

Université de Montréal

Neuroprotection des cellules ganglionnaires rétiniennes par
l'inhibition du récepteur de l'acide lysophosphatidique

Par

Josiane Lafleur

Département de pharmacologie

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures

En vue de l'obtention du grade de

Maîtrise en science (M.Sc.)

Novembre, 2006

© Josiane Lafleur, 2006



W

4

US8

2007

V.034

Direction des bibliothèques

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :
Neuroprotection des cellules ganglionnaires rétiniennes par
l'inhibition du récepteur de l'acide lysophosphatidique

Présenté par :
Josiane Lafleur

Sera évalué par un jury composé des personnes suivantes :

-----Éric Thorin-----
Président-rapporteur

-----Pierre Hardy-----
Directeur de recherche

----Sylvain Chemtob----
Codirecteur

----Vincent Pichette-----
Membre du jury

SOMMAIRE

Des concentrations élevées d'oxygène prédisposent au développement d'une rétinopathie du prématuré (ROP) chez le nouveau-né. Les cellules ganglionnaires rétiniennes (RGC) sont incapables de régénérer leurs axones après un stress oxydatif. L'acide lysophosphatidique (LPA) est un phospholipide qui, selon le type cellulaire, entraîne la survie ou la mort des cellules, ou une rétraction neuronale.

Notre hypothèse est que le LPA cause principalement une dégénérescence des RGC par rétraction neuronale dans un modèle de rétinopathie ischémique.

Les analyses immunohistochimiques ont révélé l'expression du récepteur LPA₁ et du récepteur LPA₂ dans la couche des RGC. Le modèle de rétinopathie ischémique a été développé en exposant des rats à un taux variable d'oxygène et les RGC ont été quantifiées grâce à une coloration rétrograde avec le Fluorogold. Une réduction significative du nombre de RGC est observée chez ces animaux. Cet effet est inhibé significativement chez les animaux ayant reçu des injections intraoculaires avec un antagoniste du récepteur LPA₁ (THG1603), avec un inhibiteur de radicaux libres (Tempol) ou avec un inhibiteur de Rho-kinase (Y-27632). Par ailleurs, l'administration de l'antagoniste du récepteur LPA₂ (THG1701) n'a pas d'effet sur le nombre de RGC. Une coloration immunologique de RGC en culture démontre aussi la présence du récepteur LPA₁ au niveau des RGC. Pour terminer, une incubation des RGC en culture en présence de LPA ou dans un environnement hypoxique entraîne une rétraction neuronale.

Les résultats de cette étude suggèrent que, durant un stress oxydant rétinien, l'inhibition du récepteur LPA₁ apporte un effet neuroprotecteur.

Mots clés : Cellules ganglionnaires rétiniennes, acide lysophosphatidique, rétinopathie du prématuré, dégénérescence neuronale, ischémie.

SUMMARY

Exposure to variable oxygen concentrations predisposes the premature newborn to the development of retinopathy of prematurity (ROP). Such an oxidant stress impedes retinal ganglion cell (RGC) survival. Lysophosphatidic acid (LPA) is a phospholipid that may induce survival, death, or neuronal retraction depending on the cellular type.

We hypothesize that LPA causes RGC degeneration by neuronal retraction in a model of oxygen-induced retinopathy (OIR).

Immunohistochemical analysis on rat retinas revealed LPA₁ and LPA₂ receptor expression in the RGC layer. The OIR model was developed by exposing rat pups to alternating cycles of oxygen and RGCs were identified by retrograde labelling with Fluorogold. A significant reduction in the number of RGCs was observed in animals subjected to OIR. This effect was significantly prevented following intra-ocular treatments with the LPA₁ antagonist (THG1603), with a free radical inhibitor (Tempol), or with a Rho-kinase inhibitor (Y-27632). Conversely, administration of the LPA₂ antagonist (THG1701) had no significant effect on the number of RGCs. To corroborate our animal studies, we isolated purified RGCs from neonatal retinas and demonstrated the presence of LPA₁ via immunocytochemistry. Finally, exposure of RGCs to LPA or hypoxia induced neuronal retraction.

The results of this study suggest that during retinal oxidative stress, inhibition of the LPA₁ receptor and its subsequent pathways exerts neuroprotective effects.

Key words: Retinal ganglion cell, lysophosphatidic acid, retinopathy of prematurity, neuronal degeneration, ischemia.

TABLE DES MATIÈRES

SOMMAIRE	III
SUMMARY.....	V
LISTE DES TABLEAUX	X
LISTE DES FIGURES.....	XI
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS.....	XIII
DÉDICACE.....	XVI
REMERCIEMENTS.....	XVII
I. INTRODUCTION	1
1. ANATOMIE DE L'ŒIL.....	2
1.1 Segment antérieur	2
1.2 Segment postérieur	3
2. PHYSIOLOGIE DE LA CIRCULATION OCULAIRE	3
2.1 La rétinopathie du prématuré	4
3. LA RÉTINE	6
3.1 Types cellulaires rétiniens	8
3.1.1 Les cellules non neuronales.....	8
3.1.1.1 Les cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien (RPE)	8
3.1.1.2 Les cellules gliales.....	9
3.1.2 Les cellules neuronales.....	10

3.1.2.1	Les photorécepteurs.....	10
3.1.2.2	Les cellules horizontales	10
3.1.2.3	Les cellules bipolaires	11
3.1.2.4	Les cellules amacrines.....	11
3.1.2.5	Les cellules ganglionnaires rétiniennes (RGC).....	11
4.	RGC	12
4.1	Développement des RGC	12
4.1.1	Nétrines	14
4.1.2	Slits.....	15
4.1.3	Sémaphorines	15
4.1.4	Éphrine	15
5.	MÉCANISMES DE DÉGÉNÉRESCENCE ET DE NEUROPROTECTION DES CELLULES NEURONALES	16
5.1	Sensibilité des cellules neuronales rétiniennes aux épisodes d'ischémies rétiniennes	17
5.1.1	Effet de l'ischémie sur les photorécepteurs.....	17
5.1.2	Effet de l'ischémie sur les RGC.....	18
5.1.3	Effet de l'ischémie sur les cellules amacrines.....	18
5.2	Mécanismes de dégénérescence neuronale activés par l'ischémie rétinienne.....	19
5.3	Dégénérescence ou mort neuronale induite par des lipides	21
5.4	Mécanismes de neuroprotection des cellules neuronales.....	22
6.	ACIDE LYSOPHOSPHATIDIQUE (LPA)	27
6.1	Introduction aux lipides.....	27

6.2	Biochimie du LPA.....	27
6.3	Métabolisme du LPA.....	28
6.4	Les récepteurs du LPA	31
6.4.1	Historique	31
6.4.2	Les GPCR.....	31
6.4.3	Couplage des récepteurs du LPA avec les protéines G	32
6.4.4	Voies de signalisations du LPA.....	34
6.4.5	Souris invalidées pour les récepteurs du LPA.....	38
6.4.6	LPA dans la rétine	39
6.4.7	LPA dans le système nerveux	39
II. HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS		42
III. MATÉRIEL ET MÉTHODES.....		44
IV. RÉSULTATS.....		54
V. DISCUSSION.....		61
VI. DIRECTIONS FUTURES		69
VII. FIGURES		73
VIII. BIBLIOGRAPHIE		87

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Séquences des amorces utilisées pour les RT-PCR.....	50
---	----

LISTE DES FIGURES

Figure 1:	Anatomie de l'œil simplifiée.....	2
Figure 2:	Diagramme représentant l'organisation de la rétine.....	7
Figure 3:	Schéma d'un cône de croissance et des molécules impliquées lors du développement des RGC	14
Figure 4:	Événements pouvant être impliqués dans la dégénérescence des cellules neuronales suite à un événement ischémique.....	21
Figure 5:	Structure moléculaire du LPA.....	28
Figure 6:	Voies de synthèse et de dégradation du LPA	29
Figure 7:	Schéma des différentes voies de signalisations intracellulaires impliquées suite à l'activation du LPA	41
Figure 8:	Représentation schématique du modèle de rétinopathie induite par l'oxygène	46
Figure 9:	Schéma de l'injection avec le Fluorogold pour la coloration rétrograde.....	48
Figure 10 :	Schéma proposant les différentes voies de signalisations intracellulaires impliquées dans la dégénérescence des RGC lors d'une rétinopathie ischémique.....	62
Figure 11 :	Effet des cycles d'oxygène sur la quantification des RGC	74
Figure 12 :	Effet des cycles d'oxygène sur la surface rétinienne vascularisée (induction de la ROP).....	75

Figure 13 : Expression des récepteurs LPA ₁ et LPA ₂ dans des RGC provenant de rétines isolées et expression du récepteur LPA ₁ par RT-PCR.....	77
Figure 14 : Effet des antagonistes du récepteur LPA ₁ et du récepteur LPA ₂ sur la survie des RGC	79
Figure 15 : Effet du Tempol sur la survie des RGC	80
Figure 16 : Effet d'un inhibiteur de Rho-kinase (Y-27632) sur la survie des RGC.....	82
Figure 17 : Expression génique de RhoA et de l' α -tubuline-1	84
Figure 18 : Culture purifiée de RGC et expression du récepteur LPA ₁ sur les RGC pures	85
Figure 19 : Effet du LPA et de l'hypoxie sur les RGC purifiées en culture	86

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

°C :	Degré Celsius
µg :	Microgramme
µL :	Microlitre
µm :	Micromètre
AC :	Adénylate cyclase
Acyl DHAP :	Acyl dihydroxy acétone phosphate
ADNc :	ADN complémentaire
AMPc :	Adénosine monophosphate cyclique
ANOVA :	Analyse de variance
ARNm :	ARN messenger
BDNF :	Facteur neurotrophique dérivé du cerveau
BSA :	Albumine de sérum bovin
Ca ²⁺ :	Calcium
CCG :	Couche des cellules ganglionnaires
CNE :	Couche nucléaire externe
CNI :	Couche nucléaire interne
CNS :	Système nerveux central
CNTF :	Facteur neurotrophique ciliaire
CPE :	Couche plexiforme externe
CPI :	Couche plexiforme interne
DAPI :	4,6-diamidine-2-phénylindole
DMSO :	Diméthyl sulfoxyde
EBSS :	Solution saline équilibrée de Earl
EHS-laminine :	Laminine de sarcome murin d'Engelbreth-Holm-Swarm
FG :	Hydroxystilbamidine méthanesulfonate; Fluorogold
G3P :	Glycérol-3-phosphate
GAM :	Glycoprotéine associée à la myéline
GFP :	Protéine verte fluorescente
GPCR :	Récepteur couplé aux protéines G
GSK-3 :	Glycogène-synthase-kinase-3
K ⁺ :	Potassium
kg :	Kilogramme
LPA :	Acide lysophosphatidique
LPC :	Lysophosphatidylcholine

LPI :	Lysophosphatidylinositol
LPS :	Lysophosphatidylsérine
MAG :	Monoacylglycérol
MAPK :	Protéine kinase activée par des mitogènes
mg :	Milligramme
mL :	Millilitre
MLC :	Chaîne légère de la myosine
mm :	Millimètre
mM :	Millimolaire
Na ⁺ :	Sodium
NAC :	N-acétylcystéine
ng :	Nanogramme
nM :	Nanomolaire
NMDA :	N-méthyl-D-aspartate
nNOS :	Synthase de monoxyde d'azote neuronale
NO :	Monoxyde d'azote
O ₂ :	Oxygène
O ₂ ⁻ :	Radical superoxyde
O.C.T. :	Composé pour couper à une température optimale
OH ⁻ :	Radical hydroxyle
<i>P</i> :	Seuil de l'épreuve de signification statistique
P :	Journée postnatale
PA :	Acide phosphatidique
PAF :	Facteur d'activation plaquettaire
pb :	Paire de bases
PBS :	Solution saline de tampon phosphate
PDL :	Poly-D-lysine
PFA :	Paraformaldéhyde
PI3K :	Phosphatidylinositol-3-kinase
PIP ₂ :	Phosphatidyl-inositol-biphosphate
PLC :	Phospholipase C
RGC :	Cellule ganglionnaire rétinienne
ROCK :	Rho-kinase
ROP :	Rétinopathie du prématuré ou rétinopathie obstructive proliférative
ROS :	Espèces réactives de l'oxygène
RPE :	Épithélium pigmentaire de la rétine
RT-PCR :	Transcription inverse suivie d'une réaction en chaîne de la polymérase
sLPA :	Acide lysophosphatidique steroyl

U : Unité

v/v : Volume pour volume

DÉDICACE

*Je dédie ce mémoire à mes parents,
mon frère ainsi qu'à mon copain qui
ont su m'encourager et m'inspirer au
fil des années.*

*« La théorie, c'est lorsque l'on sait tout
et que rien ne fonctionne. La pratique,
c'est lorsque tout fonctionne et que l'on
ne sait pas pourquoi »*

Einstein, Albert

REMERCIEMENTS

L'accomplissement de mes travaux de recherche et la rédaction de ce mémoire n'auraient pu être possible sans les nombreuses collaborations qui ont pris place durant cette étude. Je tiens donc à remercier sincèrement plusieurs personnes qui me sont chères et qui m'ont soutenue tout au long de ces années.

En premier lieu, je tiens à remercier mon directeur de recherche, Dr. Pierre Hardy. Tout au long de ma maîtrise il a été d'une disponibilité et d'une aide sans égal. Je te remercie pour ta confiance, ton soutien et tes précieux conseils.

Une autre personne a également apporté une contribution essentielle au projet. Dr. Sylvain Chemtob a agi en tant que codirecteur de mon projet de maîtrise et était toujours prêt à me donner des conseils pour faire avancer mon projet de recherche.

Merci également à toutes les techniciennes qui ont contribué à ma formation. Tout d'abord, Josée Champagne pour m'avoir appris les rudiments du métier dans les règles de l'art. Au travers les difficultés rencontrées, ton expérience et tes recommandations m'ont fait économiser temps et énergie. Je désire également exprimer ma gratitude envers Carmen Gagnon pour son assistance et sa contribution à la réalisation d'expériences entourant ce projet. Je veux aussi remercier Oanh Loan Ngoc Le pour sa gentillesse et son excellence.

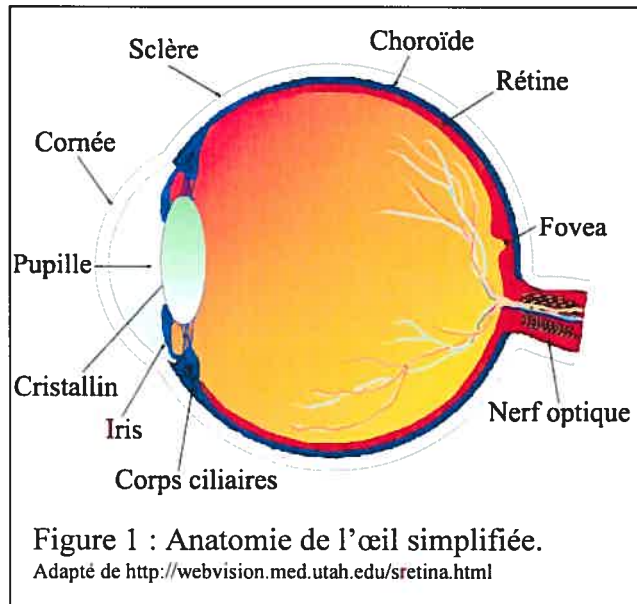
Je remercie Bupe R. Mwaikambo qui, par son entregent et sa bonne humeur, crée un environnement de travail stimulant et agréable. De plus, tu as fortement contribué au perfectionnement de mon anglais.

Il ne faut pas passer sous le silence l'aide financière ayant permise la réalisation de mon projet. Je remercie la Fondation de l'Hôpital Sainte-Justine et la Faculté des études supérieures de l'Université de Montréal pour leurs apports financiers.

I. INTRODUCTION

1. ANATOMIE DE L'ŒIL

L'œil se compose de deux segments, le segment antérieur et le segment postérieur. Le segment antérieur contient la cornée, l'iris, la pupille, le cristallin et les corps ciliaires. Le segment postérieur se compose de la rétine, la sclère et la choroïde (Figure 1).



1.1 Segment antérieur

Le segment antérieur comprend la cornée, qui est une membrane transparente et très fragile, dont le rôle est de capter et de focaliser la lumière sur le cristallin. Cette membrane est privée de vaisseaux sanguins, ce qui nous permet d'avoir une vision claire. En plus de la cornée, le segment antérieur se compose de l'iris qui donne la coloration de l'œil et son orifice central au diamètre variable, la pupille, qui contrôle le flux de lumière pénétrant dans l'œil (Tortora, 2001). L'iris est le diaphragme de l'œil et se situe devant le cristallin. Le cristallin est la lentille de l'œil qui permet la mise au point et sa plasticité lui permet de modifier ses courbures et son indice de réfraction lors de l'accommodation. Ces changements

morphologiques sont contrôlés par des petits muscles appelés corps ciliaires (Tortora, 2001).

1.2 Segment postérieur

Le segment postérieur se compose d'abord de la sclère, une membrane rigide formant l'enveloppe de l'œil. Sa partie antérieure constitue la cornée. La sclère ne possède pas d'élasticité, donc les variations de la pression intraoculaire ne modifient pas le volume oculaire (Tortora, 2001). Au niveau du segment postérieur, nous retrouvons aussi la choroïde qui est une couche hautement vascularisée permettant de nourrir l'œil (Marieb, 1999). Ce tissu apporte l'oxygène et les nutriments dont les cellules ont besoin pour vivre. Pour terminer, la rétine est une structure très importante du segment postérieur. La rétine tapisse le fond de l'œil et sa fonction est de recevoir et de transmettre les informations visuelles. Puisque l'essentiel des travaux de ma recherche porte sur la rétine, un accent particulier sera mis sur cette structure.

2. PHYSIOLOGIE DE LA CIRCULATION OCULAIRE

Le développement de l'œil, comme chez d'autres organes, dépend de la formation d'un système vasculaire complexe pour fournir les nutriments et l'oxygène nécessaire pour la différenciation des tissus oculaires. Normalement, la rétine adulte des mammifères est alimentée par deux systèmes circulatoires indépendants : le réseau de vaisseaux sanguins choroïdiens et le réseau de vaisseaux sanguins rétinien. Lors du développement initial de l'œil, l'oxygénation

de la rétine est assurée par les vaisseaux choroïdiens et la vascularisation de la rétine se produit à la fin de la gestation (Saint-Geniez et D'Amore, 2004). Les deux tiers superficiels de la rétine sont irrigués par les vaisseaux rétinien alors que le dernier tiers, où nous retrouvons les photorécepteurs, est dépendant d'une diffusion passive provenant des vaisseaux de la choroïde (Saint-Geniez et D'Amore, 2004).

2.1 La rétinopathie du prématuré

La rétinopathie du prématuré ou rétinopathie obstructive proliférative (ROP), est une pathologie ischémique décrite en 1942 par Terry (Terry, 1942). En 1951, des données cliniques ont permis de suggérer que l'exposition à des thérapies d'oxygène, nécessaire pour palier à la détresse respiratoire, jouait un rôle dans le développement de cette pathologie (Campbell, 1951). La ROP est observée chez les prématurés et son incidence augmente d'autant plus qu'il est de faible poids ou de faible âge gestationnel. Les conséquences reliées à cette pathologie sont très variées : la rémission complète, la myopie, le strabisme, l'amblyopie et, dans les cas plus graves, la cécité (Gallo *et al.*, 1991; Hebbandi *et al.*, 1997; Seaber *et al.*, 1995). Dans les pays développés, la ROP est l'une des causes majeures de cécité puisque les soins apportés aux prématurés permettent maintenant la survie des très grands prématurés.

La ROP se caractérise par deux phases distinctes : une phase initiale où la vascularisation normale est interrompue (vaso-oblitération) suivi d'une phase d'angiogenèse anarchique (néovascularisation) où les vaisseaux prolifèrent vers le

corps vitré, ce qui peut mener à un détachement de la rétine (Ryan, 2001). Les vaisseaux rétiniens débutent leur formation durant le quatrième mois de gestation (Roth, 1977). Par ailleurs, les nouveau-nés prématurés possèdent une vascularisation rétinienne incomplète dans la zone périphérique. L'aire de la zone non vascularisée dépend de l'âge gestationnel. Les fortes concentrations d'oxygène qui sont administrées aux prématurés entraînent une obstruction des vaisseaux rétiniens. Par contre, à l'arrêt de l'oxygénothérapie, une baisse du taux d'oxygène sanguin se produit et puisque la rétine périphérique est mal vascularisée, un phénomène d'angiogenèse survient afin d'améliorer l'apport sanguin en périphérie. Cependant, ces nouveaux vaisseaux prolifèrent de façon anarchique entraînant comme conséquence un décollement de la rétine dans les cas les plus graves (Ryan, 2001). Les complications associées à cette pathologie sont très difficiles à traiter et entraînent souvent une baisse sévère de l'acuité visuelle.

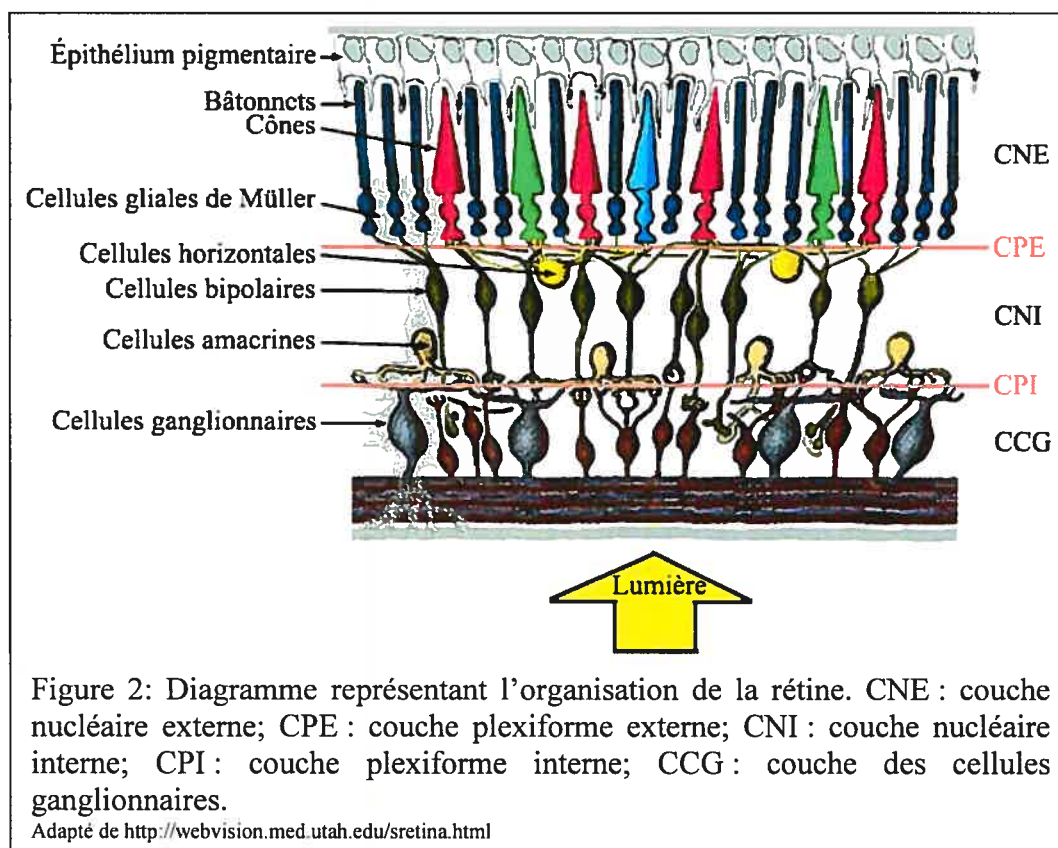
La variation du taux d'oxygène impliquée dans le développement d'une ROP est aussi responsable d'une production importante de radicaux libres (Rao et Wu, 1996). Ces molécules, lorsqu'actives, sont très néfastes pour le métabolisme cellulaire. Puisque les défenses antioxydantes chez les prématurés sont très peu développées, ils sont particulièrement sensibles aux effets toxiques des radicaux libres (Bonne *et al.*, 1998; Radomski *et al.*, 1990).

Plusieurs modèles animaux sont utilisés pour étudier la ROP. Parmi ceux-ci, citons les modèles développés chez le raton, le chaton et le chiot. Les expériences effectuées pour les besoins de ce mémoire ont été faites en utilisant le modèle de ratons exposés à des cycles où le taux d'oxygène varie entre 12% et

45%. À la naissance du raton, sa vascularisation rétinienne équivaut à celle d'un fœtus humain de 24 à 26 semaines (Ricci, 1990). Ce modèle de rétinopathie ischémique est très souvent utilisé pour l'étude de la ROP et il présente aussi quelques aspects cliniques de la rétinopathie diabétique (Margalit et Sadda, 2003). D'autres études ont eu lieu sur des modèles de chatons et de chiots puisque leur vascularisation rétinienne à la naissance correspond à celle d'un fœtus de 28 semaines (Patz, 1957) et parvient à maturité 21 jours après la naissance (Ricci *et al.*, 1990). Par ailleurs, ces modèles présentent certaines différences anatomiques comparativement à l'œil humain, ce qui en font des modèles controversés (Kretzer *et al.*, 1986). Entre autre, ces modèles ne possèdent pas d'espaces cystoïdes par lesquels passent les vaisseaux sanguins pour atteindre la périphérie de la rétine.

3. LA RÉTINE

L'origine embryonnaire de la rétine est commune au reste du système nerveux central (CNS) et dérive du neurectoderme. La rétine de tous les vertébrés est composée de neurones disposés en trois couches distinctes de corps cellulaires séparées par deux couches où prédominent les expansions cellulaires et les synapses. Ces contacts établis entre les neurones sont trop fins pour être observés en microscopie optique, c'est donc pour cette raison que les microbiologistes du XIX^e siècle ont dénommé ces zones « couches plexiformes » (en latin *plexus* = tresse) (Rodieck, 1998). La Figure 2 représente une coupe fine transversale de rétine. L'orientation de la coupe place la partie interne de l'œil vers le bas, donc la lumière atteignant la rétine vient de la partie inférieure.



