 2004;25:747–751.
50. Combarros O, Infante J, Llorca J, Berciano J. Genetic association of CYP46 and risk for Alzheimer's Disease. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 2004;18:257–260.
51. Johansson A, Katzov H, Zetterberg H, et al. Variants of CYP46A1 may interact with age and APOE to influence CSF Abeta42 levels in Alzheimer's disease. *Hum Genet*. 2004;114:581–587.
52. Kolsch H, Lütjohann D, Ludwig M, et al. Polymorphism in the cholesterol 24S-hydroxylase gene is associated with Alzheimer's disease. *Mol Psychiatry*. 2002;7:899–902.
53. Papassotiropoulos A, Streffer JR, Tsolaki M, et al. Increased brain beta-amyloid load, phosphorylated tau, and risk of Alzheimer disease associated with an intronic CYP46 polymorphism. *Arch Neurol*. 2003;60:29–35.
54. Wang B, Zhang C, Zheng W, et al. Association between a T/C polymorphism in intron 2 of cholesterol 24S-hydroxylase gene and Alzheimer's disease in Chinese. *Neurosci Lett*. 2004;369:104–107.
55. Helisalmi S, Vepsäläinen S, Koivisto AM, et al. Association of CYP46 intron 2 polymorphism in Finnish Alzheimer's disease samples and a global scale summary. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2006;77:421–422.
56. Ma SL, Tang NL, Lam LC, Chiu HF. Polymorphisms of the cholesterol 24-hydroxylase (CYP46A1) gene and the risk of Alzheimer's disease in a Chinese population. *Int Psychogeriatr*. 2006;18:37–45.
57. Fernández Del Pozo V, Alvarez Alvarez M, Fernández Martínez M, et al. Polymorphism in the cholesterol 24S-hydroxylase gene (CYP46A1) associated with the APOE epsilon3 allele increases the risk of Alzheimer's disease and of mild cognitive impairment progressing to Alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 2006;21:81–87.
58. Li Y, Chu LW, Chen YQ, et al. Intron 2 (T/C) CYP46 polymorphism is associated with Alzheimer's disease in Chinese patients. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 2006;22:399–404.
59. Papassotiropoulos A, Wollmer MA, Tsolaki M, et al. A cluster of cholesterol-related genes confers susceptibility for Alzheimer's disease. *J Clin Psychiatry*. 2005;66:940–947.
60. Fu BY, Ma SL, Tang NL, et al. 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*. 2009;24:921–926.
61. Vega GL, Weiner M, Kolsch H, et al. The effects of gender and CYP46 and apoE polymorphism on 24S-hydroxycholesterol levels in Alzheimer's patients treated with statins. *Curr Alzheimer Res*. 2004;1:71–77.
62. Tedde A, Rotondi M, Cellini E, et al. Lack of association between the CYP46 gene polymorphism and Italian late-onset sporadic Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 2006;27:773.e771–773.e773.
63. Ingelsson M, Jesneck J, Irizarry MC, Hyman BT, Rebeck GW. Lack of association of the cholesterol 24-hydroxylase (CYP46) intron 2 polymorphism with Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*. 2004;367:228–231.
64. Kabbara A, Payet N, Cotel D, et al. Exclusion of CYP46 and APOE as candidate genes for Alzheimer's disease in a French population. *Neurosci Lett*. 2004;363:139–143.
65. Chalmers KA, Culpán D, Kehoe PG, et al. APOE promoter, ACE1 and CYP46 polymorphisms and beta-amyloid in Alzheimer's disease. *Neuroreport*. 2004;15:95–98.
66. Desai P, DeKosky ST, Kamboh MI. Genetic variation in the cholesterol 24-hydroxylase (CYP46) gene and the risk of Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*. 2002;328:9–12.
67. Juhasz A, Rimanoczy A, Boda K, et al. CYP46 T/C polymorphism is not associated with Alzheimer's dementia in a population from Hungary. *Neurochem Res*. 2005;30:943–948.
68. Fourgeux C, Martine L, Björkhem I, et al. Primary open-angle glaucoma: association with cholesterol 24S-hydroxylase (CYP46A1) gene polymorphism and plasma 24-hydroxycholesterol levels. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2009;50:5712–5717.

69. Dekaban AS. Changes in brain weights during the span of human life: relation of brain weights to body heights and body weights. *Ann Neurol.* 1978;4:345-356.
70. Urata K, Kawasaki S, Matsunami H, et al. Calculation of child and adult standard liver volume for liver transplantation. *Hepatology.* 1995;21:1317-1321.
71. Wynne HA, Cope LH, Mutch E, et al. The effect of age upon liver volume and apparent liver blood flow in healthy man. *Hepatology.* 1989;9:297-301.
72. Bretillon L, Lütjohann D, Stahle L, et al. Plasma levels of 24S-hydroxycholesterol reflect the balance between cerebral production and hepatic metabolism and are inversely related to body surface. *J Lipid Res.* 2000;41:840-845.
73. Zerbib J, Seddon JM, Richard F, et al. rs5888 variant of SCARB1 gene is a possible susceptibility factor for age-related macular degeneration. *PLoS One.* 2009;4:e7341.
74. Bretillon L, Sidén A, Wahlund LO, et al. Plasma levels of 24S-hydroxycholesterol in patients with neurological diseases. *Neurosci Lett.* 2000;293:87-90.
75. Haddad S, Chen CA, Santangelo SL, Seddon JM. The genetics of age-related macular degeneration: a review of progress to date. *Surv Ophthalmol.* 2006;51:316-363.
76. Dewan A, Liu M, Hartman S, et al. HTRA1 promoter polymorphism in wet age-related macular degeneration. *Science.* 2006;314:989-992.
77. Weger M, Renner W, Steinbrugger I, et al. Association of the HTRA1 -625G>A promoter gene polymorphism with exudative age-related macular degeneration in a Central European population. *Mol Vis.* 2007;13:1274-1279.
78. Xu Y, Guan N, Xu J, et al. Association of CFH, LOC387715, and HTRA1 polymorphisms with exudative age-related macular degeneration in a northern Chinese population. *Mol Vis.* 2008;14:1373-1381.
79. Hughes AE, Orr N, Patterson C, et al. Neovascular age-related macular degeneration risk based on CFH, LOC387715/HTRA1, and smoking. *PLoS Med.* 2007;4:e355.
80. Kaur I, Katta S, Hussain A, et al. Variants in the 10q26 gene cluster (LOC387715 and HTRA1) exhibit enhanced risk of age-related macular degeneration along with CFH in Indian patients. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2008;49:1771-1776.
81. Wang G, Scott WK, Whitehead P, et al. A novel ARMS2 splice variant is identified in human retina. *Exp Eye Res.* 2012;94:187-191.
82. Kortvely E, Hauck SM, Duetsch G, et al. ARMS2 is a constituent of the extracellular matrix providing a link between familial and sporadic age-related macular degenerations. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2010;51:79-88.
83. Laine M, Jarva H, Seitsonen S, et al. Y402H polymorphism of complement factor H affects binding affinity to C-reactive protein. *J Immunol.* 2007;178:3831-3836.
84. Fourgeux C, Bron A, Acar N, Creuzot-Garcher C, Bretillon L. 24S-hydroxycholesterol and cholesterol-24S-hydroxylase (CYP46A1) in the retina: from cholesterol homeostasis to pathophysiology of glaucoma. *Chem Phys Lipids.* 2011;164:496-499.
85. Leoni V. Oxysterols as markers of neurological disease—a review. *Scand J Clin Lab Invest.* 2009;69:22-25.
86. Seet RCS, Lee CY, Loke WM, et al. Biomarkers of oxidative damage in cigarette smokers: which biomarkers might reflect acute versus chronic oxidative stress? *Free Radic Biol Med.* 2011;50:1787-1793.
87. Dashti N, McGwin G, Owsley C, Curcio CA. Plasma apolipoproteins and risk for age related maculopathy. *Br J Ophthalmol.* 2006;90:1028-1033.
88. Smith W, Assink J, Klein R, et al. Risk factors for age-related macular degeneration: pooled findings from three continents. *Ophthalmology.* 2001;108:697-704.
89. Carroll MD, Lacher DA, Sorlie PD, et al. Trends in serum lipids and lipoproteins of adults, 1960-2002. *JAMA.* 2005;294:1773-1781.
90. Maller J, George S, Purcell S, et al. Common variation in three genes, including a noncoding variant in CFH, strongly influences risk of age-related macular degeneration. *Nat Genet.* 2006;38:1055-1059.
91. Neale BM, Fagerness J, Reynolds R, et al. Genome-wide association study of advanced age-related macular degeneration identifies a role of the hepatic lipase gene (LIPC). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107:7395-7400.
92. Reynolds R, Rosner B, Seddon JM. Serum lipid biomarkers and hepatic lipase gene associations with age-related macular degeneration. *Ophthalmology.* 2010;117:1989-1995.
93. Seddon JM, Reynolds R, Rosner B. Associations of smoking, body mass index, dietary lutein, and the LIPC gene variant rs10468017 with advanced age-related macular degeneration. *Mol Vis.* 2010;16:2412-2424.
94. Shafaati M, O'Driscoll R, Björkhem I, Meaney S. Transcriptional regulation of cholesterol 24-hydroxylase by histone deacetylase inhibitors. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009;378:689-694.

C. Conséquences d'un stress rétinien associé au glaucome sur l'expression de CYP46A1 et les teneurs en 24S-hydroxycholestérol dans la rétine

Fourgeux, C., et al., *Steady-state levels of retinal 24S-hydroxycholesterol are maintained by glial cells intervention after elevation of intraocular pressure in the rat.* Acta Ophthalmol. 2012 Sep 23. doi: 10.1111/j.1755-3768.2012.02490.x. [Epub ahead of print].

N.B. : Les figures mentionnées dans le texte font référence à celles qui sont parues dans l'article.

Le cholestérol est faiblement synthétisé par les cellules de la rétine, ce qui implique nécessairement que des voies extra-rétiniennes participent activement à suppléer la rétine en cholestérol. Localement, les cellules gliales de Müller (CGM) contribueraient à l'apport de cholestérol aux neurones de la rétine, en particulier pour la formation des synapses. Les conséquences délétères d'une accumulation ou à l'inverse d'un déficit en cholestérol sur la survie neuronale soulignent l'importance de maintenir l'homéostasie du cholestérol dans la rétine. Comme nous l'avons vu dans l'introduction de ce manuscrit de thèse, la rétine neurale a en particulier la capacité d'éliminer le cholestérol après conversion en 24S-OH via la cholestérol 24S-hydroxylase (CYP46A1). CYP46A1 est exprimée dans la rétine neurale, et plus particulièrement dans les des cellules ganglionnaires de la rétine (CGR). Le rôle de CYP46A1 dans la rétine reste pour l'instant inconnu. Des liens ont été établis entre CYP46A1, 24S-hydroxycholestérol (24S-OH) et processus neurodégénératifs, suggérant un rôle potentiel dans certaines pathologies comme la maladie d'Alzheimer. Par analogie avec le cerveau, nous pouvons supposer une fonction de CYP46A1 dans le contrôle de l'homéostasie du cholestérol dans les neurones et envisager une association avec des pathologies dégénératives de la rétine comme le glaucome.

Dans ce contexte, l'objectif de ce travail a consisté à évaluer le rôle de CYP46A1 dans la rétine, *in vivo*, après avoir induit un stress en mimant, chez le rat, une caractéristique principale du glaucome qui est l'induction d'une pression intra-oculaire (PIO) élevée. Suite à ce stress induit expérimentalement, la perte de CGR conduit *a fortiori* à la perte d'expression de CYP46A1 par les CGR. Comment l'expression de CYP46A1 peut-elle alors être maintenue pour préserver l'homéostasie du cholestérol dans la rétine? Dans ce contexte, le rôle des cellules gliales, notamment des CGM, a été conforté dans cette étude.

Méthode

Afin d'induire une PIO élevée, des rats Sprague-Dawley ont été soumis à la photocoagulation laser (532nm) des veines épisclérales, du limbe et du trabéculum de l'œil droit. L'œil gauche est l'œil controlatéral. Les rats ont ensuite été euthanasiés à J3, J14, J30 et J60 ($n=10$ par groupe de temps). Un groupe témoin J0 ($n=10$) a été inclus. Pour la répartition des rétines, un nombre d'animaux a été attribué selon l'analyse effectuée, et cela pour chaque groupe de temps et pour chacun des deux yeux (expérimentaux et controlatéraux). Le 24S-OH a été mesuré dans le plasma ($n=10$) et la rétine ($n=3$) par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS) à l'aide d'un standard interne de 24S-OH deutéré. Les taux circulants ($n=10$) de cytokines (IL-1 β , IL6, TNF- α), de chimiokines (MCP-1, ICAM-1) et du facteur endothélial de croissance (VEGF) ont été mesurés par Luminex® à l'aide d'un kit multiplexe permettant de rechercher 6 biomolécules différentes dans le même puits d'une microplaque de 96 (Procarta® Cytokine Assay Kit, Affymetrix). Les expressions de CYP46A1 et de la protéine gliale fibrillaire (GFAP) ont été quantifiées dans la rétine par western-blot (WB) en utilisant la β -actine comme témoin de charge et facteur de normalisation ($n=4$). Le signal a été obtenu par chemiluminescence (ECL), l'analyse a été effectuée par densitométrie (ChemDoc XRS+ System de BioRad®) et la quantification du signal a été faite avec le logiciel ImageLab (BioRad®). L'expression de la GFAP a aussi été évaluée par immunohistochimie (IHC) sur des coupes de rétines de 10 μ m d'épaisseur (marquages sur lames) observées par microscopie à fluorescence pour établir l'activation gliale ($n=3$).

Le test non-paramétrique de Mann-Whitney a été utilisé pour comparer la PIO entre les deux yeux des groupes interventionnels. Le test non-paramétrique de Kruskal-Wallis a été utilisé pour comparer la GFAP, CYP46A1 et le 24S-OH de tous les groupes (expérimental, controlatéral, et témoin). La relation entre chaque mesure (GFAP, CYP46A1 et 24S-OH) et chacune des variables explicatives a été modélisée à l'aide d'une GEE (équation d'estimation généralisée) pour tenir compte de la corrélation des données. Un estimateur de robustesse de variances a été utilisé. Les sites des variables explicatives (œil gauche et œil droit) et les groupes (interventionnel/non-interventionnel) ont été codées 0/1. Le temps a été considéré comme étant continu. Toutes les analyses ont été faites avec le logiciel STATA version 12.0. La significativité statistique a été établie à $p < 0.05$ et les tests étaient bilatéraux (*two-tailed*).

Résultats

L'élévation de PIO est significativement maintenue dans l'œil expérimental dès le premier jour du traitement et la pression atteint son maximum à J3 avec 35.8 ± 0.4 mmHg. Les

valeurs restent significatives ($p < 0,001$) dans les yeux traités jusqu'à J21, puis les niveaux déclinent pour revenir à des valeurs basales ($8.8 \pm 0.6 \text{ mmHg}$) (**Figure 1**).

Les teneurs en 24S-hydroxycholestérol (24S-OH) rétinien et plasmatiques ont été quantifiées. Dans le plasma, la concentration en 24S-OH s'élève de façon significative comparé aux témoins (J0) : 30% d'augmentation à J3 ($p = 0,0179$), elle atteint un pic à J60 : 66% ($p = 0,0018$), puis le 24S-OH revient à son niveau basal (**Figure 2A**). La quantification du 24S-OH rétinien montre que bien qu'il y ait une légère augmentation dans les niveaux retrouvés dans les rétines expérimentales à partir de J14 (jusqu'à J60) comparée aux rétines témoins cette différence n'est pas significative (**Figure 2B**). Le 24S-OH retrouvé dans l'œil controlatéral semble suivre le profil de l'œil expérimental mais à un niveau moindre.

L'expression de CYP46A1 et GFAP a été évaluée de manière semi-quantitative par western-blotting. Pour chacun des deux anticorps primaires, aux dilutions respectives utilisées, il a préalablement été vérifié que l'intensité du signal obtenu était bien linéaire en fonction de la quantité de protéines déposée selon une gamme allant de cinq à trente microgrammes de protéines totales de lysats rétiens. Nous avons obtenu un R^2 de 0.93 pour CYP46A1 et de 0.98 pour la GFAP, ce qui était acceptable.

Les résultats montrent à J3 une augmentation de l'expression de CYP46A1 dans les rétines des yeux traités par rapport aux niveaux de base (J0). La différence est significative à J3 ($p = 0.05$, test de Kruskal-Wallis). Il y a une augmentation (non significative) de CYP46A1 dans les rétines controlatérales, suggérant une induction bilatérale, qui reste tout de même moins prononcée que dans les rétines des yeux expérimentaux. Les niveaux d'expression chutent à J14 dans les rétines expérimentales puis remontent progressivement jusqu'à J60 (**Figures 3A et B**). Ces données d'expression de CYP46A1 (**Figures 3A et B**) apparaissent discordantes avec les taux de 24S-OH présents dans la rétine (**Figure 2B**). En effet, les taux de 24S-OH dans la rétine les plus faibles sont atteints alors que l'expression de l'enzyme est la plus forte, soit à J3.

Dans notre étude, la GFAP est surexprimée dans les rétines des yeux expérimentaux comparativement aux rétines controlatérales à J3, J14, J30 et J60 (**Figures 3A et C**). L'augmentation de la GFAP est significative à J14 ($p < 0,05$) et J60 ($p < 0,01$) dans les yeux expérimentaux comparativement aux taux de GFAP des rétines témoins (J0). La différence expérimental/controlatéral est plus marquée à J14 et à J60. Cette différence est significative à J60 ($p < 0.05$). De façon intéressante, bien qu'ils ne soient pas significatifs, les niveaux d'expression de la GFAP sont augmentés dans les rétines des yeux controlatéraux à J3, J14, J30, et J60 comparé aux témoins ce qui démontre une activation gliale bilatérale (**Figure 3C**).

Ces données sur l'activation bilatérale suggèrent que des facteurs circulants ont permis cette activation, ce que nous verrons plus loin dans l'analyse des cytokines circulantes par multiplexes.

Les marquages anti-GFAP réalisés par IHC montrent qu'il n'y a pas de marquage GFAP chez les témoins (J0). La mise en place d'une activation gliale bilatérale dans les yeux expérimentaux commence dès J3 (**Figure 4**). L'intensité du marquage est à son maximum entre J14 et J30 (non montré). Sur les yeux expérimentaux, le marquage s'étend sur la partie la plus interne de la rétine : au niveau de la couche cellulaire des cellules ganglionnaires et jusqu'aux corps cellulaires des cellules bipolaires (**Figure 4B**). Par contre, sur les yeux controlatéraux, le marquage est uniquement localisé au niveau de la couche des cellules ganglionnaires (**Figure 4C**).

La recherche de facteurs circulants susceptibles d'être à l'origine de l'activation bilatérale de CYP46A1 et de la glie a été analysée par Luminex®. La **figure 5A** montre que MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein-1*) se démarque significativement des autres biomolécules par une élévation de ses teneurs à J3 (+32% ; $p < 0,001$) comparé aux niveaux physiologiques (J0). Les niveaux de MCP-1 chutent ensuite significativement dès J14 ($p < 0,001$). Les taux des cytokines IL-1 β , TNF- α et du VEGF ne montrent pas de fluctuations probantes si ce n'est leur diminution à J3. IL-6 diminue également mais plus tardivement, à J14. Les teneurs d'ICAM-1 (*intracellular adhesion molecule-1*) montrent une augmentation de 33% à J3 ($p < 0,05$) comparé aux témoins (**Figure 5B**).

Discussion

Le contrôle de l'homéostasie du cholestérol a une importance particulière dans le fonctionnement de la rétine [395]. Dans ce contexte, l'enzyme CYP46A1, en convertissant le cholestérol en 24S-OH, a une utilité fonctionnelle et stratégique dans l'élimination du cholestérol cérébral et rétinien [18, 330]. Dans notre étude, l'augmentation de PIO à J3 est accompagnée par l'induction de l'expression de CYP46A1 dans la rétine, et par l'augmentation plasmatique de 24S-OH, MCP-1 et ICAM-1. La protéine gliale fibrillaire (GFAP) est une protéine intra-cytoplasmique des neurofilaments intermédiaires. Elle est exprimée de façon précoce et croissante lorsque la gliose se met en place et protégerait les neurones. Dans notre étude, les marquages anti-GFAP montrent qu'à J3, la glie est modestement activée. En effet, c'est à J14 que les niveaux d'expression sont les plus forts et que les données sont significatives.

Des travaux ont montré que les teneurs plasmatiques en MCP-1 et ICAM-1 proviennent de la sécrétion des cellules du réseau trabéculaire [396] et des cellules endothéliales [397]. Ceci se confirme dans notre modèle de photocoagulation laser, où ces cellules ont été lésées. Le MCP-1 circulant a été récemment décrit comme une chimiokine recrutée par les macrophages. Il a été montré que MCP-1 était aussi sécrété dans les yeux controlatéraux dans un modèle d'ischémie induite chez le rat [398]. MCP-1 serait plus particulièrement relarguée au niveau de la région du pied des CGM dans un modèle de dégénérescence des photorécepteurs induit par la lumière [399]. De façon intéressante, dans notre étude, et même si nous n'avons pas obtenu de résultats significatifs entre les groupes, la réactivité gliale a été détectée dans les yeux controlatéraux. Ceci pourrait être dû au MCP-1 circulant, qui pourrait activer les astrocytes et les pieds des CGM qui se trouvent à proximité des vaisseaux rétiens de la rétine. Cette hypothèse est renforcée par nos résultats de marquages GFAP en IHC montrant que l'intensité du signal dans l'œil controlatéral est modérée et restreinte au niveau de la couche des CGR, c'est-à-dire la couche la plus interne de la rétine, là où sont situés les vaisseaux sanguins de la rétine. Au contraire, dans la rétine de l'œil expérimental, le marquage s'étend depuis la couche des CGR jusqu'aux cellules bipolaires. Ce profil d'expression est caractéristique d'une souffrance cellulaire locale : les cellules de Müller seraient activées par les CGR adjacentes qui ont souffert de l'hypertonie oculaire. Ce profil d'expression a été précédemment retrouvé dans une étude de notre laboratoire qui avait montré, dans des conditions analogues une perte de 70% des CGR après 12 semaines [400].

Dans cet environnement cellulaire, l'activation des cellules microgliales peut conduire ces cellules ramifiées en temps normal à se différencier en cellules améboïdes. Les cellules microgliales améboïdes sont connues pour être les cellules immunes de la rétine puisqu'elles descendent d'une lignée hématopoïétique, comme les macrophages [401].

ICAM-1 est une molécule sécrétée par les cellules endothéliales qui permet la transmigration des macrophages, recrutés par MCP-1, à travers les tissus. MCP-1 serait-il le facteur circulant qui serait à l'origine de l'activation de la glie dans l'œil expérimental? Les macrophages provenant de la circulation systémique pourraient également infiltrer les tissus oculaires et participer à cette activation gliale. Pour conforter cette hypothèse, une étude en multiplexes sur des larmes de patients glaucomateux a montré des niveaux élevés de MCP-1 [402].

Les cellules microgliales et les macrophages peuvent aussi avoir été activés en réponse à l'ischémie induite par l'élévation de PIO et peuvent sécréter MCP-1 comme cela a été rapporté dans des modèles ischémiques [397, 403]. Cependant, compte-tenu de la taille

réduite de la rétine, nous supposons que le MCP-1 se trouvant localement dans la rétine ne peut pas participer significativement aux teneurs retrouvées dans la circulation. Nous pouvons établir une conclusion similaire concernant le 24S-OH retrouvé dans le plasma et la rétine. En effet, l'augmentation des teneurs en 24S-OH à J14 suggère qu'un mécanisme de compensation a pu se mettre en place pour suppléer à la perte de 24S-OH de la rétine (**Figures 2A et B**). Le délai entre l'expression importante de CYP46A1 à J3 et l'augmentation des teneurs en 24S-OH (J14) dans la rétine est cohérent avec d'une part l'activité de CYP46A1 qui est relativement faible (0.01% du pool de cholestérol par heure) et la demi-vie du 24S-OH qui, par analogie avec le cholestérol, est proche de 18 jours dans la rétine [395]. Cependant, nous assumons, dans notre étude, que la surexpression de CYP46A1 (d'un facteur 2,5 comparé au témoin ; **figure 3A**), en réponse aux valeurs élevées de PIO à J3 ne puisse pas être suffisante pour augmenter de 30% la concentration plasmatique de 24S-OH (**Figure 2A**).

Le foie et le cerveau en particulier sont majoritairement à l'origine des concentrations circulantes de 24S-OH [226, 289]. Ces organes sont les meilleurs indicateurs des niveaux plasmatiques de 24S-OH, nous l'avons montré dans nos données sur le glaucome issues de l'**article 1**. Ni le glaucome, ni la sévérité de la rétinopathie, n'étaient associés aux fluctuations du 24S-OH plasmatique. L'augmentation des teneurs plasmatiques en 24S-OH (**Figure 2A**) nous amène à l'hypothèse suivante. Sachant que la capacité du cerveau à synthétiser le 24S-OH est bien supérieure à celle de la rétine, on peut supposer que les variations de 24S-OH circulant soient le reflet de modifications de l'expression et/ou de l'activité de CYP46A1 dans le cerveau, bien plus que dans la rétine. En effet, à l'instar des cellules gliales de la rétine, on peut supposer que les cellules gliales du cerveau (astrocytes) ont été activées par des facteurs circulants comme MCP-1 et ICAM-1. Il a été rapporté que, en conditions de pathologie neurodégénérative, les cellules gliales du cerveau expriment CYP46A1 [22]. Dans notre expérience, on peut suggérer que le flux de 24S-OH provenant du cerveau a été augmenté, ce qui expliquerait que les fluctuations de 24S-OH plasmatiques soient alors détectables. Nous suggérons que le MCP-1 circulant, qui a été produit suite à la photocoagulation laser des structures oculaires, a activé les cellules gliales qui ont alors sur-exprimé CYP46A1 et sécrété le 24S-OH.

Cet aspect de l'expression de CYP46A1 par les cellules gliales (microgliales et astrocytes) a déjà été rapporté dans des études sur le cerveau en réponse à un stress, et dans la maladie d'Alzheimer [22, 333, 404]. Un mécanisme similaire pourrait expliquer l'activation gliale de la rétine controlatérale [405]. Il a été montré, *in vitro*, que le stade régénératif des CGR corrèle avec l'activation des astrocytes de la rétine et des CGM [406]. Le 24S-OH

pourrait être l'un des facteurs qui concourt à cette activation. L'induction de CYP46A1 à J3 est cohérente avec la genèse du stress oxydatif en réponse à l'élévation de la PIO durant les trois premiers jours après la photo-coagulation laser. En effet, le stress oxydatif est un élément puissant qui augmente l'expression des ARNm de CYP46A1 [335] et il est aussi lié au glaucome [407]. Des données *in vitro* ont montré que le 24S-OH augmente les dépôts de peptides d'amyloïde β dans les neurones, et potentialise les effets apoptotiques de l'amyloïde β [339]. De plus, il a été montré que la surexpression de CYP46A1 dans les astrocytes réduit leur utilisation du glutamate en dissociant EAAT2 (transporteur du glutamate exprimé à la surface des cellules gliales) des rafts lipidiques [334], ce qui amplifie l'excitotoxicité du glutamate.

Un des points forts de notre étude est que nous avons montré, *in vivo*, que l'induction de CYP46A1 est seulement transitoire, et qu'elle retourne à des niveaux physiologiques quelques jours après. Par conséquent, nous signalons que la résolution de la surexpression CYP46A1 pourrait contrer les effets adverses du 24S-OH.

L'induction d'expression de CYP46A1 dans la rétine peut être considérée comme un mécanisme de neuroprotection. Le 24S-OH pourrait être un partenaire dans les interactions entre la glie et les neurones. Le 24S-OH pourrait se lier à LXR via les cellules gliales et activer les gènes cibles de LXR, tels que *abca1* et *abcg1*.

Notre étude a permis de mettre en évidence que la perte des cellules ganglionnaires de la rétine associée à l'hypertonie oculaire ne se traduit pas par un appauvrissement de la rétine en CYP46A1 et en 24S-OH, comme on aurait pu s'y attendre du fait de l'expression importante de CYP46A1 dans ces cellules et des teneurs importantes en 24S-OH dans la rétine neurale. Au contraire, une surexpression de CYP46A1 est observée, probablement en raison de l'activation gliale qui permettrait de suppléer la perte en cellules ganglionnaires. Ce mécanisme palliatif semble lié à la synthèse de facteurs trophiques comme ICAM-1 et MCP-1 qui participeraient à activer les cellules gliales de la rétine.

Dans cette étude *in vivo* faite chez le rat, après avoir reproduit une caractéristique principale du glaucome par l'augmentation de la PIO, nous avons suggéré le rôle crucial de la glie dans le maintien de l'expression de CYP46A1 au cours de la neurodégénérescence de la rétine. Cette approche expérimentale nous a permis de suggérer qu'il existe un lien entre le stress des cellules de la rétine et le 24S-OH.

Steady-state levels of retinal 24S-hydroxycholesterol are maintained by glial cells intervention after elevation of intraocular pressure in the rat

Cynthia Fourgeux,^{1,2,3} Lucy Martine,^{1,2,3} Bruno Pasquis,^{1,2,3} Marie-Annick Maire,^{1,2,3} Niyazi Acar,^{1,2,3} Catherine Creuzot-Garcher,^{1,2,3,4} Alain Bron^{1,2,3,4} and Lionel Bretillon^{1,2,3}

¹INRA, UMR1324 CSGA, Eye and Nutrition Research Group, Dijon, France

²CNRS, UMR6265 CSGA, Eye and Nutrition Research Group, Dijon, France

³Université de Bourgogne, CSGA, Eye and Nutrition Research Group, Dijon, France

⁴University Hospital, Department of Ophthalmology, Dijon, France

ABSTRACT.

Purpose: Our previous studies suggested that CYP46A1 and 24S-hydroxycholesterol (24SOH) may be associated with glaucoma. Loss of CYP46A1-expressing retinal ganglion cells is involved in the activation of glia, and therefore possibly in the disbalance of cholesterol. In this context, the purpose of our present work was to emphasize the glial and longitudinal CYP46A1 expression after an interventional glaucoma-related stress triggered by elevated intraocular pressure (IOP).

Methods: Sprague-Dawley rats were submitted to laser photocoagulation of the trabecular meshwork, limbus and episcleral veins in one eye to induce elevated IOP. Rats were euthanized at days 3, 14, 30 and 60 ($n = 10$ per time-point), and 24SOH was measured in plasma and retina by gas chromatography-mass spectrometry. CYP46A1 was quantified by Western blotting. Glial activation was assessed by glial fibrillary acidic protein immunoreactivity in Western blots and retinal cryosections.

Results: Sustained high IOP was observed in experimental eyes from day 1 to day 21. Plasma MCP-1 and ICAM-1, quantified using multiplex assay kits, were increased at day 3. Glial activation was observed bilaterally at all time-points, at lower levels in contralateral eyes than in experimental eyes. In experimental retinas, CYP46A1 expression showed a transient increase at day 3 and then returned to baseline. Plasma and retinal 24SOH peaked at day 14 and 30, respectively.

Conclusions: These data show that CYP46A1 expression was induced early in response to retinal stress but remained constant at late time-points, reinforcing the constitutive role of CYP46A1 in maintaining cholesterol balance in neuronal tissues.

Key words: cholesterol homeostasis – glaucoma – gliosis – Müller cells

Acta Ophthalmol.

© 2012 The Authors

Acta Ophthalmologica © 2012 Acta Ophthalmologica Scandinavica Foundation

doi: 10.1111/j.1755-3768.2012.02490.x

Introduction

Cholesterol 24S-hydroxylase, also known as CYP46A1, is an enzyme that was initially described as participating in cholesterol metabolism in the brain (Lutjohann et al. 1996; Björkhem et al. 1998; Björkhem & Meaney 2004). CYP46A1 belongs to the cytochrome P450 family of monooxygenases (Pikuleva 2006) and is a microsomal enzyme (Lund et al. 1999) that converts cholesterol into 24S-hydroxycholesterol (24SOH). The additional hydroxyl group at position 24S, compared to cholesterol, confers to this metabolite the property of being more easily eliminated through the blood-brain barrier than cholesterol (Björkhem 2006). CYP46A1 was also found to be expressed in other neural tissues than the brain, especially in neurons of the retina, including retinal ganglion cells (RGCs) (Bretillon et al. 2007; Ramirez et al. 2008). The loss of RGCs is a common feature of glaucomas (Quigley 2011). Glaucomas are the second leading cause of blindness worldwide, whose prevalence increases sharply after the age of 40 years

(Quigley & Broman 2006). Glaucoma includes several pathologic presentations, such as primary open-angle glaucoma, exfoliative glaucoma and normal-tension glaucoma, which are all related to neurodegenerative diseases (Guo et al. 2010). Elevated intraocular pressure (IOP) is the best-documented risk factor for glaucoma (Kwon et al. 2009). Gene involvement has also contributed to the pathogenesis of glaucoma over the past few decades. Among them, we found that one single-nucleotide polymorphism in the *CYP46A1* gene (rs754203) was a risk factor for POAG (Fourgeux et al. 2009). Potential involvement of *CYP46A1* and 24SOH in the physiopathology of glaucoma has recently been suggested (Fourgeux et al. 2011). Expression of *CYP46A1* was observed in glial cells (Bogdanovic et al. 2001) and astrocytes (Brown et al. 2004) in the brain of Alzheimer's patients and under traumatic conditions of brain injury (Cartagena et al. 2008; Smiljanic et al. 2010). It has been postulated that such glial activation of *CYP46A1* may contribute to the maintenance of cholesterol homeostasis in nervous tissues. Müller cells are the major macroglial cells in the retina. The reactivity of Müller cells is associated with the expression of the intermediate filament protein, glial fibrillary acidic protein (GFAP), which is reported in experimental conditions of elevated IOP (Woldemussie et al. 2004). Neuron–glia interactions, which were pioneered by Hernandez at the optic nerve head level (Burgoyne 2011), are important not only for the cholesterol supply to neurons, but also in neurodegeneration by restoring tissue homeostasis (Pioggia 2009). Within the context of neurodegeneration of RGCs and glial activation in glaucoma, the role and importance of *CYP46A1* remain unknown. The aim of this study was to evaluate the changes triggered by elevated IOP on *CYP46A1* expression, 24S-hydroxycholesterol levels and glial reactivity in the rat retina.

Materials and Methods

All animals used in this experiment were handled according to the regulations of the Institutional Animal Care Committee (University of Burgundy, Dijon, France), and all procedures

adhered to the tenets of the statements of the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) for the use of Animals in Ophthalmic and Vision Research.

