

Université de Montréal

Caractérisation du jeûne intermittent dans un modèle de néovascularisation choroïdienne chez
la souris

Par

Marie-Lou Faquette

Unité académique Biochimie et médecine moléculaire, Faculté de Médecine

Mémoire présenté(e) en vue de l'obtention du grade de Maîtrise

en Biochimie option général

novembre 2022

© Marie-Lou Faquette 2022

Université de Montréal

Unité académique : Biochimie Faculté de médecine

Ce mémoire intitulé(e)

**Caractérisation du jeûne intermittent dans un modèle de néovascularisation choroïdienne
chez la souris**

Présenté par

Marie-Lou Faquette

A été évalué(e) par un jury composé des personnes suivantes

Luis Rokeach

Président-rapporteur

Mike Sapiha

Directeur de recherche

Bruno Larrivée

Codirecteur

Niina Kleiber

Membre du jury

Résumé

La dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) est une des premières causes de cécité pour les personnes âgées de plus de 50 ans. Elle existe sous deux formes : sèche et humide. La forme causant les pertes de vision les plus sévères et rapides est DMLA humide où des nouveaux vaisseaux sanguins anormaux se forment dans la rétine; ce processus est appelé la néovascularisation choroïdienne. Celui-ci est causé par la dégradation des différentes membranes de la rétine et de l'augmentation du VEGF stimulant la croissance de ces vaisseaux. L'obésité, l'hypertension, le diabète et la cigarette sont connus pour être des facteurs modifiables et fortement corrélés avec la maladie. Avec l'arrivée des nombreuses diètes tendances, le jeûne intermittent pourrait être une intervention non-pharmacologique impactant l'obésité, l'hypertension et le diabète. En effet, cette diète est reconnue pour améliorer la santé, améliore la sensibilité à l'insuline et la tolérance glucose, diminuer le cholestérol sanguin et exercerait un effet bénéfique sur l'obésité.

Ce mémoire a été entrepris dans le but d'évaluer les avantages potentiels du cycle de diète, soit le jeûne intermittent, sur la néovascularisation choroïdienne dans un modèle de DMLA. Nous avons émis l'hypothèse que le jeûne intermittent permet la diminution de la néovascularisation choroïdienne. Nos résultats montrent que les souris sous le régime jeûne intermittent que nous avons utilisé, c'est-à-dire 2 jours d'alimentation pour 1 jour de jeûne, ne perdent pas de poids, et suivent le même schéma de prise de poids que les souris nourries à volonté. De plus, les souris sous jeûne intermittent n'ont pas d'avantage métabolique que ce soit au niveau du glucose et, encore, moins au niveau de l'insuline. Les résultats ne permettent pas de montrer une différence au niveau de la néovascularisation choroïdienne induit par notre modèle. Le modèle de jeûne intermittent choisit ne permet pas d'obtenir des avantages au niveau de la néovascularisation choroïdienne ni pour la sensibilité au glucose et à l'insuline

Mots-clés: DMLA, Néovascularisation choroïdienne, jeûne intermittent, diète, choroïde, membrane de Bruch, épithélium pigmentaire rétinien, modèle murin

Abstract

Age-related macular degeneration (AMD) is one of the most prominent causes of blindness for people over 50 years old. It exists in two forms: dry and wet. The form causing majority of loss of sight is caused by wet AMD from where new abnormal blood vessels form in retina. This process is called choroidal neovascularization. This is caused by degeneration of outer portion of the retina and an increase in VEGF that instigate the growth of the new blood vessels. Obesity, hypertension, diabetes and smoking are known to be modifiable factors and strongly correlated with the disease. The advent of a vast number of trendy diets has introduced the possibility of modulating chronic disease by modifying eating habits. As an example, intermittent fasting can impacting obesity, hypertension, and diabetes. Indeed, this diet has been known to improve health, increase sensitivity of insulin and glucose, lower cholesterol and to have beneficial effect in obesity.

The purpose of the research in my master's thesis is to evaluate the influence of diet cycle, intermittent fasting on choroidal neovascularization in a mouse model of AMD. We hypothesized that the intermittent fasting could be diminish the choroidal neovascularization. There are several experimental paradigms that reproduce intermittent fasting. We selected the intermittent fasting 2 days of eating for one day of fasting (IF 2:1). Our results show that mice on our selected intermittent fasting regimen did not lose weight and follow the same pattern of weight gain as the mice that fed ad libitum. Furthermore, the mice on this intermittent fasting diet paradigm didn't have metabolic benefits on glucose or insulin tolerance. Our results also did not show any differences in choroidal neovascularization. Hence, the 2:1 paradigm of intermittent fasting didn't show any benefits on choroidal neovascularization, nor glucose and insulin.

Keywords: AMD, Choroidal neovascularization, Intermittent fasting, Diet, Choroid, Bruch membrane, retinal pigment epithelium, mouse model

Table des matières

RÉSUMÉ.....	5
ABSTRACT.....	7
TABLE DES MATIÈRES.....	9
LISTE DES TABLEAUX.....	11
LISTE DES FIGURES.....	13
LISTE DES ÉQUATIONS.....	15
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATION.....	17
REMERCIEMENTS.....	21
CHAPITRE 1 – INTRODUCTION.....	23
1.1 STRUCTURE DE L'ŒIL.....	23
1.1.1 <i>La rétine</i>	24
1.1.2 <i>Espace sous-rétinien</i>	30
1.2 LA DÉGÉNÉRESCENCE MACULAIRE LIÉE À L'ÂGE.....	35
1.2.1 <i>Atrophie géographique</i>	37
1.2.2 <i>DMLA Néovasculaire</i>	38
1.2.3 <i>Facteurs de risque</i>	41
1.2.4 <i>Préventions</i>	44
1.2.5 <i>Traitements actuels</i>	45
1.3 MODÈLE DE NÉOVASCULARISATION CHOROÏDIENNE.....	48
1.3.1 <i>Évolution de l'induction des néovaisseaux sanguins</i>	48
1.3.2 <i>Modèle génétiquement modifié de la DMLA</i>	49
1.3.3 <i>Limites du modèle murin</i>	50
1.4 LE JEÛNE INTERMITTENT.....	52
1.4.1 <i>Restriction Calorique</i>	52
1.4.2 <i>L'alimentation à durée limitée dans le temps</i>	56
1.4.3 <i>Lien obésité, inflammation et cicatrisation</i>	57
1.4.4 <i>Jeûne intermittent</i>	59
CHAPITRE 2 – HYPOTHÈSE DE RECHERCHE.....	65
CHAPITRE 3 – MATÉRIELS ET MÉTHODES.....	67

3.1 MODÈLE DE JEÛNE INTERMITTENT 2 :1	67
3.2 EXPÉRIENCE CYCLE DE NOURRITURE	71
3.2.1 <i>Expérience alimentation sur cycle complet</i>	72
3.2.2 <i>Expérience alimentation sur 6h</i>	73
3.3 MODÈLE DE NÉOVASCULARISATION CHOROÏDIENNE	74
3.4 PERFUSION ET MARQUAGE.....	76
3.5 TEST DE TOLÉRANCE À L'INSULINE (ITT).....	78
3.6 TEST DE TOLÉRANCE AU GLUCOSE (GTT)	79
3.7 ANALYSES STATISTIQUES.....	80
CHAPITRE 4 –RÉSULTATS.....	81
4.1 COURBE DE POIDS	81
4.2 POIDS DES TISSUS ADIPEUX ÉPIDIDYMAIRES	83
4.3 CONSOMMATION DE NOURRITURE	85
4.3.1 <i>Expérience sur le cycle complet</i>	85
4.3.2 <i>Expérience sur 6 heures</i>	87
4.4 TEST DE TOLÉRANCE À L'INSULINE (ITT).....	88
4.5 TEST DE TOLÉRANCE AU GLUCOSE	90
4.6 NÉOVASCULARISATION.....	91
CHAPITRE 5 – DISCUSSION	95
5.1 PHÉNOTYPE	95
5.2 NÉOVASCULARISATION.....	100
CHAPITRE 6 – CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	103
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	105

Liste des tableaux

TABLEAU I RÉCAPITULATIF DES MODÈLES D'ALIMENTATION	61
TABLEAU II COMPOSITION DES DIÈTES UTILISÉES DANS LE PROTOCOLE D'ALIMENTATION	67
TABLEAU III. DÉFINITION DES UNITÉS UTILISÉES DANS LE CALCUL DE CLINICALC POUR LA TAILLE DE L'ÉCHANTILLON	71
TABLEAU IV. DOSAGE D'ANESTHÉSANT KÉTAMINE/XYLAZINE UTILISÉ PAR TRANCHE DE POIDS DE LA SOURIS	75

Liste des figures

FIGURE 1. STRUCTURE DE L'ŒIL.....	24
FIGURE 2. LA PHOTOTRANSDUCTION DES BÂTONNETS	25
FIGURE 3. CHEMIN VISUEL DES PHOTONS JUSQU'AU THALAMUS.....	27
FIGURE 4. STRUCTURE DES COUCHES DE LA RÉTINE.....	28
FIGURE 5. LÉSION DE LA DMLA ATROPHIE GÉOGRAPHIQUE.....	38
FIGURE 6. PATHOGÉNÈSE DE LA DÉGÉNÉRESCENCE MACULAIRE LIÉE À L'ÂGE DE TYPE NÉOVASCULAIRE.....	40
FIGURE 7. MODÉLISATION DES CYCLES DE NOURRITURE	68
FIGURE 8. SCHÉMA DU PROTOCOLE ENTIER J21 (INCLUSION AU PROTOCOLE) AU J83 (SACRIFICE)	69
FIGURE 9. EXPÉRIENCE DE L'HABITUDE ALIMENTAIRE CHEZ LES SOURIS AL VS IF SUR UN CYCLE COMPLET (72H)	73
FIGURE 10. CYCLE DE L'ALIMENTATION DES SOURIS SOUS LE RÉGIME IF	74
FIGURE 11 VUE DE LA PRÉPARATION DE LA RÉTINE LORS DE LA BRÛLURE AU LASER.....	76
FIGURE 12 ILLUSTRATION DU MARQUAGE DES CHOROÏDES AVEC LES ANTICORPS.	78
FIGURE 13. SUIVI DU POIDS À TRAVERS LE TEMPS DES GROUPES DE SOURIS	82
FIGURE 14. LE POIDS ET LA DISTRIBUTION DES TISSUS ADIPEUX ÉPIDIDYMAIRES.....	84
FIGURE 15. LES HABITUDES DE CONSOMMATION DES SOURIS POUR LES DIFFÉRENTS TYPES DE RÉGIME.	86
FIGURE 16. LA CONSOMMATION DE NOURRITURE DES SOURIS DURANT 6H APRÈS UNE NUIT DE JEÛNE DE 16H	88
FIGURE 17. LE TEST DE TOLÉRANCE À L'INSULINE.	89
FIGURE 18. LE TEST DE TOLÉRANCE AU GLUCOSE.....	91
FIGURE 19. EFFET DES DIÈTES SUR LA NÉOVASCULARISATION CHOROÏDIENNE (CNV)	92
FIGURE 20. LA QUANTIFICATION DE LA NÉOVASCULARISATION CHOROÏDIENNE DES DIFFÉRENTES DIÈTES	93

Liste des équations

ÉQUATION 1. CALCUL DE TAILLE DE L'ÉCHANTILLON.....	70
--	----

Liste des sigles et abréviations

ABCA1: ATP-binding cassette A1

ABCR/STGD1/ABCA4: ATP-binding cassette sub-family A, member 4

ADIPOR1: Adiponectin receptor 1

ADN : Acide désoxyribonucléique

AE-2: bis-rétinoïde pyridinium

AL: Ad libitum

AMD: age-related macular degeneration

AMPA: α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid glutamate récepteur

AMPK: AMP-activated protein kinase

APOE2: Apolipoprotéine E2

AQP1: Aquaporine 1

AREDS: Age-related eye disease studies

ARMS2: Age-related maculopathy susceptibility 2

ARNm: Acide ribonucléique messenger

ATP: Adénosine triphosphate

BDNF: Brain-derived neurotrophic factor

BMAL1/ARNTL: Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like protein-1

Ccl2: Chemokine ligand 2

Ccr2: C-C chemokine receptor type 2

CD200: Cluster of differentiation 200

CETP: Cholesterylester transfer protein

CFH: Complement factor gene

cGMP: Cyclic guanosine monophosphate

CLOCK: Circadian locomotor output cycles kaput

CMH-I et II: Complexe majeur d'histocompatibilité de classe I et II

CNE: Couche nucléaire externe

CNI: Couche nucléaire interne

CNV: Choroidal neovascularization

CREB: C-AMP response element binding protein

CX3CL1: C-X3-C motif chemokine ligand 1

DMLA: Dégénérescence maculaire lié à l'âge

EPR: Épithélium pigmentaire rétinien

FDA: Food and drug administration

FGF: Fibroblast growth factors

FGF2: Fibroblast growth factor 2

FGF21: Fibroblast growth factor 21

FITC-dextran: Fluorescein isothiocyanate-dextran

Flt1: Vascular endothelial growth factor receptor 1

Fzd4: Frizzled-4

GABA: Acide γ –aminobutyrique

GSK3 β : Glycogen synthase kinase 3 beta

GTT: Glucose tolerance test

HFD: High fat diet

HRTA1: Hight temperature requirement factor A1

IBA-1: Facteur inflammatoire d'allogreffe 1

ICL: Couche interne de collagène

IF: Intermittent fasting

IFN- β : Interféron Bêta

IGF1: Insulin-like growth factor 1

IL-10: Interleukine 10

IL-11: Interleukine 11

IL-1 β : Interleukine 1 bêta

IL-2: Interleukine 2

IL-6: Interleukine 6

IMC: Indice de masse corporelle

iNOS: Oxyde nitrique synthase

ITT: Insulin tolerance test

KDR: Kinase insert domain receptor

LIPC: Lipase C hepatic type

LRP5 : Low density lipoprotein receptor-related protein 5

mGlu6: Metabotropic glutamate receptor 6

mTOR: Mechanistic target of rapamycin

NAMPT: Nicotinamide phosphoribosyltransferase

NK: Cellule natural killer

OCT: Optical coherence tomography

PAMP: Pathogen-associated molecular pattern

PBS: Tampon phosphate salin

PDGF: Platelet derived growth factor

PDGFA: Platelet derived growth factor subunit A

PDGFR α : Platelet derived growth factor receptor alpha

PDT : Traitement photodynamique

PEDF: Pigment epithelium-derived factor

PFA: Paraformaldehyde

PGC-1 α : Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha

PPAR γ : Peroxisome proliferator-activated receptor gamma

qPCR: Quantitative polymerase chain reaction

RC: Restriction calorique

RD: Regular diet

RPE: Retinal pigment epithelium

SIRT1: Sirtuine 1/NAD-dependent deacetylase sirtuin-1

Sod1: Superoxide dismutase type 1

TGF β : Transforming growth factor beta

TIMP-3: Tissue inhibitor of metalloproteinase 3

TNF: Tumor necrosis factor

TRF: Time restricted feeding

TSP1: Thrombospondine 1

VEGF: Vascular endothelial growth factor

Wnt: "wingless" pathway

Wnt7b: Wnt family member

Remerciements

Le temps que j'ai passé à l'Université de Montréal m'a fait découvrir et redécouvrir un bon nombre de passions. Mon parcours sinueux m'a appris à ne jamais abandonner. Celui-ci a permis aussi de rencontrer plusieurs personnes qui ont cru souvent plus que moi en mes capacités lorsque je baissais les bras. Aujourd'hui, je ne peux que souligner leurs encouragements ! J'aimerais particulièrement remercier, l'une de mes amies, qui n'a jamais hésité à passer des nuits blanches pour passer à travers mes huit ans d'étude à l'UdeM (après deux baccalauréats et une maîtrise, je ne peux plus les compter !)

J'aimerais aussi remercier mon directeur de recherche, Dr. Mike Sapieha, d'avoir permis de réaliser ces études graduées. Évidemment, sans lui, je ne pourrais pas déposer ce mémoire. Sa merveilleuse équipe, toujours aussi joyeuse et débordante d'énergie, ont rendu ce temps agréable durant la période difficile de la COVID. Bien sûr, j'aimerais remercier mon co-directeur, Dr. Bruno Larrivée, d'avoir assisté à toutes les réunions et d'avoir appuyé ce projet. De plus, je ne pourrais pas passer à côté de la patience de Guillaume Blot qui a supervisé ma démarche et mes questionnements. J'espère que tu n'oublieras pas mes débats que je me faisais à moi-même ! Je ne pourrais passer à côté des judicieux conseils de Sergio Crespo-Garcia pour la réalisation de mon présent projet, ainsi que des futurs.

On peut dire qu'une chose sur la maîtrise bien qu'elle soit d'une courte durée, c'est un passage haut en couleur. On grandit à travers cette expérience ; on apprend énormément sur nous-mêmes et sur nos compétences. Je ne sais pas à quel point, je remercie les membres de mon laboratoire, de mon directeur et de mon co-directeur.

Merci!

Chapitre 1 – Introduction

Avec l'augmentation et le vieillissement de la population, les demandes grandissantes de soins pour les maladies oculaires ne font que s'accroître causant inévitablement des coûts monétaires au système de santé (1). L'acuité du système visuel diminue avec l'âge autant que les autres facultés de notre corps (exemple : système cardiaque, rénal, nerveux, etc.). La cataracte et les troubles de réfractions (par exemple la myopie) sont des conditions auxquelles les approches médicales, comme la chirurgie ou le port des lunettes, corrigent directement la vue (1). Pourtant, entre 2010 et 2019, la proportion de personnes atteintes de ces maladies oculaires ne font qu'augmenter (1). D'autres maladies, comme le glaucome, la rétinopathie diabétique et la dégénérescence maculaire liée à l'âge, sont aussi de forts contributeurs à cet important déclin visuel, mais ils sont plus difficilement traitables (1). Il semble évident que la recherche doit palier à ce défi pour comprendre les mécanismes et trouver des solutions pour diminuer les charges sur le système de santé. Par ailleurs, la science peut améliorer la qualité de vie des patients atteints de maladies oculaires possédant peu ou pas de traitements jusqu'à ce jour.

1.1 Structure de l'œil

Malgré la petite taille de l'œil, celui-ci possède une structure très complexe. Celui-ci est séparé en trois couches distinctes soit : la couche externe, la couche moyenne et la couche interne (2). La couche externe est composée de la cornée et de la sclère qui permettent de protéger l'intérieur de l'œil (figure 1) (3). La couche moyenne est composée de l'uvée dont les composantes sont l'iris, la choroïde et le corps ciliaire (figure 1) (4). Finalement, la couche interne est composée de la rétine qui est la composante nerveuse de l'œil (figure 1) (2).

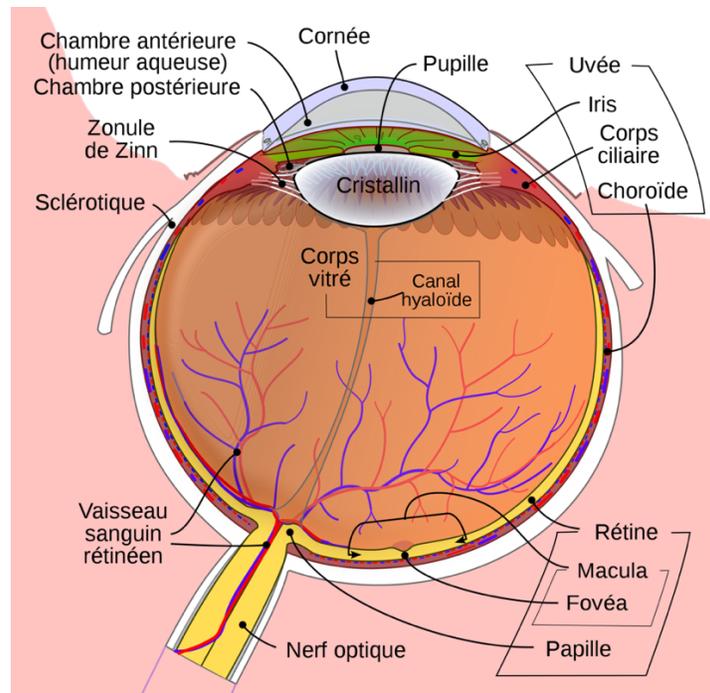


Figure 1. Structure de l'œil

Énumération de l'anatomie de l'œil humain sain. By Schematic diagram of the human eye en.svg: Rhcastilhos / derivative work: - lyhana8, Jmarchn - Schematic diagram of the human eye en.svg, CC BY-SA 3.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=6917352>

1.1.1 La rétine

1.1.1.1 Structure de la rétine

La rétine est l'expansion du système nerveux central d'une épaisseur de 0,25 mm dans les yeux humains tapissant le fond interne de l'œil (2, 5). Lors de l'embryogenèse, la rétine est formée par une excroissance du cerveau provenant du neuroectoderme, tandis que les autres parties de l'œil émanent d'autres tissus tels que l'ectoderme, de la crête neurale et du mésoderme (6). On la retrouve chez d'autres espèces avec des spécialisations et des épaisseurs différentes que celles retrouvées chez l'homme (7, 8).

La rétine répond aux stimuli environnants (par exemple : les photons) qui traversent la couche externe vers la couche interne de l'œil. Les photons sont transformés en signal électrique par les photorécepteurs (cônes et bâtonnets). Celui-ci traversera, par la suite, cinq types de neurones répartis dans trois couches nucléaires et deux couches synaptiques (aussi appelées plexiformes) (figure 3 et 4) (2, 5, 7-9). Les couches sont composées de cinq classes de neurones

(photorécepteurs, les cellules horizontales, les cellules bipolaires, les cellules amacrines et les cellules ganglionnaires) et un type de cellules gliales, les cellules de Müller (figure 3 et 4) (10). De nombreux vaisseaux sanguins, des cellules endothéliales, composent la rétine permettant l'apport nécessaire en nutriments et l'élimination des déchets (11, 12). Ainsi, ce signal électrique est envoyé vers les autres types de récepteurs au travers des couches de la rétine jusqu'au nerf optique, puis vers le thalamus et dans le cortex visuel primaire situé dans le lobe occipital (5).

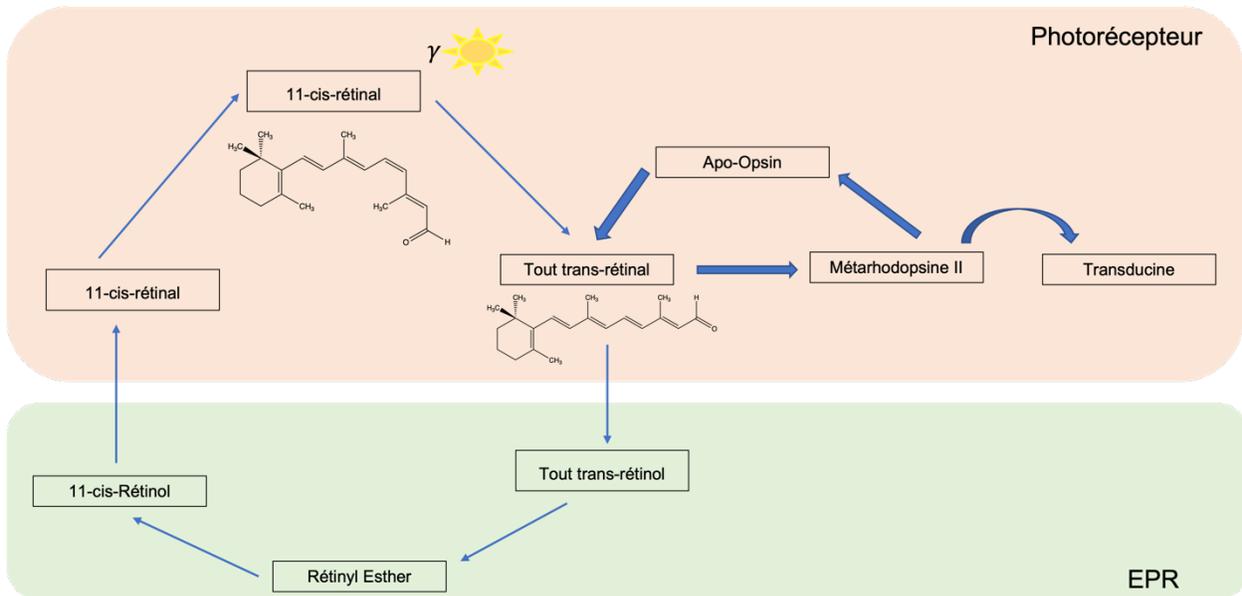


Figure 2. La phototransduction des bâtonnets

Une stimulation (γ) des photorécepteurs permet l'isomérisation du 11-cis-rétinal en tout-trans-rétinal. Cette réaction crée la formation de la métarhodopsine II. Celle-ci active une protéine G activant des processus intracellulaires. Les molécules impliquées dans le cycle visuel sont finement régulées par plusieurs enzymes (non-décrites dans ce schéma); la majorité du processus de régénération s'effectue dans l'épithélium pigmentaire rétinien.

Les photorécepteurs sont situés dans la couche nucléaire externe (CNE) de la rétine où leur corps cellulaire (segment interne et externe) touche l'épithélium pigmentaire rétinien et ressort dans la CNE (figure 3 et 4) (5, 9). Ceux-ci sont des neurones sensoriels les plus abondants de la rétine ayant un rôle important pour convertir les signaux lumineux en signaux électriques et chimiques, afin que le système nerveux capte l'information; ce phénomène est appelé la phototransduction (13). Les photorécepteurs possèdent un pigment visuel composé du rétinol (vitamine A), servant de chromophore, et de l'opsine, qui est un segment transmembranaire de

la rhodopsine (10). Lorsque les photons frappent les photorécepteurs, il y a une isomérisation de la forme 11-cis-rétinal en tout-trans-rétinal (10, 14). Cette réaction crée un produit secondaire, la métarhodopsine II, provoquant l'excitation de la membrane des photorécepteurs (figure 2) (10, 15). En effet, la métarhodopsine II s'associe à la transducine, une protéine G, qui permet l'activation d'une cascade intracellulaire (figure 2) (10, 15, 16).

Les bâtonnets et les cônes sont les deux types de photorécepteurs qui tapissent le fond de la rétine (17). Les bâtonnets sont plus sensibles à une faible luminosité (vision nocturne) (13, 17). C'est pourquoi, les cônes prennent le relai, puisque ceux-ci répondent mieux à la lumière ambiante et distinguent les couleurs (13, 17).

La prochaine couche est le plexiforme externe qui permet de séparer l'information spatiale à l'aide de cellules horizontales et bipolaires (figure 4) (10, 18). Ces cellules reçoivent l'information par synapses des photorécepteurs libérant le glutamate (figure 4) (10, 18). Les cellules bipolaires font synapses avec le photorécepteur où la dépolarisation et l'hyperpolarisation du système glutamatergique permet le signal de communication à travers la rétine (10, 16, 18, 19). Les cellules bipolaires sont reconnues pour fonctionner en polarité, c'est-à-dire « ON » et « OFF », puisqu'à leur surface les cellules « ON » sont métabotropes du mGluR6, tandis que les cellules « OFF » sont ionotropes (les dendrites expriment les récepteurs kaïnate et/ou AMPA) (figure 3 et 4) (19). Les cellules horizontales possèdent une activité confinée uniquement dans la couche du plexiforme externe permettant de relier l'information de façon latérale jusqu'aux cellules bipolaires (10). Les cellules horizontales sont des interneurons GABAergiques et du glutamate transmettant de l'information aux cellules bipolaires (20). Celles-ci permettront de donner une rétroaction des photorécepteurs sur les informations « ON » et « OFF » aux cellules bipolaires augmentant la précision de l'information (figure 3 et 4) (19, 21).

La couche nucléaire interne (CNI) contient les corps cellulaires des cellules horizontales, les cellules bipolaires, les cellules amacrines ainsi que les cellules de Müller (un type de cellules gliales) (figure 4) (9, 10). Les cellules de Müller ont pour rôle le soutien physique, l'organisation fonctionnelle et métabolique de l'ensemble des neurones de la rétine (22, 23). Elles font la liaison anatomique des neurones rétiniens permettant les échanges des molécules en direction des

vaisseaux sanguins, du vitré et l'espace sous rétinien (23). Celles-ci possèdent plusieurs canaux ioniques à voltage-dépendant et des récepteurs reconnaissant les neurotransmetteurs qui régulent le microenvironnement (liquide extracellulaire) de la rétine (22, 23). En effet, les cellules de Müller permettent l'élimination des neurotransmetteurs dans l'environnement post-synaptique (figure 3 et 4) (22, 23).

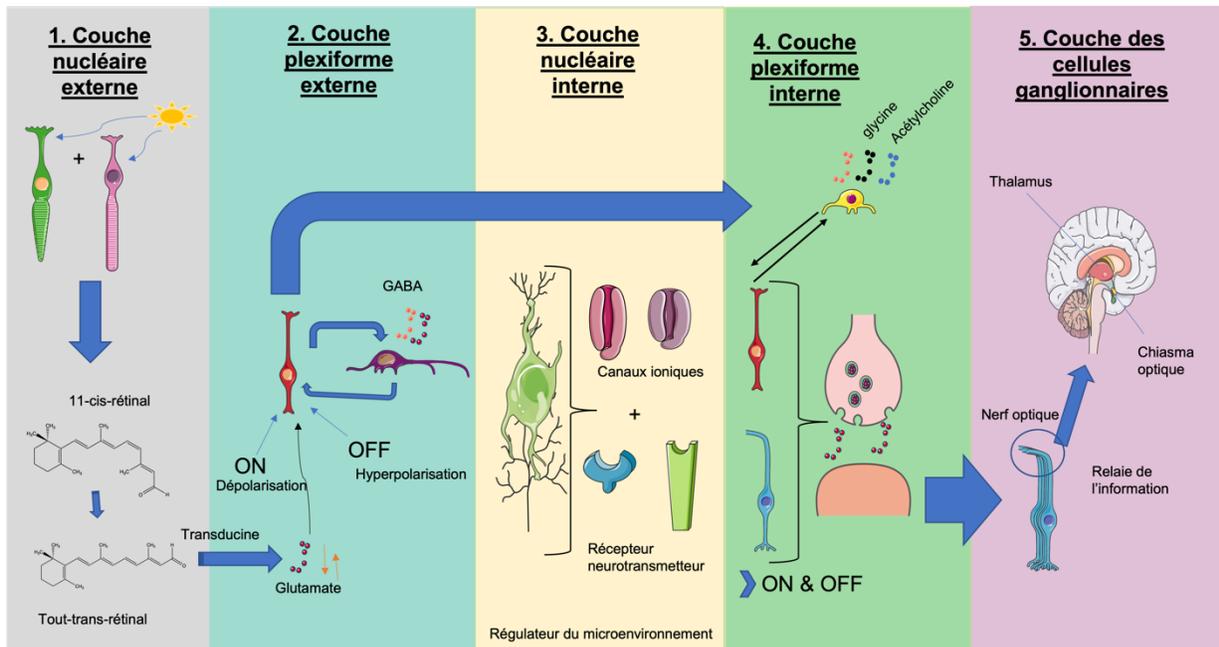


Figure 3. Chemin visuel des photons jusqu'au thalamus.

Les photons provoquent la dépolarisation des photorécepteurs débutant le cycle de la phototransduction. Ce cycle permet l'association de la métarhodopsine II et de la transducine qui activent des voies de signalisation qui diminuent les niveaux de glutamate. Les cellules bipolaires « ON » sont sensibles à la diminution de ce neurotransmetteur. Les cellules horizontales, quant à elles, permettent la rétroaction sur les cellules bipolaires à l'aide du glutamate et du GABA. Les cellules de Müller possèdent un rôle structural et régulateur du microenvironnement, puisqu'elles ont plusieurs récepteurs à sa surface. Les cellules bipolaires font synapses avec les cellules ganglionnaires et les cellules amacriques permettant une rétroaction à l'aide de diverses neurotransmetteurs (exemple : GABA, glycine et acétylcholine) et des acides aminés (exemple : glycine). Les cellules ganglionnaires permettent le relai de l'influx électrique et chimique jusqu'au système nerveux central dans le thalamus. Les images ayant permis de faire les schémas proviennent de Servier Medical art by Servier is licensed under CC3.0 unported license

La couche du plexiforme interne permet le traitement du stimuli lumineux par les cellules ganglionnaires qui sont photosensibles (figure 3 et 4) (10, 24). Les cellules bipolaires font synapses avec les cellules ganglionnaires relâchant du glutamate (9, 10, 19). Les cellules ganglionnaires sont

aussi des cellules « ON » et « OFF » par rapport à l'intensité lumineuse (25-27). Celles-ci sont connectées aux cellules bipolaires correspondantes, c'est-à-dire une cellule bipolaire « ON » avec une cellule ganglionnaire « ON » (25-27). Quant aux cellules amacrines, elles se situent dans la couche du plexiforme interne où leur activité est confinée dans ce milieu ; celles-ci possèdent un rôle inhibiteur sur les cellules bipolaires en relâchant du GABA, de la glycine et d'autres neurotransmetteurs (par exemple l'acétylcholine) pour moduler l'activité des cellules ganglionnaires (figure 3 et 4) (10, 19, 25, 28, 29). Les cellules ganglionnaires se situent dans la couche portant le même nom (couche la plus en profondeur) et font le relais de l'information jusqu'au nerf optique (figure 3) (9, 10). La particularité des cellules ganglionnaires, c'est qu'elles forment le nerf optique par le prolongement axonal jusqu'au corps genouillé latéral dans le thalamus (figure 3) (24).

