



# Identification et Analyse d'un Facteur de Survie des Photorécepteurs à Cônes de l'Épithélium Pigmentaire Rétinien

Géraldine Millet-Puel

► **To cite this version:**

Géraldine Millet-Puel. Identification et Analyse d'un Facteur de Survie des Photorécepteurs à Cônes de l'Épithélium Pigmentaire Rétinien. Biologie cellulaire. 2011. <hal-01478832>

**HAL Id: hal-01478832**

**<https://hal-ephe.archives-ouvertes.fr/hal-01478832>**

Submitted on 28 Feb 2017

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche  
ECOLE PRATIQUE DES HAUTES ETUDES  
Science de la Vie et de la Terre  
Mémoire

Présenté par

**Géraldine MILLET-PUEL**

Pour l'obtention du diplôme de l'Ecole pratique des Hautes Etudes

## Identification et Analyse d'un Facteur de Survie des Photorécepteurs à Cônes de l'Épithélium Pigmentaire Rétinien

Soutenu le 06 Décembre 2011 devant le jury suivant :

Dr. Bernard LACOUR	Président
Dr. Thierry LEVEILLARD	Tuteur Scientifique
Dr Sylvie DEMIGNOT	Tuteur Pédagogique
Dr. Emeline NANDROT	Rapporteur
Dr Sylvie RETAUX	Examineur

Mémoire préparé sous la direction de :

Dr Léveillard Thierry  
Institut de la Vision  
UMR-S 968, Département de Génétique, 17 rue Moreau 75012 Paris  
Directeur : Pr José-Alain SAHEL

Et de Dr Demignot Sylvie  
Laboratoire de Pharmacologie Cellulaire et moléculaire  
Centre de recherche des Cordeliers, 15 rue de l'école de médecine 75004 Paris  
Directeur : Pr Jean Chambaz

Identification et Analyse d'un Facteur de Survie des Photorécepteurs à Cônes de l'Épithélium Pigmentaire Rétinien

Géraldine Millet-Puel

Il existe de nombreuses maladies héréditaires qui affectent les photorécepteurs de la rétine. L'une d'elles, appelée rétinopathie pigmentaire est caractérisée par une dégénérescence irréversible et progressive des photorécepteurs à bâtonnets, responsable de la vision périphérique, suivie dans une seconde phase de la mort des photorécepteurs à cônes, les cellules les plus importantes pour la vision. Il a été démontré par notre laboratoire que la dégénérescence secondaire des cônes résultait de la perte d'expression de facteurs de survie exprimés et sécrétés par les bâtonnets. Par une approche de criblage basée sur un modèle de cultures enrichies en cônes et par criblage par expression d'une banque d'ADNc issue de rétine neurale de souris, nous avons précédemment identifié en 2004 un de ces facteurs, RdCVF (Rod derived Cone Viability Factor). Nous avons montré que ce facteur chez la souris *rd1*, modèle de la pathologie, conduit à la protection de 40% des cônes. De ce fait, il peut exister d'autres sources de protection pouvant conduire à une protection totale des cônes, telles que des facteurs provenant de l'épithélium pigmentaire rétinien.

Dans le travail présenté ici nous avons dans un premier temps démontré qu'il existait un ou plusieurs facteurs trophiques issus de l'épithélium pigmentaire rétinien. Pour identifier ces facteurs additionnels, nous avons initié une recherche de ces facteurs en reprenant les expertises acquises en criblant une banque d'ADNc d'épithélium pigmentaire de rat. Nous avons identifié à l'issue du criblage de la banque un facteur de survie que nous avons nommé Epithelium derived Cone Viability Factor (EdCVF). L'analyse bioinformatique de ce facteur montre qu'il pourrait s'agir d'un facteur de transcription ZFP180. Dans un deuxième temps, l'analyse de ce facteur *in vitro* a montré que celui-ci avait bien un effet spécifique sur les cônes dans les cultures enrichies en cônes d'embryons de poulet, puis nous avons démontré que ce facteur n'avait pas d'effet synergique *in vitro* avec le facteur de survie RdCVF, le facteur sécrété par les photorécepteurs à bâtonnets.

Le projet avait pour objectif d'identifier des facteurs de survie des cônes pour le traitement de la rétinopathie pigmentaire en complément du facteur RdCVF. Néanmoins l'absence d'effet synergique entre les deux facteurs suggère qu'EdCVF ne possède pas ce potentiel. Il serait donc maintenant important de comprendre par quels mécanismes un facteur de transcription, tel que ZFP180 produit un effet de survie sur les photorécepteurs à cônes et ainsi ouvrir de nouvelles perspectives thérapeutiques.