Induction of elevated intraocular pressure

In this experiment, 50 Sprague–Dawley rats were delivered by Janvier breedings (Le Genest Saint Isle, France). The animals were maintained under specific pathogen-free temperature ($22 \pm 1^\circ\text{C}$), hygrometry (55–60%) and light (50 lux-light on from 07:00 AM to 07:00 PM) conditions. At day 0, the animals were anesthetized by an intramuscular injection of ketamine (70 mg/kg body weight, Imalgene1000; Merial, Lyon, France) and xylazine (14 mg/kg body weight, Rompun 2%; Bayer HealthCare, Toronto, Canada). The episcleral veins, limbus and trabecular meshwork on the right eyes were submitted to laser photocoagulation (200 spots, 250 mW, 0.5 second, laser Vitra; Quantel Medical, Clermont-Ferrand, France) as previously described (Levkovitch-Verbin et al. 2002; Schnebelen et al. 2009). The left eyes were used as contralateral eyes. Hydroxymethylcellulose (Humigel[®]; Virbac, Carros, France) was topically applied on corneas to avoid intra- and postoperative dryness and damage. Tobramycin (Tobrex 0.3%; Alcon, Rueil-Malmaison, France) was used locally after laser surgery to prevent bacterial infection. Intraocular pressure was monitored by tonometry (Tonolab[®]; Tiolat, Helsinki, Finland) at days 1, 3, 14, 21, 30 and 60 between 9 and 11 AM. The rats were euthanized and enucleated at day 3, 14, 30 or 60 ($n = 10$ at each time-point). Five millilitres of blood was taken by aortic puncture in EDTA tubes, and plasma was prepared by 15-min centrifugation at 1730 *g* at 4°C . The retinas were carefully dissected after excision of the anterior segment of the eyes. Then, retinas were snap-frozen at -80°C until whole protein extraction ($n = 4$ at each time-point) or stored at -20°C in 2 ml 1 M KOH for 24SOH and cholesterol quantification ($n = 3$ at each time-point). The other eyeballs were embedded in OCT resin (Optimal Cutting Temperature, Tissue-Tek[®]; Bayer, Puteaux, France) at -70°C in isopentane and stored at -20°C until

cryosections and immunohistochemistry ($n = 3$ at each time-point).

Quantification of cholesterol and 24-hydroxycholesterol in the retina and plasma by gas chromatography

24SOH was quantified by isotope dilution mass spectrometry using racemic $[23,23,24\text{-}^2\text{H}_3]$ -24-hydroxycholesterol as internal standard (generous gift from Pr Ingemar Björkhem; Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden) in the retina ($n = 3$ at each time-point) and from 1 ml of plasma as previously described (Björkhem et al. 1998; Fourgeux et al. 2009). Briefly, 100 ng of $[23,23,24\text{-}^2\text{H}_3]$ -24OH was added to the samples that were submitted to alkaline hydrolysis in 5 ml of 1 M KOH for 2 hr. The solution was neutralized with 65 μl of phosphoric acid, and the sterols were extracted with 9 ml of chloroform in the presence of 3 ml of 0.9% sodium chloride. The organic phase was removed, and the solvent was evaporated to dryness. The sterols were dissolved in 1 ml of toluene. A 100- μl aliquot was removed for quantification of cholesterol. For this purpose, 5 μg of 5α -cholestane was added, and the solvents were evaporated to dryness. The sterols were derivatized to trimethylsilyl ethers by heating at 60°C after the addition of 200 μl of pyridine and 200 μl of BSTFA (Supelco, Bellefonte, PA, USA). The solvents were evaporated under nitrogen gas, and the samples were resuspended in hexane and analysed by gas chromatography-flame ionization detector (GC-FID, Ezychrom, Hewlett-Packard HP4890A). A 1- μl aliquot was injected by automated injection in a splitless mode at an injection temperature of 300°C on a DB-5MS fused silica capillary column (30 m $\times$ 0.25 mm id, 0.25 μm film thickness; J&W Scientific, Agilent Technologies, Massy, France). The initial oven temperature was kept at 50°C for 1 min, and then it was increased at a rate of $20^\circ\text{C}/\text{min}$ to 250°C and thereafter at $5^\circ\text{C}/\text{min}$ to a final temperature of 300°C . The remaining 900 μl of the previous saponified sterols was purified on silica columns (Supelco) for quantification of 24SOH. Removal of cholesterol was first achieved by elution with 8 ml of 0.5% isopropanol in

hexane. Purified oxysterols were subsequently eluted with 5 ml of 30% isopropanol in hexane and processed for derivatization as described above. Trimethylsilyl ethers were measured by gas chromatography-mass spectrometry (QP2010, Shimadzu, Japan). For this purpose, a 1- μ l aliquot was injected into silica columns and processed as described above. The temperature of the transfer line was kept at 300°C. Electron impact ionization was employed at 70 eV ionization energy. 24SOH and deuterated 24SOH were measured at m/z 413 and 416 amu, respectively. Absolute amounts of 24SOH were determined by interpolation from a standard curve generated in each experiment using unlabelled 24-hydroxycholesterol. Unlabelled 24-hydroxycholesterol (racemic mixture of 24S- and 24R-hydroxycholesterol) was synthesized in our own facilities. The purity and chemistry of the synthesized molecules was checked by ^1H and ^{13}C -NMR and GC-MS and reached 99.7% (data from GC-MS not shown).

Immunohistochemical analysis of glial reactivity

Ten-micron-thick cryosections of eyeballs ($n = 3$ at each time-point) were prepared with a cryomicrotome (CM3050S; Leica Microsystem SAS, Rueil-Malmaison, France), collected on gelatin-coated slides and stored at -80°C until further analysis. On the day of the immunohistochemistry procedure, cryosections were fixed with 4% paraformaldehyde (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) for 10 min and then rinsed with 1× PBS. A permeabilization step was carried out for 5 min with 0.1% Triton in 1× PBS. The slides were saturated for 10 min with a buffer containing 1% BSA, 0.05% Tween, 0.1% Triton in 1× PBS. Slides were incubated overnight at 4°C in a humidified chamber with anti-GFAP antibody (dilution: 1/200 in the saturation buffer, rabbit polyclonal antibody; NeoMarkers, Lab Vision, Fremont, CA, USA). Slides were then rinsed five times with 1× PBS and incubated for 1 hr with the secondary antibody (dilution: 1/200 in the saturation buffer, Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG; Invitrogen, A11008, Cergy Pontoise, France) in the presence of a

4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) solution (0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) (Sigma-Aldrich) to stain nuclei. Retinal sections were rinsed three times with 1× PBS and coverslipped with a fluorescence mounting medium (Dakocytomation, Trappes, France). Retinal sections were visualized with a Nikon E-600 epifluorescence microscope (Nikon, Champigny-sur-Marne, France) supplied with a mercury lamp (Nikon). Individual pictures of DAPI (excitation: 372 nm; emission: 456 nm) and GFAP (excitation: 495 nm; emission: 519 nm) fluorescence were photographed with a DXM 1200C camera before analysis with NIS Br software (Nikon).

Evaluation of CYP46A1 and GFAP expression levels in the retina

Proteins were extracted from whole rat retinas in a freshly home-made modified RIPA buffer (25 mM Tris-HCL pH 7.5, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 0.1% SDS, 1% sodium deoxycholate, 1% Triton-X-100, 150 mM NaCl) with antiphosphatases (1 mM sodium orthovanadate, 50 mM sodium fluoride) and antiproteases (Protease inhibitor cocktail EDTA-free; Roche Diagnostics, Meylan, France). The protein concentration was measured using the bicinchoninic acid assay (BCA) method at 544 nm, with the reducible agent compatible kit (Pierce, Rockford, MD, USA). Twenty micrograms of proteins from each retina were boiled 5 min in 4× Laemmli buffer and subjected to electrophoresis (Mini-Protean IV system; BioRad, Hercules, CA, USA) on a 10% SDS-PAGE gel at 120 V. Then, proteins were transferred on a nitrocellulose membrane (Hybond-ECL; GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) for 1 hr at 100 mA.

Glial fibrillary acidic protein staining was detected as follows. The membranes were blocked 2 hr at room temperature in 5% fat-free dry milk with 1× PBS 0.1% Tween-20 following by incubation for 2 hr with primary antibodies anti-GFAP (dilution 1/2000 in the blocking buffer, rabbit polyclonal antibody; NeoMarkers, Lab Vision), washed five times in 1× PBS 0.1% Tween-20 followed by 1-h incubation at room temperature with the peroxidase-conjugated goat anti-rabbit antibody (dilution: 1/4000,

DakoCytomation). The membranes were then washed five times in 1× PBS 0.1% Tween-20 before signal detection, as described below.

For the detection of CYP46A1, membranes were blocked in 10% fat-free dry milk with 1× PBS 0.1% Tween-20. Immunostaining with the monoclonal mouse anti-CYP46 (dilution 1/400, clone 1F11; Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA) was carried out by an overnight incubation at 4°C. Membranes were washed five times with 1× PBS 0.1% Tween-20 and incubated with a goat anti-mouse HRP-linked antibody (dilution 1/4000; DakoCytomation) for 90 min at room temperature. The signal was quantified by comparison with β -tubulin as a gel-loading control ($n = 4$ at each time-point) performed on the previous membranes, which were restored with Western blot stripping buffer (Thermo Scientific, Kalamazoo, MI, USA) for 30 min at room temperature. After two washes in 1× PBS 0.1% Tween-20, membranes were incubated for 45 min with monoclonal mouse anti- β -tubulin (dilution 1/4000; Zymed Laboratories, South San Francisco, CA, USA), washed five times in 1× PBS 0.1% Tween-20 and revealed with a goat anti-mouse HRP-linked secondary antibody (dilution 1/5000; DakoCytomation) for 45 min. Detection of the chemiluminescent signal was processed with the Western lighting-ECL plus kit (PerkinElmer, Waltham, MA, USA). The signal was also submitted to a Bio-Rad Molecular imager Chemidoc XRS+ System to quantify protein levels with Bio-Rad Image Lab software 2.0.1.

Quantification of cytokines and growth factors in plasma

Plasma IL-6, MCP-1, VEGF, IL-1 β , ICAM-1 and TNF- α were quantified simultaneously at each experiment time in 25 μ l of plasma by Luminex® technology based upon flow cytometry following the supplier's instructions (Procarta® Cytokine Assay kit; Affymetrix, Santa Clara, CA, USA). The results of the multiplex immunoassay were then analysed with the BioPlex® software (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Whole plasma proteins were quantified in samples by the BCA (Pierce). The levels of

cytokines and growth factors were expressed as picograms per milligram of total proteins.

Statistical analyses

A nonparametric Mann–Whitney test was used to compare the IOP between the two eyes in the intervention group. A nonparametric Kruskal–Wallis test was used to compare GFAP, CYP46A1 and 24SOH between groups (experimental eyes, contralateral eyes and naive eyes). The relationship between each outcome (GFAP, CYP46A1 and 24SOH) and each of the explanatory variables (site, group and time) was modelled as a generalized estimating equation (GEE), to account for the correlated nature of the data. A robust variance estimator was used. The explanatory variables – site (right eye and left eye) and group (no intervention or intervention) – were coded 0/1. Time was considered continuous. All analyses were conducted using STATA version 12.0 (Statacorp, College Station, TX, USA). The level of statistical significance was set at $p < 0.05$, and the tests were two-tailed.

Results

Elevated intraocular pressure

As shown in Fig. 1, the model of 532-nm laser photocoagulation of the limbus, episcleral veins and trabecular meshwork was suitable to induce a sustained high IOP in experimental eyes from day 1 to day 21 compared to control values ($p < 0.001$). Intraocular pressure returned to baseline (8.8 ± 0.6 mmHg) afterwards until the end of the 60-day experiment.

24S-hydroxycholesterol levels in plasma and the retina

Plasma levels of 24SOH increased by 30% at day 3 compared to baseline ($p = 0.0179$) and reached a maximum at day 14 (+66%, $p = 0.0018$) (Fig. 2A). Plasma 24SOH concentrations returned to normal values at day 30 and 60. 24SOH was slightly but not significantly lowered in the retina of the eye submitted to laser photocoagulation at day 1 following induction of elevated IOP (6.33 ± 0.89 ng/retina, $p > 0.05$). The 24SOH level

regularly increased afterwards, reaching its maximum at day 30 in the experimental retina, although the differences from the naive retina did not reach statistical significance. Interestingly, 24SOH modestly, but not significantly, increased in the contralateral retina at day 14, compared to the naive retina.

Time-dependent expression of CYP46A1 and glial reactivity in the retina

As shown in Figs 3A and 4B, CYP46A1 was overexpressed in the retina of the experimental eyes at all time-points compared to the naive retina at day 0. The difference reached statistical significance at day 3 only, with CYP46A1 showing a 2.5-fold increase compared to the naive retina. CYP46A1 expression also showed a 1.6-fold

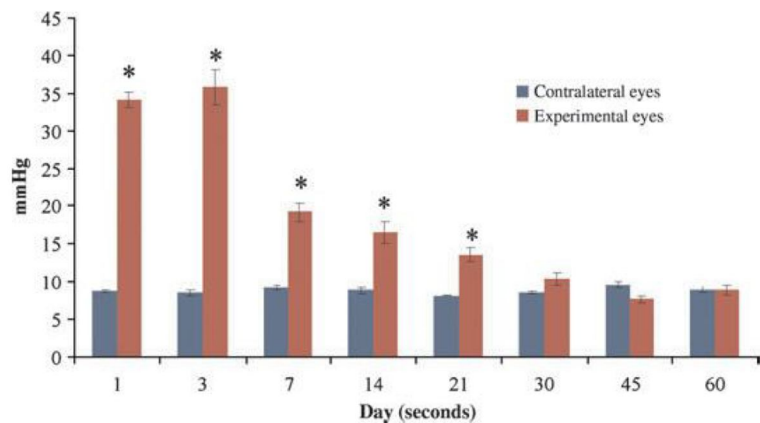


Fig. 1. Time course of intraocular pressure elevation after 532-nm laser photocoagulation of the limbus, episcleral veins and trabecular meshwork. * significantly different at $p < 0.001$ in experimental vs contralateral eyes in the corresponding time-points.

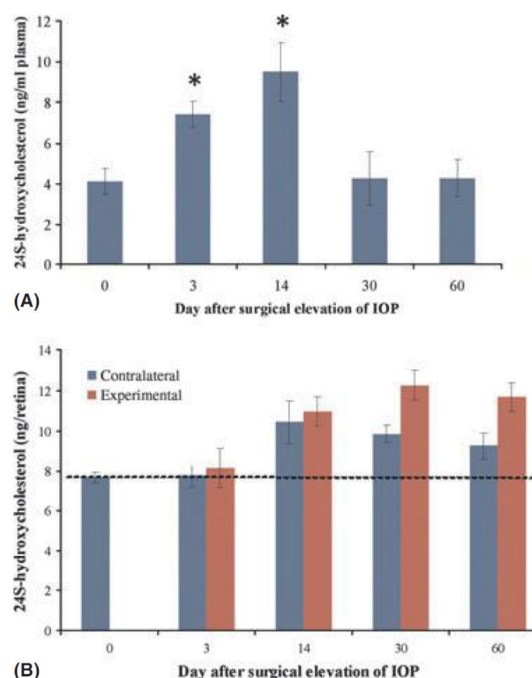


Fig. 2. Time-course changes of 24SOH level in plasma (A) and in the retina (B) after surgical elevation of intraocular pressure. Data are expressed as means $\pm$ SEM. * significantly different at $p < 0.05$ in the plasma at the corresponding time-points.

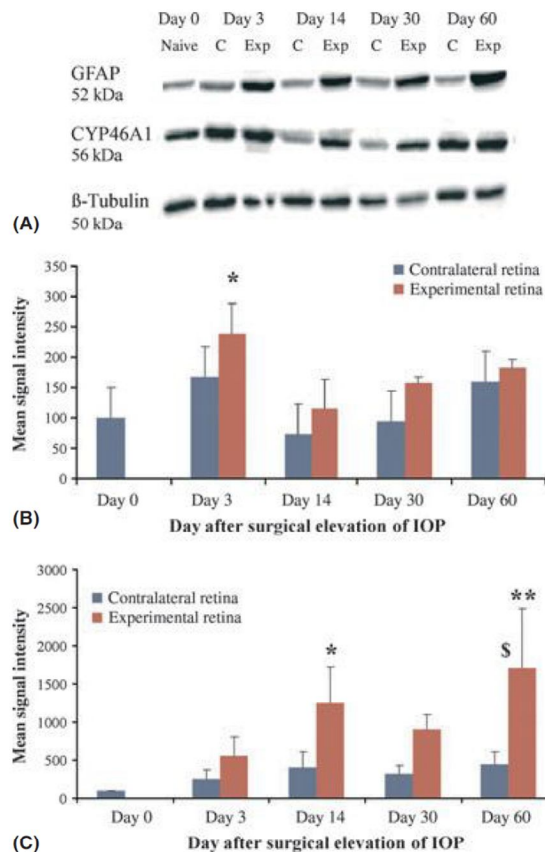


Fig. 3. CYP46A1 (A and B panels) and glial fibrillary acidic protein (GFAP) (A and C panels) expression in both experimental (exp) and contralateral (C) retinas after surgical elevation of intraocular pressure (values are expressed in arbitrary units, the basal value of 100 being considered at day 0). Monoclonal mouse anti-β-tubulin was used as loading control in Western blotting analysis (20-μg whole protein extract per well). *, ** significantly different at $p < 0.05$ or < 0.01 , respectively, versus naive retinas; S, significantly different at $p < 0.05$ versus GFAP in contralateral retinas at the corresponding time-points.

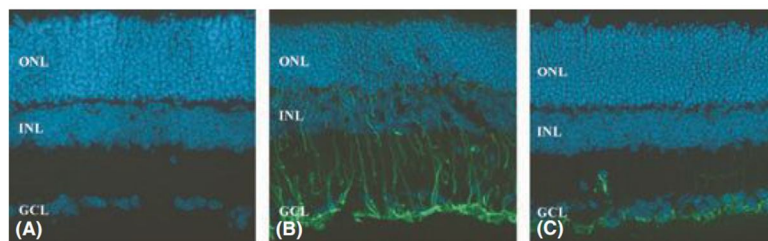


Fig. 4. Glial fibrillary acidic protein staining in retinal sections at day 3 after surgical elevation of intraocular pressure in experimental retina (B) compared to contralateral retina (C). (A): Naive retina (day 0). ONL, outer nuclear layer; INL, inner nuclear layer; GCL, ganglion cell layer.

increase in the contralateral retina at days 3 and 60, compared to CYP46A1 expression in the naive retina.

Immunohistochemical staining of GFAP (a marker for glial activation in the retina) appeared at early times after the induction of elevated IOP and spread from the ganglion cell

layer to the inner nuclear layer in the experimental retina (Fig. 4). In contrast, immunostaining was restricted to the ganglion cell layer in the contralateral retina at all time-points but at much lower levels than in the experimental retina. Glial activation was quantitated using GFAP immu-

nostaining by Western blotting. Glia was significantly activated in experimental retinas compared to contralateral retinas at day 14 (2.6-fold change, $p < 0.05$) and 60 (3.5-fold change, $p < 0.01$), and compared to the GFAP level in a naive retina (Fig. 3A,C).

Measurement of circulating cytokines, chemokines and growth factors

Plasma IL-6, MCP-1, VEGF, IL-1β, ICAM-1 and TNF-α levels are reported in Fig. 5A,B. Only MCP-1 (Fig. 5A) and ICAM-1 (Fig. 5B) showed significant variations over time with higher levels at day 3 than at baseline.

Discussion

As recently reviewed, control of cholesterol homeostasis is of particular importance for the functioning of the retina (Fliesler & Bretillon 2010). Cholesterol 24S-hydroxylase (CYP46A1) is a metabolizing enzyme that participates in the control of cholesterol homeostasis in the central nervous system (Bjorkhem 2006). Therein, including the neurosensory retina (Bretillon et al. 2007) and especially RGCs (Ramirez et al. 2008), its ability to convert cholesterol into 24S-hydroxycholesterol may be a way to regulate cholesterol levels. In our work, the increase of IOP in the experimental eye at day 3 is accompanied by the induction of CYP46A1 in the retina, and increased plasma levels of 24SOH, MCP-1 and ICAM-1. At this time-point (day 3), glia is modestly, although not significantly, activated in the experimental retina. Indeed, gliosis was observed at a significant level at day 14 only.

Plasma MCP-1 and ICAM-1 likely originated from secretion of trabecular meshwork cells (Shifera et al. 2010) and endothelial cells (Jo et al. 2003) that were injured by laser photocoagulation. Circulating MCP-1 has recently been described as a chemokine recruited by macrophages. MCP-1 was also found to be produced in the contralateral eyes in a rat model of ischaemia reperfusion injury (Sun et al. 2010) and more specifically released at the end-feet region of Müller cells in a model of light-induced photoreceptor degeneration (Rutar

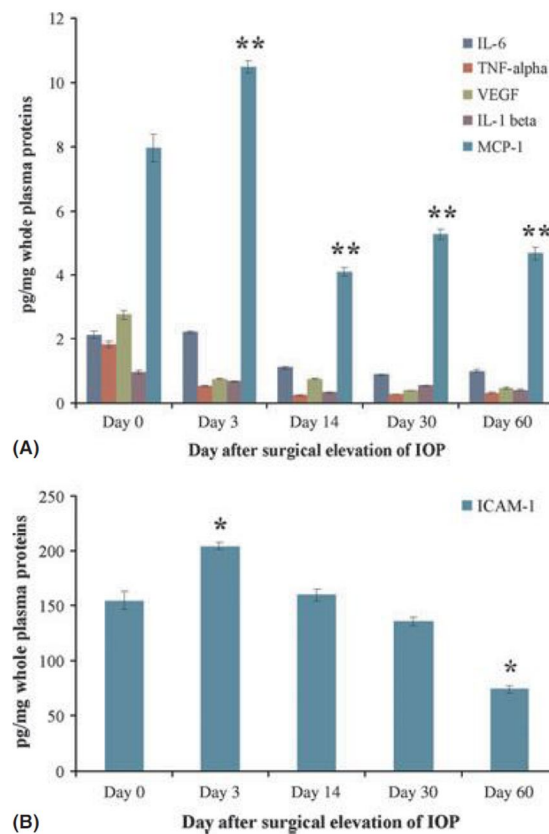


Fig. 5. Circulating IL-6, TNF-alpha, VEGF, IL-1 beta, MCP-1 (A) and ICAM-1 (B) levels after surgical elevation of intraocular pressure. **, * significantly different from controls (day 0) at $p < 0.001$ and $p < 0.05$, respectively.

et al. 2011). Interestingly, as specified above and even if we did not find any significant differences between groups, glial reactivity was detected in contralateral eyes. This might be due to circulating MCP-1, which may activate astrocytes and end-feet of Müller cells that are located in the vicinity of retinal vessels. Among these cells, activation of microglia might also lead to differentiation of ramified microglial cells into ameboid cells known to be the macrophage-like cells of the retina (Mochizuki 2010). Additionally, ICAM-1 expression leads to transmigration of macrophages from the circulation to the inflammatory site through endothelial tissues. Multiplex studies in tears of glaucomatous patients revealed elevated MCP-1 levels (Malvitte et al. 2007).

Retinal microglia and macrophages may also have been activated in response to ischaemia triggered by elevated IOP and may have produced MCP-1, as previously reported in

models of ischaemia (Jo et al. 2003; Yoshida et al. 2004). Nevertheless, accounting for the reduced size of the retina, we suspect retinal MCP-1 does not significantly participate in its plasma levels. A similar conclusion may be suggested with 24SOH levels in plasma and retina. Indeed, given that CYP46A1 activity is relatively low – 0.01% of the pool of cholesterol per hour (Björkhem et al. 1997) – we assume that the 2.5-fold overexpression of CYP46A1 in the retina in response to elevated IOP at day 3 would not be sufficient to increase plasma concentration of 24SOH by 30% as reported in the present study. The brain and the liver are the major contributors to circulating 24SOH concentration (Bretillon et al. 2000). The largest, if not exclusive, part of 24SOH originates from the brain (Björkhem 2006). We previously published data on plasma 24SOH levels in patients with glaucoma. In those patients, the ratio of the size of

the brain and of the liver was the best indicator for plasma levels of 24SOH (Bretillon et al. 2000). Neither glaucoma nor the severity of the retinopathy was associated with changes in plasma 24SOH concentrations (Fourgeux et al. 2009). We suggest that circulating MCP-1, which was produced by laser-injured ocular structures, activated glial cells in the brain, which secondarily overexpressed CYP46A1 and produced 24SOH. Similar activation of CYP46A1 in glia has already been reported in the brain in response to injury (Smiljanic et al. 2010) and in Alzheimer's disease (Bogdanovic et al. 2001; Brown et al. 2004). A recent paper also demonstrated atypical expression of CYP46A1 by activated microglial cells that became able to phagocytose damaged neurons (Smiljanic et al. 2010). A similar mechanism may likely explain glial activation in the contralateral retina, as previously reported (Ramirez et al. 2010).

Müller cells are radial and macroglial cells in the retina. End-feet of their dendritic processes closely interact with RGCs (Bringmann et al. 2006; Lebrun-Julien et al. 2009; Atsuzawa et al. 2010). *In vitro*, the regenerative state of RGCs has been shown to correlate with activation of retinal astrocytes and Müller cells (Muller et al. 2007); 24SOH may be one of these factors. The induction of CYP46A1 at day 3 is consistent with the genesis of oxidative stress in response to elevated IOP during the first 3 days after laser photocoagulation (Fig. 1). Oxidative stress is potent to increase CYP46A1 gene expression (Ohya et al. 2006) and is also linked to glaucoma (Izzotti et al. 2006; Tezel 2011). *In vitro* data showed that 24SOH exacerbated the deposition of A β peptide in neurons and potentiated the A β -dependent apoptotic effect (Gamba et al. 2011). Overexpression of CYP46A1 in astrocytes reduced glutamate uptake by dissociating EAAT2 from lipid rafts (Tian et al. 2010), thereby amplifying the excitotoxicity of glutamate. One of the strengths of our study is that we showed that, *in vivo*, CYP46A1 induction was only transient and returned to baseline a few days after. We therefore point out that the resolution of CYP46A1 overexpression would prevent any side-effect of 24SOH.

We acknowledge several limitations to our study. The left eyes were used as comparators to eyes that underwent laser photocoagulation of the limbus, the episcleral veins and the trabecular meshwork. However, in the laser-induced glaucoma model, it was shown that contralateral eyes display glial activation (Ramirez et al. 2010). Therefore, we evaluated basal glial activation in animals without intervention (naïve eyes in our study). Several animal glaucoma models are available today. Although the gold standard remains the retrograde hypertonic saline injection of episcleral veins (Morrison et al. 2011), the model we used in our experiment has been considered valid (Pang & Clark 2007) since its description (Levkovitch-Verbin et al. 2002). Another weakness of our experiment is that we did not consider endothelin-1. As it was shown that optic nerve head astrocytes are activated *in vivo* by endothelin-1, this point would need further clarification (Murphy et al. 2010).

Induction of CYP46A1 in the retina may be considered neuroprotective. 24SOH may be a partner in the cross-talk between glia and neurons. It may also bind to LXR in glia and activate LXR-target genes, such as *ABCA1* and *ABCG1*, which are involved in the efflux of cholesterol, thereby providing cholesterol to neurons (Shafaati et al. 2011).

Acknowledgements

We acknowledge the fruitful collaboration with Laboratoires Fournier/Solvay/Abbott (Daix, France) for multiplex analysis of cytokines (Luc Lebreton, Jocelyne Annat, Séverine Delaporte). The skilful assistance of Linda Northrup (PhD, ELS, English Solutions, Voiron, France) for the English-language editing of the manuscript is gratefully acknowledged.

The present work has previously been presented in part at the 2010 Annual Meeting of ARVO (Association for Research in Vision & Ophthalmology, Fort Lauderdale, FL, USA). Fourgeux, C., Bardet, B., Pasquis, B., Martine, L., Maire, M.A., Acar, N., Bron, A., Creuzot-Garcher, C., Bretillon, L., 2010. Neuron-Glia Interactions: May 24S-Hydroxycholesterol Be a Signal Molecule in the Retina in the Course of Retinal Ganglion

Cell Loss? Invest Ophthalmol Vis Sci 51, E-Abstract 5998.

References

- Atsuzawa K, Nakazawa A, Mitsutani K, Fukasawa M, Yamamoto N, Hashimoto T & Usuda N (2010): Immunohistochemical localization of mitochondrial fatty acid beta-oxidation enzymes in Müller cells of the retina. *Histochem Cell Biol* 134: 565–579.
- Bjorkhem I (2006): Crossing the barrier: oxysterols as cholesterol transporters and metabolic modulators in the brain. *J Intern Med* 260: 493–508.
- Bjorkhem I & Meaney S (2004): Brain cholesterol: long secret life behind a barrier. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24: 806–815.
- Bjorkhem I, Lütjohann D, Breuer O, Sakinis A & Wennmalm A (1997): Importance of a novel oxidative mechanism for elimination of brain cholesterol. Turnover of cholesterol and 24(S)-hydroxycholesterol in rat brain as measured with $^{18}O_2$ techniques *in vivo* and *in vitro*. *J Biol Chem* 272: 30178–30184.
- Bjorkhem I, Lütjohann D, Diczfalussy U, Stahl 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.
- Bogdanovic N, Bretillon L, Lund EG, Diczfalussy U, Lannfelt L, Winblad B, Russell DW & Bjorkhem I (2001): On the turnover of brain cholesterol in patients with Alzheimer's disease. Abnormal induction of the cholesterol-catabolic enzyme CYP46 in glial cells. *Neurosci Lett* 314: 45–48.
- Bretillon L, Lütjohann D, Stahl L, Widhe T, Bindl L, Eggertsen G, Diczfalussy U & Bjorkhem I (2000): Plasma levels of 24S-hydroxycholesterol reflect the balance between cerebral production and hepatic metabolism and are inversely related to body surface. *J Lipid Res* 41: 840–845.
- Bretillon L, Diczfalussy U, Bjorkhem I et al. (2007): Cholesterol-24S-hydroxylase (CYP46A1) is specifically expressed in neurons of the neural retina. *Curr Eye Res* 32: 361–366.
- Bringmann A, Pannicke T, Grosche J, Francke M, Wiedemann P, Skatchkov SN, Osborne NN & Reichenbach A (2006): Müller cells in the healthy and diseased retina. *Prog Retin Eye Res* 25: 397–424.
- Brown J III, Theisler C, Silberman S et al. (2004): Differential expression of cholesterol hydroxylases in Alzheimer's disease. *J Biol Chem* 279: 34674–34681.
- Burgoyne CF (2011): A biomechanical paradigm for axonal insult within the optic nerve head in aging and glaucoma. *Exp Eye Res* 93: 120–132.
- Cartagena CM, Ahmed F, Burns MP, Pajoo-hesh-Ganji A, Pak DT, Faden AI & Rebeck GW (2008): Cortical injury increases cholesterol 24S hydroxylase (Cyp46) levels in the rat brain. *J Neurotrauma* 25: 1087–1098.
- Fliesler SJ & Bretillon L (2010): The ins and outs of cholesterol in the vertebrate retina. *J Lipid Res* 51: 3399–3413.
- Fourgeux C, Martine L, Bjorkhem I et al. (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, Bron A, Acar N, Creuzot-Garcher C & Bretillon L (2011): 24S-hydroxycholesterol and cholesterol-24S-hydroxylase (CYP46A1) in the retina: from cholesterol homeostasis to pathophysiology of glaucoma. *Chem Phys Lipids* 164: 496–499.
- Gamba P, Leonarduzzi G, Tamagno E et al. (2011): Interaction between 24-hydroxycholesterol, oxidative stress, and amyloid-beta in amplifying neuronal damage in Alzheimer's disease: three partners in crime. *Aging Cell* 10: 403–417.
- Guo L, Duggan J & Cordeiro MF (2010): Alzheimer's disease and retinal neurodegeneration. *Curr Alzheimer Res* 7: 3–14.
- Izzotti A, Bagnis A & Sacca SC (2006): The role of oxidative stress in glaucoma. *Mutat Res* 612: 105–114.
- Jo N, Wu GS & Rao NA (2003): Upregulation of chemokine expression in the retinal vasculature in ischemia-reperfusion injury. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44: 4054–4060.
- Kwon YH, Fingert JH, Kuehn MH & Alward WL (2009): Primary open-angle glaucoma. *N Engl J Med* 360: 1113–1124.
- Lebrun-Julien F, Duplan L, Pernet V, et al. (2009): Excitotoxic death of retinal neurons *in vivo* occurs via a non-cell-autonomous mechanism. *J Neurosci* 29: 5536–5545.
- Levkovitch-Verbin H, Quigley HA, Martin KR, Valenta D, Baumrind LA & Pease ME (2002): Translimbal laser photocoagulation to the trabecular meshwork as a model of glaucoma in rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43: 402–410.
- Lund EG, Guileyardo JM & Russell DW (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.
- Lütjohann D, Breuer O, Ahlborg G, Nennesmo I, Siden A, Diczfalussy U & Bjorkhem I (1996): Cholesterol homeostasis in human brain: evidence for an age-dependent flux of 24S-hydroxycholesterol from the brain into the circulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 9799–9804.
- Malvitte L, Montange T, Vejux A, Baudouin C, Bron AM, Creuzot-Garcher C & Lizard G (2007): Measurement of inflammatory cytokines by multicytokine assay in tears of patients with glaucoma topically treated with chronic drugs. *Br J Ophthalmol* 91: 29–32.
- Mochizuki M (2010): Regional immunity of the eye. *Acta Ophthalmol* 88: 292–299.
- Morrison JC, Cepurna Ying Guo WO & Johnson EC (2011): Pathophysiology of

- human glaucomatous optic nerve damage: insights from rodent models of glaucoma. *Exp Eye Res* **93**: 156–164.
- Muller A, Hauk TG & Fischer D (2007): Astrocyte-derived CNTF switches mature RGCs to a regenerative state following inflammatory stimulation. *Brain* **130**: 3308–3320.
- Murphy JA, Archibald ML & Chauhan BC (2010): The role of endothelin-1 and its receptors in optic nerve head astrocyte proliferation. *Br J Ophthalmol* **94**: 1233–1238.
- Ohshima Y, Meaney S, Heverin M et al. (2006): Studies on the transcriptional regulation of cholesterol 24-hydroxylase (CYP46A1): marked insensitivity toward different regulatory axes. *J Biol Chem* **281**: 3810–3820.
- Pang IH & Clark AF (2007): Rodent models for glaucoma retinopathy and optic neuropathy. *J Glaucoma* **16**: 483–505.
- Pikuleva IA (2006): Cytochrome P450s and cholesterol homeostasis. *Pharmacol Ther* **112**: 761–773.
- Pioggia G (2009): Special issue on neuron-glia interactions. *J Biol Phys* **35**: 311–315.
- Quigley HA (2011): Glaucoma. *Lancet* **377**: 1367–1377.
- Quigley HA & Broman AT (2006): The number of people with glaucoma worldwide in 2010 and 2020. *Br J Ophthalmol* **90**: 262–267.
- Ramirez DM, Andersson S & Russell DW (2008): Neuronal expression and subcellular localization of cholesterol 24-hydroxylase in the mouse brain. *J Comp Neurol* **507**: 1676–1693.
- Ramirez AI, Salazar JJ, de Hoz R et al. (2010): Quantification of the effect of different levels of IOP in the astroglia of the rat retina ipsilateral and contralateral to experimental glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **51**: 5690–5696.
- Rutar M, Natoli R, Valtier K & Provis JM (2011): Early focal expression of the chemokine Ccl2 by Müller cells during exposure to damage-inducing bright continuous light. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **52**: 2379–2388.
- Schnebelen C, Pasquis B, Salinas-Navarro M et al. (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.
- Shafaati M, Olin M, Bavner A, Pettersson H, Rozell B, Meaney S, Parini P & Bjorkhem I (2011): Enhanced production of 24S-hydroxycholesterol is not sufficient to drive liver X receptor target genes *in vivo*. *J Intern Med* **270**: 377–387.
- Shifera AS, Trivedi S, Chau P, Bonnemaïson LH, Iguchi R & Alvarado JA (2010): Constitutive secretion of chemokines by cultured human trabecular meshwork cells. *Exp Eye Res* **91**: 42–47.
- Smiljanic K, Lavrnja I, Mladenovic Djordjevic A, Ruzdijic S, Stojiljkovic M, Pekovic S & Kanazir S (2010): Brain injury induces cholesterol 24-hydroxylase (Cyp46) expression in glial cells in a time-dependent manner. *Histochem Cell Biol* **134**: 159–169.
- Sun M-H, Pang J-HS, Chen S-L et al. (2010): Retinal protection from acute glaucoma-induced ischemia-reperfusion injury through pharmacologic induction of heme oxygenase-1. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **51**: 4798–4808.
- Tezel G (2011): The immune response in glaucoma: a perspective on the roles of oxidative stress. *Exp Eye Res* **93**: 178–186.
- Tian G, Kong Q, Lai L, Ray-Chaudhury A & Lin CL (2010): Increased expression of cholesterol 24S-hydroxylase results in disruption of glial glutamate transporter EAAT2 association with lipid rafts: a potential role in Alzheimer's disease. *J Neurochem* **113**: 978–989.
- Woldemussie E, Wijono M & Ruiz G (2004): Müller cell response to laser-induced increase in intraocular pressure in rats. *Glia* **47**: 109–119.
- Yoshida S, Yoshida A & Ishibashi T (2004): Induction of IL-8, MCP-1, and bFGF by TNF-alpha in retinal glial cells: implications for retinal neovascularization during post-ischemic inflammation. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* **242**: 409–413.