Premièrement, la couche nucléaire externe (CNE) est constituée des corps cellulaires des photorécepteurs incluant les cônes et les bâtonnets. La couche nucléaire interne (CNI) est composée des corps cellulaires des cellules bipolaires, des cellules horizontales, des cellules amacrines, ainsi que des cellules gliales de Müller. La couche la plus interne de l'œil, qui est la couche des cellules ganglionnaires (CCG), contient les corps cellulaires des cellules ganglionnaires et des cellules amacrines déplacées. Entre ces couches de cellules s'intercalent les couches plexiformes, externe et interne. La couche plexiforme externe (CPE) renferme les connexions synaptiques très spécialisées entre les photorécepteurs d'une part et les cellules bipolaires et horizontales d'autre part. Le lieu de contact synaptique entre les axones des cellules bipolaires et les dendrites des cellules

ganglionnaires, mais aussi avec les prolongements des cellules amacrines, est situé dans la couche plexiforme interne (CPI) (Rodieck, 1998).

Le point de départ de l'information visuelle est la capture de la lumière, sous forme de photons, par les photorécepteurs. Les photorécepteurs sont les seules cellules rétiniennes sensibles à la lumière (Dowling, 1987). Ces cellules, supportées par l'épithélium pigmentaire de la rétine (RPE), convertissent les photons en signal neural et conduisent le signal électrique au niveau de la CPE (Rodieck, 1998; Kaufman, 2002). L'information est alors transmise aux cellules bipolaires et la participation des cellules horizontales et amacrines permet de moduler le signal. Ensuite, les cellules bipolaires forment des synapses avec les cellules ganglionnaires, dont les axones forment le nerf optique permettant de transmettre l'influx nerveux aux corps genouillés latéraux du cerveau. Les sections suivantes décrivent en détail le rôle de chaque type cellulaire composant la rétine.

3.1 Types cellulaires rétiens

Les types de cellules constituant la rétine peuvent être divisés en deux grandes catégories, soit les cellules non neuronales et les cellules neuronales.

3.1.1 Les cellules non neuronales

3.1.1.1 Les cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien (RPE)

Les cellules du RPE forment la couche la plus externe de la rétine permettant de séparer la rétine neurale de la choroïde. Aussi, ces cellules épithéliales supportent et maintiennent les fonctions du segment externe des photorécepteurs (Newman *et al.*, 1984). Le RPE aide au maintien d'un

environnement ionique approprié pour la fonction des photorécepteurs en transportant des ions, métabolites, eau et autres substances de l'espace sous-rétinien au petit compartiment extracellulaire délimité par la membrane apicale du RPE, les prolongements apicaux des cellules gliales de Müller et les segments externes des photorécepteurs (Kaufman, 2002). Le cytoplasme des cellules du RPE contient des granules de mélanine qui sont retrouvés surtout sur le côté apical. Leur contenu en mélanine permet d'absorber la lumière incidente qui n'est pas captée par les photorécepteurs. Les pigments de mélanine ont aussi un rôle de capteur de radicaux libres (Kaufman, 2002).

3.1.1.2 Les cellules gliales

Trois types de cellules gliales sont retrouvés dans la rétine de tous les vertébrés : les cellules de Müller, qui sont de loin les plus nombreuses, les astrocytes et les cellules de la microglie. Les cellules de Müller, décrites pour la première fois par Müller en 1851, sont les principales cellules gliales de la rétine. Elles se retrouvent partout dans la rétine et constituent un support architectural (Müller, 1851). Mise à part cette fonction, les cellules de Müller protègent les neurones d'une exposition excessive de neurotransmetteurs en régulant le milieu extracellulaire. En effet, les cellules gliales de Müller possèdent de nombreux récepteurs et transporteurs de neurotransmetteurs, tel que le glutamate, permettant de réguler le surplus de glutamate dans les espaces extracellulaires (Kaufman, 2002). Les astrocytes sont le deuxième type de cellules gliales et sont restreints dans la partie la plus interne de la rétine où ils enveloppent les axones des cellules ganglionnaires et entrent en contact avec les vaisseaux sanguins (Bussow, 1980).

Cet emplacement stratégique permettrait aux astrocytes de jouer un rôle important dans la mise en place et le maintien de la barrière hémato-rétinienne (Chan-Ling et Stone, 1991). Pour terminer, les cellules de la microglie sont retrouvées partout dans la rétine et elles possèdent des fonctions macrophagiques pour la phagocytose des neurones en dégénérescence (Kaufman, 2002).

3.1.2 Les cellules neuronales

3.1.2.1 Les photorécepteurs

Les photorécepteurs comprennent les cônes et les bâtonnets et sont placés à distance de la lumière. Cette disposition particulière semble étrange, mais elle présente l'avantage de positionner les segments externes de ces cellules, qui captent la lumière de l'image rétinienne, en contact direct avec l'épithélium pigmentaire qui amène l'oxygène et les nutriments à la rétine (Rodieck, 1998). Cette énergie lumineuse est transformée via le processus de phototransduction en message chimique qui se traduit par une libération de neurotransmetteurs par exocytose dans la fente synaptique (Chabre, 1985).

3.1.2.2 Les cellules horizontales

Les cellules horizontales sont ainsi dénommées puisqu'elles sont disposées transversalement sur la rétine. L'interaction directe de ces cellules avec les cellules amacrines et bipolaires entraîne une modulation du signal permettant d'amplifier les différences spatiales dans l'intensité lumineuse (Rodieck, 1998).

3.1.2.3 *Les cellules bipolaires*

Chaque cellule bipolaire possède des dendrites dans la CPE, un noyau localisé dans la CNI et leurs terminaisons axonales se retrouvent dans la CPI. Deux groupes de cellules bipolaires sont présents dans la rétine de mammifères : les cellules bipolaires à cônes et les cellules bipolaires à bâtonnets (Sterling, 1995). Chacune d'entre elles transmette des modifications du niveau d'activation vers la CPI où se forme le contact avec les cellules ganglionnaires. Cette neurotransmission par les cellules bipolaires s'effectue en utilisant le glutamate (Kaufman, 2002).

3.1.2.4 *Les cellules amacrines*

Les cellules amacrines forment le groupe cellulaire le plus diversifié de la rétine (Dowling, 1987; Strettoi et Masland, 1996). Le nom des cellules amacrines provient du fait qu'elles paraissent dépourvues d'axone (*a* = privatif, *makros* = long, *inos* = fibre). La plupart de ces neurones sont localisés dans la CNI, mais certains se situent dans la CCG. Les cellules amacrines établissent des liens synaptiques avec les cellules bipolaires, d'autres cellules amacrines et les cellules ganglionnaires (Rodieck, 1998). Ceci suggère que les cellules amacrines ont un rôle à jouer dans la transmission de l'information visuelle, mais leurs rôles spécifiques demeurent encore très mal connus.

3.1.2.5 *Les cellules ganglionnaires rétiniennes (RGC)*

Les RGC sont situées sur la couche la plus interne de la rétine et leurs axones se regroupent pour former le nerf optique. Ainsi, chaque RGC achemine, par leur axone, un potentiel d'action jusqu'au cerveau où le traitement de

l'information visuelle sera effectué. La vitesse de génération de ces potentiels d'action est régulé par l'activité des cellules amacrines et bipolaires qui transmettent des signaux aux RGC. Généralement, l'activité des cellules amacrines tend à diminuer le taux de déclenchement des RGC tandis que l'activité des cellules bipolaires tend à l'augmenter (Rodieck, 1998). Les RGC, étant le principal sujet de mon mémoire, seront décrites plus en détail dans la section suivante.

4. RGC

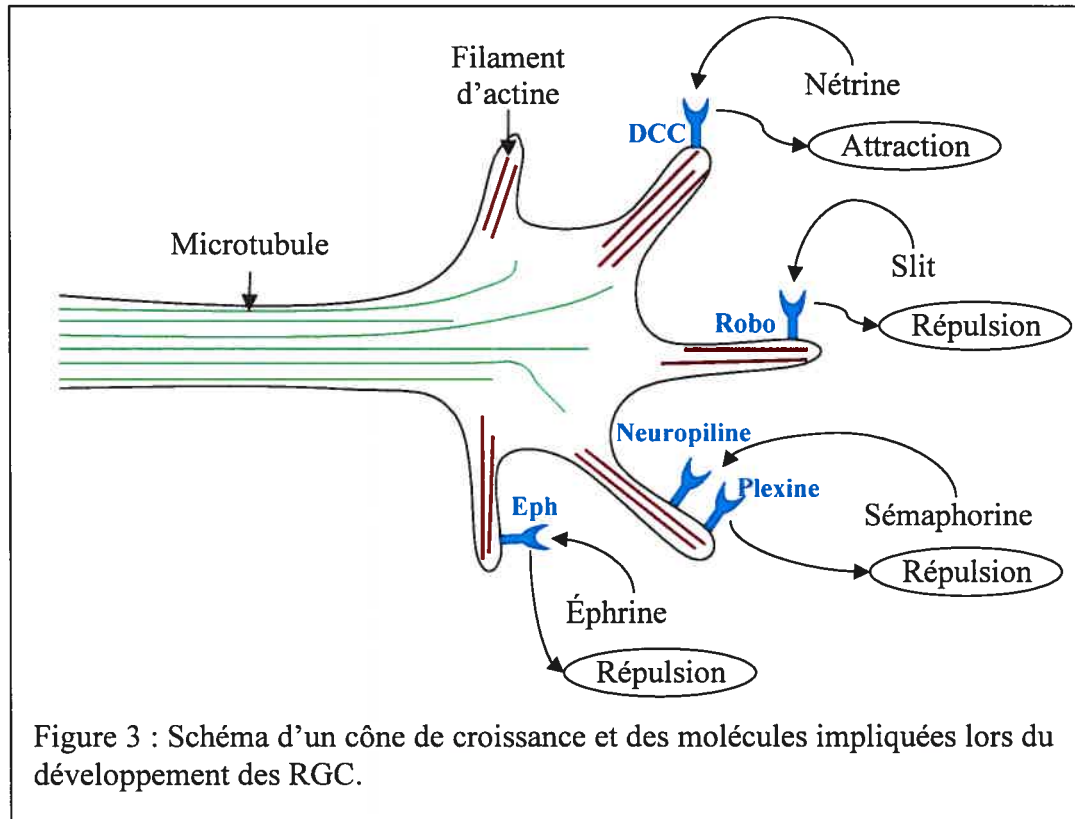
Les RGC, étant les seules cellules rétinienne se projetant au cerveau, sont cruciales pour le transport de l'information visuelle. Dans cette section nous nous concentrerons d'abord sur le développement des RGC. Ensuite nous passerons en revue les mécanismes menant à une dégénérescence ou à une mort des cellules neuronales. Pour terminer, les mécanismes de neuroprotection des cellules neuronales seront discutés.

4.1 Développement des RGC

Le système neuronal est très bien organisé puisqu'il est constitué de milliards de neurones interconnectés à des endroits spécifiques dans le cerveau. Le processus permettant d'orienter la croissance neuronale pendant le développement du cerveau s'effectue grâce à des signaux de guidage. Ces signaux permettent aux neurones en développement de parcourir de longues distances afin d'atteindre leurs cibles. Chez les vertébrés, la majorité des axones des RGC se projettent sur le collicule supérieur (Rodieck, 1998). Le collicule supérieur est le centre permettant

l'intégration de l'information visuelle et oriente les yeux vers les centres d'intérêt du monde extérieur. Dans le cerveau nous retrouvons deux collicules supérieurs accolés l'un à l'autre au dessus du mésencéphale. Les rétines, via l'activité des RGC, transmettent l'information du champ visuel droit vers le collicule gauche et vice versa (Rodieck, 1998).

Pendant la croissance des neurones, les axones élaborent un cône de croissance à leur extrémité. Le cône de croissance est composé de prolongements à base de filaments d'actine permettant d'avancer et de reculer pour la recherche de signaux de guidage. Ces structures possèdent aussi de nombreux récepteurs pouvant être activés par ces molécules de guidage. Suite à cette activation, des signaux intracellulaires entraîneront des changements dans l'arrangement de certaines composantes du cytosquelette dont les filaments d'actine et les microtubules (Figure 3) (Suter et Forscher, 1998). Les dernières années, plusieurs études ont permis d'identifier certaines molécules de guidage lors du développement des RGC. À ce jour, il existe principalement quatre molécules impliquées dans la guidance axonale pendant le développement des RGC: les nétrines, les slits, les sémaphorines et les éphrines (Figure 3).



4.1.1 Nétrines

La nétrine-1 a été la première molécule de guidage sécrétée découverte et est très importante dans le développement axonal (Kennedy *et al.*, 1994). Dans le système visuel, plusieurs évidences démontrent que cette nétrine joue un rôle important lors de la sortie des RGC de la rétine vers le nerf optique. D'abord, la nétrine est sécrétée par les cellules épithéliales se trouvant à la base du nerf optique et les cônes de croissance des RGC expriment le récepteur des nétrines, le DCC (*deleted in colorectal cancer*), ce qui permet un contact direct entre la tête du nerf optique et les RGC. De plus, des expériences effectuées à partir de souris n'exprimant pas le gène de nétrine-1 ont démontré que, chez ces souris, les axones

des RGC demeuraient dans la rétine et ne se dirigeaient jamais vers l'entrée du nerf optique (Deiner *et al.*, 1997).

4.1.2 Slits

Lorsque les axones des RGC ont quitté la rétine, des mécanismes d'inhibition entrent en jeu. Les protéines slits sont une famille de molécules de guidance inhibitrices se liant à la famille des récepteurs Robo. Ces protéines inhibent la croissance axonale en positionnant les axones des RGC pour former le chiasma optique chez les vertébrés (Plump *et al.*, 2002). Le chiasma optique permet d'assurer le traitement croisé de l'information visuelle. Ainsi, tout le champ visuel droit sera analysé par l'hémisphère gauche du cerveau et vice-versa.

4.1.3 Sémaphorines

Les sémaphorines sont une grande famille de protéines de guidance responsables d'une répulsion axonale. Certains membres de cette famille dont la sémaphorine A5 sont exprimés autour des axones des RGC (Campbell *et al.*, 2001). Ainsi, lorsque les axones quittent la rétine ils sont confinés à demeurer dans la trajectoire du nerf optique.

4.1.4 Éphrine

Les molécules de guidance précédentes permettent le développement du système visuel par des forces d'attraction ou de répulsion au niveau du cône de croissance. L'éphrine est une autre molécule impliquée dans la guidance, mais elle utilise un système de gradient pour orienter le cône de croissance. Il existe deux familles d'éphrines. L'éphrine-A se lie au récepteur EphA (Wilkinson, 2001) et

l'éphrine-B se lie au récepteur EphB (Hindges *et al.*, 2002). Dans le système visuel, la topographie au niveau de l'axe nasal-temporal est régulée par la répulsion entre le ligand éphrine-A et son récepteur EphA. Le ligand est exprimé au niveau du collicule supérieur selon un gradient et le récepteur EphA se trouve au niveau des RGC selon un gradient complémentaire (Wilkinson, 2001). La topographie de l'axe dorsal-ventral est régulée selon le même principe en utilisant le ligand éphrine-B et son récepteur EphB (Hindges *et al.*, 2002). Ainsi, ce système de gradients à deux dimensions permet d'orienter précisément la connexion entre les axones des RGC et le collicule supérieur.

5. MÉCANISMES DE DÉGÉNÉRESCENCE ET DE NEUROPROTECTION DES CELLULES NEURONALES

Les cellules neuronales, incluant les RGC, sont très fragiles et peuvent être affectées par différents stress. En effet, les mécanismes remarquables permettant le développement du système visuel du nouveau-né ne sont pas présents chez l'adulte. Lorsque les axones des RGC de l'adulte sont endommagés par une maladie ou un accident, il est impossible, actuellement, de les régénérer et de rétablir les connexions entre les neurones. Ainsi, quelques soient les dommages neuronaux chez l'adulte, soit au système visuel ou ailleurs dans le CNS, nous retrouvons comme conséquence une diminution permanente des fonctions neuronales. Par ailleurs, de nombreux groupes de recherche tentent de palier à cette conséquence. Les études montrent que les neurones du CNS auraient la possibilité de croître à l'âge adulte, mais ils seraient par contre empêchées par des

molécules inhibitrices dont Nogo (Huber et Schwab, 2000) et des glycoprotéines associées à la myéline (GAM) (Shen *et al.*, 1998). Comme dans le cas de certaines molécules de guidance inhibitrices, Nogo et GAM déclenchent l'effondrement du cône de croissance. Sur la base de ces observations, les résultats des études effectuées sur la croissance axonale lors du développement neuronal pourraient certainement nous guider vers des thérapies permettant la régénération neuronale adulte.

5.1 Sensibilité des cellules neuronales rétiniennes aux épisodes d'ischémies rétiniennes

5.1.1 Effet de l'ischémie sur les photorécepteurs

Plusieurs recherches ont été effectuées pour vérifier la sensibilité des photorécepteurs aux épisodes d'ischémies rétiniennes. Une étude d'électrorétinogramme exécutée sur des patients atteints d'une vascularite rétinienne a proposé qu'une faible ischémie cause une dépolarisation des photorécepteurs et peut mener au dommage de ces cellules (Pereira-Neves et Ribeiro-da-Silva, 1992). Par contre, des données récentes suggèrent qu'une ischémie mène d'abord à la perte des RGC et celle-ci serait responsable de la dégénérescence des photorécepteurs (Davidson *et al.*, 2000; Stevens *et al.*, 2002). D'autres études proposent que les effets de l'ischémie se font d'abord ressentir dans les neurones de la rétine interne tandis que les photorécepteurs seraient moins sensibles (Peachey *et al.*, 1993). La raison pour laquelle les photorécepteurs semblent être moins endommagés par l'ischémie demeure inconnue. Une possibilité pourrait être les hauts niveaux de neuroglobines, une globine avec une

très haute affinité pour l'oxygène, associés aux photorécepteurs (Schmidt *et al.*, 2003). Une autre variable importante reliée à la sensibilité des photorécepteurs est leur proximité spatiale avec le RPE puisque le RPE joue normalement un rôle essentiel dans l'entretien et la survie des photorécepteurs.

5.1.2 Effet de l'ischémie sur les RGC

Dans plusieurs pathologies telles le glaucome, la rétinopathie diabétique et l'occlusion de la veine rétinienne principale, il a été démontré que les périodes d'ischémies causent un amincissement de la CCG en raison des dommages ou de la perte de RGC (Osborne *et al.*, 1999; Akiyama *et al.*, 2002; Goto *et al.*, 2002; Lafuente *et al.*, 2002). Ce phénomène ischémique entraînerait une dépolarisation des RGC causée par une stimulation excessive des récepteurs du glutamate, soit les récepteurs kaïnate (Lin *et al.*, 2002) et N-méthyl-D-aspartate (NMDA) (Brandstatter *et al.*, 1994; Fletcher *et al.*, 2000).

5.1.3 Effet de l'ischémie sur les cellules amacrines

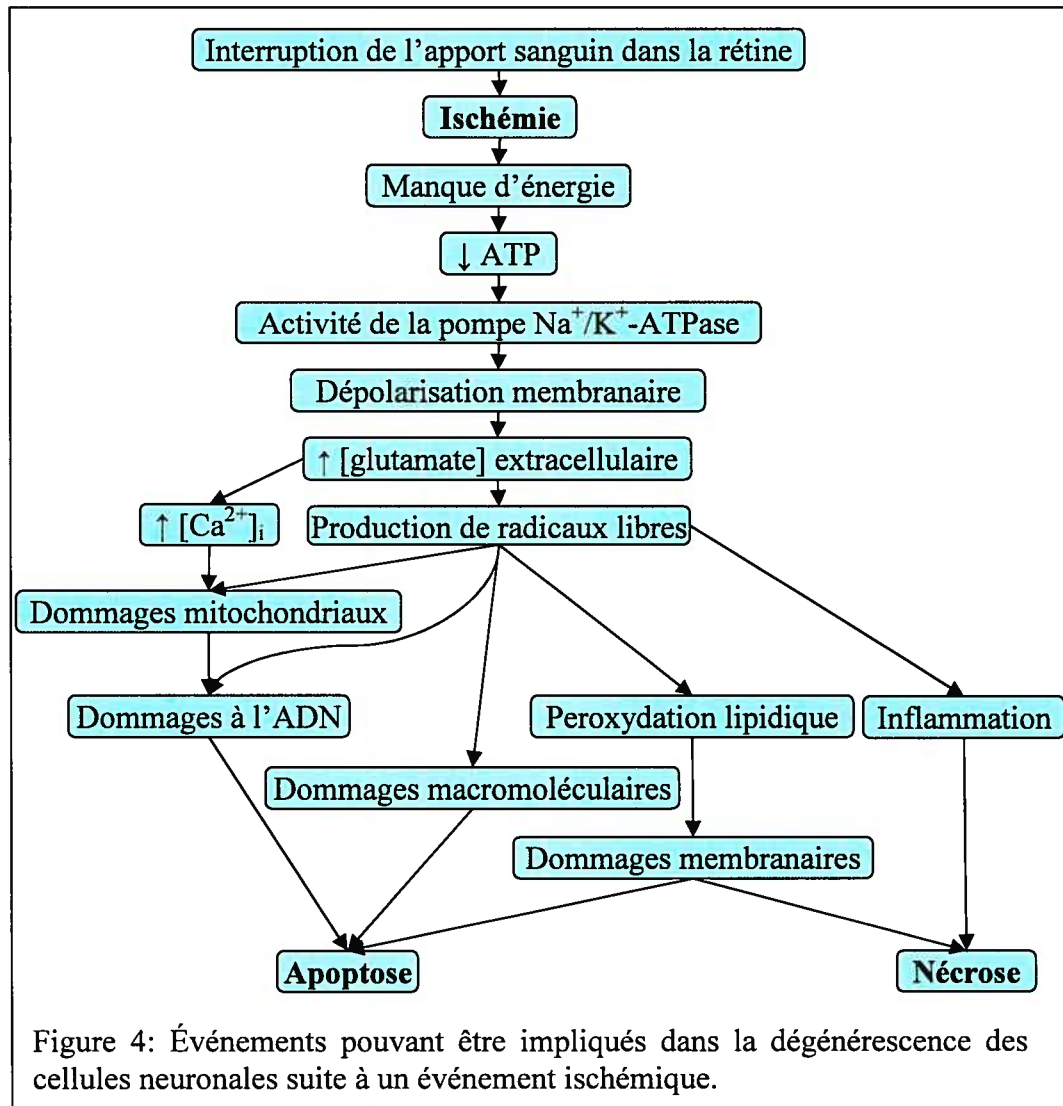
Les cellules amacrines sont aussi sensibles à l'ischémie et, comme pour les RGC, la toxicité induite par le glutamate serait responsable de la dégénérescence de ces cellules (Osborne et Herrera, 1994; Wood *et al.*, 2001). De plus, suite à l'ischémie, les cellules amacrines induisent une production accrue de médiateurs pro-inflammatoires dont la cyclo-oxygénase-2 et la synthèse de monoxyde d'azote neuronale (nNOS) et il est connu que ces molécules contribuent à la dégénérescence des RGC (Gwon *et al.*, 2001; Cheon *et al.*, 2002).

5.2 Mécanismes de dégénérescence neuronale activés par l'ischémie rétinienne

L'ischémie rétinienne survient lorsque la circulation de la rétine est insuffisante pour satisfaire trois besoins importants : l'apport de l'oxygène, l'apport des substrats métaboliques et l'élimination des déchets. La perte de ces besoins entraîne une diminution de l'activité homéostatique et induira des dommages tissulaires avec le temps. En premier lieu, l'ischémie provoque un blocage au niveau de l'apport d'oxygène et de glucose qui perturbe le système énergétique de la cellule. Le niveau de glycolyse diminue entraînant une chute de la production d'ATP menant ultimement vers une mort cellulaire.

L'ischémie est aussi impliquée dans l'augmentation de neurotransmetteurs, dont le glutamate. Normalement, les niveaux de glutamate sont très faibles dans l'espace extracellulaire. Par contre, la diminution de la production d'ATP lors de l'ischémie entraîne une réduction de l'activité de la pompe Na^+/K^+ -ATPase (Figure 4) (Lipton, 1999). Ainsi, il y a une accumulation de K^+ dans l'espace extracellulaire, la cellule se dépolarise et le gradient de Na^+ mène à une diminution de la capture de glutamate au niveau de la synapse (Rossi *et al.*, 2000). Cette cascade de signalisations intracellulaires provoque une accumulation extracellulaire excessive du glutamate qui devient toxique pour la cellule (Figure 4) (Neal *et al.*, 1994). Ces concentrations élevées de glutamate activent fortement des récepteurs NMDA entraînant une surcharge calcique intracellulaire et une dépolarisation excessive. Les RGC sont particulièrement sensibles aux fortes concentrations extracellulaires de glutamate puisque ces cellules expriment un niveau élevé de récepteurs NMDA (Brandstatter *et al.*, 1994).