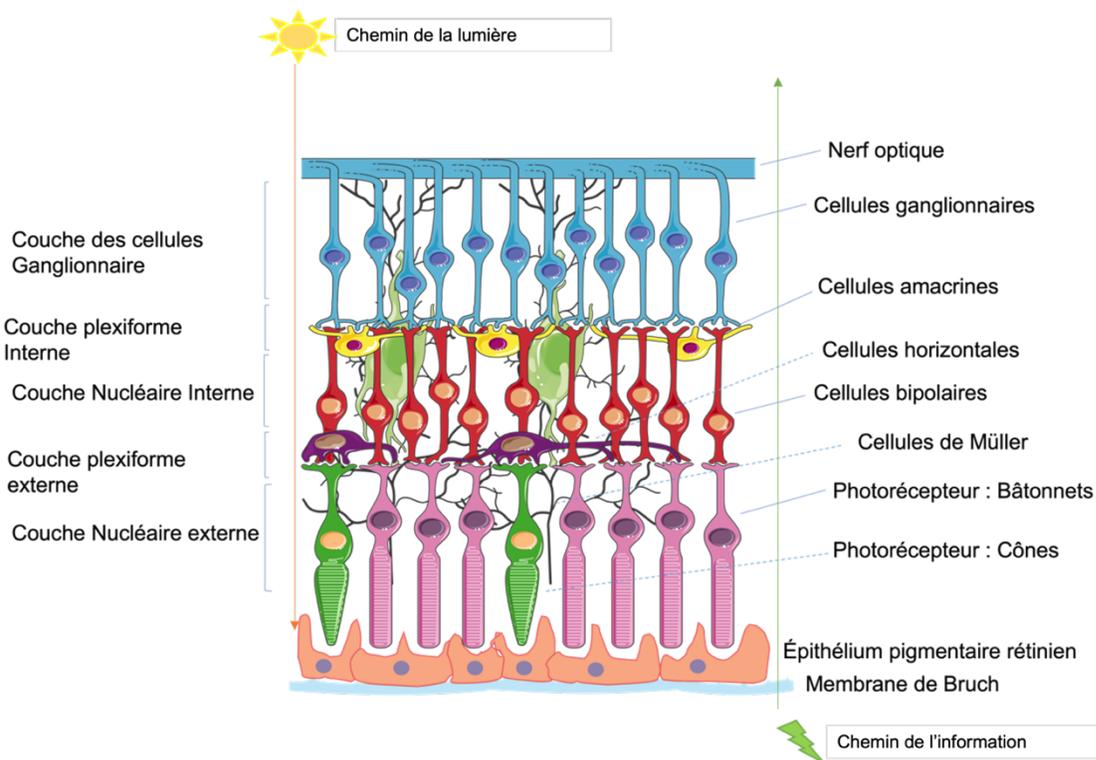


Figure 4. Structure des couches de la rétine.

Les différentes couches et cellules qui composent la rétine neurale.

images ayant permis de faire les schémas proviennent de Servier Medical art by Servier is licensed under CC3.0 unported license

1.1.1.2 Système vasculaire de la rétine

La rétine est un organe vascularisé possédant plusieurs niveaux d'organisation. Le système vasculaire rétinien se développe au cours de la gestation par une réorganisation, puisque la rétine est irriguée premièrement par le système vasculaire hyaloïde (30, 31). Ce système régresse par l'interaction du système immunitaire via la signalisation de Wnt7b (impliquée dans les processus développementaux et de l'embryogenèse) dérivée des macrophages via le récepteur Fzd4, connu pour réguler le développement du système vasculaire de la rétine et de l'oreille, et le corécepteur LRP5 (aide la spécialisation de la rétine) sur les cellules endothéliales (30, 32). Cette voie induit la mort par apoptose du système vasculaire hyaloïde dans la rétine (32).

Les astrocytes qui expriment fortement du PDGFR α envahissent la rétine (30, 33). Les cellules ganglionnaires contrôlent la prolifération des astrocytes dans la couche interne de la rétine par la sécrétion du PDGFA (30, 33). L'expression du VEGF, à la suite d'une hypoxie, permet la stimulation de l'angiogenèse (30, 33, 34). Les premiers vaisseaux émergent des couches les plus internes de la rétine au nerf optique qui formeront plus tard le plexus vasculaire superficiel (30, 35, 36). Les astrocytes sont des cellules gliales de forme étoilée qui permettent le support des vaisseaux sanguins (30, 37). Toutefois, les astrocytes rétiens résident uniquement au plexus interne (30). Les vaisseaux sanguins envahissent les couches internes vers les couches externes pour innover l'ensemble de la rétine (30).

L'artère rétinienne principale est reliée à l'artère carotide interne qui longe le nerf optique permettant son entrée dans le système visuel (11). L'organisation mature du système vasculaire est composée de plusieurs plexus provenant de l'artère visuelle principale qui se segmente (11, 38). Le premier plexus se situe au niveau de la région des cellules ganglionnaires d'où l'afflux sanguin provient de l'artère centrale rétinienne ; celui-ci se nomme le plexus vasculaire superficiel (35, 36). Il y a deux plexus situés dans la couche nucléaire interne : le plexus capillaire intermédiaire et le plexus capillaire profond (35, 38). Les deux plexus sont alimentés par le plexus vasculaire superficiel. Le dernier plexus est le capillaire péri-papillaire radial qui suit les axones des neurones de la rétine et les approvisionne en nutriment (35, 38). Le système vasculaire rétinien est impliqué dans de nombreuses maladies de la rétine telle que la rétinopathie du prématuré et la rétinopathie diabétique (11, 12, 39).

1.1.1.3 Privilège immunitaire de la rétine

Le privilège immunitaire est décrit comme un processus actif par lequel le système immunitaire et les cellules de l'organe agissent de concert pour limiter l'induction et l'expression de l'inflammation afin d'éviter d'éventuels dommages irréversibles (40, 41). La rétine, comme le cerveau, l'œil et les testicules, font partie de ces organes privilégiés (40-42). Les cellules microgliales, un autre type de cellules gliales, permettent la surveillance immunitaire de la rétine (40, 43). Ce sont des cellules résidentes de la rétine se trouvant préférentiellement dans les couches plexiformes (43). Les microglies ont des protéines de surface pour reconnaître les chimiokines, les cytokines et les protéines du système du complément et les PAMP (43, 44). Les microglies réagissent par la communication avec les neurones, les cellules gliales et l'EPR qui relâchent des molécules immunosuppressives telles que le $TGF\beta$, l'IL-10, le CX3CL1 et le CD200 (40, 43, 45). Lorsque le microenvironnement de la rétine montre des signes pathologiques, les microglies et les macrophages s'activent relâchant de l'oxyde nitrique synthase inductible (iNOS) et des cytokines pro-inflammatoires (40).

1.1.2 Espace sous-rétinien

1.1.2.1 Épithélium pigmentaire rétinien

L'épithélium pigmentaire rétinien est une monocouche pigmentée de cellules polygonales qui relie la rétine neurale et l'espace sous rétinien qui inclut les structures suivantes: la membrane de Bruch, la choriocapillaire et la choroïde (5, 46). La face externe de l'EPR (basolatérale) est connectée à la membrane de Bruch et la choroïde, tandis que la face interne (la face apicale) fait le lien avec la rétine par la couche nucléaire externe (46, 47). Cette structure fine est vitale pour garder une homéostasie de l'œil et, lorsque cette structure est endommagée, cela mène à des rétinopathies (48). Son rôle principal est de réguler la barrière hémato-rétinienne, mais elle possède aussi d'autres fonctions telles qu'une membrane de soutien pour les photorécepteurs, le transport d'ions et des fluides, de la conversion et stockage des rétinoïdes, fonction phagocytaire du segment externe des photorécepteurs et de protection contre la lumière (47, 49).

La membrane de l'EPR est une jonction serrée et étanche permettant le contrôle du passage des molécules au travers de la membrane (47, 50, 51). Celle-ci laisse passer les molécules de moins de 300 kDa (52). La surface connectée aux photorécepteurs présente des microvillosités favorisant l'échange de substances nutritives par des canaux et transporteurs, ceux-ci permettent donc le passage des ions et d'autres nutriments (46, 47, 53). Du côté des photorécepteurs, il y a une exclusion de vaisseaux sanguins, les nutriments doivent obligatoirement provenir de la forte interaction entre la membrane de Bruch et la choriocapillaire délivrant les fluides à l'EPR (54). Il y a aussi un passage de nutriments qui s'effectue aussi du côté basolatérale par une distribution asymétrique de transporteur et de canaux tels que AQP1, Na⁺/K⁺-ATPase, Na⁺/HCO₃ et cGMP (45, 47, 50). Le transport du côté basolatéral est connecté avec la circulation systémique sanguine (par la choriocapillaire) permettant d'acheminer l'oxygène et les nutriments, comme les rétinoïdes qui dérivent de l'alimentation nécessaire au cycle visuel (17).

L'EPR joue un rôle important dans le cycle visuel (55). Effectivement, il recharge les éléments visuels sous la forme de 11-cis-rétinal (rhodopsine), vers le segment externe des photorécepteurs (figure 2) (51, 56). La plupart des transformations secondaires pour la ré-isomérisation du 11-trans-rétinal en 11-cis-rétinal s'effectuent dans l'EPR, puisque plusieurs des enzymes clés s'y trouvent (figure 2) (51, 56).

La fonction phagocytaire de l'EPR est nécessaire pour le renouvellement quotidien du dixième de la longueur des photorécepteurs du côté du segment externe (17, 47, 55). Une fine signalisation permet d'initier la cascade d'événement d'élimination, de digestion et de recyclage de certains des composants (17, 47). Les mécanismes de signalisation de l'apoptose sont possiblement impliqués (17, 49). Toutefois, l'un des premiers stades bien définis de cette cascade est que les phosphatidylsérines se retrouvent à la face externe de la membrane des photorécepteurs, soit au niveau de sa base (17, 49). En effet, la phagocytose par l'EPR de cette membrane (tige) permet l'auto-renouvellement de celle-ci puisqu'elle subit de nombreux dommages oxydatifs (17, 47, 49). Ceci protège l'intégrité de l'EPR et des photorécepteurs.

L'EPR possède un pigment brun foncé, presque noir, qui provient de la mélanine, de la lipofusine et des granules de mélanolipofusines (47, 48, 57, 58). La lipofusine est un agrégat d'un ensemble

de composés comprenant principalement des lipides conjugués aux rétinoïdes (classe de cholestérol) et de protéines provenant des segments externes des photorécepteurs (48). Les agrégats de lipofusines sont dommageables et ils sont associés à un risque accru de développer des maladies de l'œil, puisqu'on les retrouve normalement dans la macula, une zone centrale de la rétine où l'acuité visuelle est la plus élevée, la fovéa (une région densément peuplée de cônes) et la péri-fovéa (48, 49). Des études ont montré que la lipofusine possédait l'un des déchets des photorécepteurs très toxiques A2E (bis-rétinoïde pyridinium/N-rétinylidène-N-rétinyléthanolamine) qui lui conféraient sa fluorescence (48, 59, 60). Quant à la mélanine, produite et stockée par les mélanosomes, elle permet de protéger des rayons UV sur l'EPR en les absorbant, et conférant une protection contre le stress oxydatif (47, 48).

L'EPR confère à la rétine un privilège immunitaire tel que mentionné dans la précédente section (45, 61). La barrière hémato-rétinienne formée par les jonctions serrées de l'EPR permet de réguler les cellules du système immunitaire qui rentrent dans la rétine (45, 52). Les cellules de l'épithélium sécrètent des facteurs immunosuppresseurs solubles, tels que TGF- β , IL-11, l'interféron β (IFN- β) et d'autres, pour réguler négativement des cellules immunitaires amenant l'inflammation dommageable (40, 45). L'EPR possède plusieurs récepteurs du Toll-Like (TLR) (TLR 1 à 7, 9 et 10), les composantes du complément, les CMH de classe I et II et sert de cellules présentatrices d'antigène (40, 45, 61). Elle possède ainsi une multitude de rôles permettant une communication entre les réponses immunitaires innées et adaptatives (40, 45, 61). Le TGF- β est un contributeur important au privilège immunitaire de l'œil, puisqu'il diminue le rôle de cellules présentatrice d'antigène en activant les lymphocytes T (44, 45). Quant à l'IFN- β , sa sécrétion serait associée à la signalisation du TLR3 lors d'une infection de type virale (44). Les études menées sur l'inflammation pathologique et chronique de la rétine montrent que la diminution de la sécrétion de facteur soluble par l'EPR augmenterait l'envahissement des cellules NK, les lymphocytes et les macrophages (40, 45, 61, 62). Ceci aurait pour effet de causer des dommages importants à la rétine par le système immunitaire (40, 45, 61, 62).

1.1.2.2 La membrane de Bruch

La membrane de Bruch permet la séparation entre deux couches importantes de l'œil soit l'EPR et la choroïde (47, 52). Cette couche a été longtemps ignorée, mais elle possède un rôle crucial dans l'homéostasie de l'œil (52). Effectivement, elle possède trois rôles majeurs : elle permet la diffusion de molécules de façon passive entre l'EPR et la choroïde (ainsi que ses vaisseaux), elle permet le support physique pour l'adhésion et la migration des cellules de l'EPR et est une barrière de division pour la choroïde et les cellules rétinienne (52).

La membrane de Bruch est un type de lame basale plus épaisse. En effet, elle possède plusieurs couches (au total cinq) qui s'appuient en partie sur l'EPR et une partie sur la choroïde (52). La couche du côté de l'EPR est la membrane basale de l'EPR ; elle est composée de collagène IV, de laminine, de fibronectine, de sulfate d'héparane (un type de polysaccharide qui s'accroche au protéoglycane de la matrice cellulaire) et de chondroïtine (52, 63, 64). La seconde couche nommée la couche interne de collagène (ICL) est organisée en treillis de collagène (I, III et V) où des molécules (comme les glycosaminoglycanes) s'insèrent au travers (52, 63, 65). La couche suivante, soit la couche d'élastine, permet la malléabilité de la membrane de Bruch à l'aide des couches superposées d'élastine qui lui confèrent cette propriété (52). Cette couche possède d'autres composantes telles que le collagène VI, la fibronectine et d'autres protéines (52, 66). La couche externe de collagène (OCL) est comparable à l'ICL au niveau de sa structure, mais elle est beaucoup moins épaisse et elle se retrouve du côté de la choroïde (52). La dernière couche est la membrane basale de la choriocapillaire dont la composition est légèrement différente de l'ICL pour la présence des fibres de collagène de type VI (52, 66). La présence des fibres de collagène de type VI permet l'ancrage de la membrane de Bruch aux cellules endothéliales de la choriocapillaire (52, 63).

1.2.2.3 La choroïde

La choroïde est une couche se retrouvant sous la membrane de Bruch et elle est délimitée par la sclère (67, 68). Cette structure est une couche hautement vascularisée qui a pour fonction principale de fournir l'oxygène et les nutriments à l'épithélium, ainsi que de ramener les déchets

provenant de l'EPR et des photorécepteurs dans la circulation systémique (68). La choroïde possède trois couches vascularisées et une couche de transition : la choriocapillaire, la couche de Sattler, la couche de Haller et la suprachoroïde (69, 70). La choriocapillaire est en étroite communication avec l'EPR par la membrane de Bruch et elle est la couche la plus interne de la choroïde (55, 68, 70). Celle-ci possède une seule couche de capillaires fenestrés sanguins (68). La couche de Sattler est un réseau de vaisseaux sanguins intermédiaires d'où prend naissance les capillaires de la choriocapillaire sous forme d'artériole et de veines (68, 70). La couche contenant les plus gros vaisseaux sanguins est la couche de Haller (70). Entre les couches vasculaires de Sattler et de Haller, la présence de cellules non-vasculaires s'y trouvent tels que les mélanocytes, les fibroblastes et les mastocytes composant le stroma choroïdien (67, 70). Quant à la suprachoroïde, elle possède un réseau lymphatique et elle permet de faire la jonction avec la sclère par la lamina fusca (67, 70).

1.2 La dégénérescence maculaire liée à l'âge

La dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) est une maladie chronique et progressive du centre de la rétine (71). Cette maladie neurodégénérative est une des principales causes de cécité (moins de 3/60 au test d'acuité visuelle avec le tableau de Snellen) dans le monde pour la population âgée de plus de 50 ans (72, 73). En 2020, on estime que la prévalence de la maladie est de 196 millions de cas et que celle-ci augmentera à 288 millions en 2040 (73). La population caucasienne et asiatique ont plus de risque de souffrir de DMLA tardive comparativement aux populations africaines, hispaniques ou afro-américaines (74). Cependant, toute population, peu importe l'ethnie, peut souffrir de la DMLA dans les premiers stades de la maladie telle que montré par les méta-analyses (74).

Plusieurs structures de l'œil sont touchées par la maladie : les photorécepteurs, l'épithélium pigmentaire rétinien, la membrane de Bruch et la choriocapillaire (73). Il n'existe aucun traitement pour guérir de cette maladie, ce sont des traitements palliatifs soulageant les symptômes qui sont offerts à ceux souffrant de la DMLA jusqu'à ce jour (46).

La perte de la vision dans la maladie se fait habituellement de façon graduelle. La DMLA se décrit généralement en quatre stades avant d'atteindre les formes les plus avancées. Le premier stade se décrit comme des changements dus au vieillissement normal avec la présence de drusen dans la macula (72, 75). Il se pourrait que le patient présente une petite baisse d'acuité et de distorsion visuelle, ainsi qu'une tâche sombre dans le champ centrale de la vision (72).

Les drusen sont l'accumulation de dépôts extracellulaires lipidiques et protéiques entre l'EPR et la membrane de Bruch, c'est-à-dire sous la lame basale (49, 76). La formation des drusen n'est pas encore bien compris, c'est-à-dire que certains dépôts lipidiques et protéiques proviendraient du métabolisme de l'œil et d'autres de la circulation systémique (77). Les drusen apparaissent comme un dépôt jaune-blanc dans le fond de l'œil percevable lors de l'examen oculaire (78). Il existe différents types de drusen qui sont possibles de caractériser lors de cet examen : durs, mous, calciques et pseudo-drusen (77-79). Les drusen durs sont associés au vieillissement normal de l'œil et sont caractérisés par une forme solide et épaisse (77, 78). Quant aux drusen calciques, ils sont associés à une apparence blanchâtre ou brillante causée par le dépôt de calcium (78).

Certains types de drusen (mous et pseudo-drusen (réticulaire)) sont associés à un risque plus accru de pathologie (78-80). L'examen de l'œil montre les drusen mous comme ayant des rebords moins définis, tandis que les pseudo-drusen sont de larges (125 à 250 μm) amas perceptibles à la lumière bleue de forme arrondi ou ovale (78, 79). Une accumulation accrue à la macula et le profil des drusens (forme, diamètre et nombre) peuvent être associés au développement d'une DMLA sévère (49, 73, 76, 81, 82).

Dans le second stade, il y a la présence de drusen de plus grandes tailles, appelé les drusen intermédiaires, à la macula. Il n'y a toujours pas de dommage observé au niveau de l'EPR (72). Le troisième stade est le stade étendu, modéré, où la présence d'un grand druse est observé dans la macula et l'apparition d'anomalie/dommages au niveau de l'EPR (72). À ce stade, les patients ont leur vision largement affectée (72). Le dernier stade, soit le quatrième stade, est la forme avancée de la maladie où il est possible de distinguer deux types de DMLA, soit la DMLA sèche (ou atrophie géographique), soit la DMLA humide (ou néovasculaire) (72, 83).

Les drusen ont plusieurs effets indésirables sur la progression de la maladie dont l'épaississement de la membrane de Bruch pouvant causer une diminution de la vision (49). Les drusen bloquent la diffusion des molécules entre les vaisseaux sanguins de la choroïde et de la rétine vers l'EPR empêchant les échanges de nutriments (49). L'épaississement de la membrane de Bruch n'est pas seulement causé par les drusen, mais aussi par plusieurs autres facteurs comme par une détérioration accrue des fibres de collagène (52, 77). Les fibres de collagènes subissent les attaques du stress oxydatif par des défauts du métabolisme du fer causé par l'âge et le processus de réticulation par glycation avancée (52, 77). La membrane de Bruch s'épaissit, perd de son élasticité et son pouvoir de filtration, puisque d'autres déchets provenant de l'EPR restent dans ce goulot (52). La membrane est alors fragilisée et risque de se briser.

Plusieurs processus cellulaires du vieillissement pathologique dans les yeux sont sous-jacents à la progression de la maladie dans la forme atrophique géographique et néovasculaire.

1.2.1 Atrophie géographique

La DMLA de type atrophie géographique (aussi appelée sèche ou non-exsudative) représente la forme de la maladie la plus fréquente jusqu'à 85 à 90% des cas (68, 83, 84). Bien qu'on parle souvent de la cécité qu'apporte la maladie, celle-ci amène énormément de souffrance émotionnelle telle que la dépression et le stress (85). En effet, l'atrophie géographique peut toucher qu'un seul œil et cette possibilité de perdre l'acuité visuelle dans l'autre œil ne fait qu'augmenter l'angoisse chez le patient (85). Ceci engendre des coûts supplémentaires en matière de santé. Les symptômes cliniques rapportés sont une vision centrale et nocturne altérée (flou et distorsion des couleurs et des lignes) (84). Dans le cas où la macula est touchée, l'acuité visuelle est fortement compromise (85).

La DMLA sèche est caractérisée par une atrophie focale de la membrane de l'EPR qui soutient les photorécepteurs (81, 83). La perte des vaisseaux choroïdiens engendre la diminution de l'apport en nutriment jusqu'à l'EPR (81, 84). De plus, la formation de dépôts toxiques entre la rétine et l'EPR endommage fortement les photorécepteurs qui sont « étouffés » par le manque de nutriments et l'environnement nocif dans lequel ils se trouvent (83, 86). Ceci provoque l'apoptose des photorécepteurs; il y a diminution progressive de cette population dans la macula épargnant tout d'abord la fovéa (68, 83). La formation de plusieurs îlots atrophiques peuvent s'agrandir et fusionner, puis finir par compromettre la fovéa (83). La présence d'un grand nombre de cellules immunitaires dans les zones d'atrophie géographique et les drusen suggèrent un environnement pro-inflammatoire préparant éventuellement à la progression de la maladie (87). Les patients atteints de DMLA de type atrophie géographique peuvent évoluer vers une DMLA avec néovascularisation (54, 84).

Lors de la photographie du fond de l'œil, il est possible de voir cette atrophie qui forme des zones rondes et ovales de 175 μm et plus (figure 5) (85). Lorsque les atteintes sont sévères, les vaisseaux sanguins de la choroïdes sont perceptibles (85). Les outils diagnostiques de la DMLA sèche sont la photographie du fond de l'œil, l'auto-fluorescence du fond de l'œil et la tomographie par cohérence optique (OCT) (84, 88). L'OCT est une technique d'imagerie médicale, non-invasive, où il est possible d'avoir des images en coupe de l'œil avec précision (72, 88).

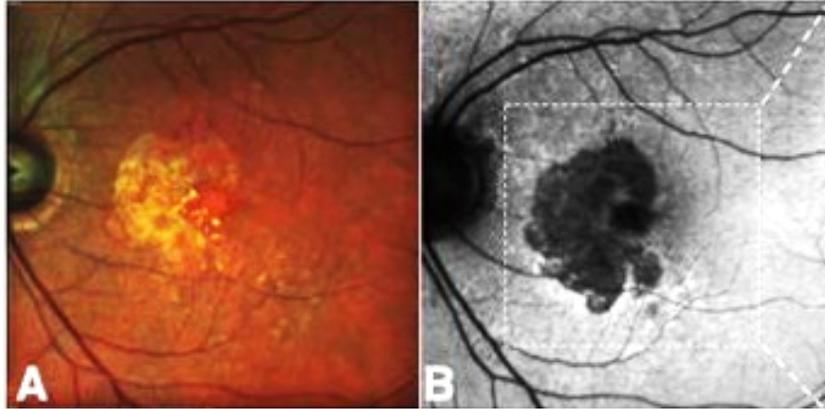


Figure 5. Lésion de la DMLA atrophie géographique.

Illustration des lésions d'un patient atteint de la maladie. Les images découlent de la technique d'imagerie tomographie par cohérence optique (OCT) où **A**) la zone lésée d'apparence plus clair, puis **B**) la perte de l'auto-fluorescence du fond de l'œil au niveau de la lésion. CC BY SA 4.0 Sacconi, R., Corbelli, E., Querques, L. *et al.* A Review of Current and Future Management of Geographic Atrophy. *Ophthalmol Ther* 6, 69–77 (2017). <https://doi.org/10.1007/s40123-017-0086-6> (figure adapté)

Malheureusement, il n'existe aucune cure pour la DMLA sèche jusqu'à ce jour (83, 84). Les dommages à l'EPR et aux photorécepteurs sont irréversibles et aucune médication ne peut les réparer ou les remplacer (84, 85). Des essais cliniques (de phase II) basés sur la neuroprotection et des composés anti-inflammatoires semblent être prometteurs dans le cas de la DMLA sèche (85). Par exemple dans les études de neuroprotection, la brimonidine, un agoniste d' α -2-adrénergique, est utilisé dans le traitement du glaucome (84, 85). Lors des essais chez des rongeurs, ils ont montré qu'il y avait une protection sur la rétine neurale (84, 85). L'injection intravitréenne chez des patients atteints de façon bilatérale a débuté dans une étude de phase II randomisée (85). Toutefois, jusqu'à ce jour, les professionnels de la santé misent sur la prévention et le ralentissement de la progression de la maladie en réduisant les facteurs de risque et en changeant la diète (84). Il est suggéré que les patients cessent de fumer, prennent certains suppléments alimentaires et fassent plus d'activité physique (84, 89).

1.2.2 DMLA Néovasculaire

La forme néovasculaire (aussi appelée la forme humide ou exsudative) représente 10 à 15 % des cas de la maladie (68, 83, 84). En général, la forme néovasculaire est associée à une perte de la vision plus sévère et plus rapide que la forme sèche (72).

La DMLA néovasculaire est caractérisée par la croissance de néovaisseaux sanguins sous l'espace rétinien, soit dans la choroïde (CNV) (68, 90). Des défauts de la membrane de Bruch surviennent par des processus inflammatoires et dégénératifs dû à l'âge (90). Un des nombreux mécanismes possibles de cette perturbation est la dégradation du collagène par des leucocytes (91). Les fibres de collagène subissent les effets du stress oxydatif au courant de la vie et ceci a pour effet de les endommager et de créer un environnement inflammatoire (54, 68). Les cellules inflammatoires présentes dans cet environnement, les macrophages et les microglies, produisent des facteurs pro-angiogéniques tels que le VEGF-A et IL-1 β (92). Les effets du vieillissement de la membrane de Bruch provoquent son épaissement et diminuent sa perméabilité (54). Ceci a pour effet de moins bien acheminer les nutriments vers l'EPR diminuant sa fonction (54). Par manque de nutriments et d'irrigation, les cellules EPR envoient des signaux d'alarme en sécrétant du VEGF vers la choriocapillaire, dont la densité et l'apport sanguin irriguant l'espace sous-rétinien diminuent avec l'âge (54, 68, 72). La synergie des signaux de VEGF envoyé par la choriocapillaire âgée et l'EPR signalent le besoin d'avoir de nouveaux vaisseaux pour alimenter l'EPR et les photorécepteurs (52, 54, 55, 68). L'ensemble de ces facteurs favorisent la CNV (52, 68, 92).

Les cellules endothéliales s'infiltrent dans cette membrane endommagée et l'EPR (figure 6) (68, 93). L'angiogenèse est stimulée par le déséquilibre entre les facteurs inhibiteurs et stimulateurs de la croissance des vaisseaux sanguins (68). Dans les états pathologiques, comme dans le cas de la néovascularisation choroïdienne ou les tumeurs, les facteurs inhibiteurs (PEDF (aussi connu sous le nom de serpine F1 (le facteur dérivé de l'épithélium pigmentaire)), endostatine et TSP1 (Thrombospondine 1)) sont largement diminués (68). Les cellules endothéliales, les péricytes et l'EPR peuvent produire du VEGF ce qui amplifie la surcharge sur le déséquilibre et pousse l'infiltration des cellules endothéliales dans l'espace sous-rétinien, endommageant les photorécepteurs (68). Le VEGF est un contributeur massif à la croissance des vaisseaux sanguins, mais il n'est pas le seul facteur stimulateur ; les autres facteurs impliqués sont le facteur de croissance analogue à l'insuline (IGF-1), les membres de la famille des facteurs de croissance des fibroblastes (FGF), les interleukines et les angiopoïétines (68).

Les nouveaux vaisseaux formés laissent échapper du liquide (exsudats) et/ou du sang (hémorragie), puisque ceux-ci ne sont pas aussi étanches que des vaisseaux sanguins en santé (68, 90). Cette étape est associée à une forme plus sévère, puisque ce liquide contient plusieurs médiateurs inflammatoires (IL-2, IL-6 et IL-10) ce qui crée un environnement propice à enrichir les dommages et agrandissant les zones affectées (68, 90).

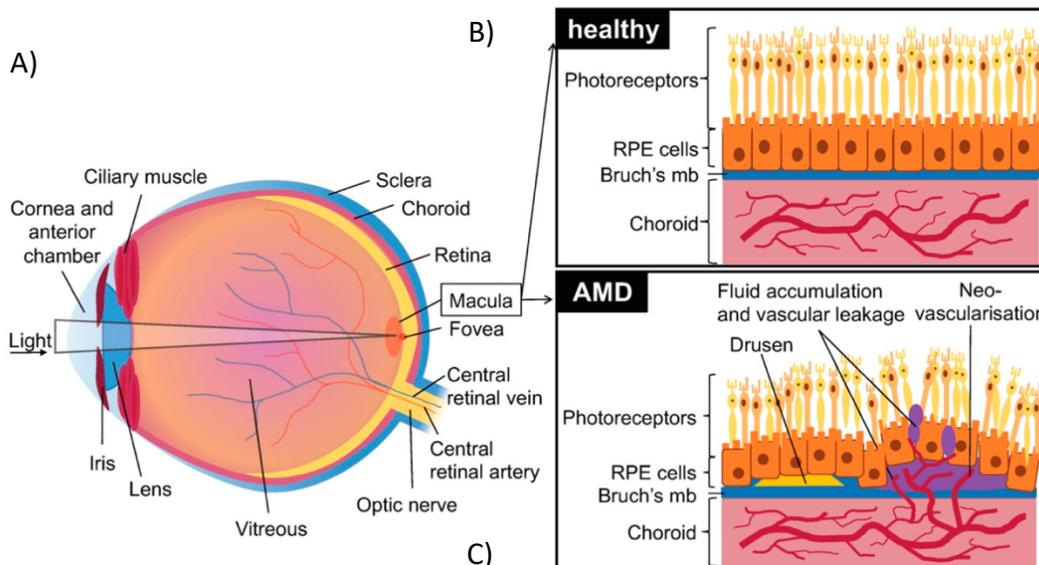


Figure 6. Pathogénèse de la dégénérescence maculaire liée à l'âge de type néovasculaire.