Received on March 26th, 2012

Accepted on June 4th, 2012.

Correspondence:

Lionel Bretillon

CSGA

Centre INRA

17 rue Sully

BP86510

F-21065 Dijon Cedex

France.

Tel: + 33 0 3 80 69 31 21

Fax: + 33 0 3 80 69 32 23

Email: lionel.bretillon@dijon.inra.fr

D. Conséquences de l'inhibition de CYP46A1 sur la fonction et l'homéostasie du cholestérol dans la rétine

Fourgeux, C., et al., *In vivo consequences of cholesterol-24S-hydroxylase inhibition by voriconazole on cholesterol homeostasis and function in the rat retina.*

Soumission à *Biochemical Pharmacology*

N.B.: Les figures mentionnées dans le texte font référence à celles qui sont insérées dans le manuscrit soumis.

En catalysant l'addition d'un groupement hydroxyle en position 24 du cholestérol, CYP46A1 participe à l'élimination du cholestérol du système nerveux central, incluant la rétine. CYP46A1 participerait ainsi à limiter l'accumulation de cholestérol dans les neurones qui est reconnu comme délétère [395]. Inhiber CYP46A1 pourrait donc s'avérer néfaste et ce particulièrement en condition de stress rétinien, comme au cours du glaucome.

Nous avons donc testé l'effet sur la rétine du voriconazole, un antifongique utilisé en pratique clinique pour traiter des affections pneumologiques et les infections fongiques dans l'œil, qui s'est révélé être un inhibiteur de l'activité de CYP46A1 [408]. Nous avons donc testé l'effet inhibiteur du voriconazole sur le métabolisme du cholestérol et son effet sur la fonction de la rétine évaluée par électrorétinographie (ERG), ainsi que sur l'activation de la glie et l'expression de CYP46A1.

Pour cela, nous avons tiré parti de l'utilisation de la minocycline en parallèle et avec le voriconazole. En effet, la minocycline inhibe l'activation des cellules microgliales et des monocytes. Ceci nous permettrait alors de contrebalancer une éventuelle interaction immune du voriconazole, suggéré par des données montrant l'activation de la différenciation des monocytes en macrophages par le voriconazole [409]; et de mieux en apprécier son effet sur le métabolisme du cholestérol indépendamment de son action sur les monocytes et la microglie.

Modèle animal et analyses

Des rats mâles de souche Sprague-Dawley de 7 semaines ont été utilisés. Quatre groupes ont été constitués. Chaque animal (n=10) a reçu 5 injections intra-péritonéales à raison d'une injection par jour pendant 5 jours. Pour le groupe Vor, 60mg/kg/jour de voriconazole ont été administrés. Le groupe Mino a reçu 22mg/kg/ jour de minocycline. Le

groupe Vor+Mino a reçu les deux traitements aux concentrations utilisées dans les groupes Vor et Mino. Le groupe témoin a reçu le mélange PBS/BSA/EtOH utilisé pour dissoudre le voriconazole et la minocycline. Les animaux ont été soumis à l'ERG après avoir été placés une nuit dans le noir. Après l'examen, les animaux ont été euthanasiés. Le sang, l'humeur vitrée, les rétines et le cerveau ont été prélevés. Le cholestérol et le 24SOH ont été mesurés dans le plasma, le cerveau et la rétine par GC-MS à l'aide d'un standard interne deutéré. Des marquages en western blot ont été réalisés dans la rétine et le cerveau pour analyser l'expression de CYP46A1 et de la GFAP comme marqueur de l'activation gliale. Les cytokines et chimiokines ont été mesurées par Luminex® en multiplexes, dans le plasma, l'humeur vitrée, les homogénats de rétine et de cerveau.

Le test non-paramétrique de Kruskal-Wallis a été utilisé pour comparer les niveaux d'expression protéique (GFAP, CYP46A1), les teneurs en 24S-OH et en cholestérol, les niveaux de cytokines et chimiokines (MCP-1, ICAM-1, IL-1 β , IL6, VEGF, TNF- α) entre les groupes (témoin, Vor, Mino et Vor+Mino). La relation entre chaque donnée (GFAP, CYP46A1, 24SOH, chimiokines) et chacune des variables explicatives (tissu et groupe) a été modélisée par une approche GEE (équation d'estimation généralisée), pour tenir compte de la corrélation des données. Un estimateur de la robustesse de la variance a été utilisé. Les variables explicatives de tissu (plasma, vitré, homogénats de rétine et de cerveau) et de groupe (témoin, Vor, Mino et Vor+Mino) ont été codées 0/1. Le test de comparaison de Dunn a été utilisé. Toutes les analyses ont été faites avec le logiciel STATA version 12.0. Le niveau de significativité statistique a été établi à $p < 0,05$, et les tests étaient bilatéraux (*two-tailed*).

Résultats

Les données sur l'ERG montrent que le voriconazole injecté seul ou avec la minocycline altère le fonctionnement de la rétine interne (**Figure 1**). L'amplitude de l'onde b est significativement diminuée ($p < 0,05$) par rapport aux animaux du groupe témoin. Certains ERG provenant du groupe Vor ou Vor+Mino sont même altérés, rendant l'interprétation de l'ERG inexploitable (8 ERG étaient quantitativement inexploitable). Le temps de latence de la réponse de la rétine interne n'est pas affecté par le voriconazole. La minocycline seule n'a pas d'effet sur l'ERG. La réponse des photorécepteurs, caractérisée par la réponse de l'onde a, n'est pas affectée par le traitement.

L'histogramme de la **figure 2A** résume les résultats des moyennes d'amplitude des 4 pics mesurés (OP1 à OP4), qui sont caractéristiques des potentiels oscillatoires (OPs). L'analyse des tracés des potentiels oscillatoires enregistrés dans les deux groupes traités avec

le voriconazole (Vor et Vor+Mino) montrent une altération significative des potentiels oscillatoires ($p < 0,0001$). Cette altération intervient particulièrement au niveau de l'amplitude des pics OP2 et OP3.

La réponse STR (Scotopic Threshold Response) est également altérée dans les groupes traités avec le voriconazole. En effet et comme attendu, dans le groupe témoin, la moyenne des amplitudes des pSTR augmente progressivement en fonction de l'augmentation de l'intensité du stimulus lumineux. Dans le groupe Mino, l'augmentation est également progressive et croissante. Dans les groupes Vor+Mino, la moyenne d'amplitude des pSTR est significativement réduite aux plus fortes intensités ($-4,32$ et $-4,06 \log \text{ mcd.s/m}^2$) comparativement aux valeurs du groupe témoin, mais surtout il n'y a plus d'augmentation croissante de la réponse. Les nSTR ne sont pas affectés ou à un niveau moindre (**Figure 2B**). Les temps de latence des pSTR et nSTR ne sont pas modifiés (données non fournies).

Concernant les teneurs en 24S-OH de la rétine, nous avons obtenu une diminution de 37% dans le groupe Vor ($p < 0,05$) et de 25% dans le groupe Vor+Mino. Dans le cerveau, les teneurs en 24S-OH sont augmentées de 18% (non significatif) dans le groupe Vor, et ces teneurs sont diminuées de 43% dans le groupe Vor+Mino ($p < 0,001$) et de 11% dans le groupe Mino comparé au groupe témoin (**Figure 3**). Les concentrations plasmatiques de 24S-OH sont significativement diminuées de 45% dans le groupe Vor+Mino, et de 16 et 18% dans les groupes Vor et Mino, respectivement. La teneur en cholestérol plasmatique montre une diminution de 16% non significative. Une augmentation significative de 12% est observée dans la rétine du groupe Vor+Mino ($p < 0,05$) comparativement au groupe Vor. Dans ce groupe Vor, les teneurs en cholestérol de la rétine sont augmentés de 18% comparé au groupe témoin (non significatif). Dans le cerveau, le cholestérol n'est pas affecté par les traitements (**Figure 3**).

Nos résultats de l'analyse de l'expression de CYP46A1 par western-blotting (**Figure 4a**) montrent une augmentation de l'expression de CYP46A1 dans la rétine ($\times 1,4$; $\times 1,7$) et le cerveau ($\times 1,2$; $\times 1,3$) des groupes Vor et Vor+Mino comparés aux témoins (non significatif). En revanche, il y a une association positive entre l'expression de CYP46A1 dans la rétine et celle dans le cerveau ($R^2=0,2405$; $p < 0,0013$). L'expression de GFAP est augmentée d'un facteur 2,7 et 1,8 dans la rétine et le cortex, respectivement dans le groupe Vor (**Figure 4b**). L'induction de GFAP par la combinaison Vor+Mino est plus forte dans la rétine ($\times 4,3$) que dans le cortex. De façon intéressante, il existe une corrélation positive entre l'expression de CYP46A1 et celle de GFAP dans la rétine ($R^2=0,2980$; $p < 0,0003$). La minocycline n'a pas d'effet sur l'expression de CYP46A1 ou de la GFAP.

Les résultats du luminex montrent que les niveaux de MCP-1 et ICAM-1 sont significativement élevés (**Figure 5**) dans la rétine (x2,3 ; x1,8) et le vitré (x12,4 ; x2,7), respectivement, des groupes Vor+Mino comparé aux niveaux retrouvés dans le groupe témoin. L'IL-6 est significativement augmenté dans le vitré des groupes Vor+Mino comparé aux témoins (x12,5). Dans le vitré, les teneurs en VEGF chutent significativement par rapport aux valeurs relevées chez les témoins ($p < 0,002$). Dans le plasma et le cortex, les teneurs en TNF- α et en VEGF sont augmentées dans le groupe Vor, même si les différences ne sont pas significatives. MCP-1 est augmenté dans le plasma du groupe Vor. Le groupe Mino n'est pas affecté par le traitement, les niveaux de base sont même légèrement réduits par rapport au niveau de base du groupe témoin (non significatif) sauf pour le TNF- α qui diminue de façon significative dans le cerveau ($p < 0,05$) comparé au groupe témoin.

Discussion

L'équipe de Pikuleva a récemment défini les azoles comme des ligands de CYP46A1. Parmi eux, le voriconazole a été caractérisé comme un inhibiteur efficace de CYP46A1 et de la synthèse du cholestérol en inhibant l'HMGCR, au moins dans le cerveau [408, 410, 411].

La question de tels effets dans la rétine restait cependant licite, en raison de l'expression de CYP46A1 dans la rétine, mais néanmoins en suspens. Le voriconazole est couramment utilisé dans le milieu médical, particulièrement sous forme de gouttes à 1% avant ou après la chirurgie, pour traiter les infections à *Aspergillus*. Cependant son utilisation serait également associée à des perturbations visuelles transitoires, comme l'ont démontré Kinoshita *et al.*, en analysant des ERG effectués chez le singe après injection intraveineuse de voriconazole [70]. Nos données montrent que le voriconazole altère la rétine interne, comme on le voit par les amplitudes des ondes b qui sont réduites, ainsi que par la diminution des potentiels oscillatoires. L'analyse des STR permet de rendre compte de la fonctionnalité des CGR. En effet l'amplitude des pSTR et/ou nSTR diminue progressivement avec une dysfonction des CGR [412, 413]. Nos données montrent que la moyenne d'amplitude des pSTR est significativement réduite dans les groupes Vor+Mino aux plus fortes intensités. Les nSTR sont peu voire pas affectés, ce qui est cohérent avec des données précédentes stipulant que les pSTR sont plus représentatifs de la fonctionnalité de la rétine et plus exploités que les nSTR [414].

Le voriconazole a été utilisé en injection intravitréenne chez le rat [415] et le lapin [416]. Ces études n'ont pas révélé d'effet délétère du voriconazole sur l'ERG. Outre les espèces animales qui sont différentes, la voie d'administration l'est également et, à notre sens,

peut expliquer cette discordance dans les effets. Le voriconazole a été décrit comme promoteur de la différenciation des monocytes en macrophages [409]. Ainsi, nous pouvons suspecter que, utilisé par voie intraveineuse ou intrapéritonéale, le voriconazole serait à même d'activer les macrophages circulants qui, potentiellement pourraient infiltrer la rétine et altérer sa fonction. Au contraire, la voie directe s'affranchirait de cet effet. Cependant, si la minocycline est connue pour limiter l'activation des cellules microgliales [417], elle l'est également vis-à-vis des monocytes [418]. L'effet sur l'ERG dans le groupe Vor+Mino plaide donc en faveur d'un effet qui ne serait pas associé à l'infiltration de monocytes/macrophages mais à un effet de l'inhibition de CYP46A1.

Nos résultats montrent l'établissement de la gliose dans la rétine après injection de voriconazole. Les valeurs d'expression de la GFAP sont significatifs dans les groupes Vor et Vor+Mino, avec un effet plus marqué dans le groupe combiné ($\times 4,3$; $p < 0,002$). Dans le cerveau, l'expression de GFAP reste constante. Il n'y a pas de différence significative de l'expression de CYP46A1 dans le cerveau ou dans la rétine, bien qu'il y ait tout de même une légère augmentation dans les groupes Vor et Vor+Mino. Il existe une association positive et significative entre le niveau d'expression de CYP46A1 dans la rétine et celui dans le cerveau.

De plus, dans la rétine, l'augmentation de CYP46A1 est corrélée positivement et significativement à celle de la GFAP dans les groupes correspondants. Nous pouvons donc associer les niveaux d'expression de la GFAP à ceux de CYP46A1. Ceci est cohérent avec nos récentes données publiées. Nous avons montré que l'expression de CYP46A1 était maintenue, dans un modèle expérimental d'induction du glaucome chez le rat, afin de préserver l'homéostasie du cholestérol dans la rétine [419].

De nombreuses études ont montré les effets protecteurs de l'inhibition de la microglie par la minocycline au cours du glaucome, de la rétinopathie diabétique et sur la dégénérescence des photorécepteurs [417, 420, 421]. L'inhibition de la microglie pourrait alors être une stratégie thérapeutique pour ralentir la perte des CGR [422]. Dans notre étude, l'inhibition de la microglie et de l'activation des monocytes/macrophages et de l'activité CYP46A1 est associée à une restauration des teneurs en 24S-OH dans la rétine (-37% ; $p < 0,05$) par rapport à la situation dans laquelle seule l'activité CYP46A1 est inhibée, mais également à une exacerbation de la gliose réactionnelle.

En effet, nos résultats de dosages en multiplexe montrent que dans le cerveau du groupe Mino, le TNF- α diminue de moitié comparé aux contrôles, ce qui est cohérent avec le fait que la minocycline a une action anti-inflammatoire [417]. Les niveaux des cytokines et chimiokines du panel recherché sont même plus faibles que ceux du groupe témoin. Les effets

de la minocycline sur l'inhibition de la microglie ont été rapportés dans un contexte d'activation précoce de la microglie au cours d'un stress oxydatif. Les teneurs de MCP-1 de la rétine et du vitré sont significativement augmentés dans les groupes Vor+Mino comparé au groupe témoin, et les niveaux sont augmentés dans le groupe Vor, mais à un niveau moindre. Nous suggérons que l'inhibition de la microglie par la minocycline amplifie l'effet du voriconazole sur la gliose des CGM dans le groupe Vor+Mino, d'où des niveaux augmentés de MCP-1 et d'ICAM-1 dans la rétine. L'inhibition de la microglie, associée à une modulation de l'homéostasie du cholestérol amplifierait l'activation de la macroglie. Nous avons trouvé des niveaux de VEGF significativement diminués ($p < 0,002$) dans les groupes traités avec le voriconazole, ce qui est comparable à des données précédentes sur l'action d'un analogue au voriconazole, l'itraconazole, combiné à la minocycline qui diminue aussi les niveaux de VEGF [423-426]. Ces études montrent que l'inhibition de la prolifération cellulaire endothéliale et de l'angiogénèse, qui sont étroitement associées à l'inhibition du VEGF, doivent être reliées à l'inhibition de la voie de signalisation mTor (impliquée dans les altérations du trafic de cholestérol) et celle impliquant SHH (associée à la perte des connections neuronales).

En conclusion, le voriconazole inhibe la synthèse de 24S-OH dans la rétine, et il altère la fonctionnalité rétinienne. La minocycline n'inverse pas les effets du voriconazole, ce qui signifie que, les voies menant à la différenciation des monocytes sont indépendamment empruntées par chacun de ces deux composés. Nos données mettent en exergue le dialogue entre CGR et cellules gliales en suggérant que les cellules gliales sont capables de détecter une modification de la concentration de la rétine en 24S-OH et de s'activer. Nos travaux montrent pour la première fois l'interaction entre homéostasie du cholestérol et microglie dans la rétine. Enfin, compte tenu de l'exacerbation de la gliose et des marqueurs de l'inflammation dans la rétine et le vitré après injection de voriconazole et de minocycline, il sera opportun d'évaluer, en condition de stress associé au glaucome, si les propriétés neuroprotectrices de la minocycline sont amoindries lorsque l'activité de CYP46A1 est inhibée.

1 **In vivo consequences of cholesterol-24S-hydroxylase (CYP46A1) inhibition by voriconazole on**
2 **cholesterol homeostasis and function in the rat retina**

3

4 Cynthia FOURGEUX^{1,2,3}, Lucy MARTINE^{1,2,3}, Niyazi ACAR^{1,2,3}, Alain M. BRON^{1,2,3,4}, Catherine P.
5 CREUZOT-GARCHER^{1,2,3,4} and Lionel BRETILLON^{1,2,3*}

6 ¹ INRA, UMR1324 Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation, Eye and Nutrition Research
7 Group, F-21000 Dijon, France,

8 ² CNRS, UMR6265 Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation, Eye and Nutrition Research
9 Group, F-21000 Dijon, France

10 ³ Université de Bourgogne, Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation, Eye and Nutrition
11 Research Group, F-21000 Dijon, France

12 ⁴ University Hospital, Department of Ophthalmology, F-21000 Dijon, France

13

14 * corresponding author: Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation, Centre INRA, 17 rue Sully,
15 BP86510, F-21065 Dijon cedex, France. Phone: +33 380693121, fax: +33 380693223, Email :
16 lionel.bretillon@dijon.inra.fr

17

18 Running title: Inhibition of CYP46A1 in the retina by voriconazole

19 Abstract 245 words, Text 4214 words, Acknowledgments 97 words, References 1676 words, Figure
20 legends 292 words, 0 Table, 4 Figures.

1 **Abstract**

2 Cholesterol 24S-hydroxylase (CYP46A1) is an enzyme which converts cholesterol into 24S-
3 hydroxycholesterol in neurons and participates to cholesterol homeostasis in the central nervous
4 system including the retina. This study aimed to evaluate the consequences of CYP46A1 inhibition by
5 voriconazole on cholesterol homeostasis and function in the retina. Sprague-Dawley rats received
6 daily intraperitoneal injections of voriconazole (60mg/kg), minocycline (22mg/kg), voriconazole *plus*
7 minocycline, or vehicle during five consecutive days. The rats were submitted to electroretinography
8 to monitor retinal functionality. Cholesterol and 24S-hydroxycholesterol were measured in plasma,
9 brain and retina by isotope dilution gas chromatography-mass spectrometry. The expression of
10 CYP46A1, and GFAP as a marker for glial activation in the retina and brain was analysed by Western
11 Blotting. Cytokines and chemokines were measured in plasma, vitreous, retinal and brain
12 homogenates. Voriconazole significantly impaired the functioning of the retina as exemplified by the
13 reduced amplitude and increased latency of the b-wave of the electroretinogram. Meanwhile,
14 oscillatory potentials were altered in the two voriconazole-treated groups. Voriconazole decreased
15 24S-hydroxycholesterol levels in the retina. Unexpectedly, CYP46A1 expression was increased in the
16 retina of rats from the voriconazole-treated groups. Meanwhile, GFAP expression was increased in
17 the retina and brain by voriconazole-treatments. ICAM-1 and MCP-1 showed significant increases in
18 the retina and vitreous. Minocycline did not reverse the effects of voriconazole. Our data highlighted
19 the cross talk between retinal ganglion cells and glial cells in the retina, suggesting that reduced 24S-
20 hydroxycholesterol concentration in the retina may be detected by glial cells, which were
21 consequently activated.

22

23 Key-words: Retinal ganglion cell; glia; cholesterol homeostasis; CYP46A1; voriconazole

1- Introduction

Most part of cholesterol in the neurosensory retina is present as free form. Free cholesterol accounts for 85% of total cholesterol in the neurosensory retina, the remaining consists of cholesteryl esters [1]. As recently reviewed, cholesterol levels must be tightly regulated in the retina [2]. Dysregulations of cholesterol homeostasis leading to cholesterol deficiency or accumulation have detrimental consequences on the retina and are associated with neurodegeneration. As an example, the Smith-Lemli-Opitz syndrome is an autosomal recessive disorder [3] that is due to 7-dehydrocholesterol reductase deficiency [4,5,6] and causes the inability of the cells to synthesize cholesterol. It results to the accumulation of 7-dehydrocholesterol in brain [7,8,9] and retinal neurons [10] and is associated with neurodegeneration. The opposite situation of cholesterol accumulation in Niemann-Pick type C syndrome gives a similar feature of loss of neurons in the brain [11,12] and retina [13].

Cholesterol 24S-hydroxylase (CYP46A1), cholesterol-27-hydroxylase (CYP27A1) and CYP11A1 are cholesterol-metabolizing enzymes that are involved in cholesterol homeostasis, and are expressed in the retina [14]. Cholesterol 24S-hydroxylase (CYP46A1) converts cholesterol into 24S-hydroxycholesterol (24SOH) in neurons of the central nervous system [15,16,17]. CYP46A1 expression and 24SOH are specific to neurons of the CNS [18], including inner neurons of the retina and retinal ganglion cells (RGC) [18,19]. The exact role of CYP46A1 in the retina remains partly unknown. Alike brain neurons [15,20,21], the formation of 24SOH may represent a pathway for retinal neurons to maintain the balance of cholesterol. Interestingly, in an experimental rat model of glaucoma, we found steady-states levels of CYP46A1 and 24SOH in the retina, despite the expected loss of retinal neurons and as a consequence, the expected decrease in CYP46A1 and 24SOH levels [22].

Drugs inhibiting CYP46A1 have recently been characterized [23,24]. Among them, voriconazole is an antifungal agent that belongs to the triazole class, and exhibits high affinity for CYP46A1 [23]. Voriconazole was found to transiently inhibit the activity of HMG CoA reductase and CYP46A1 in mice brain [25]. In vitro, voriconazole potentiated the activation of monocytes triggered by fungal infection, especially by up-regulating the expression of immunomodulatory genes, including TNF- α [26]. The safety of intravitreal injection of voriconazole on the function of the retina has been established in rats [27] and rabbits [28]. However different findings were reported in monkeys. Indeed when injected intravenously, voriconazole significantly impaired bipolar cell function as illustrated by abnormal – although transient and reversible – profiles of the electroretinogram (ERG) [29]. The reason for the discrepancy in the ERG data in the simian species compared to rodents and rabbits may be linked to the systemic effect of voriconazole on monocyte activation [26] that may

1 infiltrate the retina when voriconazole was used intravenously. On the contrary, such inflammatory
2 process would not occur when used intravitreally. ERG impairment may alternatively be associated
3 to the inhibition of CYP46A1 in the retinal cells that specifically express CYP46A1. Until now the role
4 of CYP46A1 in the electrophysiological response of the retinal cells remains unknown.

5 In order to better understand the role of CYP46A1 in the retina, we took advantage of voriconazole
6 as an inhibitor of CYP46A1 activity to evaluate its potential to modulate cholesterol homeostasis and
7 function in the retina. Meanwhile, minocycline was used in parallel and in addition to voriconazole to
8 inhibit monocyte activation, and therefore delineate the specific effect of voriconazole in this
9 pathway.

1 2- Materials and methods

2 All animals used in this experiment were handled according to the regulations of the Institutional
3 Animal Care Committee (University of Burgundy, Dijon, France), and all procedures adhered to the
4 tenets of the statements of the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) for the
5 use of Animals in Ophthalmic and Vision Research.

6 2.1. Voriconazole and minocycline administration

7 In this experiment a total of 50 male Wistar rats at 7 to 8 weeks of age were delivered by Janvier
8 breedings (Le Genest Saint Isle, France). The animals were maintained under specific pathogen-free
9 conditions of temperature ($22 \pm 1^\circ\text{C}$), hygrometry (55–60%) and light (50 lux-light on from 07:00 am
10 to 07:00 pm). The rats ($n=10-15$ on the basis of two to three repeated experiments with $n=5$ per
11 group) received daily intraperitoneal injections of either voriconazole (Vor) (60 mg/kg in PBS 1x, once
12 a day, $n=15$) (Pfizer, Groton, USA), minocycline (Mino) (22 mg/kg in PBS 1x, once a day, $n=10$)
13 (Minocycline hydrochloride, Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France), voriconazole *plus*
14 minocycline (Vor+Mino) (60 and 22 mg/kg respectively in PBS 1x, $n=10$), or vehicle (approx. 0.2 mL
15 PBS 1x, once a day, $n=15$) during five consecutive days.

16 2.2. Electroretinography

17 The rats were submitted to electroretinography (ERG). Before ERG recordings, the rats were dark-
18 adapted for at least 12 h. All further procedures were carried out under dim red light ($\lambda=650$ nm) and
19 at a constant temperature of 25°C . Anaesthesia was induced by intraperitoneal injection of ketamine
20 (50 mg/kg, Imalgène® 1000, Merial, Lyon, France) and xylazine (10 mg/kg, Rompun® 2%, Bayer,
21 Puteau, France). The pupils were dilated with 0.5% tropicamide (Ciba Vision Ophthalmics, Blagnac,
22 France). Hydroxymethylcellulose (Humigel®, Virbac, Carros, France) was topically applied on corneas
23 to ensure good electrical contact and to keep the eye hydrated during the entire procedure. After
24 10 min, rats were positioned in a warming plate that maintained a constant body temperature, and
25 the corneal electrodes were put in place. The ERG was recorded via corneal electrodes (thin gold
26 wire with a 3-mm ring end) and reference and ground electrodes (silver needle) placed on the
27 forehead and tail, respectively. The recording setup featured a Ganzfeld bowl, an amplifier, and a
28 computer-based control and recording unit (RETI port/scan 21, Stasche & Finger GmbH, Roland
29 Consult, Brandenburg, Germany). ERG responses were recorded from both eyes simultaneously after
30 the rats were placed in the Ganzfeld bowl.

31 The band-pass filter width was 1–300 Hz for the recording procedure of scotopic single-flash
32 responses. Stimuli of the scotopic single-flash were recorded with ten increasing intensities from
33 0.0003 cd.s/m² to 10 cds/m². These responses were averaged with an inter-stimulus interval of 5 s

1 (from 1 to 10 cd.s/m²) or 17 s (up to 0.3 cd.s/m²). The band-pass filter width was 0.2-30 Hz for the
2 recording procedure of scotopic threshold responses (STR). Stimuli of the STR were recorded with
3 three increasing intensities: -4.60log, -4.32log and -4.02log cd.s/m². An inter-stimulus interval of 2 s
4 was used between these stimuli. For the oscillatory potentials (OPs) recording, the band-pass filter
5 width was 200-500 Hz. One single stimulus was applied at 0.06 Hz. The inter-stimuli interval was
6 about 17 s. After amplification, the signal was digitized and processed. Ten animals were considered
7 per group.
8 Scotopic and photopic responses were recorded, a- and b-waves amplitudes and latencies were
9 analyzed as previously described [30,31,32]. OPs were also recorded as previously published [33,34]
10 and analyzed on the basis of means of amplitude and time-latency measures of each of the four
11 typically characterized peaks (P1 to P4) [35,36].

12 2.3. Samples processing

13 After ERG recordings, rats were euthanized and enucleated. Five milliliters of blood were taken by
14 aortic puncture in EDTA tubes and plasma was prepared by 15-min centrifugation at 3 000 rpm at
15 4°C. The retinas were carefully dissected after excision of the anterior segment of the eyes. Vitreous
16 of both eye was collected and pooled for each animal (n=10 per group). All retinas were then
17 carefully dissected from the underlying choroid and sclera. For each animal, one retina was stored at
18 -20°C in 2 mL 1M KOH for 24SOH and cholesterol quantification (n=10 per group) (see paragraph
19 2.4). The other retina was snap-frozen at -80°C until whole protein extraction (n=10 per group). The
20 retinal lysates were further divided for cytokines/chemokines quantification (see paragraph 2.5) and
21 western blotting (see paragraph 2.6). Brains were dissected from the skulls and sagittally divided in
22 two parts. One half-brain was stored in 5 mL Folch solution (chloroform/methanol, 2:1, v/v) for
23 24SOH and cholesterol quantification (n=10 per group) (see paragraph 2.4) and 10 mg cortex was
24 used for cytokines/chemokines quantification (see paragraph 2.5) and western blotting (n=10 per
25 group) (see paragraph 2.6).

26 2.4. Quantification of cholesterol and 24-hydroxycholesterol in the retina, brain and plasma

27 Cholesterol and 24SOH were quantified in retina (n=10 per group), plasma (n=10 × 1 mL per group)
28 and a half-brain (n=10 per group) using authentic internal standards: 5 α -cholestane for cholesterol
29 quantification by gas chromatography flame ionization detection, and deuterated racemic [23,23,24-
30 ²H₃]-24-hydroxycholesterol (generous gift from Pr Ingemar Björkhem, Karolinska Institutet,
31 Stockholm, Sweden) for 24SOH quantification by isotope dilution GC-MS as previously described
32 [20,37,38]. Total lipids were first extracted from the brains which were homogenized in 20 mL of
33 Folch solution + 4 mL 0.9% NaCl. After 3 min centrifugation at 3 000 g, the organic phase was

1 removed and the solvent was evaporated to dryness. Total lipids were then resuspended in 10 mL
2 chloroform. An aliquot of 100 μ L of total brain lipids was used for quantification of cholesterol and
3 24SOH using 10 μ g of 5 α -cholestane and 150 ng of [23,23,24- 2 H $_3$]-24OH. For retinas and plasmas, 100
4 ng of [23,23,24- 2 H $_3$]-24OH was added to the samples that were submitted to alkaline hydrolysis in 5
5 mL of 1M KOH for 2 h. The solution was neutralized with 65 μ L of phosphoric acid and the sterols
6 were extracted with 9 mL of chloroform in the presence of 3 mL of 0.9% NaCl. The organic phase was
7 removed and the solvent was evaporated to dryness. The sterols were dissolved in 1 mL of toluene. A
8 100 μ L-aliquot was taken for quantification of cholesterol. For this purpose, 5 μ g of 5 α -cholestane
9 were added, and the solvents were evaporated to dryness. The sterols were derivatized to
10 trimethylsilyl ethers by heating at 60°C after the addition of 200 μ L of pyridine and 200 μ L of BSTFA
11 (Supelco, Bellefonte, PA, USA). The solvents were evaporated under nitrogen gas and the samples
12 were resuspended in hexane and analyzed by gas chromatography-flame ionization detector (GC-FID,
13 Ezychrom, Hewlett-Packard HP4890A). A 1 μ L-aliquot was injected by automated injection in a
14 splitless mode at an injection temperature of 300°C on a DB-5MS fused silica capillary column (30 m
15 $\times$ 0.25 mm id, 0.25 μ m film thickness; J&W Scientific, Agilent Technologies, Massy, France). The initial
16 oven temperature was kept at 50°C for 1 min, then it was increased at a rate of 20°C.min $^{-1}$ to 250°C
17 and thereafter at 5°C.min $^{-1}$ to a final temperature of 300°C. The remaining 900 μ L of the saponified
18 sterols was purified on silica columns (Supelco) for quantification of 24SOH. Removal of cholesterol
19 was first achieved by elution with 8 mL of 0.5% isopropanol in hexane. Purified oxysterols were
20 subsequently eluted with 5 mL of 30% isopropanol in hexane and processed for derivatization as
21 described above. Trimethylsilyl ethers were measured by gas chromatography-mass spectrometry
22 (QP2010, Shimadzu, Japan). For this purpose, a 1 μ L-aliquot was injected into silica columns and
23 processed as described above. The temperature of the transfer line was kept at 300°C. Electron
24 impact ionization was employed at 70 eV ionization energy. 24SOH and deuterated 24SOH were
25 measured at m/z 413 and 416 amu, respectively. Absolute amounts of 24SOH were determined by
26 interpolation from a standard curve generated in each experiment using unlabelled 24-
27 hydroxycholesterol. Unlabelled 24-hydroxycholesterol (racemic mixture of 24S- and 24R-
28 hydroxycholesterol) was synthesized in our own facilities. The purity and chemistry of the
29 synthesized molecules was checked by 1 H and 13 C-NMR and GC-MS and reached 99.7% (data from
30 GC-MS not shown).

31

1 2.5. Quantification of cytokines, chemokines and growth factors in plasma, vitreous humor,
2 retina and cortex homogenates

3 IL6, MCP-1, VEGF, IL1 β , ICAM-1 and TNF α were quantified simultaneously in plasma, vitreous humor,
4 retinal and brain homogenates with Procarta[®] Cytokine Assay kit (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA).
5 Retinas and brain lysates were first obtained as follows: one retina or 10 mg of cortex in 100 μ L or
6 150 μ L respectively of Procarta[®] lysis buffer, were homogenized on a Tissue Lyser (Qiagen, Venlo,
7 Limbourg, the Netherlands) with 3 mm carbide-tungsten beads (Qiagen) at 30 Hz for 1 min 30 s or 3
8 min for retinas or brains respectively. Then samples were centrifuged 10 min at 4°C and lysates were
9 processed for the assay. Following the supplier's instructions, 25 μ L of plasma diluted by half in PBS
10 0.1% BSA, 25 μ L of vitreous humor diluted by four in PBS 0.1% BSA and 25 μ L of retina and brain
11 homogenates were used for the quantification. Cytokines and chemokines were measured in all
12 samples by Luminex[®] technology based on flow cytometry. The raw data of the multiplex
13 immunoassays were then analyzed with the BioPlex[®] software (BioRad Laboratories, Hercules, CA,
14 USA). Whole protein concentrations were measured in all samples using the bicinchoninic acid assay
15 (BCA) at 544 nm (Pierce, Rockford, MD, USA). The levels of cytokines and growth factors were
16 expressed as picograms per milligram of total proteins.