Suite à l'ischémie, les cellules neuronales se trouvent exposées à une concentration excessive de radicaux libres. Les radicaux libres sont un sous-produit inévitable du métabolisme cellulaire normal de l'oxygène (Boveris et Chance, 1973). Par contre, lors de la reperfusion suivant l'ischémie, les composés réduits, s'étant accumulés pendant l'ischémie, sont oxydés de nouveau augmentant ainsi la production de radicaux libres (Figure 4) (Gilgun-Sherki *et al.*, 2002). Les antioxydants endogènes comme la superoxyde dismutase, les vitamines E et C et le glutathion ont pour rôle d'inactiver les radicaux libres produits. Cependant, s'ils ne sont pas inactivés suffisamment, ou si la production de radicaux libres est trop élevée, ces radicaux peuvent agir négativement sur les constituants cellulaires macromoléculaires et peuvent causer la fragmentation de l'ADN, la peroxydation lipidique et l'activation du programme apoptotique (Figure 4). Aussi, la mort par nécrose peut avoir lieu suite à une inflammation causée par les radicaux libres. Parmi les radicaux libres produits, nous retrouvons le radical superoxyde (O_2^-) et le monoxyde d'azote (NO) qui peuvent interagir pour former du peroxyde d'azote et des radicaux libres très réactifs dont le radical hydroxyle (OH \cdot) (Gilgun-Sherki *et al.*, 2002). Tout comme les radicaux libres, le peroxyde d'azote agit en altérant les acides nucléiques de l'ADN causant, de ce fait, une dégénérescence de la cellule. Les radicaux libres ne sont pas seulement produits par les mitochondries. L'activation de cellules gliales et l'infiltration de leucocytes libèrent aussi des médiateurs inflammatoires, tels que le NO, l'acide arachidonique et des cytokines, qui jouent des rôles principaux dans la formation des radicaux libres après ischémie (Sethi *et al.*, 2000; Mattson et Camandola, 2001).



5.3 Dégénérescence ou mort neuronale induite par des lipides

Les neurones sont très sensibles à divers stimuli dont un excès de glutamate qui peut être induit par différentes pathologies. Ces cellules peuvent aussi être endommagées par d'autres molécules dont les lipides. Parmi ces lipides, nous retrouvons le céramide, qui est un lipide intracellulaire, le facteur d'activation plaquettaire (PAF) et l'acide lysophosphatidique (LPA). Le céramide et le PAF sont deux lipides qui semblent être impliqués dans la mort neuronale

progressive responsable de la maladie d'Alzheimer. L'inflammation cérébrale observée lors de la maladie d'Alzheimer entraîne une hausse de la concentration de ces molécules qui provoque directement une mort neuronale par apoptose. Des expérimentations effectuées avec des cellules PC12 (lignée cellulaire tumorale dérivée de la crête neurale chez le rat) ont aussi démontré que le LPA est impliqué activement dans la mort neuronale (Holtsberg *et al.*, 1998). Le LPA peut aussi agir en provoquant une rétraction dendritique ou axonale. Le LPA peut être généré suite à l'action de diverses enzymes, dont la phospholipase A₂, lors d'ischémies cérébrales (Sun *et al.*, 2002). Ces observations ont donc constitué les bases rationnelles de nos recherches et elles nous ont amené à se concentrer sur les effets du LPA lors d'une ischémie rétinienne. Une discussion au sujet du LPA sera exposée dans le prochain chapitre.

5.4 Mécanismes de neuroprotection des cellules neuronales

Le concept de neuroprotection a pour but de s'opposer à la mort cellulaire, plus précisément la mort neuronale. En effet, plusieurs situations en neurologie s'accompagnent d'un appauvrissement cellulaire secondaire à différentes pathologies qui conduisent inévitablement à l'activation de mécanismes de mort cellulaire. Ainsi, la neuroprotection est l'utilisation de moyens pharmacologiques pour protéger les cellules soit en leur fournissant des outils pour atténuer les dommages intracellulaires ou en atténuant les stimuli extracellulaires néfastes. Pour traiter des pathologies oculaires en agissant directement sur les RGC, trois critères doivent être considérés pour évaluer l'efficacité du traitement : la drogue

devrait se lier à un récepteur spécifique présent sur les RGC ou sur le nerf optique, l'activation de la cible devrait déclencher des voies de signalisations intracellulaires qui ont la possibilité d'augmenter la résistance du neurone ou de supprimer les effets toxiques, et la drogue devrait atteindre la rétine avec des concentrations efficaces.

Dans le cas d'une pathologie ischémique, plusieurs mécanismes peuvent être envisagés afin de bloquer le processus de dégénérescence des RGC. La toxicité causée par une présence accrue de glutamate au niveau extracellulaire joue aussi un rôle important lors de l'ischémie. Chez le rat et le lapin, les dommages rétiniens induits par l'ischémie se manifestent histologiquement par un amincissement de la rétine interne, alors que les photorécepteurs, qui constituent la rétine externe, paraissent particulièrement résistants à l'ischémie. Les neurones qui semblent les plus sensibles à une dégénérescence sont ceux présentant des récepteurs du glutamate, dont les récepteurs NMDA. Cependant, cette susceptibilité peut être modulée par la co-localisation de récepteurs de neurotransmetteurs, comme la sérotonine et la dopamine, puisque l'activation de ces récepteurs contrebalance la stimulation excitatrice causant cette dégénérescence (Osborne *et al.*, 1999). Il est rapporté dans la littérature que le glutamate entraîne la dégénérescence des cellules ganglionnaires puisqu'elles possèdent un grand nombre de récepteurs de type NMDA (Brandstatter *et al.*, 1994). L'utilisation d'antagonistes des récepteurs NMDA permet d'inhiber la stimulation excessive de ces récepteurs fournissant alors une neuroprotection empêchant l'afflux excessif de calcium. Des études *in vitro* et *in vivo* ont démontré

que l'utilisation d'antagonistes des récepteurs NMDA, la mémantine (Vorwerk *et al.*, 1996) et la dizocilpine (MK 801) (Lam *et al.*, 1997), préviennent effectivement la mort des RGC causée par le glutamate lors d'ischémie. Dans un modèle de rétinopathie ischémique induit par l'élévation de la pression intraoculaire chez le rat, l'administration systémique de mémantine a permis de réduire la perte des RGC (Lagreze *et al.*, 1998). De même, le dextrométhorphan (Yoon et Marmor, 1989), la flupirtine (Osborne *et al.*, 1996) et la kétamine (Tsukahara *et al.*, 1992), qui protègent la rétine contre les effets de l'ischémie, pourraient agir par un phénomène d'inhibition des récepteurs NMDA. Ces évidences expérimentales montrent le bénéfice d'utiliser ce type d'antagoniste dans des pathologies impliquant la mort des RGC causée par le glutamate ou par d'autres stimuli.

Une étude effectuée il y a quelques années a montré, par résonance paramagnétique électronique, la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) au niveau de la rétine lors d'un épisode d'ischémie (Muller *et al.*, 1997). L'origine des ROS produits dans la rétine au cours de l'ischémie est multiple. Suite à leur formation, les ROS et d'autres radicaux libres peuvent réagir avec les compartiments macromoléculaires de la cellule et mener à des modifications protéiniques, la peroxydation lipidique et des dommages au niveau de l'ADN (Lipton, 1999; Chan, 1996). Pour cette raison, les cellules ont développé des mécanismes naturels de défense contre les radicaux libres. Dans le cas de pathologies ischémiques, les radicaux libres générés se retrouvent en excès par rapport au potentiel antioxydant de la cellule et les dommages cellulaires ont alors lieu. La neuroprotection des cellules neuronales peut être réalisée en augmentant le

potentiel antioxydant des cellules par l'administration de drogues antioxydantes. Ces antioxydants agissent en neutralisant les radicaux libres émanant de la cascade du glutamate. Plusieurs capteurs de radicaux sont souvent utilisés : la catalase, les vitamines C et E et les mimétiques de la superoxyde dismutase (Tempol) (Gupta et Marmor, 1993; Block et Schwarz, 1997; Reddan *et al.*, 1993). Ces antioxydants apportent un effet protecteur lorsqu'ils sont administrés juste avant la période de reperfusion suivant l'ischémie.

Le NO, qui est un radical synthétisé par trois enzymes présents dans la rétine, peut aussi jouer un rôle important dans la physiopathologie de désordres neurodégénératifs. La synthèse de NO neuronale, présente dans les cellules de Müller, est activée dans les cellules stimulées par le glutamate et semble impliquée dans la neurotoxicité ischémique, comme le suggèrent l'effet neuroprotecteur de ses inhibiteurs (Becquet *et al.*, 1997). Par ailleurs, bien que des inhibiteurs de la synthèse de NO sont neuroprotecteurs dans certains modèles expérimentaux d'ischémie rétinienne (Geyer *et al.*, 1995; Peachey *et al.*, 1993; Lam *et al.*, 1995), leurs utilisations thérapeutiques sont peu probables en raison des nombreuses fonctions physiologiques au sein desquelles ces enzymes sont impliquées. En revanche, l'élimination pharmacologique des ROS qu'elles engendrent, apparaît comme une approche réaliste. Des composés tels que les lazaroides (Levin *et al.*, 1996; Muller *et al.*, 1996), la mélatonine (Cazevielle et Osborne, 1997) et l'acide lipoïque (Block et Schwarz, 1998), qui ont démontré des activités anti-oxydantes et neuroprotectrices chez l'animal, pourraient avoir un avenir thérapeutique.

Les différents mécanismes de dégénérescence neuronale introduits précédemment peuvent causer la mort des cellules par apoptose suite à l'activation de voies de signalisations (MacManus et Linnik, 1997). Plusieurs travaux ont montré l'évidence que les dommages ischémiques au niveau du cerveau activent des voies de signalisations apoptotiques. L'inhibition de la signalisation menant à l'apoptose est une stratégie de neuroprotection pouvant être employée. Un des traitements étudiés dans le cas de l'ischémie cérébrale utilise le cycloheximide (Linnik *et al.*, 1993), qui est un inhibiteur bloquant la synthèse des protéines. Bien que les mécanismes cellulaires précis ne soient pas clairs, l'attention de certains travaux s'est dirigée vers l'activation de deux caspases, la caspase-3 et la caspase-1, dans le cas de la dégénérescence neuronale par apoptose lors de dommages ischémiques au cerveau (Hara *et al.*, 1997; Endres *et al.*, 1998; Cheng *et al.*, 1998; Schielke *et al.*, 1998). Il a été démontré que les tissus endommagés par l'ischémie présentaient une augmentation de l'activité de la caspase-3 (Cheng *et al.*, 1998). Ainsi, ces résultats suggèrent que l'activation pathologique de la caspase-3 contribuerait aux dommages tissulaires et l'inhibition de son activité pourrait donc limiter les atteintes neuronales. Un fait intéressant et important pour des applications cliniques potentielles, est que l'efficacité neuroprotectrice d'un inhibiteur de caspases, le boc-aspartyl(OMe)-fluoromethylketone, est observable même si le traitement débute jusqu'à 3 heures après les dommages ischémiques (Cheng *et al.*, 1998). Dans d'autres modèles, l'inhibition de l'activité de la caspase-1 a démontré une neuroprotection (Schielke *et al.*, 1998). Par ailleurs, il est prématuré d'attribuer le phénomène d'apoptose directement à cette caspase. En

effet, il est reconnu que la caspase-1 est impliquée dans la production d'interleukine-1 β , qui est une cytokine pro-inflammatoire importante lors de dommages ischémiques. Plusieurs facteurs peuvent limiter la possibilité d'appliquer des thérapies anti-apoptotiques en conditions cliniques. Par exemple, l'inhibition non-spécifique du programme de mort cellulaire programmé pourrait avoir des effets délétères, en particulier chez les nouveau-né, puisque ce type d'inhibiteur peut perturber de manière importante des événements critiques au développement neuronal.

6. ACIDE LYSOPHOSPHATIDIQUE (LPA)

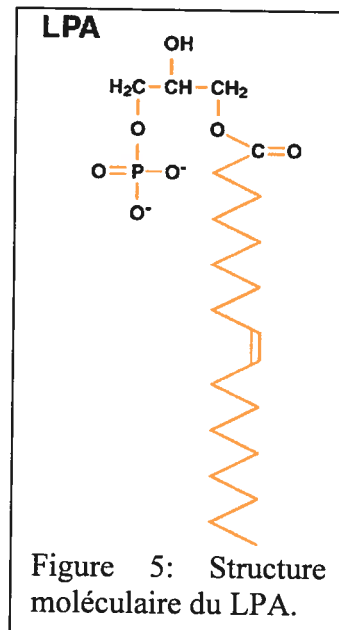
6.1 Introduction aux lipides

Les membranes cellulaires sont principalement composées de phospholipides formés d'une chaîne d'acides gras, d'un glycérol et d'un groupement phosphate. Ces phospholipides sont dits amphipathiques, c'est-à-dire qu'ils présentent une région hydrophile et une région hydrophobe. Deux couches de phospholipides associés queue à queue forment une bicouche lipidique qui est la base structurale des membranes cellulaires. Auparavant associés principalement à une fonction de structure des membranes cellulaires, les lipides sont maintenant reconnus en tant que molécules importantes dans la signalisation cellulaire.

6.2 Biochimie du LPA

Le LPA est un phospholipide naturel composant les membranes cellulaires et est produit suite à une synthèse *de novo* des phospholipides membranaires. Cette

molécule est un glycérophospholipide très simple où la chaîne d'acides gras est greffée au squelette glycérol-phosphate par l'intermédiaire d'une liaison acyle, alkyle ou alkényle en position 1 ou en position 2 (Figure 5). Le terme LPA se rapporte à plusieurs molécules lipidiques plutôt qu'à une structure chimique simple. Chez les mammifères, les espèces de LPA retrouvées dans les fluides biologiques sont constituées d'acides gras à longues chaînes saturées ou insaturées. Ces espèces existent naturellement en configuration R.

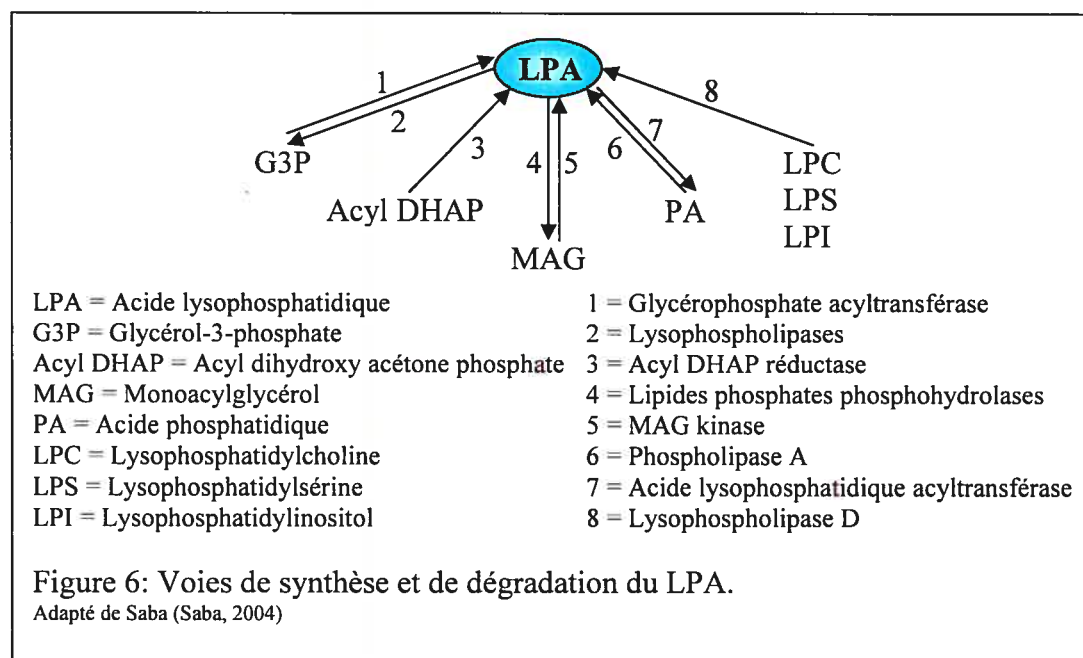


La démonstration de l'existence d'un LPA bioactif remonte à 1963 où W. Vogt démontra l'implication du LPA dans la vasoconstriction induite par des extraits d'intestins de grenouilles sur des cellules musculaires lisses de lapins (Vogt, 1963). Par la suite, certains travaux ont démontré que l'injection intraveineuse de LPA cause de l'hypertension chez les rats mais de l'hypotension chez les chats et les lapins (Tokumura *et al.*, 1978), que le LPA est un puissant facteur favorisant l'agrégation plaquettaire (Mauco *et al.*, 1978), qu'il induit une rétraction neuronale et l'arrondissement des cellules (*cell rounding*) dans des lignées de cellules de neuroblastome et de neurogliome (Jalink *et al.*, 1993).

6.3 Métabolisme du LPA

Le LPA doit se trouver dans le milieu extracellulaire afin de se lier à son récepteur et ainsi induire des réponses biologiques. Par ailleurs, vu sa nature

polaire, le LPA peu très difficilement diffuser de manière passive au travers les membranes cellulaires. La présence de LPA à l'extérieur de la cellule résulte majoritairement d'une synthèse exécutée directement dans le milieu extracellulaire. Les enzymes et les protéines impliquées dans la synthèse, le transport et la dégradation du LPA gèrent sa disponibilité biologique. Il existe plusieurs enzymes susceptibles de synthétiser le LPA à l'extérieur de la cellule. Quelques voies possibles pour la synthèse et la dégradation du LPA sont illustrées sur la Figure 6.



Le LPA peut être formé suite à l'estérification du glycérol-3-phosphate (G3P) par la glycérophosphate acyltransférase. La formation du LPA peut s'effectuer par la réduction de l'acyl dihydroxy acétone phosphate (Acyl DHAP), la phosphorylation du monoacylglycérol (MAG) par la monoacylglycérol kinase, la déacylation de l'acide phosphatidique (PA) par l'activité de la phospholipase A₁ ou A₂, l'hydrolyse de glycérophospholipides incluant la lysophosphatidylcholine

(LPC), la lysophosphatidylsérine (LPS) et la lysophosphatidylinositol (LPI) par la lysophospholipase D (Saba, 2004). La génération du LPA dans les cellules normales est initiée par des perturbations physiques ou suite à une stimulation des récepteurs membranaires ou d'autres protéines de surface, lesquelles activent des enzymes spécifiques telles que les phospholipases. En revanche, les cellules tumorales ont la possibilité de sécréter le LPA spontanément (Goetzl, 2001). Due à son caractère hydrophile, le LPA ne reste pas nécessairement associé à la membrane après sa formation (Moolenaar, 1995). La concentration de LPA dans le sérum se trouve dans la gamme du micromolaire (Eichholtz *et al.*, 1993). Par ailleurs, les récepteurs du LPA sont généralement assez sensibles et peuvent être activés par une concentration d'environ 10 nM de LPA (Hecht *et al.*, 1996; Bando *et al.*, 1999; Ishii *et al.*, 2000).

Parallèlement à sa synthèse, le LPA subit également une dégradation intense. La très grande majorité (plus de 90 %) de son inactivation est suite à sa déphosphorylation par des lipides phosphates phosphohydrolases. Il s'agit de phosphatases dont le site catalytique est orienté vers la face externe de la membrane plasmique (Simon *et al.*, 2002). Alternativement, le LPA peut être converti en PA par l'acide lysophosphatidique acyltransférase ou en G3P par l'activité de lysophospholipases (Saba, 2004).

6.4 Les récepteurs du LPA

6.4.1 Historique

Auparavant, les scientifiques assumaient que les effets du LPA étaient issus d'une interaction sans récepteur. Une possibilité étant que le LPA diffusait dans la bicouche lipidique, induisant ainsi une perturbation permettant l'activation de protéines hétérotrimériques G liées à la membrane (van Corven *et al.*, 1989). Une autre explication était que le LPA exerçait son influence par l'activation de canaux calciques (Tokumura *et al.*, 1991). Plus récemment, un autre groupe a proposé que le LPA puisse se lier à un récepteur pour déclencher son action (Moolenaar, 1995). L'évidence de l'existence d'un récepteur a été déterminée par des études de photoaffinité où une protéine liée au LPA a été identifiée (van der Bend *et al.*, 1992). Le premier récepteur du LPA, le récepteur LPA₁, a été découvert en 1996 par Hecht *et al.* et son expression a été observée au niveau du cortex cérébral d'embryon (Hecht *et al.*, 1996). Ensuite, un autre sous-type, le récepteur LPA₂, a été décelé. Un peu plus tard, en 1999, le sous-type LPA₃ a été caractérisé par Bandoh *et al.* (Bandoh *et al.*, 1999). Plus récemment, un quatrième récepteur, le récepteur LPA₄, a été repéré par le groupe de Shimizu en 2003 (Noguchi *et al.*, 2003). Finalement, au mois de juin dernier, l'équipe de Chun a décrit la présence du récepteur LPA₅ (Lee *et al.*, 2006). Tous ces récepteurs appartiennent à la famille des récepteurs couplés aux protéines G (GPCR).

6.4.2 Les GPCR

La famille des GPCR, comptant plus de 1000 membres, est le plus grand groupe de récepteurs de surface cellulaire. Ces récepteurs sont majoritairement

responsables de la transduction du signal transmembranaire en réponse aux hormones et aux neurotransmetteurs. Les protéines de cette famille possèdent sept domaines transmembranaires hydrophobes et elles sont toutes basées sur le même principe. La partie N-terminale se trouve du côté extracellulaire et est assez éloignée de la membrane, la partie C-terminale se trouve du côté intracellulaire et entre les deux, nous retrouvons sept domaines transmembranaires liés entre eux par des boucles. La reconnaissance des molécules qui jouent le rôle de ligand se fait par ces boucles qui ont une séquence et une position particulière dans l'espace. Une fois le ligand fixé sur ce domaine externe, il y a changement de la conformation du récepteur à l'intérieur de la membrane et ce changement est reconnu par une protéine G qui est responsable de la transmission du signal. Les voies de signalisations mises en jeu par l'activation des récepteurs du LPA varient selon la nature des protéines G auxquelles ils sont couplés (Karp, 1998).

6.4.3 Couplage des récepteurs du LPA avec les protéines G

Le LPA₁ fut le premier récepteur du LPA à être identifié. Ce récepteur agit en se couplant à quatre types de protéines G ($G_{i/o}$, G_q , $G_{12/13}$, G_s) pour induire une vaste gamme de réponses cellulaires dont : la prolifération cellulaire, l'activation de protéines kinases activées par des mitogènes (MAPK), l'inhibition de l'adénylate cyclase (AC), l'activation de la phospholipase C (PLC), la mobilisation de Ca^{2+} et l'activation de Rho (Ishii *et al.*, 2004). L'expression du récepteur LPA₁ se fait majoritairement au niveau du système nerveux et une régulation spatiale et temporelle s'effectue tout au long du développement du cerveau. Lors de la période postnatale, l'expression du récepteur LPA₁ est présente autour et dans la

matière blanche en développement et son expression coïncide avec le processus de myélinisation (Weiner *et al.*, 1998). Le récepteur LPA₂, quant à lui, peut se coupler aux mêmes protéines G que le récepteur LPA₁ pour ensuite entraîner une signalisation cellulaire très similaire au récepteur LPA₁ (Ishii *et al.*, 2004). Le récepteur LPA₃ a été isolé tout d'abord en tant que GPCR orphelin et il est très distinct du récepteur LPA₁ et du récepteur LPA₂ dans sa capacité de lier les sous-unités G_s, G_{i/o} et G_q mais pas G_{12/13} (Ishii *et al.*, 2000). Il est aussi beaucoup moins sensible aux espèces de LPA avec les chaînes saturées et une liaison acyle. Néanmoins, le récepteur LPA₃ induit différentes signalisations incluant l'activation de la PLC, la mobilisation de Ca²⁺, l'activation de l'AC via sa liaison avec la sous-unité G_s et l'activation des MAPK (Ishii *et al.*, 2004). Le récepteur LPA₃ ne se couple pas à l'actomyosine qui est responsable de l'arrondissement des cellules neuronales impliquant G_{12/13} et Rho. La surexpression du récepteur LPA₃ dans les neuroblastes mène étonnamment à l'élongation des neurites, tandis qu'une surexpression du récepteur LPA₁ ou du récepteur LPA₂ provoque une rétraction des neurites et la cellule s'arrondie une fois stimulée avec LPA (Ishii *et al.*, 2000). L'homologie des acides aminés entre les récepteurs LPA₁, LPA₂ et LPA₃ chez les mammifères est d'environ 55 % (Chun *et al.*, 2002). Dernièrement, un quatrième récepteur, le récepteur LPA₄, a été identifié, mais sa séquence, divergente comparativement aux autres récepteurs du LPA, présente une similitude étroite au récepteur de PAF (Ishii *et al.*, 2004). Les récepteurs LPA₄ et LPA₅ sont impliqués dans la mobilisation de Ca²⁺ et dans l'accumulation de l'adénosine monophosphate

cyclique (AMPC), par ailleurs, leur couplage avec les différentes protéines G est encore mal connu.

6.4.4 Voies de signalisations du LPA

Les différentes voies de signalisations du LPA, qui seront brièvement décrites dans cette section, sont illustrées à la Figure 7. Divers facteurs favorisent l'une ou l'autre des différentes voies de signalisations cellulaires. D'abord, il y a une différence qualitative et quantitative dans l'expression des récepteurs du LPA sur les différents types cellulaires (Weiner *et al.*, 2001; Ishii *et al.*, 2000). Ensuite, chaque type cellulaire présente une expression et une régulation génique unique qui peuvent être modifiées par le signal du LPA. Troisièmement, il y a une interférence entre les différentes voies de signalisations pouvant contribuer au résultat final initié par le LPA. En quatrième lieu, nous retrouvons une variation dans les facteurs cytoprotecteurs, comme les antioxydants, dans la cellule, ce qui peut influencer la réponse d'apoptose induite par LPA (Holtsberg *et al.*, 1998). Le cinquième niveau de régulation se situe au niveau des protéines adaptatrices (protéines G). Les différents récepteurs du LPA peuvent se coupler à diverses protéines G et ces dernières déclencheront des mécanismes variables. Finalement, les conditions spécifiques sous lesquelles l'activité du LPA a été examinée peuvent potentiellement modifier les effets du LPA.