Représentation schématique de l'œil général (A) Présentation d'un grossissement de l'espace sous-rétinien montrant le réseau sanguin d'un œil sain (B) et dans le cas de la DMLA (C) les vaisseaux en croissance dans la membrane de Bruch et l'EPR. CC By SA 4.0 Rastoin, O.; Pagès, G.; Dufies, M. Experimental Models in Neovascular Age Related Macular Degeneration. *Int. J. Mol. Sci.* 2020, 21, 4627. <https://doi.org/10.3390/ijms21134627>

Les lésions causées par la croissance des vaisseaux sanguins peuvent évoluer vers une fibrose vasculaire, puis vers une fibrose maculaire (commutation angio-fibrotique) (90). À cette étape, il est possible d'apercevoir à l'examen de l'œil des cicatrices surélevées de tissus blancs-jaunâtres et solides (cicatrice fibrotique) (90). Lorsque les cellules arrivent dans cette étape, un processus d'apoptose est enclenché par les cellules de l'EPR, les macrophages et les cellules endothéliales (vaisseaux sanguins) formant les cicatrices (68, 90, 94, 95). Il y a d'autres facteurs impliqués dans ce processus soit le facteur de croissance transformant bêta (TGF- β) et l'inhibiteur de tissu métalloprotéinase 3 (TIMP-3 [tissue inhibitors of metalloproteinases 3]) permettant d'enclencher le processus de cicatrisation (68). Ce processus engagé permet une certaine résorption au niveau

de la néovascularisation, car la production de VEGF est diminuée (90). Malheureusement, cette étape implique énormément de fibrose et ceci endommage gravement la vision (90).

1.2.3 Facteurs de risque

Il existe une multitude de facteurs de risque dans la DMLA que ce soit au niveau de l'environnement, des habitudes de vie ou tout simplement de la génétique, puisque c'est une maladie multifactorielle (87). Ce sont trois grands volets que l'on retrouve dans plusieurs maladies dégénératives et celle-ci n'y échappe pas. Plusieurs facteurs seront énumérés et expliqués dans ce présent chapitre.

1.2.3.1 Facteurs génétiques

La prévalence de la DMLA est susceptible d'augmenter lorsque dans une famille, un membre (par exemple un parent ou la fratrie) est atteint (96). C'est pourquoi il est important de connaître les différentes causes génétiques. Plusieurs gènes associés au métabolisme lipidique et mitochondrial sont associés à une augmentation du risque de DMLA (49). En effet, l'accumulation de lipides (drusen) dans la membrane de Bruch est associée à la pathogenèse de la maladie dans plusieurs cas (49). La mauvaise gestion par le système lipidique (lipides et lipoprotéines) et des résultats d'études génétiques ont permis d'associer des variantes génétiques comme apolipoprotéine E2 (APOE2), la protéine de transfert des esters de cholestérol (*cholesterylester transfer protein*) (CETP), Lipase C (LIPC), facteur du complément H (CFH), transporteur à cassette liant l'ATP de la famille 4 ou la maladie de Stargardt (ABCR/STGD1/ABCA4), facteur de croissance 1 analogue à l'insuline (*insulin-like growth factor-1*) IGF1), récepteur de l'adiponectine 1 (ADIPOR1) et bien d'autres gènes (49, 96, 97).

De plus, plusieurs des facteurs mentionnés sont interreliés dans le métabolisme des lipides. Par exemple, l'APOE2 est sécrété par l'EPR lorsqu'il est en contact avec le système du complément (98). Dans le cas des drusen, ils sont constitués en partie de cholestérols, de lipides et d'autres constituant lipidiques (87, 98). L'APOE avec ABCA1 permet le transport efficace du cholestérol

jusqu'au foie (87, 98). Malheureusement, dans le cas de l'isoforme E2, ce transport semble inefficace (49, 87, 98). L'accumulation du cholestérol diminuerait la capacité autophagique dans l'EPR (97, 98).

Quant au CFH, l'incidence de la maladie serait associée à un polymorphisme génétique identifié soit rs1061170 (87). Ce polymorphisme est associé à la substitution d'une histidine 402 pour une tyrosine (CFH402H) augmentant le risque de 50% d'être atteint de la DMLA (99). La voie du complément est un mécanisme de défense immunitaire innée permettant de détruire les pathogènes (87, 99). Cette voie est composée d'une cascade de protéine protéolytique et cytolytique ayant la capacité de déclencher des processus inflammatoires et de reconnaître des pathogènes (100). Le rôle du CFH permet d'inhiber la voie du complément par la sécrétion d'une protéine soluble nommé *Cfh* (99, 101). Le dysfonctionnement au niveau de l'inhibition de la voie du complément peut entraîner une accumulation de lipides sous l'EPR (101). Ceci engendre la signalisation aberrante de la voie du complément permettant les dommages à l'EPR, puisque le *Cfh* ne serait pas efficace (101).

Il existe une susceptibilité génétique sur le chromosome 10, dont la localisation est le 10q26 (75, 102, 103). Plusieurs polymorphismes y sont associés comme les gènes de l'ARMS2 (la protéine 2 de sensibilité à la maculopathie) et HRTA1 (l'exigence de température élevée A1 [*high temperature requirement factor A1*]) ; ils sont, de plus, transmis de paires (102, 103). Ces polymorphismes augmentent la probabilité de développer une DMLA sévère (102, 103). Le rôle de ces deux gènes n'est pas totalement élucidé. Une étude récente a montré que des patients à risque avait une expression altérée de la protéine *Hrta1* (son activité est diminuée) contrairement aux patients non à risque (102).

1.2.3.2 Facteurs environnementaux

La DMLA est une maladie du vieillissement, ainsi le facteur de risque le plus important est l'âge (72, 87). L'œil suit un processus de vieillissement, comme d'autres organes du corps humain (72, 104). L'exposition à la lumière du soleil (ou à la lumière bleue) génère du stress oxydatif au fond de l'œil qui est géré par la mélanine. La littérature sur les risques de l'exposition aux UV sur la

DMLA ne possède aucun consensus (104-106). Pourtant, il est suggéré qu'une forte exposition au rayon UV au courant d'une vie pourrait augmenter le développement de la DMLA (104, 105). Le port de lunette de soleil de prescription, conçue pour protéger la vue, peut définitivement prévenir contre les maladies oculaires (dont les maladies rétinienne et de l'EPR) (107). Le port de grand chapeau et de casquette est une autre stratégie à adopter contre les rayons du soleil (107). Les protections contre la lumière bleue, présentes dans les prescriptions oculaires, ont pour but de protéger contre les effets des écrans et diminuer la fatigue oculaire (108). La grande présence des rayonnements de faible intensité (380 à 500 nm) causée par la consommation d'appareil électronique produisent des dommages importants sur la rétine et l'EPR (105, 107, 109).

1.2.3.3 Facteur habitude de vie

La DMLA est une maladie multifactorielle, dont les habitudes vies exercent une influence sur l'incidence de cette dernière (72). Par exemple, le tabagisme est l'une des premières causes de maladies et de mortalité (110). La cigarette accélère certaines conditions préexistantes par l'interaction gène-habitude de vie influençant ainsi la survenue de la maladie précocement (72). La fumée de cigarette dégage plus de 4000 produits toxiques et cancérigènes (110). Cette habitude de vie agit comme un stress oxydatif et augmente de 1,7 à 3,4 fois le risque d'être atteint de la maladie (72, 87, 110).

De nos jours, l'alimentation est au centre des conversations : manger équilibré, l'exercice et rester hydraté. Pourtant, malgré les campagnes de préventions, l'obésité s'accroît à travers le monde (111, 112). L'augmentation de poids des populations augmente la prise en charge dans les centres hospitaliers pour différents troubles du métabolisme (111). Malheureusement, l'obésité augmente aussi les facteurs de risque de souffrir de plusieurs maladies oculaires dont la DMLA (87, 112). L'obésité est le deuxième facteur de risque le plus important après le tabagisme. Cette condition augmente les événements cardiovasculaires, un état pro-inflammatoire, un excès de tissus adipeux qui peut causer une hyperléptémie (sécrétion par les adipocytes de la leptine) et une déficience en antioxydant (112). Pris ensemble, ces facteurs sont contributeurs à des

problèmes vasculaires et inflammatoires qui peuvent jouer un rôle dans la pathogénèse de la DMLA (112). L'IMC (indice de masse corporelle) est souvent utilisé dans les études pour créer des catégories afin d'aider à la classification (113). Malheureusement, cette classification ne peut pas être utilisée chez les athlètes ou chez les personnes âgées, puisque ceux-ci sont hors des courbes de l'IMC (112, 113). Certains chercheurs proposent d'utiliser une autre corrélation le ratio taille/hanche ou le pourcentage de graisse viscérale qui serait un meilleur prédicteur du potentiel de développer la DMLA (112, 113).

1.2.4 Préventions

L'étude AREDS, comportant plusieurs rapports, est maintes fois citées par les scientifiques et les professionnels de la santé, pour sa large cohorte de patients. Celle-ci est centrale pour les connaissances sur la prévention et les facteurs de risques (89, 114). L'étude AREDS (Age-related eye disease study) avait pour but d'étudier les facteurs de risques possibles pour la DMLA et la cataracte chez ces participants (114, 115). Au sein de cette étude, un essai clinique pour évaluer l'efficacité pharmacologique d'un supplément naturel a été aussi élaboré (114, 115).

Cette étude a trouvé une forte corrélation avec le tabagisme à tous les stades de la maladie (114). Ce facteur de risque modifiable provoque la diminution des antioxydants alimentaires dont la β -carotène (114). L'arrêt tabagique permettrait de diminuer les risques de l'apparition précoce de la maladie, mais les anciens-fumeurs ont toujours une probabilité plus grande que les non-fumeurs d'être atteints de celle-ci (jusqu'à 2 fois plus dépendamment de la consommation tabagique) (116). Plusieurs professionnels de la santé proposent, selon les antécédents, le produit de l'étude AREDS, qui est composé de 80 mg d'oxyde de zinc, 2 mg d'oxyde de cuivre (II), 15 mg de β -carotène, 500 mg de vitamine C et 400 UI de vitamine E (116). Il est non seulement proposé dans les cas de patients fumeurs, mais aussi en guise de « traitement » pour les patients atteint de la DMLA géographique (84, 85, 116). Selon le rapport de l'étude longitudinale, la prise de cette combinaison permet de diminuer le risque de développer une DMLA sévère de 25 % sur une période de cinq ans (72, 115, 117, 118). Ceci permettrait de retarder l'apparition des stades tardifs de la maladie (72, 115, 117, 118). La nouvelle étude AREDS2 a permis de faire quelques

changements au niveau de la formulation du composé : le retrait de la β -carotène (précurseur de la vitamine A) et l'ajout de 10mg de lutéine et 2 mg de zéaxanthine (116, 119). L'utilisation de β -carotène a fait significativement augmenter les cas de cancer du poumon chez les fumeurs et les anciens fumeurs utilisant le produit AREDS (116, 119, 120). En effet, la supplémentation en β -carotène montre une interaction nocive avec les différents produits composants la cigarette, dont le goudron logé sur les poumons endommagés des anciens fumeurs et des fumeurs actifs créant des radicaux libres (121-123). Les études ont montré qu'elle n'apportait pas d'avantage supplémentaire à sa consommation par rapport aux dommages qu'elle pouvait causer sur la santé (116, 119, 120). Il existe, encore aujourd'hui, une étude sur les effets du supplément AREDS2 sur une cohorte de dix ans pour s'assurer que ceux-ci n'encourent pas de risque à long-terme pour la santé causée par la lutéine et la zéaxanthine (120).

Bien qu'il soit difficile de quantifier l'exposition au soleil au courant d'une vie totale et que l'étude AREDS n'a pu déceler une corrélation positive, d'autres ont suggéré que le soleil est un facteur de risque (présenté dans le chapitre précédent) (114). Le port de lunette solaire peut à long-terme protéger contre les attaques des rayons UV et prévenir contre la DMLA (72, 104).

1.2.5 Traitements actuels

Dans les années 80, les chercheurs ont développé plusieurs techniques pour traiter les patients atteints de la DMLA néovasculaire, mais ceux-ci développaient d'autres problèmes oculaires associés à ces traitements (124). Les professionnels de la santé utilisaient la photocoagulation maculaire qui consiste à brûler avec un laser le fond de l'œil les vaisseaux sanguins problématiques. Malheureusement, les patients pouvaient développer un scotome, qui est la présence d'une tâche aveugle, suite à la destruction de l'EPR et des photorécepteurs (124). De plus, cette thérapie était associée à des nombreuses rechutes après 18 mois (124, 125).

Vers la fin des années 90, une nouvelle ère de traitement a vu le jour, la photodynamique (PDT) (124-128). Ce traitement nécessite un composé photosensible, tel que la vertéporfine qui tient le rôle de photosensibilisateur, administré par voie intraveineuse au patient (124-128). Le PDT possède une grande sélectivité pour sa cible thérapeutique, c'est-à-dire que la concentration du

photosensibilisateur est spécifique au tissu (128, 129). La source lumineuse, d'une longueur d'onde tout aussi spécifique, est dirigée vers la zone à traiter (128, 129). La vertéporfine, associée au traitement de la DMLA néovasculaire, est activée par un laser non-thermique d'une longueur d'onde de 689 nm et de la présence d'oxygène permettant la destruction des vaisseaux anormaux (124-127, 130). À la suite de la stimulation de la vertéporfine par le laser, il y a transfert d'énergie permettant la création de radicaux réactifs qui détruisent et endommagent les cellules et les tissus environnants (129-131). Les améliorations de la condition des patients, à la suite du traitement, sont restées faibles (124, 126). Ceux-ci doivent répéter le traitement à tous les trois mois, puisqu'il y a fréquemment des rechutes soit des fuites au niveau de la choriocapillaire, un symptôme associé à la maladie (124, 126, 129). De plus, ce traitement initiait des dommages à l'EPR, à la choriocapillaire et la neurorétine sensorielle (129). Une augmentation de la fréquence de traitement accroît les dommages causés à ces tissus (129).

1.2.5.1 Anti-VEGF

Les thérapies ciblant spécifiquement le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) est un choix stratégique, puisque celui-ci est un large contributeur de la forme néovasculaire de la maladie (124). Le VEGF possède différents isoformes qui sont les cibles des médicaments qui sont actuellement sur le marché (124).

Le Pegaptanib (macugen©), traitement approuvé en 2004 par la FDA, est composé d'un aptamère oligonucléotide pégylé ayant une affinité très élevée pour l'isoforme VEGF165 (72, 124, 132, 133). Celui-ci se lie près du domaine de liaison à l'héparine empêchant la liaison au récepteur du VEGF (72, 124). L'administration de ce médicament se fait de façon intravitréenne; la recherche fondamentale a permis de montrer que celui-ci inhibait la néovascularisation pathologique et les fuites vasculaires qui sont provoquées par la forte expression de VEGF (124). La thérapie ne permettait pas de retrouver une bonne acuité visuelle et, au fil du temps, les patients avaient une rechute pour la taille des lésions (pouvant s'agrandir) et des fuites au niveau des vaisseaux sanguins (72, 124).

Le Ranibizumab (Lucentis ©), approuvé par la FDA en 2006, est un médicament composé de fragments monoclonaux qui se lient à plusieurs isoformes : VEGF165, VEGF121 et VEGF110 (124). L'effet thérapeutique était plus efficace que la thérapie avec la vertéporfine (72). Celui-ci est aussi administré par injection intravitréenne (72).

Le Bevacizumab (Avastin ©), traitement approuvé par la FDA en 2004 pour le cancer, mais celui-ci est toujours à l'étude pour traiter la dégénérescence maculaire liée à l'âge de type néovasculaire, est un anticorps monoclonal murin humanisé se liant spécifiquement au VEGF humain (72). Le Bevacizumab permet l'inhibition de la liaison du VEGF au récepteur de surface des cellules endothéliales, Flt-1 et KDR (124). Les résultats sont équivalents à ceux observés au Ranibizumab.

Plusieurs autres médicaments font l'objet d'étude et ceux-ci ciblent différentes molécules dont le facteur dérivé des plaquettes (PDGF) ou l'angiopoïétine-2 (124). Malheureusement, certains patients répondent mal aux thérapies anti-VEGF qui sont, aujourd'hui, un standard pour contrer la diminution de la perte de la vue (134-136). De plus, certains patients perdent la vue malgré le traitement d'anti-VEGF et cela est causée par la formation de tissus cicatriciel dans la fovéa après deux ans de traitement (135-138). Certaines autres études cliniques rapportent que les thérapies anti-VEGF précipiteraient les patients vers une atrophie géographique (135). La science doit persévérer, afin de trouver des moyens efficaces de ralentir le processus de dégénérescence de l'EPR et de la membrane de Bruch qui mène vers des complications telles que la néovascularisation choroïdienne.

1.3 Modèle de néovascularisation choroïdienne

Pour l'étude de la DMLA néovasculaire, une technique a été adaptée chez les souris par une blessure induite au laser (139). Cette technique, décrite pour la première fois par Tobe en 1998, a été maintes fois testées (140). Celle-ci est la plus acceptée et la plus utilisée actuellement par la communauté scientifique faisant l'étude de la maladie (139-141). Ce modèle consiste à percer la membrane de Bruch à l'aide d'un laser ce qui entraîne la croissance des vaisseaux sanguins dans l'espace sous-rétinien de l'œil (139, 141). Cette méthode récapitule, de façon accélérée, certains processus biologiques complexes observés dans la DMLA humide chez l'humain tel que les cascades moléculaires qui ont permis la découverte des thérapies ciblées anti-VEGF (141). Certaines adaptations du protocole ont permis d'augmenter la précision du modèle comme exemple le changement de la lampe à fente vers le micron IV qui est doté d'une caméra à temps réel captant le fond de l'œil et cet appareil est adapté au modèle murin. (142).

Cette technique a permis l'étude d'interactions importantes et d'essais cliniques de certains prototypes de médicaments impliquant l'anti-VEGF (141-143). L'induction par laser de la néovascularisation choroïdienne permet aux chercheurs d'avoir du matériel biologique relativement plus rapidement et plus facilement accessible que chez certains types de modèles (par exemple : primate non-humain) ou chez l'humain (141). De plus, les souris n'ont pas besoin d'être manipulés génétiquement pour obtenir les lésions (141, 142).

1.3.1 Évolution de l'induction des néovaisseaux sanguins

Plusieurs étapes ont été très bien documentées dans l'induction de nouveaux vaisseaux sanguins qui croissent dans l'espace sous-rétinien (144). Les étapes sont les mêmes chez le rat et la souris (143). Ces étapes sont importantes pour déterminer l'arrêt de la séquence d'expérimentation chez notre modèle animal. Effectivement, après 14 jours, un processus cicatriciel s'installe, puisque ce modèle est un processus aigu de cicatrisation (90, 143).

L'apparition des nouveaux vaisseaux sanguins se fait trois jours après la blessure au laser (140). Les vaisseaux sanguins occupent généralement le centre de la blessure, mais ils sont faiblement

fonctionnels (144). L'ARNm de TGF- β 1 augmente au 3^e jour jusqu'au 14^e jour après l'induction ce qui laisse présager une croissance cellulaire (145). De plus, une augmentation des cellules immunitaires, comme les macrophages, les microglies et les monocytes, dans la rétine et l'espace sous-rétinien est observée provoquant de l'inflammation (87, 90, 144, 145). Au septième jour, la plupart des impacts de laser possèdent des néovaisseaux contrairement au 3^e jour (144). Ceux-ci occupent une bonne partie de la superficie de la blessure (144). À 10 jours, les vaisseaux sanguins sont complètement formés et occupent l'espace sous-rétinien (144). Plusieurs des études sont menées à la limite où la néovascularisation choroïdienne est active, soit à 14 jours (période d'activité 3 à 14 jours) (141, 145, 146). L'expression de l'ARNm du VEGF augmente du 3^e au 14^e jour, puis subit un déclin abrupt dans son expression (144, 146). Les études sur les processus de fibrose se font généralement dans les stades tardifs de l'évolution jusqu'à 35 jours après la blessure induite au laser ; l'apparition de fibroses dans les tissus débute dès le jour 7 (90, 134).

1.3.2 Modèle génétiquement modifié de la DMLA

Il ne faut pas oublier que les pathologies humaines ne possèdent pas le même équivalent chez les animaux c'est-à-dire que la symptomatologie peut différer (143, 147). En d'autres mots, les scientifiques induisent des conditions à des modèles animaux, comme les souris, mais ceux-ci ne montrent qu'un symptôme de la maladie qui afflige l'humain (143, 147). Il existe certaines souris mutantes associées à un phénotype sénescence (par exemple : les souris *cfh* *-/-*, les souris *Ccl2* *-/-* et *Ccr2* *-/-*, les souris *Sod1* *-/-* et bien d'autres) (142, 143). Ces souris sont créées dans le but de reproduire des processus observés dans la DMLA ayant une évolution distincte de la méthode développée et décrite par Tobe (141, 148). Elles peuvent développer spontanément des lésions au niveau des yeux ressemblant au phénotype de la DMLA (141, 142). Certaines de ces souches de souris auront ces lésions tardivement au cours de leur vieillissement (135, 136). Par exemple, les souris déficientes en protéine chimioattractante monocyte-1 ou du récepteur chimiokine CC de type 2 (*Ccl2* *-/-* et *Ccr2* *-/-*) possèdent des caractéristiques intéressantes pour les processus immunitaires menant à des agrégats de protéines, composés de complexes

immuns, de protéines régulant la voie du complément et d'IgG dans la rétine et l'EPR, puisque les macrophages n'ont plus la capacité de répondre adéquatement (147, 148).

1.3.3 Limites du modèle murin

Il existe des différences physiologiques entre l'œil murin et humain (67, 141). Celles-ci sont importantes à connaître pour déterminer les limites d'un modèle et les assomptions qui peuvent être faites entre la souris et l'humain. Il y a plusieurs différences dans les glandes ou le nombre d'os entourant l'œil humain versus celui de la souris, mais ceci ne compose pas la différence fondamentale dans le modèle de la pathogenèse de la DMLA (67). La souris ne possède pas de fovéa (5). En effet, la structure de cette partie de l'œil est différente au niveau de l'épaisseur de l'EPR et de la membrane de Bruch chez l'humain (5). De plus, il y a une large concentration des photorécepteurs dans cette structure (5). La souris possède une vision différente de celle humaine (67).

Bien que le modèle de néovascularisation choroïdienne soit accepté et utilisé parmi la communauté scientifique travaillant sur la DMLA, celui-ci possède plusieurs limites. La technique est une faible imitation de la pathologie dont les patients souffrent (141). Chez la souris, la blessure induite par laser du fond de l'œil est complètement cicatrisée au-delà de 14 jours contrairement à la condition humaine (141). Au contraire chez l'humain, l'évolution de la maladie est multifactorielle (interaction gène, environnement et habitudes de vie) et se développe probablement sur plusieurs mois, voire des années. Malheureusement, en utilisant ce modèle, la pathogenèse de la DMLA liée au vieillissement est perdue (142). De plus, cette méthode est une imitation d'une phase de la DMLA néovasculaire et elle exclut la DMLA de type atrophie géographique (141). Quant aux modèles d'animaux génétiquement modifiés, les lésions s'installent chez des souris vieillissantes, donc il y a un prolongement des durées des protocoles de soins (143, 147). À cet effet, l'élevage à long-terme de souris amène des coûts financiers importants (149). Les souris vieillissantes auront naturellement un déclin progressif de certains tissus et des comorbidités menant parfois à la mortalité dans les colonies (150).

Malgré les limites du modèle de CNV, celui-ci reste une technique validée, bien documentée et très utile (139, 141, 142). Il a permis de comprendre plusieurs mécanismes potentiels de la DMLA exsudative (143).

1.4 Le jeûne intermittent

Avant d'être étudié par la science, l'alimentation était déjà considérée comme un moyen d'améliorer sa condition de vie. Par exemple Francis Bacon, philosophe, ou George Washington ont associé la réduction de la consommation de nourriture à l'amélioration ou l'allongement de la vie (151, 152). Aujourd'hui, le monde du « fitness » valorise cette pratique pour augmenter les performances ou tout simplement encourage les vertus associées à la restriction alimentaire ou au jeûne (152, 153). Bien que ce soient des récits anecdotiques et de l'observation, l'ensemble de ces personnes citées ci-haut semblent avoir décelé quelques résultats amenés par Obsourne en 1917 et McCay en 1935 qui ont fait l'étude de la restriction calorique et son effet protecteur sur le vieillissement chez le rat (151, 154, 155). Depuis, le nombre de recherche sur ce champ d'étude n'a fait qu'augmenter.

De nombreuses études ont été faites sur le vieillissement et la longévité se basant sur les cycles d'alimentation (151, 156). Toutefois, il n'existe aucun consensus dans les types de modèle de recherche, c'est-à-dire que premièrement les chercheurs interchangent les différents types de cycles d'alimentation (restriction calorique versus jeûne intermittent) et deuxièmement certains ne définissent pas clairement le modèle qu'ils ont utilisé (157). Dans le cas de ce rapport, la restriction calorique (RC) est définie par une fraction de l'apport quotidien d'un groupe nourrit ad libitum (AL) (100% de la consommation) donnée au groupe sous RC (par exemple 70% de la consommation du groupe AL) sans toutefois causer de malnutrition (151, 158). Quant au jeûne intermittent, c'est une alternance de jour d'alimentation et de jour de jeûne (153). La restriction alimentaire possède des avantages comme de réduire le poids corporel, d'accroître la sensibilité à l'insuline, de diminuer les comorbidités existantes (maladies), permet de résister au stress et prolonge la durée de vie (159). Même si les vertus sont les mêmes, les manipulations ne sont pas les mêmes.

1.4.1 Restriction Calorique

La restriction calorique est, sans aucun doute, un type d'expérience très utilisé dans l'étude du vieillissement et du métabolisme ; celle-ci a été utilisée sur différents modèles d'animaux tels que

les rongeurs, le nématode (par exemple *C. Elegans*), la levure et la drosophile (160, 161). Cette méthode est associée à une intervention relativement facile et reproductible (158). Des études de divers champs d'intérêts ont été effectuées à partir du modèle de la restriction calorique pour les domaines de la gérontologie, de l'oncologie, de la neuroscience et de la toxicologie (159, 162). Les recherches menées ont pu déceler des réductions dans les niveaux de plusieurs hormones, des facteurs de croissances et de l'inflammation, de la réduction du stress oxydatif, de la prolifération cellulaire, d'amélioration de l'autophagie et l'association de plusieurs processus améliorés de réparation de l'ADN (158, 161). Les mécanismes moléculaires sous-jacents ne sont pas encore bien compris, mais certaines molécules sont probablement impliquées telles que l'IGF-1 (hormone peptidique favorisant la croissance osseuse et musculaire), le SIRT1 (protéine enzymatique qui a pour fonction la désacétylation des histones en réponse au stress inflammatoire, métabolique et oxydatif), le NAMPT (enzyme impliquée dans la conversion du NAD⁺), l'AMPK (permet l'équilibre homéostatique entre la consommation et la production d'ATP par phosphorylation), le PGC-1 α (métabolisme énergétique), le mTOR (enzyme régulant la prolifération, la mobilité, la croissance et la survie cellulaire,), le GSK3 β (protéine agissant comme régulateur du glucose, de la signalisation de la voie Wnt et régulation de facteurs de transcription des microtubules) et le FGF21 (protéine permettant la régulation du glucose et des lipides dans le tissu brun et les muscles squelettiques) (tableau I) (153, 158, 163).

1.4.1.1 Paramètres de l'étude de restriction calorique

Le modèle général du protocole de restriction calorique (RC) possède deux groupes, soit des souris nourries ad libitum, à volonté, soit des souris sous expérience de restriction calorique (151). Les souris sous le régime AL sont le groupe contrôle où la nourriture est pesée pour connaître leur consommation. Dans certains types de protocole, la moyenne de cette nourriture pesée permet de faire l'apport quotidien (en pourcentage) qui sera donnée aux souris sous RC (151). Les souris sous RC reçoivent une partie de la consommation des souris AL, c'est-à-dire que l'expérimentateur peut décider de donner, par exemple, que 70% de l'apport de la consommation des souris AL (151). Le standard établi dans l'apport calorique se situe entre 20 à 50% de la consommation des souris contrôles (151, 162, 164). Cette méthode ne permet pas de respecter

les facteurs individuels de chaque souris, certaines souris consommant plus ou moins que d'autres et cela peut se répercuter sur les résultats en augmentant la variabilité intra-groupe (tableau I) (151).

D'autres protocoles utilisent une moyenne de la consommation des souris sous RC lors de leur acclimatation où celles-ci sont nourries AL (151). Cette façon de faire ne permet pas de suivre les courbes de développement chez la souris (151). Lors de leur croissance, la consommation de nourriture chez les souris augmente, puis atteint un plateau à l'âge adulte et, ensuite, la consommation de nourriture diminue à la vieillesse (151). Selon les études, la restriction calorique atteint ses effets maximaux lorsque les animaux reçoivent 40 à 45% de leur apport initial, lorsque cette limite est dépassée des effets négatifs se font ressentir sur la prolongation de la durée de vie (151).

Dans les protocoles de restrictions caloriques, les souris consomment très rapidement leur nourriture (153, 165). Elle n'est souvent fournie qu'une seule fois par jour et les souris la dévorent en moins de deux heures ce qui cause une restriction temporelle supplémentaire (153, 165). Selon l'étude de Pak et al. 2021, le jeûne que les souris s'imposent est nécessaire pour assurer les bienfaits observés dans la RC (165). Cette étude est la première à s'être penchée sur la question de ce jeûne que s'imposaient les souris sous RC avec un repas par jour, même si le phénomène de « frénésie alimentaire » était observé dans d'autres études (165, 166). Ils sont venus à la conclusion que le jeûne entre les repas était bénéfique pour le métabolisme et pour la longévité et qu'à lui seul il était capable de conférer une signature métabolique semblable à la restriction calorique classique (165). Les souris sous RC perdent du poids comparativement à leur congénère sous un régime AL et leur perte de poids est proportionnelle à la sévérité de la restriction (151, 159).

Les études sous RC doivent être menées en hébergeant les animaux individuellement pour obtenir un meilleur contrôle de la consommation de chaque souris (165). Dépendamment du groupe de chercheur, le groupe AL (contrôle) peut ne pas être réellement nourri à volonté, c'est-à-dire qu'il prédétermine un nombre de calories qu'ils administrent à tout le groupe afin d'avoir un meilleur contrôle (151, 162, 167). Bien que ce ne soit pas toutes les études, cette manière de

procéder provoque une certaine forme de restriction calorique chez certaines souris qui pourraient individuellement manger plus contrairement à une autre.

Une critique a été formulée de la part d'un groupe de chercheur, Cerqueira et Kowaltowski (2010), sur la façon dont les protocoles de RC sont élaborés de nos jours. Lorsque McCay en 1935 a réalisé cette méthode, les souris recevaient une supplémentation de vitamines et de minéraux pour pallier les manques en nutriment (154, 157). L'arrivée sur le marché des régimes contrôlés offert par les entreprises, dont les valeurs nutritives étaient balancées, la supplémentation a été abandonnée (157). Selon Cerqueira et Kowaltowski, ces régimes contrôlés seraient sur-supplémentés à la base, donc les expérimentateurs ne penseraient pas que ce soit nécessaire de le faire (157). Il serait fort probable que les souris sous les protocoles de RC soient dénutries, ainsi les résultats pourraient être dus au régime hypo-calorique ou à l'effet d'un nutriment en faible quantité ou présent sous forme de trace (157).

1.4.1.2 Restriction diététique

Dans certains autres protocoles, les animaux subissent une restriction de certains nutriments spécifiques de leur alimentation. Ces protocoles sont appelés la restriction diététique, mais la littérature ne fait pas bien la différence entre les termes (RC vs restriction diététique) (151, 168). La restriction peut être une réduction accrue des protéines, des lipides, des glucides et des niveaux très bas ou absence de certains acides aminés (méthionine, tryptophane, etc.) (168-170). Ces restrictions n'engagent généralement pas un déficit calorique, mais un déficit au niveau du contenu alimentaire délivré aux souris (169). Dans le cas de la restriction de la méthionine, dont celle-ci est réduite dans l'alimentation du groupe expérimental, les souris auraient les mêmes avantages bénéfiques sur la santé que les animaux subissant une RC classique, c'est-à-dire un retard des effets du vieillissement qui impacte l'apparition de l'âge de la mortalité (169, 171). Ils ont aussi observé une baisse de l'insuline, du glucose et d'IGF-1 qui est commun à la RC (169). Des études ont aussi montré que la restriction protéique prolongeait la vie des rongeurs, cette intervention diététique serait une alternative supplémentaire à la restriction alimentaire (172). Cependant, les études sur la restriction diététique ne semblent pas arrivées à des résultats

convaincants, puisqu'ils existent des effets confondants associés à la diminution de certains nutriments et de la mortalité précoce accrue chez les rongeurs en restriction protéique et de tryptophane (tableau I) (172, 173).