17 2.6. Evaluation of CYP46A1 and GFAP expression levels in the retina and the cortex

18 Twenty five micrograms of proteins from retina and cortex were boiled during 5 min in 4 $\times$ Laemmli
19 buffer and stored at -20°C. Then the samples were subjected to electrophoresis (Mini-Protein IV
20 system, BioRad, Hercules, CA, USA) on a 10% SDS-PAGE gel at 120 V. Proteins were then transferred
21 on a nitrocellulose membrane (Hybond-ECL, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) for 1 h at 100
22 mA.

23 GFAP staining was detected as follows. The membranes were blocked 2 h at room temperature in 5%
24 fat-free dry milk with 1 $\times$ PBS 0.1% Tween 20, prior to the step of incubation for 2 h with primary anti-
25 GFAP antibody (dilution 1:2 000 in the blocking buffer, clone N-18 rabbit polyclonal antibody; Santa
26 Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA), and washing five times in 1 $\times$ PBS 0.1% Tween 20
27 followed by 1 h incubation at room temperature with the peroxidase-conjugated goat anti-rabbit
28 antibody (dilution: 1:4 000, DakoCytomation). The membranes were then washed five times in 1 $\times$
29 PBS 0.1% Tween 20 before signal detection, as described below.

30 For the detection of CYP46A1, membranes were blocked in 10% fat-free dry milk with 1 $\times$ PBS 0.1%
31 Tween 20. Immunostaining with the monoclonal mouse anti-CYP46 (dilution 1:400, clone 1F11, Santa
32 Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA) was carried out by an overnight incubation at 4°C.

1 Membranes were washed five times with 1× PBS 0.1% Tween 20 and incubated with a goat anti-
2 mouse HRP-linked antibody (dilution 1:4 000, DakoCytomation) for 90 min at room temperature. The
3 signal was quantified by comparison with β -tubulin as a gel-loading control ($n=10$ per group). For that
4 purpose, the membrane was restored with the Western blot stripping buffer (Thermo Scientific,
5 Kalamazoo, MI, USA) for 30 min at room temperature. After two washes in 1× PBS 0.1% Tween 20,
6 the membranes were incubated for 45 min with monoclonal mouse anti- β -tubulin (dilution 1:4 000,
7 Zymed Laboratories, South San Francisco, CA, USA), washed five times in 1× PBS 0.1% Tween 20, and
8 revealed with a goat anti-mouse HRP-linked secondary antibody (dilution 1:5 000, DakoCytomation)
9 for 45 min. Detection of the chemiluminescent signal was processed with the Western lightning-ECL
10 plus kit (PerkinElmer, Waltham, MA, USA). The signal was submitted to a BioRad molecular imager
11 Chemidoc XRS+ System to quantify protein levels with Bio-Rad Image Lab software 2.0.1.

12 *2.7. Statistical analyses*

13 A nonparametric Kruskal-Wallis test was used to compare proteins expression levels,
14 24SOH/cholesterol amounts, cytokines and chemokines between groups (vehicle, Vor, Mino,
15 Vor+Mino). The relationship between each outcome (GFAP, CYP46A1, 24SOH, cytokines and
16 chemokines) and each of the explanatory variables (sample and group) was modeled as a generalized
17 estimating equation (GEE), to account for the correlated nature of the data. A robust variance
18 estimator was used. The explanatory variables – sample (plasma, vitreous, retina and brain) and
19 group (no intervention or intervention) – were binary coded. Dunn's comparison test was used. All
20 analyses were conducted using STATA version 12.0 (STATA CORP, College Station, TX, USA). The level
21 of statistical significance was set at $p<0.05$ and the tests were two-tailed.

3- Results

3.1. Impairment of retinal functionality

The analysis of the scotopic single flash ERG showed that voriconazole injected alone or with minocycline significantly impaired the functioning of the inner retina as exemplified by the reduced b-wave amplitude (Figure 1). ERG b-wave latency was unaffected by voriconazole. None of the ERG parameters exhibited any variation after minocycline injected alone compared to the control group. The a-wave amplitude was unaffected by any treatment compared to control, whereas a-wave latency was slightly but not significantly increased after Vor and Vor+Mino injections (data not shown). OPs were altered in the groups of animals injected with Vor, and Vor+Mino, especially when considering P2 and P3 peaks and the sum of the four individual OPs ($p < 0.0001$, Figure 2). Our recordings revealed a significant alteration of the pSTR with voriconazole. Indeed, on the contrary to the expected increase in pSTR amplitude as a function of light stimulus intensity observed in controls animals, pSTR amplitudes did not increase in animals treated with Vor alone and Vor+Mino. At higher light intensities of $-4.32 \log$ and $-4.02 \log$ cds/m², pSTR were significantly decreased ($p < 0.0002$) in Vor+Mino group. nSTR were significantly decreased at $-4.02 \log$ cds/m² in Vor+Mino groups ($p < 0.0002$). At the lower intensity ($-4.60 \log$ cds/m²), pSTR were significantly decreased in Vor group only ($p < 0.05$). The histogram in the figure 2b shows the mean amplitude obtained for pSTR and nSTR. The slope of the increase of pSTR amplitude as a function of light intensity in vehicle was about 15.8 ($R^2 = 0.913$) which is almost equivalent to that of the minocycline group (14.0; $R^2 = 0.997$), whereas in groups treated with voriconazole, slopes values were lower (1.8; $R^2 = 0.989$ and -0.3 ; $R^2 = 0.015$ in Vor and Vor+Mino groups, respectively). Slopes for nSTR in vehicle and minocycline groups gave similar values (15.7; $R^2 = 0.905$ and 14.9; $R^2 = 0.855$) and lower slopes in voriconazole-treated groups (10.2; $R^2 = 0.7021$ and 8.2; $R^2 = 0.556$ in Vor and Vor+Mino groups, respectively). These calculations reinforce our findings about alterations of STR in voriconazole-treated groups. Time latencies of the pSTR and nSTR were unaffected by the treatments (data not shown).

3.2. Dysregulation of cholesterol homeostasis

24SOH levels decreased by 37% ($p < 0.05$) and 25% (not significant) in the retina of Vor and Vor+Mino groups, respectively, compared to the control group (Figure 3). In the brain, 24SOH levels were unaffected by the Vor treatment but were decreased by 43% in the Vor+Mino group ($p < 0.001$, Figure 3). Plasma 24SOH concentrations were significantly decreased by 45% ($p < 0.005$) in the Vor+Mino groups, 18% and 16% in the Vor and Mino groups respectively (not significant, Figure 3). Moreover, minor changes in cholesterol levels were found in the retina: -12% in Vor+Mino group ($p < 0.05$) compared to Vor group in which levels reached +18% of the value in the group injected with vehicle (not significant, Figure 3).

1 3.3. *Up-regulation of CYP46A1 and GFAP expression in the retina and cortex*

2 CYP46A1 expression was increased in the retina and cortex of the Vor group (x1.4 and 1.2,
3 respectively, compared to the control) and in the Vor+Mino group (x1.7 and x1.3, respectively,
4 compared to the control) but the differences were not significant (Figure 4). Meanwhile, GFAP
5 expression was raised by a factor of 2.7 and 4.3 in the retina ($p<0.05$) and 1.8 and 1.6 in the cortex
6 (not significant), after Vor and Vor+Mino treatments respectively, compared to the controls (Figure
7 4). Interestingly, the levels of CYP46A1 expression in the retina and the cortex were positively
8 associated ($r^2=0.241$; $p=0.0013$). The same positive association was observed between CYP46A1 and
9 GFAP expression in the retina ($r^2=0.298$, $p=0.0003$).
10 Minocycline did not reverse the effects of voriconazole. CYP46A1 and the retina and cortex GFAP
11 expression remained unaffected by minocycline injection compared to vehicle.

12 3.4. *Measurement of cytokines, chemokines and growth factors in plasma, vitreous humor,*
13 *retina and cortex homogenates*

14 Voriconazole significantly increased plasma MCP-1 concentration by 1.5-fold, and decreased VEGF
15 levels by 65% in the vitreous. Minocycline decreased by half $\text{TNF}\alpha$ in the cortex. The most
16 tremendous effects were found after Vor+Mino treatment. MCP-1 and ICAM-1 levels were
17 significantly increased 2.3-fold in the retina and 12-fold in the vitreous compared to vehicle. IL6 was
18 also significantly increased in the vitreous of Vor+Mino groups (x12.5) compared to vehicle (data not
19 shown).

1 4- Discussion

2 Pikuleva and co-authors recently defined that azoles bind CYP46A1 [23,39]. Among them,
3 voriconazole was an efficient inhibitor of CYP46A1 but also of cholesterol biosynthesis in mice brain
4 [25]. Until now the question about similar effects of this molecule in the retina remained unknown.
5 Similar to the brain, CYP46A1 is specifically expressed in neurons of the neural retina [19], on the
6 contrary to other CYP450 enzymes, such as CYP27A1 and CYP11A1 which are expressed in the retina
7 but are not specific to neurons [14]. Voriconazole has been incriminated in transient visual
8 disturbances. Intravitreal injection of voriconazole is recommended in the treatment of fungal
9 endophthalmitis and its innocuity was demonstrated in the rat [27] and the rabbit [28]. Different
10 findings were reported in monkeys. When injected intravenously, voriconazole significantly
11 impaired bipolar cell function, although this effect was transient and reversible [29]. The reason for
12 the discrepancy in the ERG data may be linked to the systemic effect of voriconazole on monocyte
13 activation that may infiltrate the retina and alter retinal function when voriconazole was used
14 intravenously. On the contrary, such inflammatory process would not occur when used
15 intravitreally.

16 In our model, voriconazole efficiently impaired the functioning of the inner retina as demonstrated
17 by the tremendous reduction of the ERG b-wave amplitude and drastic alteration of the OPs. Similar
18 data were obtained by Kinoshita *et al.* [29] who demonstrated the transient inhibitory effects of this
19 azole in monkeys. In their model, voriconazole especially targeted bipolar cells as demonstrated by
20 the reduction or even disappearance of the b-wave. Similar to Kinoshita's, we found that
21 photoreceptors were unaffected by the treatment as judged by the absence of effect on a-wave
22 amplitude. The STR recordings showed significant alterations, whereas nSTR were not or at least not
23 significantly affected. Cuenca *et al.* [40] pointed out the relevance to interpret pSTR rather than
24 nSTR. Vidal-Sanz has been a pioneer in the evaluation of STRs in its models of acute RGC loss which
25 surmised the use of STRs to assess RGC dysfunction [35,36]. Our data clearly highlighted that the
26 inhibition of CYP46A1 in RGC which specifically expressed CYP46A1 [18,19] impaired RGC function.
27 Therefore, cholesterol homeostasis seems needed for a proper RGC function.

28 The level of CYP46A1 expression in the retina was slightly but not significantly increased in Vor and
29 Vor+Mino groups, when compared to the control group. Meanwhile GFAP protein was significantly
30 up-regulated in Vor and Vor+Mino groups, suggesting that the inhibition of CYP46A1 activity
31 triggered glial reactivity. Consistently, we found a positive association between CYP46A1 and GFAP
32 expression levels in the retina. This is in accordance with our previous work in a rat model of
33 glaucoma since we suggested that retinal glial cells were able to express CYP46A1 in order to
34 counterbalance the suffering or loss of RGC [22]. Again, as we previously reported [22], the reduction

1 of 24SOH in the retina was associated with up-regulation of GFAP and CYP46A1. Our interpretation is
2 that retinal glial cells could be able to detect the changes of 24SOH concentration in the retina by
3 over-expressing CYP46A1. The Vor-induced decrease in 24SOH levels observed in the retina but not
4 in the brain can be linked to the greater permeability of the blood-retinal barrier to voriconazole
5 compared to the blood-brain barrier, as previously observed by our group with dietary fatty acids
6 [41]. Of note, 24SOH diminished in the brain and plasma of rats injected with Vor+Mino. Accounting
7 the almost exclusive cerebral origin of 24SOH, the reduction in plasma 24SOH levels is consistent
8 with similar reduced levels in the brain.

9 In combination with minocycline voriconazole had marked effects on the inflammatory status of the
10 retina and vitreous, as exemplified by increased levels of MCP-1, and GFAP signal in the retina.
11 Müller cells are major producers of MCP-1 in the retina that is able to attract microglial cells and
12 monocytes/macrophages upon retinal stress [42,43]. Our data revealed that the inhibition of
13 microglia by minocycline exacerbated the effects of voriconazole on the activation of glia and up-
14 regulation of CYP46A1 in the retina. Some studies reported the protective effects of microglial
15 inhibition by minocycline in glaucoma, diabetic retinopathy or even photoreceptor loss [44,45,46].
16 Inhibition of microglial activation might be a therapeutic strategy to slow RGC loss [47]. Accounting
17 the enhanced macroglial reactivity and inflammatory markers in the retina and vitreous after
18 voriconazole and minocycline treatment, the neuroprotective effect of microglial inhibition by
19 minocycline may be hampered by CYP46A1 inhibition. Further ongoing experiments will define the
20 consequences of inhibiting CYP46A1 activity in the course of RGC loss in glaucoma models.

21 Interestingly we found that voriconazole injected alone or in combination with minocycline
22 significantly decreased intravitreal VEGF levels ($p=0.002$). Similarly itraconazole, an analog of
23 voriconazole, was found to inhibit endothelial cell proliferation and VEGF expression. This effect was
24 restored by cholesterol treatment via the shh pathway [48,49,50,51] which is also of importance in
25 cholesterol transport in the cells [52].

26

27 Our study supports the role of CYP46A1 in the maintenance of RGC function. Dysregulation of
28 cholesterol homeostasis by voriconazole impaired inner retinal neurons and RGC response. Our data
29 also highlighted the cross talk between RGC and glial cells in the retina by suggesting that reduced
30 24SOH concentration in the retina may be detected by glial cells, which were consequently activated.
31 Our work also showed for the first time a close interaction between cholesterol homeostasis in the
32 retina and microglia.

1 **Acknowledgements**

2 Voriconazole was obtained from Pfizer laboratories. We acknowledge the fruitful collaboration with
3 Laboratoires Fournier/Solvay/Abbott (Daix, France) for multiplex analysis of cytokines (Luc Lebreton,
4 Jocelyne Annat, Séverine Delaporte). We are grateful to our animal house staff, Bruno Pasquis,
5 Laurence Decoq and Elise Lalarme to take care on animals. Parts of this work were presented at the
6 2011 Annual Meeting of ARVO (Association for Research in Vision & Ophthalmology, Fort Lauderdale,
7 FL, USA) [53], and at the first 2011 Symposium of ENOR (European Network on Oxysterols Research)
8 (Münich, Germany).

9 No author has any financial and commercial relationship related to this work to disclose.

1 **References**

- 2 [1] Bretillon L, Thuret G, Gregoire S, Acar N, Joffre C, Bron AM, et al. Lipid and fatty acid profile of the
3 retina, retinal pigment epithelium/choroid, and the lacrimal gland, and associations with
4 adipose tissue fatty acids in human subjects. *Exp Eye Res* 2008;87:521-8.
- 5 [2] Fliesler SJ and Bretillon L. The ins and outs of cholesterol in the vertebrate retina. *J Lipid Res*
6 2010;51:3399-413.
- 7 [3] Opitz JM. RSH/SLO ("Smith-Lemli-Opitz") syndrome: historical, genetic, and developmental
8 considerations. *Am J Med Genet* 1994;50:344-6.
- 9 [4] Irons M (1993). Smith-Lemli-Opitz Syndrome. GeneReviews. R. A. Pagon, T. D. Bird, C. R. Dolan, K.
10 Stephens and M. P. Adam. Seattle (WA).
- 11 [5] Irons M, Elias ER, Tint GS, Salen G, Frieden R, Buie TM, et al. Abnormal cholesterol metabolism in
12 the Smith-Lemli-Opitz syndrome: report of clinical and biochemical findings in four patients and
13 treatment in one patient. *Am J Med Genet* 1994;50:347-52.
- 14 [6] Tint GS, Irons M, Elias ER, Batta AK, Frieden R, Chen TS, et al. Defective cholesterol biosynthesis
15 associated with the Smith-Lemli-Opitz syndrome. *N Engl J Med* 1994;330:107-13.
- 16 [7] Xu L, Mirnics K, Bowman AB, Liu W, Da J, Porter NA, et al. DHCEO accumulation is a critical
17 mediator of pathophysiology in a Smith-Lemli-Opitz syndrome model. *Neurobiol Dis*
18 2012;45:923-9.
- 19 [8] Jiang XS, Backlund PS, Wassif CA, Yergey AL and Porter FD. Quantitative proteomics analysis of
20 inborn errors of cholesterol synthesis: identification of altered metabolic pathways in DHCR7
21 and SC5D deficiency. *Mol Cell Proteomics* 2010;9:1461-75.
- 22 [9] Solca C, Pandit B, Yu H, Tint GS and Patel SB. Loss of apolipoprotein E exacerbates the neonatal
23 lethality of the Smith-Lemli-Opitz syndrome mouse. *Mol Genet Metab* 2007;91:7-14.
- 24 [10] Kretzer FL, Hittner HM and Mehta RS. Ocular manifestations of the Smith-Lemli-Opitz syndrome.
25 *Arch Ophthalmol* 1981;99:2000-6.
- 26 [11] Paul CA, Boegle AK and Maue RA. Before the loss: neuronal dysfunction in Niemann-Pick Type C
27 disease. *Biochim Biophys Acta* 2004;1685:63-76.
- 28 [12] Phillips SE, Woodruff EA, 3rd, Liang P, Patten M and Broadie K. Neuronal loss of *Drosophila*
29 NPC1a causes cholesterol aggregation and age-progressive neurodegeneration. *J Neurosci*
30 2008;28:6569-82.
- 31 [13] Claudepierre T, Paques M, Simonutti M, Buard I, Sahel J, Maue RA, et al. Lack of Niemann-Pick
32 type C1 induces age-related degeneration in the mouse retina. *Mol Cell Neurosci* 2010;43:164-
33 76.

- 1 [14] Mast N, Reem R, Bederman I, Huang S, DiPatre PL, Bjorkhem I, et al. Cholestenic Acid is an
2 important elimination product of cholesterol in the retina: comparison of retinal cholesterol
3 metabolism with that in the brain. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011;52:594-603.
- 4 [15] Björkhem I, Lütjohann D, Breuer O, Sakinis A and Wennmalm A. Importance of a novel oxidative
5 mechanism for elimination of brain cholesterol. Turnover of cholesterol and 24(S)-
6 hydroxycholesterol in rat brain as measured with $^{18}\text{O}_2$ techniques in vivo and in vitro. *J Biol*
7 *Chem* 1997;272:30178-84.
- 8 [16] Russell DW, Halford RW, Ramirez DM, Shah R and Kotti T. Cholesterol 24-hydroxylase: an
9 enzyme of cholesterol turnover in the brain. *Annu Rev Biochem* 2009;78:1017-40.
- 10 [17] Bjorkhem I. Crossing the barrier: oxysterols as cholesterol transporters and metabolic
11 modulators in the brain. *J Intern Med* 2006;260:493-508.
- 12 [18] Ramirez DM, Andersson S and Russell DW. Neuronal expression and subcellular localization of
13 cholesterol 24-hydroxylase in the mouse brain. *J Comp Neurol* 2008;507:1676-93.
- 14 [19] Bretillon L, Diczfalusy U, Bjorkhem I, Maire MA, Martine L, Joffre C, et al. Cholesterol-24S-
15 hydroxylase (CYP46A1) is specifically expressed in neurons of the neural retina. *Curr Eye Res*
16 2007;32:361-6.
- 17 [20] Björkhem I, Lütjohann D, Diczfalusy U, Stahle L, Ahlborg G and Wahren J. Cholesterol
18 homeostasis in human brain: turnover of 24S-hydroxycholesterol and evidence for a cerebral
19 origin of most of this oxysterol in the circulation. *J Lipid Res* 1998;39:1594-600.
- 20 [21] Bjorkhem I and Meaney S. Brain cholesterol: long secret life behind a barrier. *Arterioscler*
21 *Thromb Vasc Biol* 2004;24:806-15.
- 22 [22] Fourgeux C, Martine L, Pasquis B, Maire MA, Acar N, Creuzot-Garcher C, et al. Steady-state levels
23 of retinal 24S-hydroxycholesterol are maintained by glial cells intervention after elevation of
24 intraocular pressure in the rat. *Acta Ophthalmol* 2012;Sep 23. doi: 10.1111/j.1755-
25 3768.2012.02490.
- 26 [23] Mast N, Charvet C, Pikuleva IA and Stout CD. Structural basis of drug binding to CYP46A1, an
27 enzyme that controls cholesterol turnover in the brain. *J Biol Chem* 2010;285:31783-95.
- 28 [24] Mast N, Norcross R, Andersson U, Shou M, Nakayama K, Bjorkhem I, et al. Broad substrate
29 specificity of human cytochrome P450 46A1 which initiates cholesterol degradation in the brain.
30 *Biochemistry* 2003;42:14284-92.
- 31 [25] Shafaati M, Mast N, Beck O, Nayef R, Heo GY, Bjorkhem-Bergman L, et al. The antifungal drug
32 voriconazole is an efficient inhibitor of brain cholesterol 24S-hydroxylase in vitro and in vivo. *J*
33 *Lipid Res* 2010;51:318-23.

- 1 [26] Simitsopoulou M, Roilides E, Likartsis C, Ioannidis J, Orfanou A, Paliogianni F, et al. Expression of
2 immunomodulatory genes in human monocytes induced by voriconazole in the presence of
3 *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2007;51:1048-54.
- 4 [27] Gao H, Pennesi ME, Shah K, Qiao X, Hariprasad SM, Mieler WF, et al. Intravitreal voriconazole: an
5 electroretinographic and histopathologic study. *Arch Ophthalmol* 2004;122:1687-92.
- 6 [28] Harrison J, Glickman R, Ballentine C, Trigo Y, Pena M, Kurian P, et al. Retinal Function Assessed
7 by ERG Before and After Induction of Ocular Aspergillosis and Treatment by the Anti-fungal,
8 Micafungin, in Rabbits. *Doc Ophthalmol* 2005;110:37-55.
- 9 [29] Kinoshita J, Iwata N, Ohba M, Kimotsuki T and Yasuda M. Mechanism of voriconazole-induced
10 transient visual disturbance: reversible dysfunction of retinal ON-bipolar cells in monkeys. *Invest*
11 *Ophthalmol Vis Sci* 2011;52:5058-63.
- 12 [30] Bretillon L, Acar N, Seeliger MW, Santos M, Maire MA, Juaneda P, et al. ApoB100,LDLR-/- mice
13 exhibit reduced electroretinographic response and cholesteryl esters deposits in the retina.
14 *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008;49:1307-14.
- 15 [31] Jaissle GB, May CA, Reinhard J, Kohler K, Fauser S, Lutjen-Drecoll E, et al. Evaluation of the
16 rhodopsin knockout mouse as a model of pure cone function. *Invest Ophthalmol Vis Sci*
17 2001;42:506-13.
- 18 [32] Schnebelen C, Pasquis B, Salinas-Navarro M, Joffre C, Creuzot-Garcher CP, Vidal-Sanz M, et al. A
19 dietary combination of omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids is more efficient than
20 single supplementations in the prevention of retinal damage induced by elevation of intraocular
21 pressure in rats. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2009;247:1191-203.
- 22 [33] Hancock HA and Kraft TW. Oscillatory potential analysis and ERGs of normal and diabetic rats.
23 *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45:1002-8.
- 24 [34] Wachtmeister L. Oscillatory potentials in the retina: what do they reveal. *Prog Retin Eye Res*
25 1998;17:485-521.
- 26 [35] Alarcon-Martinez L, Aviles-Trigueros M, Galindo-Romero C, Valiente-Soriano J, Agudo-Barriuso
27 M, Villa Pde L, et al. ERG changes in albino and pigmented mice after optic nerve transection.
28 *Vision Res* 2010;50:2176-87.
- 29 [36] Alarcon-Martinez L, de la Villa P, Aviles-Trigueros M, Blanco R, Villegas-Perez MP and Vidal-Sanz
30 M. Short and long term axotomy-induced ERG changes in albino and pigmented rats. *Mol Vis*
31 2009;15:2373-83.
- 32 [37] Fourgeux C, Martine L, Bjorkhem I, Diczfalusy U, Joffre C, Acar N, et al. Primary open-angle
33 glaucoma: association with cholesterol 24S-hydroxylase (CYP46A1) gene polymorphism and
34 plasma 24-hydroxycholesterol levels. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009;50:5712-7.

- 1 [38] Breuer O and Bjorkhem I. Use of an $^{18}O_2$ inhalation technique and mass isotopomer distribution
2 analysis to study oxygenation of cholesterol in rat. Evidence for in vivo formation of 7-oxo-, 7
3 beta-hydroxy-, 24-hydroxy-, and 25-hydroxycholesterol. *J Biol Chem* 1995;270:20278-84.
- 4 [39] Mast N, White MA, Bjorkhem I, Johnson EF, Stout CD and Pikuleva IA. Crystal structures of
5 substrate-bound and substrate-free cytochrome P450 46A1, the principal cholesterol
6 hydroxylase in the brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:9546-51.
- 7 [40] Cuenca N, Pinilla I, Fernandez-Sanchez L, Salinas-Navarro M, Alarcon-Martinez L, Aviles-Trigueros
8 M, et al. Changes in the inner and outer retinal layers after acute increase of the intraocular
9 pressure in adult albino Swiss mice. *Exp Eye Res* 2010;91:273-85.
- 10 [41] Acar N, Bonhomme B, Joffre C, Bron AM, Creuzot-Garcher C, Bretillon L, et al. The retina is more
11 susceptible than the brain and the liver to the incorporation of trans isomers of DHA in rats
12 consuming trans isomers of alpha-linolenic acid. *Reprod Nutr Dev* 2006;46:515-25.
- 13 [42] Nakazawa T, Hisatomi T, Nakazawa C, Noda K, Maruyama K, She H, et al. Monocyte
14 chemoattractant protein 1 mediates retinal detachment-induced photoreceptor apoptosis. *Proc*
15 *Natl Acad Sci U S A* 2007;104:2425-30.
- 16 [43] Rutar M, Natoli R, Valter K and Provis JM. Early Focal Expression of the Chemokine Ccl2 by
17 Muller Cells during Exposure to Damage-Inducing Bright Continuous Light. *Invest Ophthalmol Vis*
18 *Sci* 2011;52:2379-88.
- 19 [44] Krady JK, Basu A, Allen CM, Xu Y, LaNoue KF, Gardner TW, et al. Minocycline reduces
20 proinflammatory cytokine expression, microglial activation, and caspase-3 activation in a rodent
21 model of diabetic retinopathy. *Diabetes* 2005;54:1559-65.
- 22 [45] Levkovitch-Verbin H, Kalev-Landoy M, Habot-Wilner Z and Melamed S. Minocycline delays death
23 of retinal ganglion cells in experimental glaucoma and after optic nerve transection. *Arch*
24 *Ophthalmol* 2006;124:520-6.
- 25 [46] Zhang C, Lei B, Lam TT, Yang F, Sinha D and Tso MO. Neuroprotection of photoreceptors by
26 minocycline in light-induced retinal degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45:2753-9.
- 27 [47] Bosco A, Inman DM, Steele MR, Wu G, Soto I, Marsh-Armstrong N, et al. Reduced retina
28 microglial activation and improved optic nerve integrity with minocycline treatment in the
29 DBA/2J mouse model of glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008;49:1437-46.
- 30 [48] Del Carratore R, Carpi A, Beffy P, Lubrano V, Giorgetti L, Maserti BE, et al. Itraconazole inhibits
31 HMEC-1 angiogenesis. *Biomed Pharmacother* 2012;66:312-7.
- 32 [49] Nacev BA, Grassi P, Dell A, Haslam SM and Liu JO. The antifungal drug itraconazole inhibits
33 vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR2) glycosylation, trafficking, and signaling in
34 endothelial cells. *J Biol Chem* 2011;286:44045-56.

- 1 [50] Shi W, Nacev BA, Aftab BT, Head S, Rudin CM and Liu JO. Itraconazole side chain analogues:
2 structure-activity relationship studies for inhibition of endothelial cell proliferation, vascular
3 endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR2) glycosylation, and hedgehog signaling. *J Med*
4 *Chem* 2011;54:7363-74.
- 5 [51] Xu J, Dang Y, Ren YR and Liu JO. Cholesterol trafficking is required for mTOR activation in
6 endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:4764-9.
- 7 [52] Bidet M, Joubert O, Lacombe B, Ciantar M, Nehme R, Mollat P, et al. The hedgehog receptor
8 patched is involved in cholesterol transport. *PLoS One* 2011;6:e23834.
- 9 [53] Fourgeux C, Martine L, Pasquis B, Acar N, Bron AM, Garcher CP, et al. In Vivo Consequences Of
10 Cholesterol-24s-hydroxylase (CYP46A1) Inhibition By Voriconazole On Cholesterol Homeostasis
11 And Function In The Rat Retina. *ARVO Meeting Abstracts* 2011;52:519.
- 12

1 **Figures legends**

2 Figure 1: Scotopic b-wave amplitude of the ERG after five days of intraperitoneal injections of
3 voriconazole (Vor) (a), minocycline (Mino) (b) and voriconazole+minocycline (c) (in blue) compared to
4 vehicle. Normal range given by the 5% and 95% quantile of the rats treated with vehicle is shown by
5 red lines. Data are plotted as a function of the flash intensity.

6 Figure 2: (a) Sum of mean amplitudes of the four oscillatory potentials recorded during ERG
7 processing and displayed as histogram. *: significantly different from vehicle at $p<0.0001$. \$:
8 significantly different from minocycline at $p<0.0001$. Means of pSTR (b) and nSTR (c) measured in
9 each eye at the time of ERG recording. *, **, \$: significantly different at $p<0.02$; $p<0.002$ and
10 $p<0.0002$, respectively in each group compared to vehicle.

11 Figure 3: Changes of 24SOH and cholesterol levels in the retina (a), brain (b) and plasma (c) after five
12 days of intraperitoneal injections with voriconazole (Vor), minocycline (Mino) or
13 voriconazole+minocycline (Vor+Mino). Data are expressed as means $\pm$ SEM. (a) *: significantly
14 different from 24SOH in the retina of Vor group compared to vehicle at $p<0.05$; * with reds dots:
15 significantly different from cholesterol in the retina of Vor+Mino group compared to Vor group. (b)
16 **: significantly different from 24SOH in the brain of Vor+Mino groups at $p<0.001$. (c) \$: significantly
17 different from 24SOH in the plasma of Vor+Mino groups at $p<0.005$.

18 Figure 4: CYP46A1 (a) and GFAP (b) expression in experimental retinas and cortex (values are
19 expressed in arbitrary units as means $\pm$ SEM). Monoclonal mouse anti- β -tubulin was used as loading
20 control in Western-blotting analysis (25 μ g whole protein extract per well). *, \$: significantly different
21 from the value in the retina of Vor and Vor+Mino groups compared to vehicle at $p<0.05$ or $p<0.002$,
22 respectively.