Grâce à leur couplage à la sous-unité G_i , les trois sous-types de récepteurs conduisent à l'activation des MAPK et du phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) conduisant respectivement à une suppression de la mort cellulaire et à une augmentation de la mobilité des cellules. En premier lieu, Ras induit l'activation

de Raf, MEK et MAPK. Suite à cette activation, MAPK transloque au noyau où il phosphoryle et active des facteurs de transcription nucléaires impliqués dans la synthèse d'ADN (Daaka, 2002). Ces effets de proliférations cellulaires causés par le LPA ont été observés dès le milieu des années 1980 (van Corven *et al.*, 1989). La signalisation via le PI3K implique l'activité du facteur d'échange de nucléotides de guanine Tiam1 (facteur d'invasion tumorale, *T-cell lymphoma invasion and metastasis 1*) (Van Leeuwen *et al.*, 2003). Tiam1 est un facteur d'échange pour la GTPase Rac1, donc Tiam1 active Rac1. Ensuite, Rac1 recrute des effecteurs (kinases, protéines de liaison ou de modulation de la polymérisation de l'actine) permettant aux cellules de former des lamellipodes et de migrer. Dans le même temps, d'autres protéines sont inactivées et notamment d'autres GTPases comme RhoA (Van Leeuwen *et al.*, 2003).

La liaison des récepteurs LPA₁ et LPA₂ avec la sous-unité G_i conduit à une inhibition de l'AC, ce qui a comme conséquence de diminuer le niveau d'AMPc intracellulaire. Le récepteur LPA₃ entraîne, à l'opposé, une activation de l'AC possiblement grâce à un couplage avec la sous-unité G_s (Saulnier-Blache, 2004).

Les récepteurs LPA₁ et LPA₂ conduisent à différents stimuli grâce à leur couplage à la sous-unité G_{12/13} et à l'activation de Rho. Des expérimentations ont permis de réaliser que, dans les cellules de Schwann, l'activation de la voie de Rho par le LPA inhibe potentiellement l'apoptose en favorisant l'adhésion cellulaire. Ce mécanisme agit via l'activation des voies de PI3K, suggérant une interférence possible entre les voies de Rho et de PI3K (Weiner *et al.*, 2001).

Grâce au couplage avec la sous-unité $G_{12/13}$, il y a différents mécanismes par lequel le LPA active Rho pour induire une contraction cytosquelettique dirigeant vers une rétraction neuronale. Une fois activée, la sous-unité $G_{12/13}$ se lie à des facteurs d'échange de nucléotides guanyliques (Rho-GEF) favorisant l'accumulation de Rho-GTP (Schmidt et Hall, 2002). Ceci mène alors à l'activation de la Rho-kinase (ROCK) qui conduit à une contraction de l'actomyosine et ainsi une rétraction neuronale et un arrondissement des cellules par différents mécanismes (Hirose *et al.*, 1998; van Nieuw Amerongen *et al.*, 2000). Dans certaines cellules, la rétraction neuronale provoquée par le LPA est causée par une augmentation de la phosphorylation de la protéine associée aux microtubules Tau conduisant à une désorganisation des microtubules (Sayas *et al.*, 1999). Ce processus est induit par des voies Rho-dépendantes avec la participation du glycogène-synthase-kinase-3 (GSK-3). La stimulation de Rho et de ROCK mènent à la phosphorylation de la chaîne légère de la myosine (MLC) et de la myosine phosphate, cette dernière a pour rôle d'enlever les résidus phosphates de la MLC phosphorylée (Amano *et al.*, 1996). Puisque la myosine phosphate, une fois phosphorylée, est inactive, l'activation de Rho provoque une accumulation de la myosine phosphorylée et augmente, par conséquent, la polymérisation et la contraction cellulaire (Amano *et al.*, 1998).

Par ailleurs, le LPA est aussi connu pour être impliqué dans l'apoptose via Rho dans des lignées de cellules myéloïdes progénitrices, TF-1 et D2 (Lai *et al.*, 2001). Il a été rapporté que le LPA seul n'avait pas d'effet apoptotique sur ces cellules, mais lorsque ces cellules sont traitées avec du phorbol-myristate-acétate

l'activation de la voie de signalisation de Rho par le LPA aurait la possibilité de réduire la capacité d'adhésion de ces cellules, favorisant ainsi l'apoptose (Lai *et al.*, 2001).

Les caspases sont des molécules impliquées dans une cascade menant à l'apoptose dans des cellules PC12 suite à une activation par le LPA (Holtsberg *et al.*, 1998). Plusieurs événements survenant au niveau de la mitochondrie et pouvant activer la cascade de caspases ont été détectés après le traitement de cette lignée cellulaire avec le LPA. Ce traitement au LPA induit une production de NO et de ROS pouvant conduire à l'apoptose par l'activation des caspases apoptotiques (Holtsberg *et al.*, 1998).

Les trois récepteurs, LPA₁, LPA₂ et LPA₃, conduisent également à l'activation de la PLC menant à une hydrolyse du phosphatidyl-inositol-biphosphate (PIP₂) et une augmentation du calcium intracellulaire via un couplage à la sous-unité G_q (Fukushima *et al.*, 2002). Cette voie indépendante de Rho mène à une dépolymérisation de l'actine qui est associée avec une perte des mouvements membranaires ondulants au bout des neurones (Fukushima *et al.*, 2002). Ceci a été la première évidence démontrant que le cytosquelette d'actine pouvait être régulé par deux voies indépendantes (Rho-dépendant et Rho-indépendant).

La majorité des cellules de mammifères co-expriment au moins deux récepteurs du LPA, suggérant que les récepteurs du LPA signalent d'une façon coopérative (Mills *et al.*, 2002). Les récepteurs LPA₁ et LPA₂ partagent beaucoup de voies de signalisations, mais le récepteur LPA₃ semble se comporter d'une façon atypique en favorisant l'élongation plutôt que la rétraction de neurites (Ishii

et al., 2000). Il reste beaucoup à étudier pour élucider comment cet effet d'opposition est provoqué. Certaines études suggèrent que le récepteur LPA₄ pourrait activer la PLC et l'AC, mais les propriétés de ce GPCR sont très peu définies (Noguchi *et al.*, 2003). Pour terminer, les voies de signalisations intracellulaires déclenchées par le récepteur LPA₅ ne sont pas encore connues.

6.4.5 Souris invalidées pour les récepteurs du LPA

L'invalidation des récepteurs LPA₁ et LPA₂ a été réalisée chez la souris (Contos *et al.*, 2002; Contos *et al.*, 2000a). Les souris ne présentant pas le récepteur LPA₂ n'exprimaient pas de phénotype particulier, mais les souris invalidées pour le récepteur LPA₁ manifestaient une mortalité néonatale importante (50 %) liée à une perturbation de l'olfaction et une réduction du comportement de succion chez les nouveau-nés (Contos *et al.*, 2000a). Ces observations correspondent au fait que le récepteur LPA₁ est exprimé dans les cavités nasales (McGiffert *et al.*, 2002). Les souris ayant survécues avaient une taille plus petite d'environ 30 % et des anomalies crâniennes (Contos *et al.*, 2000a). Les souris déficientes pour les deux récepteurs, LPA₁ et LPA₂, présentent des anomalies similaires aux souris déficientes seulement pour le récepteur LPA₁. Par ailleurs, des travaux étudiant la sensibilité au LPA de fibroblastes issus d'embryons de ces souris ont montré que la double invalidation LPA₁/LPA₂ est nécessaire pour entraîner une perte complète de l'effet du LPA sur certains mécanismes cellulaires, ceci suggère une redondance entre l'action de ces deux récepteurs (Contos *et al.*, 2002).

6.4.6 LPA dans la rétine

Depuis quelques années certains chercheurs portent leur intérêt sur l'étude de l'effet du LPA sur les cellules rétinienne. D'abord, Thoreson *et al.* ont indiqué que le LPA stimulait plusieurs voies de signalisation dans les cellules du RPE. Ces cellules montrent une forte expression du récepteur LPA₁ et son activation induit une prolifération cellulaire, une inhibition de l'AC, une activation de MAPK et une activation de la PLC. Ainsi, il est suggéré que le LPA participe au développement et à la régénérescence tissulaire au niveau de ces cellules endothéliales. Ce rôle permet aux cellules du RPE de constituer une barrière sang-rétine et de contribuer à l'entretien homéostatique des photorécepteurs (Thoreson *et al.*, 2002).

Des évidences physiologiques ont aussi proposé que les cellules de Müller expriment des récepteurs du LPA et, suite à la rupture de la barrière sang-rétine, le LPA contenu dans le sérum entre dans la rétine et active les récepteurs du LPA sur les cellules de Müller pour ensuite induire des changements dans l'activité de différents types de canaux ioniques. Cet effet amène une dysfonction neuronale, mais les détails de ce phénomène restent encore à être élucidés (Kusaka *et al.*, 1998).

6.4.7 LPA dans le système nerveux

Historiquement, les études employant des cellules nerveuses du système périphérique ont démontré des rôles pour le LPA dans le système nerveux. L'exposition de ces cellules nerveuses au LPA produit une rétraction neuronale rapide et un arrondissement des cellules impliquant la polymérisation du

cytosquelette d'actine. Combiné au fait que le LPA est présent en concentration élevée dans le sérum, il a été proposé que le LPA puisse causer une dégénérescence neuronale dans des conditions pathologiques lorsque la barrière hémato-encéphalique est endommagée et que le sérum fuie dans le cerveau (Eichholtz *et al.*, 1993; Moolenaar, 1995). Chez des lignées de cellules neuronales immortalisées provenant du CNS, une rétraction neuronale se produit quelques minutes suite à l'exposition au LPA par un mécanisme impliquant l'activation de Rho (Ishii *et al.*, 2000).

L'effondrement du cône de croissance est une réponse cellulaire connue pour être déclenchée par l'activité du LPA lors de la guidance axonale ou lors de la migration de neurones différenciés (Fukushima *et al.*, 2002). Cette réponse est induite par l'activation de Rho et de ROCK. Un autre mécanisme pouvant induire l'effondrement du cône de croissance dans les neurones rétiniens par le LPA est la protéolyse dépendante de l'ubiquitine. Les voies apoptotiques impliquant la kinase p-38 et la caspase-3 jouent un rôle important dans ce processus (Campbell et Holt, 2003).

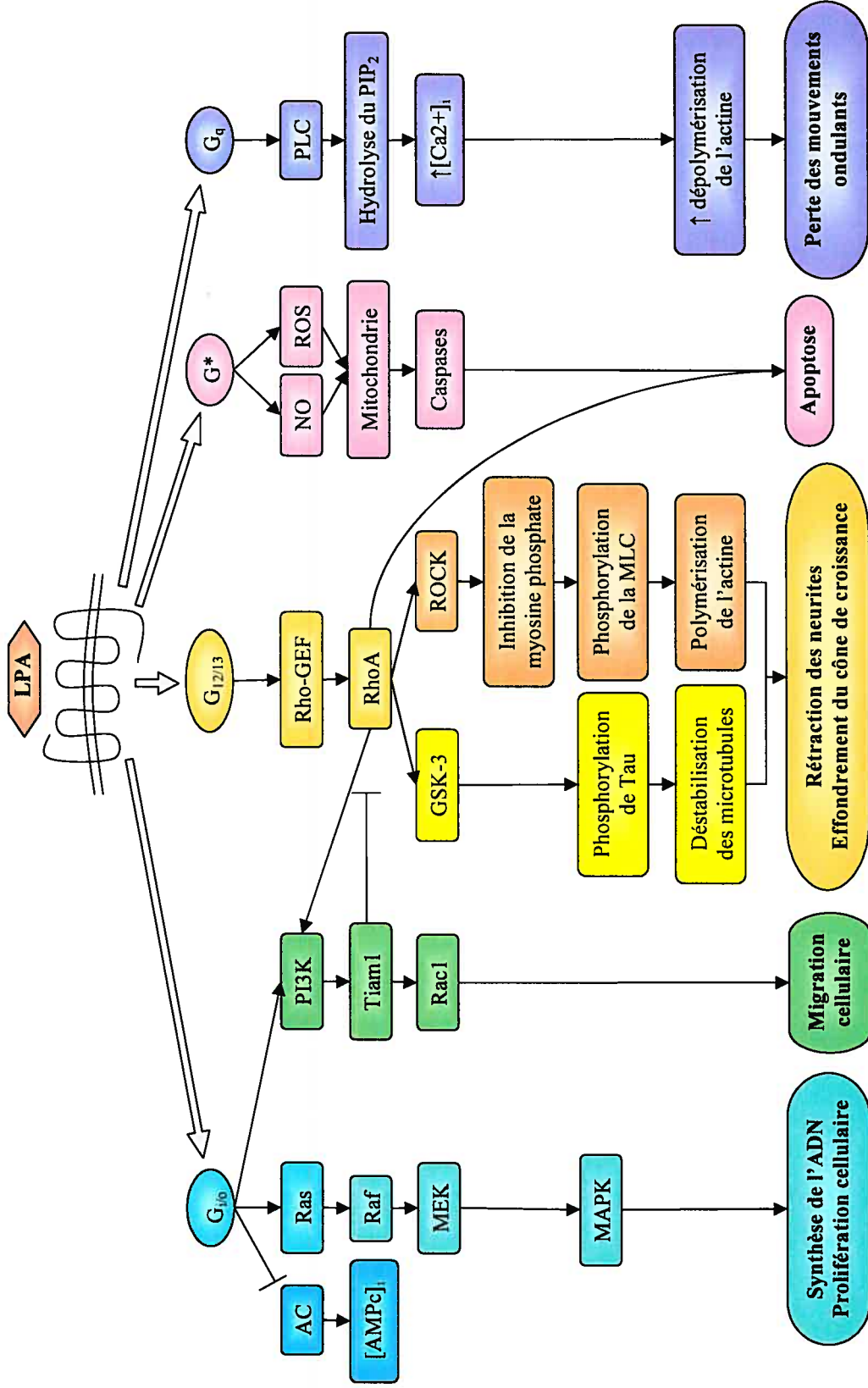


Figure 7: Schéma des différentes voies de signalisations intracellulaires impliquées suite à l'activation du LPA. G* : "Protéine G indéterminée."

II. HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS

Hypothèse

Plusieurs études ont montré que le LPA joue un rôle important dans la dégénérescence des cellules neuronales, mais aucune n'a décrit un lien direct avec les RGC.

Nous proposons que le LPA cause principalement une dégénérescence des RGC par rétraction neuronale dans un modèle de rétinopathie ischémique.

Objectifs

1. Démontrer la présence d'une dégénérescence neuronale lors d'une rétinopathie ischémique.
2. Investiguer la contribution du LPA, l'activation des récepteurs LPA₁ et LPA₂ et leurs voies de signalisations intracellulaires respectives dans notre modèle de rétinopathie ischémique.

III. MATÉRIEL ET MÉTHODES

Matériel

Le matériel a été obtenu des sources suivantes : THG1603 (PCT WO 00/17348) et THG1701 (PCT WO 00/17348) ont été d'une gracieuseté de Theratechnologies Inc. (Montréal, Québec, CA); milieu Neurobasal-A, solution saline équilibrée de Earl (EBSS), pyruvate de sodium, supplément B27, glutamine, pénicilline, streptomycine (Invitrogen, Burlington, ON, Canada); progestérone, transferrine humaine, sélénite de sodium, insuline bovine, forskoline, laminine de sarcome murin d'Engelbreth-Holm-Swarm (EHS-laminine), anticorps monoclonal anti- β -III-tubuline, facteur neurotrophique ciliaire (CNTF), facteur neurotrophique dérivé du cerveau (BDNF), putrécine, albumine de sérum bovin (BSA), trypsine, L-cystéine, poly-D-lysine (PDL), N-acétylcystéine (NAC), lectine Griffonia simplicifolia conjuguée à TRITC, paraformaldéhyde (PFA), sucrose, triiodothyronine, Triton X-100, diméthyl sulfoxyde (DMSO), Y-27632 (inhibiteur de ROCK), Tempol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO); médium de montage anti-décolorant (Biomedica, CA, E-U); composé pour couper à une température optimale (O.C.T.) (Tissue-Tek, Miles Laboratories, Elkhart, IN, E-U); hydroxystilbamidine méthanesulfonate (Fluorogold, FG), anticorps de chèvre anti-lapin couplé à l'Alexa Fluor 488, anticorps de chèvre anti-lapin couplé à l'Alexa Fluor 594, anticorps de chèvre anti-souris couplé à l'Alexa Fluor 594, 4,6-diamidine-2-phénylindole (DAPI) (Molecular Probes, Eugene, OR, E-U); anticorps polyclonal de lapin anti-Edg2 (Exalpha Biologicals, Inc., Boston, MA, E-U); anticorps de souris anti-Edg4 humain (Antibody solution, Palo Alto, CA, E-U); anticorps lapin anti-macrophage de rat (Accurate chemical, Westbury, NY, E-U); papaïne

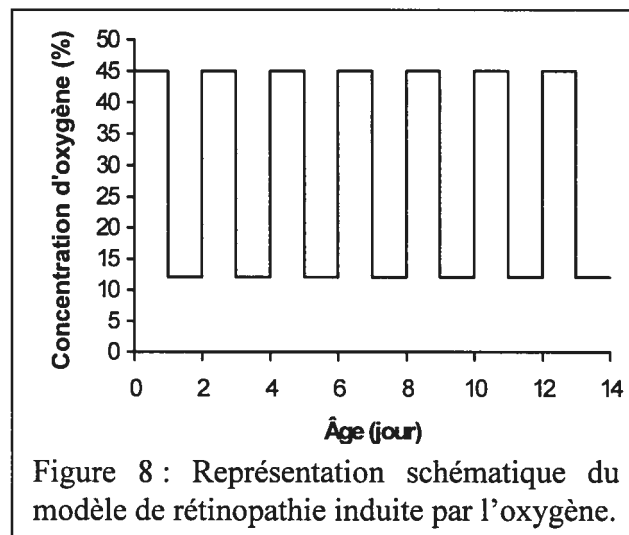
(Worthington Biochemical. Corp., Lakewood, NJ, E-U); anticorps monoclonal de souris anti-Thy1.1 (Chemicon); anticorps de chèvre anti-IgM de souris (chaîne spécifique à μ), anticorps de chèvre anti-IgG de lapin (H+L) (Jackson immunoresearch); acide lysophosphatidique steroyl (sLPA) (Avanti Polar Lipids Inc); chambre d'incubation hermétique (Billups-Rothenberg, Del Mar, CA, E-U); sonde à oxygène (Teledyne Analytical Instruments, Los Angeles, CA); seringue Hamilton (Hamilton Co., Reno, NV) le reste du matériel a été acheté de Fisher Scientific (Montréal, Québec, Canada).

Animaux

Des rats Long Evans (Charles River, Saint-Constant, Québec, Canada) sont utilisés en accord avec un protocole du Comité Institutionnel des Bonnes Pratiques Animales en Recherche du Centre de Recherche de l'Hôpital Ste-Justine.

Rétinopathie induite par l'oxygène

La rétinopathie induite par l'oxygène, qui est un modèle de ROP chez le rat, est induite selon un protocole établi (Werdich *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2003). Afin de provoquer une rétinopathie induite par l'oxygène, les mères Long Evans et leurs ratons (13-16 ratons/portée) sont maintenus



du jour postnatal 0 (P0) à P14 dans des chambres où le taux d'oxygène varie à tous les 24 heures entre 45 % et 12 % d'oxygène (Figure 8). Le niveau d'oxygène de ces chambres est contrôlé par le logiciel Oxycycler (BioSpherix Ltd., Redfield, NY). Les rats contrôles sont maintenus à l'air ambiant (21 % oxygène). Pour la quantification des RGC, les nouveau-nés sont sacrifiés à P14. Un groupe séparé d'animaux est placé en normoxie (21 % oxygène) pour les 6 jours suivants le traitement aux cycles d'oxygène (jusqu'à P20). Ce protocole produit la néovascularisation rétinienne dans 100 % des cas, ce qui nous a permis de confirmer l'induction de la rétinopathie induite par l'oxygène. Tous les rats sont sacrifiés en utilisant 2 mL/4,5 kg d'Euthanyl injecté par la voie intrapéritonéale.

Coloration des vaisseaux rétiens

Les yeux des rats sont retirés et fixés 1 heure dans 4 % v/v formaline. Les rétines sont mises à plat et sont colorées avec la lectine. Brièvement, les rétines sont perméabilisées avec du méthanol 100 % (-20 °C) pour 10 minutes, et incubées 1 heure à la température ambiante dans 1 % Triton X-100/PBS avec la lectine Griffonia simplicifolia conjuguée à TRITC (1/100). Les rétines sont montées à plat entre lame et lamelle en utilisant un médium de montage anti-décolorant, elles sont visualisées en utilisant un microscope à fluorescence Nikon Eclipse E800 et photographiées avec une caméra digitale Nikon DMX1200. La densité vasculaire est déterminée à l'aide du programme informatique Image-Pro Plus 4.5 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD) comme rapporté auparavant (Lahaie *et al.*, 1998; Beauchamp *et al.*, 2001) et la densité est normalisée avec les animaux exposés à 21 % d'oxygène.

Quantification des RGC

Au jour P7, une semaine avant le sacrifice des animaux, les RGC sont colorées de manière rétrograde en utilisant du FG 5 %, un traceur fluorescent, dilué dans une solution de saline 0,9 % contenant 10 % de DMSO. Une injection de 1 μ L est effectuée à une profondeur de 2 mm au dessus de chaque collicule supérieur en utilisant une seringue Hamilton de 10 μ L (Figure 9).

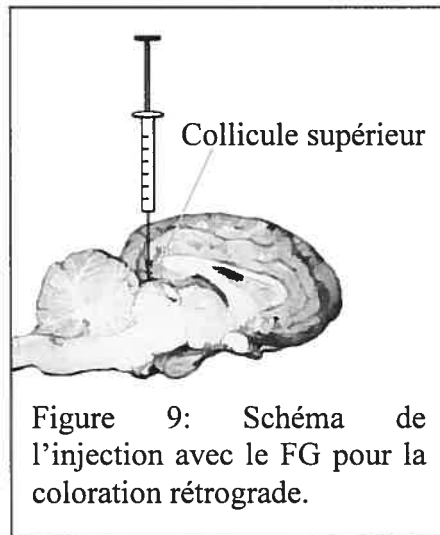


Figure 9: Schéma de l'injection avec le FG pour la coloration rétrograde.

Au jour 14, les rats sont sacrifiés et perfusés avec du PFA 4 % dilué dans du PBS. Un point de suture est effectué au dessus du cadran supérieur de l'œil afin d'orienter l'œil correctement lors des coupes histologiques au cryostat. Les yeux sont prélevés et incubés 2 heures dans du PFA 4 % à la température ambiante pour ensuite être transférés dans une solution de sucrose 30 % pour une nuit à 4 °C. Les yeux sont disséqués et enrobés dans de l'O.C.T. Les sections sont coupées au cryostat (16 μ m) sur le plan sagittal et sont collectées sur des lames préalablement enduites de gélatine. Pour la quantification des RGC, seuls les coupes incluant le nerf optique sont analysées pour s'assurer de toujours étudier une coupe représentative de la rétine. Les coupes histologiques des rétines sont visualisées en utilisant un microscope à fluorescence Nikon Eclipse E800 et photographiées avec une caméra digitale Nikon DMX1200. La quantité de RGC est calculée dans le cadran supérieur et inférieur de la rétine.

Injections intraoculaires

Les rats sont anesthésiés en utilisant l'isoflurane (2 %) et reçoivent une injection intraoculaire aux jours P0, 3, 6, 9 et 12 en utilisant un système de micro-injection (FemtoJet; Eppendorf AG) et des micro-capillaires de verres stériles (≈ 60 gauge) (Femtotips II; Eppendorf AG). Pour les injections, les micro-capillaires sont insérés dans l'hémisphère supérieur de l'œil avec un angle de 45° à travers la sclère dans le corps vitreux. Cette route d'administration évite le détachement de la rétine ou des blessures de la structure interne de l'œil. Les animaux reçoivent $2 \mu\text{L}$ de véhicule; saline 0,9 % ou saline 0,9 % contenant 10 % de DMSO. L'œil controlatéral est injecté avec soit, un antagoniste du récepteur LPA_1 (THG1603, 20 mM), un antagoniste du récepteur LPA_2 (THG1701, 20 mM), un capteur de radicaux libres (Tempol, 0,77 M) ou un inhibiteur de ROCK (Y-27632, 2 mM). La concentration de ces solutions résulte en une concentration efficace dans le vitré (le volume total de l'œil d'un raton est estimé à $40 \mu\text{L}$ basé sur un volume sphérique). Les animaux en normoxie et les animaux soumis aux cycles d'oxygène reçoivent les mêmes injections intraoculaires et les yeux sont prélevés à P14 pour procéder à la quantification des RGC.

Transcription inverse suivie d'une réaction en chaîne de la polymérase (RT-PCR)

L'ARN total est isolé à partir de rétines de rats P14 en utilisant l'ensemble d'extraction d'ARN de Qiagen (Qiagen) selon les instructions du fabricant. Pour la synthèse de l'ADN complémentaire (ADNc), nous avons utilisé $1 \mu\text{g}$ d'ARN messager (ARNm) pour toutes les réactions. Les séquences des

amorces utilisées pour l'amplification sont contenues au Tableau 1. Pour l'amplification de l'ADNc du récepteur LPA₁, le chauffage initial est fait pour 3 minutes à 94 °C, suivi de 35 cycles de 45 secondes de dénaturation à 94 °C, 30 secondes de recuit à 58 °C, une extension à 72 °C pour 1 minute et une extension finale de 10 minutes à 72 °C. Pour l'amplification de l'ADNc de RhoA, de l' α -tubuline-1 et de la β -actine, le chauffage initial est fait pour 3 minutes à 94 °C, suivi de 30 cycles de 1 minute de dénaturation à 94 °C, 1 minute de recuit à 56 °C, une extension à 72 °C pour 1 minute et une extension finale de 10 minutes à 72 °C. Ensuite, 10 μ L de chaque échantillon amplifié sont évalués à l'aide d'une électrophorèse sur un gel d'agarose 1 %.