Mots Clés	Rétinopathie pigmentaire	Facteurs de survie
	Criblage haut contenu	Embryons de poulet
	Photorécepteurs à cônes	Zinc Finger Protein
	Epithélium pigmentaire rétinien	

Introduction	5
I. La rétine	5
I.1. Structure de la rétine	5
I.1.1 Les neurones	6
I.1.2 Les cellules gliales	7
I.1.3 Les Photorécepteurs	8
I.1.4 L'épithélium pigmentaire rétinien	11
I.2 Culture primaire de la rétine	13
I.2.1 Historique de la cellule	13
I.2.2. Techniques d'étude de la cellule	15
I.2.2.1 Généralités	15
I.2.2.2 Historique de la culture cellulaire	16
I.2.2.3 Culture Cellulaire du Système Nerveux Central	18
II. Les dégénérescences rétiniennes héréditaires	21
II.1 Les Rétinopathies pigmentaires	21
II.2 Approches thérapeutiques de la rétinopathie pigmentaire.	23
II.3 La neuroprotection des photorécepteurs	25
II.3.1 Les facteurs de croissance	25
II.3.2 Les facteurs de survie « Rod-derived Cone Viability Factors »	27

## *Liste des abréviations*

AAV = Adeno-associated virus  
AB = Antibiotique  
ADN = Acide Désoxyribonucléique  
ADNc = Acide Désoxyribonucléique complémentaire  
ADP = Adénosine Di-Phosphate  
ARN = Acide RiboNucléique  
ATP = Adénosine Tri-Phosphate  
BBS = Bes Buffer Saline  
BCIP = Bromo Chloro Indolyl Phosphate toluidine salt  
BSA = Bovin Serum Albumin  
CDM = Chemically defined media  
CFU = Colonies formant unités  
CMV = Cytomégalovirus  
CNTF = Ciliary Neural Growth Factor  
DMEM = Dulbecco's Modified Eagle Medium  
EdCVF = Epithelium-derived Cone Viability Factor  
ERG = Electrorétinogramme  
EPR = Epithélium Pigmentaire Rétinien  
FGF = Fibroblast Growth Factor  
HTC = Hight Content Screening  
HTS = Hight Throughput Screening  
IRBP = Interphotoreceptor Retinoid Binding Protein  
LB = Luria-Bertani Broth  
MABT = Maleic Acid Buffer Tween  
NBT = Nitroblue Tetrazolium Chloride  
NTP = Nucléotide Tri-phosphate  
OCT = Optimal Cutting Temperature  
ORF = Open Reading Frame  
PA = Potentiel d'action  
PBS = Phosphate Buffer Saline  
PCR = Polymerase chain reaction  
PEDF = Pigment epithelium-derived factor  
PFA = Paraformaldéhyde  
PNA = Peanut agglutinin lectin  
PTPC = Permeability-Transition Pore Complex  
RCS = Royal College of Surgeons  
*Rd* = Retinal degeneration  
RdCVF = Rod-derived Cone Viability Factor  
REG = Réticulum Endoplasmique Granuleux  
REL = Réticulum Endoplasmique Lisse  
ROS = Reactive Oxygen Species  
RP = Rétinopathies Pigmentaires  
SE = Segment Externe  
SNC = Système Nerveux Central  
SNP = Système nerveux périphérique  
SSC = Saline Sodium Citrate  
SVF = Sérum de Veau Foetal  
VDAC = Voltage-Dependent Anion Channel  
ZFP= Zinc Finger Protein

# *Introduction*

## **I. La rétine**

### *I.1. Structure de la rétine*

La vision est l'un des cinq sens développés chez l'être humain, c'est le sens dédié à la perception de la lumière. Cette perception est rendue possible grâce à l'organe visuel, l'œil et plus particulièrement par le capteur, la rétine. La rétine qui tapisse le fond de l'œil est composée de deux tissus, la rétine neurale et l'épithélium pigmentaire rétinien (Figure 1). Par abus de langage la rétine neurale est communément appelée rétine, il en sera donc ainsi dans ce mémoire. La rétine est le lieu de traduction du message lumineux venant de l'extérieur, en signaux nerveux envoyés au cerveau via le nerf optique. Il s'agit d'un tissu neuronal très fin, partie intégrée au système nerveux central, de 0,1 à 0,5 mm d'épaisseur qui est localisé entre l'humeur vitrée et l'épithélium pigmentaire rétinien (EPR). La rétine possède une structure stratifiée dans laquelle on distingue 5 types de neurones (photorécepteurs, cellules bipolaires, cellules amacrines, cellules horizontales et cellules ganglionnaires) et 3 types de cellules gliales (cellules gliales de Müller, astrocytes et microglies). Ces différents types cellulaires sont organisés en 5 couches nucléaires (Figure 2) :