Figures
Figure 1

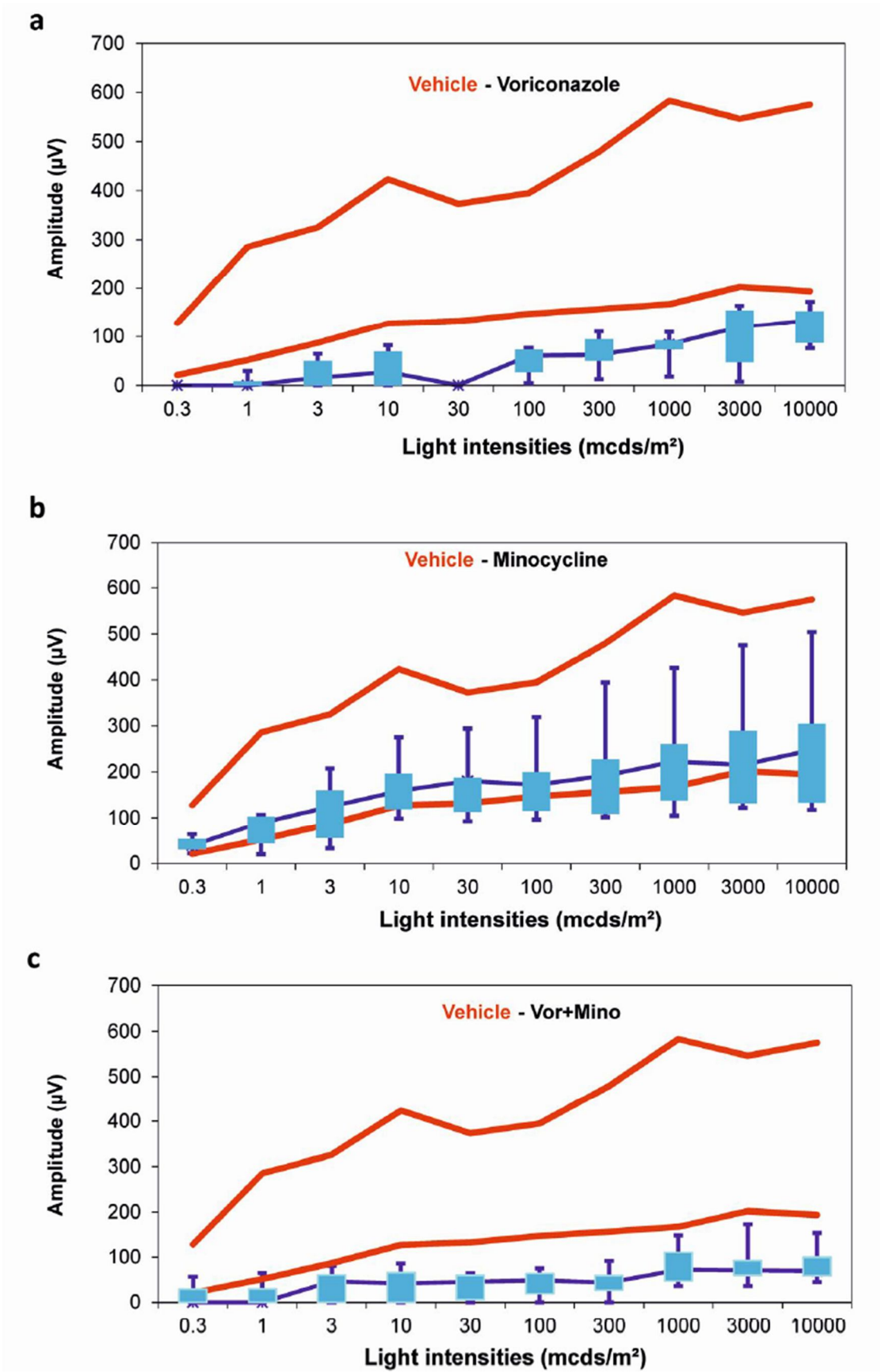


Figure 2

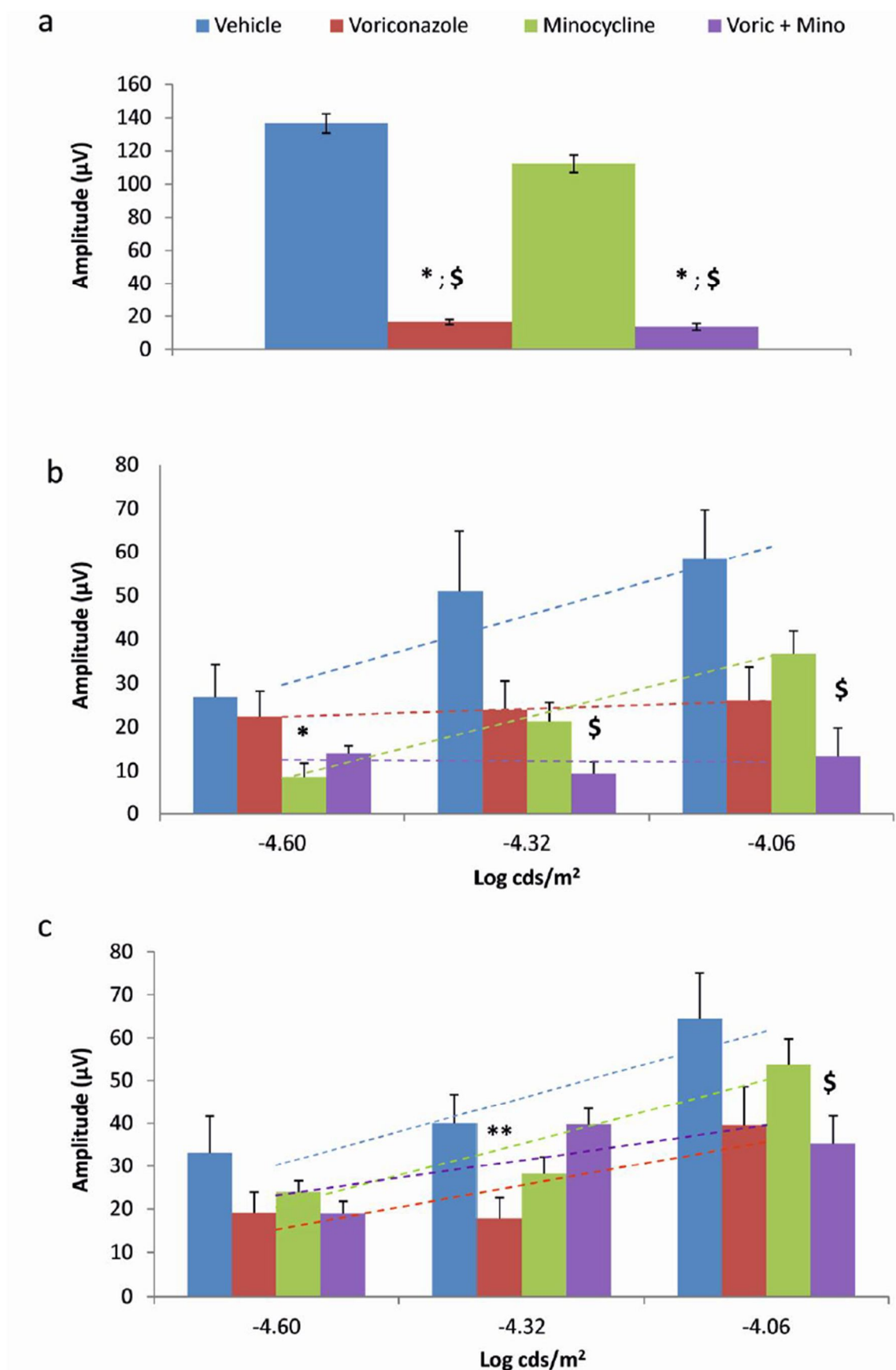


Figure 3

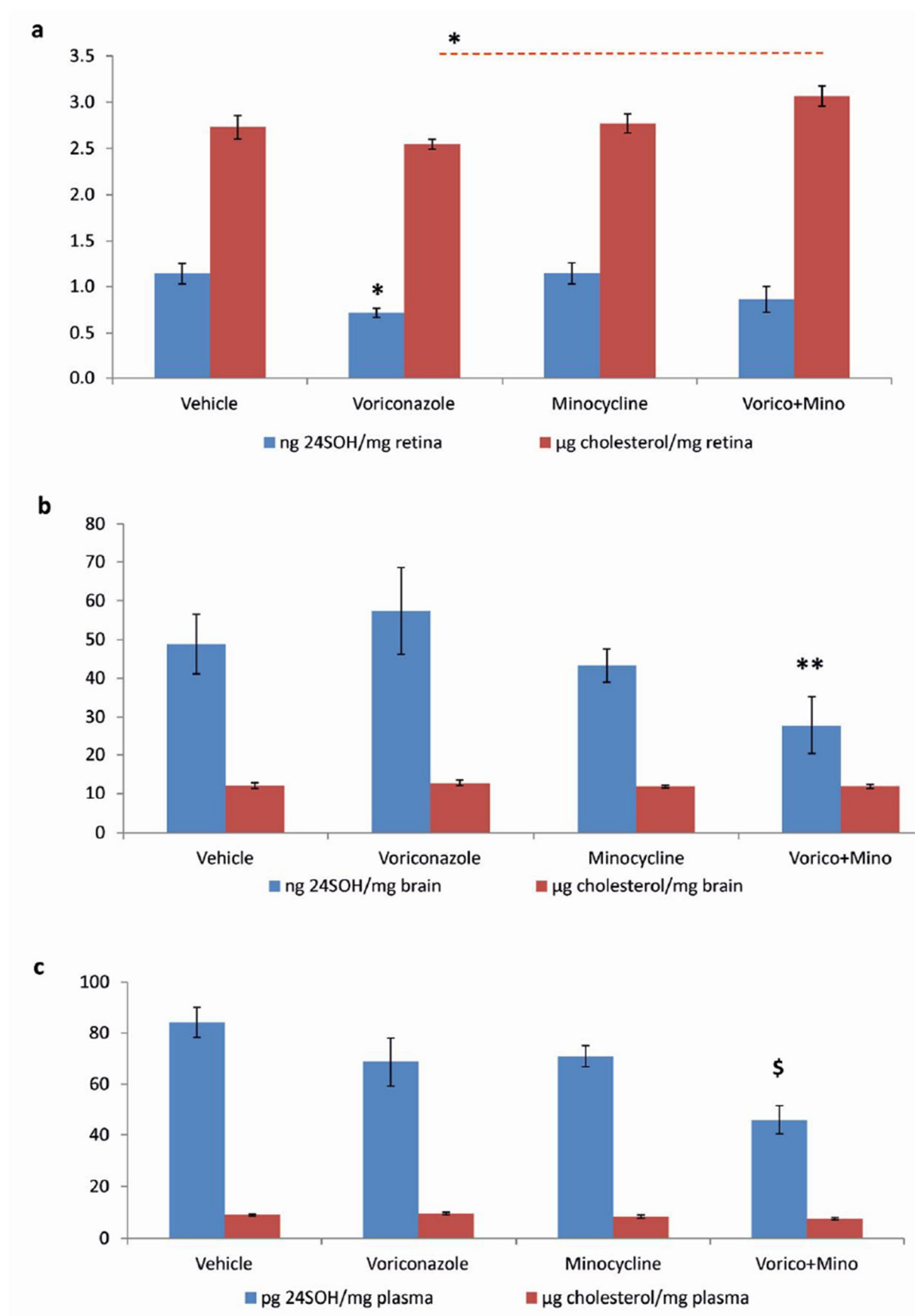
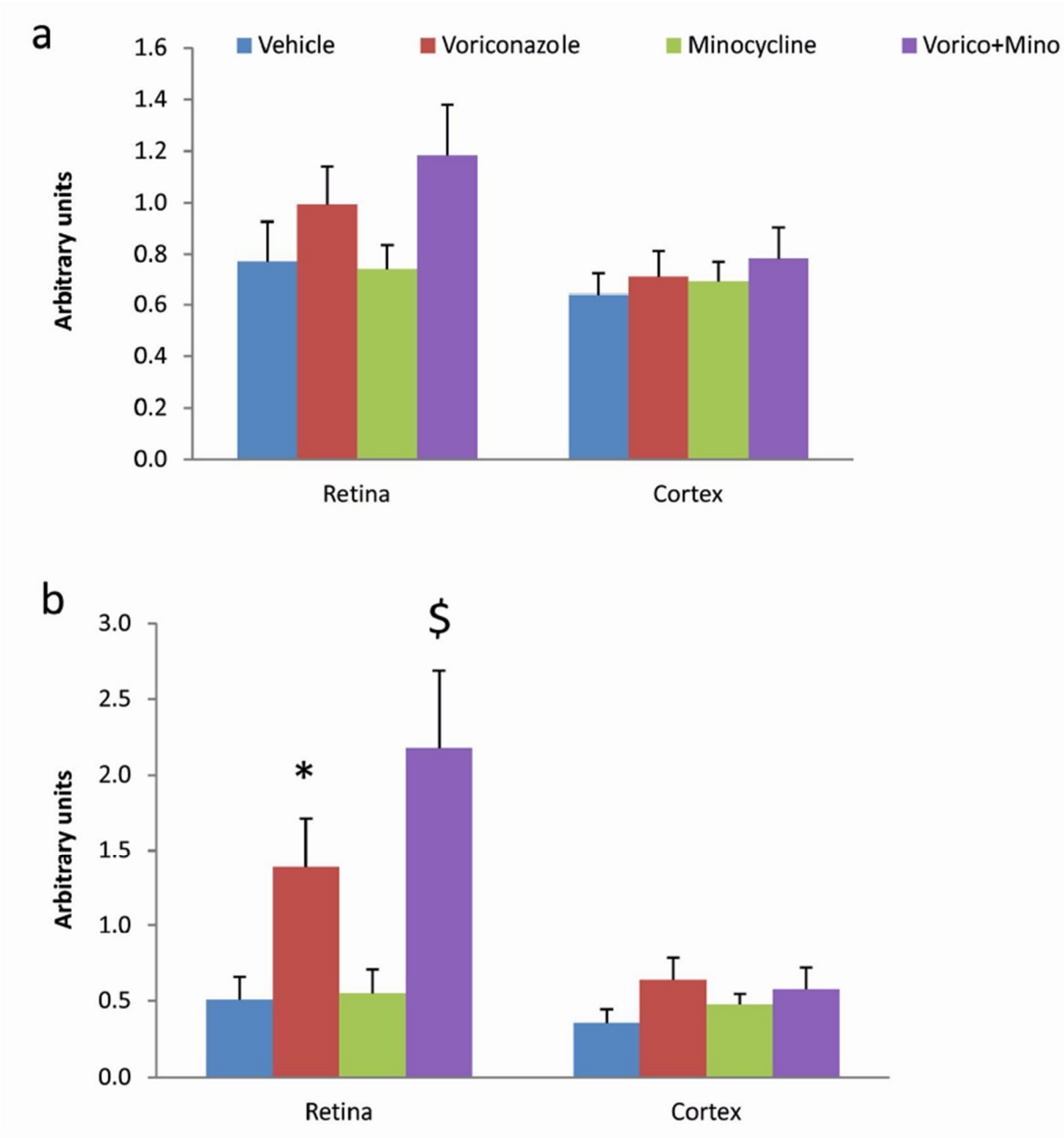
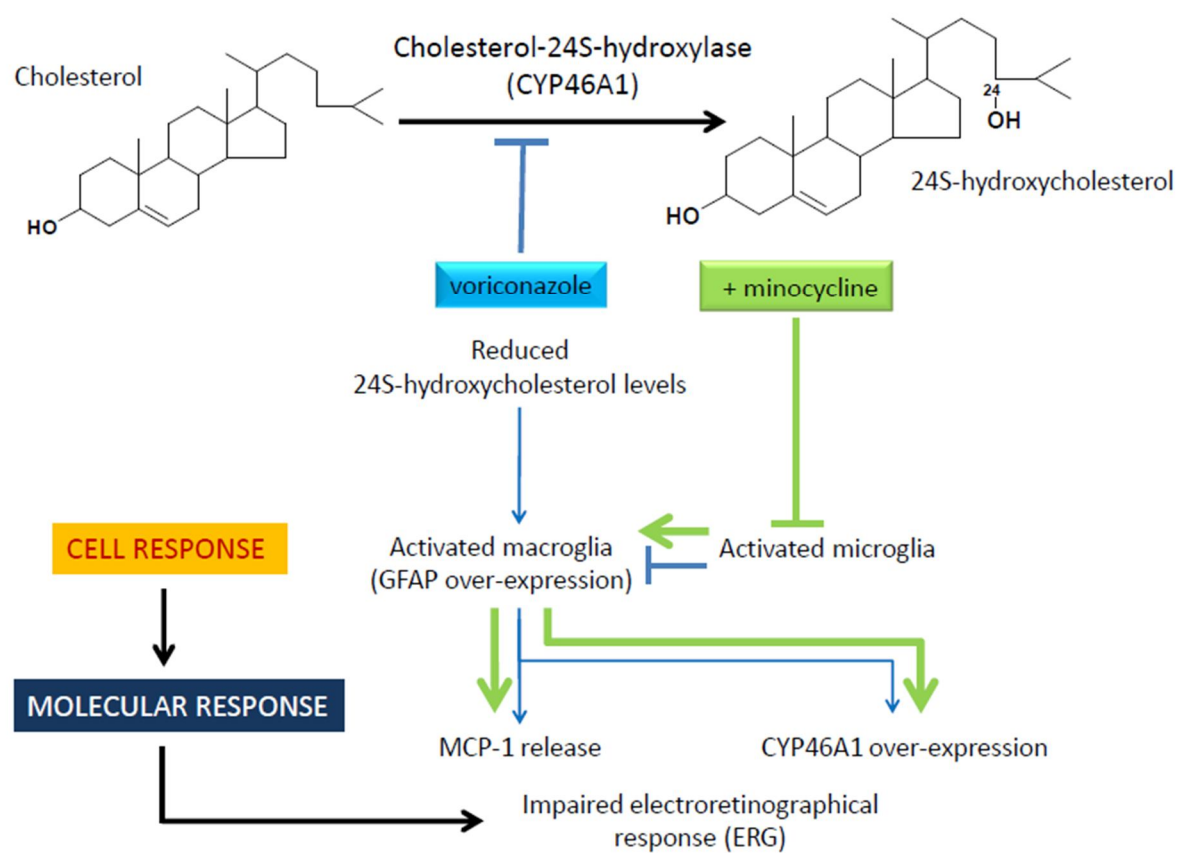


Figure 4



Graphical Abstract



Discussion générale et perspectives

Les résultats présentés dans cette thèse suggèrent des associations entre la cholestérol-24S-hydroxylase (CYP46A1), son produit métabolique le 24S-hydroxycholestérol (24S-OH) et les pathologies neurodégénératives de la rétine.

Tout d'abord le polymorphisme génétique rs754203 dans l'intron 2 du gène codant CYP46A1 a été identifié comme facteur de risque de glaucome ([article 1](#)). Le mécanisme par lequel ce polymorphisme est associé au glaucome reste inconnu. Il ne s'agit probablement pas d'une modification de l'activité de l'enzyme, le polymorphisme étant situé dans un intron, *a priori* sans influence sur l'activité catalytique elle-même. Il pourrait s'agir d'une régulation de l'activité par une modification de la liaison de facteurs régulateurs, dont la nature reste inconnue. A l'exception d'une régulation épigénétique [225] et du stress oxydatif [335], l'activité CYP46A1 est peu soumise à des régulations. Le rôle du stress oxydatif dans l'induction de CYP46A1 dans la rétine ([article 3](#)) peut être évoqué dans notre étude *in vivo* chez le rat auquel on a induit une élévation de la pression intra-oculaire. En effet, la PIO élevée induit une ischémie de la rétine, propice à générer un stress oxydatif. Notre étude a cependant également permis de mettre en évidence qu'il existe un lien entre le stress des cellules ganglionnaires de la rétine et les cellules gliales. Nous avons démontré le rôle crucial de la glie dans le maintien de l'expression de CYP46A1 au cours de la neurodégénérescence de la rétine où les cellules gliales prennent le relais pour suppléer à la perte de 24S-OH, maintenant l'homéostasie du cholestérol dans la rétine. Cet effet est toutefois limité aux temps les plus précoces et implique l'action de chimiokines circulantes telles que MCP-1 et ICAM-1.

Ce même polymorphisme de CYP46A1 n'est pas retrouvé comme facteur de risque chez les patients DMLA ([article 2](#)). A nouveau, bien que l'origine de l'association entre la présence de ce polymorphisme génétique et le risque accru de glaucome reste énigmatique, le fait que nous ne retrouvions pas ce polymorphisme associé à la DMLA nous conforte dans notre hypothèse que CYP46A1 est impliqué dans l'homéostasie des cellules ganglionnaires de la rétine. En effet, à l'inverse du glaucome, la dégénérescence des cellules ganglionnaires n'est pas associée au développement de la DMLA. Il était par conséquent envisageable et attendu par nous que nous ne retrouvions pas ce polymorphisme associé à une pathologie dont le développement implique la mort de cellules qui n'expriment pas CYP46A1 (épithélium pigmentaire et photorécepteurs). Notre laboratoire a récemment mené une étude analogue

chez des patients atteints de rétinopathie diabétique. Les résultats ne montrent pas d'association non plus, ce qui renforce encore notre hypothèse.

Un point intéressant à noter est que ce polymorphisme pourrait être un facteur de risque de DMLA chez les patients ne portant pas déjà d'allèles à risque identifiés de DMLA : CFH (rs10490924, allèle à risque C) et LOC387715 (rs1061170, allèle à risque T). Cette analyse n'a concerné que 190 sujets dans notre population, ce qui limite la portée de nos résultats. Une étude sur une population plus importante nous permettrait de mieux fonder cette suggestion.

Nos deux études cliniques rapportent que le 24S-OH ne peut pas être utilisé comme biomarqueur du glaucome, ni de la DMLA. Compte tenu de la taille réduite de la rétine par rapport à celle du cerveau, la production de 24S-OH par la rétine apparaît relativement faible comparé au cerveau. Nos résultats sont par conséquent tout à fait cohérents avec des données précédentes montrant que la taille du cerveau et celle du foie sont les deux paramètres qui permettent d'expliquer les modifications des teneurs plasmatiques en 24S-OH au cours de la vie [226]. En effet, les concentrations plasmatiques de 24S-OH proviennent exclusivement de la production cérébrale de 24S-OH, voie d'élimination majeure du cholestérol cérébral qui masque la production rétinienne. Notre résultat montrant une augmentation de la concentration plasmatique en 24S-OH chez le rat au cours du stress associé à l'augmentation de la PIO est plus probablement dû à l'induction de CYP46A1 dans le cerveau que dans la rétine. Cette surexpression est induite par les chimiokines circulantes qui, par ailleurs, ont conduit à un effet similaire sur CYP46A1 dans la rétine de l'œil controlatéral et à une réactivité gliale ([article 3](#)).

Cette étude, qui a consisté à augmenter de façon prolongée (21 jours) et élevée la PIO chez le rat, a permis de mettre en évidence que, malgré la perte attendue de cellules ganglionnaires associée – et évaluée précédemment dans une de nos études précédentes [400] et par conséquent du niveau d'expression de CYP46A1 –, le niveau d'expression de CYP46A1 est maintenu à un niveau constant dans la rétine. Nous avons formulé l'hypothèse que l'activation gliale, corolaire au stress, est responsable du maintien de l'expression de CYP46A1 dans la rétine ([article 3](#)). Une situation analogue peut être suspectée dans notre étude *in vivo* ayant conduit à l'inhibition de l'activité de CYP46A1 ([article 4](#)). En effet, nous avons relevé une association entre la surexpression de CYP46A1 et la réactivité gliale dans la rétine. Ces deux cas ont en commun que la teneur en 24S-OH des rétines est diminuée dans les épisodes les plus initiaux du modèle : diminution d'environ 25% 1 jour après l'induction de la PIO élevée et de 37% lors de l'étude avec le voriconazole. Ces résultats suggèrent que

les cellules gliales sont capables de détecter la modification du contenu en 24S-OH dans la rétine. Aussi, pour vérifier cette hypothèse, nous avons mené une étude supplémentaire sur des cellules de Müller en culture afin d'évaluer le potentiel du 24S-OH (10, 50 et 100 μ M) à induire une réponse des cellules gliales. L'IL-1 β (2, 10 et 20 ng/mL⁻¹) a été utilisé en parallèle à titre de comparaison pour mimer un stress de type inflammatoire. Nos résultats mettent en évidence une réponse spécifique des cellules de Müller au 24S-OH avec une augmentation de la sécrétion de MCP-1 et d'ICAM-1, une surexpression des gènes codant ABCA1, ABCG1 et une répression du gène codant HMGCR. Ainsi, nous sommes en mesure de proposer la séquence suivante. Au cours du glaucome, la perte des cellules ganglionnaires de la rétine conduit à un relargage de leur contenu cellulaire et en particulier du 24S-OH. Le 24S-OH est détecté par les cellules gliales de la rétine qui, en réponse, s'activent pour suppléer les neurones en dégénérescence afin de maintenir une teneur constante en 24S-OH.

La question du rôle de CYP46A1 et par conséquent du 24S-OH dans la rétine reste encore à explorer. Notre étude avec le voriconazole a permis de montrer que l'inhibition de CYP46A1 conduit à une altération de la fonction des cellules qui l'expriment : cellules ganglionnaires (STR) et neurones de la rétine interne (onde b de l'ERG scotopique, potentiels oscillatoires). Dans ce contexte, le rôle de la glie (cellules de Müller et microglie) apparaît indissociable des effets observés. Sans être en mesure de le démontrer tout à fait, nous suggérons que le maintien de l'homéostasie du cholestérol par CYP46A1 peut être considéré comme un mécanisme d'adaptation de la rétine au stress. Dans ce contexte, les cellules gliales y joueraient un rôle central. Cette hypothèse est corroborée par les données montrant que l'inhibition de l'activation microgliale serait bénéfique vis-à-vis de la dégénérescence des cellules ganglionnaires par exemple [422].

Dans le contexte de nos études sur le rôle présumé de la cholestérol 24S-hydroxylase (CYP46A1) dans la rétine, nous avons pu associer le 24S-OH à la neurodégénérescence, particulièrement celle des cellules ganglionnaires de la rétine, dans un contexte de pathologies liées à l'âge, notamment dans le développement physiopathologique du glaucome ([11] : revue jointe en annexe).

Comme cela a été mentionné dans la partie introductive de cette thèse, les oxystérols sont encore méconnus. Aucune donnée ne permet actuellement de déterminer si les modifications de teneur en oxystérols dans différents tissus pathologiques sont une cause ou une conséquence de l'apparition d'une pathologie. En effet, bien que très étudiés,

l'implication directe des oxystérols dans la survenue de pathologies n'a jamais encore été clairement démontrée. Les oxystérols étaient précédemment considérés comme des substances néfastes qui s'accumulent dans les différents stades physiopathologiques. Cependant, les travaux effectués ces dix dernières années ont révélé leurs fonctions physiologiques impliquées dans le maintien de l'homéostasie cellulaire et lipidique. Les oxystérols pourraient agir comme des régulateurs endogènes de l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme lipidique ; et comme molécules signal jouant un rôle-clé dans le développement, la différenciation et les processus inflammatoires [198, 284, 427-429].

Perspectives

Mieux comprendre le rôle de CYP46A1 en conditions pathologiques :

Puisque l'inhibition de la microglie a été suggérée comme une stratégie de protection contre la perte des CGR par apoptose [422], alors inhiber l'activation microgliale est utile pour ralentir la perte des CGR :

- ceci nous permettrait d'associer l'inhibition de la microglie à la survie des CGR et de mieux appréhender le rôle de CYP46A1 dans la rétine,

- inhiber l'activation microgliale (par la minocycline ou d'autres composés à visée pharmacologique) et induire, en parallèle, l'expression de CYP46A1 par les cellules macrogliales de Müller : cette stratégie serait bénéfique lors de dysfonctionnements et/ou de perte de CGR comme au cours des glaucomes. Nous pourrions vérifier cette hypothèse dans notre modèle expérimental associé au glaucome,

- étudier les mécanismes de régulation épigénétique de CYP46A1 lors des glaucomes au cours d'une étude clinique en lien avec le SNP rs754203 de CYP46A1 ou lors d'une étude expérimentale visant à inhiber les histones déacétylases (HDAC). En effet, il a été montré récemment que les HDAC sont impliquées dans la régulation neuronale de CYP46A1 [430-432].

Bibliographie

1. Bretillon, L., et al., *Lipid and fatty acid profile of the retina, retinal pigment epithelium/choroid, and the lacrimal gland, and associations with adipose tissue fatty acids in human subjects*. Exp Eye Res, 2008. **87**(6): p. 521-8.
2. Fliesler, S.J. and G.J. Schroepfer, Jr., *Sterol composition of bovine retinal rod outer segment membranes and whole retinas*. Biochim Biophys Acta, 1982. **711**(1): p. 138-48.
3. Bretillon, L., et al., *ApoB100,LDLR-/- mice exhibit reduced electroretinographic response and cholesteryl esters deposits in the retina*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2008. **49**(4): p. 1307-14.
4. Curcio, C.A. and C.L. Millican, *Basal linear deposit and large drusen are specific for early age-related maculopathy*. Arch Ophthalmol, 1999. **117**(3): p. 329-39.
5. Curcio, C.A., et al., *Accumulation of cholesterol with age in human Bruch's membrane*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2001. **42**(1): p. 265-74.
6. Fliesler, S.J. and L. Bretillon, *The ins and outs of cholesterol in the vertebrate retina*. J Lipid Res, 2010.
7. Fliesler, S.J., et al., *Cholesterol synthesis in the vertebrate retina: effects of U18666A on rat retinal structure, photoreceptor membrane assembly, and sterol metabolism and composition*. Lipids, 2000. **35**(3): p. 289-96.
8. Fliesler, S.J. and R.K. Keller, *Metabolism of [3H]farnesol to cholesterol and cholesterologenic intermediates in the living rat eye*. Biochem Biophys Res Commun, 1995. **210**(3): p. 695-702.
9. Keller, R.K. and S.J. Fliesler, *Incorporation of squalene into rod outer segments*. J Biol Chem, 1990. **265**(23): p. 13709-12.
10. Gould, R.G., et al., *Cholesterol metabolism. I. Effect of dietary cholesterol on the synthesis of cholesterol in dog tissue in vitro*. J Biol Chem, 1953. **201**(2): p. 519-28.
11. Fourgeux, C., et al., *24S-hydroxycholesterol and cholesterol-24S-hydroxylase (CYP46A1) in the retina: from cholesterol homeostasis to pathophysiology of glaucoma*. Chem Phys Lipids, 2011. **164**(6): p. 496-9.
12. Tserentsoodol, N., et al., *Uptake of cholesterol by the retina occurs primarily via a low density lipoprotein receptor-mediated process*. Mol Vis, 2006. **12**: p. 1306-18.
13. Curcio, C.A., et al., *Aging, age-related macular degeneration, and the response-to-retention of apolipoprotein B-containing lipoproteins*. Prog Retin Eye Res, 2009. **28**(6): p. 393-422.
14. Pfrieger, F.W., *Role of glial cells in the formation and maintenance of synapses*. Brain Res Rev, 2010. **63**(1-2): p. 39-46.
15. Pfrieger, F.W., *Cholesterol homeostasis and function in neurons of the central nervous system*. Cell Mol Life Sci, 2003. **60**(6): p. 1158-71.
16. Bjorkhem, I., et al., *Importance of a novel oxidative mechanism for elimination of brain cholesterol. Turnover of cholesterol and 24(S)-hydroxycholesterol in rat brain as measured with ¹⁸O₂ techniques in vivo and in vitro*. J Biol Chem, 1997. **272**(48): p. 30178-84.
17. Lutjohann, D., et al., *Cholesterol homeostasis in human brain: evidence for an age-dependent flux of 24S-hydroxycholesterol from the brain into the circulation*. Proc Natl Acad Sci USA, 1996. **93**(18): p. 9799-804.
18. Bretillon, L., et al., *Cholesterol-24S-hydroxylase (CYP46A1) is specifically expressed in neurons of the neural retina*. Curr Eye Res, 2007. **32**(4): p. 361-6.

19. Lund, E.G., J.M. Guileyardo, and D.W. Russell, *cDNA cloning of cholesterol 24-hydroxylase, a mediator of cholesterol homeostasis in the brain*. Proc Natl Acad Sci USA, 1999. **96**(13): p. 7238-43.
20. Ramirez, D.M., S. Andersson, and D.W. Russell, *Neuronal expression and subcellular localization of cholesterol 24-hydroxylase in the mouse brain*. J Comp Neurol, 2008. **507**(5): p. 1676-93.
21. Joffre, C., et al., *Oxysterols induced inflammation and oxidation in primary porcine retinal pigment epithelial cells*. Curr Eye Res, 2007. **32**(3): p. 271-80.
22. Bogdanovic, N., et al., *On the turnover of brain cholesterol in patients with Alzheimer's disease. Abnormal induction of the cholesterol-catabolic enzyme CYP46 in glial cells*. Neurosci Lett, 2001. **314**(1-2): p. 45-8.
23. Bretillon, L., et al., *Plasma levels of 24S-hydroxycholesterol in patients with neurological diseases*. Neurosci Lett, 2000. **293**(2): p. 87-90.
24. Heverin, M., et al., *Changes in the levels of cerebral and extracerebral sterols in the brain of patients with Alzheimer's disease*. J Lipid Res, 2004. **45**: p. 186-193.
25. Lutjohann, D., et al., *Plasma 24S-hydroxycholesterol (cerebrosterol) is increased in Alzheimer and vascular demented patients*. J Lipid Res, 2000. **41**(2): p. 195-8.
26. Bringmann, A., et al., *Muller cells in the healthy and diseased retina*. Prog Retin Eye Res, 2006. **25**(4): p. 397-424.
27. Lignereux, Y., *Elements d'anatomie ophtalmologique du chien*. Pratique médicale et chirurgicale de l'animal de compagnie, 1997. **32 (supplément)**.
28. Nobeschi, L., E. Freymuller, and R.L. Smith, *Intercellular junctions in rabbit eye ora serrata*. Anat Histol Embryol, 2006. **35**(5): p. 287-92.
29. Atsuzawa, K., et al., *Immunohistochemical localization of mitochondrial fatty acid beta-oxidation enzymes in Muller cells of the retina*. Histochem Cell Biol, 2010. **134**(6): p. 565-79.
30. Reichenbach, A., et al., *Development of the rabbit retina: II. Muller cells*. J Comp Neurol, 1991. **311**(1): p. 33-44.
31. Bringmann, A., et al., *Cellular signaling and factors involved in Muller cell gliosis: neuroprotective and detrimental effects*. Prog Retin Eye Res, 2009. **28**(6): p. 423-51.
32. Poitry-Yamate, C.L., S. Poitry, and M. Tsacopoulos, *Lactate released by Muller glial cells is metabolized by photoreceptors from mammalian retina*. J Neurosci, 1995. **15**(7 Pt 2): p. 5179-91.
33. Kuwabara, T. and D.G. Cogan, *Retinal glycogen*. Arch Ophthalmol, 1961. **66**: p. 680-8.
34. Pfeiffer-Guglielmi, B., et al., *Glycogen phosphorylase isozyme pattern in mammalian retinal Muller (glial) cells and in astrocytes of retina and optic nerve*. Glia, 2005. **49**(1): p. 84-95.
35. Newman, E.A., *A physiological measure of carbonic anhydrase in Muller cells*. Glia, 1994. **11**(4): p. 291-9.
36. Kofuji, P. and E.A. Newman, *Potassium buffering in the central nervous system*. Neuroscience, 2004. **129**(4): p. 1045-56.
37. Newman, E.A., D.A. Frambach, and L.L. Odette, *Control of extracellular potassium levels by retinal glial cell K⁺ siphoning*. Science, 1984. **225**(4667): p. 1174-5.
38. Nagelhus, E.A., et al., *Aquaporin-4 water channel protein in the rat retina and optic nerve: polarized expression in Muller cells and fibrous astrocytes*. J Neurosci, 1998. **18**(7): p. 2506-19.
39. Pow, D.V. and D.K. Crook, *Immunocytochemical evidence for the presence of high levels of reduced glutathione in radial glial cells and horizontal cells in the rabbit retina*. Neurosci Lett, 1995. **193**(1): p. 25-8.

40. Reichelt, W., et al., *The glutathione level of retinal Muller glial cells is dependent on the high-affinity sodium-dependent uptake of glutamate*. Neuroscience, 1997. **77**(4): p. 1213-24.
41. Schutte, M. and P. Werner, *Redistribution of glutathione in the ischemic rat retina*. Neurosci Lett, 1998. **246**(1): p. 53-6.
42. Biedermann, B., A. Bringmann, and A. Reichenbach, *High-affinity GABA uptake in retinal glial (Muller) cells of the guinea pig: electrophysiological characterization, immunohistochemical localization, and modeling of efficiency*. Glia, 2002. **39**(3): p. 217-28.
43. Brew, H. and D. Attwell, *Electrogenic glutamate uptake is a major current carrier in the membrane of axolotl retinal glial cells*. Nature, 1987. **327**(6124): p. 707-9.
44. Qian, H., R.P. Malchow, and H. Ripps, *The effects of lowered extracellular sodium on gamma-aminobutyric acid (GABA)-induced currents of Muller (glial) cells of the skate retina*. Cell Mol Neurobiol, 1993. **13**(2): p. 147-58.
45. Rauen, T. and B.I. Kanner, *Localization of the glutamate transporter GLT-1 in rat and macaque monkey retinæ*. Neurosci Lett, 1994. **169**(1-2): p. 137-40.
46. Linser, P. and A.A. Moscona, *Induction of glutamine synthetase in embryonic neural retina: localization in Muller fibers and dependence on cell interactions*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1979. **76**(12): p. 6476-80.
47. Pow, D.V., D.K. Crook, and R.O. Wong, *Early appearance and transient expression of putative amino acid neurotransmitters and related molecules in the developing rabbit retina: an immunocytochemical study*. Vis Neurosci, 1994. **11**(6): p. 1115-34.
48. Das, S.R., et al., *Muller cells of chicken retina synthesize 11-cis-retinol*. Biochem J, 1992. **285** (Pt 3): p. 907-13.
49. Newman, E.A., *Glial cell inhibition of neurons by release of ATP*. J Neurosci, 2003. **23**(5): p. 1659-66.
50. Newman, E.A. and K.R. Zahs, *Modulation of neuronal activity by glial cells in the retina*. J Neurosci, 1998. **18**(11): p. 4022-8.
51. Stevens, E.R., et al., *D-serine and serine racemase are present in the vertebrate retina and contribute to the physiological activation of NMDA receptors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(11): p. 6789-94.
52. Eichler, W., et al., *VEGF release by retinal glia depends on both oxygen and glucose supply*. Neuroreport, 2000. **11**(16): p. 3533-7.
53. Eichler, W., et al., *PEDF derived from glial Muller cells: a possible regulator of retinal angiogenesis*. Exp Cell Res, 2004. **299**(1): p. 68-78.
54. Ikeda, T., et al., *Expression of transforming growth factor-beta s and their receptors by human retinal glial cells*. Curr Eye Res, 1998. **17**(5): p. 546-50.
55. Willbold, E., et al., *On the role of Muller glia cells in histogenesis: only retinal spheroids, but not tectal, telencephalic and cerebellar spheroids develop histotypical patterns*. J Hirnforsch, 1997. **38**(3): p. 383-96.
56. Virchow, R., *Cellular pathology. As based upon physiological and pathological histology. Lecture XVI--Atheromatous affection of arteries*. 1858. Nutr Rev, 1989. **47**(1): p. 23-5.
57. Araque, A., et al., *Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner*. Trends Neurosci, 1999. **22**(5): p. 208-15.
58. Araque, A., *Astrocytes process synaptic information*. Neuron Glia Biol, 2008. **4**(1): p. 3-10.
59. Grandes, P., et al., *Homocysteate, an Excitatory Transmitter Candidate Localized in Glia*. Eur J Neurosci, 1991. **3**(12): p. 1370-1373.