1.4.2 L'alimentation à durée limitée dans le temps

L'alimentation à durée limitée dans le temps (TRF [time restricted feeding]) est un autre modèle utilisé dans la recherche et il est souvent associé aux recherches sur le cycle circadien (174-176). Il existe un champ d'intérêt, relativement récent, appelé la chrono-nutrition s'intéressant à la relation entre le cycle circadien et le métabolisme (175, 177). Le modèle du TRF est souvent utilisé dans ce champ (175, 177). Les études du cycle circadien et l'alimentation TRF ont permis de constater que ce rythme d'alimentation chez les rongeurs permettait de réaligner l'horloge circadien, c'est-à-dire en rétablissant les cycles éveils-sommeils naturels (178). Les gènes associés au cycle circadien subissent aussi une régulation, lorsque ce régime est pratiqué (par exemple : CLOCK et BMAL-1) (178). À titre d'exemple, le TRF peut éliminer les comportements de grignotement durant les phases sans activité (176, 178). Les mécanismes de la TRF, comme la RC, ne sont pas encore élucidés, mais il agit probablement sur plusieurs voies de signalisation dont BMAL-1, CLOCK, PPAR γ (164, 174, 178). Puisque les recherches utilisant ce modèle s'intéressent au cycle circadien, les voies ciblées sont en relation avec l'oscillation des voies des horloges circadiens, mais celles-ci sont aussi retrouvées dans les hypothèses de la RC soit l'activation du CREB [*C-AMP response Element-binding protein*], l'AMPK et mTOR (tableau I) (164, 176).

1.4.2.1 Paramètre du modèle TRF

Ce modèle consiste à restreindre l'accès à la nourriture d'une cohorte de souris durant un temps prédéfini (moins de 12 heures), mais celles-ci reçoivent la même quantité de nourriture que les souris AL (174, 179). Plusieurs études préfèrent donner l'accès à la nourriture aux souris durant la nuit pour respecter le cycle éveil-sommeil, puisque c'est un animal nocturne (153, 174, 175).

Malheureusement, plusieurs protocoles, comme la RC, donnent accès à la nourriture plutôt le matin (153, 174, 175). Par contre, des études mentionnent qu'il n'y a aucun changement au niveau de la durée de vie des rongeurs en fournissant la nourriture au début du cycle de lumière ou durant la phase d'obscurité (165). La TRF peut être initiée tôt ou tard dans la phase sombre, bien que des études ont montré que débiter tardivement durant la nuit diminuerait l'efficacité des effets (179, 180). La TRF n'a pas à être suivie de façon très stricte, tel que montré par une étude en 2014, où il y a eu des interruptions du protocole la fin de semaine pour certains groupes de rongeur (179). Ces écarts de protocole reproduisent les comportements humains chez qui la compliance est souvent variable (179) (tableau I).

1.4.3 Lien obésité, inflammation et cicatrisation

L'obésité est un sujet au cœur des maladies métaboliques et une condition omniprésente dans nos sociétés (164, 181). La recherche s'intéresse à ce sujet, afin de trouver des solutions et de mieux connaître les mécanismes sous-jacents à cette condition (181, 182). Les modèles de perte ou de maintenance de poids s'illustrent dans les théories ou les protocoles de restriction calorique, de restriction diététique et de jeûne intermittent (IF) (ou de TRF) qui ont été présentés précédemment. L'obésité est souvent au centre des protocoles de RC ou d'IF. Il semble que le fait de jeûner permet de contrer les effets nocifs amenés par l'obésité, c'est-à-dire qu'il renverserait certaines voies métaboliques (181). Une étude randomisée menée chez l'humain a montré qu'un régime TRF, dont celui-ci était de 1500 à 1800 kcalories pour les hommes et de 1200 à 1500 kcalories pour les femmes durant 12 mois, chez des patients obèses, montraient des améliorations au niveau du glucose, des lipides et de l'indice HOMA-IR (indice de la résistance à l'insuline) (152, 183, 184). Les participants de l'étude sous le régime TRF ont perdu en moyenne sur 12 mois que huit kg avant que le poids se stabilise (152).

Dans l'étude de Hatori et al. de 2012, ils ont montré que l'état inflammatoire induit par l'obésité dans les différents tissus adipeux était réduit dans les souris nourries sous un régime TRF (181). Des études menées chez les rongeurs et chez des humains obèses ont montré qu'une

alimentation IF diminuait de façon significative les taux de TNF (le facteur de nécrose tumorale) et IL-6 circulant (181, 185).

En lien avec les profils inflammatoires, il existe peu d'études sur la restriction calorique soumettant les tissus des animaux aux séquençages à haut débit dans le but d'avoir un éventail de profil cellulaire (186). Une étude récente a permis d'obtenir l'expression transcriptomique à l'échelle unicellulaire chez les rats soumis à un protocole de RC (186). Les chercheurs ont utilisé la technologie du *single-cell RNA-sequencing* pour fournir les réponses (186). Même si l'étude a été menée chez le rat âgé soumis à une RC, ils ont pu déceler un inversement des phénotypes associés au vieillissement dont la diminution de l'état inflammatoire et un changement de la polarisation des macrophages (état inflammatoire réprimé) (186).

Il y a quelques études sur les modèles de cicatrisation et la restriction alimentaire, mais le répertoire est très limité (présents dans diverses espèces et tissus sans confirmation des résultats) (187-190). Dans le chapitre 3 de ce document, la présentation d'un modèle d'une brûlure au fond de l'œil chez la souris permet d'imiter la néovascularisation choroïdienne observée dans un type de DMLA et d'un processus de cicatrisation (141). Christovam et al (2019) ont mené une étude chez des souris sous régime RC d'un mois leur infligeant au 18^e jour une plaie cutanée dorsale (188). Leur étude a permis d'observer que ce type d'alimentation augmentait la capacité de cicatrisation et une augmentation du VEGF et du FGF2 (188). Une autre étude chez le rat et le singe montre une fermeture de la plaie légèrement plus rapide (189). Des souris sous HFD, connues pour des altérations métaboliques également au niveau de la cicatrisation, ont été soumises à un régime TRF sous un court laps de temps (10 jours) (187). Ils ont trouvé qu'il n'y avait aucun changement sur la fermeture de la plaie (187). Le temps requis était le même entre le groupe HFD TRF et HFD pour la fermeture (187). Le temps du régime TRF était-il adéquat dans cette étude ? Les résultats de l'ensemble de ces études ne semblent pas montrer que le processus de réparation et de cicatrisation des plaies soient améliorées lors d'une restriction alimentaire.

1.4.4 Jeûne intermittent

Le jeûne intermittent est une alternative aux autres protocoles présentés. Les recherches avaient conclu que l'apport faible en calories permettait les effets positifs sur la santé chez les animaux (165). Il a été montré par Pak et al. 2021 que l'apport faible en calories n'était pas une composante importante d'un régime, mais plutôt le temps de jeûne imposé entre les repas (165). De plus, l'un des avantages d'utiliser le jeûne intermittent est que l'animal perd peu ou pas de poids, selon les types de modèles choisis (par exemple les souris C57BL/6) (165). Les implications de ce type de protocole mènent à des différences méthodologiques et de résultats (par exemple, le IGF-1 est augmenté dans le jeûne intermittent contrairement à la restriction calorique où il est diminué) bien que les mécanismes soient toujours inconnus (159). Des études ont montré qu'il y avait plusieurs avantages à utiliser le jeûne intermittent augmentant les niveaux des enzymes antioxydants, des facteurs de protections dans le système neuronal (par exemple le BDNF (facteur neurotrophique dérivé du cerveau) permettant d'activer une cascade d'évènements pour stimuler le développement de l'activité synaptique des neurones de l'hippocampe), l'autophagie et stimule la sécrétion de chaperonnes telles que HSP70 et GRP-78 (c'est-à-dire que l'activité mitochondriale est augmentée) (164, 191). Les souris sous jeûne intermittent ont une plus grande sensibilité à l'insuline, mais, contrairement aux études sur les régimes RC, celles-ci possèdent des taux élevés de β -hydroxybutyrate ce qui suggère une régulation métabolique différente, soit la cétose (159, 164, 192) (tableau I).

1.4.4.1 Paramètres du modèle de jeûne intermittent

Le jeûne intermittent ressemble à un sous-type de TRF. Celui-ci est caractérisé par des alternances d'alimentation et des périodes de jeûne (153). Le modèle classique utilisé dans la recherche chez les rongeurs est le modèle d'alimentation tous les deux jours qui consiste à avoir une période d'alimentation de 24h pour une période de jeûne de 24h (avec accès à l'eau) (IF 1 :1) (153). Comme il a été mentionné précédemment, l'un des avantages de ce protocole est que les souris sous IF ne perdent pas de poids (159). Effectivement, des études ont montré que les souris sous

diète IF 1 :1 consommaient le même nombre de calories sur 24h que les souris sous diète AL, donc les souris IF font du « rattrapage » alimentaire (tableau I) (153, 159).

Une alternative existante au modèle de jeûne classique, où les humains ont une possibilité plus facile à y adhérer et, dont, les vétérinaires préfèrent son utilisation, est le modèle de jeûne 2 :1. Ce modèle d'alimentation consiste à jeûner durant 24h et donner accès pour 48h à la nourriture ce qui fait de lui un protocole moins drastique que l'IF 1 :1 (193). Ce protocole de deux jours d'alimentation pour une journée de jeûne (avec accès à l'eau) (IF 2 :1) est aussi isocalorique comme montré par les autres protocoles ci-haut, c'est-à-dire que les souris mangent autant que les souris AL au bout de deux jours d'alimentation (176, 193, 194). Certaines études remettent en question le fait qu'une diète IF 1 :1 soit isocalorique comparativement à une diète normale, puisque les souris qui y sont soumises n'ont pas le même gain pondérale (193, 195). En effet, des études montrent une diminution de poids chez les souris IF 1 :1, malgré la théorie dans laquelle le jeûne intermittent ne devrait pas affecter le poids corporel des souris (193, 195).

Un autre régime de jeûne utilisé est le régime périodique (ou jeûne périodique) sous forme 5 :2 où les souris subissent deux jours par semaine un jeûne avec accès à l'eau ou peu de calories et cinq jours d'alimentation (176). Les jours de jeûne ne sont pas consécutifs dans ce protocole (172).

Le choix des souches de souris choisies est important dans l'étude. Celles-ci réagissent différemment aux protocoles, parce qu'une souris transgénique ne porte pas le même bagage génétique et ne mangeront pas de la même façon (prise de poids, adaptation à la diète, etc.) (151, 165, 196-198). Bien connaître l'espèce et la souche choisit est crucial lors de manipulation alimentaire, car même si l'étude utilise des souches consanguines, donc normalement identique génétiquement, elles peuvent répondre différemment à la restriction alimentaire dans le groupe (170, 198).

1.4.4.2 Combinaison de modèles

Des protocoles alimentaires délivrent une partie de la nourriture, selon un horaire établi (162). Ce protocole nécessite une connaissance du nombre de calories (ou du poids) de la nourriture donnée au groupe contrôle et expérimental, comme décrit dans la section de restriction calorique (162). La nourriture fournie aux animaux est donnée en portion, c'est-à-dire que chez les souris AL, ils peuvent recevoir 1/7 de la portion allouée chaque jour du lundi au jeudi (totale remise : 4/7). Le vendredi, afin que le personnel ait du repos, 3/7 de la portion totale est remise (totale de la semaine 7/7) (162). Tandis que pour les souris sous le régime RC, celui-ci est entrecoupé de pause, donc 2/7 de la nourriture est remise le lundi et mercredi (totale remis 4/7), puis 3/7 le vendredi (totale remise au courant de la semaine 7/7) (162). Les souris RC peuvent recevoir une quantité moindre de nourriture dans l'allocation totale (une portion (%) de ce que reçoit les souris AL) (162).

Tableau I Récapitulatif des modèles d'alimentation

Modèle d'alimentation	Caractéristiques	Biais de recherche
Restriction calorique	<ul style="list-style-type: none"> • Régime hypocalorique (20 à 50% du régime des souris AL) • Voie moléculaire possiblement impliquée : IGF-1, SIRT-1, NAMPT, AMPK PGC-1α, GSK3β et FGF21. • Les taux sanguins d'insuline, de glucose et d'IGF-1 diminuent. 	<ul style="list-style-type: none"> • Sujette à la frénésie alimentaire • Les souris faussement AL (le chercheur pré-contrôle le nombre de calories ingéré pour ce groupe) • Le manque supplément vitaminique peut suggérer que les animaux sont dénutris.

	<ul style="list-style-type: none"> • L'âge de mortalité augmente. • Alternative : Restriction diététique (restreindre nutriment dans alimentation (acide aminée, protéine, etc.) 	<ul style="list-style-type: none"> • Les nutriments causent-t-ils les bénéfices observés ou c'est la restriction de nourriture ? (Effet confondant)
Alimentation à durée limitée dans le temps	<ul style="list-style-type: none"> • Régime associé au cycle circadien (régulation du cycle) • Voie signalisation possiblement impliquée : PPARγ, CLOCK, BMAL1, CREB, AMPK et mTOR • La quantité de nourriture est la même pour tous les groupes, mais le temps pour s'alimenter diffère (moins de 12h) 	<ul style="list-style-type: none"> • Les effets ne seraient pas les mêmes quand la nourriture est administrée le matin, le jour, le début de la nuit ou la fin de la nuit.
Jeûne intermittent	<ul style="list-style-type: none"> • Alternance jour d'alimentation et jour de jeûne • Alimentation isocalorique avec la diète AL 	<ul style="list-style-type: none"> • Normalement sans perte de poids • Rattrapage alimentaire

	<ul style="list-style-type: none">• Augmentation IGF-1, sensibilité à l'insuline et le β-hydroxybutyrate.• Augmentation enzyme anti-oxydant, facteur de protection neuronale (BDNF), l'autophagie et les chaperonnes (HSP-70 et GRP-78).	
--	--	--

Chapitre 2 – Hypothèse de recherche

La DMLA est une maladie multifactorielle dont la génétique, l'environnement et le style de vie peuvent influencer son apparition et sa progression. L'étude longitudinale AREDS a montré au travers de ces cohortes qu'un changement d'alimentation et de supplémentation alimentaire pouvaient améliorer la progression de la DMLA dans les stades les plus avancés, c'est-à-dire de type néovasculaire ou atrophie géographique. L'obésité est associée à de nombreux troubles métaboliques (diabète, hypercholestérolémie, pression élevée, etc.) et l'augmentation de certaines maladies dont la DMLA. Les changements au niveau de l'alimentation telle que la restriction alimentaire ont montré des effets positifs sur les impacts nocifs causés par l'obésité, c'est-à-dire une sensibilité à l'insuline, diminution des taux sanguins de glucose et un meilleur bilan lipidique. De ce fait avec les données encourageantes dans les modèles de rongeurs de différentes études, nous pensons que le jeûne intermittent peut avoir un effet sur la néovascularisation choroïdienne, soit une réduction, dans la DMLA, puisque la restriction calorique peut réduire l'angiogenèse dans des modèles de cancer (199, 200). Puisqu'il n'y a pas d'études comparatives jusqu'à ce jour, nous croyons pouvoir avoir les mêmes effets observés dans le cancer chez la CNV (199). Un modèle murin sera utilisé pour induire les phases de néovascularisation par laser. L'utilisation de différentes diètes contrôlées permettra l'étude de l'effet d'une diète saine (RD [*regular diet*]) versus une diète riche en graisse (HFD [*high fat diet*]) avec l'effet d'un cycle d'alimentation à volonté ou de jeûne intermittent sur la néovascularisation choroïdienne dans un modèle de DMLA murin. Dans un premier temps, l'étude des caractéristiques phénotypiques des souris sous le régime de jeûne intermittent (IF [*intermittent fasting*]) sera comparée aux souris sous un régime Ad Libitum (AL). De plus, l'une des hypothèses émises est que les souris sous un régime HFD-IF auront un phénotype proche des souris sous le régime RD-AL. Cette caractérisation se fera par l'utilisation du gain de poids, le test de résistance à l'insuline et du glucose et la comparaison des poids des tissus adipeux épидидymaires. Dans un second temps, l'effet protecteur du jeûne intermittent sur la néovascularisation choroïdienne sera évalué dans un modèle murin induit par laser.

Chapitre 3 – Matériels et méthodes

3.1 Modèle de jeûne intermittent 2 :1

Le modèle de jeûne intermittent utilisé pour les expériences est un protocole intermédiaire, c'est-à-dire à mi-chemin entre un protocole strictement TRF et un de jeûne intermittent. La raison principale de ce choix est l'application de faisabilité pour des cohortes humaines pour de futures expériences. Le jeûne intermittent est moins difficile d'application qu'une restriction calorique. Par contre, le jeûne classique, soit d'une alternance d'un jour de jeûne pour un jour d'alimentation, n'est pas toujours envisageable pour tous. Donc, le choix du modèle d'une journée de jeûne pour deux jours d'alimentation a été choisie (193, 194).

Tableau II Composition des diètes utilisées dans le protocole d'alimentation

Ingrédients		Diètes			
Type	Nom	RD (12450J)		HFD (D12492)	
		Kcal	g	Kcal	g
Protéine	Caséine, lactique, 30 mesh	800	200	800	200
	L-cystéine	12	3	12	3
Glucides	Fécule de maïs	2024,8	506,2	0	0
	Lodex 10	500	125	500	125
	Sucrose	275,2	72,8	275,2	72,8
Fibre	Solka Floc Fcc 200	0	50	0	50
Gras	Huile de Soja	225	25	225	25
	Lard	180	20	2205	245
Minéraux	S10026B	0	50	0	50
Vitamine	V10001C	40	1	40	1
	Choline Bitartrate	0	2	0	2
Colorant	FD&C Yellow DYE #5	0	0,04	0	0
	FD&C Blue DYE #1	0	0,01	0	0,05
	Total	4057	1055,05	4057	773,85
	Énergie composition	100		100	
	Protéine	20		20	
	Carbohydate	70		20	
	Gras	10		60	

Le modèle de jeûne intermittent, qui a été choisi, est une alternance d'un jour de jeûne et de deux jours d'alimentation. Il est largement moins exigeant que le jeûne classique (1 :1). L'IF 2 :1 est illustré à la figure 7 de la section B) où les souris sont soumises à un jeûne intermittent de 16h, puis une réalimentation de 56h. Un cycle complet de ce protocole est de trois jours (72h). Le type de nourriture fournit dans les deux conditions est soit du RD (D12450J; <https://researchdiets.com/en/formulas/d12450j>) ou HFD (D12492; <https://researchdiets.com/formulas/d12492>) est composé de 60% kcalories de matière grasse provenant du lard (tableau II pour le contenu complet).

Des souris mâles ont été sélectionnés pour diminuer les variables hormonales confondantes de l'étude, puisque ceci est une étude exploratoire. Les souris sont soumises dès la troisième semaine (J21) de vie à une acclimatation de diètes soit RD ou HFD AL (figure 8). Celles-ci sont aléatoirement séparées dans les différents groupes. Cette acclimatation dure deux semaines et, à cette étape, le suivi du poids des souris se fait une seule fois par semaine. À la cinquième semaine (J35) de vie, les souris sont séparées à nouveau en deux autres groupes possibles, soit AL ou IF, ce qui fait quatre groupes à l'étude (figure 8).

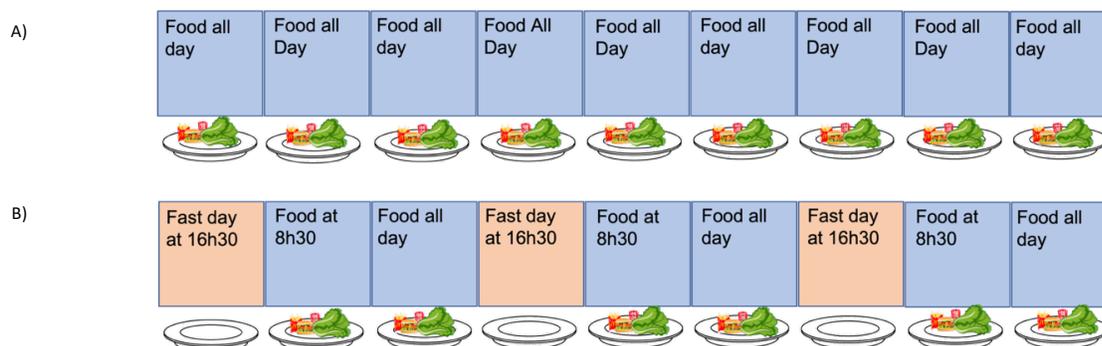


Figure 7. Modélisation des cycles de nourriture

A) Les souris sous le cycle de diète Ad libitum, à volonté, ayant accès à la nourriture en tout temps que ce soit sous la diète RD ou HFD **B)** Les souris sous le cycle de diète IF, jeûne intermittent 2 :1, ayant un retrait de nourriture à partir de 16h30 le jour de jeûne et remise de la nourriture à 8h30 le lendemain matin. L'accès à la nourriture pour les souris IF est de 56h jusqu'au prochain que ce soit pour la diète RD ou HFD.

Les souris sous la diète IF (HFD ou RD) dès la cinquième semaine (J35) subissent une pesée et changement de cage à 16 h 30 où débute leur première nuit de jeûne (figure 8). Une nouvelle cage est fournie aux souris où celles-ci ont accès, en tout temps, à une bouteille d'eau. Les souris sont hébergées en groupe, puisqu'une étude a montré qu'il n'y avait pas d'effet de compétitivité et d'agressivité pour la nourriture (151). Ceci est aussi pour respecter leur espèce de type grégaire. À 8 h 30 le lendemain matin, celles-ci sont pesées à nouveau afin de connaître l'évolution de leur poids. Puis, elles sont transférées dans leur ancienne cage de logement. Quant aux souris sous diète AL (HFD ou RD), elles subissent le même processus, mais elles ont accès à la nourriture toute la nuit. Toutefois, les manipulations de pesées et de changement de cage sont aussi répétées pour ce groupe pour les traiter de manière identique.

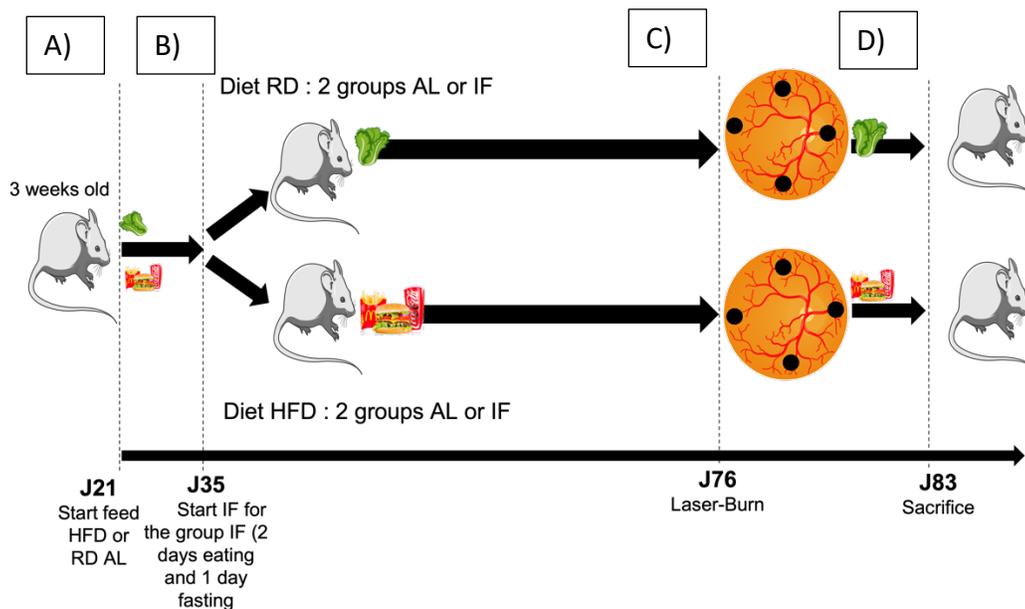


Figure 8. Schéma du protocole entier J21 (inclusion au protocole) au J83 (sacrifice)

A) Les souris sont soumises à la 3^e semaine de vie (J21), dès leur sevrage, à une acclimatation sur une des diètes RD ou HD pour 2 semaines. **B)** À partir de la semaine 5, les différents cycles d'alimentation (IF ou AL) débutent durant 6 semaines. **C)** À la 11^{ème} semaine (jour 76), l'induction de la néovascularisation par laser avec le micron IV© pour les 4 groupes et la continuation de la poursuite des diètes. **D)** Le sacrifice s'effectue 7 jours plus tard, à la 12^{ème} semaine (jour 83).

Les images ayant permis de faire les schémas proviennent de Servier Medical art by Servier is licensed under CC3.0 unported license..

Ces manipulations sont effectuées durant six semaines consécutives pour chacun des groupes, jusqu'au jour 76. L'initiation de la blessure par laser est effectuée au jour 76 avec le dispositif

micron IV pour tous les groupes : RD-AL, RD-IF, HFD-AL et HFD-IF (voir section modèle de néovascularisation choroïdienne). Les souris sont resoumises à leur diète durant sept jours, correspondant au moment de l'effet maximal de l'inflammation, jusqu'au jour 83 où est pratiqué l'euthanasie.

Le projet de jeûne intermittent est une étude exploratrice réalisée dans les installations du centre de recherche de l'hôpital Maisonneuve-Rosemont. Le principal critère d'évaluation de notre étude était de déterminer s'il existe un potentiel effet du jeûne intermittent dans un modèle murin de néovascularisation choroïdienne induite par laser. Le calcul de la taille de nos échantillons s'appuie sur les données publiées par Andriessen et Al 2016 où les souris sous un régime HFD avaient une néovascularisation 1,7 (SD ± 0,5) fois plus importante que chez les souris sous un régime RD (201). Notre étude a été construite pour permettre d'identifier à l'aide d'un t test une différence de néovascularisation choroïdienne entre les groupes AL et IF supérieure ou égale à 1,5 (SD ± 0,5) fois. Nous avons utilisé l'outil Clinicalc, accessible gratuitement en ligne (<https://clincalc.com/stats/samplesize.aspx>) permettant d'effectuer les calculs de notre échantillonnage. Dans l'outil, nous avons fixé les paramètres de puissance statistique à 80% ($\beta=0,2$; erreur de type II) et une probabilité d'erreur de type I à 5% ($\alpha=0,05$). Nous avons déterminé avec ces paramètres qu'une néovascularisation choroïdienne de 1,5 fois nécessitaient des groupes de 16 animaux par condition.

Équation 1. Calcul de taille de l'échantillon

$$k = \frac{n_2}{n_1} = 1$$

$$n_1 = \frac{(\sigma_1^2 + \sigma_2^2/k)(z_{1-\alpha/2} - z_{1-\beta})^2}{\Delta^2}$$

$$n_1 = \frac{(0,5^2 + 0,5^2/1)(1,96 + 0,84)^2}{0,5^2}$$

$$n_1 = 16$$

$$n_2 = K * n_1 = 16$$

Tableau III. Définition des unités utilisées dans le calcul de Clinicalc pour la taille de l'échantillon

SYMBOLE	DÉFINITION
Δ	Valeur absolue de la différence entre deux moyennes
σ_1, σ_2	La variance de la moyenne de l'échantillon 1 et 2
n_1	Taille de l'échantillon 1
n_2	Taille de l'échantillon 2
α	La probabilité de l'erreur de type I (habituellement à 0,05)
β	La probabilité de l'erreur de type II (habituellement à 0,2)
z	Les valeurs de Z critiques données à α et β . Cette valeur représente la dispersion des données autour de la moyenne en multipliant par l'écart-type.
k	Le ratio de la taille de l'échantillon du groupe 2 et du groupe 1

Dans cette étude, nous avons des critères d'évaluation secondaire comme l'interaction entre le cycle d'alimentation (IF vs AL) et la composition de la nourriture (RD vs HFD), ces analyses ont été effectuées par Two-Way ANOVA, mais elles n'ont pas été prises lors du calcul de la taille de l'échantillon.

3.2 Expérience cycle de nourriture

Deux types d'expérience de consommation de nourriture ont été réalisées, afin de caractériser les habitudes de consommation des souris sur le type de diètes et sur le cycle d'alimentation.

3.2.1 Expérience alimentation sur cycle complet

Il a été mentionné à plusieurs reprises dans la littérature que les souris sous la diète de jeûne intermittent consommaient le même nombre de calories lors de la reprise de leur alimentation ad libitum (153, 159). Puisque ce protocole est moins utilisé dans la recherche que le jeûne 1 :1 (classique), il est important de vérifier si les souris IF consomment autant que les souris sous régime AL peu importe leur type de diètes.

Cette expérience est basée sur le protocole de la section du modèle IF 2 :1. Celle-ci est effectuée aux environs du jour 56 (soit environ à la 3^e semaine après le début des cycles d'alimentation) permettant aux rongeurs de s'adapter à leur diète. Les souris dans ce protocole sont hébergées dans des cages nouvelles et propres dont la responsabilité de tout changement au niveau des cages est celle de l'expérimentateur ; les techniciennes de l'animalerie doivent aviser pour ne pas fausser l'expérimentation (exemple, une bouteille qui fuit).

Le cycle de jeûne débute à 16 h 30 (T0), lorsque la nourriture est retirée pour les groupes de souris du régime IF (RD et HFD) (figure 9). La nourriture est pesée et comptabilisée. Pour les souris sous régime AL (RD et HFD), les souris sont transférées dans une nouvelle cage et la nourriture est pesée (figure 9). À 8 h 30 le lendemain matin, soit 16h plus tard, les souris sous IF ont maintenant accès à la nourriture préalablement pesée (figure 9). À noter que les étapes qui ont été décrites précédemment, avec les changements de cages et la pesée des souris, doivent être respectées (voir modèle de jeûne intermittent 2 :1). Pour les souris AL, la cage est nettoyée pour obtenir toute la nourriture, dont celle du grillage et celle tombée au fond de la cage, pour être comptabilisée. Le deuxième jour du cycle, soit 40 h plus tard après le temps initial, les cages sont nettoyées pour les quatre groupes afin de comptabiliser le poids de la nourriture (figure 9). Le troisième jour du cycle, 64 h plus tard, il y a deux mesures à prendre (à 64 h et 72 h) avant le début d'un autre cycle. La mesure à 64 h est la même chose que les étapes de 40 h (figure 9). À 72 h, il y a une étape de nettoyage de la cage et de comptabilisation de toute la nourriture pour les quatre groupes (même chose que les étapes précédentes). En revanche, il y a le retrait de la

nourriture a effectué pour les souris IF, puisque le début d'un nouveau cycle de jeûne débute (16 h 30) (figure 9).



Figure 9. Expérience de l'habitude alimentaire chez les souris AL vs IF sur un cycle complet (72h)

A) Les souris AL (RD et HFD) reçoivent une quantité de nourriture préalablement pesée au premier jour du cycle (T0H), cette nourriture est repesée à T16H, T40H, T64H et T72H et celle-ci est comptabilisée. **B)** Les souris IF (RD et HFD) sont en jeûne à la première nuit du cycle (T0H à T16H). Celles-ci reçoivent de la nourriture préalablement pesée à T16H post-jeûne et débute le cycle de consommation de nourriture où celle-ci sera aussi pesée à T40H, T64H et T72H. La nourriture est ensuite enlevée à T72H pour recommencer un nouveau cycle de jeûne.

3.2.2 Expérience alimentation sur 6h

Cette expérience a été faite dans le but de connaître les habitudes post-jeûne des animaux pour comparer avec les groupes contrôles ad libitum. Il est important de noter que le protocole à suivre pour cette expérience est élaboré à partir de la première partie du modèle détaillée à la section « modèle de jeûne intermittent 2 :1 » sur la mise en jeûne des souris et du traitement des souris contrôles.

Une nouvelle cage d'hébergement est préparée pour chacun des groupes de souris (RD-AL, HFD-AL, RD-IF et HFD-IF). La nourriture pour chacune des conditions est pesée, puis déposée dans le grillage des cages. Les souris sont placées dans leur nouvelle cage d'hébergement où la nourriture sera pesée et comptabilisée à chaque heure pour une durée de 6 heures. Il est important de bien nettoyer la litière afin de trouver toute nourriture qui aurait pu tomber au fond de la cage, surtout

pour la nourriture HFD qui s'émiette énormément. De plus, les souris ont tendance à cacher leur nourriture près de leur nid.