La couche nucléaire externe contenant le corps cellulaire des photorécepteurs

La couche plexiforme externe qui est formée par les jonctions synaptiques entre les photorécepteurs et les cellules de la couche inférieure

La couche nucléaire interne contenant le corps cellulaire des cellules horizontales, bipolaires et amacrines

La couche plexiforme interne, qui fait la jonction synaptique des cellules bipolaires et des cellules ganglionnaires

La couche des ganglionnaires, qui se compose essentiellement des cellules ganglionnaires et de quelques cellules amacrines.

#### **I.1.1 Les neurones**

Les photorécepteurs étant l'un des types cellulaires étudiés dans le travail présenté ici, ils seront traités à part dans le sous chapitre III.1.4

**Les cellules bipolaires:** Les cellules bipolaires comme leur nom l'indique font l'articulation entre les deux pôles de la rétine: les photorécepteurs et les cellules ganglionnaires, les interneurones permettent la transmission verticale du signal lumineux. Il existe plusieurs groupes de cellules bipolaires (Boycott and Wassle, 1991; Kolb et al., 1992; Mariani, 1984): les bipolaires des bâtonnets, reliant plusieurs bâtonnets à une cellule ganglionnaire, et les bipolaires des cônes, reliant un ou plusieurs cônes à une cellule ganglionnaire. Ces derniers se subdivisent encore en deux groupes, les bipolaires "invaginées" et les bipolaires "superficielles", formant deux voies distinctes de transmission de l'information.

**Les cellules horizontales:** Il existe trois types de cellules horizontales HI, HII et HIII (Boycott et al., 1987; Kolb et al., 1994). Les cellules horizontales sont connectées latéralement à plusieurs cônes, bâtonnets et neurones bipolaires, leur rôle est d'inhiber l'activité des cellules avoisinantes. Cette suppression sélective de certains signaux nerveux s'appelle inhibition latérale et son rôle principal est d'augmenter le contraste du signal sensoriel.

**Les cellules Amacrines:** La morphologie des cellules amacrines est très diversifiée, il existe en effet 29 types de cellules amacrines (MacNeil and Masland, 1998), qui sont toutes caractérisées par l'absence d'axone, elles n'ont que des prolongements dendritiques et elles utilisent une grande diversité de neurotransmetteurs. Leur corps cellulaire est situé dans la couche nucléaire interne et leur terminaison synaptique dans la couche plexiforme interne. En reliant les neurones bipolaires et ganglionnaires, elles forment une voie alternative de communication entre la rétine externe et interne ne reposant pas sur les cellules bipolaires.

**Les cellules ganglionnaires:** Les cellules ganglionnaires (Figure 3) constituent le dernier

maillon de la chaîne neuronale rétinienne. Ce sont les seuls neurones de la rétine à transmettre le signal nerveux en potentiel d'action. L'ensemble des axones des cellules ganglionnaires se regroupe au niveau de la papille optique pour former le nerf optique qui propage le signal visuel, au niveau du cerveau. Il existe une très grande diversité de cellules ganglionnaires qui sont regroupées en deux types : les cellules ganglionnaires M ("*magnus*": grand en latin) et les cellules ganglionnaires P ("*pagnus*" : petit en latin) (Dacey and Petersen, 1992; Kolb et al., 1992).

### I.1.2 Les cellules gliales

**Les cellules Gliales de Müller :** Ces cellules gliales traversent la rétine de part en part et leurs pieds terminaux forment la couche limitante externe et la couche limitante interne (Figure 4). Elles sont majoritaires dans la rétine par rapport aux deux autres types de cellules gliales. Les cellules gliales de Müller entrent en interaction avec tous les neurones de la rétine (photorécepteurs, cellules bipolaires, cellules ganglionnaires, etc.). Il a été démontré que les cellules gliales de Müller étaient produites à partir de cellules neuroépithéliales qui sont également les progéniteurs des neurones rétiens (Turner and Cepko, 1987). Ces cellules interviennent dans le maintien de la structure rétinienne mais elles jouent également un rôle de maintien du métabolisme des neurones car elles recyclent les ions et les neurotransmetteurs libérés par les neurones et régulent ainsi la concentration ionique.