60. Newman, E.A., *New roles for astrocytes: regulation of synaptic transmission*. Trends Neurosci, 2003. **26**(10): p. 536-42.
61. Newman, E.A., *Glial modulation of synaptic transmission in the retina*. Glia, 2004. **47**(3): p. 268-74.
62. Reichenbach, A., et al., *The Muller (glial) cell in normal and diseased retina: a case for single-cell electrophysiology*. Ophthalmic Res, 1997. **29**(5): p. 326-40.
63. Derouiche, A. and T. Rauen, *Coincidence of L-glutamate/L-aspartate transporter (GLAST) and glutamine synthetase (GS) immunoreactions in retinal glia: evidence for coupling of GLAST and GS in transmitter clearance*. J Neurosci Res, 1995. **42**(1): p. 131-43.
64. Germer, A., et al., *Distribution of mitochondria within Muller cells--II. Post-natal development of the rabbit retinal periphery in vivo and in vitro: dependence on oxygen supply*. J Neurocytol, 1998. **27**(5): p. 347-59.
65. Kofuji, P. and N.C. Connors, *Molecular substrates of potassium spatial buffering in glial cells*. Mol Neurobiol, 2003. **28**(2): p. 195-208.
66. Fort, P.E., et al., *Kir4.1 and AQP4 associate with Dp71- and utrophin-DAPs complexes in specific and defined microdomains of Muller retinal glial cell membrane*. Glia, 2008. **56**(6): p. 597-610.
67. Kofuji, P., et al., *Kir potassium channel subunit expression in retinal glial cells: implications for spatial potassium buffering*. Glia, 2002. **39**(3): p. 292-303.
68. Macaione, S., et al., *Free amino acids in developing rat retina*. J Neurochem, 1974. **22**(6): p. 887-91.
69. Gaucher, D., et al., *Taurine deficiency damages retinal neurones: cone photoreceptors and retinal ganglion cells*. Amino Acids, 2012.
70. Kinoshita, J., et al., *Mechanism of voriconazole-induced transient visual disturbance: reversible dysfunction of retinal ON-bipolar cells in monkeys*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2011. **52**(8): p. 5058-63.
71. Delcourt, C., et al., *Smoking and age-related macular degeneration. The POLA Study. Pathologies Oculaires Liees a l'Age*. Arch Ophthalmol, 1998. **116**(8): p. 1031-5.
72. Augood, C., et al., *Methods for a population-based study of the prevalence of and risk factors for age-related maculopathy and macular degeneration in elderly European populations: the EUREYE study*. Ophthalmic Epidemiol, 2004. **11**(2): p. 117-29.
73. Friedman, D.S., et al., *Prevalence of age-related macular degeneration in the United States*. Arch Ophthalmol, 2004. **122**(4): p. 564-72.
74. Jager, R.D., W.F. Mieler, and J.W. Miller, *Age-related macular degeneration*. N Engl J Med, 2008. **358**(24): p. 2606-17.
75. Fourgeux, C., et al., *Single nucleotide polymorphism in the cholesterol-24S-hydroxylase (CYP46A1) gene and its association with CFH and LOC387715 gene polymorphisms in AMD*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2012.
76. Seddon, J.M., et al., *Association of CFH Y402H and LOC387715 A69S with progression of age-related macular degeneration*. JAMA, 2007. **297**(16): p. 1793-800.
77. Swaroop, A., et al., *Genetic susceptibility to age-related macular degeneration: a paradigm for dissecting complex disease traits*. Hum Mol Genet, 2007. **16 Spec No. 2**: p. R174-82.
78. Yates, J.R., et al., *Complement C3 variant and the risk of age-related macular degeneration*. N Engl J Med, 2007. **357**(6): p. 553-61.
79. Gold, B., et al., *Variation in factor B (BF) and complement component 2 (C2) genes is associated with age-related macular degeneration*. Nat Genet, 2006. **38**(4): p. 458-62.
80. Ennis, S., et al., *Association between the SERPING1 gene and age-related macular degeneration: a two-stage case-control study*. Lancet, 2008. **372**(9652): p. 1828-34.

81. Thakkestian, A., et al., *Systematic review and meta-analysis of the association between complement factor H Y402H polymorphisms and age-related macular degeneration*. Hum Mol Genet, 2006. **15**(18): p. 2784-90.
82. Delcourt, C., *Application of nutrigenomics in eye health*. Forum Nutr, 2007. **60**: p. 168-75.
83. Delcourt, C., et al., *Associations of antioxidant enzymes with cataract and age-related macular degeneration. The POLA Study. Pathologies Oculaires Liees a l'Age*. Ophthalmology, 1999. **106**(2): p. 215-22.
84. Delcourt, C., et al., *Age-related macular degeneration and antioxidant status in the POLA study. POLA Study Group. Pathologies Oculaires Liees a l'Age*. Arch Ophthalmol, 1999. **117**(10): p. 1384-90.
85. Delyfer, M.N., et al., *Association of macular pigment density with plasma omega-3 fatty acids: the PIMAVOSA study*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2012. **53**(3): p. 1204-10.
86. Ho, L., et al., *Reducing the genetic risk of age-related macular degeneration with dietary antioxidants, zinc, and omega-3 fatty acids: the Rotterdam study*. Arch Ophthalmol, 2011. **129**(6): p. 758-66.
87. Simon, E., et al., *Decreasing dietary linoleic acid promotes long chain omega-3 fatty acid incorporation into rat retina and modifies gene expression*. Exp Eye Res, 2011. **93**(5): p. 628-35.
88. Li, B., P. Vachali, and P.S. Bernstein, *Human ocular carotenoid-binding proteins*. Photochem Photobiol Sci, 2010. **9**(11): p. 1418-25.
89. Delcourt, C., et al., *Nutrition and age-related eye diseases: the Alienor (Antioxydants, Lipides Essentiels, Nutrition et maladies Oculaires) Study*. J Nutr Health Aging, 2010. **14**(10): p. 854-61.
90. Quigley, H.A. and A.T. Broman, *The number of people with glaucoma worldwide in 2010 and 2020*. Br J Ophthalmol, 2006. **90**(3): p. 262-7.
91. Delcourt, C., et al., *[Prevalence and description of treatment with intraocular pressure-lowering topical medications in continental France]*. J Fr Ophtalmol, 2006. **29**(10): p. 1098-106.
92. Klein, B.E., et al., *Prevalence of glaucoma. The Beaver Dam Eye Study*. Ophthalmology, 1992. **99**(10): p. 1499-504.
93. Katz, J. and A. Sommer, *Risk factors for primary open angle glaucoma*. Am J Prev Med, 1988. **4**(2): p. 110-4.
94. Villain, M., et al., *[The French glaucoma and ocular hypertension 1-day study]*. J Fr Ophtalmol, 2006. **29**(5): p. 520-5.
95. Shiose, Y., et al., *Epidemiology of glaucoma in Japan--a nationwide glaucoma survey*. Jpn J Ophthalmol, 1991. **35**(2): p. 133-55.
96. Shimmyo, M., et al., *Intraocular pressure, Goldmann applanation tension, corneal thickness, and corneal curvature in Caucasians, Asians, Hispanics, and African Americans*. Am J Ophthalmol, 2003. **136**(4): p. 603-13.
97. Renard, J.P., et al., *Nutritional, lifestyle and environmental factors in ocular hypertension and primary open-angle glaucoma: an exploratory case-control study*. Acta Ophthalmol, 2012.
98. Alward, W.L., et al., *Clinical features associated with mutations in the chromosome 1 open-angle glaucoma gene (GLC1A)*. N Engl J Med, 1998. **338**(15): p. 1022-7.
99. Colomb, E., et al., *Association of a single nucleotide polymorphism in the TIGR/MYOCILIN gene promoter with the severity of primary open-angle glaucoma*. Clin Genet, 2001. **60**(3): p. 220-5.

100. Medeiros, F.A., et al., *Corneal thickness as a risk factor for visual field loss in patients with preperimetric glaucomatous optic neuropathy*. Am J Ophthalmol, 2003. **136**(5): p. 805-13.
101. Gordon, M.O., et al., *The Ocular Hypertension Treatment Study: baseline factors that predict the onset of primary open-angle glaucoma*. Arch Ophthalmol, 2002. **120**(6): p. 714-20; discussion 829-30.
102. Leske, M.C., *Ocular perfusion pressure and glaucoma: clinical trial and epidemiologic findings*. Curr Opin Ophthalmol, 2009. **20**(2): p. 73-8.
103. Kwon, Y.H., et al., *Primary open-angle glaucoma*. N Engl J Med, 2009. **360**(11): p. 1113-24.
104. Acar, N., et al., *Red blood cell plasmalogens and docosahexaenoic acid are independently reduced in primary open-angle glaucoma*. Exp Eye Res, 2009. **89**(6): p. 840-53.
105. Friedman, D.S., et al., *Prevalence of open-angle glaucoma among adults in the United States*. Arch Ophthalmol, 2004. **122**(4): p. 532-8.
106. Dreyer, E.B., et al., *Elevated glutamate levels in the vitreous body of humans and monkeys with glaucoma*. Arch Ophthalmol, 1996. **114**(3): p. 299-305.
107. Neufeld, A.H., *Nitric oxide: a potential mediator of retinal ganglion cell damage in glaucoma*. Surv Ophthalmol, 1999. **43 Suppl 1**: p. S129-35.
108. Leske, M.C., et al., *Factors for glaucoma progression and the effect of treatment: the early manifest glaucoma trial*. Arch Ophthalmol, 2003. **121**(1): p. 48-56.
109. Parrish, R.K., 2nd, et al., *Five-year follow-up optic disc findings of the Collaborative Initial Glaucoma Treatment Study*. Am J Ophthalmol, 2009. **147**(4): p. 717-724 e1.
110. Asrani, S., et al., *Large diurnal fluctuations in intraocular pressure are an independent risk factor in patients with glaucoma*. J Glaucoma, 2000. **9**(2): p. 134-42.
111. Harwerth, R.S. and H.A. Quigley, *Visual field defects and retinal ganglion cell losses in patients with glaucoma*. Arch Ophthalmol, 2006. **124**(6): p. 853-9.
112. Harwerth, R.S., J.L. Wheat, and N.V. Rangaswamy, *Age-related losses of retinal ganglion cells and axons*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2008. **49**(10): p. 4437-43.
113. Leung, C.K., et al., *Evaluation of retinal nerve fiber layer progression in glaucoma a prospective analysis with neuroretinal rim and visual field progression*. Ophthalmology, 2011. **118**(8): p. 1551-7.
114. Molenaar, J.C., [From the library of the Netherlands Journal of Medicine. Rudolf Virchow: *Die Cellularpathologie in ihrer Begründung auf physiologische und pathologische Gewebelehre*; 1858]. Ned Tijdschr Geneesk, 2003. **147**(45): p. 2236-44.
115. Bringmann, A. and A. Reichenbach, *Role of Muller cells in retinal degenerations*. Front Biosci, 2001. **6**: p. E72-92.
116. Bringmann, A., et al., *Role of retinal glial cells in neurotransmitter uptake and metabolism*. Neurochem Int, 2009. **54**(3-4): p. 143-60.
117. Lucas, D.R. and J.P. Newhouse, *The toxic effect of sodium L-glutamate on the inner layers of the retina*. AMA Arch Ophthalmol, 1957. **58**(2): p. 193-201.
118. Garcia, M. and E. Vecino, *Role of Muller glia in neuroprotection and regeneration in the retina*. Histol Histopathol, 2003. **18**(4): p. 1205-18.
119. Cao, W., et al., *Induction of basic fibroblast growth factor mRNA by basic fibroblast growth factor in Muller cells*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1997. **38**(7): p. 1358-66.
120. Fu, Q.L., et al., *Up-regulated endogenous erythropoietin/erythropoietin receptor system and exogenous erythropoietin rescue retinal ganglion cells after chronic ocular hypertension*. Cell Mol Neurobiol, 2008. **28**(2): p. 317-29.

121. Harada, T., et al., *Modification of glial-neuronal cell interactions prevents photoreceptor apoptosis during light-induced retinal degeneration*. *Neuron*, 2000. **26**(2): p. 533-41.
122. Wen, R., et al., *Injury-induced upregulation of bFGF and CNTF mRNAs in the rat retina*. *J Neurosci*, 1995. **15**(11): p. 7377-85.
123. Nakazawa, T., et al., *Attenuated glial reactions and photoreceptor degeneration after retinal detachment in mice deficient in glial fibrillary acidic protein and vimentin*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2007. **48**(6): p. 2760-8.
124. Yafai, Y., et al., *Retinal endothelial angiogenic activity: effects of hypoxia and glial (Muller) cells*. *Microcirculation*, 2004. **11**(7): p. 577-86.
125. Bocker-Meffert, S., et al., *Erythropoietin and VEGF promote neural outgrowth from retinal explants in postnatal rats*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2002. **43**(6): p. 2021-6.
126. Sanchez, A., S. Wadhvani, and P. Grammas, *Multiple neurotrophic effects of VEGF on cultured neurons*. *Neuropeptides*, 2010. **44**(4): p. 323-31.
127. Lebrun-Julien, F., et al., *Excitotoxic death of retinal neurons in vivo occurs via a non-cell-autonomous mechanism*. *J Neurosci*, 2009. **29**(17): p. 5536-45.
128. Anderson, D.H., et al., *Morphological recovery in the reattached retina*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1986. **27**(2): p. 168-83.
129. Almasieh, M., et al., *The molecular basis of retinal ganglion cell death in glaucoma*. *Prog Retin Eye Res*, 2012. **31**(2): p. 152-81.
130. Wurm, A., et al., *Glial cell-derived glutamate mediates autocrine cell volume regulation in the retina: activation by VEGF*. *J Neurochem*, 2008. **104**(2): p. 386-99.
131. Bringmann, A., et al., *Arachidonic acid-induced inhibition of Ca²⁺ channel currents in retinal glial (Muller) cells*. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 2001. **239**(11): p. 859-64.
132. Pannicke, T., et al., *Altered membrane physiology in Muller glial cells after transient ischemia of the rat retina*. *Glia*, 2005. **50**(1): p. 1-11.
133. Uckermann, O., et al., *Glutamate-evoked alterations of glial and neuronal cell morphology in the guinea pig retina*. *J Neurosci*, 2004. **24**(45): p. 10149-58.
134. Skatchkov, S.N., et al., *Tandem-pore domain potassium channels are functionally expressed in retinal (Muller) glial cells*. *Glia*, 2006. **53**(3): p. 266-76.
135. Nickells, R.W., *From ocular hypertension to ganglion cell death: a theoretical sequence of events leading to glaucoma*. *Can J Ophthalmol*, 2007. **42**(2): p. 278-87.
136. Maeda-Yajima, M., A. Mizota, and T. Kimura, *Light and Electron Microscopic Study of the Retina in a Patient with Congenital Glaucoma*. *Jpn J Ophthalmol*, 2001. **45**(1): p. 113-114.
137. Inman, D.M. and P.J. Horner, *Reactive nonproliferative gliosis predominates in a chronic mouse model of glaucoma*. *Glia*, 2007. **55**(9): p. 942-53.
138. Lam, T.T., J.M. Kwong, and M.O. Tso, *Early glial responses after acute elevated intraocular pressure in rats*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2003. **44**(2): p. 638-45.
139. Tezel, G. and M.B. Wax, *Glial modulation of retinal ganglion cell death in glaucoma*. *J Glaucoma*, 2003. **12**(1): p. 63-8.
140. Grieshaber, M.C., et al., *Relationship between retinal glial cell activation in glaucoma and vascular dysregulation*. *J Glaucoma*, 2007. **16**(2): p. 215-9.
141. Kawasaki, A., Y. Otori, and C.J. Barnstable, *Muller cell protection of rat retinal ganglion cells from glutamate and nitric oxide neurotoxicity*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2000. **41**(11): p. 3444-50.
142. Schmidt, J.F., et al., *Expression of ephrinB1 and its receptor in glaucomatous optic neuropathy*. *Br J Ophthalmol*, 2007. **91**(9): p. 1219-24.

143. Carter-Dawson, L., et al., *Glutamine immunoreactivity in Muller cells of monkey eyes with experimental glaucoma*. Exp Eye Res, 1998. **66**(5): p. 537-45.
144. Taylor, S., et al., *Glutamate stimulates neurotrophin expression in cultured Muller cells*. Brain Res Mol Brain Res, 2003. **111**(1-2): p. 189-97.
145. Woldemussie, E., M. Wijono, and G. Ruiz, *Muller cell response to laser-induced increase in intraocular pressure in rats*. Glia, 2004. **47**(2): p. 109-19.
146. Chen, C.T., et al., *Loss of glutamine synthetase immunoreactivity from the retina in canine primary glaucoma*. Vet Ophthalmol, 2008. **11**(3): p. 150-7.
147. Harada, T., et al., *The potential role of glutamate transporters in the pathogenesis of normal tension glaucoma*. J Clin Invest, 2007. **117**(7): p. 1763-70.
148. Moreno, M.C., et al., *Effect of glaucoma on the retinal glutamate/glutamine cycle activity*. FASEB J, 2005. **19**(9): p. 1161-2.
149. Holcombe, D.J., et al., *The effects of acute intraocular pressure elevation on rat retinal glutamate transport*. Acta Ophthalmol, 2008. **86**(4): p. 408-14.
150. Tezel, G., et al., *Mechanisms of immune system activation in glaucoma: oxidative stress-stimulated antigen presentation by the retina and optic nerve head glia*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2007. **48**(2): p. 705-14.
151. Stasi, K., et al., *Complement component 1Q (C1Q) upregulation in retina of murine, primate, and human glaucomatous eyes*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2006. **47**(3): p. 1024-9.
152. Tezel, G. and M.B. Wax, *Increased production of tumor necrosis factor-alpha by glial cells exposed to simulated ischemia or elevated hydrostatic pressure induces apoptosis in cocultured retinal ganglion cells*. J Neurosci, 2000. **20**(23): p. 8693-700.
153. Tezel, G., et al., *Role of tumor necrosis factor receptor-1 in the death of retinal ganglion cells following optic nerve crush injury in mice*. Brain Res, 2004. **996**(2): p. 202-12.
154. Yang, X., et al., *Neurodegenerative and inflammatory pathway components linked to TNF-alpha/TNFR1 signaling in the glaucomatous human retina*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2011. **52**(11): p. 8442-54.
155. Barker, P.A. and E.M. Shooter, *Disruption of NGF binding to the low affinity neurotrophin receptor p75LNTR reduces NGF binding to TrkA on PC12 cells*. Neuron, 1994. **13**(1): p. 203-15.
156. Bai, Y., et al., *Chronic and acute models of retinal neurodegeneration TrkA activity are neuroprotective whereas p75NTR activity is neurotoxic through a paracrine mechanism*. J Biol Chem, 2010. **285**(50): p. 39392-400.
157. Bai, Y., et al., *During glaucoma, alpha2-macroglobulin accumulates in aqueous humor and binds to nerve growth factor, neutralizing neuroprotection*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2011. **52**(8): p. 5260-5.
158. Shi, Z., et al., *Alpha2-macroglobulin is a mediator of retinal ganglion cell death in glaucoma*. J Biol Chem, 2008. **283**(43): p. 29156-65.
159. Rog, T., et al., *Comparison of cholesterol and its direct precursors along the biosynthetic pathway: effects of cholesterol, desmosterol and 7-dehydrocholesterol on saturated and unsaturated lipid bilayers*. J Chem Phys, 2008. **129**(15): p. 154508.
160. Vist, M.R. and J.H. Davis, *Phase equilibria of cholesterol/dipalmitoylphosphatidylcholine mixtures: 2H nuclear magnetic resonance and differential scanning calorimetry*. Biochemistry, 1990. **29**(2): p. 451-64.
161. Simons, K. and D. Toomre, *Lipid rafts and signal transduction*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2000. **1**(1): p. 31-9.
162. Addona, G.H., et al., *Where does cholesterol act during activation of the nicotinic acetylcholine receptor?* Biochim Biophys Acta, 1998. **1370**(2): p. 299-309.

163. Aittoniemi, J., et al., *Insight into the putative specific interactions between cholesterol, sphingomyelin, and palmitoyl-oleoyl phosphatidylcholine*. Biophys J, 2007. **92**(4): p. 1125-37.
164. Vainio, S., et al., *Significance of sterol structural specificity. Desmosterol cannot replace cholesterol in lipid rafts*. J Biol Chem, 2006. **281**(1): p. 348-55.
165. Kushwaha, R.S. and H.C. McGill, Jr., *Mechanisms controlling lipemic responses to dietary lipids*. World Rev Nutr Diet, 1997. **80**: p. 82-125.
166. Baldan, A., D.D. Bojanic, and P.A. Edwards, *The ABCs of sterol transport*. J Lipid Res, 2009. **50 Suppl**: p. S80-5.
167. Gerard, P., et al., *Bacteroides sp. strain D8, the first cholesterol-reducing bacterium isolated from human feces*. Appl Environ Microbiol, 2007. **73**(18): p. 5742-9.
168. Murphy, C., et al., *Promoter analysis of the murine squalene epoxidase gene. Identification of a 205 bp homing region regulated by both SREBP'S and NF-Y*. Biochim Biophys Acta, 2006. **1761**(10): p. 1213-27.
169. Wu, J. and A.J. Dickson, *SREBP isoform and SREBP target gene expression during rat primary hepatocyte culture*. In Vitro Cell Dev Biol Anim, 2010. **46**(8): p. 657-63.
170. Engelking, L.J., et al., *Schoenheimer effect explained--feedback regulation of cholesterol synthesis in mice mediated by Insig proteins*. J Clin Invest, 2005. **115**(9): p. 2489-98.
171. Gill, S., R. Chow, and A.J. Brown, *Sterol regulators of cholesterol homeostasis and beyond: the oxysterol hypothesis revisited and revised*. Prog Lipid Res, 2008. **47**(6): p. 391-404.
172. Horton, J.D., J.L. Goldstein, and M.S. Brown, *SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver*. J Clin Invest, 2002. **109**(9): p. 1125-31.
173. Istvan, E.S., et al., *Crystal structure of the catalytic portion of human HMG-CoA reductase: insights into regulation of activity and catalysis*. Embo J, 2000. **19**(5): p. 819-30.
174. Hardie, D.G., et al., *Management of cellular energy by the AMP-activated protein kinase system*. FEBS Lett, 2003. **546**(1): p. 113-20.
175. Jo, Y., P.V. Sguigna, and R.A. DeBose-Boyd, *Membrane-associated ubiquitin ligase complex containing gp78 mediates sterol-accelerated degradation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase*. J Biol Chem, 2011. **286**(17): p. 15022-31.
176. Dong, X.Y. and S.Q. Tang, *Insulin-induced gene: a new regulator in lipid metabolism*. Peptides, 2010. **31**(11): p. 2145-50.
177. Lagrost, L., *Regulation of cholesteryl ester transfer protein (CETP) activity: review of in vitro and in vivo studies*. Biochim Biophys Acta, 1994. **1215**(3): p. 209-36.
178. Tall, A.R., *Plasma cholesteryl ester transfer protein*. J Lipid Res, 1993. **34**(8): p. 1255-74.
179. Melchior, G.W., et al., *Apolipoprotein A-I metabolism in cholesteryl ester transfer protein transgenic mice. Insights into the mechanisms responsible for low plasma high density lipoprotein levels*. J Biol Chem, 1994. **269**(11): p. 8044-51.
180. Sharp, D., et al., *Human microsomal triglyceride transfer protein large subunit gene structure*. Biochemistry, 1994. **33**(31): p. 9057-61.
181. Shoulders, C.C., et al., *Abetalipoproteinemia is caused by defects of the gene encoding the 97 kDa subunit of a microsomal triglyceride transfer protein*. Hum Mol Genet, 1993. **2**(12): p. 2109-16.
182. Chmara, M., et al., *Molecular characterization of Polish patients with familial hypercholesterolemia: novel and recurrent LDLR mutations*. J Appl Genet, 2010. **51**(1): p. 95-106.

183. Mozas, P., et al., *Molecular characterization of familial hypercholesterolemia in Spain: identification of 39 novel and 77 recurrent mutations in LDLR*. Hum Mutat, 2004. **24**(2): p. 187.
184. Dominiczak, M.H. and M.J. Caslake, *Apolipoproteins: metabolic role and clinical biochemistry applications*. Ann Clin Biochem, 2011. **48**(Pt 6): p. 498-515.
185. Fazio, S., et al., *Co-expression of cholesteryl ester transfer protein and defective apolipoprotein E in transgenic mice alters plasma cholesterol distribution. Implications for the pathogenesis of type III hyperlipoproteinemia*. J Biol Chem, 1994. **269**(51): p. 32368-72.
186. Schiepers, O.J., et al., *APOE E4 status predicts age-related cognitive decline in the ninth decade: longitudinal follow-up of the Lothian Birth Cohort 1921*. Mol Psychiatry, 2012. **17**(3): p. 315-24.
187. Lima, L.M., et al., *Atheromatosis extent in coronary artery disease is not correlated with apolipoprotein-E polymorphism and its plasma levels, but associated with cognitive decline*. Curr Alzheimer Res, 2010. **7**(6): p. 556-63.
188. Pedersen, J.I. and K. Saarem, *Rat liver mitochondrial cytochrome P-450--A C27-steroid 26-hydroxylase*. J Steroid Biochem, 1978. **9**(12): p. 1165-8.
189. Souidi, M., et al., *Effects of dietary 27-hydroxycholesterol on cholesterol metabolism and bile acid biosynthesis in the hamster*. Can J Physiol Pharmacol, 2003. **81**(9): p. 854-63.
190. Breuer, O. and I. Bjorkhem, *Use of an 18O2 inhalation technique and mass isotopomer distribution analysis to study oxygenation of cholesterol in rat. Evidence for in vivo formation of 7-oxo-, 7 beta-hydroxy-, 24-hydroxy-, and 25-hydroxycholesterol*. J Biol Chem, 1995. **270**(35): p. 20278-84.
191. Boselli, E., et al., *Pressurized liquid extraction of lipids for the determination of oxysterols in egg-containing food*. J Chromatogr A, 2001. **917**(1-2): p. 239-44.
192. Przygonski, K., H. Jelen, and E. Wasowicz, *Determination of cholesterol oxidation products in milk powder and infant formulas by gas chromatography and mass spectrometry*. Nahrung, 2000. **44**(2): p. 122-5.
193. Leonarduzzi, G., B. Sottero, and G. Poli, *Oxidized products of cholesterol: dietary and metabolic origin, and proatherosclerotic effects (review)*. J Nutr Biochem, 2002. **13**(12): p. 700-710.
194. Yan, P.S., *Cholesterol oxidation products. Their occurrence and detection in our foodstuffs*. Adv Exp Med Biol, 1999. **459**: p. 79-98.
195. Schroepfer, G.J., Jr., *Oxysterols: modulators of cholesterol metabolism and other processes*. Physiol Rev, 2000. **80**(1): p. 361-554.
196. Babiker, A. and U. Diczfalussy, *Transport of side-chain oxidized oxysterols in the human circulation*. Biochim Biophys Acta, 1998. **1392**(2-3): p. 333-9.
197. Krut, L.H., et al., *The effect of oxidizing cholesterol on gastrointestinal absorption, plasma clearance, tissue distribution, and processing by endothelial cells*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1997. **17**(4): p. 778-85.
198. Olkkonen, V.M. and R. Hynynen, *Interactions of oxysterols with membranes and proteins*. Mol Aspects Med, 2009. **30**(3): p. 123-33.
199. Yamazaki, S., et al., *Importance of the proline-rich region following signal-anchor sequence in the formation of correct conformation of microsomal cytochrome P-450s*. J Biochem, 1993. **114**(5): p. 652-7.
200. Garfinkel, D., *Studies on pig liver microsomes. I. Enzymic and pigment composition of different microsomal fractions*. Arch Biochem Biophys, 1958. **77**(2): p. 493-509.
201. Klingenberg, M., *Pigments of rat liver microsomes*. Arch Biochem Biophys, 1958. **75**(2): p. 376-86.

202. Nelson, D.R., et al., *P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature*. Pharmacogenetics, 1996. **6**(1): p. 1-42.
203. Omura, T., *Forty years of cytochrome P450*. Biochem Biophys Res Commun, 1999. **266**(3): p. 690-8.
204. Onderwater, R.C., et al., *The use of macroporous microcarriers for the large-scale growth of V79 cells genetically designed to express single human cytochrome P450 isoenzymes and for the characterization of the expressed cytochrome P450*. Protein Expr Purif, 1996. **8**(4): p. 439-46.
205. Black, V.H., *Cytochrome P450s in the guinea pig adrenal that are immunologically similar to liver forms: estrogen suppression explains male-female differences*. J Steroid Biochem Mol Biol, 1992. **43**(8): p. 863-8.
206. Lund, E.G., et al., *cDNA cloning of mouse and human cholesterol 25-hydroxylases, polytopic membrane proteins that synthesize a potent oxysterol regulator of lipid metabolism*. J Biol Chem, 1998. **273**(51): p. 34316-27.
207. Schweizer, R.A., et al., *Rapid hepatic metabolism of 7-ketocholesterol by 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1: species-specific differences between the rat, human, and hamster enzyme*. J Biol Chem, 2004. **279**(18): p. 18415-24.
208. Fleming, I., *Cytochrome p450 and vascular homeostasis*. Circ Res, 2001. **89**(9): p. 753-62.
209. Funk, C.D., *Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology*. Science, 2001. **294**(5548): p. 1871-5.
210. Muller, B., *Pharmacology of thromboxane A2, prostacyclin and other eicosanoids in the cardiovascular system*. Therapie, 1991. **46**(3): p. 217-21.
211. Nebert, D.W. and D.W. Russell, *Clinical importance of the cytochromes P450*. Lancet, 2002. **360**(9340): p. 1155-62.
212. Sarfarazi, M. and I. Stoilov, *Molecular genetics of primary congenital glaucoma*. Eye (Lond), 2000. **14** (Pt 3B): p. 422-8.
213. Kovar, J., et al., *The A-204C polymorphism in the cholesterol 7alpha-hydroxylase (CYP7A1) gene determines the cholesterolemia responsiveness to a high-fat diet*. Physiol Res, 2004. **53**(5): p. 565-8.
214. Hansson, M., et al., *Unique patient with cerebrotendinous xanthomatosis. Evidence for presence of a defect in a gene that is not identical to sterol 27-hydroxylase*. J Intern Med, 2007. **261**(5): p. 504-10.
215. Souidi, M., et al., *[Oxysterols: metabolism, biological role and associated diseases]*. Gastroenterol Clin Biol, 2004. **28**(3): p. 279-93.
216. Danielsson, H. and M.G. Horning, *On the oxidation of cholesterol by mouse liver mitochondria. Bile acids and steroids 88*. Biochim Biophys Acta, 1959. **34**: p. 596-8.
217. Fredrickson, D.S., *The conversion of cholesterol-4-C14 to acids and other products by liver mitochondria*. J Biol Chem, 1956. **222**(1): p. 109-20.
218. Li-Hawkins, J., et al., *Expression cloning of an oxysterol 7alpha-hydroxylase selective for 24-hydroxycholesterol*. J Biol Chem, 2000. **275**(22): p. 16543-9.
219. Russell, D.W. and K.D. Setchell, *Bile acid biosynthesis*. Biochemistry, 1992. **31**(20): p. 4737-49.
220. Umetani, M., et al., *27-Hydroxycholesterol is an endogenous SERM that inhibits the cardiovascular effects of estrogen*. Nat Med, 2007. **13**(10): p. 1185-92.
221. Lund, E.G., J.M. Guileyardo, and D.W. Russell, *cDNA cloning of cholesterol 24-hydroxylase, a mediator of cholesterol homeostasis in the brain*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(13): p. 7238-43.
222. Russell, D.W., et al., *Cholesterol 24-hydroxylase: an enzyme of cholesterol turnover in the brain*. Annu Rev Biochem, 2009. **78**: p. 1017-40.

223. Liao, W.L., et al., *Steroid and protein ligand binding to cytochrome P450 46A1 as assessed by hydrogen-deuterium exchange and mass spectrometry*. Biochemistry, 2009. **48**(19): p. 4150-8.
224. Halford, R.W. and D.W. Russell, *Reduction of cholesterol synthesis in the mouse brain does not affect amyloid formation in Alzheimer's disease, but does extend lifespan*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(9): p. 3502-6.
225. Shafaati, M., et al., *Transcriptional regulation of cholesterol 24-hydroxylase by histone deacetylase inhibitors*. Biochem Biophys Res Commun, 2009. **378**(4): p. 689-94.
226. Bretillon, L., et al., *Plasma levels of 24S-hydroxycholesterol reflect the balance between cerebral production and hepatic metabolism and are inversely related to body surface*. J Lipid Res, 2000. **41**(5): p. 840-5.
227. Bjorkhem, I., *Crossing the barrier: oxysterols as cholesterol transporters and metabolic modulators in the brain*. J Intern Med, 2006. **260**(6): p. 493-508.
228. Guyton, J.R., et al., *Toxicity of oxidized low density lipoproteins for vascular smooth muscle cells and partial protection by antioxidants*. Atherosclerosis, 1995. **118**(2): p. 237-49.
229. Lizard, G., et al., *Evaluation of the cytotoxic effects of some oxysterols and of cholesterol on endothelial cell growth: methodological aspects*. Pathol Biol (Paris), 1997. **45**(4): p. 281-90.
230. Sevanian, A., J. Berliner, and H. Peterson, *Uptake, metabolism, and cytotoxicity of isomeric cholesterol-5,6-epoxides in rabbit aortic endothelial cells*. J Lipid Res, 1991. **32**(1): p. 147-55.
231. Ares, M.P., et al., *Ca²⁺ channel blockers verapamil and nifedipine inhibit apoptosis induced by 25-hydroxycholesterol in human aortic smooth muscle cells*. J Lipid Res, 1997. **38**(10): p. 2049-61.
232. Souidi, M., et al., *Assay of microsomal oxysterol 7alpha-hydroxylase activity in the hamster liver by a sensitive method: in vitro modulation by oxysterols*. Biochim Biophys Acta, 2000. **1487**(1): p. 74-81.
233. Chang, J.Y., K.D. Phelan, and J.A. Chavis, *Neurotoxicity of 25-OH-cholesterol on sympathetic neurons*. Brain Res Bull, 1998. **45**(6): p. 615-22.
234. Chang, J.Y., K.D. Phelan, and L.Z. Liu, *Neurotoxicity of 25-OH-cholesterol on NGF-differentiated PC12 cells*. Neurochem Res, 1998. **23**(1): p. 7-16.
235. Kolsch, H., et al., *The neurotoxic effect of 24-hydroxycholesterol on SH-SY5Y human neuroblastoma cells*. Brain Res, 1999. **818**(1): p. 171-5.
236. Chang, J.Y. and L.Z. Liu, *Neurotoxicity of cholesterol oxides on cultured cerebellar granule cells*. Neurochem Int, 1998. **32**(4): p. 317-23.
237. Lizard, G., et al., *Characterization and comparison of the mode of cell death, apoptosis versus necrosis, induced by 7beta-hydroxycholesterol and 7-ketocholesterol in the cells of the vascular wall*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1999. **19**(5): p. 1190-200.
238. Vejux, A. and G. Lizard, *Cytotoxic effects of oxysterols associated with human diseases: Induction of cell death (apoptosis and/or oncosis), oxidative and inflammatory activities, and phospholipidosis*. Mol Aspects Med, 2009. **30**(3): p. 153-70.
239. Vejux, A., L. Malvitte, and G. Lizard, *Side effects of oxysterols: cytotoxicity, oxidation, inflammation, and phospholipidosis*. Braz J Med Biol Res, 2008. **41**(7): p. 545-56.