3.3 Modèle de néovascularisation choroïdienne

Le modèle de néovascularisation choroïdienne a été élaboré à partir du modèle d'induction par laser de l'article paru dans Nature de Lambert et al. (141). Dans ce modèle, la souche de souris choisie est cruciale pour une étude adéquate du fond de l'œil, c'est pourquoi, nous avons choisi d'utiliser la souche de souris C57BL6/J (source : <https://www.jax.org/strain/000664>). Cette souche est bien décrite pour ce protocole et possède des avantages d'utilisation, dont le fond de l'œil pigmenté qui permet la visualisation et une meilleure réponse au laser (141, 142).

La procédure par laser pour l'induction de la CNV se fait au jour 76, ce jour a été calculé et synchronisé pour que chaque groupe arrive sur une journée de diètes AL. Pour les souris sous régime IF, ceci correspond au jour 2 du cycle où les souris ont reçu de la nourriture la veille à 8 h 30 (figure 10). Ceci permet aux souris dans la condition IF d'être en repos, puisque l'anesthésie peut être éprouvante (évitement du jeûne pendant et directement après l'anesthésie). La procédure est effectuée le matin pour tous les groupes afin d'obtenir de la régularité dans les manipulations.

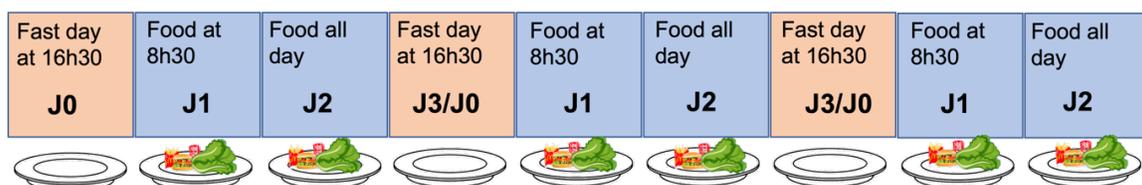


Figure 10. Cycle de l'alimentation des souris sous le régime IF

Le J0 représente le début du cycle de jeûne. Le J1 est l'accès, à partir de 8h30, à la nourriture à volonté. Le J2 est une journée sans manipulation physique de la souris par l'expérimentateur et accès à la nourriture à volonté. Le J3, les souris ont accès à la nourriture à volonté jusqu'à 16h30, puis début d'un nouveau cycle à nouveau (J0).

La configuration utilisée au courant des expériences est 350 mW de puissance de laser pour une exposition de 50 ms. Si la souris est bien positionnée, la taille de l'impact (blessure), selon le manufacturier, est de 50 μ m. À ce moment, il faut quelques ajustements au niveau des vis sur

l'appareil pour obtenir la précision du laser et la possibilité de centrer le laser au centre de la cible.

L'anesthésiant utilisé est un mélange de kétamine 10% /xylazine 1%, bien que Lambert et al. ont rapporté qu'il peut potentiellement causer l'opacification des yeux (141). L'anesthésiant cause une anesthésie profonde dérégulant la thermorégulation de l'animal, c'est-à-dire l'hypothermie (202-204). Cette hypothermie, dans les cas les plus graves, peut être fatale pour la souris. Due à l'hypothermie induite par l'anesthésie ceci cause, secondairement, l'opacification réversible des yeux; les souris sont donc placées sur un tapis chauffant. Des tests pour trouver la dose adéquate, selon le poids, ont été effectués et présentés dans le tableau IV; ces tests ont été produits pour palier à la sensibilité à l'anesthésie des souris sous les différents régimes. L'administration de l'anesthésiant se fait intra-péritonéal. À la suite de l'injection, une demie- à une-goutte de mydriacyl est déposée dans chaque œil pour permettre la dilation des pupilles.

Tableau IV. Dosage d'anesthésiant kétamine/xylazine utilisé par tranche de poids de la souris

Nombre d'unités à administrer	Par tranche de poids de la souris
Élimination du protocole	> 23,0 g
16	[23,1 g -26,2g]
17	[26,3 g – 28,0 g]
18	[28,1 g – 30,9 g]
19	[31,0 g – 33,9 g]
20	[34,0 g – 40,0 g]

L'application d'un gel hydratant (Optixcare) aidera à ne pas assécher les yeux de la souris. Lorsque l'animal est bien endormi, après vérification de la respiration et les réflexes, celle-ci est positionnée sur un support adapté pour les rongeurs. Par la suite, il faut rapprocher la souris de l'optique et du laser en ajustant la position pour apercevoir le fond de l'œil (soit la rétine) et centrer le nerf optique dans l'image projetée à l'écran (figure 11). Lorsque la position est trouvée,

le laser est activé et les brûlures sont effectuées à 12h, 3h, 6h et 9h (suivant un cadran) (figure 11).

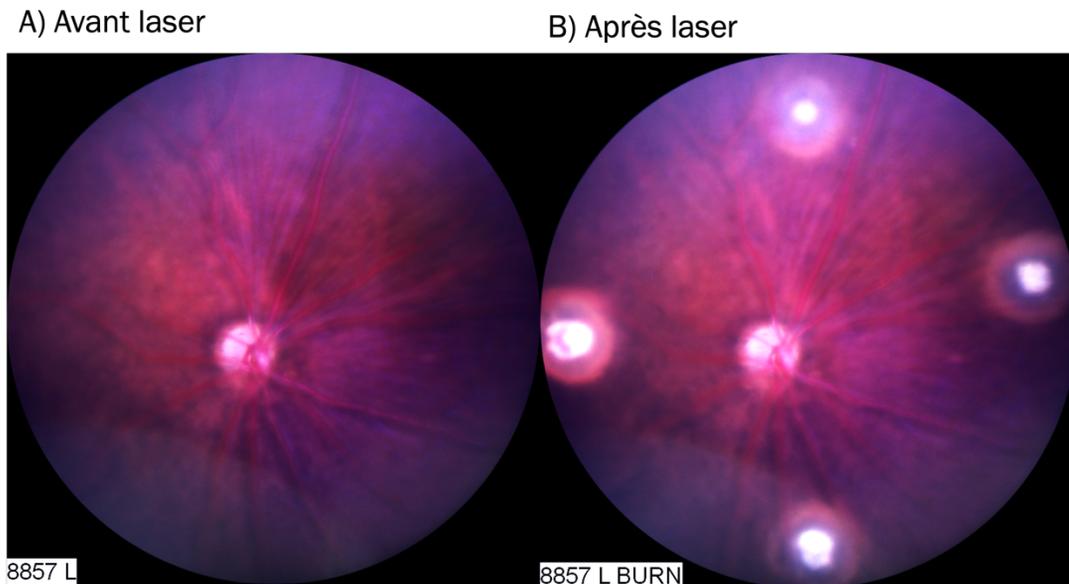


Figure 11 *Vue de la préparation de la rétine lors de la brûlure au laser.*

A) La vue de la rétine gauche avant la brûlure au laser; aperçu du nerf optique au centre, puis les différents vaisseaux sanguins d'un rouge plus foncé. **B)** La rétine gauche d'une souris qui a subi des brûlures au laser à 12h, 3h, 6h et 9h en évitant de percuter les vaisseaux sanguins.

Les souris, qui ont subi les brûlures au laser, nécessitent des soins jusqu'à leur réveil. Une solution d'eau saline est injectée sous cutanée, selon leur poids corporel (5 à 10% p/v). Celles-ci sont ensuite déposées sur un coussin chauffant pour aider à maintenir une température corporelle appropriée. Puis, l'ajout de gel hydratant sur leurs yeux pour éviter que leurs cornées sèchent.

3.4 Perfusion et marquage

L'euthanasie des souris se fait sept jours post brûlure dans le but d'obtenir de plus grands impacts des cellules inflammatoires sur la néovascularisation choroïdienne, nous permettant d'observer comment le cycle de diète influence l'inflammation dans un modèle murin de CNV.

Le matin de l'euthanasie, il faut diluer du FITC-Dextran à 5 mg/mL (Fluorescéine isothiocyanate-dextran (de poids moléculaire 2,000,000) #FD2000S-1G) qui sera perfusé en intracardiaque (injection de 500 μ L, retrait de la seringue du cœur après une minute, puis dislocation). Le FITC-dextran permet d'obtenir la perméabilité des vaisseaux sanguins, qui est la capacité des cellules endothéliales a laissé passer les molécules dans et hors du système sanguin, ce qui permettra d'évaluer la néovascularisation dans les yeux des souris (205-207). Les yeux sont énucléés et fixés dans le PFA 4% (paraformaldehyde) (1h à température pièce, 3 lavages au PBS de 10 minutes) et les tissus adipeux épидидymaires sont récoltés, pesés et congelés.

Lorsque les yeux sont fixés, il est possible de faire la microdissection pour préserver la choroïde. Ceci permettra de faire les marquages afin de détecter les néovaisseaux par microscopie (208). Les choroïdes sont déposées dans des plaques multi-puits pour l'entreposage dans du PBS jusqu'au jour du marquage avec les anticorps.

Les choroïdes ont été préalablement marquées avec le FITC-Dextran lors de la perfusion intracardiaque. Dans cette étape, des marquages supplémentaires vont être effectués à l'aide d'anticorps (figure 12). L'utilisation de différent marqueur en microscopie permettra de distinguer des éléments inflammatoires tels que les macrophages par IBA1 (Wako, #019-19741) (figure 12). Quant à la lectine (GSL 1, BSL 1, rhodamine, RL-1102), elle permet le marquage de cellules endothéliales et les cellules myéloïdes permettant, donc, de détecter la zone de la blessure par laser et les cellules inflammatoires (figure 12). Ce composé, naturellement fluorescent, se lie de préférence à la laminine et d'autres glycoprotéines qui se trouvent dans la zone blessée. Le DAPI est ajouté à la solution pour permettre de visualiser les noyaux et si certains débris ont été oubliés à la microdissection (exemple : rétine) (figure 12).

Les choroïdes sont montées à plat en « flat-mount », c'est à-dire en formant des pétales, sur les lames de microscopie. Le liquide de montage (Fluorogel avec tampon tris #17985-10) est déposé sur les choroïdes où une lamelle est appliquée sur les « flat-mount ». Puis, les lames sont placées à sécher 24 heures à 4 °C dans l'obscurité. La microscopie a été effectuée avec un microscope épifluorescent inversé de la marque Zeiss Axio Imager Z2 possédant des caméras MRm monochrome et MRc couleur CCD. L'utilisation de l'apoptome et du Z-stack a permis d'effectuer

différentes coupes de l'image augmentant ainsi la précision de l'analyse. Les images ont été analysées par Image J.

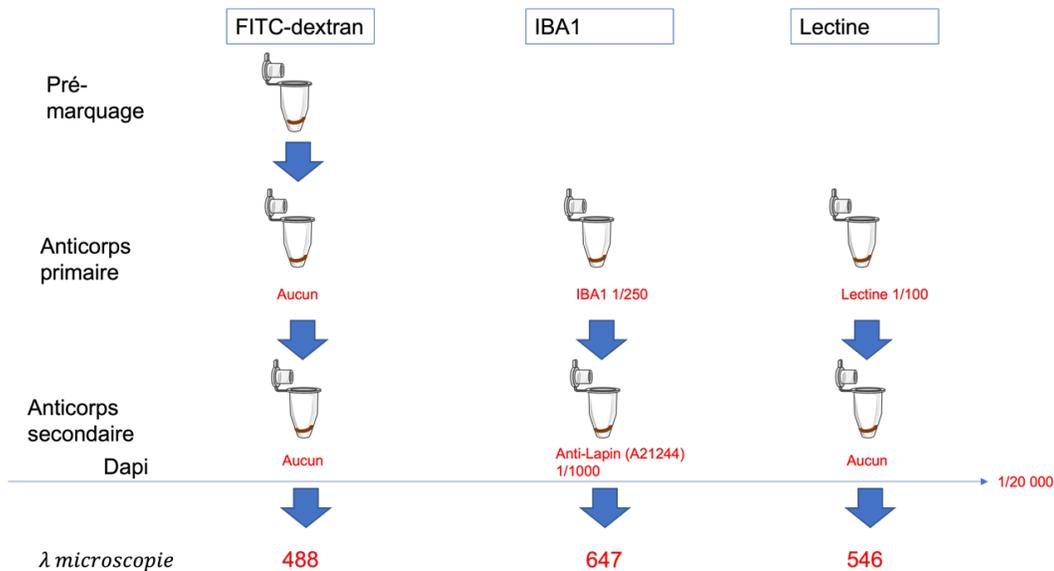


Figure 12 Illustration du marquage des choroïdes avec les anticorps.

Les choroïdes ont été pré-marquées avec le *FITC-dextran* par perfusion intracardiaque lors de l'euthanasie des souris ; ce produit ne nécessite aucun anticorps primaire ni secondaire et il est excité à 488 nm. L'*IBA1* est un anticorps primaire marquant les cellules myéloïdes. Il est couplé à un anticorps secondaire anti-lapin répondant à une longueur d'onde de 647 nm. Quant à la *lectine*, elle peut être mise dans l'étape primaire ou secondaire, car elle ne nécessite pas d'être couplée à un anticorps secondaire fluorescent. La lectine marque la zone de brûlure et les cellules myéloïdes. Le *dapi* est utilisé à la toute fin pour marquer les noyaux (350 nm).

Les images ayant permis de faire les schémas proviennent de Servier Medical art by Servier is licensed under CC3.0 unported license..

3.5 Test de tolérance à l'insuline (ITT)

La littérature a souvent fait mention que la restriction alimentaire améliorait la sensibilité à l'insuline (151, 156, 165, 178, 180). Afin d'évaluer la sensibilité à l'insuline des souris sous différents régimes alimentaires, des tests métaboliques sur la tolérance de l'insuline ont été effectués. Les souris qui subissent les tests métaboliques glycémiques (ITT/GTT) sont exclues des analyses de CNV. Celles-ci forment un groupe test, puisque nous ignorons si ces tests pouvaient avoir des impacts sur le métabolisme ou sur la néovascularisation.

Les souris subissent l'ITT le J2 du cycle après six semaines de protocole de diètes pour toutes les conditions (figure 10). Les animaux sous le régime AL et IF sont soumis à un jeûne de cinq heures avant de débiter les injections (jeûne à 8 h 30 et première injection à 13 h 30). Les souris sont hébergées dans une cage propre ayant accès à de l'eau durant cette procédure. La quantité d'insuline (Humulin R DIN 00586714) à injecter dépend du poids de la souris ; une dilution préalable d'une insuline humaine est nécessaire pour obtenir une concentration de 0,75 U/kg (pour obtenir le volume à injecter en unité : $v = \frac{7,5 U * poids}{10}$).

Une entaille, complètement au bout de la queue des souris, est effectuée avec une aiguille pour prendre la glycémie à l'aide de bandelette test (Alphatrak2 de Zoetis). Le temps zéro (initial) est la glycémie de référence avant l'injection de l'insuline par voie intra-péritonéale. À la suite de l'injection d'insuline, les glycémies sont mesurées à 30 minutes, 1h et 2h.

3.6 Test de tolérance au glucose (GTT)

La littérature a souvent fait mention que la restriction alimentaire améliorerait la tolérance au glucose (151, 156, 161, 165, 178, 180). Afin de confirmer le modèle utilisé, des GTT ont été effectués. Ce test est effectué 14 jours après l'ITT pour laisser du temps aux souris de récupérer ; le protocole de diète est, tout de même, poursuivi durant ce temps. Puisque cette expérience possède un temps de jeûne beaucoup plus long que celui de l'ITT, ce dernier est effectué au J0, mais l'heure de jeûne est retardée vers 20h (obtention de 12h de jeûne). Les souris sont hébergées dans une cage propre ayant accès à de l'eau durant cette procédure. La quantité de D-(+)-glucose à injecter dépend du poids de la souris ; une solution de D-glucose 10% est préparée (pour obtenir le volume à injecter en unité : $v = \frac{20 U * poids}{10}$ ou équivalent à 2mg/kg).

Une entaille, au bout de la queue des souris, est effectuée avec une aiguille pour prendre la glycémie à l'aide de bandelette test. Le temps zéro (le temps initial) est la glycémie de référence avant l'injection de glucose par voie intra-péritonéale. Puis, il s'ensuit les différentes prises de glycémie à 15 minutes, 30 minutes, 1h, 2h et 4h.

3.7 Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du logiciel GraphPadPrism version 9.4.0 (GraphPad Software Inc.; La Jolla, CA) ainsi que les représentations graphiques. Des 2-way anova bidirectionnels avec un test post-hoc de Tukey ont été faits pour les expériences suivantes : l'analyse de la différence des poids au jour 76, la masse des tissus adipeux et la quantification de la néovascularisation choroïdienne. Les données de la quantification de la néovascularisation choroïdienne ont subi un test de normalité vs lognormalité dans prism. Quant aux expériences de résistance à l'insuline et du glucose, la glycémie au temps initial a subi une analyse statistique par un *unpaired t test* bidirectionnel. Les analyses de la réponse glycémique au courant du temps ont été effectuées par un 2-way anova bidirectionnel avec une correction de Šidák. Un traitement supplémentaire par le test de ROUT 1% dans le but d'éliminer les données aberrantes a été effectué.

Pour analyser les yeux ayant subi une néovascularisation, une analyse supplémentaire a été effectuée en utilisant des critères d'élimination sur les impacts laser (brûlures). Effectivement, les critères suivants ont été utilisés lors du traitement des résultats : s'assurer qu'il n'y ait pas eu d'hémorragie à l'emplacement de l'impact, la brûlure doit être ronde (exclure les formes difformes ou allongées), s'assurer qu'il n'y ait pas de trou à l'endroit de l'impact, exclure l'œil qui possède qu'un seul impact valide et, finalement, exclure un œil qui possède une taille très différente à la moyenne soit plus ou moins 5 fois un écart de grandeur (209).

Chapitre 4 –Résultats

Le but de l'étude menée est d'observer l'impact du jeûne intermittent sur la néovascularisation choroïdienne dans un modèle murin. Pour ce faire, deux types de diètes ont été associés à des cycles d'alimentation soit ad libitum (aussi connu sous le nom de régime à volonté) et de jeûne intermittent (IF 2 :1 régime intermédiaire). L'observation phénotypique telle que le poids corporel ou des graisses, des habitudes alimentaires des souris ou de la gestion des sucres ou de l'insuline permettent de caractériser le modèle choisi, ainsi de le valider. De plus, dans un second temps, l'étude de la néovascularisation choroïdienne permettra de donner plus d'information sur la capacité de ce modèle de jeûne murin sur la croissance vasculaire et la cicatrisation.

4.1 Courbe de poids

Un suivi serré du poids corporel de chacune des souris du protocole a été effectué dès son initiation à trois semaines de vie. Celles-ci ont été régulièrement pesées une fois par semaine pour les deux premières semaines d'acclimatation à la diète (figure 13). Au jour 21, les souris ont un poids équivalent peu importe la diète dans lequel elles ont été soumises (figure 13A). Après deux semaines de diètes (jour 35), le gain de poids est significativement plus élevé pour les souris sous HFD (figure 13A). À partir du jour 35, les souris sont soumises au cycle d'alimentation où elles ont été aléatoirement attribuées aux groupes AL et, d'autres, aux groupes IF jusqu'aux jours 76 (six semaines) (figure 13A). Il est possible d'apercevoir deux profils distincts : le régime AL et le régime IF. Effectivement, les souris sous AL, qu'elles soient sous un régime HFD ou RD, ont une augmentation du poids corporel du jour 35 jusqu'au jour 76. Une différence notée est le degré de la pente entre dans les courbes poids entre le groupe HFD-AL et RD-AL (figure 13A). En effet, les souris sous HFD-AL prennent un peu plus rapidement de poids que les souris RD-AL (figure 13A). Quant aux régimes IF, les souris perdent environ 2 g de masse corporelle chaque nuit de jeûne (figure 13A). Lorsque celles-ci sont réalimentées, elles reprennent plus de 2 g rattrapant les groupes AL correspondant (figure 13A). Les souris sous régime IF ont une augmentation du poids corporel tout au long des six semaines (figure 13A).

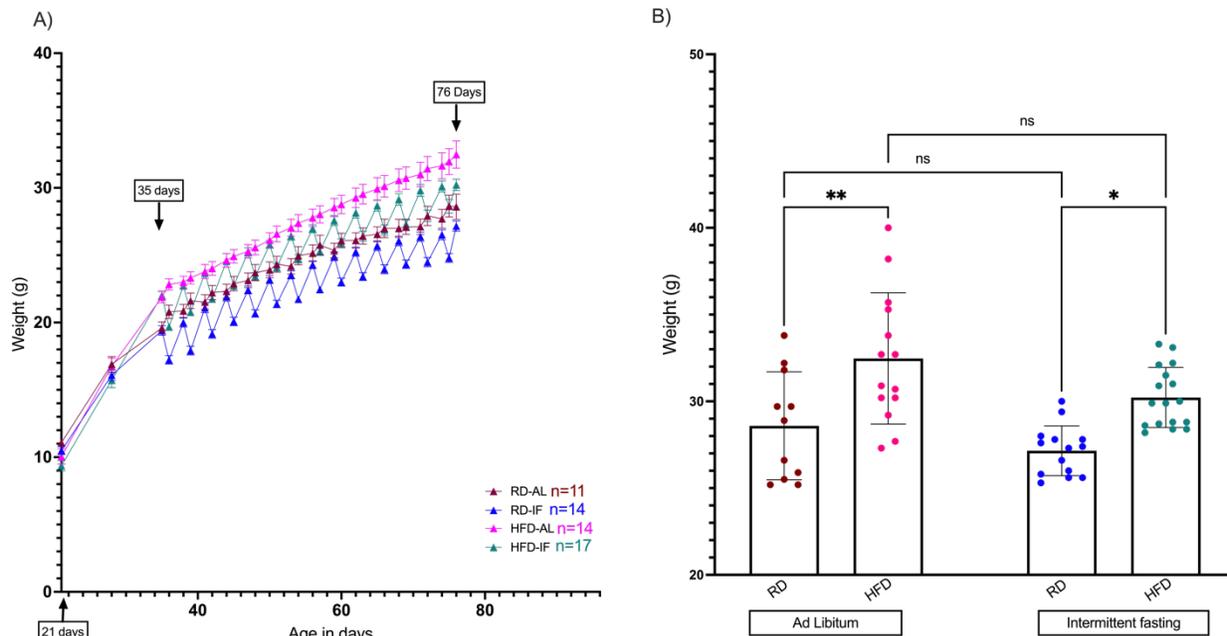


Figure 13. Suivi du poids à travers le temps des groupes de souris

- A)** Les souris ont été pesées une fois par semaine à partir du jour 21 où celles-ci ont été mises sur une diète alimentaire RD ou HFD. Au jour 35, l'initiation du protocole de jeûne intermittent de 16h pour 56h d'accès à la nourriture ad libitum (AL). Les souris sont pesées le matin, après une nuit de jeûne, sur plusieurs cycles répétés jusqu'au jour 76. **B)** Les souris ont été pesées avant la session de brûlure induite par le laser Micron IV. Les données représentent la moyenne de 11 souris RD-AL, 14 souris RD-IF, 14 souris HFD-AL et 17 souris HFD-IF par groupe plus ou moins l'erreur standard de la moyenne (SEM). Two-way anova bidirectionnel avec test post hoc de Tukey. ns : non-significatif, * : $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Lorsque les souris subissent la brûlure par laser du fond de l'œil, celles-ci sont pesées, non seulement pour donner la dose d'anesthésiant, mais aussi pour les comparer entre elles. Effectivement, l'une des raisons principales d'utilisation du jeûne intermittent à la restriction calorique est la stabilité du poids entre les souris sous le régime IF versus AL. Andriessen et al. ont montré qu'une différence de poids induit par un régime alimentaire riche en graisse pouvait induire une CNV plus importante (201). Pour cette raison, il était important que les souris contrôles (AL) et IF ne soient pas différentes par rapport à leur masse corporelle (figure 13B). La seule différence obtenue est au niveau du type de diètes (RD versus HFD) où les HFD ont un poids plus important que les RD (figure 13B).

Les souris sous le régime IF ont une augmentation de leur poids corporel tout au long du protocole qu'elles soient sous régime RD ou HFD (figure 13A). Il n'y a pas de différence significative de poids entre les groupes AL et IF au jour 76 (figure 13B).

4.2 Poids des tissus adipeux épидидymaires

Les tissus adipeux épидидymaire (eWat), communément appelé *fat pad*, ont été prélevés lors du sacrifice et congelés. La moyenne des tissus adipeux ventraux a été réalisée pour s'assurer que la dissection a été faite de façon juste (figure 14A). Les résultats obtenus montrent que la moyenne des tissus adipeux n'atteint pas de différence significative pour les souris sous le même régime alimentaire (RD IF-RD-AL et HFD-AL -HFD-IF) (figure 14A). La seule différence significative se trouve au niveau des diètes RD versus HFD, puisque celles-ci sont probablement corrélées avec l'augmentation du poids des souris causée par la composition des diètes (figure 13A et figure 14A).

Lors du sacrifice, le seul tissu graisseux prélevé étant le tissu adipeux épидидymaire, celui-ci permettra donc uniquement d'indiquer s'il y a une différence sur sa répartition. Le tissu adipeux a été pesé et divisé par le poids de l'animal, ceci permettant d'obtenir un ratio de répartition pour permettre la comparaison entre les autres conditions du protocole (figure 14B). Les résultats montrent qu'il n'y a aucune différence significative entre le ratio des groupes AL et IF dans la répartition des graisses ventrales peu importe le type de diètes (figure 14B).

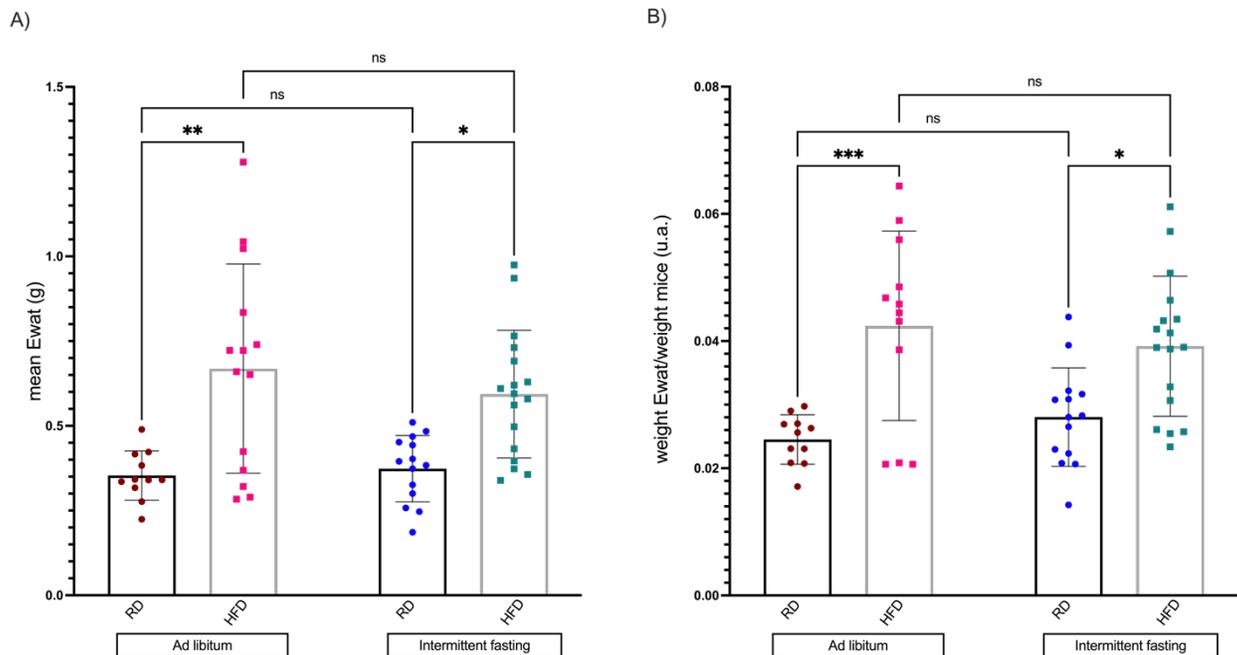


Figure 14. Le poids et la distribution des tissus adipeux épидидymaires.

A) Le poids moyen des tissus adipeux épидидymaires des souris dans chacune des conditions **B)** Le ratio du poids total des tissus adipeux épидидymaire sur le poids de la souris, afin d'évaluer la distribution de ce tissu. Les données représentent la moyenne de 11 souris RD-AL, 14 souris RD-IF, 14 souris HFD-AL et 17 souris HFD-IF par groupe plus ou moins le SEM. Two-way anova bidirectionnel avec test post hoc de Tukey. ns : non-significatif, * : $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Encore une fois, la seule différence significative obtenue est une variation de la répartition des graisses des souris sous HFD et RD (figure 14B). Les souris sous le régime RD-AL semblent avoir une répartition des graisses ventrales plus uniforme, selon leur poids comparativement à ce qui est observé dans les groupes HFD-AL et HFD-IF (figure 14B). En revanche, ceci ne semble pas être le cas pour les souris sous régime RD-IF bien que la moyenne totale du ratio soit équivalente aux souris RD-AL (figure 14B). Cette variation dans la répartition peut être expliquée par les différences métaboliques intra-groupes lors de la reprise de la nourriture. Pourtant, cet écart ne semble pas être observé chez les souris HFD-IF (figure 14B).

En résumé, les souris ne présentent pas de différence significative entre les groupes AL et IF (figure 14A). La distribution de la graisse épидидymaire ne présente pas de différence significative entre les cycles de diètes et leur contrôle associé (figure 14B).

4.3 Consommation de nourriture

La consommation de nourriture est sujet d'étude dans les protocoles de restriction calorique, dans l'alimentation à durée limitée dans le temps et le jeûne intermittent. Afin de mieux comprendre le modèle utilisé, l'étude des habitudes alimentaires des souris a été réalisée en deux expériences.

4.3.1 Expérience sur le cycle complet

L'expérience de cycle de nourriture permet d'étudier la consommation des souris sur un cycle complet de 72h, c'est-à-dire 16h de jeûne pour 56h d'accès AL pour les souris IF. Il était primordial de confirmer le modèle utilisé, puisqu'il ne correspondait pas avec les protocoles utilisés dans la littérature. De plus, il semblerait qu'une partie de la littérature affirme que les souris sous cycle d'alimentation IF rattrape les animaux contrôles sous régime AL ce qui provoque aucune perte de poids, tandis que d'autres ne dénotent pas de tels résultats (153, 165, 193). Des observations anecdotiques ont été faites lors des changements de cage qui ont mené à des hypothèses et l'urgence de l'étude des habitudes alimentaires des rongeurs. Effectivement, lors du retour de la nourriture, les souris sous IF étaient très actives et elles semblaient avoir des comportements hyperphagiques.

Durant la phase obscure du jour 0 à 16h du cycle, les souris HFD-AL consomment plus de nourriture en moyenne que les souris RD-AL (figure 15A). Les souris sous IF, au lendemain du jeûne, consomment beaucoup plus de nourriture que les groupes contrôles (RD-AL et HFD-AL) dans l'intervalle de 16h à 40h (24h) (figure 15A). Dans la période de 16h à 40h, la tendance semble s'être inversée pour les souris HFD-AL qui ont consommé moins de nourriture que les souris RD-AL (figure 15A). Il se pourrait que le stress induit dans la période de 0 à 16h et le changement d'une nouvelle cage d'hébergement affecterait la consommation des souris. Pour la période de 40h à 64h (24h), les souris sous régime IF affichent la même tendance que le premier 24h, c'est-à-dire que celles-ci consomment plus que les souris AL (figure 15A). Les souris sous le régime AL semblent se stabiliser consommant le même nombre de croquettes (figure 15A). Dans le dernier

8h (64h à 72h), les souris IF continuent à afficher la même tendance de consommation (figure 15A).