Tableau 1: Séquences des amorces utilisées pour les RT-PCR

Amorces	Séquences	Taille
LPA ₁	5'-ATCTAGCCACAGAATGGAACACAGT-3' 5'-CAGATGCAGTTCAGCCCACACTGGG-3'	451 pb
RhoA (Zhang <i>et al.</i> , 2005)	5'-ACCAGTTCACAGAGGTTTATGT-3' 5'-TTTGGTCTTTGCTGAACACT-3'	410 pb
α -tubuline-1	5'-ATGGTCTTGTGCGCTTGGCA-3' 5'-TGAGCGCCCAACCTACTACTAA-3'	551 pb
β -actine (Hornuss <i>et al.</i> , 2001)	5'-TTCTACAATGAGCTGCGTGTGGC-3' 5'-AGAGGTCTTTACGGATGTCAACG-3'	611 pb

Immunohistochimie

Les coupes histologiques réalisées au cryostat sont effectuées comme décrit précédemment. L'attachement non spécifique est bloqué en incubant les sections pour 1 heure dans du BSA 3 % et Triton X-100 0,3 % dans du PBS. Chaque premier anticorps est dissous dans la solution de blocage (anticorps polyclonal de lapin anti-Edg2 1/400 et anticorps de souris anti-Edg4 humain 1/100) et incubé une nuit à 4 °C. Le lendemain les sections sont incubées avec le

second anticorps dissous dans la solution de blocage (anticorps de chèvre anti-lapin couplé à l'Alexa Fluor 594 1/300 et anticorps de chèvre anti-souris couplé à l'Alexa Fluor 594 1/300 respectivement). Les échantillons sont protégés entre lame et lamelle en utilisant un milieu de montage anti-décolorant. Les colorations sont visualisées en utilisant un microscope à fluorescence Nikon Eclipse E800 et photographiées avec une caméra digitale Nikon DMX1200.

Isolation et culture des RGC

Les RGC sont purifiées en utilisant un protocole modifié d'attachement des RGC sur un anticorps spécifique (Otori *et al.*, 1998; Guenther *et al.*, 1994) décrit pour la première fois par Barres et al (Barres *et al.*, 1988). Brièvement, les rats Long Evans de 6 jours sont sacrifiés pour obtenir environ 20 rétines par expérience. Les rétines isolées sont incubées 30 minutes dans une solution de papaine (15 U/mL) à 37 °C et les cellules dissociées sont ensuite incubées 10 minutes avec un anticorps de lapin anti-macrophage de rat. Les cellules en suspension sont incubées 30 minutes sur un pétri enduit d'un anticorps de chèvre anti-IgG de lapin dirigé contre les chaînes L et H (0,05 mg/mL dans un tampon Tris). Les cellules en suspension n'ayant pas adhéré au pétri sont incubées 1 heure sur un pétri enduit d'un anticorps monoclonal de souris anti-Thy1,1 (1/300). Les RGC attachées au pétri sont récoltées suite à une digestion enzymatique avec de la trypsine 0,125 %. À cette étape, la densité des RGC dissociées est calculée à l'aide d'un hémocytomètre et les cellules sont séparées afin d'obtenir 1×10^5 cellules par puit dans une plaque de 24 puits préalablement enduits avec de la PDL (1 mg/mL)

pendant 2 heures et ensuite incubés toute la nuit avec de la EHS-laminine (5 µg/mL).

Les cellules en culture sont maintenues dans un milieu de culture à base de Neurobasal avec pyruvate de sodium (1 mM), supplément B27 (1:50), NAC (60 µg/mL), insuline (5 µg/mL), forskoline (10 ng/mL), glutamine (2 mM), triiodothyronine (40 ng/mL), pénicilline (100 U/mL), streptomycine (100 µg/mL), putrésine (16 µg/mL), sélénite de sodium (40 ng/mL), BSA (100 µg/mL), transferrine (100 µg/mL), progestérone (62 ng/mL), BDNF (50 ng/mL) et CNTF (10 ng/mL).

La pureté de la culture de RGC est évaluée suite à une coloration immunohistochimique avec l'anticorps monoclonal anti-β-III-tubuline. Brièvement, les cellules sont fixées avec du PFA 4 %. Les sites non spécifiques sont bloqués 1 heure en utilisant une solution de blocage composée de PBS avec BSA 3 % et Triton X-100 0,4 %. Les échantillons sont d'abord incubés 1 heure à la température de la pièce avec le premier anticorps, monoclonal anti-β-III-tubuline (1/100). Par la suite, une incubation de 1 heure avec le second anticorps, anticorps de chèvre anti-souris couplé à l'Alexa Fluor 594 (1/200), est effectuée. Une incubation de 3 minutes avec une solution de DAPI (1/1000) est aussi exécutée pendant 3 minutes afin de colorer les noyaux cellulaires. Les lamelles contenant les cellules sont finalement montées sur lames en utilisant un milieu de montage anti-décolorant. Pour déterminer l'expression du récepteur LPA₁, nous avons procédé à une double coloration avec d'abord, un anticorps polyclonal de lapin anti-Edg2 (1/100) pour une nuit à 4 °C. Le lendemain, les cellules sont

incubées avec l'anticorps secondaire, anticorps de chèvre anti-lapin couplé à l'Alexa Fluor 488 (1/200) pour 1 heure à la température ambiante. Ensuite, nous avons incubé ces mêmes échantillons 1 heure avec le deuxième anticorps primaire, anticorps monoclonal anti- β -III-tubuline (1/100) suivi d'une incubation pendant 1 heure avec un anticorps de chèvre anti-souris couplé à l'Alexa Fluor 594 (1/200). Finalement, les échantillons ont été exposés à une concentration de 1/1000 de DAPI pendant 3 minutes.

Pour déterminer l'effet du LPA sur les RGC en culture, tous les facteurs de croissance sont retirés du milieu de culture 24 heures avant les expérimentations. Ensuite, une incubation de 30 minutes est effectuée avec une concentration finale de 1 μ M de sLPA.

Les RGC ont été exposées à un environnement hypoxique en utilisant une chambre d'incubation hermétique. La chambre a été remplie avec une atmosphère artificielle et la concentration d'oxygène est déterminée à l'aide d'une sonde à oxygène. La chambre hypoxique contenant les pétris de culture cellulaire est ensuite transférée dans un incubateur de cellules.

Analyse statistique

Le test statistique ANOVA à deux voies a été utilisé pour déterminer l'effet des différents traitements. Nous considérons significatif la valeur de $P < 0.05$.

IV. RÉSULTATS

Effet d'une rétinopathie ischémique sur la survie des RGC

Pour investiguer l'impact d'une rétinopathie ischémique sur la survie des RGC, les rats ont été exposés à un taux variable d'oxygène (45 %-12 % O₂) pour induire la pathologie. La viabilité des RGC a été déterminée en procédant à une coloration rétrograde avec le FG au jour P7. Au jour 14, les RGC ont été quantifiées et les résultats obtenus démontrent une perte significative de 25 % des RGC suite à l'induction d'une rétinopathie ischémique (Figure 11).

Modèle de rétinopathie induite par l'oxygène

Bien que le modèle de rétinopathie utilisé ait été décrit dans la littérature, nous avons vérifié si l'induction de cette pathologie fonctionnait chez nos animaux. Ainsi, la néovascularisation rétinienne a été évaluée au jour 20 suite à une coloration des vaisseaux avec la lectine et une différence significative de l'aire vascularisée est observée chez les animaux exposés aux cycles d'hyperoxie-hypoxie (45 %-12 % O₂) comparativement aux animaux contrôles en normoxie (21 % O₂) (Figure 12). Aucune pathologie rétinienne n'a été observée chez les rats contrôles. Le modèle de rétinopathie s'est ainsi avéré fonctionnel et nous avons poursuivi nos expérimentations en utilisant ce modèle animal de rétinopathie ischémique, soit l'exposition des animaux pendant 14 jours à des cycles de 45 %-12 % d'oxygène.

Implication du LPA lors de la rétinopathie ischémique

Le LPA est un phospholipide connu pour être impliqué dans la dégénérescence de certains types de cellules neuronales. Ainsi, la présence de 2

récepteurs du LPA, soit le récepteur LPA₁ et le récepteur LPA₂, a été évaluée par immunofluorescence. La Figure 13A montre la CCG colorée en bleu par le FG et en rouge nous retrouvons le récepteur LPA₁. La superposition de ces deux images permet de visualiser une localisation du récepteur LPA₁ au niveau des RGC. De plus, il est à noter que le récepteur LPA₁ est exprimé dans la CNV où nous retrouvons des cellules horizontales, bipolaires et amacrines. Le récepteur LPA₂ de son côté, est aussi bien exprimé dans la rétine mais seulement par les RGC (Figure 13B). De plus, nous avons utilisé la technique de RT-PCR afin de quantifier l'expression du gène du récepteur LPA₁ dans des rétines contrôles (normoxie; 21 % O₂) et des rétines ayant développées une rétinopathie (hyperoxie-hypoxie; 45 %-12 % O₂). Aucune variation est notable dans le niveau d'ARNm du récepteur LPA₁ suite au développement de la pathologie en comparant avec le niveau de la β -actine (Figure 13C). Par ailleurs, ce résultat permet de confirmer qu'il y a bel et bien expression du récepteur LPA₁ dans les rétines de rats.

Suite à l'obtention des résultats sur l'expression des récepteurs LPA₁ et LPA₂, nous avons pensé bloquer ces récepteurs en utilisant des antagonistes spécifiques en vue de vérifier la présence d'un lien direct entre le LPA et la dégénérescence des RGC lors d'une rétinopathie ischémique. D'abord, nous avons soumis nos animaux aux traitements à l'oxygène et nous avons procédé à des injections intraoculaires périodiquement avec un antagoniste spécifique au récepteur LPA₁, le THG1603, pour ensuite quantifier les RGC. La Figure 14A montre que l'antagoniste du récepteur LPA₁ n'a pas d'effet sur la survie des cellules ganglionnaires chez les animaux contrôles (normoxie; 21 % O₂) en

comparant avec le groupe contrôle injecté avec le véhicule. Cependant, dans le groupe d'animaux ayant développé une rétinopathie (hyperoxie-hypoxie; 45 %-12 % O₂) nous pouvons noter une augmentation du nombre de RGC au niveau de la CCG suite au traitement avec l'antagoniste du récepteur LPA₁ comparativement au groupe ayant reçu le véhicule. Des expériences similaires ont aussi été exécutées en utilisant un antagoniste du récepteur LPA₂, le THG1701. Comme dans le cas de l'antagoniste du récepteur LPA₁, la drogue n'affecte pas les RGC dans le groupe contrôle (normoxie; 21 % O₂). Par contre, l'antagoniste du récepteur LPA₂ n'apporte aucun effet neuroprotecteur lors du développement d'une rétinopathie ischémique (hyperoxie-hypoxie; 45 %-12 % O₂) (Figure 14B). Ces résultats suggèrent donc que le LPA serait impliqué, via son récepteur LPA₁ seulement, dans la dégénérescence des RGC lors du développement d'une rétinopathie ischémique.

Neuroprotection des RGC suite à l'induction d'une rétinopathie induite par l'oxygène

Afin de réduire la perte des RGC observée lors de la pathologie ischémique, nous nous sommes intéressés à étudier la cascade de signalisations intracellulaires, à partir du LPA, pouvant mener à la dégénérescence des RGC. La Figure 15A représente différentes voies de signalisations intracellulaires. Plusieurs avenues peuvent mener à une rétraction neuronale, soit par l'activité de ROCK ou par l'activation de la GSK-3, mais le LPA peut aussi causer l'apoptose via la production de radicaux libres. Premièrement, nous avons bloqué une partie de la mort cellulaire par apoptose en injectant un capteur de radicaux libres, le Tempol.

Les résultats présentés à la Figure 15B montrent qu'en inhibant certains radicaux libres nous parvenons à empêcher partiellement la dégénérescence des RGC chez les animaux développant une rétinopathie ischémique comparativement aux animaux traités avec le véhicule. Ainsi, la production de radicaux libres serait impliquée dans la dégénérescence des RGC via l'activité du LPA.

En parallèle, nous avons évalué l'implication de ROCK dans la rétraction neuronale lors du développement d'une rétinopathie ischémique en effectuant des injections intraoculaires de Y-27632, un inhibiteur spécifique de ROCK (Figure 16A). La Figure 16B montre que, comme dans le cas du traitement avec le Tempol, l'inhibition de ROCK se traduit en une augmentation du nombre de RGC dans les rétines comparativement aux animaux injectés avec le véhicule dans le groupe ayant été exposé au taux variable d'oxygène. Cette neuroprotection en inhibant ROCK permet d'observer une quantification de RGC similaire aux animaux contrôle exposés en normoxie.

Différentes réactions de RT-PCR ont été réalisées pour déterminer le niveau d'expression de certains gènes, soit RhoA et α -tubuline-1. RhoA est une protéine impliquée dans la voie de la rétraction neuronale induite par le LPA et l' α -tubuline-1 est une protéine importante composant les microtubules suite à sa liaison avec la β -tubuline. L'expression de ces 2 gènes a été évaluée sur des rétines provenant d'animaux contrôles (normoxie; 21 % O₂) et d'animaux ayant développés une rétinopathie (hyperoxie-hypoxie; 45 %-12 % O₂). En se référant au niveau d'expression de la β -actine, aucune différence n'est notable concernant le

niveau d'expression de RhoA et de l' α -tubuline-1 dans chacun des groupes (Figure 17).

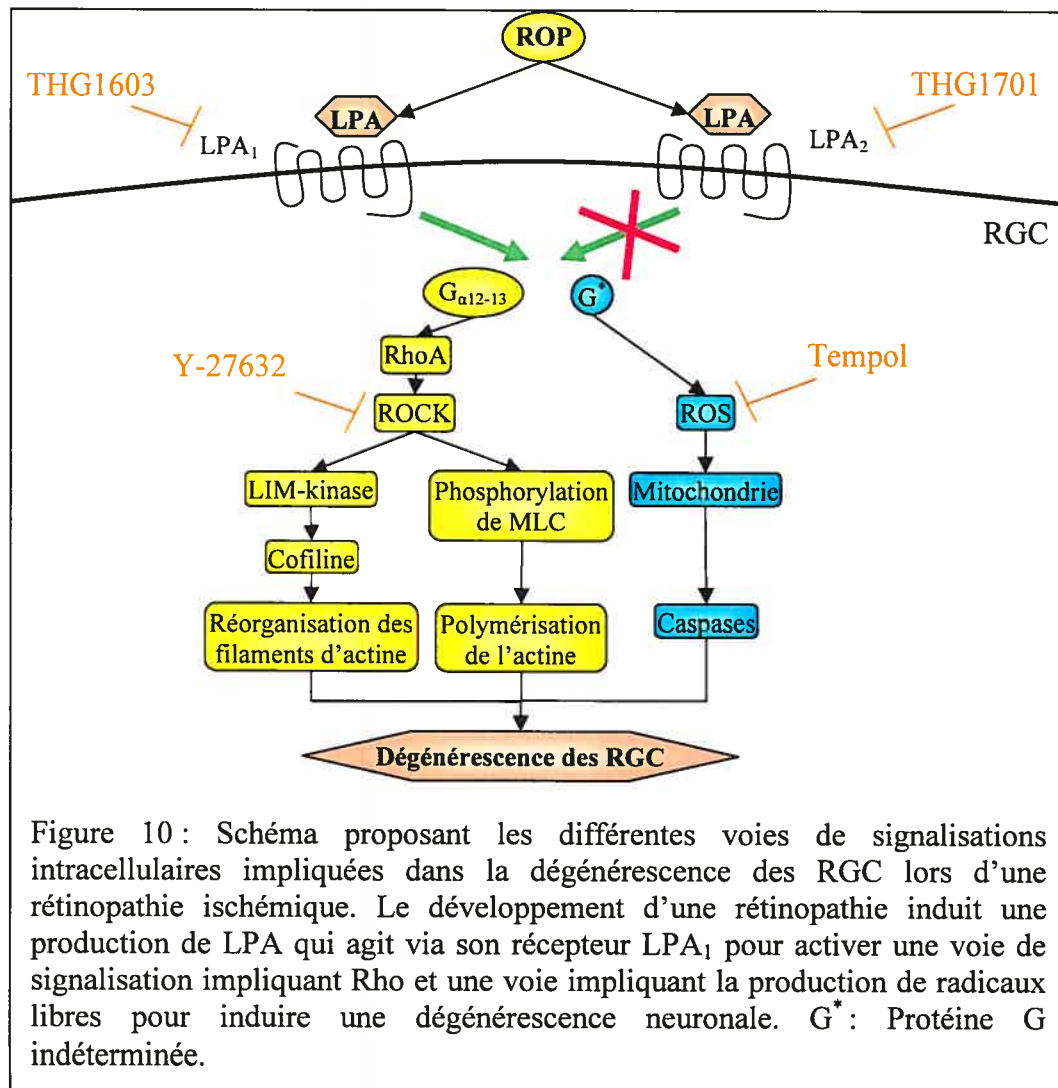
Afin d'étudier les mécanismes intracellulaires de dégénérescence des RGC plus en détails, nous avons procédé à une culture pure de RGC isolées à partir de rats. La β -tubuline est une protéine importante dans la composition des microtubules du cytosquelette et le sous-type β -III-tubuline est spécifique, dans la rétine, aux RGC. Nous avons donc utilisé un anticorps contre la β -III-tubuline pour identifier la présence de RGC en culture (Figure 18A). L'expression du récepteur LPA_1 a aussi été observée par immunofluorescence et il est possible de visualiser une co-localisation de ce récepteur avec la β -III-tubuline à la Figure 18B. Ce résultat correspond aux données présentées précédemment puisque nous avons démontré l'expression du récepteur LPA_1 sur des coupes histologiques rétiniennes à la Figure 13A.

Puisque nos cellules en culture correspondent à des RGC et expriment le récepteur LPA_1 , nous avons vérifié si l'administration de LPA dans le milieu de culture aurait un impact sur les RGC. Sur la Figure 19A nous retrouvons une RGC et, suite à une incubation de 30 minutes avec une concentration de 1 μ M de LPA, nous observons une rétraction des neurites de la cellule accompagnée d'un arrondissement du corps cellulaire. De plus, nous avons testé l'effet, sur les RGC, d'une incubation dans un environnement hypoxique. Pour ce faire, nous avons disposé les plaques de culture cellulaire dans une chambre hermétique contenant 2 % d'oxygène. Après une incubation de 6 heures en hypoxie nous avons visualisé

les RGC et observé, comme dans le cas de l'incubation avec le LPA, une rétraction des neurites (Figure 19B).

V. DISCUSSION

Le LPA est un lipide endogène pouvant induire divers effets dont la rétraction neuronale, l'effondrement du cône de croissance et l'apoptose. Jusqu'à ce jour, aucune recherche n'a démontré un lien direct entre la dégénérescence des RGC et le LPA. Notre étude tend à démontrer *in vivo* que la rétinopathie ischémique provoquerait une dégénérescence des RGC et ce phénomène pourrait avoir lieu via l'activation du récepteur LPA₁ (Figure 10). Ces résultats sont supportés par d'autres travaux ayant démontrés que les RGC sont les cellules rétinienne les plus vulnérables lors d'une ischémie (Osborne *et al.*, 2004). Une



diminution d'environ 25 % des RGC a été observée au niveau de la CCG suite au développement d'une rétinopathie ischémique. Cette différence observée comparativement au groupe contrôle peut être causée par une mort par apoptose ou par nécrose des RGC. De plus, un phénomène de rétraction neuronale ou un effondrement du cône de croissance peut avoir lieu. Il est connu que le corps des RGC est situé dans la CCG et, à partir de cet endroit, l'axone de chaque cellule croît en se dirigeant vers le collicule supérieur. Si les axones des RGC subissent une rétraction ou un effondrement du cône de croissance lors d'une rétinopathie ischémique, le lien entre le collicule supérieur et les RGC ne sera pas réalisé. Un autre aspect à prendre en considération est que les RGC, qui nous paraissent normales à première vue, peuvent voir leur fonction altérée. Ainsi, plusieurs cellules peuvent demeurer vivantes sans nécessairement être capable de remplir leur fonction principale.

Puisque le LPA est un lipide pouvant agir activement sur le système neuronal, nous avons déterminé l'expression de deux récepteurs du LPA, soit le récepteur LPA₁ et le récepteur LPA₂, au niveau des RGC. Nous avons concentré nos analyses sur ces deux récepteurs puisque ce sont les plus étudiés et le récepteur LPA₁ est connu pour être fortement exprimé sur les cellules neuronales (Jin *et al.*, 2006). Le récepteur LPA₃, de son côté, est plus faiblement exprimé dans les neurones et est impliqué dans le phénomène d'élongation des neurites (Ishii *et al.*, 2000). Les récepteurs LPA₄ et LPA₅ sont encore très peu connus et aucun anticorps ou antagoniste spécifique n'est présentement disponible sur le marché, ce qui rend difficile l'étude de l'implication de ces récepteurs dans la

dégénérescence neuronale. Par immunofluorescence nous avons démontré clairement, pour la première fois, l'expression des récepteurs LPA₁ et LPA₂ sur les RGC et via ces récepteurs le LPA peut provoquer divers effets menant ultimement à une dégénérescence neuronale. En utilisant l'antagoniste du récepteur LPA₂ nous avons déterminé que ce récepteur n'est pas impliqué dans la dégénérescence des RGC. Par ailleurs, l'injection intraoculaire de l'antagoniste du récepteur LPA₁ nous a permis d'observer une neuroprotection des RGC lors du développement d'une rétinopathie ischémique (Figure 10). Ainsi, le LPA pourrait agir via son récepteur LPA₁ pour induire une dégénérescence neuronale dans les RGC. Cependant, il y a une possibilité que le LPA causerait la mort de cellules endothéliales vasculaires. Basé sur cette théorie, le fait d'inhiber le récepteur LPA₁ pourrait avoir eu l'effet de préserver la survie de ces cellules endothéliales et, de fait, cette survie cellulaire permettrait de soutenir l'apport d'oxygène afin de maintenir la survie des RGC dans le modèle de la ROP. Par ailleurs, nos études effectuées sur des cultures pures de RGC nous montrent un effet direct du LPA sur la dégénérescence de ces cellules.

Le LPA, synthétisé à partir de phospholipides membranaires par l'action de divers enzymes (Pages *et al.*, 2001), stimule une variété de réponses cellulaires (Contos *et al.*, 2000b; Panetti *et al.*, 2001). Celles-ci incluent un réarrangement du cytosquelette d'actine via l'activation de RhoA et l'apoptose induite par une production de radicaux libres. La voie de signalisation intracellulaire impliquant RhoA est impliquée dans la rétraction de neurites induite par le LPA (Fukushima *et al.*, 1998; Hirose *et al.*, 1998; Weiner et Chun, 1999; Weiner *et al.*, 2001; Tigyi

et al., 1996b; Tigyi *et al.*, 1996a). Nous avons confirmé que la voie de signalisation impliquant RhoA joue un rôle dans le processus de rétraction induite par le LPA dans les RGC en employant le Y-27632, un inhibiteur de ROCK (Uehata *et al.*, 1997; Narumiya *et al.*, 2000). L'injection directe du Y-27632 empêche partiellement la rétraction causée par le LPA, comme démontré dans des études précédentes effectuées sur des cellules neuronales et des cellules de Schwann (Jalink *et al.*, 1994; Tigyi *et al.*, 1996b; Tigyi *et al.*, 1996a; Hirose *et al.*, 1998; Weiner *et al.*, 2001). Nous avons aussi démontré que l'inhibition des ROS permet une neuroprotection partielle des RGC, mais il est également possible que d'autres radicaux libres, dont le NO, aient un impact négatif sur les RGC (Yamasaki *et al.*, 2005). Puisque les ROS sont impliqués dans la voie de l'apoptose induite par le LPA et que les ROCK agissent en provoquant une rétraction neuronale, ces deux phénomènes semblent être impliqués dans la dégénérescence des RGC lors de la rétinopathie ischémique. Par ailleurs, la coloration rétrograde avec le FG ne nous permet pas de distinguer ces deux phénomènes *in vivo*.

La famille des protéines Rho est fortement exprimée dans le CNS en développement (Malosio *et al.*, 1997) et la signalisation intracellulaire impliquant ROCK implique l'activation de RhoA. Nous avons ainsi vérifié l'expression de l'ARNm de RhoA. Cette protéine étant importante dans l'activation de la rétraction neuronale, nous avons donc supposé que l'expression de RhoA serait augmentée dans le groupe ayant développé une rétinopathie ischémique. De façon surprenante, l'expression de l'ARNm de RhoA demeure inchangée

comparativement au groupe contrôle. Ces données suggèrent donc que la différence au niveau de la signalisation cellulaire entre les deux groupes se trouve en aval de RhoA. Les microtubules se composent de dimères d' α -tubuline et de β -tubuline et remplissent des fonctions cellulaires nombreuses et diversifiées, qui concernent l'établissement et le maintien de l'organisation spatiale et dynamique du cytoplasme (Avila, 1990). Puisque l'instabilité des microtubules peut être impliquée dans la rétraction neuronale, nous avons vérifié l'expression de l'ARNm de l' α -tubuline-1, une protéine importante dans la composition des microtubules. Cependant, aucune variation n'est observée lorsque nous comparons le groupe exposé aux cycles d'oxygène avec le groupe contrôle. Ces résultats suggèrent que d'autres protéines du cytosquelette ou des changements au niveau des modifications post-traductionnelles seraient responsables de la rétraction observée. Plusieurs modifications post-traductionnelles dont la phosphorylation, l'acétylation et la détyrosylation, jouent un rôle important dans la stabilisation des microtubules et l'élongation des neurites (Gard et Kirschner, 1985; Sale *et al.*, 1988; Wolf *et al.*, 1988; Lim *et al.*, 1989). Il est donc possible que chez les animaux exposés aux cycles d'oxygène ces changements enzymatiques soient désorganisés, ce qui mène ultimement à une désorganisation des microtubules entraînant une rétraction du cytosquelette. De plus, il est rapporté que le NO induit une reconfiguration du squelette de microtubules lors d'une rétraction axonale (He *et al.*, 2002).