240. Vejux, A., M. Samadi, and G. Lizard, *Contribution of cholesterol and oxysterols in the physiopathology of cataract: implication for the development of pharmacological treatments*. J Ophthalmol, 2011. **2011**: p. 471947.
241. Rosklint, T., et al., *Oxysterols induce interleukin-1beta production in human macrophages*. Eur J Clin Invest, 2002. **32**(1): p. 35-42.
242. Ohlsson, B.G., et al., *Oxidized low density lipoprotein inhibits lipopolysaccharide-induced binding of nuclear factor-kappaB to DNA and the subsequent expression of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta in macrophages*. J Clin Invest, 1996. **98**(1): p. 78-89.
243. Fowler, A.J., et al., *Liver X receptor activators display anti-inflammatory activity in irritant and allergic contact dermatitis models: liver-X-receptor-specific inhibition of inflammation and primary cytokine production*. J Invest Dermatol, 2003. **120**(2): p. 246-55.
244. Prunet, C., et al., *Multiplexed flow cytometric analyses of pro- and anti-inflammatory cytokines in the culture media of oxysterol-treated human monocytic cells and in the sera of atherosclerotic patients*. Cytometry A, 2006. **69**(5): p. 359-73.
245. Bauman, D.R., et al., *25-Hydroxycholesterol secreted by macrophages in response to Toll-like receptor activation suppresses immunoglobulin A production*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(39): p. 16764-9.
246. Liu, C., et al., *Oxysterols direct B-cell migration through EBI2*. Nature, 2011. **475**(7357): p. 519-23.
247. Benned-Jensen, T., et al., *Molecular characterization of oxysterol binding to the Epstein-Barr Virus-induced gene 2 (GPR183)*. J Biol Chem, 2012.
248. Reiss, A.B., *Effects of inflammation on cholesterol metabolism: impact on systemic lupus erythematosus*. Curr Rheumatol Rep, 2009. **11**(4): p. 255-60.
249. Teunissen, C.E., et al., *24S-hydroxycholesterol in relation to disease manifestations of acute experimental autoimmune encephalomyelitis*. J Neurosci Res, 2007. **85**(7): p. 1499-505.
250. Edwards, P.A., M.A. Kennedy, and P.A. Mak, *LXRs; oxysterol-activated nuclear receptors that regulate genes controlling lipid homeostasis*. Vascul Pharmacol, 2002. **38**(4): p. 249-56.
251. Lund, E.G., J.G. Menke, and C.P. Sparrow, *Liver X receptor agonists as potential therapeutic agents for dyslipidemia and atherosclerosis*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2003. **23**(7): p. 1169-77.
252. Janowski, B.A., et al., *Structural requirements of ligands for the oxysterol liver X receptors LXRalpha and LXRbeta*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(1): p. 266-71.
253. Ory, D.S., *Nuclear receptor signaling in the control of cholesterol homeostasis: have the orphans found a home?* Circ Res, 2004. **95**(7): p. 660-70.
254. Lehmann, J.M., et al., *Activation of the nuclear receptor LXR by oxysterols defines a new hormone response pathway*. J Biol Chem, 1997. **272**(6): p. 3137-40.
255. Mitro, N., et al., *The nuclear receptor LXR is a glucose sensor*. Nature, 2007. **445**(7124): p. 219-23.
256. Zelcer, N. and P. Tontonoz, *Liver X receptors as integrators of metabolic and inflammatory signaling*. J Clin Invest, 2006. **116**(3): p. 607-14.
257. Huwait, E.A., et al., *A novel role for c-Jun N-terminal kinase and phosphoinositide 3-kinase in the liver X receptor-mediated induction of macrophage gene expression*. Cell Signal, 2011. **23**(3): p. 542-9.
258. Beaven, S.W. and P. Tontonoz, *Nuclear receptors in lipid metabolism: targeting the heart of dyslipidemia*. Annu Rev Med, 2006. **57**: p. 313-29.

259. Zhou, C., et al., *Hyperglycemic Ins2AkitaLdlr(-)/(-) mice show severely elevated lipid levels and increased atherosclerosis: a model of type 1 diabetic macrovascular disease*. J Lipid Res, 2011. **52**(8): p. 1483-93.
260. Fuentes, L., T. Roszer, and M. Ricote, *Inflammatory mediators and insulin resistance in obesity: role of nuclear receptor signaling in macrophages*. Mediators Inflamm, 2010. **2010**: p. 219583.
261. Hamlat, N., et al., *Lipogenesis in arterial wall and vascular smooth muscular cells: regulation and abnormalities in insulin-resistance*. Cardiovasc Diabetol, 2009. **8**: p. 64.
262. Kase, E.T., et al., *Liver X receptor antagonist reduces lipid formation and increases glucose metabolism in myotubes from lean, obese and type 2 diabetic individuals*. Diabetologia, 2007. **50**(10): p. 2171-80.
263. Tontonoz, P. and D.J. Mangelsdorf, *Liver X receptor signaling pathways in cardiovascular disease*. Mol Endocrinol, 2003. **17**(6): p. 985-93.
264. Laffitte, B.A., et al., *LXRs control lipid-inducible expression of the apolipoprotein E gene in macrophages and adipocytes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(2): p. 507-12.
265. Shih, S.J., et al., *Duplicated downstream enhancers control expression of the human apolipoprotein E gene in macrophages and adipose tissue*. J Biol Chem, 2000. **275**(41): p. 31567-72.
266. Claudel, T., et al., *Reduction of atherosclerosis in apolipoprotein E knockout mice by activation of the retinoid X receptor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(5): p. 2610-5.
267. Costet, P., et al., *Retinoic acid receptor-mediated induction of ABCA1 in macrophages*. Mol Cell Biol, 2003. **23**(21): p. 7756-66.
268. Avallone, R., et al., *A growth hormone-releasing peptide that binds scavenger receptor CD36 and ghrelin receptor up-regulates sterol transporters and cholesterol efflux in macrophages through a peroxisome proliferator-activated receptor gamma-dependent pathway*. Mol Endocrinol, 2006. **20**(12): p. 3165-78.
269. Akiyama, T.E., et al., *Conditional disruption of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma gene in mice results in lowered expression of ABCA1, ABCG1, and apoE in macrophages and reduced cholesterol efflux*. Mol Cell Biol, 2002. **22**(8): p. 2607-19.
270. Zhou, T., et al., *OSBP-related protein 8 (ORP8) regulates plasma and liver tissue lipid levels and interacts with the nucleoporin Nup62*. PLoS One, 2011. **6**(6): p. e21078.
271. Vihervaara, T., et al., *Cytoplasmic oxysterol-binding proteins: sterol sensors or transporters?* Chem Phys Lipids, 2011. **164**(6): p. 443-50.
272. Vihervaara, T., et al., *Sterol binding by OSBP-related protein 1L regulates late endosome motility and function*. Cell Mol Life Sci, 2011. **68**(3): p. 537-51.
273. Radhakrishnan, A., et al., *Sterol-regulated transport of SREBPs from endoplasmic reticulum to Golgi: oxysterols block transport by binding to Insig*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(16): p. 6511-8.
274. Sun, L.P., et al., *Sterol-regulated transport of SREBPs from endoplasmic reticulum to Golgi: Insig renders sorting signal in Scap inaccessible to COPII proteins*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(16): p. 6519-26.
275. Alpy, F. and C. Tomasetto, *Give lipids a START: the StAR-related lipid transfer (START) domain in mammals*. J Cell Sci, 2005. **118**(Pt 13): p. 2791-801.
276. Rodriguez-Agudo, D., et al., *Human StarD5, a cytosolic StAR-related lipid binding protein*. J Lipid Res, 2005. **46**(8): p. 1615-23.

277. Infante, R.E., et al., *Purified NPC1 protein. I. Binding of cholesterol and oxysterols to a 1278-amino acid membrane protein*. J Biol Chem, 2008. **283**(2): p. 1052-63.
278. Infante, R.E., et al., *Purified NPC1 protein: II. Localization of sterol binding to a 240-amino acid soluble luminal loop*. J Biol Chem, 2008. **283**(2): p. 1064-75.
279. Wang, Y., et al., *A second class of nuclear receptors for oxysterols: Regulation of RORalpha and RORgamma activity by 24S-hydroxycholesterol (cerebrosterol)*. Biochim Biophys Acta, 2010. **1801**(8): p. 917-23.
280. Wang, Y., et al., *Modulation of retinoic acid receptor-related orphan receptor alpha and gamma activity by 7-oxygenated sterol ligands*. J Biol Chem, 2010. **285**(7): p. 5013-25.
281. Hannedouche, S., et al., *Oxysterols direct immune cell migration via EBI2*. Nature, 2011. **475**(7357): p. 524-7.
282. Nachtergaele, S., et al., *Oxysterols are allosteric activators of the oncoprotein Smoothened*. Nat Chem Biol, 2012. **8**(2): p. 211-20.
283. Wang, D.Q. and N.H. Afdhal, *Good cholesterol, bad cholesterol: role of oxysterols in biliary tract diseases*. Gastroenterology, 2001. **121**(1): p. 216-8.
284. Olkkonen, V.M., *Macrophage oxysterols and their binding proteins: roles in atherosclerosis*. Curr Opin Lipidol, 2012.
285. Shibata, N. and C.K. Glass, *Macrophages, oxysterols and atherosclerosis*. Circ J, 2010. **74**(10): p. 2045-51.
286. Saher, G., S. Quintes, and K.A. Nave, *Cholesterol: a novel regulatory role in myelin formation*. Neuroscientist, 2011. **17**(1): p. 79-93.
287. Baraton, G. and A. Revol, *[Activators for sphingohydrolases and the nature of the sphingomyelinase deficiency in Niemann-Pick disease types A, B and C (author's transl)]*. Clin Chim Acta, 1977. **76**(3): p. 339-43.
288. Dietschy, J.M. and S.D. Turley, *Thematic review series: brain Lipids. Cholesterol metabolism in the central nervous system during early development and in the mature animal*. J Lipid Res, 2004. **45**(8): p. 1375-97.
289. Bjorkhem, I. and S. Meaney, *Brain cholesterol: long secret life behind a barrier*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2004. **24**(5): p. 806-15.
290. Edmond, J., et al., *Dietary cholesterol and the origin of cholesterol in the brain of developing rats*. J Nutr, 1991. **121**(9): p. 1323-30.
291. Osono, Y., et al., *Role of the low density lipoprotein receptor in the flux of cholesterol through the plasma and across the tissues of the mouse*. J Clin Invest, 1995. **95**(3): p. 1124-32.
292. Quan, G., et al., *Ontogenesis and regulation of cholesterol metabolism in the central nervous system of the mouse*. Brain Res Dev Brain Res, 2003. **146**(1-2): p. 87-98.
293. Canevari, L. and J.B. Clark, *Alzheimer's disease and cholesterol: the fat connection*. Neurochem Res, 2007. **32**(4-5): p. 739-50.
294. Zurawel, R.H., et al., *Analysis of PTCH/SMO/SHH pathway genes in medulloblastoma*. Genes Chromosomes Cancer, 2000. **27**(1): p. 44-51.
295. Rowitch, D.H., et al., *Sonic hedgehog regulates proliferation and inhibits differentiation of CNS precursor cells*. J Neurosci, 1999. **19**(20): p. 8954-65.
296. Vaillant, C. and D. Monard, *SHH pathway and cerebellar development*. Cerebellum, 2009. **8**(3): p. 291-301.
297. Porter, J.A., K.E. Young, and P.A. Beachy, *Cholesterol modification of hedgehog signaling proteins in animal development*. Science, 1996. **274**(5285): p. 255-9.
298. Karpen, H.E., et al., *The sonic hedgehog receptor patched associates with caveolin-1 in cholesterol-rich microdomains of the plasma membrane*. J Biol Chem, 2001. **276**(22): p. 19503-11.

299. Joubert, O., et al., *Heterologous expression of human membrane receptors in the yeast Saccharomyces cerevisiae*. Methods Mol Biol, 2010. **601**: p. 87-103.
300. Joubert, O., et al., *Functional studies of membrane-bound and purified human Hedgehog receptor Patched expressed in yeast*. Biochim Biophys Acta, 2009. **1788**(9): p. 1813-21.
301. Bidet, M., et al., *The hedgehog receptor patched is involved in cholesterol transport*. PLoS One, 2011. **6**(9): p. e23834.
302. Bidet, M., et al., *The Hedgehog receptor Patched functions in multidrug transport and chemotherapy resistance*. Mol Cancer Res, 2012.
303. Nehme, R., et al., *Stability study of the human G-protein coupled receptor, Smoothed*. Biochim Biophys Acta, 2010. **1798**(6): p. 1100-10.
304. Gilbert, S.F., *Developmental biology (6th ed.)*. . Sunderland, Mass: Sinauer Associates. , 2000.
305. Lee, R.G., et al., *Differential expression of ACAT1 and ACAT2 among cells within liver, intestine, kidney, and adrenal of nonhuman primates*. J Lipid Res, 2000. **41**(12): p. 1991-2001.
306. Rudel, L.L., R.G. Lee, and T.L. Cockman, *Acyl coenzyme A: cholesterol acyltransferase types 1 and 2: structure and function in atherosclerosis*. Curr Opin Lipidol, 2001. **12**(2): p. 121-7.
307. Pitas, R.E., et al., *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, 1987. **262**(29): p. 14352-60.
308. Vance, J.E., H. Hayashi, and B. Karten, *Cholesterol homeostasis in neurons and glial cells*. Semin Cell Dev Biol, 2005. **16**(2): p. 193-212.
309. Bu, G., *Apolipoprotein E and its receptors in Alzheimer's disease: pathways, pathogenesis and therapy*. Nat Rev Neurosci, 2009. **10**(5): p. 333-44.
310. Liu, M., et al., *Apolipoprotein E does not cross the blood-cerebrospinal fluid barrier, as revealed by an improved technique for sampling CSF from mice*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2012.
311. Saito, M., E.P. Benson, and A. Rosenberg, *Metabolism of cholesterol and triacylglycerol in cultured chick neuronal cells, glial cells, and fibroblasts: accumulation of esterified cholesterol in serum-free culture*. J Neurosci Res, 1987. **18**(2): p. 319-25.
312. Hayashi, H., et al., *Glial lipoproteins stimulate axon growth of central nervous system neurons in compartmented cultures*. J Biol Chem, 2004. **279**(14): p. 14009-15.
313. Mauch, D.H., et al., *CNS synaptogenesis promoted by glia-derived cholesterol*. Science, 2001. **294**(5545): p. 1354-7.
314. DeMattos, R.B., et al., *Purification and characterization of astrocyte-secreted apolipoprotein E and J-containing lipoproteins from wild-type and human apoE transgenic mice*. Neurochem Int, 2001. **39**(5-6): p. 415-25.
315. Herz, J., *Apolipoprotein E receptors in the nervous system*. Curr Opin Lipidol, 2009. **20**(3): p. 190-6.
316. Ikonen, E. and M. Jansen, *Cellular sterol trafficking and metabolism: spotlight on structure*. Curr Opin Cell Biol, 2008. **20**(4): p. 371-7.
317. Famer, D., et al., *Regulation of alpha- and beta-secretase activity by oxysterols: cerebrosterol stimulates processing of APP via the alpha-secretase pathway*. Biochem Biophys Res Commun, 2007. **359**(1): p. 46-50.
318. Walter, J., *gamma-Secretase, apolipoprotein E and cellular cholesterol metabolism*. Curr Alzheimer Res, 2012. **9**(2): p. 189-99.

319. Abildayeva, K., et al., *24(S)-hydroxycholesterol participates in a liver X receptor-controlled pathway in astrocytes that regulates apolipoprotein E-mediated cholesterol efflux*. J Biol Chem, 2006. **281**(18): p. 12799-808.
320. Shobab, L.A., G.Y. Hsiung, and H.H. Feldman, *Cholesterol in Alzheimer's disease*. Lancet Neurol, 2005. **4**(12): p. 841-52.
321. Whitney, K.D., et al., *Regulation of cholesterol homeostasis by the liver X receptors in the central nervous system*. Mol Endocrinol, 2002. **16**(6): p. 1378-85.
322. Bjorkhem, I., *Are side-chain oxidized oxysterols regulators also in vivo?* J Lipid Res, 2009. **50 Suppl**: p. S213-8.
323. Shafaati, M., et al., *Enhanced production of 24S-hydroxycholesterol is not sufficient to drive liver X receptor target genes in vivo*. J Intern Med, 2011. **270**(4): p. 377-87.
324. Liu, J.P., et al., *Cholesterol involvement in the pathogenesis of neurodegenerative diseases*. Mol Cell Neurosci, 2010. **43**(1): p. 33-42.
325. Meaney, S., et al., *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, 2002. **43**(12): p. 2130-5.
326. Ohtsuki, S., et al., *Brain-to-blood elimination of 24S-hydroxycholesterol from rat brain is mediated by organic anion transporting polypeptide 2 (oatp2) at the blood-brain barrier*. J Neurochem, 2007. **103**(4): p. 1430-8.
327. Lund, E.G., et al., *Knockout of the cholesterol 24-hydroxylase gene in mice reveals a brain-specific mechanism of cholesterol turnover*. J Biol Chem, 2003. **278**(25): p. 22980-8.
328. Xie, C., et al., *Quantitation of two pathways for cholesterol excretion from the brain in normal mice and mice with neurodegeneration*. J Lipid Res, 2003. **44**(9): p. 1780-9.
329. Dzeletovic, S., et al., *Determination of cholesterol oxidation products in human plasma by isotope dilution-mass spectrometry*. Anal Biochem, 1995. **225**(1): p. 73-80.
330. Bjorkhem, I., et al., *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, 1998. **39**(8): p. 1594-600.
331. Kotti, T.J., et al., *Brain cholesterol turnover required for geranylgeraniol production and learning in mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(10): p. 3869-74.
332. Hudry, E., et al., *Adeno-associated virus gene therapy with cholesterol 24-hydroxylase reduces the amyloid pathology before or after the onset of amyloid plaques in mouse models of Alzheimer's disease*. Mol Ther, 2010. **18**(1): p. 44-53.
333. Brown, J., 3rd, et al., *Differential expression of cholesterol hydroxylases in Alzheimer's disease*. J Biol Chem, 2004. **279**(33): p. 34674-81.
334. Tian, G., et al., *Increased expression of cholesterol 24S-hydroxylase results in disruption of glial glutamate transporter EAAT2 association with lipid rafts: a potential role in Alzheimer's disease*. J Neurochem, 2010. **113**(4): p. 978-89.
335. Ohyama, Y., et al., *Studies on the transcriptional regulation of cholesterol 24-hydroxylase (CYP46A1): marked insensitivity toward different regulatory axes*. J Biol Chem, 2006. **281**(7): p. 3810-20.
336. Kolsch, H., et al., *Polymorphism in the cholesterol 24S-hydroxylase gene is associated with Alzheimer's disease*. Mol Psychiatry, 2002. **7**(8): p. 899-902.
337. Kolsch, H., et al., *The role of 24S-hydroxycholesterol in Alzheimer's disease*. J Nutr Health Aging, 2003. **7**(1): p. 37-41.
338. Zhao, S., et al., *Polar metabolite of cholesterol induces rat cognitive dysfunctions*. Neuroscience, 2009. **164**(2): p. 398-403.

339. Gamba, P., et al., *Interaction between 24-hydroxycholesterol, oxidative stress, and amyloid-beta in amplifying neuronal damage in Alzheimer's disease: three partners in crime*. Aging Cell, 2011. **10**(3): p. 403-17.
340. Heverin, M., et al., *Crossing the barrier: net flux of 27-hydroxycholesterol into the human brain*. J Lipid Res, 2005. **46**(5): p. 1047-52.
341. Gilardi, F., et al., *Expression of sterol 27-hydroxylase in glial cells and its regulation by liver X receptor signaling*. Neuroscience, 2009. **164**(2): p. 530-40.
342. Bjorkhem, I., et al., *Oxysterols and neurodegenerative diseases*. Mol Aspects Med, 2009. **30**(3): p. 171-9.
343. Heverin, M., et al., *Studies on the cholesterol-free mouse: strong activation of LXR-regulated hepatic genes when replacing cholesterol with desmosterol*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2007. **27**(10): p. 2191-7.
344. Milagre, I., et al., *Marked change in the balance between CYP27A1 and CYP46A1 mediated elimination of cholesterol during differentiation of human neuronal cells*. Neurochem Int, 2012. **60**(2): p. 192-8.
345. Milagre, I., et al., *Neuronal differentiation alters the ratio of Sp transcription factors recruited to the CYP46A1 promoter*. J Neurochem, 2012. **120**(2): p. 220-9.
346. Li, C.M., et al., *Lipoprotein-like particles and cholesteryl esters in human Bruch's membrane: initial characterization*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2005. **46**(7): p. 2576-86.
347. Wang, L., et al., *Lipoprotein particles of intraocular origin in human Bruch membrane: an unusual lipid profile*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2009. **50**(2): p. 870-7.
348. Curcio, C.A., et al., *Apolipoprotein B-containing lipoproteins in retinal aging and age-related macular degeneration*. J Lipid Res, 2010. **51**(3): p. 451-67.
349. Starita, C., et al., *Localization of the site of major resistance to fluid transport in Bruch's membrane*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1997. **38**(3): p. 762-7.
350. Duncan, K.G., et al., *Human retinal pigment epithelial cells express scavenger receptors BI and BII*. Biochem Biophys Res Commun, 2002. **292**(4): p. 1017-22.
351. Gordiyenko, N., et al., *RPE cells internalize low-density lipoprotein (LDL) and oxidized LDL (oxLDL) in large quantities in vitro and in vivo*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2004. **45**(8): p. 2822-9.
352. Tserentsoodol, N., et al., *Intraretinal lipid transport is dependent on high density lipoprotein-like particles and class B scavenger receptors*. Mol Vis, 2006. **12**: p. 1319-33.
353. Mast, N., et al., *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, 2011. **52**(1): p. 594-603.
354. Zhang, J., et al., *7alpha-Hydroxylation and 3-dehydrogenation abolish the ability of 25-hydroxycholesterol and 27-hydroxycholesterol to induce apoptosis in thymocytes*. Eur J Biochem, 1997. **247**(1): p. 129-35.
355. Jeitner, T.M., I. Voloshyna, and A.B. Reiss, *Oxysterol derivatives of cholesterol in neurodegenerative disorders*. Curr Med Chem, 2011. **18**(10): p. 1515-25.
356. Korade, Z., et al., *Lipid biomarkers of oxidative stress in a genetic mouse model of Smith-Lemli-Opitz syndrome*. J Inherit Metab Dis, 2012.
357. Xu, L., et al., *An oxysterol biomarker for 7-dehydrocholesterol oxidation in cell/mouse models for Smith-Lemli-Opitz syndrome*. J Lipid Res, 2011. **52**(6): p. 1222-33.
358. Xu, L., et al., *Novel oxysterols observed in tissues and fluids of AY9944-treated rats: a model for Smith-Lemli-Opitz syndrome*. J Lipid Res, 2011. **52**(10): p. 1810-20.

359. Xu, L., et al., *7-Dehydrocholesterol-derived oxysterols and retinal degeneration in a rat model of Smith-Lemli-Opitz syndrome*. Biochim Biophys Acta, 2012. **1821**(6): p. 877-83.
360. Kolsch, H., et al., *Altered levels of plasma 24S- and 27-hydroxycholesterol in demented patients*. Neurosci Lett, 2004. **368**(3): p. 303-8.
361. Koschack, J., et al., *Serum 24S-hydroxycholesterol and hippocampal size in middle-aged normal individuals*. Neurobiol Aging, 2009. **30**(6): p. 898-902.
362. Solomon, A., et al., *Plasma levels of 24S-hydroxycholesterol reflect brain volumes in patients without objective cognitive impairment but not in those with Alzheimer's disease*. Neurosci Lett, 2009. **462**(1): p. 89-93.
363. Schonknecht, P., et al., *Cerebrospinal fluid 24S-hydroxycholesterol is increased in patients with Alzheimer's disease compared to healthy controls*. Neurosci Lett, 2002. **324**(1): p. 83-5.
364. Zuliani, G., et al., *Plasma 24S-hydroxycholesterol levels in elderly subjects with late onset Alzheimer's disease or vascular dementia: a case-control study*. BMC Neurol, 2011. **11**: p. 121.
365. Leoni, V. and C. Caccia, *Oxysterols as biomarkers in neurodegenerative diseases*. Chem Phys Lipids, 2011. **164**(6): p. 515-24.
366. Wang, L., et al., *Liver X receptors in the central nervous system: from lipid homeostasis to neuronal degeneration*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(21): p. 13878-83.
367. Fukumoto, H., et al., *Induction of the cholesterol transporter ABCA1 in central nervous system cells by liver X receptor agonists increases secreted Abeta levels*. J Biol Chem, 2002. **277**(50): p. 48508-13.
368. Vaya, J. and H.M. Schipper, *Oxysterols, cholesterol homeostasis, and Alzheimer disease*. J Neurochem, 2007. **102**(6): p. 1727-37.
369. Javitt, N.B. and J.C. Javitt, *The retinal oxysterol pathway: a unifying hypothesis for the cause of age-related macular degeneration*. Curr Opin Ophthalmol, 2009. **20**(3): p. 151-7.
370. Larrayoz, I.M., et al., *7-ketocholesterol-induced inflammation: involvement of multiple kinase signaling pathways via NFkappaB but independently of reactive oxygen species formation*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2010. **51**(10): p. 4942-55.
371. Moreira, E.F., et al., *7-Ketocholesterol is present in lipid deposits in the primate retina: potential implication in the induction of VEGF and CNV formation*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2009. **50**(2): p. 523-32.
372. Rodriguez, I.R. and S.J. Fliesler, *Photodamage generates 7-keto- and 7-hydroxycholesterol in the rat retina via a free radical-mediated mechanism*. Photochem Photobiol, 2009. **85**(5): p. 1116-25.
373. Rodriguez, I.R. and I.M. Larrayoz, *Cholesterol oxidation in the retina: implications of 7KCh formation in chronic inflammation and age-related macular degeneration*. J Lipid Res, 2010. **51**(10): p. 2847-62.
374. Libby, R.T., et al., *Complex genetics of glaucoma susceptibility*. Annu Rev Genomics Hum Genet, 2005. **6**: p. 15-44.
375. Resch, Z.T. and M.P. Fautsch, *Glaucoma-associated myocilin: a better understanding but much more to learn*. Exp Eye Res, 2009. **88**(4): p. 704-12.
376. Lam, C.Y., et al., *Association of apolipoprotein E polymorphisms with normal tension glaucoma in a Chinese population*. J Glaucoma, 2006. **15**(3): p. 218-22.
377. Ressiniotis, T., et al., *Apolipoprotein E promoter polymorphisms do not have a major influence on the risk of developing primary open angle glaucoma*. Mol Vis, 2004. **10**: p. 805-7.

378. Yucel, I., et al., *Effect of hypercholesterolemia on inducible nitric oxide synthase expression in a rat model of elevated intraocular pressure*. Vision Res, 2005. **45**(9): p. 1107-14.
379. Li, Y., et al., *Intron 2 (T/C) CYP46 polymorphism is associated with Alzheimer's disease in Chinese patients*. Dement Geriatr Cogn Disord, 2006. **22**(5-6): p. 399-404.
380. Wang, B., et al., *Association between a T/C polymorphism in intron 2 of cholesterol 24S-hydroxylase gene and Alzheimer's disease in Chinese*. Neurosci Lett, 2004. **369**(2): p. 104-7.
381. Tamura, H., et al., *High frequency of open-angle glaucoma in Japanese patients with Alzheimer's disease*. J Neurol Sci, 2006. **246**(1-2): p. 79-83.
382. Janciauskiene, S. and T. Krakau, *Alzheimer's peptide: a possible link between glaucoma, exfoliation syndrome and Alzheimer's disease*. Acta Ophthalmol Scand, 2001. **79**(3): p. 328-9.
383. Ning, A., et al., *Amyloid-beta deposits lead to retinal degeneration in a mouse model of Alzheimer disease*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2008. **49**(11): p. 5136-43.
384. Lutjohann, D., et al., *Cholesterol homeostasis in human brain: evidence for an age-dependent flux of 24S-hydroxycholesterol from the brain into the circulation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(18): p. 9799-804.
385. Klein, R., et al., *Prevalence of age-related macular degeneration in the US population*. Arch Ophthalmol, 2011. **129**(1): p. 75-80.
386. Haddad, S., et al., *The genetics of age-related macular degeneration: a review of progress to date*. Surv Ophthalmol, 2006. **51**(4): p. 316-63.
387. Kanda, A., et al., *A variant of mitochondrial protein LOC387715/ARMS2, not HTRA1, is strongly associated with age-related macular degeneration*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(41): p. 16227-32.
388. Wang, G., et al., *A novel ARMS2 splice variant is identified in human retina*. Exp Eye Res, 2012. **94**(1): p. 187-91.
389. Laine, M., et al., *Y402H polymorphism of complement factor H affects binding affinity to C-reactive protein*. J Immunol, 2007. **178**(6): p. 3831-6.
390. Xu, Y., et al., *Association of CFH, LOC387715, and HTRA1 polymorphisms with exudative age-related macular degeneration in a northern Chinese population*. Mol Vis, 2008. **14**: p. 1373-81.
391. Fourgeux, C., et al., *Primary open-angle glaucoma: association with cholesterol 24S-hydroxylase (CYP46A1) gene polymorphism and plasma 24-hydroxycholesterol levels*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2009. **50**(12): p. 5712-7.
392. Dashti, N., et al., *Plasma apolipoproteins and risk for age related maculopathy*. Br J Ophthalmol, 2006. **90**(8): p. 1028-33.
393. Smith, W., et al., *Risk factors for age-related macular degeneration: Pooled findings from three continents*. Ophthalmology, 2001. **108**(4): p. 697-704.
394. Carroll, M.D., et al., *Trends in serum lipids and lipoproteins of adults, 1960-2002*. JAMA, 2005. **294**(14): p. 1773-81.
395. Fliesler, S.J. and L. Bretillon, *The ins and outs of cholesterol in the vertebrate retina*. J Lipid Res, 2010. **51**(12): p. 3399-413.
396. Shifera, A.S., et al., *Constitutive secretion of chemokines by cultured human trabecular meshwork cells*. Exp Eye Res, 2010. **91**(1): p. 42-7.
397. Jo, N., G.S. Wu, and N.A. Rao, *Upregulation of chemokine expression in the retinal vasculature in ischemia-reperfusion injury*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2003. **44**(9): p. 4054-60.

398. Sun, M.H., et al., *Retinal protection from acute glaucoma-induced ischemia-reperfusion injury through pharmacologic induction of heme oxygenase-1*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2010. **51**(9): p. 4798-808.
399. Rutar, M., et al., *Early Focal Expression of the Chemokine Ccl2 by Muller Cells during Exposure to Damage-Inducing Bright Continuous Light*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2011. **52**(5): p. 2379-88.
400. Schnebelen, C., et al., *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, 2009. **247**(9): p. 1191-203.
401. Mochizuki, M., *Regional immunity of the eye*. Acta Ophthalmol, 2010. **88**(3): p. 292-9.
402. Malvitte, L., et al., *Measurement of inflammatory cytokines by multicytokine assay in tears of patients with glaucoma topically treated with chronic drugs*. Br J Ophthalmol, 2007. **91**(1): p. 29-32.
403. Yoshida, S., A. Yoshida, and T. Ishibashi, *Induction of IL-8, MCP-1, and bFGF by TNF-alpha in retinal glial cells: implications for retinal neovascularization during post-ischemic inflammation*. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 2004. **242**(5): p. 409-13.
404. Smiljanic, K., et al., *Brain injury induces cholesterol 24-hydroxylase (Cyp46) expression in glial cells in a time-dependent manner*. Histochem Cell Biol, 2010. **134**(2): p. 159-69.
405. Ramirez, A.I., et al., *Quantification of the effect of different levels of IOP in the astroglia of the rat retina ipsilateral and contralateral to experimental glaucoma*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2010. **51**(11): p. 5690-6.
406. Muller, A., T.G. Hauk, and D. Fischer, *Astrocyte-derived CNTF switches mature RGCs to a regenerative state following inflammatory stimulation*. Brain, 2007. **130**(Pt 12): p. 3308-20.
407. Tezel, G., *The immune response in glaucoma: a perspective on the roles of oxidative stress*. Exp Eye Res, 2011. **93**(2): p. 178-86.
408. Shafaati, M., et al., *The antifungal drug voriconazole is an efficient inhibitor of brain cholesterol 24S-hydroxylase in vitro and in vivo*. J Lipid Res, 2010. **51**(2): p. 318-23.
409. Simitsopoulou, M., et al., *Expression of immunomodulatory genes in human monocytes induced by voriconazole in the presence of Aspergillus fumigatus*. Antimicrob Agents Chemother, 2007. **51**(3): p. 1048-54.
410. Mast, N., et al., *Structural basis of drug binding to CYP46A1, an enzyme that controls cholesterol turnover in the brain*. J Biol Chem, 2010. **285**(41): p. 31783-95.
411. Mast, N., et al., *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, 2008. **105**(28): p. 9546-51.
412. Alarcon-Martinez, L., et al., *ERG changes in albino and pigmented mice after optic nerve transection*. Vision Res, 2010. **50**(21): p. 2176-87.
413. Alarcon-Martinez, L., et al., *Short and long term axotomy-induced ERG changes in albino and pigmented rats*. Mol Vis, 2009. **15**: p. 2373-83.
414. Cuenca, N., et al., *Changes in the inner and outer retinal layers after acute increase of the intraocular pressure in adult albino Swiss mice*. Exp Eye Res, 2010. **91**(2): p. 273-85.
415. Gao, H., et al., *Intravitreal voriconazole: an electroretinographic and histopathologic study*. Arch Ophthalmol, 2004. **122**(11): p. 1687-92.