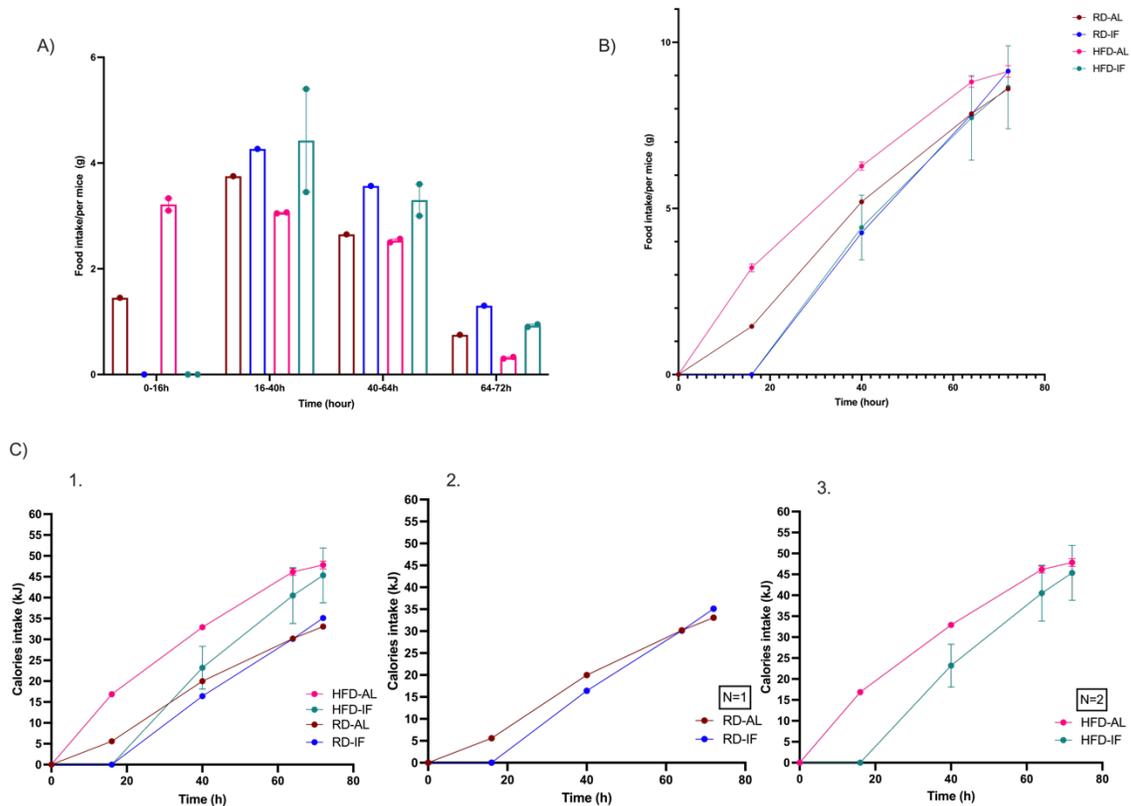


Figure 15. Les habitudes de consommation des souris pour les différents types de régime.

A) La consommation de nourriture des souris (en g) selon leur condition d'alimentation (RD/HFD/IF/AL) détaillée sur un cycle de 72h (HFD AL et IF n=2 ; RD AL et IF n=1) **B)** La consommation cumulative (en g) sur le cycle de 72h de chaque type de diète **C)** La consommation cumulative de nourriture en calories (kJ) des souris **1.** Dans l'ensemble des conditions **2.** Dans la condition RD-AL et RD-IF (n=1) **3.** Dans la condition HFD-AL et HFD-IF (n=2).

Les données compilées montrent que durant le cycle de consommation totale (72 h), les souris sous le régime IF, que ce soit sous la diète RD ou HFD, consomment le même poids de nourriture (figure 15B). La conception des diètes est différente; la HFD est principalement composée de lard tandis que la RD est constituée de glucides (tableau II). La diète HFD est plus calorique que la RD. Une représentation plus valide de la consommation de la nourriture ingérée par les souris, en calories, durant une période de 72 h est présentée à la figure 15 C) 1. où il y a un écart présent

entre les diètes RD et HFD. Les régimes RD-AL/RD-IF et HFD-AL/HFD-IF ne présentent pas de différence entre les calories ingérées par les souris pour chacune de leur condition (figure 15C) 2. et 3.).

En résumé, les souris sous régime RD consomment le même nombre de calories que ce soit sous le régime AL ou IF (figure 15 C) 2.). Ceci est aussi observé pour la condition HFD où les souris sous le régime AL ou IF ingèrent autant de calories (figure 15C) 3.).

4.3.2 Expérience sur 6 heures

L'étude de l'expérience d'alimentation sur 6h découle d'une hypothèse observationnelle, selon laquelle les souris sous le régime IF font de l'hyperphagie alimentaire. Afin de répondre à ce questionnement et avec les connaissances acquises dans la littérature, la mesure de la consommation de nourriture post-jeûne était importante (153, 197). Il a été montré dans la section précédente que les souris sous le régime IF consommaient autant de calories que leur contrôle AL. En revanche, la quantité de nourriture ingérée après le jeûne n'est pas connue.

Les souris, dès la sortie de leur jeûne intermittent, ont accès à la nourriture à volonté. La remise de la nourriture provoque un comportement où celles-ci consomment plus que les souris AL (figure 16). Effectivement, les souris RD-IF consomment près de 2 g et les HFD-IF 1,5 g de nourriture comparativement aux souris RD-AL et HFD-AL qui consomment respectivement 0,25 g et 0,60 g (figure 16A). Les souris RD-IF et HFD-IF consomment le même nombre de calories dans les 6h après le jeûne (figure 16B). Dans l'expérience précédente de consommation de nourriture, les souris sous régime IF mangeaient près de 4 g en 24h post-jeûne (16-40h) (figure 15A). Dans cette condition, les souris consomment en 6h presque la moitié de leur consommation journalière (figure 15A et 16A).

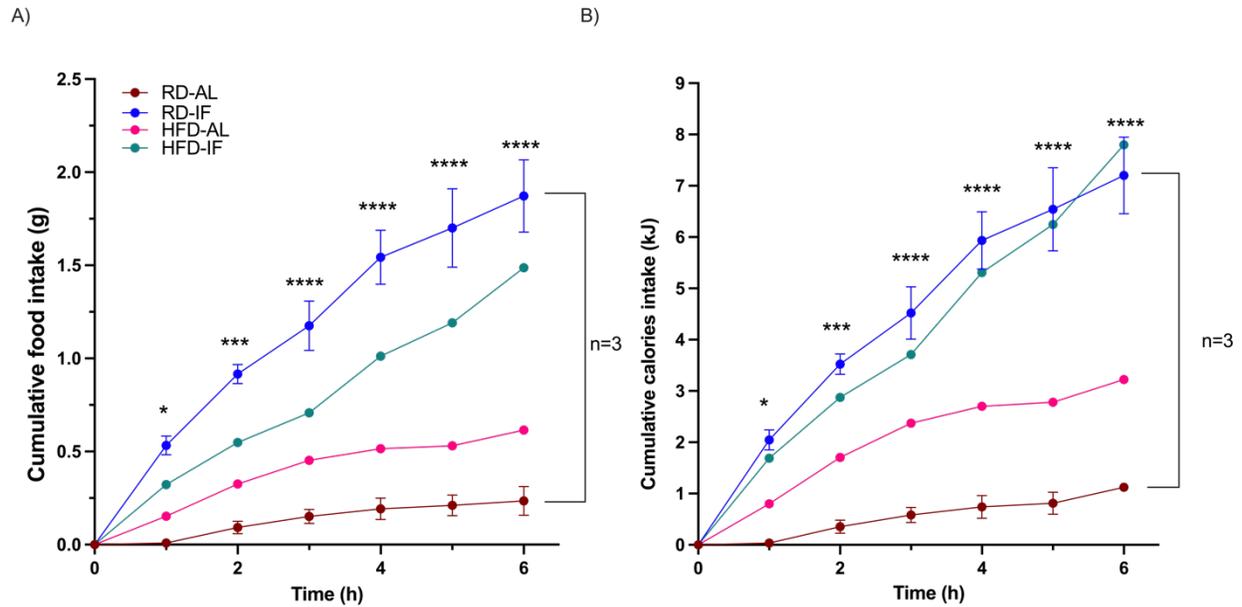


Figure 16. La consommation de nourriture des souris durant 6h après une nuit de jeûne de 16h

La consommation cumulative de nourritures exprimée en masse (g) pour tous les types de diètes. **B)** La consommation cumulative calorique (kJ) des souris pour tous les groupes expérimentaux. Les données représentent la moyenne des souris hébergées dans une même cage, dont les expériences ont été répétées pour les RD-AL et RD-IF n=3 tandis que les HFD-AL et HFD-IF n=1. Les données graphiques sont représentées plus ou moins le SEM avec un Two-way anova bidirectionnel avec test post hoc de Tukey. * : p<0,05, *** p<0,001, **** : p<0,0001

En résumé, les souris sous jeûne intermittent consomment une grande partie de la nourriture journalière dans les six premières heures après leur nuit de jeûne (figure 16).

4.4 Test de tolérance à l'insuline (ITT)

Des expériences sur le métabolisme ont été réalisées dans le but de valider le modèle et d'observer si la modification du régime alimentaire des souris apportait des bénéfices sur l'insuline et le glucose. Une étude indirecte de la mesure de l'activité de l'insuline a été effectuée en injectant une quantité connue d'insuline, selon le poids corporel de la souris, puis le suivi dans le temps de la réponse de la glycémie avec des bandelettes tests.

Les souris sous régime IF et AL ont été soumises à un court jeûne de 5h. Le taux de glucose sanguin est mesuré avant les injections d'insuline. La glycémie des souris HFD-AL et HFD-IF ne montre pas de différence significative au temps initial (figure 17A). Les souris HFD-IF ne semblent pas (ou faiblement) affectées par les injections d'insuline. Effectivement, la variation de glycémie prise à travers le temps en comparaison avec la glycémie initiale (% de variation) varie peu chez les HFD-IF (au plus bas est de 76%), contrairement aux souris HFD-AL qui atteint un seuil de 57% (figure 17B). Au bout de 120 minutes, il y a une différence statistique entre les souris HFD-IF et HFD-AL sur le pourcentage de variation entre la glycémie initiale et la glycémie à ce temps (figure 17B). Ce test indique que les souris sous le régime HFD-IF seraient plus résistantes à l'insuline que les HFD-AL. Une représentation des données brutes où on observe que les souris sous régime IF sont peu affectées par les injections d'insuline contrairement aux souris sous régime AL (figure 17C). On observe qu'il y a une diminution de la glycémie dans les 30 premières minutes (figure 17C). En revanche, cette représentation ne montre aucune différence significative entre la condition HFD-AL et HFD-IF (figure 17C).

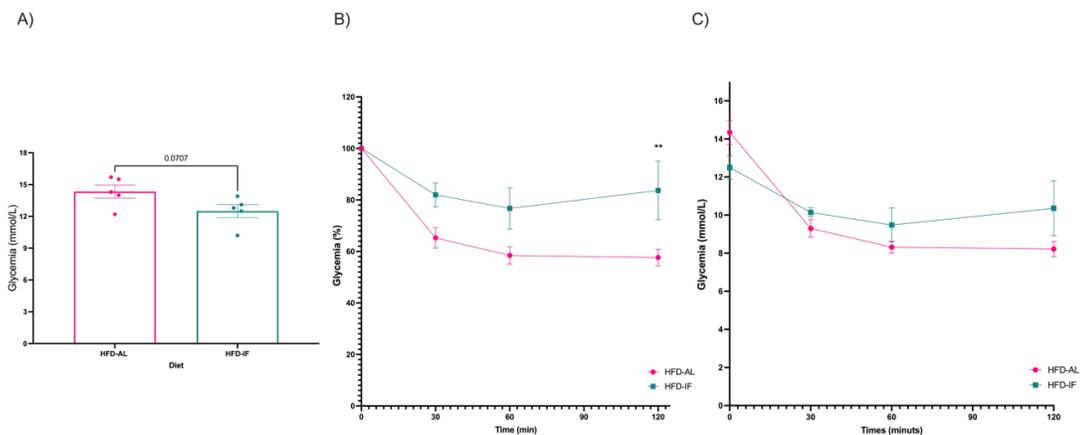


Figure 17. Le test de tolérance à l'insuline.

A) La glycémie au temps initial (t=0) des souris avant l'injection de l'insuline; *unpaired t test* représentant la moyenne de 5 souris HFD-AL et 5 souris HFD-IF, résultat ns **B)** Le pourcentage de changement de la glycémie au travers du temps; *two-way anova*, ns dans tous les temps sauf à 120 minutes (** $p < 0,01$) **C)** L'évolution de la glycémie au travers du temps après l'injection d'insuline. Les données en B et C représentent la moyenne de 5 souris HFD-AL et 5 souris HFD-IF par groupe plus ou moins le SEM. *Two-way anova* bidirectionnel avec test post hoc de Šidák. ** $p < 0,01$

Le jeûne intermittent auquel les animaux sont soumis ne semble pas conférer davantage sur le métabolisme de l'insuline. En effet, les résultats montrent que les souris HFD-IF sont plus insulino résistantes que les souris sous HFD-AL (figure 17B). À la suite de problèmes de dosage d'insuline, il n'a pas été possible d'obtenir de résultats avec les souris RD, puisque nous n'avons pas pu obtenir de courbe dose-réponse du suivi de la glycémie. Les souris devenaient fortement hypoglycémiques et nous devions porter rapidement assistance à celles-ci en leur injectant du dextrose (produit chimiquement identique au glucose) pour annuler les effets de l'insuline.

4.5 Test de tolérance au glucose

Le test de la tolérance au glucose est un test direct de quantification du glucose sanguin où la glycémie est suivie avec des bandelettes tests. Les souris sont soumises à un jeûne de 12 h, puis la glycémie à jeun est prise pour connaître le taux de glucose au temps initial (figure 18A et C). Les glycémies de départ pour les souris RD et HFD n'atteignent pas de différence significative (figure 18A et C). Bien que dans les deux cas, la significativité n'est pas atteinte, il semble avoir une certaine tendance où la glycémie après 12 h de jeûne est plus élevée dans la condition d'IF que dans la condition AL (figure 18A et C).

Dans ce test, les souris reçoivent une quantité connue de glucose qui est calculée à partir de leur poids. Le suivi de la glycémie est fait à différent temps (15 min, 30 min, 60 min, 120 min et 240 min) à l'aide de bandelettes tests. Les souris sous le régime RD-AL et IF montrent un profil glycémique pratiquement semblable à tous les temps, sauf au premier 15 minutes où les souris RD-IF ont un pic très élevé de glucose (figure 18B). L'écart est sporadique, puisque les valeurs reviennent pratiquement identiques à celles observées au RD-AL (figure 18B). Quant aux souris sous le régime HFD, il n'existe aucune différence significative de glycémie au courant du temps (figure 18D).

Les souris sous régime RD et HFD n'ont aucune différence significative au temps initial pour leur glycémie (figure 18). Les souris sous le régime RD-IF possèdent un pic de glycémie élevée à 15 minutes après l'injection de glucose, puis il y a une stabilisation de la glycémie ressemblant à celle

de la condition RD-AL (figure 18B). La glycémie des souris HFD, au courant du test, ne diffère pas entre les groupes AL et IF (figure 18D).

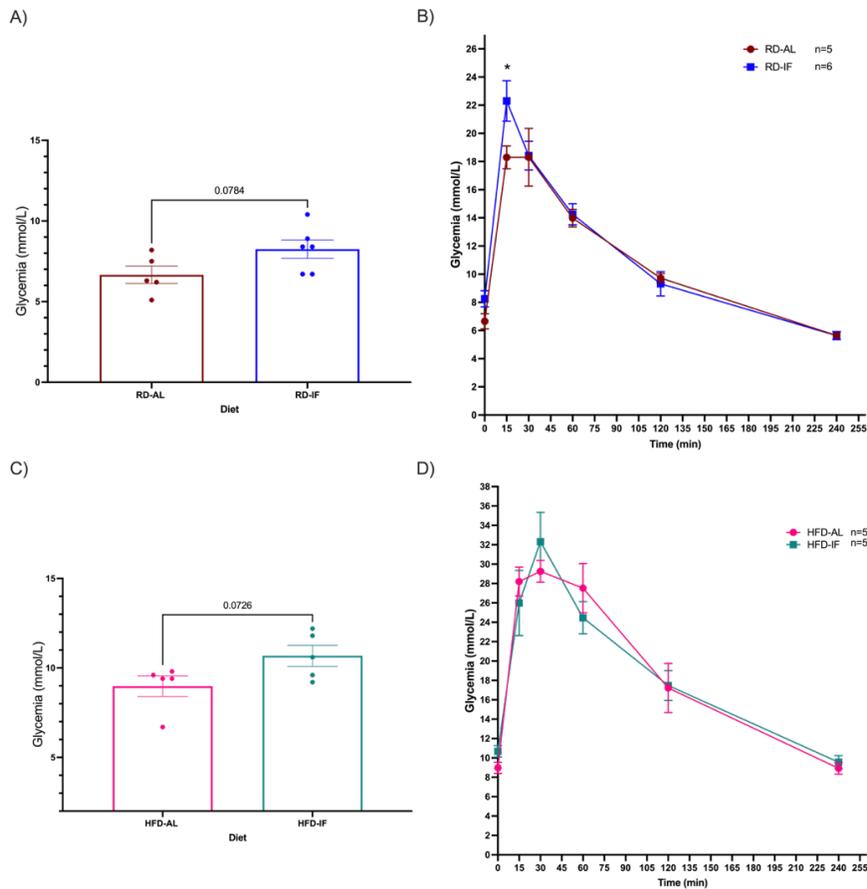


Figure 18. Le test de tolérance au glucose.

A) La glycémie au temps initial des souris sous le régime RD; *unpaired t test* représentant la moyenne de 5 souris RD-AL et 6 souris RD-IF résultat *ns* **B)** Évolution dans le temps de la glycémie à la suite de l'injection de glucose pour les souris sous condition RD. **C)** La glycémie au temps initial des souris sous le régime HFD; test statistique *unpaired t test* représentant la moyenne de 5 souris HFD-AL et 5 souris HFD-IF, résultat *ns* **D)** Évolution de la glycémie dans le temps après une injection de glucose des souris HFD. Les données en B et D représentent la moyenne de 5 souris RD-AL, 6 souris RD-IF, 5 souris HFD-AL et 5 souris HFD-IF par groupe plus ou moins le SEM. Two-way anova bidirectionnel avec test post hoc de Šidák. * $p < 0,05$

4.6 Néovascularisation

Le deuxième objectif du travail était d'observer un impact de la diète, c'est-à-dire le jeûne intermittent, sur la néovascularisation choroïdienne dans un modèle de DMLA murin. Pour ce

faire, des études de marquage par immunofluorescence ont été effectuées pour permettre le calcul des aires de la blessure et de la néovascularisation des yeux. Un microscope épifluorescent a permis de prendre les photos de la choroïde mise à plat marquée avec différents marqueurs fluorescents : anti-IBA1 couplé avec un anticorps anti-lapin (647) marquant les cellules immunitaires (magenta), FITC-dextran marquant les néovaisseaux (vert), Rhodamine/lectine marquant l'aire de la blessure (rouge) et le DAPI marquant les noyaux (bleu) (figure 19). Malheureusement, les cellules inflammatoires n'ont pas été dénombrées, puisqu'elles étaient trop nombreuses et superposées, au septième jour, dans les images de microscopie (figure 19).

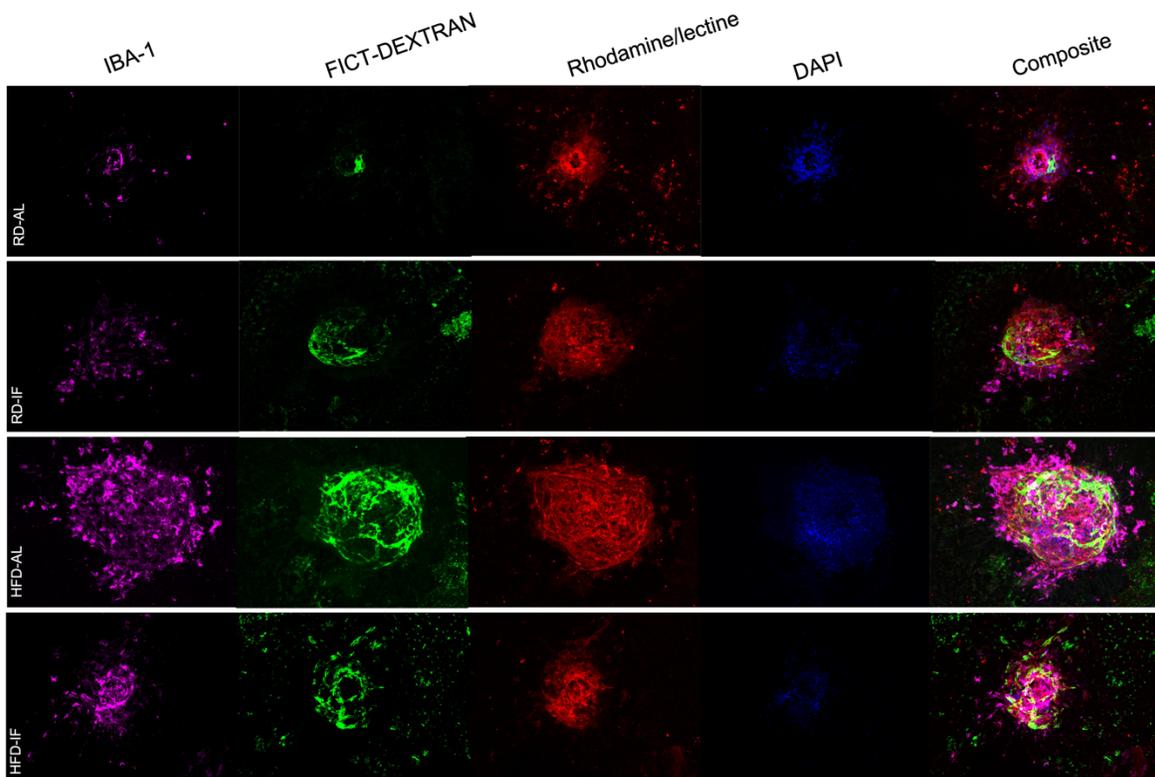


Figure 19. Effet des diètes sur la néovascularisation choroïdienne (CNV)

Les effets des différentes diètes sur la néovascularisation choroïdienne, sept jours après l'induction au laser. Condition d'une brûlure laser par microscopie montrant toutes les conditions de fluorescence: IBA-1 (647), FITC-Dextran (488), Rhodamin/lectine (546) et Dapi (450). Les images ont été réalisées sur le microscope épifluorescent Zeiss Axio imager Z2 avec l'apoptome pour la création de Z-stack. Les images ont été traitées par Image J et les analyses statistiques réalisées par Prism 9.

La figure 19 montre des images de microscopie retrouvées dans chaque condition. Ces images ont permis d'obtenir les différentes quantifications sur image J en traçant les aires du FITC-Dextran et de la lectine, puis celles-ci sont traitées statistiquement par PRISM.

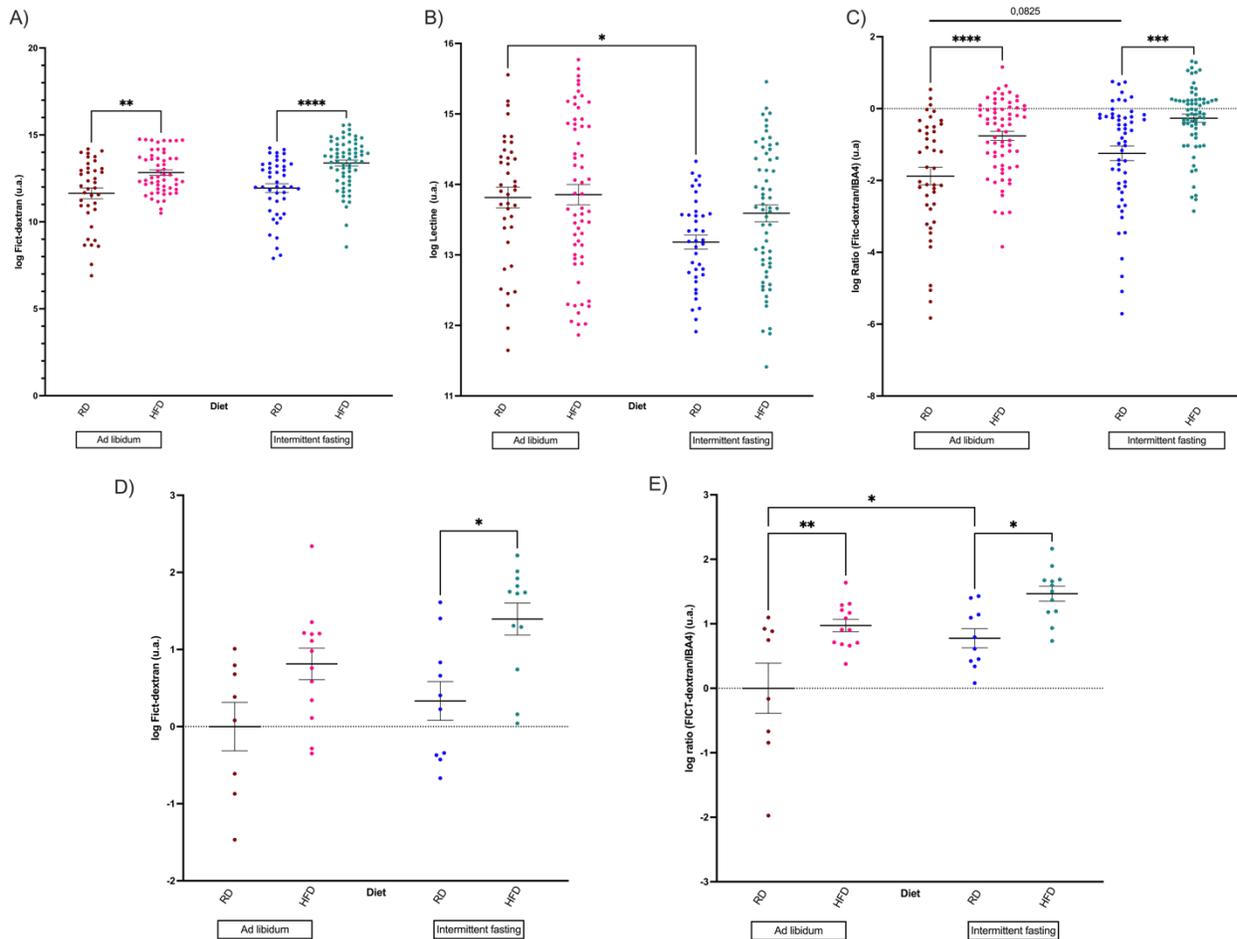


Figure 20. La quantification de la néovascularisation choroidienne des différentes diètes

A) L'aire des néovaisseaux détectée par le FITC-Dextran injecté intracardiaque **B)** L'aire de la blessure détectée par le produit fluorescent Rhodamine/lectine **C)** La quantification obtenue du ratio FITC-Dextran sur la lectine **D)** L'aire des nouveaux vaisseaux sanguins par animal obtenue à l'aide du FITC-Dextran **E)** La quantification par animal obtenue pour le ratio FITC-dextran sur la lectine. Les données représentent la moyenne de 11 souris RD-AL (43 brûlures laser), 14 souris RD-IF (67 brûlures laser), 14 souris HFD-AL (55 brûlures laser), et 17 souris HFD-IF (66 brûlures laser) par groupe plus ou moins le SEM. Les points aberrants ont été testés par un test de ROUT 1% et une étude des yeux endommagés par une mauvaise néovascularisation ou des dommages ne permettant pas de les quantifier. Two-way anova bidirectionnel avec test post hoc de Turkey. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, ****: $p < 0,0001$

Les aires tracées des nouveaux vaisseaux sanguins qui ont été obtenues par la perfusion intracardiaque de FITC-DEXTRAN montrent qu'il n'y a pas de différence significative entre les souris RD-AL versus RD-IF et HFD-AL versus HFD-IF (figure 20A). Des différences sont observées uniquement entre le type d'alimentation (HFD et RD) tel que retrouvé dans les résultats des poids et la masse des tissus adipeux (voir figure 20A), 13, 14). Afin d'obtenir des résultats par animaux, une moyenne des huit brûlures par laser a été compilée par souris dans le but d'éliminer la variabilité intra-individu. Cette manipulation mathématique a provoqué la perte de la significativité pour les souris sous RD-AL et HFD-AL qui a été probablement causée par la grande variabilité au sein d'un même individu retrouvée chez les souris RD (figure 20D). De plus, il n'y a toujours pas de différence significative entre les souris sous IF et AL (figure 20D).

Les résultats obtenus dans les aires de blessures, marquées par la lectine, pour toutes les conditions montrent une très grande variance (figure 20B). Les résultats des souris RD-AL et les RD-IF montrent la plus grande variance causant une différence significative (figure 20B). Le ratio FIT-DEXTRAN sur la lectine montre une différence significative uniquement sur le type d'alimentation (RD vs HFD), mais pas sur les cycles de diètes (AL vs IF) (figure 20C). Une étude par animal a été effectuée pour le ratio FITC-dextran sur la lectine afin d'éliminer les variations individuelles. Les résultats obtenus ressemblent à ceux montrés précédemment sauf pour les souris RD-AL et RD-IF (figure 20E). Effectivement, le jeûne intermittent semble avoir un effet sur la néovascularisation pour le groupe de diète RD en l'augmentant (figure 20E).

En résumé, il n'y a pas de différence significative entre le cycle de diète que nous avons sélectionné. Cependant, il y a une différence par animal pour la diète RD probablement causée par la variance dans le groupe (figure 20). La diète (RD vs HFD) influence la néovascularisation (figure 20A).

Chapitre 5 – Discussion

Cette étude avait pour but d'évaluer les effets des types et des cycles de diète sur la néovascularisation choroïdienne dans un modèle murin de DMLA. Pour ce faire, différents groupes de souris ont été placés aléatoirement sur un type de diète (RD ou HFD), puis sur un cycle d'alimentation (AL ou IF). Par la suite, ces souris ont subi des tests, afin de comparer leurs caractéristiques phénotypiques telles que leur poids, la masse graisseuse et la tolérance au glucose et de l'insuline. Par la suite, celles-ci ont subi une brûlure au laser du fond de l'œil pour imiter la pathologie de la DMLA pour quantifier les nouveaux vaisseaux sanguins par immunofluorescence.

Le modèle d'alimentation utilisé est un protocole intermédiaire du jeûne intermittent, puisqu'il ne possède que 16 heures de jeûne, contrairement à d'autres études où le jeûne est beaucoup plus long (par exemple 24h). Effectivement, il emprunte des caractéristiques à différent modèle existant dans le jeûne intermittent (1 :1 ou 2 :1) et le régime d'alimentation restreint dans le temps. Dans l'alimentation restreint dans le temps (TRF), les souris ont accès à la nourriture près de 8h par jour lors de la phase obscur respectant, ainsi, leur cycle naturel d'alimentation, puis celles-ci ont 16 heures de jeûne (174, 179). L'avantage de ce protocole à mi-chemin entre le jeûne intermittent classique et le TRF est la facilité à le mettre en place et la possibilité de le reproduire chez l'être humain, puisqu'il n'est pas très rigoureux ou sévère. Ceci pourrait expliquer en partie les résultats obtenus au travers de l'étude.

5.1 Phénotype

Les caractéristiques phénotypiques ont été observées tout au long du protocole. Le poids corporel des souris a été un outil déterminant pour garder les animaux dans le protocole. En effet, les courbes tracées ont permis de déterminer la croissance normale des animaux et de déterminer si certains animaux étaient malades : le stress excessif, les batailles et les problèmes de dentition.

Les souris ont pris du poids dès la naissance jusqu'à leur euthanasie peu importe le type de diète ou de cycle d'alimentation (figure 13). Les souris sous régime IF, qu'elles soient sous RD ou HFD, perdent en moyenne par nuit de jeûne 2 g de leur masse corporelle et cette perte est constante pendant les six semaines de régime (figure 13). D'ailleurs, les souris IF rattrapaient au bout de deux jours après le jeûne les souris sous régime AL (figure 13). Ces résultats concordent avec une majeure partie de la littérature, bien qu'une minorité des recherches affirme que les souris perdent du poids durant un jeûne intermittent (153, 157, 176, 193, 194).