Pour faciliter les études de signalisations intracellulaires, une culture pure de RGC a été réalisée. En se basant sur des travaux antérieurs, une incubation de

30 minutes avec une concentration de 1 μM de LPA a été utilisée pour notre étude (Dawson *et al.*, 2003; Tigyi *et al.*, 1996a). Le traitement des RGC en culture cause un processus rapide de rétraction neuronale. Puisqu'il y a un phénomène d'hypoxie lors d'une pathologie ischémique, nous avons aussi vérifié l'effet de cette condition sur les RGC en culture et nous avons observé une rétraction neuronale comme dans le cas du LPA lorsque ces cellules neuronales sont incubées dans un environnement hypoxique. Toutefois, il reste à déterminer si cette rétraction observée en condition hypoxique implique l'activité du LPA ou s'effectue par une voie différente. Ces résultats obtenus dans un environnement hypoxique sont supportés par une autre étude ayant démontré un dommage de la morphologie des neurites lorsque des RGC provenant de rétines adultes sont exposées en hypoxie (Luo *et al.*, 2001). De nombreuses voies de signalisations peuvent être impliquées dans la dégénérescence des RGC en condition ischémique telle l'activation des récepteurs au glutamate (Luo *et al.*, 2001), la production de radicaux libres (Gupta et Marmor, 1993; Szabo *et al.*, 1991; Ophir *et al.*, 1993; Kortuem *et al.*, 2000), la peroxydation lipidique (Levin *et al.*, 1996), le NO (Morgan *et al.*, 1999) et le facteur de nécrose tumorale- α (Tezel et Wax, 2000). Des expériences avec les RGC en cultures en utilisant le Tempol et le Y-27632 nous permettraient de renforcer nos résultats obtenus *in vivo* au sujet de la neuroprotection des RGC.

La signalisation impliquée dans le phénomène ischémique et l'activation du LPA demeure encore à être déterminée, mais des études ont clairement démontré une augmentation du LPA ou de ses précurseurs, dont le LPC, lors de

différentes pathologies ischémiques (Chen *et al.*, 2003; Okusa *et al.*, 2003). Plusieurs mécanismes doivent encore être analysés en profondeur pour mieux comprendre la pathologie étudiée. En distinguant mieux les voies de signalisations activées lors de la dégénérescence des RGC nous pourrions développer des thérapies afin de bloquer ce processus de dégénérescence cellulaire observé lors d'une rétinopathie ischémique.

VI. DIRECTIONS FUTURES

Il serait intéressant de pousser notre étude plus loin afin de déterminer, de façon précise, les voies de signalisations utilisées par le LPA lors de la dégénérescence des RGC. Nous pourrions d'abord déterminer si cette dégénérescence observée implique une rétraction neuronale ou une mort par apoptose. Pour vérifier la présence d'une rétraction neuronale, il est possible d'effectuer un traçage antérograde avec la sous-unité β de la toxine du choléra. Cette coloration permet d'identifier précisément chaque axone des RGC et suite à ce traçage des coupes histologiques du collicule supérieur permettent de visualiser si tous les axones des RGC sont reliés au collicule supérieur. Si une différence significative est observée entre notre groupe contrôle et celui exposé aux cycles d'oxygène, nous pourrions considérer la rétraction neuronale comme étant impliquée lors d'une rétinopathie ischémique. Pour vérifier s'il y a présence d'apoptose nous pouvons vérifier l'expression de certaines protéines présentes dans la cascade de signalisations menant à l'apoptose, dont p-38 et c-Jun N-terminale kinase. De plus, il serait important d'évaluer l'effet de différentes concentrations de LPA sur les RGC en culture puisqu'une faible dose pourrait engendrer une rétraction neuronale, mais à forte concentration nous pourrions observer une mort cellulaire.

Étant donné que nous avons obtenu des résultats de rétraction neuronale suite à l'incubation de RGC en culture avec le LPA et en condition hypoxique, nous pouvons vérifier si la rétraction observée lorsque les cellules sont incubées en hypoxie implique l'activation du LPA. Pour ce faire, nous pouvons mesurer le niveau de LPA ou bloquer spécifiquement les récepteurs du LPA sur les cellules

exposées en hypoxie. Puisque la phospholipase A_2 est une enzyme importante dans la formation du LPA, il serait aussi possible d'utiliser un bloqueur de la phospholipase A_2 afin d'élucider son rôle dans la génération du LPA. Aussi, la rétraction examinée sur nos RGC en culture peut être provoquée simplement par un réarrangement du cytosquelette tout en conservant la viabilité cellulaire, mais l'apoptose peut aussi induire ce même phénomène de rétraction, il serait donc nécessaire de distinguer lequel de ces deux phénomènes nous observons majoritairement, soit une simple rétraction ou une apoptose. Une autre aspect à considérer lorsque nous étudions des cellules neuronales en culture est le type de ramifications observées. Normalement, *in vivo*, chaque cellule neuronale possède un axone et plusieurs dendrites, mais ceci n'est pas toujours vrai lorsque ces cellules sont mises en culture. Effectivement, il a été démontré qu'une RGC peut se retrouver avec un plus grand nombre d'axones que de dendrites lorsqu'elle est mise en culture (Craig et Banker, 1994). Il est important de prendre ce fait en considération et de déterminer précisément le type de rétraction observée, soit dendritique ou axonale, lorsque nous procédons à des études portant sur le réarrangement du cytosquelette. Les dendrites et les axones expriment certaines protéines qui leurs sont spécifiques. MAP-2 est une protéine caractéristique des dendrites tandis que Tau est particulière aux axones (Wiche *et al.*, 1983; Tytell *et al.*, 1984). L'insertion, dans les RGC, d'une construction de MAP-2 lié à la protéine verte fluorescente (GFP) nous permettrons de distinguer les dendrites visuellement et d'y étudier plus spécifiquement la rétraction neuronale. Le même principe est possible avec une construction Tau-GFP qui permet d'identifier

précisément les axones des cellules neuronales. Finalement, l'étude *in vitro* des RGC nous permet aisément de compléter le milieu de culture avec un antagoniste du récepteur LPA₁, des capteurs de radicaux libres ou un inhibiteur de ROCK dans le but d'étudier les mécanismes intracellulaires impliqués dans la rétraction neuronale. Cependant, il ne faut pas oublier que nos expériences *in vitro* sont effectuées sur une culture pure de RGC, nous ne retrouvons donc pas les mécanismes d'interactions des RGC avec les autres cellules rétiniennes.

La continuation de cette étude nous permettra, pour la première fois, d'établir un lien direct entre la pathologie de la rétinopathie ischémique et son effet sur les RGC.

VII. FIGURES

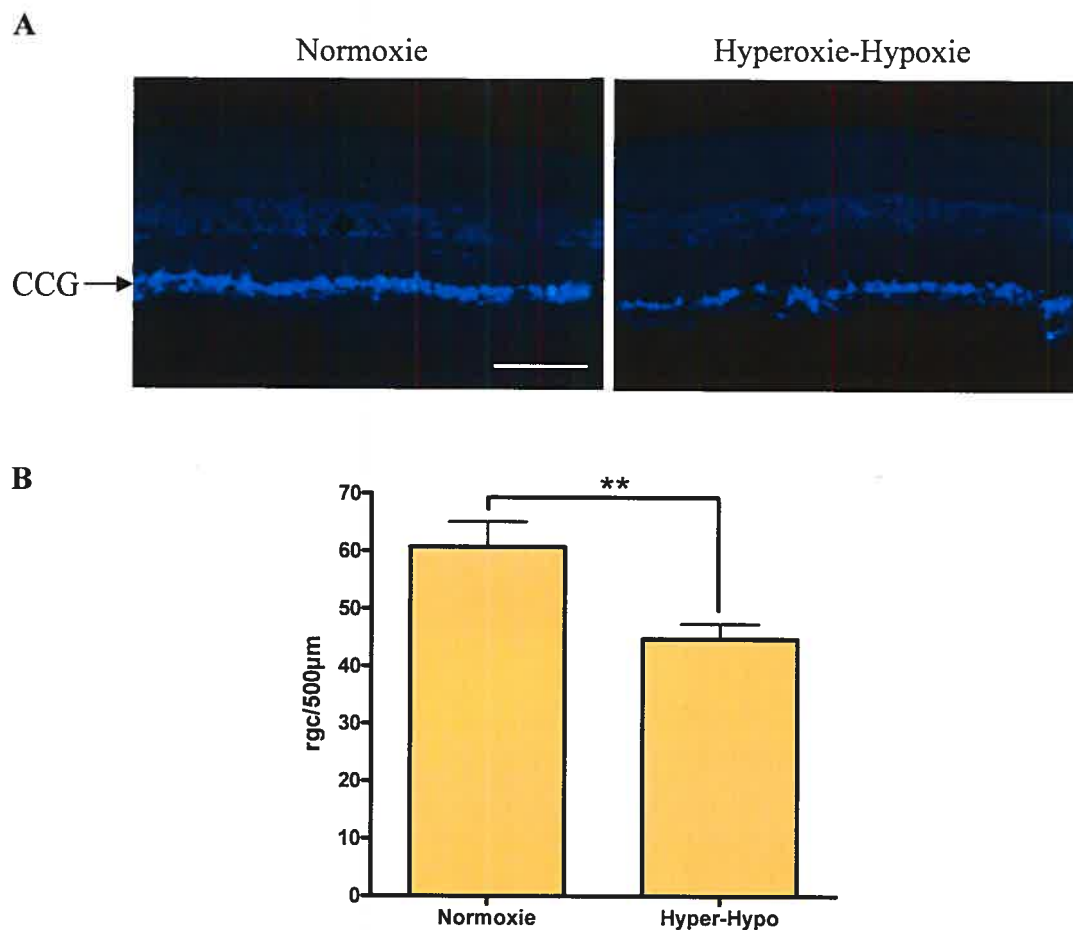


Figure 11 : Effet des cycles d'oxygène sur la quantification des RGC. (A) Coupes histologiques de rétines de rats ayant reçu une injection de FG au niveau du collicule supérieur. La couche des cellules ganglionnaires est identifiée (CCG). (B) Graphique représentant la quantification de la survie des RGC suite à l'exposition des rats à des cycles d'hyperoxie-hypoxie (45 %-12 % O₂) comparativement au groupe contrôle (normoxie; 21 % O₂). Une diminution du nombre de RGC au niveau de la CCG est observée suite au développement d'une rétinopathie ischémique (groupe exposé à l'hyperoxie-hypoxie; 45 %-12 % O₂). La barre d'échelle représente 100 µm. ** $P < 0,01$.

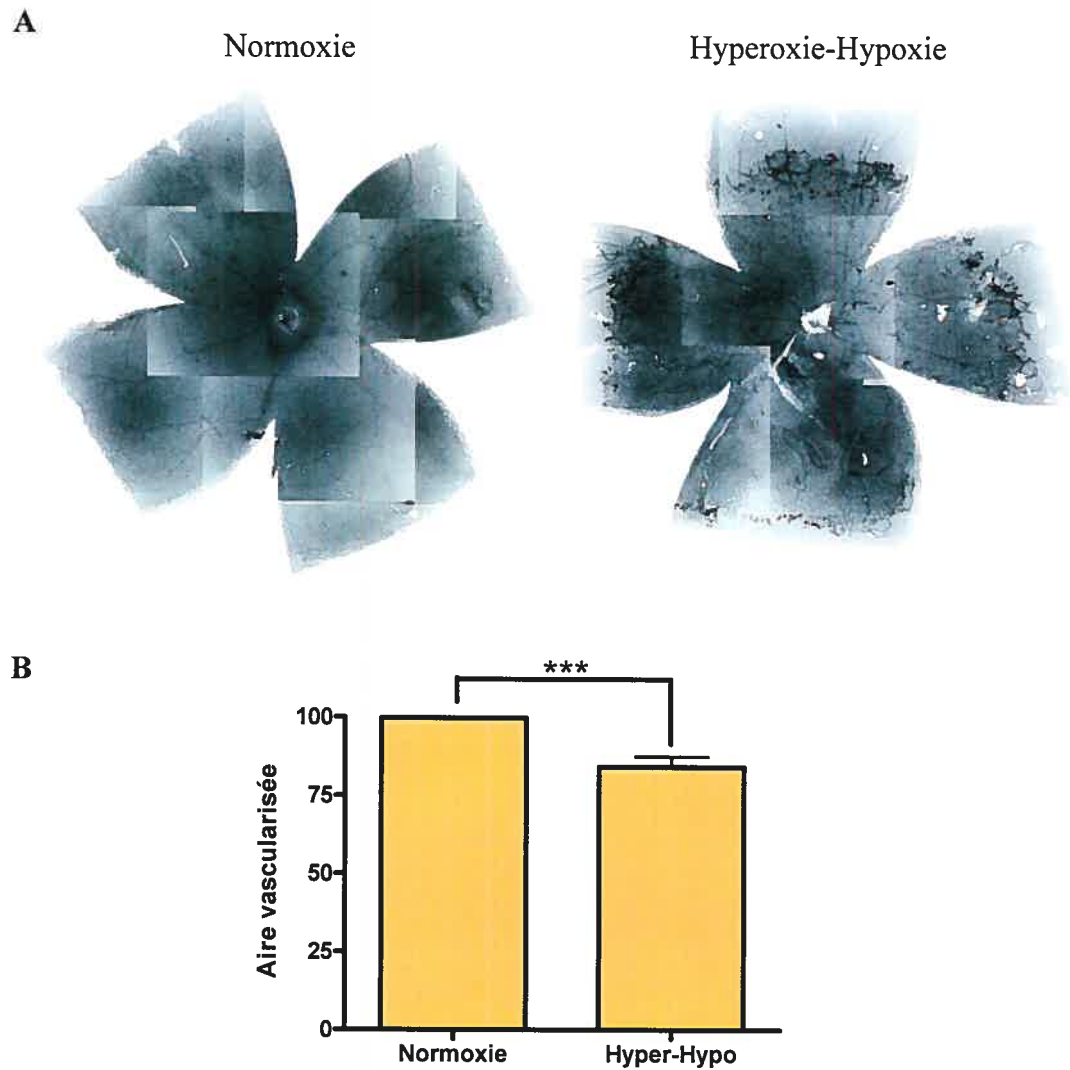


Figure 12 : Effet des cycles d'oxygène sur la surface rétinienne vascularisée (induction de la ROP). (A) Rétines mises à plat de rats exposés en normoxie (21 % O₂) ou aux cycles d'hyperoxie-hypoxie (45 %-12 % O₂). La néovascularisation a été visualisée 6 jours après la fin des traitements à l'oxygène, donc au jour 20, et les vaisseaux ont été colorés par immunohistochimie avec la lectine. (B) Graphique représentant l'aire vascularisée des rétines. Les animaux exposés à un taux variable d'oxygène présentent une diminution de la surface

rétinienne vascularisée correspondant au développement d'une rétinopathie.

*** $P < 0,001$.

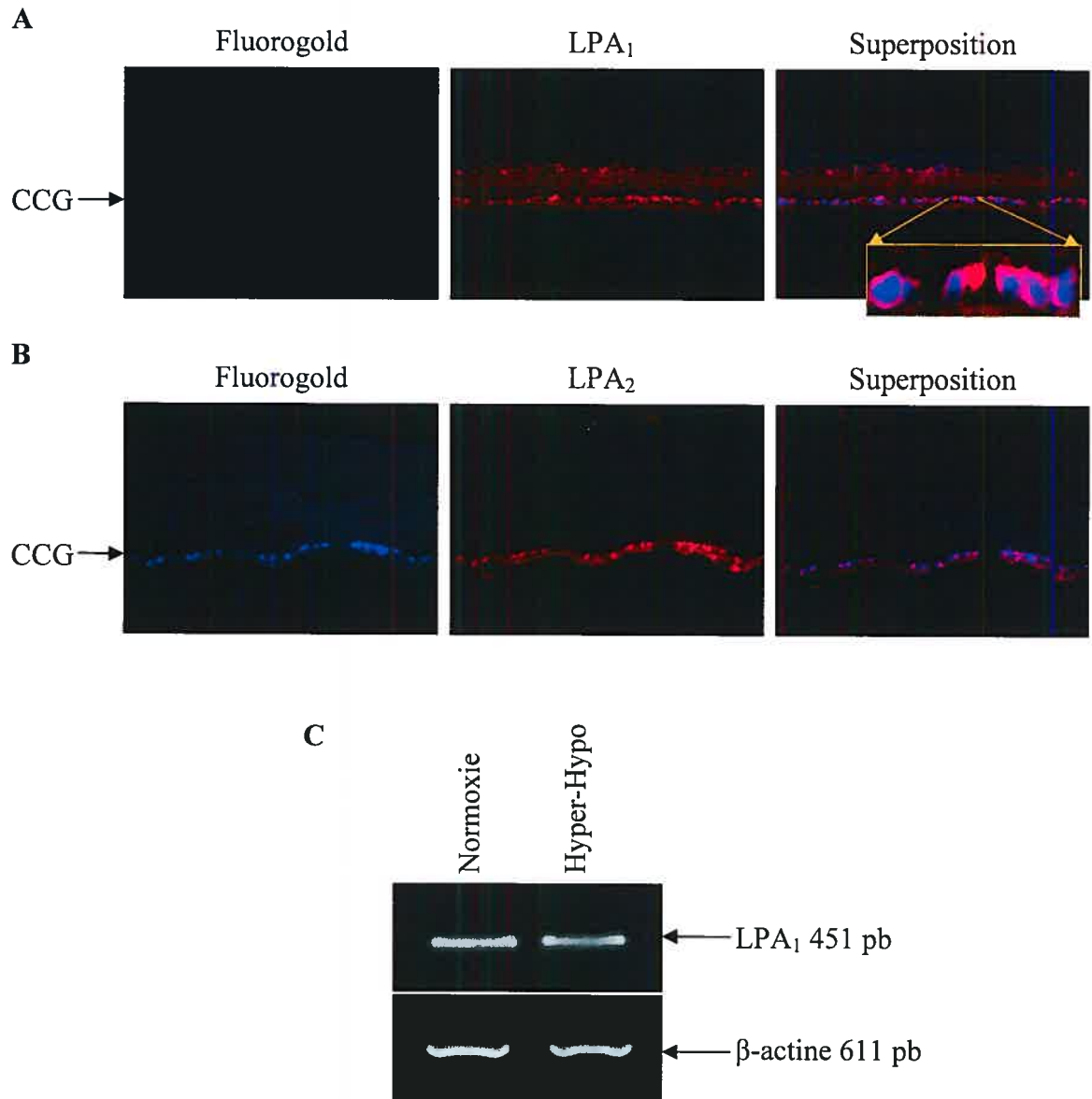
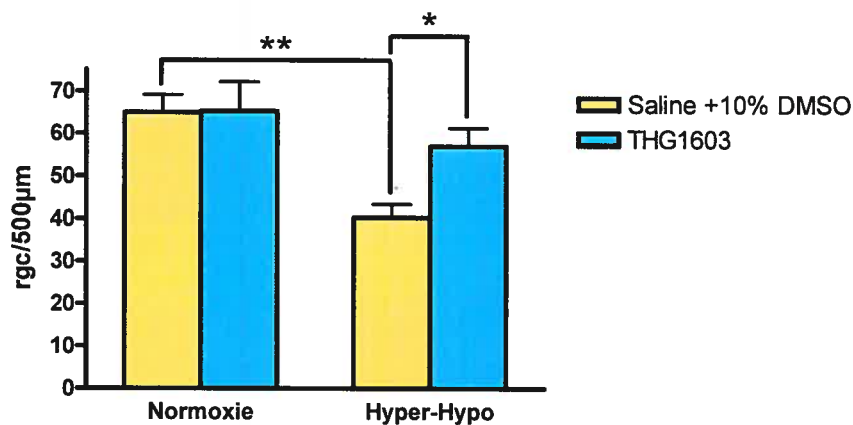


Figure 13 : Expression des récepteurs LPA₁ et LPA₂ dans des RGC provenant de rétines isolées et expression du récepteur LPA₁ par RT-PCR. (A) Coupe histologique d'une rétine colorée rétrogradement avec le FG (bleu) et par immunohistochimie en utilisant un anticorps contre le récepteur LPA₁ (rouge). Les colorations avec le FG et avec l'anticorps contre le récepteur LPA₁ se co-localisent. (B) Coupe histologique d'une rétine colorée rétrogradement avec le FG (bleu) et par immunohistochimie en utilisant un anticorps contre le récepteur LPA₂

(rouge). Les RGC et le récepteur LPA₂ se co-localisent. La couche des cellules ganglionnaires est identifiée (CCG). (C) RT-PCR pour la détection de l'ARNm du récepteur LPA₁ sur des rétines isolées d'animaux contrôles (normoxie; 21 % O₂) et des animaux exposés à un taux variable d'oxygène (hyperoxie-hypoxie; 45 %-12 % O₂). Le niveau d'expression du récepteur LPA₁ a été analysé sur la base de l'expression de la β -actine.

A



B

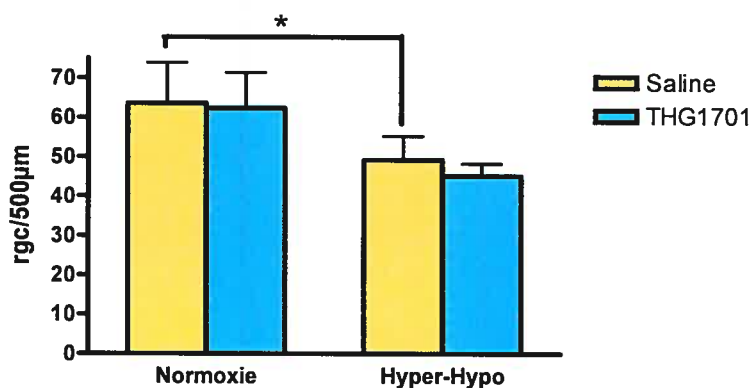


Figure 14 : Effet des antagonistes du récepteur LPA₁ et du récepteur LPA₂ sur la survie des RGC. (A) Effet de l'antagoniste du récepteur LPA₁ (THG1603) sur la neuroprotection des RGC chez des rats contrôles et des rats exposés à des cycles d'hyperoxie-hypoxie. (B) Effet de l'antagoniste du récepteur LPA₂ (THG1701) sur la neuroprotection des RGC chez des rats contrôles et des rats exposés à des cycles d'hyperoxie-hypoxie. Les injections intraoculaires ont été réalisées périodiquement en utilisant chacune des drogues précédentes lors du traitement à l'oxygène des rats. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$.

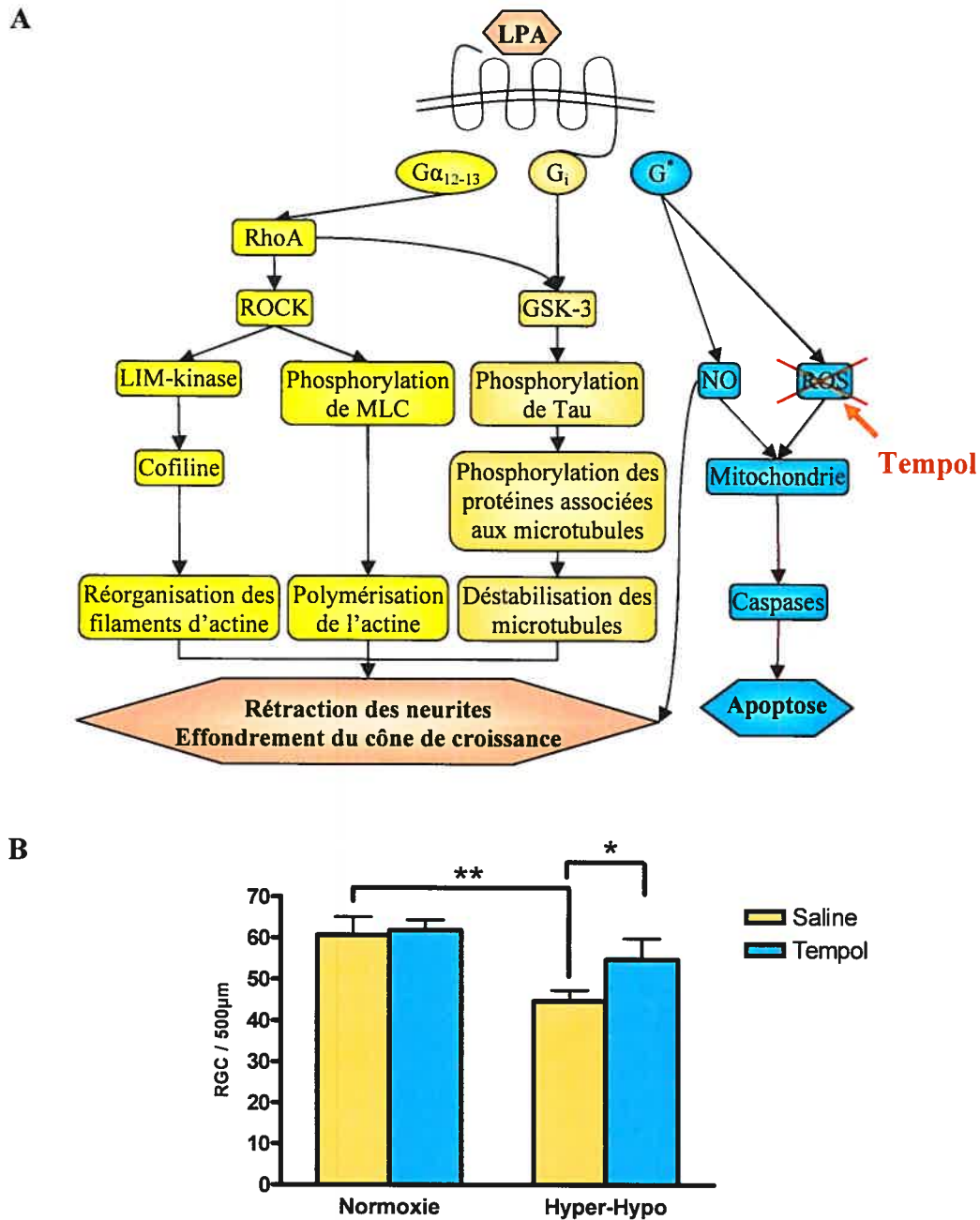


Figure 15 : Effet du Tempol sur la survie des RGC. (A) Schéma représentant les différentes voies de signalisations pouvant être impliquées dans la dégénérescence des RGC par l'intermédiaire du LPA. (B) Effet de l'administration intraoculaire de Tempol chez les animaux exposés en normoxie (21 % O₂) ou aux cycles

d'hyperoxie-hypoxie (45 %-12 % O₂). G* : Protéine G indéterminée. * $P < 0,05$;
** $P < 0,01$.