416. Harrison, J., et al., *Retinal Function Assessed by ERG Before and After Induction of Ocular Aspergillosis and Treatment by the Anti-fungal, Micafungin, in Rabbits*. Doc Ophthalmol, 2005. **110**(1): p. 37-55.
417. Krady, J.K., et al., *Minocycline reduces proinflammatory cytokine expression, microglial activation, and caspase-3 activation in a rodent model of diabetic retinopathy*. Diabetes, 2005. **54**(5): p. 1559-65.
418. Pang, T., et al., *Minocycline ameliorates LPS-induced inflammation in human monocytes by novel mechanisms including LOX-1, Nur77 and LITAF inhibition*. Biochim Biophys Acta, 2012. **1820**(4): p. 503-10.
419. Fourgeux, C., et al., *Steady-state levels of retinal 24S-hydroxycholesterol are maintained by glial cells intervention after elevation of intraocular pressure in the rat*. Acta Ophthalmol, 2012.
420. Levkovitch-Verbin, H., et al., *Minocycline delays death of retinal ganglion cells in experimental glaucoma and after optic nerve transection*. Arch Ophthalmol, 2006. **124**(4): p. 520-6.
421. Zhang, C., et al., *Neuroprotection of photoreceptors by minocycline in light-induced retinal degeneration*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2004. **45**(8): p. 2753-9.
422. Bosco, A., et al., *Reduced retina microglial activation and improved optic nerve integrity with minocycline treatment in the DBA/2J mouse model of glaucoma*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2008. **49**(4): p. 1437-46.
423. Del Carratore, R., et al., *Itraconazole inhibits HMEC-1 angiogenesis*. Biomed Pharmacother, 2012. **66**(4): p. 312-7.
424. Nacev, B.A., et al., *The antifungal drug itraconazole inhibits vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR2) glycosylation, trafficking, and signaling in endothelial cells*. J Biol Chem, 2011. **286**(51): p. 44045-56.
425. Shi, W., et al., *Itraconazole side chain analogues: structure-activity relationship studies for inhibition of endothelial cell proliferation, vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR2) glycosylation, and hedgehog signaling*. J Med Chem, 2011. **54**(20): p. 7363-74.
426. Xu, J., et al., *Cholesterol trafficking is required for mTOR activation in endothelial cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(10): p. 4764-9.
427. Olkkonen, V.M., *Oxysterol binding protein and its homologues: new regulatory factors involved in lipid metabolism*. Curr Opin Lipidol, 2004. **15**(3): p. 321-7.
428. Olkkonen, V.M. and M. Lehto, *Oxysterols and oxysterol binding proteins: role in lipid metabolism and atherosclerosis*. Ann Med, 2004. **36**(8): p. 562-72.
429. Olkkonen, V.M. and T.P. Levine, *Oxysterol binding proteins: in more than one place at one time?* Biochem Cell Biol, 2004. **82**(1): p. 87-98.
430. Nunes, M.J., et al., *Okadaic acid inhibits the trichostatin A-mediated increase of human CYP46A1 neuronal expression in a ERK1/2-Sp3-dependent pathway*. J Lipid Res, 2012. **53**(9): p. 1910-9.
431. Milagre, I., et al., *Chromatin-modifying agents increase transcription of CYP46A1, a key player in brain cholesterol elimination*. J Alzheimers Dis, 2010. **22**(4): p. 1209-21.
432. Nunes, M.J., et al., *Sp proteins play a critical role in histone deacetylase inhibitor-mediated derepression of CYP46A1 gene transcription*. J Neurochem, 2010. **113**(2): p. 418-31.
433. Fourgeux, C., et al., *Single Nucleotide Polymorphism in the Cholesterol-24S-Hydroxylase (CYP46A1) Gene and Its Association with CFH and LOC387715 Gene Polymorphisms in Age-Related Macular Degeneration*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2012. **53**(11): p. 7026-7033.

- 434. Fourgeux, C., et al., *Neuron-Glia Interactions: May 24S-Hydroxycholesterol Be a Signal Molecule in the Retina in the Course of Retinal Ganglion Cell Loss?* ARVO Meeting Abstracts, 2010. **51**: p. E-Abstract 5998.
- 435. Fourgeux, C., et al., *In Vivo Consequences Of Cholesterol-24s-hydroxylase (CYP46A1) Inhibition By Voriconazole On Cholesterol Homeostasis And Function In The Rat Retina.* ARVO Meeting Abstracts, 2011. **52**(6): p. 519.
- 436. Fourgeux, C., et al., *Effects of 24S-hydroxycholesterol on primary glial Müller cells. New insights on Müller cells function and cholesterol homeostasis in the retina.* ARVO Meeting Abstracts, 2012.

Annexes

Revue sur le glaucome (24S-OH, CYP46A1):

Fourgeux, C., Bron, A., Acar, N., Creuzot-Garcher, C., Bretillon, L. 24S-hydroxycholesterol and cholesterol-24S-hydroxylase (CYP46A1) in the retina: from cholesterol homeostasis to pathophysiology of glaucoma. *Chem Phys Lipids*, 164 (2011) 496-499.



Review

24S-hydroxycholesterol and cholesterol-24S-hydroxylase (CYP46A1) in the retina: from cholesterol homeostasis to pathophysiology of glaucoma

Cynthia Fourgeux^a, Alain Bron^{a,b}, Niyazi Acar^a, Catherine Creuzot-Garcher^{a,b}, Lionel Bretillon^{a,*}^a Eye & Nutrition Research Group, Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation, UMR 1324 INRA, 6265 CNRS, University of Burgundy, Centre de recherche INRA, 17 rue Sully, F-21000 Dijon, France^b Department of Ophthalmology, University Hospital, 3 rue du Faubourg Raines, F-21000 Dijon, France

ARTICLE INFO

Article history:
Available online 21 April 2011Keywords:
Retina
Cholesterol
Metabolism
Glaucoma
Neuron

ABSTRACT

Free cholesterol is the predominant form of cholesterol in the neural retina. The vertebrate neural retina exhibits its own capacity to synthesize cholesterol and meets its demand also by taking it from the circulation. Defects in cholesterol synthesis and trafficking in the neural retina has detrimental consequences on its structure and function, highlighting the crucial importance of maintaining cholesterol homeostasis in the retina. Our purpose was to give a review on the functioning of the retina, the role of cholesterol and cholesterol metabolism therein, with special emphasis on cholesterol-24S-hydroxylase (CYP46A1). Similar to the brain, the retina expresses cholesterol-24S-hydroxylase (CYP46A1) and is enriched in its metabolic product, 24S-hydroxycholesterol. We recently published that one single nucleotide polymorphism in CYP46A1 gene, designated as rs754203, was a risk factor for glaucoma. Glaucoma is the second leading cause of blindness worldwide, affecting more than 60 million people. Glaucoma is characterized by the loss of retinal ganglion cells, which show high CYP46A1 expression. These data suggest the potential involvement of CYP46A1 and 24S-hydroxycholesterol in the pathophysiology of glaucoma.

© 2011 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

Contents

1. Introduction	496
2. Structure and function of the retina	497
3. The metabolism of cholesterol in the retina	497
4. Role of cholesterol-24S-hydroxylase (CYP46A1) in the retina	498
5. Clinical relevance of 24S-hydroxycholesterol and CYP46A1 in retinal diseases	498
6. Conclusion	498
References	498

1. Introduction

The retina covers the internal side of the ocular globe at its posterior pole. The retina is composed of the neurosensory retina and the retinal pigment epithelium (RPE). The retina is a sensitive target of aging. Age-related Macular Degeneration (AMD), diabetic retinopathy and glaucoma are the most prevalent retinal patholo-

gies in aged Western populations. AMD is the leading cause of visual loss in developed countries (Fine et al., 2000). Glaucoma is the second blinding disease worldwide after cataract. More than 60 millions people suffer from glaucoma in the world in 2010, 80 millions are expected in 2020 (Quigley and Broman, 2006). Diabetic retinopathy is a major concern in the next decades, accounting the growing number of subjects with diabetes and that 30–40% of diabetic patients develop diabetic retinopathy.

The neurosensory retina is rich in lipids: 25% of the dry matter, partitioned between 90% phospholipids and 10% cholesterol (Bretillon et al., 2008b). Cholesterol is the main sterol in the vertebrate retina (Fliesler and Schroepfer, 1982). Cholesterol is exclusively present as the free form in the neurosensory retina (Bretillon et al., 2008b). Deposits of free cholesterol and cholesteryl esters at the basement of RPE are hallmarks of aging in humans, and

Abbreviations: AMD, age-related macular degeneration; DHA, docosahexaenoic acid; RGC, retinal ganglion cells; RPE, retinal pigment epithelium; SLOS, Smith-Lemli-Opitz syndrome.

* Corresponding author. Tel.: +33 (0)380693121; fax: +33 (0)380693223.
E-mail addresses: cfourgeux@dijon.inra.fr (C. Fourgeux), alain.bron@chu-dijon.fr (A. Bron), acar@dijon.inra.fr (N. Acar), catherine.creuzot-garcher@chu-dijon.fr (C. Creuzot-Garcher), lionel.bretillon@dijon.inra.fr (L. Bretillon).

0009-3084/\$ – see front matter © 2011 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.
doi:10.1016/j.chemphyslip.2011.04.006

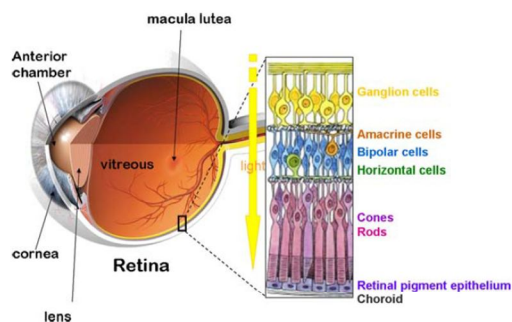


Fig. 1. Structural organization of the human eye and retina. The yellow arrow illustrates the way light enters the retina.

AMD (Curcio et al., 2010). The neurosensory retina belongs to the central nervous system. As such, it exhibits a specific physical and metabolic barrier which limits the entry of exogenous molecules and the export of endogenous ones.

In the present review, after a brief summary on the structure and function of the retina, we will highlight the main findings related to the putative role of cholesterol-24S-hydroxylase in the retina, and its age-related diseases.

2. Structure and function of the retina

The primary function of the retina is to convert light into an electrical signal which is transferred to the brain via the optic nerve. The neurosensory retina contains photosensitive cells, neurons and glial cells. Various types of neurons are present in the neurosensory retina: bipolar cells, ganglion cells, amacrine cells, horizontal cells. The architecture of the neurosensory retina is reverse to the way light enters. Indeed, cones and rods which are the light-sensitive cells are located at the most external side of the neurosensory retina, at the vicinity of the RPE (Fig. 1). The coding function of the retina is dependent not only to photoreceptors but also to neurons, glial cells and RPE which amplify the signal. Rods represent the prominent population of photoreceptors compared to cones, even in most diurnal animal species (Masland, 2001). The structural organization of photoreceptors and neurons in the retina is unique. The signal emerges from rods and cones independently, is transmitted to bipolar cells, and converges to ganglion cells. On the contrary to the cone pathway which involves a one-to-one association of cone-bipolar cell-ganglion cell, the rod system is much more convergent since the signal from many rods is pooled to generate a signal in one ganglion cells. About 100 millions of cones and rods and 1 million of ganglion cells are present in the retina. This relationship between photoreceptors, bipolar cells and ganglion cells maximize the response to light, especially in rods. The ability of photoreceptors to convert light photons into an electrical signal is due to the presence of a photopigment (opsin in cones, rhodopsin in rods) in their outer segments. The outer segment of a photoreceptor consists in a stack of disk membranes that are synthesized in the proximal portion of the outer segment and shed at its apical side. Rhodopsin is a G-protein coupled receptor which is present in the outer segments. Absorption of photon by rhodopsin yields conformational movements of rhodopsin that result in activation of the G-protein and biological response. The lipid environment of rhodopsin is a key effector of these changes (Brown et al., 2010). Docosahexaenoic acid (DHA) is a long chain polyunsaturated fatty acid from the omega 3 series. It is present at high levels in the neurosensory retina: about 15% in the whole human retina (Bretillon et al., 2008b), and accounts for 50% of the fatty acids in the outer segments of photoreceptors (Fliesler and Anderson, 1983). DHA

improves the kinetics of the photocycle by creating specific intermolecular associations with rhodopsin. On the contrary, despite no direct specific interactions, cholesterol stabilizes rhodopsin and impairs its activation (Grossfield et al., 2006). Electroretinography is a suitable method to monitor the capacity of the retina to respond to light stimulus. The retina of animals reared under a diet deficient in omega 3 fatty acids is depleted in DHA, and shows a reduced electroretinographic response (Neuringer et al., 1986). The consequences of cholesterol deficiency on retinal function are far less well known than for DHA. Smith-Lemli-Opitz syndrome (SLOS) is a congenital metabolic disease which is characterized by the biochemical defect in the conversion of 7-dehydrocholesterol to cholesterol. The rodent model of SLOS shows a 2-fold reduction of the sensitivity and maximum amplitude response of rods to light stimulation, compared to control animals (Fliesler et al., 2004). It remains much more difficult to evaluate the situation in humans, since electroretinographic data in humans have been collected in patients treated by long term dietary supplementation with cholesterol starting at young ages. Nevertheless and despite this limitation, reduced saturated response amplitude of rods has been reported in SLOS patients (Garry et al., 2010). At the opposite of cholesterol depletion in SLOS, Niemann-Pick type C disease is characterized by cholesterol accumulation in neurons of the brain (Paul et al., 2004). Niemann-Pick type C disease is a rare autosomal recessive disorder characterized by the impairment of the endosomal-lysosomal pathway, leading to excessive storage of lysosomes. The mouse model of Niemann-Pick type C deficiency showed age-dependent altered electroretinographic response, and neurodegeneration (Claudepierre et al., 2010).

3. The metabolism of cholesterol in the retina

Cholesterol is exclusively present as free form in the neurosensory retina (Bretillon et al., 2008b), and distributed in all cell layers (Bretillon et al., 2008a). Cholesterol in the neuroretina originates from *in situ* synthesis and extra-retinal sources. The relative contribution of cholesterol coming from the circulation and local biosynthesis remains unknown. The capacity of the retina to synthesize cholesterol has been suggested from studies using radiolabelled precursors of cholesterol. RPE, Müller cells and rods express HMGCoA reductase, the rate-limiting enzyme in the cholesterol biosynthetic pathway (Fliesler and Bretillon, 2010). Lipoproteins, i.e., LDL and HDL, are the circulating carriers of free cholesterol and cholesteryl esters. RPE creates the blood-retinal barrier at the basement of the neurosensory retina. Tight junctions between RPE cells limit the intercellular movements of molecules to water and small molecules. RPE cells express various lipoprotein and scavenger receptors which can promote the recognition of cholesterol-rich lipoprotein and enhance the entry of cholesterol in the neurosensory retina (Fliesler and Bretillon, 2010). Indeed, Tserentsoodol et al. (2006) showed that cholesterol bound to LDL can reach the RPE and enter the neurosensory retina. As mentioned above, Müller cells express HMGCoA reductase. Glia is also known to support neurons in the formation and maintenance of synapses (Pfrieger, 2010) in which the role cholesterol is crucial (Pfrieger, 2003). Therefore and altogether these data suggest that glial Müller cells may also contribute to deliver cholesterol to neurons.

As illustrated from the consequences for the retina of cholesterol accumulation in the *npc1*^{-/-} murine model of SLOS (Claudepierre et al., 2010), the export of cholesterol is mandatory to maintain the balance with cholesterol import and *in situ* biosynthesis. Both the neurosensory retina and RPE cells express proteins which participate to cholesterol export in other tissues than the retina, such as ABCA1, apoE, ApoA1 or SR-BI (Fliesler and Bretillon, 2010). The role and activity of these proteins in the retina remains to be fully defined. RPE cells have the capacity to synthesize lipoprotein-like

particles which may also play a role in these mechanisms of efflux and influx of cholesterol in the retina (Curcio et al., 2009).

4. Role of cholesterol-24S-hydroxylase (CYP46A1) in the retina

Similar to the brain (Björkhem et al., 1997, 1998; Lund et al., 1999; Lutjohann et al., 1996), the neurosensory retina expresses cholesterol-24S-hydroxylase (CYP46A1) (Bretillon et al., 2007; Ramirez et al., 2008). CYP46A1 is a microsomal cytochrome P450 enzyme which catalyzes the hydroxylation of cholesterol at position C24. 24S-Hydroxycholesterol is formed from cholesterol by CYP46A1 activity at relatively low rate. The rate of 24S-hydroxycholesterol synthesis in rat brain *in vivo* was estimated to be 0.02% of the endogenous pool of cholesterol per hour (Björkhem et al., 1997). We quantified 24S-hydroxycholesterol in post-mortem human retinas. 24S-hydroxycholesterol ranged from 0.11 to 0.47 ng of 24S-hydroxycholesterol per microgram of cholesterol (Fliesler and Bretillon, 2010), a value similar to that measured in the brain (Lutjohann et al., 1996). In the brain, 24S-hydroxycholesterol production has been suggested to represent a mechanism of cholesterol removal from neurons, since the rate of 24S-hydroxycholesterol synthesis nearly equal that of cholesterol (Björkhem et al., 1997). CYP46A1 would therefore maintain cholesterol homeostasis in the brain, and possibly in the neurosensory retina also. Other mechanisms than CYP46A1 have been described in the retina. 7-Ketocholesterol is a non enzymatic-oxidation product of cholesterol. Formation of 7-ketocholesterol in the retina has thoroughly been studied in the retina, in connection with oxidative stress, aging and AMD. Interested readers should refer to the recent review from Rodriguez (Rodriguez and Larrayoz, 2010). Cholesterol-27-hydroxylase (CYP27A1) shows the similar property as CYP46A1 to convert cholesterol into a more polar metabolite. 27-Hydroxycholesterol is formed by CYP27A1 activity (Pikuleva et al., 1998). CYP27A1 expression has been reported in the retina: Müller cells, and at minor levels RPE and choriocapillaris (Lee et al., 2006). Recent findings suggest that the oxidation of 27-hydroxycholesterol into cholestenic acid takes place in the retina. Formation of cholestenic acid would exceed that of 24S-hydroxycholesterol and 27-hydroxycholesterol in the retina (Mast et al., 2011). On the contrary to the formation of 7-ketocholesterol, 27-hydroxycholesterol and cholestenic acid, the synthesis of 24S-hydroxycholesterol is specific to neurons.

5. Clinical relevance of 24S-hydroxycholesterol and CYP46A1 in retinal diseases

The relevance of 24S-hydroxycholesterol as a marker for brain neurodegeneration has been questioned and is reviewed elsewhere (Björkhem, 2006; Leoni, 2009). Early phases of neurodegeneration in patients with Alzheimer's disease have been associated with elevated plasma levels of 24S-hydroxycholesterol (Lutjohann et al., 2000). On the contrary, patients at late phases of the disease had reduced 24S-hydroxycholesterol levels in brain (Heverin et al., 2004) and plasma (Bretillon et al., 2000). Glial expression of CYP46A1 has also been reported in the brain of Alzheimer's patients (Bogdanovic et al., 2001; Brown et al., 2004). One may suspect glia to compensate for the loss of neurons while expressing CYP46A1. Retinal ganglion cells (RGC) specifically express CYP46A1 (Bretillon et al., 2007; Ramirez et al., 2008). Glaucoma is a group of optic neuropathies which are all characterized by the loss of RGC (Kwon et al., 2009). Degeneration of RGC and their axons in the optic nerve results in a concomitant pattern of visual loss (Weinreb and Khaw, 2004). Independently or in addition to elevated intraocular pressure, other factors contribute to the death of RGC, including genetic

predisposition (Wiggs, 2007). Müller cells play a key role in the maintenance of RGC bodies in the retina. Besides participating to lipid metabolism including fatty acid oxidation (Atsuzawa et al., 2010), these cells are involved in the control of the extracellular environment, maintain the extracellular glutamate and ion balance, and modulate oxidative stress at the vicinity of RGC (Bringmann et al., 2006). In a group of patients with primary open angle glaucoma, we evaluated whether plasma 24S-hydroxycholesterol concentration would be associated with the disease and the stage of glaucoma. Plasma 24S-hydroxycholesterol levels did not differ in glaucoma patients compared to controls (Fourgeux et al., 2009). Although patients with early glaucoma had slightly elevated 24S-hydroxycholesterol plasma concentrations, compared to control subjects, or glaucoma patients at moderate or late stages of the disease, the difference failed to reach significance. We also analyzed the rs754203 single nucleotide polymorphism (SNP) in *cyp46a1* gene in our population. rs754203 SNP has been associated with Alzheimer's disease in some (Fu et al., 2009; Golanska et al., 2009; Li et al., 2006; Papassotiropoulos et al., 2003; Wang et al., 2004) but not all studies (Garcia et al., 2009). Interestingly, glaucoma patients presented higher frequency of the T-allele in *cyp46a1* gene compared to control subjects. Therefore, our finding suggested that the rs754203 SNP in intron 2 of *cyp46a1* gene was associated with a significant risk for glaucoma (OR = 1.26; 95% CI = 1.006–1.574) (Fourgeux et al., 2009). The mechanisms behind this association remain unknown. In our population of controls and glaucoma patients, subjects with the TT-genotype had slightly higher plasma 24S-hydroxycholesterol levels than CC and CT-carriers (Fourgeux et al., 2009). We may suspect similar differences in 24S-hydroxycholesterol concentrations in all organs, including brain and retina. 24S-hydroxycholesterol is a potent inducer of oxidative stress and the inflammatory response in RPE cells (Joffre et al., 2007). 24S-hydroxycholesterol inhibits the production of Aβ peptide in neurons (Brown et al., 2004) but, under pathological conditions, would potentiate its apoptotic effects (Gamba et al., 2011). In experimental glaucoma, Aβ colocalizes with apoptotic RGC (Guo et al., 2007). Therefore, we may suggest that higher – if any – levels of 24S-hydroxycholesterol in the retina might potentiate apoptosis of RGC in glaucoma patients carrying the TT-genotype in *cyp46a1* gene. If we assume this hypothesis to be realistic, SNP in *cyp46a1* gene and 24S-hydroxycholesterol would not be risk factors for glaucoma *per se*, but would participate to RGC loss under pathophysiological conditions.

6. Conclusion

Cholesterol-24S-hydroxylase is a neuron-specific enzyme involved in cholesterol homeostasis. Similar to the brain where it was initially described, the neurosensory retina expresses CYP46A1. Associations between 24S-hydroxycholesterol and neurodegeneration have been suspected. Special emphasis may be placed on the role of CYP46A1 and 24S-hydroxycholesterol in retinal ganglion cells in the development of glaucoma. Within this context, it remains unknown whether formation of 24S-hydroxycholesterol may be considered beneficial by preventing from toxic effects of cholesterol accumulation in neurons, or as an amplifier of neurodegeneration via Aβ peptide formation for instance.

References

- Atsuzawa, K., Nakazawa, A., Mizutani, K., Fukasawa, M., Yamamoto, N., Hashimoto, T., Usuda, N., 2010. Immunohistochemical localization of mitochondrial fatty acid beta-oxidation enzymes in Muller cells of the retina. *Histochem. Cell Biol.* 134, 565–579.
- Björkhem, I., 2006. Crossing the barrier: oxysterols as cholesterol transporters and metabolic modulators in the brain. *J. Intern. Med.* 260, 493–508.

- Björkhem, I., Lütjohann, D., Breuer, O., Sakinis, A., Wennmalm, A., 1997. Importance of a novel oxidative mechanism for elimination of brain cholesterol turnover of cholesterol and 24(S)-hydroxycholesterol in rat brain as measured with $^{18}\text{O}_2$ techniques in vivo and in vitro. *J. Biol. Chem.* 272, 30178–30184.
- Björkhem, I., Lütjohann, 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.
- Bogdanovic, N., Bretillon, L., Lund, E.G., Diczfalussy, U., Lannfelt, L., Winblad, B., Russell, D.W., Björkhem, I., 2001. On the turnover of brain cholesterol in patients with Alzheimer's disease abnormal induction of the cholesterol-catabolic enzyme CYP46 in glial cells. *Neurosci. Lett.* 314, 45–48.
- Bretillon, L., Acar, N., Seeliger, M.W., Santos, M., Maire, M.A., Juaneda, P., Martine, L., Gregoire, S., Joffre, C., Bron, A.M., Creuzot-Garcher, C., 2008a. ApoB $_{100}$ LDLR $^{-/-}$ mice exhibit reduced electroretinographic response and cholesterol esters deposits in the retina. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 49, 1307–1314.
- Bretillon, L., Diczfalussy, U., Björkhem, 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., Siden, A., Wahlund, L.O., Lütjohann, D., Minthon, L., Crisby, M., Hillert, J., Groth, C.G., Diczfalussy, U., Björkhem, I., 2000. Plasma levels of 24S-hydroxycholesterol in patients with neurological diseases. *Neurosci. Lett.* 293, 87–90.
- Bretillon, L., Thuret, G., Grégoire, S., Acar, N., Joffre, C., Bron, A., Gain, P., Creuzot-Garcher, C., 2008b. Lipid and fatty acid profile of the retina, retinal pigment epithelium/choroid, and lacrimal gland, and associations with adipose tissue fatty acids in human subjects. *Exp. Eye Res.* 87, 521–528.
- Bringmann, A., Pannicke, T., Grosche, J., Francke, M., Wiedemann, P., Skatchkov, S.N., Osborne, N.N., Reichenbach, A., 2006. Müller cells in the healthy and diseased retina. *Prog. Retin. Eye Res.* 25, 397.
- Brown 3rd, J., Theisler, C., Silberman, S., Magnuson, D., Gottardi-Littell, N., Lee, J.M., Yager, D., Crowley, J., Sambamurti, K., Rahman, M.M., Reiss, A.B., Eckman, C.B., Wolozin, B., 2004. Differential expression of cholesterol hydroxylases in Alzheimer's disease. *J. Biol. Chem.* 279, 34674–34681.
- Brown, M.F., Salgado, G.F.J., Struts, A.V., 2010. Retinal dynamics during light activation of rhodopsin revealed by solid-state NMR spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta* 1798, 177–193.
- 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.
- Curcio, C.A., Johnson, M., Huang, J.D., Rudolf, M., 2009. Aging age-related macular degeneration, and the response-to-retention of apolipoprotein B-containing lipoproteins. *Prog. Retin. Eye Res.* 28, 393–422.
- 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.
- Fine, S.L., Berger, J.W., Maguire, M.G., Ho, A.C., 2000. Age-related macular degeneration. *N. Engl. J. Med.* 342, 483–492.
- Fliesler, S.J., Anderson, R.E., 1983. Chemistry and metabolism of lipids in the vertebrate retina. *Prog. Retin. Eye Res.* 22, 79–131.
- 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., Richards, M.J., Nagel, B.A., Vaughan, D.K., 2004. Retinal degeneration in a rodent model of Smith-Lemli-Opitz syndrome: electrophysiologic, biochemical, and morphologic features. *Arch. Ophthalmol.* 122, 1190–1200.
- Fliesler, S.J., Schroeffer Jr., G.J., 1982. Sterol composition of bovine retinal rod outer segment membranes and whole retinas. *Biochim. Biophys. Acta* 711, 138–148.
- Fourgeux, C., Martine, L., Björkhem, 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.
- 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.
- Gamba, P., Leonarduzzi, G., Tamagno, E., Guglielmo, M., Testa, G., Sottero, B., Gargiulo, S., Biasi, F., Mauro, A., Vina, J., Poli, G., 2011. Interaction between 24hydroxycholesterol, oxidative stress and amyloid-beta in amplifying neuronal damage in Alzheimer's disease: three partners in crime. *Aging Cell* Jan 27, doi:10.1111/j.14749726.2011.00681.x.
- Garcia, A., Muniz, M., Souza e Silva, H., da Silva, H., Athayde-Junior, L., 2009. Cyp46 polymorphisms in Alzheimer's disease: a review. *J. Mol. Neurosci.* 39, 342–345.
- Garry, D., Hansen, R., Moskowitz, A., Elias, E., Irons, M., Fulton, A., 2010. Cone ERG responses in patients with Smith-Lemli-Opitz Syndrome (SLOS). *Doc. Ophthalmol.* 121, 85–91.
- Golanska, E., Hulas-Bigoszewska, K., Sieruta, M., Zawlik, I., Witusik, M., Gresner, S.M., Sobow, T., Styczynska, M., Peplonska, B., Barcikowska, M., Liberski, P.P., Corder, E.H., 2009. Earlier onset of Alzheimer's disease: risk polymorphisms within PRNP, PRND CYP46, and APOE genes. *J. Alzheimers Dis.* 17, 359–368.
- Grossfield, A., Feller, S.E., Pitman, M.C., 2006. A role for direct interactions in the modulation of rhodopsin by {omega}-3 polyunsaturated lipids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 4888–4893.
- 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.
- Heverin, M., Bogdanovic, N., Lütjohann, D., Bayer, T., Pikuleva, I., Bretillon, L., Diczfalussy, U., Winblad, B., Björkhem, I., 2004. Changes in the levels of cerebral and extracerebral sterols in the brain of patients with Alzheimer's disease. *J. Lipid Res.* 45, 186–193.
- Joffre, C., Leclerc, L., Buteau, B., Martine, L., Cabaret, S., Malvitte, L., Acar, N., Lizard, G., Bron, A., Creuzot-Garcher, C., Bretillon, L., 2007. Oxysterols induced inflammation and oxidation in primary porcine retinal pigment epithelial cells. *Curr. Eye Res.* 32, 271–280.
- Kwon, Y.H., Fingert, J.H., Kuehn, M.H., Alward, W.L., 2009. Primary open-angle glaucoma. *N. Engl. J. Med.* 360, 1113–1124.
- 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.
- Leoni, V., 2009. Oxysterols as markers of neurological disease—a review. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 69, 22–25.
- Li, Y., Chu, L.W., Chen, Y.Q., Cheung, B.M., Leung, R.Y., Yik, P.Y., Ng, K.M., Mak, W., Jin, D.Y., St George-Hyslop, P., Song, Y.Q., 2006. Intron 2 (T/C) CYP46 polymorphism is associated with Alzheimer's disease in Chinese patients. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* 22, 399–404.
- 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.
- Lütjohann, D., Breuer, O., Ahlborg, G., Nennesmo, I., Siden, A., Diczfalussy, U., Björkhem, I., 1996. Cholesterol homeostasis in human brain: evidence for an age-dependent flux of 24S-hydroxycholesterol from the brain into the circulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 9799–9804.
- Lütjohann, D., Papassotiropoulos, A., Björkhem, I., Locatelli, S., Bagli, M., Oehring, R.D., Schlegel, U., Jessen, F., Rao, M.L., von Bergmann, K., Heun, R., 2000. Plasma 24S-hydroxycholesterol (cerebrosterol) is increased in Alzheimer and vascular demented patients. *J. Lipid Res.* 41, 195–198.
- Masland, R.H., 2001. The fundamental plan of the retina. *Nat. Neurosci.* 4, 877–886.
- Mast, N., Reem, R., Bederman, I., Huang, S., DiPatre, P.L., Björkhem, I., Pikuleva, I.A., 2011. Cholestenic 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.
- Neuringer, M., Connor, W.E., Lin, D.S., Barstad, L., Luck, S., 1986. Biochemical and functional effects of prenatal and postnatal omega 3 fatty acid deficiency on retina and brain in rhesus monkeys. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 83, 4021–4025.
- Papassotiropoulos, A., Streffer, J.R., Tsolaki, M., Schmid, S., Thal, D., Nicosia, F., Iakovidou, V., Maddalena, A., Lütjohann, 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.
- Paul, C.A., Boegle, A.K., Maue, R.A., 2004. Before the loss: neuronal dysfunction in Niemann-Pick Type C disease. *Biochim. Biophys. Acta* 1685, 63–76.
- Pfrieger, F.W., 2003. Role of cholesterol in synapse formation and function. *Biochim. Biophys. Acta* 1610, 271–280.
- Pfrieger, F.W., 2010. Role of glial cells in the formation and maintenance of synapses. *Brain Res. Rev.* 63, 39–46.
- Pikuleva, I.A., Babiker, A., Waterman, M.R., Björkhem, I., 1998. Activities of recombinant human cytochrome P450c27 (CYP27) which produce intermediates of alternative bile acid biosynthetic pathways. *J. Biol. Chem.* 273, 18153–18160.
- Quigley, H.A., Broman, A.T., 2006. The number of people with glaucoma worldwide in 2010 and 2020. *Br. J. Ophthalmol.* 90, 262–267.
- 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.
- Rodriguez, I.R., Larrayoz, I.M., 2010. Cholesterol oxidation in the retina: implications of 7KCh formation in chronic inflammation and age-related macular degeneration. *J. Lipid Res.* 51, 2847–2862.
- Tserentsoodol, N., Sztein, 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.
- 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.
- Weinreb, R.N., Khaw, P.T., 2004. Primary open-angle glaucoma. *Lancet* 363, 1711–1720.
- Wiggs, J.L., 2007. Genetic etiologies of glaucoma. *Arch. Ophthalmol.* 125, 30–37.

Productions

1. Articles

Fourgeux C., et al., Primary Open-Angle Glaucoma: Association with Cholesterol 24S-Hydroxylase (CYP46A1) Gene Polymorphism and Plasma 24-Hydroxycholesterol Levels. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009;50:5712-5717 [391].

Fourgeux, C., et al., Single Nucleotide Polymorphism in the Cholesterol-24S-Hydroxylase (CYP46A1) Gene and Its Association with CFH and LOC387715 Gene Polymorphisms in Age-Related Macular Degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2012. 53(11): p. 7026-7033 [433].

Fourgeux, C., et al., Steady-state levels of retinal 24S-hydroxycholesterol are maintained by glial cells intervention after elevation of intraocular pressure in the rat. *Acta Ophthalmol*. 2012 Sep 23. doi : 10.1111/j.1755-3768.2012.02490.x. [Epub ahead of print] [419].

Fourgeux, C., et al., In vivo consequences of cholesterol-24S-hydroxylase (CYP46A1) inhibition by voriconazole on cholesterol homeostasis and function in the rat retina. Soumis à *Experimental Eye Research*.

2. Revue

Fourgeux C, Bron A, Acar N, et al. 24S-hydroxycholesterol and Cholesterol-24S-hydroxylase (CYP46A1) in the Retina: from Cholesterol Homeostasis to Pathophysiology of Glaucoma. *Chem Phys Lipids* 2011 164(6): p. 496-9 [11].

3. Congrès

Forum des Jeunes Chercheurs (FJC), Ecole Doctorale E2S/STIC « Environnement et Santé », Université de Bourgogne (UB), Dijon, 2009, présentation sous forme de poster d'une partie de l'article issu de mes travaux sur le glaucome primaire à angle ouvert [391].

Congrès de l'Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO), Fort Lauderdale, Floride, USA. Présentation sous forme de poster de mes travaux lors des congrès de :

-2010: Neuron-Glia Interactions: May 24S-Hydroxycholesterol Be a Signal Molecule in the Retina in the Course of Retinal Ganglion Cell Loss? *ARVO Abstracts Meetings* [434],

-2011: In Vivo Consequences Of Cholesterol-24s-hydroxylase (CYP46A1) Inhibition By Voriconazole On Cholesterol Homeostasis And Function In The Rat Retina. *ARVO Abstracts Meetings* [435],

-2012: Effects of 24S-hydroxycholesterol on primary glial Müller cells. New insights on Müller cells function and cholesterol homeostasis in the retina. *ARVO Abstracts Meetings* [436].