Les souris C57BL6/J ont été mise sur un régime alimentaire HFD ou RD, afin de les acclimater durant deux semaines à partir de leur troisième semaine de vie. Durant six semaines consécutives jusqu'à l'induction par laser de la néovascularisation choroïdienne, les souris sont soumises à un cycle de diète, IF, ou à une alimentation AL (figure 8). Une question s'impose : est-ce que les diètes ont eu le temps de faire leur effet sous ce modèle ? Les souris C57BL6/J sont régulièrement utilisées pour l'induction de l'obésité avec la diète HFD, puisqu'elles présentent une susceptibilité génétique permettant de prendre un plus grand gain de poids, l'accumulation de graisse dans le foie et une intolérance au glucose importante comparativement à d'autres souches de souris (210, 211). Cette souche a permis de faire l'étude de maladie métabolique et de l'obésité observée chez l'humain (210, 212, 213). Chez les souris C57BL6/J, l'apparition de la prise de poids apparaît deux semaines suite à l'initiation du traitement (213). Puis, au-delà de ces deux semaines, la prise de poids se consolident (213). La figure 13B montre une différence significative sur les poids des souris soumises au régime HFD versus RD. Les souris sous un régime riche en calories sous forme de graisse prennent de plus en plus de poids plus au courant des semaines d'expérimentation. Nous utilisons un régime RD qui est une diète de contrôle qualifié de plus saine par sa composition (214). En revanche, ces régimes, même s'ils sont standardisés, sont remplis de fibres alimentaires qui peuvent avoir des effets sur la santé métabolique via l'intestin (214). Les régimes standardisés, tels que le RD, doivent être comparés avec un régime aussi contrôlé dans sa composition et reconnu comme étant le contrôle de celui-ci (voir la fiche technique de la compagnie) (214). Malheureusement, la nourriture donnée aux animaux est source d'une très grande variation entre les études, puisqu'elle affecte la santé métabolique des animaux (215). De plus, des recherches montrent l'impact de la composition sur l'intestin (215).

Ceci pourrait expliquer certaines différences qui existent entre les études, puisque les types de régime et diète alimentaire varient énormément entre les études de restriction alimentaire (151, 156, 160, 162, 165, 178, 180, 184, 189, 216-218).

Les effets du cycle de diète sur la néovascularisation choroïdienne sont aussi à l'étude dans notre recherche. Plusieurs études sur le métabolisme chez les souris ne comparent pas deux types de diètes, mais font la comparaison de cycle diète, c'est-à-dire la RC versus AL ou l'IF vs AL (165). De plus, certaines études ont préféré abandonner les expériences comparatives, lorsqu'elles avaient les groupes de diètes RD et HFD, puisque les souris HFD montraient des résultats significatifs et plus intéressants (193, 194). Malheureusement, les données obtenues au cours de nos expériences ne concordent pas avec les bienfaits énoncés dans la littérature : amélioration de la tolérance au glucose, une sensibilité améliorée à l'insuline, parfois des pertes de poids, etc. (153, 157, 176, 193, 194). Dans la recherche sur la restriction calorique et le jeûne intermittent, il n'existe pas de protocole établi et validé ; il existe autant de méthodes que d'articles traitant sur le jeûne ou la restriction calorique (151, 156, 160, 162, 165, 178, 180, 184, 189, 216-219). La durée du jeûne intermittent est préférable d'être long plutôt que court, même s'il est rapporté dans des nombreux articles que les changements métaboliques s'effectuent rapidement, ainsi que ces effets (156). Il est aussi difficile de déterminer quelle est l'âge optimal pour lequel le jeûne intermittent possède les plus grands effets. Puisque le champ d'intérêt est le vieillissement, seraient-ils plus appropriés d'avoir des souris plus âgées ? Plusieurs des études débutent par l'acclimatation des souris à partir de l'âge 6 à 8 semaines durant 2 à 4 semaines avant le début du processus expérimental des cycles d'alimentation (149, 153, 157, 175, 176, 193, 194). Ces recherches débutent, donc, les expériences d'alimentation de RC ou d'IF avec des souris adultes (autour de 10 semaines, sinon plus âgées) (153, 157, 176, 193, 194). Lors de notre expérience, les souris ont cinq semaines, lorsqu'elles sont soumises au jeûne intermittent et elles sont euthanasiées à 12 semaines de vie. Donc, les souris des autres protocoles débutent leur cycle d'alimentation aux environs de l'âge que nos souris sont euthanasiées (149, 153, 157, 175, 176, 193, 194). Ceci pourrait expliquer la difficulté de reproduire les résultats déjà obtenus dans la littérature pour de jeune souris, car les souris vieillissantes ont certains troubles métaboliques causés par l'âge tels que l'intolérance au glucose et de la résistance à l'insuline (220, 221). De

plus, l'étude Xie et al. (Nature Communications) montre qu'il est plus difficile de déterminer l'effet du cycle d'alimentation si les animaux ont grandi avec ce type de diète ou si celui-ci a été initié plus tardivement (216). Ce groupe a fait l'étude comparative de groupes de souris jeunes et âgées sur un régime de jeûne intermittent 1 :1, ils ont ainsi comparé les effets à court et moyen terme sur la longévité et l'apparition du cancer (216).

Avec l'étude des habitudes alimentaires, il a été aussi observé que les souris sous jeûne intermittent consommaient majoritairement la nourriture quotidienne dans les six premières heures (figure 16). Il est rapporté dans la littérature que les souris qui consomment la nourriture de façon excessive et dans une courte période de temps présentent un comportement de gavage (166). Ce comportement est déclenché par la restriction de l'accès à la nourriture (IF ou RC) (166). Cependant, les études sur les habitudes alimentaires devraient être répétées pour augmenter leur puissance statistique (RD n=1 et HFD n=2) bien qu'elles montrent une tendance importante et concordante avec des études bien établies de la littérature (figure 15 et 16). Nos souris sont hébergées par colonie (trois souris par cage en moyenne), donc la nourriture est une moyenne calculée par cage de tous les individus divisés par le nombre de souris dans cette même cage (l'estimation de la consommation moyenne par souris par cage). Malheureusement, cette méthode n'est pas la plus fiable, puisque les souris possèdent des différences individuelles ; nous devrions plus tôt les héberger individuellement pour obtenir la consommation réelle par souris.

Les tissus adipeux épидидymaux ont été pesés à la fin du protocole, afin de les comparer entre les conditions. Plus ils sont volumineux, plus ils sont susceptibles d'engendrer plusieurs réactions métaboliques telles un « réacteur », c'est-à-dire ceux-ci peuvent moduler la glycémie ou l'inflammation. Les souris sous le régime riche en graisse ont des tissus graisseux plus volumineux que celles sous un régime plus sain (RD) (figure 14). Toutefois, cette différence était attendue, puisque la qualité de la nourriture influence directement la manière dont les lipides sont stockés dans les graisses (222). Les souris sous HFD ont une propension à devenir obèse. Cette nourriture est associée à un remodelage des tissus adipeux, à une augmentation de la taille et le nombre d'adipocyte et mène à une susceptibilité de développer des maladies métaboliques telles que le diabète (223-225).

La répartition des graisses peut différer chez les individus qui subissent une modification de leur régime alimentaire. Puisque le protocole modifie la prise alimentaire des animaux en leur infligeant des moments de jeûnes prolongés, est-il possible qu'il y ait une modification de la distribution des graisses ? Selon nos analyses, le jeûne intermittent n'a pas permis de diminuer l'effet causé par le régime alimentaire. Certains articles de la littérature affirment que le changement de diète, dont les régimes tels que la restriction calorique ou le jeûne intermittent, permet de réduire les impacts d'une diète riche en graisse. Par exemple, des études ont montré qu'un protocole de jeûne intermittent induit une réduction de la masse adipeuse blanche chez les rongeurs (224). Bien que notre étude n'ait pas fait l'éventail des connaissances possibles des caractéristiques des tissus adipeux entre les groupes AL et IF, des études sur la taille des adipocytes et l'inflammation pourraient permettre d'en connaître davantage sur la santé métabolique de la souris. Effectivement, le tissu adipeux peut engager plusieurs voies de régulation affectant l'insuline et le glucose (224, 225).

Les souris ont subi des tests de tolérance à l'insuline et au glucose. Le test de tolérance à l'insuline a été mené chez les souris HFD et RD, mais les résultats ont été abandonnés chez les RD à défaut de trouver une dose d'insuline adéquate à injecter sans causer de dommage aux souris. En effet, le protocole élaboré et optimisé dans le laboratoire a été mené principalement chez des souris sous HFD. Cependant, les souris RD montrent une sensibilité accrue à l'insuline et nécessitent des soins immédiats. Les résultats obtenus chez les souris HFD-IF montrent une résistance à l'insuline comparativement aux souris AL (figure 17). Ces résultats ne concordent pas avec la littérature, puisqu'ils sont inverses à ce qui est rapporté. En effet, il est montré que le jeûne intermittent améliore le métabolisme du glucose et de l'insuline (153, 164, 179). Le protocole de jeûne intermittent montrant cette amélioration est différent de celui que nous avons utilisé. Les souris sous un régime de jeûne intermittent 2 :1 sont soumis à 24h de jeûne contrairement à notre protocole où les souris subissent 16h de jeûne. Cependant, la littérature rapporte que quelques heures de jeûne intermittent induiraient des changements bénéfiques sur le métabolisme (226). Les souris sous HFD ne montrent pas d'amélioration ni de détérioration au niveau de la glycémie lors du test de tolérance au glucose (figure 18). Pour ce qui est des souris RD, le test de tolérance au glucose montre un pic dans le premier 15 minutes pour les souris IF, puis aucune différence

notable dans les autres temps (figure 18). Ceci suggère que le protocole utilisé ne confère pas davantage métabolique au niveau de la gestion de l'insuline et du glucose. Comme il a été mentionné ci-haut, l'âge des souris peut affecter les résultats sur la tolérance à l'insuline et au glucose; les souris de notre protocole sont relativement jeunes comparativement à ceux utilisés dans les recherches portant sur le jeûne intermittent ou la restriction calorique (149, 153, 159, 174, 179, 226, 227). Une solution possible pour palier à ce problème est le changement au niveau du paradigme expérimental soit en mettant les souris sur la diète d'acclimatation RD ou HFD pour une période plus longue (environ 4 à 6 semaines ; âge des souris 7 à 9 semaines). À la suite de cette acclimatation, le début du cycle de diète AL ou IF serait de 6 à 8 semaines (âge de la souris 13 à 17 semaines) jusqu'à la néovascularisation choroïdienne, puis 1 semaine plus tard l'euthanasie de la souris aurait lieu. Ceci correspondrait pour les âges dans les comparaisons entre notre étude et les autres (151, 156, 160, 162, 165, 178, 180, 184, 189, 216-218).

5.2 Néovascularisation

La question centrale du projet était l'impact du jeûne intermittent sur la DMLA. L'étude a été réalisée chez un modèle murin bien caractérisée où il y a une induction par laser de la néovascularisation choroïdienne.

La perfusion de FITC-dextran marquant les nouveaux vaisseaux sanguins ne montre aucune différence significative entre les souris AL et IF (figure 20). Cependant, il y a une différence significative entre les groupes de diète, c'est-à-dire HFD et RD (figure 20), confirmant ce qui a déjà été montrée (201). Une part des résultats peut être expliquée par le manque d'habileté de l'utilisation du laser, de l'injection intracardiaque et de la microdissection des yeux pour les premières souris de l'expérience, celles-ci ont été majoritairement éliminées (par exemple, nombre inégale de yeux dans les groupes). L'aire de la blessure, marquée par la lectine, montre une grande variance au sein du même groupe (figure 20).

La délimitation des aires de la lectine peut être confondue avec celle de IBA-1, puisque les marqueurs ont un chevauchement sur le marquage des cellules inflammatoires. Il est probable

que la lectine ait marqué, près des zones des blessures, des cellules inflammatoires. Les erreurs expérimentales sont possibles. Elles auraient pu être prévenues par une méthode, qui a été négligée dans ce protocole, par une vérification des fuites post-laser par une angiographie à la fluorescéine du fond de l'œil (142). Cette technique aurait permis de détecter les vaisseaux sanguins fuyants qui pourraient expliquer certaines pertes d'information, puisque le FITC-Dextran n'a pas marqué les vaisseaux sanguins de la même façon (figure 19 montre des vaisseaux bien marqués) (142, 228). Par la suite, le ratio de FITC-dextran sur la lectine permet la diminution de la variabilité comme un étalon interne au sein d'un groupe. Ce ratio ne confère aucun avantage statistique, c'est-à-dire qu'il y a également une présence d'une grande variance et d'aucune différence significative pour les cycles de diète (figure 20). L'utilisation d'un test statistique pour éliminer certaines données aberrantes a été utilisée (ROUT) ce qui a causé la perte d'information dans le groupe RD-IF plus que dans d'autres groupes (figure 20).

Puisque le modèle de l'induction par laser de la néovascularisation choroïdienne ressemble à un processus de cicatrisation, les études menées auparavant auraient pu permettre de diriger nos hypothèses. Peu d'études avaient fait mention de la capacité du jeûne intermittent et de la restriction calorique d'avoir un effet positif sur la guérison ou la fermeture d'une cicatrice (187-190). Malheureusement, les résultats de ces études étaient en général peu concluants, c'est-à-dire que les changements alimentaires n'avaient pas d'effet sur la période de cicatrisation (187-190). La lectine permet de marquer l'aire de cicatrisation des blessures induite par laser, lorsqu'on compare les résultats, il n'y a pas de différence significative, sauf pour les souris nourries sous RD (figure 20B). Pour ce qui est des souris HFD, il n'existe aucune différence significative entre les aires de la blessure pour le groupe AL et IF (figure 20B).

Le décompte des cellules inflammatoires n'a pas été réalisé, puisque la résolution des images ne le permettait pas, c'est-à-dire que les cellules inflammatoires étaient superposées et trop nombreuses. De plus, la discrimination entre le marqueur IBA-1 et la lectine étaient laborieux. Il n'a pas été possible de quantifier l'aspect inflammatoire entre le cycle d'alimentation et le type de diète dans la choroïde ce qui aurait permis de communiquer l'interaction entre la vascularisation, la diète et l'implication du système immunitaire. Nous avons comme hypothèse que l'inflammation serait beaucoup plus importante dans les yeux de souris sous HFD telles que

montrer précédemment dans le laboratoire, mais nous supposons que le jeûne intermittent pour les souris sous une diète obésogène (HFD) permettrait de diminuer l'inflammation à un niveau comparable à celui des souris RD-AL (145, 201). En revanche, d'autres préparations peuvent être utilisées pour quantifier le profil inflammatoire de la rétine et la choroïde telle que la cytométrie en flux ou la qPCR.

Chapitre 6 – Conclusions et perspectives

Le but de l'expérience était d'observer les effets de la diète et des cycles d'alimentation sur la néovascularisation choroïdienne dans un modèle murin et les caractéristiques phénotypiques engendrées par le protocole de jeûne utilisé. Les résultats divergents obtenus, c'est-à-dire la masse des tissus graisseux épидидymaires inchangée, la résistance à l'insuline des souris sous IF et aucun changement bénéfique pour le glucose, à celle de la littérature montrent que le protocole utilisé n'apporte pas davantage au modèle murin. En effet, les souris sous IF n'ont pas de changement au niveau de la masse graisseuse blanche ni n'améliorent leur test de tolérance au glucose et à l'insuline. Quant à la néovascularisation choroïdienne, il n'y a aucun changement au niveau du cycle d'alimentation pour les souris AL et IF. En conséquence, le modèle de jeûne 2 :1 sur 16h n'apportent pas davantage à la néovascularisation choroïdienne et au métabolisme du glucose et de l'insuline. En revanche, il serait intéressant de trouver une manière de tester un protocole de jeûne plus sévère et automatisé pour calculer l'impact que cela pourrait apporter sur la néovascularisation choroïdienne. Le temps d'alimentation pourrait en effet posséder un impact plus important que l'on pourrait croire. Puisque la littérature n'arrive pas à ce consensus : doit-on nourrir les souris durant le jour ou durant la nuit ? Les futures recherches sur le jeûne intermittent vont se bâtir sur les conclusions de cette étude et pourront davantage éclairer le rôle du jeûne intermittent et la restriction calorique dans le développement et la progression d'une des principales causes de cécité dans le monde, la DMLA.

Références bibliographiques

1. Steinmetz JD, Bourne RRA, Briant PS, Flaxman SR, Taylor HRB, Jonas JB, et al. Causes of blindness and vision impairment in 2020 and trends over 30 years, and prevalence of avoidable blindness in relation to VISION 2020: the Right to Sight: an analysis for the Global Burden of Disease Study. *The Lancet Global Health*. 2021;9(2):e144-e60.
2. Willoughby CE, Ponzin D, Ferrari S, Lobo A, Landau K, Omidi Y. Anatomy and physiology of the human eye: effects of mucopolysaccharidoses disease on structure and function – a review. *2010;38(s1):2-11*.
3. Song -T, Zhou -J. - Primary cilia in corneal development and disease %J - *Zoological Research*. 2020;- 41(- 5):- 495.
4. Yanoff M, Sassani JW. 9 - Uvea. In: Yanoff M, Sassani JW, editors. *Ocular Pathology (Eighth Edition)*. London: Elsevier; 2020. p. 357-79.e5.
5. Bringmann A, Wiedemann P. Chapter 2 - Basic structure of the retina. In: Bringmann A, Wiedemann P, editors. *The Fovea: Academic Press*; 2022. p. 35-50.
6. Swindell EC, Liu C, Shah R, Smith AN, Lang RA, Jamrich M. Eye formation in the absence of retina. *Developmental Biology*. 2008;322(1):56-64.
7. Spitschan M, Santhi N. Individual differences and diversity in human physiological responses to light. *eBioMedicine*. 2022;75:103640.
8. Baden T, Euler T, Berens P. Understanding the retinal basis of vision across species. *Nature Reviews Neuroscience*. 2020;21(1):5-20.
9. Stenkamp D. Development of the Vertebrate Eye and Retina. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. 2015;134C:397-414.
10. Dowling JE. Retina. In: Ramachandran VS, editor. *Encyclopedia of the Human Brain*. New York: Academic Press; 2002. p. 217-35.
11. Bharadwaj AS, Appukuttan B, Wilmarth PA, Pan Y, Stempel AJ, Chipps TJ, et al. Role of the retinal vascular endothelial cell in ocular disease. *Progress in Retinal and Eye Research*. 2013;32:102-80.

12. Yu PK, Balaratnasingam C, Cringle SJ, McAllister IL, Provis J, Yu D-Y. Microstructure and Network Organization of the Microvasculature in the Human Macula. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2010;51(12):6735-43.
13. Ran J, Zhou J. Targeting the photoreceptor cilium for the treatment of retinal diseases. *Acta Pharmacologica Sinica*. 2020;41(11):1410-5.
14. Perusek L, Maeda T. Vitamin A Derivatives as Treatment Options for Retinal Degenerative Diseases. 2013;5(7):2646-66.
15. Bavik C, Henry SH, Zhang Y, Mitts K, McGinn T, Budzynski E, et al. Visual Cycle Modulation as an Approach toward Preservation of Retinal Integrity. *PLoS One*. 2015;10(5):e0124940.
16. Cioffi CL. Introduction: Overview of the Human Eye, Mammalian Retina, and the Retinoid Visual Cycle. In: Cioffi CL, editor. *Drug Delivery Challenges and Novel Therapeutic Approaches for Retinal Diseases*. Cham: Springer International Publishing; 2020. p. 1-42.
17. Kevany BM, Palczewski K. Phagocytosis of Retinal Rod and Cone Photoreceptors. 2010;25(1):8-15.
18. Chapot CA, Euler T, Schubert T. How do horizontal cells 'talk' to cone photoreceptors? Different levels of complexity at the cone-horizontal cell synapse. *J Physiol*. 2017;595(16):5495-506.
19. Euler T, Haverkamp S, Schubert T, Baden T. Retinal bipolar cells: elementary building blocks of vision. *Nature Reviews Neuroscience*. 2014;15(8):507-19.
20. Barnes S, Grove JCR, McHugh CF, Hirano AA, Brecha NC. Horizontal Cell Feedback to Cone Photoreceptors in Mammalian Retina: Novel Insights From the GABA-pH Hybrid Model. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 2020;14.
21. Duebel J, Haverkamp S, Schleich W, Feng G, Augustine GJ, Kuner T, et al. Two-Photon Imaging Reveals Somatodendritic Chloride Gradient in Retinal ON-Type Bipolar Cells Expressing the Biosensor Clomeleon. *Neuron*. 2006;49(1):81-94.
22. Newman E, Reichenbach A. The Müller cell: a functional element of the retina. *Trends in Neurosciences*. 1996;19(8):307-12.
23. Reichenbach A, Bringmann A. New functions of Müller cells. *Glia*. 2013;61(5):651-78.

24. Kim US, Mahroo OA, Mollon JD, Yu-Wai-Man P. Retinal Ganglion Cells—Diversity of Cell Types and Clinical Relevance. *Frontiers in Neurology*. 2021;12.
25. Marshak DW. Retinal Ganglion Cells: Anatomy. In: Squire LR, editor. *Encyclopedia of Neuroscience*. Oxford: Academic Press; 2009. p. 211-8.
26. Dumanskaya GV, Kosheleva SO, Veselovsky NS. Chemical Neurotransmission from Retinal Ganglion Cells to Superior Colliculus Neurons under Conditions of Long-Lasting Neighboring Co-Culturing. *Neurophysiology*. 2012;44(5):356-62.
27. Bertalmío M. Chapter 2 - The biological basis of vision: the retina. In: Bertalmío M, editor. *Vision Models for High Dynamic Range and Wide Colour Gamut Imaging*: Academic Press; 2020. p. 11-46.
28. Marc RE. Information Processing: Amacrine Cells. In: Dartt DA, editor. *Encyclopedia of the Eye*. Oxford: Academic Press; 2010. p. 330-7.
29. Masland Richard H. The Neuronal Organization of the Retina. *Neuron*. 2012;76(2):266-80.
30. Fruttiger M. Development of the retinal vasculature. *Angiogenesis*. 2007;10(2):77-88.
31. Hughes S, Yang H, Chan-Ling T. Vascularization of the human fetal retina: roles of vasculogenesis and angiogenesis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2000;41(5):1217-28.
32. Lobov IB, Rao S, Carroll TJ, Vallance JE, Ito M, Ondr JK, et al. WNT7b mediates macrophage-induced programmed cell death in patterning of the vasculature. *Nature*. 2005;437(7057):417-21.
33. West H, Richardson WD, Fruttiger M. Stabilization of the retinal vascular network by reciprocal feedback between blood vessels and astrocytes. *Development*. 2005;132(8):1855-62.
34. Chu Y, Hughes S, Chan-Ling T. Differentiation and migration of astrocyte precursor cells (APCs) and astrocytes in human fetal retina: relevance to optic nerve coloboma. *The FASEB Journal*. 2001;15(11):2013-5.
35. Campbell JP, Zhang M, Hwang TS, Bailey ST, Wilson DJ, Jia Y, et al. Detailed Vascular Anatomy of the Human Retina by Projection-Resolved Optical Coherence Tomography Angiography. *Scientific Reports*. 2017;7(1):42201.
36. Rust R, Grönnert L, Dogançay B, Schwab ME. A Revised View on Growth and Remodeling in the Retinal Vasculature. *Scientific Reports*. 2019;9(1):3263.

37. Sofroniew MV, Vinters HV. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol.* 2010;119(1):7-35.
38. Zhang HR. Scanning electron-microscopic study of corrosion casts on retinal and choroidal angioarchitecture in man and animals. *Progress in Retinal and Eye Research.* 1994;13(1):243-70.
39. Mrugacz M, Bryl A, Zorena K. Retinal Vascular Endothelial Cell Dysfunction and Neuroretinal Degeneration in Diabetic Patients. 2021;10(3):458.
40. Murakami Y, Ishikawa K, Nakao S, Sonoda K-H. Innate immune response in retinal homeostasis and inflammatory disorders. *Progress in Retinal and Eye Research.* 2020;74:100778.
41. Medawar PB. Immunity to homologous grafted skin; the fate of skin homografts transplanted to the brain, to subcutaneous tissue, and to the anterior chamber of the eye. *Br J Exp Pathol.* 1948;29(1):58-69.
42. Mao B, Yan M, Li L, Yan Cheng C. Blood-Testis Barrier. In: Skinner MK, editor. *Encyclopedia of Reproduction (Second Edition)*. Oxford: Academic Press; 2018. p. 152-60.
43. Karlstetter M, Scholz R, Rutar M, Wong WT, Provis JM, Langmann T. Retinal microglia: Just bystander or target for therapy? *Progress in Retinal and Eye Research.* 2015;45:30-57.
44. Dick AD, Carter D, Robertson M, Broderick C, Hughes E, Forrester JV, et al. Control of myeloid activity during retinal inflammation. 2003;74(2):161-6.
45. Ao J, Wood JPM, Chidlow G, Gillies MC, Casson RJ. Retinal pigment epithelium in the pathogenesis of age-related macular degeneration and photobiomodulation as a potential therapy? *Clinical & Experimental Ophthalmology.* 2018;46(6):670-86.
46. Yang S, Zhou J, Li D. Functions and Diseases of the Retinal Pigment Epithelium. 2021;12.
47. R. Sparrow J, Hicks D, P. Hamel C. The Retinal Pigment Epithelium in Health and Disease. *Current Molecular Medicine.* 2010;10(9):802-23.
48. Meleppat RK, Ronning KE, Karlen SJ, Burns ME, Pugh EN, Zawadzki RJ. In vivo multimodal retinal imaging of disease-related pigmentary changes in retinal pigment epithelium. *Scientific Reports.* 2021;11(1):16252.
49. Lewandowski D, Sander CL, Tworak A, Gao F, Xu Q, Skowronska-Krawczyk D. Dynamic lipid turnover in photoreceptors and retinal pigment epithelium throughout life. *Progress in Retinal and Eye Research.* 2021:101037.

50. Stamer WD, Bok D, Hu J, Jaffe GJ, McKay BS. Aquaporin-1 Channels in Human Retinal Pigment Epithelium: Role in Transepithelial Water Movement. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2003;44(6):2803-8.
51. Taylor AW, Hsu S, Ng TF. The Role of Retinal Pigment Epithelial Cells in Regulation of Macrophages/Microglial Cells in Retinal Immunobiology. 2021;12.
52. Booij JC, Baas DC, Beisekeeva J, Gorgels TGMF, Bergen AAB. The dynamic nature of Bruch's membrane. *Progress in Retinal and Eye Research*. 2010;29(1):1-18.
53. Schneider S, Hotaling N, Campos M, Patnaik SR, Bharti K, May-Simera HL. Generation of an inducible RPE-specific Cre transgenic-mouse line. *PLOS ONE*. 2018;13(11):e0207222.
54. Chen M, Xu H. Parainflammation, chronic inflammation, and age-related macular degeneration. 2015;98(5):713-25.
55. Ford K, D'Amore PA. Retinal Pigment Epithelial–Choroid Interactions. In: Dartt DA, editor. *Encyclopedia of the Eye*. Oxford: Academic Press; 2010. p. 81-8.
56. Travis GH, Golczak M, Moise AR, Palczewski K. Diseases Caused by Defects in the Visual Cycle: Retinoids as Potential Therapeutic Agents. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 2007;47(1):469-512.
57. Chen L, Cao D, Messinger JD, Ach T, Ferrara D, Freund KB, et al. Histology and clinical imaging lifecycle of black pigment in fibrosis secondary to neovascular age-related macular degeneration. *Experimental Eye Research*. 2022;214:108882.
58. Warburton S, Davis WE, Southwick K, Xin H, Woolley AT, Burton GF, et al. Proteomic and phototoxic characterization of melanolipofuscin: correlation to disease and model for its origin. *Mol Vis*. 2007;13:318-29.
59. Wang Z, Dillon J, Gaillard ER. Antioxidant Properties of Melanin in Retinal Pigment Epithelial Cells. 2006;82(2):474-9.
60. Sparrow JR, Fishkin N, Zhou J, Cai B, Jang YP, Krane S, et al. A2E, a byproduct of the visual cycle. *Vision Research*. 2003;43(28):2983-90.
61. Detrick B, Hooks JJ. Immune regulation in the retina. *Immunologic Research*. 2010;47(1):153-61.

62. McMenamin PG, Saban DR, Dando SJ. Immune cells in the retina and choroid: Two different tissue environments that require different defenses and surveillance. *Prog Retin Eye Res.* 2019;70:85-98.
63. Murali A, Krishnakumar S, Subramanian A, Parameswaran S. Bruch's membrane pathology: A mechanistic perspective. 2020;30(6):1195-206.
64. Call TW, Hollyfield JG. Sulfated proteoglycans in Bruch's membrane of the human eye: Localization and characterization using cupromeronic blue. *Experimental Eye Research.* 1990;51(4):451-62.
65. Chen L, Miyamura N, Ninomiya Y, Handa JT. Distribution of the collagen IV isoforms in human Bruch's membrane. *Br J Ophthalmol.* 2003;87(2):212-5.
66. Toomey CB, Johnson LV, Bowes Rickman C. Complement factor H in AMD: Bridging genetic associations and pathobiology. *Progress in Retinal and Eye Research.* 2018;62:38-57.
67. Zeiss CJ, Tu DC, Phan I, Wong R, Treuting PM. 21 - Special Senses: Eye. In: Treuting PM, Dintzis SM, Montine KS, editors. *Comparative Anatomy and Histology (Second Edition)*. San Diego: Academic Press; 2018. p. 445-70.
68. Luttj GA. Outer Retinal (Choroidal) Vasculature Structure and Choroidopathies. In: McManus LM, Mitchell RN, editors. *Pathobiology of Human Disease*. San Diego: Academic Press; 2014. p. 2162-78.
69. Zhang Y, Wildsoet CF. Chapter Thirteen - RPE and Choroid Mechanisms Underlying Ocular Growth and Myopia. In: Hejtmancik JF, Nickerson JM, editors. *Progress in Molecular Biology and Translational Science.* 134: Academic Press; 2015. p. 221-40.
70. Nickla DL, Wallman J. The multifunctional choroid. *Progress in Retinal and Eye Research.* 2010;29(2):144-68.
71. Jonas JB, Cheung CMG, Panda-Jonas S. Updates on the Epidemiology of Age-Related Macular Degeneration. 2017;6(6):493-7.
72. Deng Y, Qiao L, Du M, Qu C, Wan L, Li J, et al. Age-related macular degeneration: Epidemiology, genetics, pathophysiology, diagnosis, and targeted therapy. *Genes Dis.* 2021;9(1):62-79.

73. Nebbioso M, Franzone F, Lambiase A, Taurone S, Artico M, Gharbiya M, et al. Complement Mediators in Development to Treat Age-Related Macular Degeneration. *Drugs & Aging*. 2022.
74. Wong WL, Su X, Li X, Cheung CMG, Klein R, Cheng C-Y, et al. Global prevalence of age-related macular degeneration and disease burden projection for 2020 and 2040: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Global Health*. 2014;2(2):e106-e16.
75. Lim LS, Mitchell P, Seddon JM, Holz FG, Wong TY. Age-related macular degeneration. *The Lancet*. 2012;379(9827):1728-38.
76. Flores R, Carneiro Â, Tenreiro S, Seabra MC. Retinal Progression Biomarkers of Early and Intermediate Age-Related Macular Degeneration. 2022;12(1):36.
77. Bergen AA, Arya S, Koster C, Pilgrim MG, Wiatrek-Moumoulidis D, van der Spek PJ, et al. On the origin of proteins in human drusen: The meet, greet and stick hypothesis. *Progress in Retinal and Eye Research*. 2019;70:55-84.
78. Zhang X, Sivaprasad S. Drusen and pachydrusen: the definition, pathogenesis, and clinical significance. *Eye*. 2021;35(1):121-33.
79. Ueda-Arakawa N, Ooto S, Nakata I, Yamashiro K, Tsujikawa A, Oishi A, et al. Prevalence and Genomic Association of Reticular Pseudodrusen in Age-Related Macular Degeneration. *American Journal of Ophthalmology*. 2013;155(2):260-9.e2.
80. Hogg RE, Silva R, Staurenghi G, Murphy G, Santos AR, Rosina C, et al. Clinical Characteristics of Reticular Pseudodrusen in the Fellow Eye of Patients with Unilateral Neovascular Age-Related Macular Degeneration. *Ophthalmology*. 2014;121(9):1748-55.
81. Flores-Bellver M, Mighty J, Aparicio-Domingo S, Li KV, Shi C, Zhou J, et al. Extracellular vesicles released by human retinal pigment epithelium mediate increased polarised secretion of drusen proteins in response to AMD stressors. *Journal of Extracellular Vesicles*. 2021;10(13):e12165.
82. Lin JB, Halawa OA, Husain D, Miller JW, Vavvas DG. Dyslipidemia in age-related macular degeneration. *Eye*. 2022.
83. Somasundaran S, Constable IJ, Mellough CB, Carvalho LS. Retinal pigment epithelium and age-related macular degeneration: A review of major disease mechanisms. *Clinical & Experimental Ophthalmology*. 2020;48(8):1043-56.