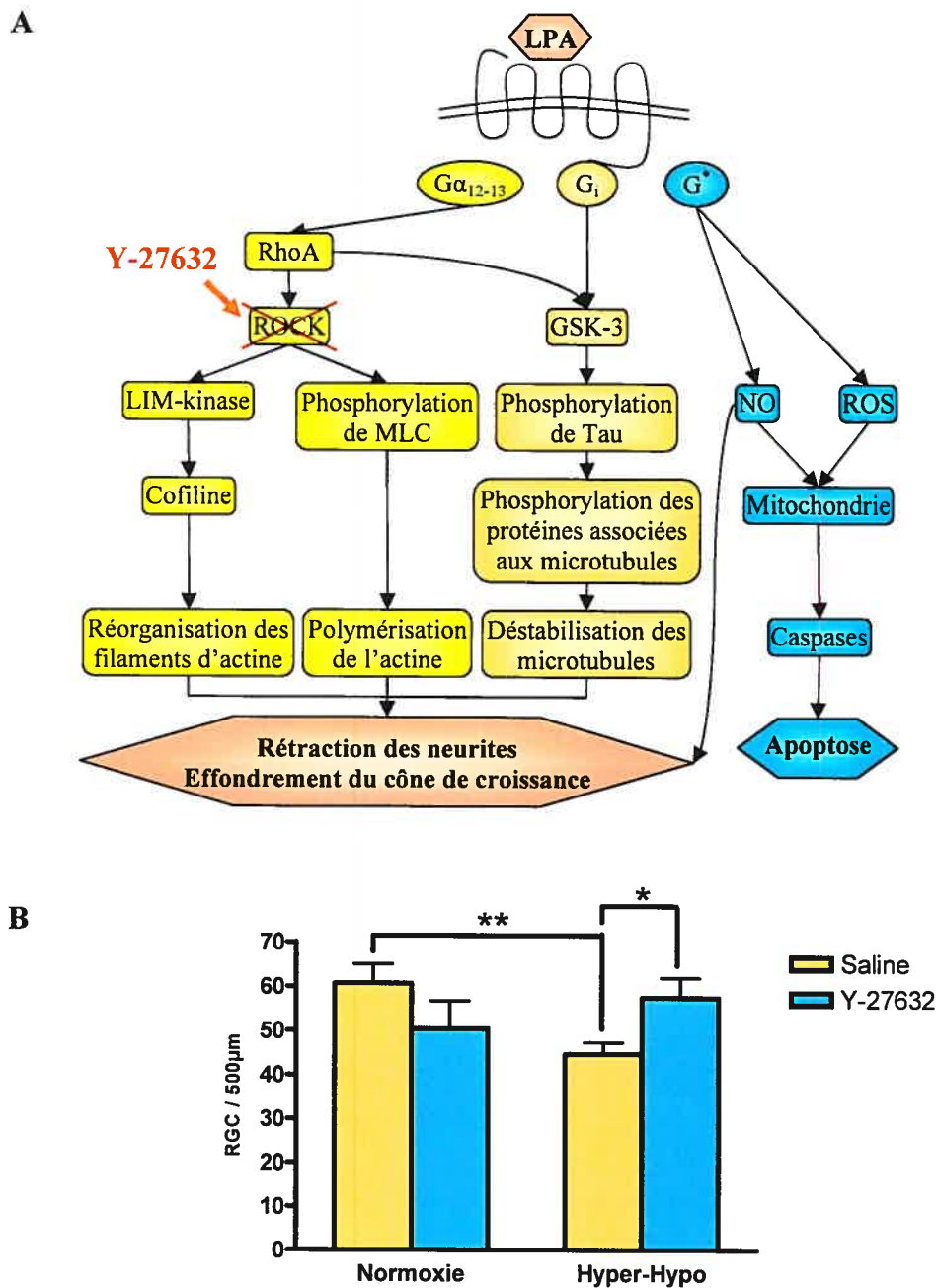


Figure 16 : Effet d'un inhibiteur de Rho-kinase (Y-27632) sur la survie des RGC. (A) Schéma représentant les différentes voies de signalisations pouvant être impliquées dans la dégénérescence des RGC par l'intermédiaire du LPA. (B) Effet de l'administration intraoculaire de Y-27632 chez les animaux exposés en

normoxie (21% O₂) ou aux cycles d'hyperoxie-hypoxie (45 %-12 % O₂).

G* : Protéine G indéterminée. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$.

A

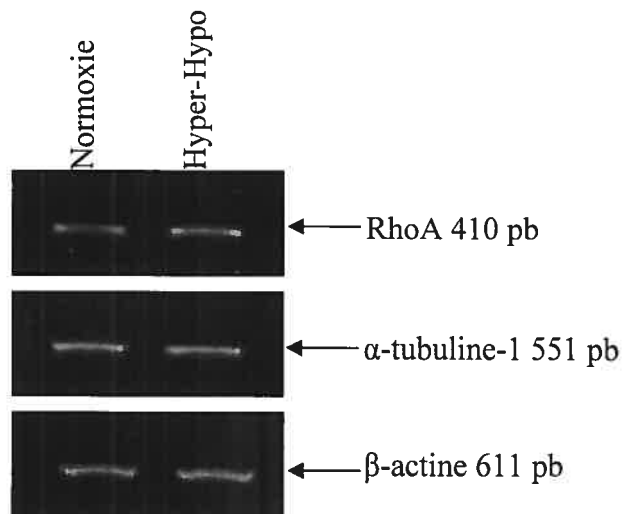


Figure 17 : Expression génique de RhoA et de l' α -tubuline-1. (A) RT-PCR pour la détection de l'ARNm de RhoA et de l' α -tubuline-1 sur des rétines isolées d'animaux contrôles (normoxie; 21 % O₂) et des animaux exposés à un taux variable d'oxygène (hyperoxie-hypoxie; 45 %-12 % O₂). Le niveau d'expression de ces deux gènes a été analysé sur la base de l'expression de la β -actine.

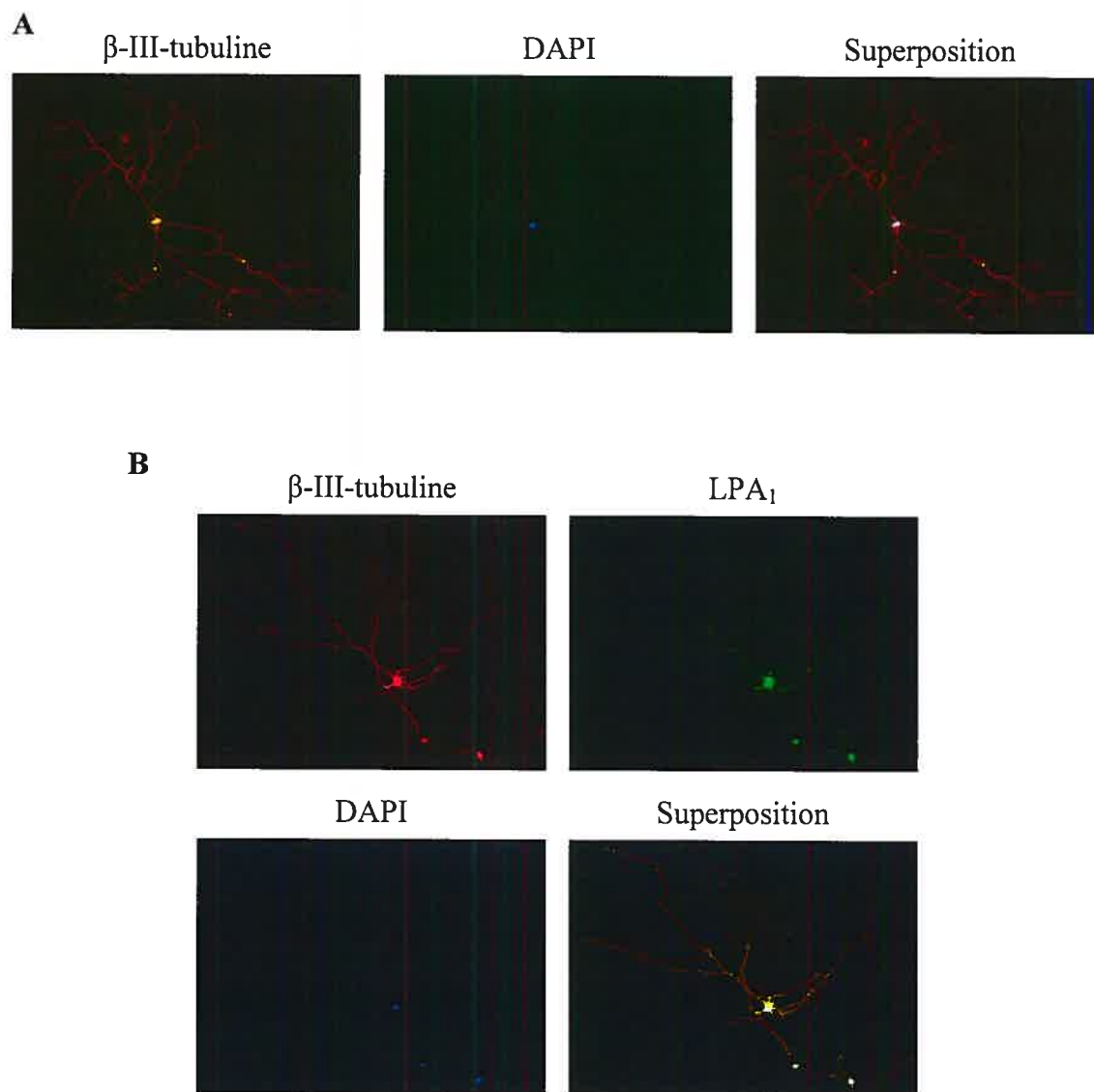


Figure 18 : Culture purifiée de RGC et expression du récepteur LPA₁ sur les RGC purs. (A) Coloration d'une cellule ganglionnaire avec un anticorps anti- β -III-tubuline (rouge) et le DAPI (bleu) pour identifier le noyau de la cellule. (B) Expression du récepteur LPA₁ (vert) sur une cellule ganglionnaire en culture pure.

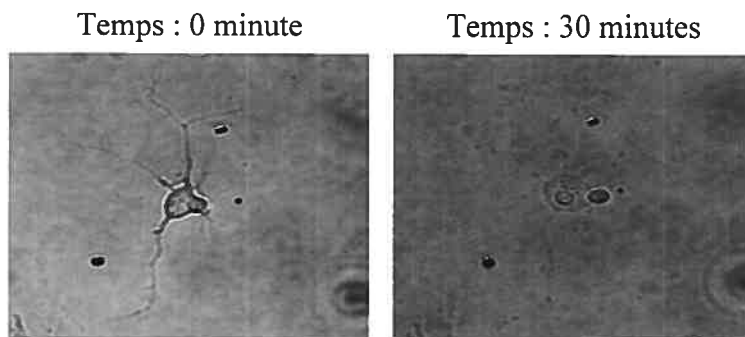
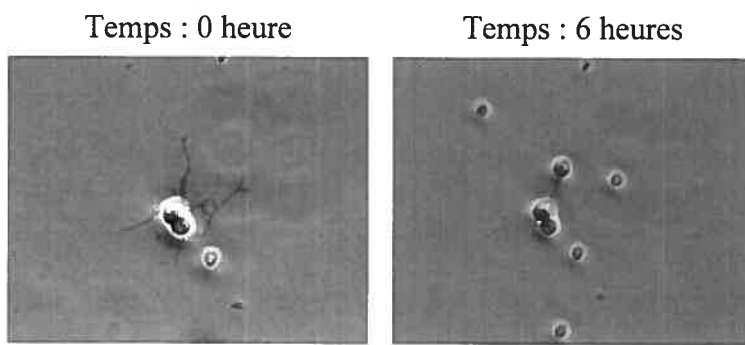
A LPA 1 μ M**B** Hypoxie (2 % O₂)

Figure 19 : Effet du LPA et de l'hypoxie sur les RGC purifiées en culture. **(A)** Rétraction neuronale observée sur des RGC pures suite à 30 minutes d'incubation avec une concentration de 1 μ M de LPA. **(B)** Rétraction neuronale observée sur des RGC pures suite à 6 heures d'incubation en hypoxie (2 % O₂).

VIII. BIBLIOGRAPHIE

Akiyama, H., Nakazawa, T., Shimura, M., Tomita, H., and Tamai, M. (2002) Presence of mitogen-activated protein kinase in retinal Muller cells and its neuroprotective effect ischemia-reperfusion injury. *Neuroreport* **13**, 2103-2107.

Amano, M., Chihara, K., Nakamura, N., Fukata, Y., Yano, T., Shibata, M., Ikebe, M., et Kaibuchi, K. (1998) Myosin II activation promotes neurite retraction during the action of Rho and Rho-kinase. *Genes Cells* **3**, 177-188.

Amano, M., Ito, M., Kimura, K., Fukata, Y., Chihara, K., Nakano, T., Matsuura, Y., et Kaibuchi, K. (1996) Phosphorylation and activation of myosin by Rho-associated kinase (Rho-kinase). *J Biol Chem* **271**, 20246-20249.

Avila, J. (1990) Microtubule dynamics. *FASEB J* **4**, 3284-3290.

Bandoh, K., Aoki, J., Hosono, H., Kobayashi, S., Kobayashi, T., Murakami-Murofushi, K., Tsujimoto, M., Arai, H., et Inoue, K. (1999) Molecular cloning and characterization of a novel human G-protein-coupled receptor, EDG7, for lysophosphatidic acid. *J Biol Chem* **274**, 27776-27785.

Barres, B. A., Silverstein, B. E., Corey, D. P., et Chun, L. L. (1988) Immunological, morphological, and electrophysiological variation among retinal ganglion cells purified by panning. *Neuron* **1**, 791-803.

Beauchamp, M. H., Martinez-Bermudez, A. K., Gobeil, F., Jr., Marrache, A. M., Hou, X., Speranza, G., Abran, D., Quiniou, C., Lachapelle, P., Roberts, J., Almazan, G., Varma, D. R., et Chemtob, S. (2001) Role of thromboxane in retinal microvascular degeneration in oxygen-induced retinopathy. *J Appl Physiol* **90**, 2279-2288.

Becquet, F., Courtois, Y., et Goureau, O. (1997) Nitric oxide in the eye: multifaceted roles and diverse outcomes. *Surv Ophthalmol* **42**, 71-82.

Block, F. et Schwarz, M. (1998) The b-wave of the electroretinogram as an index of retinal ischemia. *Gen Pharmacol* **30**, 281-287.

Block, F. et Schwarz, M. (1997) Effects of antioxidants on ischemic retinal dysfunction. *Exp Eye Res* **64**, 559-564.

Bonne, C., Muller, A., et Villain, M. (1998) Free radicals in retinal ischemia. *Gen Pharmacol* **30**, 275-280.

Boveris, A. et Chance, B. (1973) The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem J* **134**, 707-716.

Brandstatter, J. H., Hartveit, E., Sassoe-Pognetto, M., et Wassle, H. (1994) Expression of NMDA and high-affinity kainate receptor subunit mRNAs in the adult rat retina. *Eur J Neurosci* **6**, 1100-1112.

Bussow, H. (1980) The astrocytes in the retina and optic nerve head of mammals: a special glia for the ganglion cell axons. *Cell Tissue Res* **206**, 367-378.

Campbell, D. S. et Holt, C. E. (2003) Apoptotic pathway and MAPKs differentially regulate chemotropic responses of retinal growth cones. *Neuron* **37**, 939-952.

Campbell, D. S., Regan, A. G., Lopez, J. S., Tannahill, D., Harris, W. A., et Holt, C. E. (2001) Semaphorin 3A elicits stage-dependent collapse, turning, and branching in *Xenopus* retinal growth cones. *J Neurosci* **21**, 8538-8547.

Campbell, K. (1951) Intensive oxygen therapy as a possible cause of retrolental fibroplasia; a clinical approach. *Med J Aust* **2**, 48-50.

Cazevieuille, C. et Osborne, N. N. (1997) Retinal neurones containing kainate receptors are influenced by exogenous kainate and ischaemia while neurones lacking these receptors are not -- melatonin counteracts the effects of ischaemia and kainate. *Brain Res* **755**, 91-100.

Chabre, M. (1985) Trigger and amplification mechanisms in visual phototransduction. *Annu Rev Biophys Biophys Chem* **14**, 331-360.

Chan, P. H. (1996) Role of oxidants in ischemic brain damage. *Stroke* **27**, 1124-1129.

Chan-Ling, T. et Stone, J. (1991) Factors determining the migration of astrocytes into the developing retina: migration does not depend on intact axons or patent vessels. *J Comp Neurol* **303**, 375-386.

Chen, X., Yang, X. Y., Wang, N. D., Ding, C., Yang, Y. J., You, Z. J., Su, Q., et Chen, J. H. (2003) Serum lysophosphatidic acid concentrations measured by dot immunogold filtration assay in patients with acute myocardial infarction. *Scand J Clin Lab Invest* **63**, 497-503.

Cheng, Y., Deshmukh, M., D'Costa, A., Demaro, J. A., Gidday, J. M., Shah, A., Sun, Y., Jacquin, M. F., Johnson, E. M., et Holtzman, D. M. (1998) Caspase inhibitor affords neuroprotection with delayed administration in a rat model of neonatal hypoxic-ischemic brain injury. *J Clin Invest* **101**, 1992-1999.

Cheon, E. W., Park, C. H., Kang, S. S., Cho, G. J., Yoo, J. M., Song, J. K., et Choi, W. S. (2002) Nitric oxide synthase expression in the transient ischemic rat retina: neuroprotection of betaxolol. *Neurosci Lett* **330**, 265-269.

Chun, J., Goetzl, E. J., Hla, T., Igarashi, Y., Lynch, K. R., Moolenaar, W., Pyne, S., et Tigyi, G. (2002) International Union of Pharmacology. XXXIV. Lysophospholipid receptor nomenclature. *Pharmacol Rev* **54**, 265-269.

Contos, J. J., Fukushima, N., Weiner, J. A., Kaushal, D., et Chun, J. (2000a) Requirement for the lpA1 lysophosphatidic acid receptor gene in normal suckling behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 13384-13389.

Contos, J. J., Ishii, I., et Chun, J. (2000b) Lysophosphatidic acid receptors. *Mol Pharmacol* **58**, 1188-1196.

Contos, J. J., Ishii, I., Fukushima, N., Kingsbury, M. A., Ye, X., Kawamura, S., Brown, J. H., et Chun, J. (2002) Characterization of lpa(2) (Edg4) and lpa(1)/lpa(2) (Edg2/Edg4) lysophosphatidic acid receptor knockout mice:

signaling deficits without obvious phenotypic abnormality attributable to *lpa(2)*. *Mol Cell Biol* **22**, 6921-6929.

Craig, A. M. et Banker, G. (1994) Neuronal polarity. *Annu Rev Neurosci* **17**, 267-310.

Daaka, Y. (2002) Mitogenic action of LPA in prostate. *Biochim Biophys Acta* **1582**, 265-269.

Davidson, C. M., Pappas, B. A., Stevens, W. D., Fortin, T., et Bennett, S. A. (2000) Chronic cerebral hypoperfusion: loss of pupillary reflex, visual impairment and retinal neurodegeneration. *Brain Res* **859**, 96-103.

Dawson, J., Hotchin, N., Lax, S., et Rumsby, M. (2003) Lysophosphatidic acid induces process retraction in CG-4 line oligodendrocytes and oligodendrocyte precursor cells but not in differentiated oligodendrocytes. *J Neurochem* **87**, 947-957.

Deiner, M. S., Kennedy, T. E., Fazeli, A., Serafini, T., Tessier-Lavigne, M., et Sretavan, D. W. (1997) Netrin-1 and DCC mediate axon guidance locally at the optic disc: loss of function leads to optic nerve hypoplasia. *Neuron* **19**, 575-589.

Dowling, J. (1987) *The Retina: an Approachable Part of the Brain*. Cambridge, 12-41.

Eichholtz, T., Jalink, K., Fahrenfort, I., et Moolenaar, W. H. (1993) The bioactive phospholipid lysophosphatidic acid is released from activated platelets. *Biochem J* **291 (Pt 3)**, 677-680.

Endres, M., Namura, S., Shimizu-Sasamata, M., Waeber, C., Zhang, L., Gomez-Isla, T., Hyman, B. T., et Moskowitz, M. A. (1998) Attenuation of delayed neuronal death after mild focal ischemia in mice by inhibition of the caspase family. *J Cereb Blood Flow Metab* **18**, 238-247.

Fletcher, E. L., Hack, I., Brandstatter, J. H., et Wassle, H. (2000) Synaptic localization of NMDA receptor subunits in the rat retina. *J Comp Neurol* **420**, 98-112.

Fukushima, N., Ishii, I., Habara, Y., Allen, C. B., et Chun, J. (2002) Dual regulation of actin rearrangement through lysophosphatidic acid receptor in neuroblast cell lines: actin depolymerization by Ca(2+)-alpha-actinin and polymerization by rho. *Mol Biol Cell* **13**, 2692-2705.

Fukushima, N., Kimura, Y., et Chun, J. (1998) A single receptor encoded by vzg-1/lpA1/edg-2 couples to G proteins and mediates multiple cellular responses to lysophosphatidic acid. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 6151-6156.

Gallo, J. E., Holmstrom, G., Kugelberg, U., Hedquist, B., et Lennerstrand, G. (1991) Regressed retinopathy of prematurity and its sequelae in children aged 5-10 years. *Br J Ophthalmol* **75**, 527-531.

Gard, D. L. et Kirschner, M. W. (1985) A polymer-dependent increase in phosphorylation of beta-tubulin accompanies differentiation of a mouse neuroblastoma cell line. *J Cell Biol* **100**, 764-774.

Geyer, O., Almog, J., Lupu-Meiri, M., Lazar, M., et Oron, Y. (1995) Nitric oxide synthase inhibitors protect rat retina against ischemic injury. *FEBS Lett* **374**, 399-402.

Gilgun-Sherki, Y., Rosenbaum, Z., Melamed, E., et Offen, D. (2002) Antioxidant therapy in acute central nervous system injury: current state. *Pharmacol Rev* **54**, 271-284.

Goetzl, E. J. (2001) Pleiotypic mechanisms of cellular responses to biologically active lysophospholipids. *Prostaglandins* **64**, 11-20.

Goto, W., Ota, T., Morikawa, N., Otori, Y., Hara, H., Kawazu, K., Miyawaki, N., et Tano, Y. (2002) Protective effects of timolol against the neuronal damage induced by glutamate and ischemia in the rat retina. *Brain Res* **958**, 10-19.

Guenther, E., Schmid, S., Grantyn, R., et Zrenner, E. (1994) In vitro identification of retinal ganglion cells in culture without the need of dye labeling. *J Neurosci Methods* **51**, 177-181.

Gupta, L. Y. et Marmor, M. F. (1993) Mannitol, dextromethorphan, and catalase minimize ischemic damage to retinal pigment epithelium and retina. *Arch Ophthalmol* **111**, 384-388.

Gwon, J. S., Ju, W. K., Park, S. J., Kim, I. B., Lee, M. Y., Oh, S. J., et Chun, M. H. (2001) The regulatory expression of neuronal nitric oxide synthase in the ischemic rat retina. *Neuroreport* **12**, 3385-3389.

Hara, H., Friedlander, R. M., Gagliardini, V., Ayata, C., Fink, K., Huang, Z., Shimizu-Sasamata, M., Yuan, J., et Moskowitz, M. A. (1997) Inhibition of interleukin 1beta converting enzyme family proteases reduces ischemic and excitotoxic neuronal damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 2007-2012.

He, Y., Yu, W., et Baas, P. W. (2002) Microtubule reconfiguration during axonal retraction induced by nitric oxide. *J Neurosci* **22**, 5982-5991.

Hebbandi, S. B., Bowen, J. R., Hipwell, G. C., Ma, P. J., Leslie, G. I., et Arnold, J. D. (1997) Ocular sequelae in extremely premature infants at 5 years of age. *J Paediatr Child Health* **33**, 339-342.

Hecht, J. H., Weiner, J. A., Post, S. R., et Chun, J. (1996) Ventricular zone gene-1 (vzg-1) encodes a lysophosphatidic acid receptor expressed in neurogenic regions of the developing cerebral cortex. *J Cell Biol* **135**, 1071-1083.

Hindges, R., McLaughlin, T., Genoud, N., Henkemeyer, M., et O'Leary, D. D. (2002) EphB forward signaling controls directional branch extension and arborization required for dorsal-ventral retinotopic mapping. *Neuron* **35**, 475-487.