**Les astrocytes :** Les astrocytes rétiens ne sont pas issus comme les cellules gliales de Müller d'un progéniteur commun avec les neurones, mais migrent du cerveau vers la rétine via le nerf optique durant le développement rétinien (Chan-Ling, 1997). Des études récentes démontrent qu'il existe un deuxième site de production des astrocytes dans la zone ventriculaire, très tôt durant le développement embryonnaire de la rétine (Chan-Ling et al., 2009). Ces astrocytes se retrouvent seulement dans la partie la plus interne de la rétine : la couche des ganglionnaires où ils jouent un rôle dans le maintien de la barrière entre la circulation sanguine et la rétine.

**Les microglies :** Durant le stade embryonnaire, les cellules microgliales pénètrent dans la rétine en même temps que les précurseurs des vaisseaux sanguins, ce qui laisse à supposer qu'elles ont une origine mesenchymale (Chan-Ling, 1997). Leur fonction, à l'âge adulte, est de phagocyter les débris cellulaires qui sont libérés lors de traumatismes de la rétine.

### I.1.3 Les Photorécepteurs

Les photorécepteurs sont, comme leur nom l'indique, des neurones sensibles à la lumière. Ils sont responsables de la transduction du signal lumineux en signal biochimique, puis électrique appelé phototransduction. Il existe deux types de photorécepteurs, les bâtonnets et les cônes qui n'ont pas la même sensibilité à la lumière.

#### **Structure :**

La structure des photorécepteurs est particulière car ce type cellulaire possède un segment externe qui est le siège de la phototransduction, un segment interne où se trouve toute la machinerie cellulaire, un cil connecteur qui relie le segment externe et le segment interne et un pied où se trouvent les terminaisons synaptiques (Figures 5 a et 5b). Le cil connecteur est la seule connexion entre le cytoplasme des deux compartiments, il est donc impliqué dans le processus d'échange de nombreuses molécules, notamment des protéines (Trojan et al., 2008). Le segment externe est formé d'un empilement de disques enchâssés dans la membrane de la cellule, pour les bâtonnets et d'un repliement de la membrane pour les cônes. C'est sur ces disques que sont localisés les pigments visuels sensibles à la lumière (les opsines). Pour les bâtonnets, ce segment externe est très long et contient donc beaucoup de pigments visuels, c'est pour cela qu'ils sont 1.000 fois plus sensibles à la lumière que les cônes. Chez les cônes, ces segments externes sont plus petits et en forme effilée, en cône. Les disques sont constamment renouvelés par l'EPR, les membranes et protéines membranaires qui les composent migrent donc progressivement du pôle basal, où ils sont synthétisés et assemblés vers le pôle apical, où ils sont renouvelés. Le segment interne des photorécepteurs contient le noyau et les organites (les mitochondries, l'appareil de Golgi, etc.) indispensables au fonctionnement du photorécepteur. La terminaison synaptique est le lieu de transmission du signal électrique produit par la lumière vers les neurones internes de la rétine.

**Les bâtonnets :**

Les bâtonnets sont très sensibles à la lumière et sont donc responsables de la vision scotopique, c'est à dire à faible luminosité. Cette vision n'est qu'en noir, blanc et nuances de gris car les bâtonnets ne perçoivent pas les couleurs, ils sont responsables également du champ visuel car chez l'homme, ils sont absents dans la zone la plus centrale de la rétine. Les bâtonnets n'expriment qu'un seul pigment visuel, la Rhodopsine « du grec rhodos, rose, et opsis, vision ». Cette molécule est une protéine à sept domaines transmembranaires, l'opsine, qui présente une liaison covalente avec le rétinol, qui n'est autre qu'un aldéhyde de la vitamine A (rétinol). La molécule d'opsine qui lie le rétinol, est synthétisée dans l'appareil de Golgi dans le segment interne, puis est transportée via des vésicules jusqu'au cil connecteur où elle est incorporée dans la membrane des disques (Papermaster et al., 1985). Le rétinol, produit de la vitamine A est issu de la circulation sanguine via la choroïde et l'EPR. La molécule de rétinol est commune aux bâtonnets et aux différents types de cônes.