84. Schultz NM, Bhardwaj S, Barclay C, Gaspar L, Schwartz J. Global Burden of Dry Age-Related Macular Degeneration: A Targeted Literature Review. *Clinical Therapeutics*. 2021;43(10):1792-818.
85. Sacconi R, Corbelli E, Querques L, Bandello F, Querques G. A Review of Current and Future Management of Geographic Atrophy. *Ophthalmology and Therapy*. 2017;6(1):69-77.
86. Boyer DS, Schmidt-Erfurth U, van Lookeren Campagne M, Henry EC, Brittain C. THE PATHOPHYSIOLOGY OF GEOGRAPHIC ATROPHY SECONDARY TO AGE-RELATED MACULAR DEGENERATION AND THE COMPLEMENT PATHWAY AS A THERAPEUTIC TARGET. 2017;37(5):819-35.
87. Guillonneau X, Eandi CM, Paques M, Sahel J-A, Sapiéha P, Sennlaub F. On phagocytes and macular degeneration. *Progress in Retinal and Eye Research*. 2017;61:98-128.
88. Schmidt-Erfurth U, Klmscha S, Waldstein SM, Bogunović H. A view of the current and future role of optical coherence tomography in the management of age-related macular degeneration. *Eye*. 2017;31(1):26-44.
89. Risk Factors for the Incidence of Advanced Age-Related Macular Degeneration in the Age-Related Eye Disease Study (AREDS): AREDS report no. 19. *Ophthalmology*. 2005;112(4):533-9.e1.
90. Tenbrock L, Wolf J, Boneva S, Schlecht A, Agostini H, Wieghofer P, et al. Subretinal fibrosis in neovascular age-related macular degeneration: current concepts, therapeutic avenues, and future perspectives. *Cell and Tissue Research*. 2021.
91. Penfold PL, Provis JM, Billson FA. Age-related macular degeneration: ultrastructural studies of the relationship of leucocytes to angiogenesis. *Graefes Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*. 1987;225(1):70-6.
92. Marneros AG. Role of inflammasome activation in neovascular age-related macular degeneration. *The FEBS Journal*. 2021;n/a(n/a).
93. Rastoin O, Pagès G, Dufies M. Experimental Models in Neovascular Age Related Macular Degeneration. 2020;21(13):4627.
94. Peng X, Xiao H, Tang M, Zhan Z, Yang Y, Sun L, et al. Mechanism of fibrosis inhibition in laser induced choroidal neovascularization by doxycycline. *Experimental Eye Research*. 2018;176:88-97.

95. Brandli A, Khong FL, Kong RCK, Kelly DJ, Fletcher EL. Transcriptomic analysis of choroidal neovascularization reveals dysregulation of immune and fibrosis pathways that are attenuated by a novel anti-fibrotic treatment. *Scientific Reports*. 2022;12(1):859.
96. Chakravarthy U, Wong TY, Fletcher A, Piau E, Evans C, Zlateva G, et al. Clinical risk factors for age-related macular degeneration: a systematic review and meta-analysis. *BMC Ophthalmology*. 2010;10(1):31.
97. McKay GJ, Patterson CC, Chakravarthy U, Dasari S, Klaver CC, Vingerling JR, et al. Evidence of association of APOE with age-related macular degeneration - a pooled analysis of 15 studies. *Human Mutation*. 2011;32(12):1407-16.
98. La Cunza N, Tan LX, Thamban T, Germer CJ, Rathnasamy G, Toops KA, et al. Mitochondria-dependent phase separation of disease-relevant proteins drives pathological features of age-related macular degeneration. *JCI Insight*. 2021;6(9).
99. Edwards AO, Ritter R, Abel KJ, Manning A, Panhuysen C, Farrer LA. Complement Factor H Polymorphism and Age-Related Macular Degeneration. 2005;308(5720):421-4.
100. Dunkelberger JR, Song W-C. Complement and its role in innate and adaptive immune responses. *Cell Research*. 2010;20(1):34-50.
101. Toomey CB, Kelly U, Saban DR, Bowes Rickman C. Regulation of age-related macular degeneration-like pathology by complement factor H. 2015;112(23):E3040-E9.
102. Williams BL, Seager NA, Gardiner JD, Pappas CM, Cronin MC, Amat di San Filippo C, et al. Chromosome 10q26-driven age-related macular degeneration is associated with reduced levels of *HTRA1* in human retinal pigment epithelium. 2021;118(30):e2103617118.
103. Clark SJ, Johnson LV. Secondary Photoreceptor Degenerations: Age-Related Macular Degeneration☆. Reference Module in Neuroscience and Biobehavioral Psychology: Elsevier; 2017.
104. Schick T, Ersoy L, Lechanteur YTE, Saksens NTM, Hoyng CB, den Hollander AI, et al. HISTORY OF SUNLIGHT EXPOSURE IS A RISK FACTOR FOR AGE-RELATED MACULAR DEGENERATION. 2016;36(4):787-90.

105. Margrain TH, Boulton M, Marshall J, Sliney DH. Do blue light filters confer protection against age-related macular degeneration? *Progress in Retinal and Eye Research*. 2004;23(5):523-31.
106. Zhou H, Zhang H, Yu A, Xie J. Association between sunlight exposure and risk of age-related macular degeneration: a meta-analysis. *BMC Ophthalmology*. 2018;18(1):331.
107. Sliney DH. Photoprotection of the eye – UV radiation and sunglasses. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2001;64(2):166-75.
108. Hiromoto K, Kuse Y, Tsuruma K, Tadokoro N, Kaneko N, Shimazawa M, et al. Colored lenses suppress blue light-emitting diode light-induced damage in photoreceptor-derived cells. 2016;21 %J *Journal of Biomedical Optics*(3):035004.
109. Vagge A, Ferro Desideri L, Del Noce C, Di Mola I, Sindaco D, Traverso CE. Blue light filtering ophthalmic lenses: A systematic review. *Seminars in Ophthalmology*. 2021;36(7):541-8.
110. Solberg Y, Rosner M, Belkin M. The Association Between Cigarette Smoking and Ocular Diseases. *Survey of Ophthalmology*. 1998;42(6):535-47.
111. Engin A. The Definition and Prevalence of Obesity and Metabolic Syndrome. In: Engin AB, Engin A, editors. *Obesity and Lipotoxicity*. Cham: Springer International Publishing; 2017. p. 1-17.
112. Ng Yin Ling C, Lim SC, Jonas JB, Sabanayagam C. Obesity and risk of age-related eye diseases: a systematic review of prospective population-based studies. *International Journal of Obesity*. 2021;45(9):1863-85.
113. Romero-Corral A, Somers VK, Sierra-Johnson J, Thomas RJ, Collazo-Clavell ML, Korinek J, et al. Accuracy of body mass index in diagnosing obesity in the adult general population. *International Journal of Obesity*. 2008;32(6):959-66.
114. Risk factors associated with age-related macular degeneration: A case-control study in the age-related eye disease study: age-related eye disease study report number 3. *Ophthalmology*. 2000;107(12):2224-32.
115. The Age-Related Eye Disease Study (AREDS): Design Implications AREDS Report No. 1. *Controlled Clinical Trials*. 1999;20(6):573-600.

116. Velilla S, García-Medina JJ, García-Layana A, Dolz-Marco R, Pons-Vázquez S, Pinazo-Durán MD, et al. Smoking and Age-Related Macular Degeneration: Review and Update. *Journal of Ophthalmology*. 2013;2013:895147.
117. Group* TA-REDSR. Lutein + Zeaxanthin and Omega-3 Fatty Acids for Age-Related Macular Degeneration: The Age-Related Eye Disease Study 2 (AREDS2) Randomized Clinical Trial. *JAMA*. 2013;309(19):2005-15.
118. A randomized, placebo-controlled, clinical trial of high-dose supplementation with vitamins C and E, beta carotene, and zinc for age-related macular degeneration and vision loss: AREDS report no. 8. *Arch Ophthalmol*. 2001;119(10):1417-36.
119. Domalpally A, Agrón E, Pak JW, Keenan TD, Ferris FL, Clemons TE, et al. Prevalence, Risk, and Genetic Association of Reticular Pseudodrusen in Age-related Macular Degeneration: Age-Related Eye Disease Study 2 Report 21. *Ophthalmology*. 2019;126(12):1659-66.
120. Chew EY, Clemons TE, Agrón E, Domalpally A, Keenan TDL, Vitale S, et al. Long-term Outcomes of Adding Lutein/Zeaxanthin and ω -3 Fatty Acids to the AREDS Supplements on Age-Related Macular Degeneration Progression: AREDS2 Report 28. *JAMA Ophthalmology*. 2022.
121. Middha P, Weinstein SJ, Männistö S, Albanes D, Mondul AM. β -Carotene Supplementation and Lung Cancer Incidence in the Alpha-Tocopherol, Beta-Carotene Cancer Prevention Study: The Role of Tar and Nicotine. *Nicotine Tob Res*. 2019;21(8):1045-50.
122. Goralczyk R. β -Carotene and Lung Cancer in Smokers: Review of Hypotheses and Status of Research. *Nutrition and Cancer*. 2009;61(6):767-74.
123. Kordiak J, Bielec F, Jabłoński S, Pastuszak-Lewandoska D. Role of Beta-Carotene in Lung Cancer Primary Chemoprevention: A Systematic Review with Meta-Analysis and Meta-Regression. 2022;14(7):1361.
124. Bressler SB. Introduction: Understanding the Role of Angiogenesis and Antiangiogenic Agents in Age-Related Macular Degeneration. *Ophthalmology*. 2009;116(10, Supplement):S1-S7.
125. ZARBIN M, SZIRTH B. Current Treatment of Age-Related Macular Degeneration. 2007;84(7):E559-E72.
126. Verteporfin therapy of subfoveal choroidal neovascularization in age-related macular degeneration: two-year results of a randomized clinical trial including lesions with occult with no

classic choroidal neovascularization—verteporfin in photodynamic therapy report 2. *American Journal of Ophthalmology*. 2001;131(5):541-60.

127. Pauleikhoff D. NEOVASCULAR AGE-RELATED MACULAR DEGENERATION: Natural History and Treatment Outcomes. 2005;25(8):1065-84.

128. Schmidt-Erfurth U, Hasan T. Mechanisms of Action of Photodynamic Therapy with Verteporfin for the Treatment of Age-Related Macular Degeneration. *Survey of Ophthalmology*. 2000;45(3):195-214.

129. Renno RZ, Miller JW. Photosensitizer delivery for photodynamic therapy of choroidal neovascularization. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2001;52(1):63-78.

130. Konstantinou EK, Notomi S, Kosmidou C, Brodowska K, Al-Moujahed A, Nicolaou F, et al. Verteporfin-induced formation of protein cross-linked oligomers and high molecular weight complexes is mediated by light and leads to cell toxicity. *Scientific Reports*. 2017;7(1):46581.

131. Miller JW. Photodynamic therapy for choroidal neovascularization. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*. 2003;241(4):258-62.

132. Kourlas H, Schiller DS. Pegaptanib sodium for the treatment of neovascular age-related macular degeneration: A review. *Clinical Therapeutics*. 2006;28(1):36-44.

133. Pegaptanib. In: Aronson JK, editor. *Meyler's Side Effects of Drugs (Sixteenth Edition)*. Oxford: Elsevier; 2016. p. 545-7.

134. Ishikawa K, Kannan R, Hinton DR. Molecular mechanisms of subretinal fibrosis in age-related macular degeneration. *Experimental Eye Research*. 2016;142:19-25.

135. Cohen SY, Oubraham H, Uzzan J, Dubois L, Tadayoni R. CAUSES OF UNSUCCESSFUL RANIBIZUMAB TREATMENT IN EXUDATIVE AGE-RELATED MACULAR DEGENERATION IN CLINICAL SETTINGS. 2012;32(8):1480-5.

136. Roberts PK, Zotter S, Montuoro A, Pircher M, Baumann B, Ritter M, et al. Identification and Quantification of the Angiofibrotic Switch in Neovascular AMD. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2019;60(1):304-11.

137. Amoaku WM, Chakravarthy U, Gale R, Gavin M, Ghanchi F, Gibson J, et al. Defining response to anti-VEGF therapies in neovascular AMD. *Eye*. 2015;29(6):721-31.

138. Daniel E, Toth CA, Grunwald JE, Jaffe GJ, Martin DF, Fine SL, et al. Risk of Scar in the Comparison of Age-related Macular Degeneration Treatments Trials. *Ophthalmology*. 2014;121(3):656-66.
139. Shah RS, Soetikno BT, Lajko M, Fawzi AA. A Mouse Model for Laser-induced Choroidal Neovascularization. *J Vis Exp*. 2015(106):e53502-e.
140. Tobe T, Ortega S, Luna JD, Ozaki H, Okamoto N, Derevjani NL, et al. Targeted Disruption of the FGF2 Gene Does Not Prevent Choroidal Neovascularization in a Murine Model. *The American Journal of Pathology*. 1998;153(5):1641-6.
141. Lambert V, Lecomte J, Hansen S, Blacher S, Gonzalez M-LA, Struman I, et al. Laser-induced choroidal neovascularization model to study age-related macular degeneration in mice. *Nature Protocols*. 2013;8(11):2197-211.
142. Gong Y, Li J, Sun Y, Fu Z, Liu C-H, Evans L, et al. Optimization of an Image-Guided Laser-Induced Choroidal Neovascularization Model in Mice. *PLOS ONE*. 2015;10(7):e0132643.
143. Pennesi ME, Neuringer M, Courtney RJ. Animal models of age related macular degeneration. *Molecular Aspects of Medicine*. 2012;33(4):487-509.
144. Edelman JL, Castro MR. Quantitative Image Analysis of Laser-induced Choroidal Neovascularization in Rat. *Experimental Eye Research*. 2000;71(5):523-33.
145. Andriessen EMMA, Binet F, Fournier F, Hata M, Dejda A, Mawambo G, et al. Myeloid-resident neuropilin-1 promotes choroidal neovascularization while mitigating inflammation. *EMBO Molecular Medicine*. 2021;13(5):e11754.
146. Ménard C, Wilson AM, Dejda A, Miloudi K, Binet F, Crespo-Garcia S, et al. miR-106b suppresses pathological retinal angiogenesis. *Aging (Albany NY)*. 2020;12(24):24836-52.
147. Fletcher EL, Jobling AI, Greferath U, Mills SA, Waugh M, Ho T, et al. Studying age-related macular degeneration using animal models. *Optom Vis Sci*. 2014;91(8):878-86.
148. Ambati J, Anand A, Fernandez S, Sakurai E, Lynn BC, Kuziel WA, et al. An animal model of age-related macular degeneration in senescent Ccl-2- or Ccr-2-deficient mice. *Nature Medicine*. 2003;9(11):1390-7.
149. Jackson SJ, Andrews N, Ball D, Bellantuono I, Gray J, Hachoumi L, et al. Does age matter? The impact of rodent age on study outcomes. *Lab Anim*. 2017;51(2):160-9.

150. Pettan-Brewer C, Treuting PM. Practical pathology of aging mice. *Pathobiol Aging Age Relat Dis*. 2011;1.
151. Speakman JR, Mitchell SE. Caloric restriction. *Molecular Aspects of Medicine*. 2011;32(3):159-221.
152. Liu D, Huang Y, Huang C, Yang S, Wei X, Zhang P, et al. Calorie Restriction with or without Time-Restricted Eating in Weight Loss. 2022;386(16):1495-504.
153. Acosta-Rodríguez VA, de Groot MHM, Rijo-Ferreira F, Green CB, Takahashi JS. Mice under Caloric Restriction Self-Impose a Temporal Restriction of Food Intake as Revealed by an Automated Feeder System. *Cell Metabolism*. 2017;26(1):267-77.e2.
154. McCay CM, Crowell MF, Maynard LA. The Effect of Retarded Growth Upon the Length of Life Span and Upon the Ultimate Body Size: One Figure. *The Journal of Nutrition*. 1935;10(1):63-79.
155. Osborne TB, Mendel LB, Ferry EL. The Effect of Retardation of Growth Upon the Breeding Period and Duration of Life of Rats. 1917;45(1160):294-5.
156. Mitchell SJ, Bernier M, Mattison JA, Aon MA, Kaiser TA, Anson RM, et al. Daily Fasting Improves Health and Survival in Male Mice Independent of Diet Composition and Calories. *Cell Metabolism*. 2019;29(1):221-8.e3.
157. Cerqueira FM, Kowaltowski AJ. Commonly adopted caloric restriction protocols often involve malnutrition. *Ageing Research Reviews*. 2010;9(4):424-30.
158. Longo VD, Fontana L. Calorie restriction and cancer prevention: metabolic and molecular mechanisms. *Trends in Pharmacological Sciences*. 2010;31(2):89-98.
159. Anson RM, Guo Z, Cabo Rd, Iyun T, Rios M, Hagepanos A, et al. Intermittent fasting dissociates beneficial effects of dietary restriction on glucose metabolism and neuronal resistance to injury from calorie intake. 2003;100(10):6216-20.
160. Shanley DP, Kirkwood TBL. Caloric restriction does not enhance longevity in all species and is unlikely to do so in humans. *Biogerontology*. 2006;7(3):165-8.
161. Masoro EJ. Caloric restriction-induced life extension of rats and mice: A critique of proposed mechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. 2009;1790(10):1040-8.

162. Pugh TD, Klopp RG, Weindruch R. Controlling caloric consumption: protocols for rodents and rhesus monkeys☆. *Neurobiology of Aging*. 1999;20(2):157-65.
163. Aoi W. Chapter 7 - Myokines: A potential key factor in development, treatment, and biomarker of sarcopenia. In: Sakuma K, editor. *Sarcopenia*: Elsevier; 2021. p. 171-85.
164. Mattson Mark P, Allison David B, Fontana L, Harvie M, Longo Valter D, Malaisse Willy J, et al. Meal frequency and timing in health and disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2014;111(47):16647-53.
165. Pak HH, Haws SA, Green CL, Koller M, Lavarias MT, Richardson NE, et al. Fasting drives the metabolic, molecular and geroprotective effects of a calorie-restricted diet in mice. *Nature Metabolism*. 2021;3(10):1327-41.
166. Hambly C, Simpson CA, McIntosh S, Duncan JS, Dalgleish GD, Speakman JR. Calorie-restricted mice that gorge show less ability to compensate for reduced energy intake. *Physiology & Behavior*. 2007;92(5):985-92.
167. Li X, Cope MB, Johnson MS, Smith Jr DL, Nagy TR. Mild Calorie Restriction Induces Fat Accumulation in Female C57BL/6J Mice. 2010;18(3):456-62.
168. Gallinetti J, Harputlugil E, Mitchell JR. Amino acid sensing in dietary-restriction-mediated longevity: roles of signal-transducing kinases GCN2 and TOR. *Biochem J*. 2013;449(1):1-10.
169. Miller RA, Buehner G, Chang Y, Harper JM, Sigler R, Smith-Wheelock M. Methionine-deficient diet extends mouse lifespan, slows immune and lens aging, alters glucose, T4, IGF-I and insulin levels, and increases hepatocyte MIF levels and stress resistance. 2005;4(3):119-25.
170. Green CL, Lamming DW, Fontana L. Molecular mechanisms of dietary restriction promoting health and longevity. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2022;23(1):56-73.
171. Mirzaei H, Raynes R, Longo VD. The conserved role of protein restriction in aging and disease. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2016;19(1):74-9.
172. Minor RK, Allard JS, Younts CM, Ward TM, de Cabo R. Dietary Interventions to Extend Life Span and Health Span Based on Calorie Restriction. *The Journals of Gerontology: Series A*. 2010;65A(7):695-703.
173. Ooka H, Segall PE, Timiras PS. Histology and survival in age-delayed low-tryptophan-fed rats. *Mech Ageing Dev*. 1988;43(1):79-98.

174. Chaix A, Lin T, Le HD, Chang MW, Panda S. Time-Restricted Feeding Prevents Obesity and Metabolic Syndrome in Mice Lacking a Circadian Clock. *Cell Metabolism*. 2019;29(2):303-19.e4.
175. Johnston JD, Ordovás JM, Scheer FA, Turek FW. Circadian Rhythms, Metabolism, and Chrononutrition in Rodents and Humans. *Advances in Nutrition*. 2016;7(2):399-406.
176. Longo VD, Panda S. Fasting, Circadian Rhythms, and Time-Restricted Feeding in Healthy Lifespan. *Cell Metabolism*. 2016;23(6):1048-59.
177. Zhang SL, Sehgal A. 11 - Circadian Rhythms and Disease. In: Pyeritz RE, Korf BR, Grody WW, editors. *Emery and Rimoin's Principles and Practice of Medical Genetics and Genomics (Seventh Edition)*: Academic Press; 2019. p. 299-314.
178. Zarrinpar A, Chaix A, Panda S. Daily Eating Patterns and Their Impact on Health and Disease. *Trends in Endocrinology & Metabolism*. 2016;27(2):69-83.
179. Chaix A, Zarrinpar A, Miu P, Panda S. Time-Restricted Feeding Is a Preventative and Therapeutic Intervention against Diverse Nutritional Challenges. *Cell Metabolism*. 2014;20(6):991-1005.
180. Regmi P, Chaudhary R, Page AJ, Hutchison AT, Vincent AD, Liu B, et al. Early or delayed time-restricted feeding prevents metabolic impact of obesity in mice. *Journal of Endocrinology*. 2021;248(1):75-86.
181. Hatori M, Vollmers C, Zarrinpar A, DiTacchio L, Bushong Eric A, Gill S, et al. Time-Restricted Feeding without Reducing Caloric Intake Prevents Metabolic Diseases in Mice Fed a High-Fat Diet. *Cell Metabolism*. 2012;15(6):848-60.
182. Hammer SS, Vieira CP, McFarland D, Sandler M, Levitsky Y, Dorweiler TF, et al. Fasting and fasting-mimicking treatment activate SIRT1/LXR α and alleviate diabetes-induced systemic and microvascular dysfunction. *Diabetologia*. 2021;64(7):1674-89.
183. Tang Q, Li X, Song P, Xu L. Optimal cut-off values for the homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR) and pre-diabetes screening: Developments in research and prospects for the future. *Drug Discov Ther*. 2015;9(6):380-5.
184. Sutton EF, Beyl R, Early KS, Cefalu WT, Ravussin E, Peterson CM. Early Time-Restricted Feeding Improves Insulin Sensitivity, Blood Pressure, and Oxidative Stress Even without Weight Loss in Men with Prediabetes. *Cell Metabolism*. 2018;27(6):1212-21.e3.

185. Kroeger CM, Klempel MC, Bhutani S, Trepanowski JF, Tangney CC, Varady KA. Improvement in coronary heart disease risk factors during an intermittent fasting/calorie restriction regimen: Relationship to adipokine modulations. *Nutr Metab (Lond)*. 2012;9(1):98.
186. Ma S, Sun S, Geng L, Song M, Wang W, Ye Y, et al. Caloric Restriction Reprograms the Single-Cell Transcriptional Landscape of *Rattus Norvegicus* Aging. *Cell*. 2020;180(5):984-1001.e22.
187. Akowuah PK, Hargrave A, Rumbaut RE, Burns AR. Dissociation between Corneal and Cardiometabolic Changes in Response to a Time-Restricted Feeding of a High Fat Diet. *Nutrients*. 2021;14(1).
188. Christovam AC, Theodoro V, Mendonça FAS, Esquisatto MAM, dos Santos GMT, do Amaral MEC. Activators of SIRT1 in wound repair: an animal model study. *Archives of Dermatological Research*. 2019;311(3):193-201.
189. Roth GS, Kowatch MA, Hengemihle J, Ingram DK, Spangler EL, Johnson LK, et al. Effect of age and caloric restriction on cutaneous wound closure in rats and monkeys. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 1997;52(2):B98-102.
190. Reed MJ, Penn PE, Li Y, Birnbaum R, Vernon RB, Johnson TS, et al. Enhanced cell proliferation and biosynthesis mediate improved wound repair in refed, caloric-restricted mice. *Mechanisms of Ageing and Development*. 1996;89(1):21-43.
191. Arumugam TV, Phillips TM, Cheng A, Morrell CH, Mattson MP, Wan R. Age and energy intake interact to modify cell stress pathways and stroke outcome. 2010;67(1):41-52.
192. Leung YB, Cave NJ, Heiser A, Edwards PJB, Godfrey AJR, Wester T. Metabolic and Immunological Effects of Intermittent Fasting on a Ketogenic Diet Containing Medium-Chain Triglycerides in Healthy Dogs. *Frontiers in Veterinary Science*. 2020;6.
193. Kim K-H, Kim YH, Son JE, Lee JH, Kim S, Choe MS, et al. Intermittent fasting promotes adipose thermogenesis and metabolic homeostasis via VEGF-mediated alternative activation of macrophage. *Cell Research*. 2017;27(11):1309-26.
194. Kim YH, Lee JH, Yeung JL-H, Das E, Kim RY, Jiang Y, et al. Thermogenesis-independent metabolic benefits conferred by isocaloric intermittent fasting in ob/ob mice. *Scientific Reports*. 2019;9(1):2479.

195. Boutant M, Kulkarni Sameer S, Joffraud M, Raymond F, Métairon S, Descombes P, et al. SIRT1 Gain of Function Does Not Mimic or Enhance the Adaptations to Intermittent Fasting. *Cell Reports*. 2016;14(9):2068-75.
196. Perello M, Valdivia S, García Romero G, Raingo J. Considerations about rodent models of binge eating episodes. 2014;5.
197. Czyzyk TA, Sahr AE, Statnick MA. A model of binge-like eating behavior in mice that does not require food deprivation or stress. *Obesity (Silver Spring)*. 2010;18(9):1710-7.
198. Kraev A. Parallel universes of Black Six biology. *Biology Direct*. 2014;9(1):18.
199. Mukherjee P, El-Abbadi MM, Kasperzyk JL, Raney MK, Seyfried TN. Dietary restriction reduces angiogenesis and growth in an orthotopic mouse brain tumour model. *Br J Cancer*. 2002;86(10):1615-21.
200. Vidoni C, Ferraresi A, Esposito A, Maheshwari C, Dhanasekaran DN, Mollace V, et al. Calorie Restriction for Cancer Prevention and Therapy: Mechanisms, Expectations, and Efficacy. *J Cancer Prev*. 2021;26(4):224-36.
201. Andriessen EM, Wilson AM, Mawambo G, Dejda A, Miloudi K, Sennlaub F, et al. Gut microbiota influences pathological angiogenesis in obesity-driven choroidal neovascularization. *EMBO Mol Med*. 2016;8(12):1366-79.
202. Arras M, Autenried P, Rettich A, Spaeni D, Rülcke T. Optimization of intraperitoneal injection anesthesia in mice: drugs, dosages, adverse effects, and anesthesia depth. *Comp Med*. 2001;51(5):443-56.
203. Lee C, Jones TA. Effects of Ketamine Compared with Urethane Anesthesia on Vestibular Sensory Evoked Potentials and Systemic Physiology in Mice. *J Am Assoc Lab Anim Sci*. 2018;57(3):268-77.
204. Navarro KL, Huss M, Smith JC, Sharp P, Marx JO, Pacharinsak C. Mouse Anesthesia: The Art and Science. *ILAR Journal*. 2021;62(1-2):238-73.
205. Svensjö E, Bouskela E. Chapter 4 - Endothelial Barrier: Factors That Regulate Its Permeability. In: Da Luz PL, Libby P, Chagas ACP, Laurindo FRM, editors. *Endothelium and Cardiovascular Diseases*: Academic Press; 2018. p. 37-48.

206. Thomas A, Wang S, Sohrabi S, Orr C, He R, Shi W, et al. Characterization of vascular permeability using a biomimetic microfluidic blood vessel model. *Biomicrofluidics*. 2017;11(2):024102.
207. Miyazaki K, Hashimoto K, Sato M, Watanabe M, Tomikawa N, Kanno S, et al. Establishment of a method for evaluating endothelial cell injury by TNF- α in vitro for clarifying the pathophysiology of virus-associated acute encephalopathy. *Pediatric Research*. 2017;81(6):942-7.
208. Au - Miloudi K, Au - Dejda A, Au - Binet F, Au - Lapalme E, Au - Cerani A, Au - Sapieha P. Assessment of Vascular Regeneration in the CNS Using the Mouse Retina. *JoVE*. 2014(88):e51351.
209. Poor SH, Qiu Y, Fassbender ES, Shen S, Woolfenden A, Delpero A, et al. Reliability of the Mouse Model of Choroidal Neovascularization Induced by Laser Photocoagulation. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2014;55(10):6525-34.
210. Siersbæk MS, Ditzel N, Hejbøl EK, Præstholm SM, Markussen LK, Avolio F, et al. C57BL/6J substrain differences in response to high-fat diet intervention. *Scientific Reports*. 2020;10(1):14052.
211. Kern M, Knigge A, Heiker JT, Kosacka J, Stumvoll M, Kovacs P, et al. C57BL/6JRj mice are protected against diet induced obesity (DIO). *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2012;417(2):717-20.
212. York DA. Lessons from animal models of obesity. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 1996;25(4):781-800.
213. Wang C-Y, Liao JK. A Mouse Model of Diet-Induced Obesity and Insulin Resistance. In: Weichhart T, editor. *mTOR: Methods and Protocols*. Totowa, NJ: Humana Press; 2012. p. 421-33.
214. Pellizzon MA, Ricci MR. The common use of improper control diets in diet-induced metabolic disease research confounds data interpretation: the fiber factor. *Nutrition & Metabolism*. 2018;15(1):3.
215. Council NR. Guidance for the description of animal research in scientific publications. 2011.

216. Xie K, Neff F, Markert A, Rozman J, Aguilar-Pimentel JA, Amarie OV, et al. Every-other-day feeding extends lifespan but fails to delay many symptoms of aging in mice. *Nature Communications*. 2017;8(1):155.
217. Wang S, Huang M, You X, Zhao J, Chen L, Wang L, et al. Gut microbiota mediates the anti-obesity effect of calorie restriction in mice. *Scientific Reports*. 2018;8(1):13037.
218. Patikorn C, Roubal K, Veettil SK, Chandran V, Pham T, Lee YY, et al. Intermittent Fasting and Obesity-Related Health Outcomes: An Umbrella Review of Meta-analyses of Randomized Clinical Trials. *JAMA Network Open*. 2021;4(12):e2139558-e.
219. Anson RM, Jones B, de Cabod R. The diet restriction paradigm: a brief review of the effects of every-other-day feeding. *AGE*. 2005;27(1):17-25.
220. Benedé-Ubieto R, Estévez-Vázquez O, Ramadori P, Cubero FJ, Nevzorova YA. Guidelines and Considerations for Metabolic Tolerance Tests in Mice. *Diabetes Metab Syndr Obes*. 2020;13:439-50.
221. Stout RW. Glucose tolerance and ageing. *J R Soc Med*. 1994;87(10):608-9.
222. Diaz-Marin R, Crespo-Garcia S, Wilson AM, Buscarlet M, Dejda A, Fournier F, et al. Myeloid-resident neuropilin-1 influences brown adipose tissue in obesity. *Scientific Reports*. 2021;11(1):15767.
223. Hariri N, Thibault L. High-fat diet-induced obesity in animal models. *Nutrition Research Reviews*. 2010;23(2):270-99.
224. Dwaib HS, AlZaim I, Eid AH, Obeid O, El-Yazbi AF. Modulatory Effect of Intermittent Fasting on Adipose Tissue Inflammation: Amelioration of Cardiovascular Dysfunction in Early Metabolic Impairment. *Front Pharmacol*. 2021;12:626313.
225. Choe SS, Huh JY, Hwang IJ, Kim JI, Kim JB. Adipose Tissue Remodeling: Its Role in Energy Metabolism and Metabolic Disorders. 2016;7.
226. de Cabo R, Mattson MP. Effects of Intermittent Fasting on Health, Aging, and Disease. 2019;381(26):2541-51.
227. Carlson AJ, Hoelzel F. Apparent prolongation of the life span of rats by intermittent fasting. *J Nutr*. 1946;31:363-75.

228. Wigg JP, Zhang H, Yang D. A Quantitative and Standardized Method for the Evaluation of Choroidal Neovascularization Using MICRON III Fluorescein Angiograms in Rats. PLoS one. 2015;10(5):e0128418-e.