Hirose, M., Ishizaki, T., Watanabe, N., Uehata, M., Kranenburg, O., Moolenaar, W. H., Matsumura, F., Maekawa, M., Bito, H., et Narumiya, S. (1998) Molecular

dissection of the Rho-associated protein kinase (p160ROCK)-regulated neurite remodeling in neuroblastoma N1E-115 cells. *J Cell Biol* **141**, 1625-1636.

Holtsberg, F. W., Steiner, M. R., Bruce-Keller, A. J., Keller, J. N., Mattson, M. P., Moyers, J. C., et Steiner, S. M. (1998) Lysophosphatidic acid and apoptosis of nerve growth factor-differentiated PC12 cells. *J Neurosci Res* **53**, 685-696.

Hornuss, C., Hammermann, R., Fuhrmann, M., Juergens, U. R., et Racke, K. (2001) Human and rat alveolar macrophages express multiple EDG receptors. *Eur J Pharmacol* **429**, 303-308.

Huber, A. B. et Schwab, M. E. (2000) Nogo-A, a potent inhibitor of neurite outgrowth and regeneration. *Biol Chem* **381**, 407-419.

Ishii, I., Contos, J. J., Fukushima, N., et Chun, J. (2000) Functional comparisons of the lysophosphatidic acid receptors, LP(A1)/VZG-1/EDG-2, LP(A2)/EDG-4, and LP(A3)/EDG-7 in neuronal cell lines using a retrovirus expression system. *Mol Pharmacol* **58**, 895-902.

Ishii, I., Fukushima, N., Ye, X., et Chun, J. (2004) Lysophospholipid receptors: signaling and biology. *Annu Rev Biochem* **73**, 321-354.

Jalink, K., Eichholtz, T., Postma, F. R., van Corven, E. J., et Moolenaar, W. H. (1993) Lysophosphatidic acid induces neuronal shape changes via a novel, receptor-mediated signaling pathway: similarity to thrombin action. *Cell Growth Differ* **4**, 247-255.

Jalink, K., van Corven, E. J., Hengeveld, T., Morii, N., Narumiya, S., et Moolenaar, W. H. (1994) Inhibition of lysophosphatidate- and thrombin-induced neurite retraction and neuronal cell rounding by ADP ribosylation of the small GTP-binding protein Rho. *J Cell Biol* **126**, 801-810.

Jin, R. H., Nam, J. S., Sun, Y., Kim, M. J., Choi, H. K., Han, D. H., Kim, N. H., et Huh, S. O. (2006) Lysophosphatidic acid stimulates cAMP accumulation and

cAMP response element-binding protein phosphorylation in immortalized hippocampal progenitor cells. *Neuroreport* **17**, 523-526.

Karp, G. (1998) Communication entre les cellules et leur environnement. In: *Biologie cellulaire et moléculaire*, pp. 651-668. Ed De Boeck. Paris.

Kaufman, P. L. (2002) Development and structure of the retina. In: *Adler's Physiology of the Eye*, pp. 319-343. Ed I. Mosby. St. Louis.

Kennedy, T. E., Serafini, T., de, I. T., Jr., et Tessier-Lavigne, M. (1994) Netrins are diffusible chemotropic factors for commissural axons in the embryonic spinal cord. *Cell* **78**, 425-435.

Kortuem, K., Geiger, L. K., et Levin, L. A. (2000) Differential susceptibility of retinal ganglion cells to reactive oxygen species. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **41**, 3176-3182.

Kretzer, F. L., McPherson, A. R., et Hittner, H. M. (1986) An interpretation of retinopathy of prematurity in terms of spindle cells: relationship to vitamin E prophylaxis and cryotherapy. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* **224**, 205-214.

Kusaka, S., Kapousta-Bruneau, N., Green, D. G., et Puro, D. G. (1998) Serum-induced changes in the physiology of mammalian retinal glial cells: role of lysophosphatidic acid. *J Physiol* **506 (Pt 2)**, 445-458.

Lafuente, M. P., Villegas-Perez, M. P., Selles-Navarro, I., Mayor-Torroglosa, S., Miralles, d., I, et Vidal-Sanz, M. (2002) Retinal ganglion cell death after acute retinal ischemia is an ongoing process whose severity and duration depends on the duration of the insult. *Neuroscience* **109**, 157-168.

Lagreze, W. A., Knorle, R., Bach, M., et Feuerstein, T. J. (1998) Memantine is neuroprotective in a rat model of pressure-induced retinal ischemia. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **39**, 1063-1066.

Lahaie, I., Hardy, P., Hou, X., Hassessian, H., Asselin, P., Lachapelle, P., Almazan, G., Varma, D. R., Morrow, J. D., Roberts, L. J., et Chemtob, S. (1998) A novel mechanism for vasoconstrictor action of 8-isoprostaglandin F2 alpha on retinal vessels. *Am J Physiol* **274**, R1406-R1416.

Lai, J. M., Lu, C. Y., Yang-Yen, H. F., et Chang, Z. F. (2001) Lysophosphatidic acid promotes phorbol-ester-induced apoptosis in TF-1 cells by interfering with adhesion. *Biochem J* **359**, 227-233.

Lam, T. T., Fu, J., Hrynewycz, M., et Tso, M. O. (1995) The effect of aurintricarboxylic acid, an endonuclease inhibitor, on ischemia/reperfusion damage in rat retina. *J Ocul Pharmacol Ther* **11**, 253-259.

Lam, T. T., Siew, E., Chu, R., et Tso, M. O. (1997) Ameliorative effect of MK-801 on retinal ischemia. *J Ocul Pharmacol Ther* **13**, 129-137.

Lee, C. W., Rivera, R., Gardell, S., Dubin, A. E., et Chun, J. (2006) GPR92 as a new G12/13 and Gq coupled lysophosphatidic acid receptor that increases cAMP: LPA5. *J Biol Chem*.

Levin, L. A., Clark, J. A., et Johns, L. K. (1996) Effect of lipid peroxidation inhibition on retinal ganglion cell death. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **37**, 2744-2749.

Lim, S. S., Sammak, P. J., et Borisy, G. G. (1989) Progressive and spatially differentiated stability of microtubules in developing neuronal cells. *J Cell Biol* **109**, 253-263.

Lin, B., Martin, P. R., et Grunert, U. (2002) Expression and distribution of ionotropic glutamate receptor subunits on parasol ganglion cells in the primate retina. *Vis Neurosci* **19**, 453-465.

Linnik, M. D., Zobrist, R. H., et Hatfield, M. D. (1993) Evidence supporting a role for programmed cell death in focal cerebral ischemia in rats. *Stroke* **24**, 2002-2008.

- Lipton, P. (1999) Ischemic cell death in brain neurons. *Physiol Rev* **79**, 1431-1568.
- Luo, X., Lambrou, G. N., Sahel, J. A., et Hicks, D. (2001) Hypoglycemia induces general neuronal death, whereas hypoxia and glutamate transport blockade lead to selective retinal ganglion cell death in vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **42**, 2695-2705.
- MacManus, J. P. et Linnik, M. D. (1997) Gene expression induced by cerebral ischemia: an apoptotic perspective. *J Cereb Blood Flow Metab* **17**, 815-832.
- Malosio, M. L., Gilardelli, D., Paris, S., Albertinazzi, C., et de, C., I (1997) Differential expression of distinct members of Rho family GTP-binding proteins during neuronal development: identification of Rac1B, a new neural-specific member of the family. *J Neurosci* **17**, 6717-6728.
- Margalit, E. et Sadda, S. R. (2003) Retinal and optic nerve diseases. *Artif Organs* **27**, 963-974.
- Marieb, E. N. (1999) Les sens. In: *Anatomie et physiologie humaine*, pp. 544-565. Ed Éditions du Renouveau Pédagogique Inc. Saint-Laurent.
- Mattson, M. P. et Camandola, S. (2001) NF-kappaB in neuronal plasticity and neurodegenerative disorders. *J Clin Invest* **107**, 247-254.
- Mauco, G., Chap, H., Simon, M. F., et Douste-Blazy, L. (1978) Phosphatidic and lysophosphatidic acid production in phospholipase C-and thrombin-treated platelets. Possible involvement of a platelet lipase. *Biochimie* **60**, 653-661.
- McGiffert, C., Contos, J. J., Friedman, B., et Chun, J. (2002) Embryonic brain expression analysis of lysophospholipid receptor genes suggests roles for s1p(1) in neurogenesis and s1p(1-3) in angiogenesis. *FEBS Lett* **531**, 103-108.
- Mills, G. B., Eder, A., Fang, X., Hasegawa, Y., Mao, M., Lu, Y., Tanyi, J., Tabassam, F. H., Wiener, J., Lapushin, R., Yu, S., Parrott, J. A., Compton, T., Tribley, W., Fishman, D., Stack, M. S., Gaudette, D., Jaffe, R., Furui, T., Aoki, J.,

et Erickson, J. R. (2002) Critical role of lysophospholipids in the pathophysiology, diagnosis, and management of ovarian cancer. *Cancer Treat Res* **107**, 259-283.

Moolenaar, W. H. (1995) Lysophosphatidic acid, a multifunctional phospholipid messenger. *J Biol Chem* **270**, 12949-12952.

Morgan, J., Caprioli, J., et Koseki, Y. (1999) Nitric oxide mediates excitotoxic and anoxic damage in rat retinal ganglion cells cocultured with astroglia. *Arch Ophthalmol* **117**, 1524-1529.

Muller, A., Pietri, S., Villain, M., Frejaville, C., Bonne, C., et Culcas, M. (1997) Free radicals in rabbit retina under ocular hyperpressure and functional consequences. *Exp Eye Res* **64**, 637-643.

Muller, A., Villain, M., Favreau, B., Sandillon, F., Privat, A., et Bonne, C. (1996) Differential effect of ischemia/reperfusion on pigmented and albino rabbit retina. *J Ocul Pharmacol Ther* **12**, 337-342.

Müller, H. (1851) Zur Histologie der Netzhaut. *Z Wiss Zool* **3**, 234-237.

Narumiya, S., Ishizaki, T., et Uehata, M. (2000) Use and properties of ROCK-specific inhibitor Y-27632. *Methods Enzymol* **325**, 273-284.

Neal, M. J., Cunningham, J. R., Hutson, P. H., et Hogg, J. (1994) Effects of ischaemia on neurotransmitter release from the isolated retina. *J Neurochem* **62**, 1025-1033.

Newman, E. A., Frambach, D. A., et Odette, L. L. (1984) Control of extracellular potassium levels by retinal glial cell K⁺ siphoning. *Science* **225**, 1174-1175.

Noguchi, K., Ishii, S., et Shimizu, T. (2003) Identification of p2y9/GPR23 as a novel G protein-coupled receptor for lysophosphatidic acid, structurally distant from the Edg family. *J Biol Chem* **278**, 25600-25606.

Okusa, M. D., Ye, H., Huang, L., Sigismund, L., Macdonald, T., et Lynch, K. R. (2003) Selective blockade of lysophosphatidic acid LPA3 receptors reduces murine renal ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Renal Physiol* **285**, F565-F574.

Ophir, A., Berenshtein, E., Kitrossky, N., Berman, E. R., Photiou, S., Rothman, Z., et Chevion, M. (1993) Hydroxyl radical generation in the cat retina during reperfusion following ischemia. *Exp Eye Res* **57**, 351-357.

Osborne, N. N., Casson, R. J., Wood, J. P., Chidlow, G., Graham, M., et Melena, J. (2004) Retinal ischemia: mechanisms of damage and potential therapeutic strategies. *Prog Retin Eye Res* **23**, 91-147.

Osborne, N. N. et Herrera, A. J. (1994) The effect of experimental ischaemia and excitatory amino acid agonists on the GABA and serotonin immunoreactivities in the rabbit retina. *Neuroscience* **59**, 1071-1081.

Osborne, N. N., Schwarz, M., et Pergande, G. (1996) Protection of rabbit retina from ischemic injury by flupirtine. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **37**, 274-280.

Osborne, N. N., Ugarte, M., Chao, M., Chidlow, G., Bae, J. H., Wood, J. P., et Nash, M. S. (1999) Neuroprotection in relation to retinal ischemia and relevance to glaucoma. *Surv Ophthalmol* **43 Suppl 1**, S102-S128.

Otori, Y., Wei, J. Y., et Barnstable, C. J. (1998) Neurotoxic effects of low doses of glutamate on purified rat retinal ganglion cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **39**, 972-981.

Pages, C., Simon, M. F., Valet, P., et Saulnier-Blache, J. S. (2001) Lysophosphatidic acid synthesis and release. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **64**, 1-10.

Panetti, T. S., Magnusson, M. K., Peyruchaud, O., Zhang, Q., Cooke, M. E., Sakai, T., et Mosher, D. F. (2001) Modulation of cell interactions with extracellular

matrix by lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate. *Prostaglandins* **64**, 93-106.

Patz, A. (1957) The role of oxygen in retrolental fibroplasia. *Sinai Hosp J (Balt)* **6**, 3-22.

Peachey, N. S., Green, D. J., et Ripps, H. (1993) Ocular ischemia and the effects of allopurinol on functional recovery in the retina of the arterially perfused cat eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **34**, 58-65.

Pereira-Neves, L. et Ribeiro-da-Silva, J. (1992) Electrophysiology in pseudohistoplasmosis and chronic idiopathic retinal vasculitis. *Eur J Ophthalmol* **2**, 179-189.

Plump, A. S., Erskine, L., Sabatier, C., Brose, K., Epstein, C. J., Goodman, C. S., Mason, C. A., et Tessier-Lavigne, M. (2002) Slit1 and Slit2 cooperate to prevent premature midline crossing of retinal axons in the mouse visual system. *Neuron* **33**, 219-232.

Radomski, M. W., Palmer, R. M., et Moncada, S. (1990) An L-arginine/nitric oxide pathway present in human platelets regulates aggregation. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**, 5193-5197.

Rao, N. A. et Wu, G. S. (1996) Oxygen free radicals and retinopathy of prematurity. *Br J Ophthalmol* **80**, 387.

Reddan, J. R., Sevilla, M. D., Giblin, F. J., Padgaonkar, V., Dziedzic, D. C., Leverenz, V., Misra, I. C., et Peters, J. L. (1993) The superoxide dismutase mimic TEMPOL protects cultured rabbit lens epithelial cells from hydrogen peroxide insult. *Exp Eye Res* **56**, 543-554.

Ricci, B. (1990) Oxygen-induced retinopathy in the rat model. *Doc Ophthalmol* **74**, 171-177.

Ricci, B., Lepore, D., Zonghi, E., et Calogero, G. (1990) Oxygen-induced retinopathy in the newborn rat: a scoring system for the evaluation of retinal vascular changes. Scoring system for OIR in the rat. *Doc Ophthalmol* **76**, 241-249.

Rodieck, R. W. (1998) *La vision*. Paris, 37-273.

Rossi, D. J., Oshima, T., et Attwell, D. (2000) Glutamate release in severe brain ischaemia is mainly by reversed uptake. *Nature* **403**, 316-321.

Roth, A. M. (1977) Retinal vascular development in premature infants. *Am J Ophthalmol* **84**, 636-640.

Ryan, S. (2001) *Retina*. St. Louis, 1472-1480.

Saba, J. D. (2004) Lysophospholipids in development: Miles apart and edging in. *J Cell Biochem* **92**, 967-992.

Saint-Geniez, M. et D'Amore, P. A. (2004) Development and pathology of the hyaloid, choroidal and retinal vasculature. *Int J Dev Biol* **48**, 1045-1058.

Sale, W. S., Besharse, J. C., et Piperno, G. (1988) Distribution of acetylated alpha-tubulin in retina and in vitro-assembled microtubules. *Cell Motil Cytoskeleton* **9**, 243-253.

Saulnier-Blache, J. S. (2004) [Lysophosphatidic acid: a "bioactive" phospholipid]. *Med Sci (Paris)* **20**, 799-803.

Sayas, C. L., Moreno-Flores, M. T., Avila, J., et Wandosell, F. (1999) The neurite retraction induced by lysophosphatidic acid increases Alzheimer's disease-like Tau phosphorylation. *J Biol Chem* **274**, 37046-37052.

Schielke, G. P., Yang, G. Y., Shivers, B. D., et Betz, A. L. (1998) Reduced ischemic brain injury in interleukin-1 beta converting enzyme-deficient mice. *J Cereb Blood Flow Metab* **18**, 180-185.

Schmidt, A. et Hall, A. (2002) Guanine nucleotide exchange factors for Rho GTPases: turning on the switch. *Genes Dev* **16**, 1587-1609.

Schmidt, M., Giessel, A., Laufs, T., Hankeln, T., Wolfrum, U., et Burmester, T. (2003) How does the eye breathe? Evidence for neuroglobin-mediated oxygen supply in the mammalian retina. *J Biol Chem* **278**, 1932-1935.

Seaber, J. H., Machemer, R., Elliott, D., Buckley, E. G., deJuan, E., et Martin, D. F. (1995) Long-term visual results of children after initially successful vitrectomy for stage V retinopathy of prematurity. *Ophthalmology* **102**, 199-204.

Sethi, S., Singh, M. P., et Dikshit, M. (2000) Mechanisms involved in the augmentation of arachidonic acid-induced free-radical generation from rat neutrophils following hypoxia-reoxygenation. *Thromb Res* **98**, 445-450.

Shen, Y. J., DeBellard, M. E., Salzer, J. L., Roder, J., et Filbin, M. T. (1998) Myelin-associated glycoprotein in myelin and expressed by Schwann cells inhibits axonal regeneration and branching. *Mol Cell Neurosci* **12**, 79-91.

Simon, M. F., Rey, A., Castan-Laurel, I., Gres, S., Sibrac, D., Valet, P., et Saulnier-Blache, J. S. (2002) Expression of ectolipid phosphate phosphohydrolases in 3T3F442A preadipocytes and adipocytes. Involvement in the control of lysophosphatidic acid production. *J Biol Chem* **277**, 23131-23136.

Sterling, P. (1995) Vision. Tuning retinal circuits. *Nature* **377**, 676-677.

Stevens, W. D., Fortin, T., et Pappas, B. A. (2002) Retinal and optic nerve degeneration after chronic carotid ligation: time course and role of light exposure. *Stroke* **33**, 1107-1112.

Strettoi, E. et Masland, R. H. (1996) The number of unidentified amacrine cells in the mammalian retina. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**, 14906-14911.

Sun, Y., Wu, Q., Yao, C., Huang, S., Tang, Z., Li, Z., Bao, H., Li, S., et Zhou, W. (2002) [Level of plasma lysophosphatidic acid in patients with cerebral ischemic attack, a preliminary study]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* **82**, 229-231.

Suter, D. M. et Forscher, P. (1998) An emerging link between cytoskeletal dynamics and cell adhesion molecules in growth cone guidance. *Curr Opin Neurobiol* **8**, 106-116.

Szabo, M. E., Droy-Lefaix, M. T., Doly, M., et Braquet, P. (1991) Free radical-mediated effects in reperfusion injury: a histologic study with superoxide dismutase and EGB 761 in rat retina. *Ophthalmic Res* **23**, 225-234.

Terry, T. L. (1942) Extreme prematurity and fibroblastic overgrowth of persistent vascular sheath behind each crystalline lens. *American Journal of Ophthalmology* **25**, 203-204.

Tezel, G. et Wax, M. B. (2000) 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* **20**, 8693-8700.

Thoreson, W. B., Ryan, J. S., Shi, C., Kelly, M. E., Bryson, E. J., Toews, M. L., Ediger, T. L., et Chacko, D. M. (2002) Lysophosphatidic acid receptor signaling in mammalian retinal pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **43**, 2450-2461.

Tigyi, G., Fischer, D. J., Sebok, A., Marshall, F., Dyer, D. L., et Miledi, R. (1996a) Lysophosphatidic acid-induced neurite retraction in PC12 cells: neurite-protective effects of cyclic AMP signaling. *J Neurochem* **66**, 549-558.

Tigyi, G., Fischer, D. J., Sebok, A., Yang, C., Dyer, D. L., et Miledi, R. (1996b) Lysophosphatidic acid-induced neurite retraction in PC12 cells: control by phosphoinositide-Ca²⁺ signaling and Rho. *J Neurochem* **66**, 537-548.

Tokumura, A., Fukuzawa, K., Akamatsu, Y., Yamada, S., Suzuki, T., et Tsukatani, H. (1978) Identification of vasopressor phospholipid in crude soybean lecithin. *Lipids* **13**, 468-472.

Tokumura, A., Yube, N., Fujimoto, H., et Tsukatani, H. (1991) Lysophosphatidic acids induce contraction of rat isolated colon by two different mechanisms. *J Pharm Pharmacol* **43**, 774-778.

Tortora, G. J. (2001) Les sens. In: *Principes d'anatomie et de physiologie*, pp. 542-556. Ed Éditions du Renouveau Pédagogique Inc. Saint-Laurent.

Tsukahara, Y., Blair, N. P., Eappen, D. C., Moy, J. J., Takahashi, A., Shah, G. K., et Viana, M. A. (1992) Ketamine suppresses ischemic injury in the rabbit retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **33**, 1822-1825.

Tytell, M., Brady, S. T., et Lasek, R. J. (1984) Axonal transport of a subclass of tau proteins: evidence for the regional differentiation of microtubules in neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**, 1570-1574.

Uehata, M., Ishizaki, T., Satoh, H., Ono, T., Kawahara, T., Morishita, T., Tamakawa, H., Yamagami, K., Inui, J., Maekawa, M., et Narumiya, S. (1997) Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a Rho-associated protein kinase in hypertension. *Nature* **389**, 990-994.

van Corven, E. J., Groenink, A., Jalink, K., Eichholtz, T., et Moolenaar, W. H. (1989) Lysophosphatidate-induced cell proliferation: identification and dissection of signaling pathways mediated by G proteins. *Cell* **59**, 45-54.

van der Bend, R. L., Brunner, J., Jalink, K., van Corven, E. J., Moolenaar, W. H., et van Blitterswijk, W. J. (1992) Identification of a putative membrane receptor for the bioactive phospholipid, lysophosphatidic acid. *EMBO J* **11**, 2495-2501.

Van Leeuwen, F. N., Olivo, C., Grivell, S., Giepmans, B. N., Collard, J. G., et Moolenaar, W. H. (2003) Rac activation by lysophosphatidic acid LPA1 receptors through the guanine nucleotide exchange factor Tiam1. *J Biol Chem* **278**, 400-406.

van Nieuw Amerongen, G. P., Vermeer, M. A., et van, H., V (2000) Role of RhoA and Rho kinase in lysophosphatidic acid-induced endothelial barrier dysfunction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **20**, E127-E133.

Vogt, W. (1963) Pharmacologically active acidic phospholipids and glycolipids. *Biochem Pharmacol* **12**, 415-420.

Vorwerk, C. K., Lipton, S. A., Zurakowski, D., Hyman, B. T., Sabel, B. A., et Dreyer, E. B. (1996) Chronic low-dose glutamate is toxic to retinal ganglion cells. Toxicity blocked by memantine. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **37**, 1618-1624.

Weiner, J. A. et Chun, J. (1999) Schwann cell survival mediated by the signaling phospholipid lysophosphatidic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 5233-5238.

Weiner, J. A., Fukushima, N., Contos, J. J., Scherer, S. S., et Chun, J. (2001) Regulation of Schwann cell morphology and adhesion by receptor-mediated lysophosphatidic acid signaling. *J Neurosci* **21**, 7069-7078.

Weiner, J. A., Hecht, J. H., et Chun, J. (1998) Lysophosphatidic acid receptor gene *vzg-1/lpA1/edg-2* is expressed by mature oligodendrocytes during myelination in the postnatal murine brain. *J Comp Neurol* **398**, 587-598.

Werdich, X. Q., McCollum, G. W., Rajaratnam, V. S., et Penn, J. S. (2004) Variable oxygen and retinal VEGF levels: correlation with incidence and severity of pathology in a rat model of oxygen-induced retinopathy. *Exp Eye Res* **79**, 623-630.

Wiche, G., Briones, E., Hirt, H., Krepler, R., Artlieb, U., et Denk, H. (1983) Differential distribution of microtubule-associated proteins MAP-1 and MAP-2 in neurons of rat brain and association of MAP-1 with microtubules of neuroblastoma cells (clone N2A). *EMBO J* **2**, 1915-1920.

Wilkinson, D. G. (2001) Multiple roles of EPH receptors and ephrins in neural development. *Nat Rev Neurosci* **2**, 155-164.

Wolf, N., Regan, C. L., et Fuller, M. T. (1988) Temporal and spatial pattern of differences in microtubule behaviour during *Drosophila* embryogenesis revealed by distribution of a tubulin isoform. *Development* **102**, 311-324.

Wood, J. P., DeSantis, L., Chao, H. M., et Osborne, N. N. (2001) Topically applied betaxolol attenuates ischaemia-induced effects to the rat retina and stimulates BDNF mRNA. *Exp Eye Res* **72**, 79-86.

Yamasaki, M., Mishima, H. K., Yamashita, H., Kashiwagi, K., Murata, K., Minamoto, A., et Inaba, T. (2005) Neuroprotective effects of erythropoietin on glutamate and nitric oxide toxicity in primary cultured retinal ganglion cells. *Brain Res* **1050**, 15-26.

Yoon, Y. H. et Marmor, M. F. (1989) Dextromethorphan protects retina against ischemic injury in vivo. *Arch Ophthalmol* **107**, 409-411.

Zhang, H. Y., Shirasawa, Y., Chen, X., Yu, H., et Benoit, J. N. (2005) Impaired agonist-dependent myosin phosphorylation and decreased RhoA in rat portal hypertensive mesenteric vasculature. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **288**, G603-G608.

Zhang, W., Ito, Y., Berlin, E., Roberts, R., et Berkowitz, B. A. (2003) Role of hypoxia during normal retinal vessel development and in experimental retinopathy of prematurity. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **44**, 3119-3123.