**Les cônes :**

Les cônes sont responsables de la vision photopique, c'est à dire à très forte luminosité. Ils permettent une vision très fine chez les primates et les oiseaux, grâce à la présence de la fovéa (Figure 6) au centre de la rétine qui ne comprend que des photorécepteurs à cônes. Ils permettent également la distinction des couleurs grâce aux différents types de cônes. En effet les cônes se répartissent en trois grandes familles chez l'homme et les autres primates, L (long), M (medium) et S (short) correspondant respectivement à leur sensibilité aux longues, moyennes et courtes longueurs d'ondes (Brown and Wald, 1963). Les cônes exprimant l'erythropsine sont sensibles pour des longueurs d'onde correspondant au rouge (opsine-L), ceux exprimant de la chloropsine, au vert (opsine-M) et ceux exprimant de la cyanopsine, au bleu (opsine-S). Ces trois types de récepteurs sont inégalement répartis sur la rétine des primates. Alors que la fovéa comporte essentiellement des cônes L et M, les cônes de types S se trouvent essentiellement en région parafovéale. De plus, la répartition des différents types de cônes dans la rétine, malgré la régularité évoquée plus haut, est aléatoire. Cette répartition aléatoire des différents types de cônes permet d'éviter des aberrations visuelles lorsque le sujet regarde des motifs réguliers. Les cônes expriment alternativement une des trois iodopsines (l'erythropsine, la chloropsine et la cyanopsine) ce qui les différencie et leur transfère leur sensibilité spectrale. C'est la séquence des opsines des cônes qui détermine le spectre de longueurs d'ondes absorbées (Figure 7).

**Phototransduction :**

La phototransduction la mieux connue est celle des bâtonnets qui contiennent la rhodopsine au niveau des disques empilés du segment externe. Au niveau moléculaire, la réception de la lumière provoque l'isomérisation de l'11-cis rétinol en tout-trans rétinol, la photoisomérisation qui entraîne un changement de conformation de l'opsine à laquelle le rétinol est lié et initie la phototransduction, ce changement de conformation induit toute une cascade de réactions biochimiques (figure 8), cette cascade induit la fermeture de canaux sodium puis des canaux calcium, ce qui provoque l'hyperpolarisation membranaire du photorécepteur et bloque la libération d'un neurotransmetteur, le glutamate. Le signal est alors transmis aux neurones internes de la rétine.

#### I.1.4 L'épithélium pigmentaire rétinien

La rétine pigmentaire est constituée d'un épithélium cubique simple dont les cellules émettent des microvillosités qui entourent les segments externes des photorécepteurs (Figure 9). Il existe deux types de microvillosités, des courtes dont la fonction est la phagocytose des segments externes des photorécepteurs, et des longues, qui ont plus un rôle de maintien de la structure EPR/photorécepteur et un rôle d'apport des nutriments essentiel aux photorécepteurs. Chaque cellule de l'épithélium est en contact avec en moyenne 25 photorécepteurs, bâtonnets et cônes. L'épithélium pigmentaire nourrit et soutient la couche des photorécepteurs sous-jacente à l'aide de quatre fonctions principales. La fonction principale de cet épithélium consiste en la phagocytose et la dégradation des segments externes (SE) des photorécepteurs qui sont constitués de disques membranaires. Au cours d'une journée, la concentration des substances nocives résultant de l'exposition des photorécepteurs à la lumière augmente particulièrement dans la région apicale des segments externes (Beatty et al., 2000). Les segments externes sont donc phagocytés par l'EPR une fois par jour et renouvelés pour maintenir le fonctionnement



du système. Les microvilies dites courtes des cellules de l'EPR entourent l'extrémité des segments externes des photorécepteurs et phagocytose ces derniers. Les phagosomes qui contiennent les segments externes fusionnent ensuite avec les lysozymes dans les cellules de l'EPR où ils sont dégradés (Figure 9). On estime qu'une cellule de l'EPR phagocyte entre 2.000 et 4.000 disques membranaires chaque jour. Il semblerait que l'EPR initie la phagocytose des SE des bâtonnets au lever du soleil, alors que la phagocytose des SE des cônes commencerait à la tombée de la nuit. L'épithélium assure aussi un rôle d'absorption des rayons lumineux, car il contient un pigment de couleur brun noir : la mélanine, qui absorbe la lumière et qui limite ainsi la quantité de lumière réfléchie dans l'œil et protège donc les photorécepteurs. Cette monocouche cellulaire participe au maintien du cycle visuel (Figure 10). Le cycle de la vision est régi par la photoisomérisation du rétinol qui est lié au pigment visuel par une liaison covalente. Lorsque le rétinol 11-*cis* absorbe un photon venant de la lumière, il passe de l'état 11-*cis* à l'état tout-*trans*. Cette isomérisation est à l'origine de l'influx nerveux par phototransduction. Le rétinol 11-*cis* est ensuite régénéré par voie enzymatique, en permettant la transisomérisation du tout-*trans*-rétinol en 11-*cis*-rétinol (Baehr et al., 2003). Les photorécepteurs ne possèdent pas d'activité *cis-trans* isomérase. Ce recyclage est possible grâce au transport de la molécule de *cis*-rétinol du segment externe des photorécepteurs vers l'EPR via une protéine de transport l' "Interphotoreceptor Retinoid Binding Protein" (IRBP) (Adler and Martin, 1982; Gonzalez-Fernandez, 2002). Certaines études montrent qu'il existe une deuxième voie de transisomérisation pour les cônes via les cellules gliales de Müller. En effet, les cônes peuvent recycler leurs tout-*trans*-rétinol via un second cycle visuel dans les cellules de Müller (Mata et al., 2002). L'EPR joue aussi un rôle de barrière hémato-rétinienne contrôlant l'afflux des nutriments entre la rétine et la circulation sanguine au niveau de la choroïde, sous-jacente à l'EPR. Dans un sens, l'EPR transporte des électrolytes et de l'eau de l'espace sous rétinien vers la choroïde (Strauss, 2005), dans l'autre sens il transporte du glucose, des ions et d'autres nutriments du sang vers les photorécepteurs. Pour transporter le glucose, l'EPR présente des transporteurs sur sa face apicale et sa face basolatérale. Les transporteurs GLUT1 et GLUT3 sont exprimés en grande quantité dans l'épithélium pigmentaire (Ban and Rizzolo, 2000; Sugawara et al., 1994). L'EPR transporte également la vitamine A (rétinol), nécessaire au renouvellement du cycle visuel au niveau du couple EPR-Photorécepteurs.

## I.2 Culture primaire de la rétine

### I.2.1 Historique de la cellule

Le mot cellule est un mot très souvent employé en biologie car c'est l'unité structurale, fonctionnelle et reproductrice constituant les êtres vivants. Cette notion a été introduite pour la première fois en 1665 par Robert Hooke, qui après observation de plantes vivantes (liège) avec l'un des premiers microscopes (Figure 11A), observa de petits compartiments, qu'il nomma cellules, du latin cellula qui signifie petite chambre. Le nom de cellules est resté, bien que les structures qu'il observait n'étaient en fait que les parois cellulaires survivant à la mort des cellules végétales (Figure 11B). En 1838 et 1839, Matthias Jakob Schleiden, botaniste de formation et Théodor Schwann, zoologiste, découvrirent que les végétaux et les animaux étaient tous constitués de cellules, c'est la première fois qu'est prononcé le terme de cellules vivantes. L'observation de ce matériel vivant va donc les amener à énoncer que « tous les organismes sont faits de petites unités : les cellules », ceci constituant la première étape dans l'introduction de la théorie cellulaire. En 1855, une deuxième étape fut franchie par un médecin Allemand Virchow, qui suggéra que toute cellule provient d'une autre cellule. L'idée que les organismes vivants ne naissent pas spontanément mais proviennent d'organismes préexistants fut très contestée à l'époque, mais fut finalement confirmée par les travaux de Louis Pasteur dans les années 1860. Ses travaux permirent de réfuter définitivement la théorie de la génération spontanée grâce à la célèbre expérience de la Mer de Glace. Ainsi, il montra que les micro-organismes ne naissent pas spontanément et si les milieux de culture utilisés par Pasteur se troublaient, c'est qu'il y avait en suspension dans l'air des particules vivantes qui venaient contaminer ceux-ci. Ainsi chaque nouveau microbe provient d'un microbe précédent qui l'a engendré et il lui est identique. Pasteur dira de la vie que « Son apparition ne résulte

pas de l'effet du hasard mais de celui d'un ordre qui est celui de la vie ».

Le monde cellulaire est divisé en deux organisations fondamentales différentes : la cellule procaryote et la cellule eucaryote. La cellule procaryote est une cellule sans noyau, qui se retrouve exclusivement chez les Bactéries: Eubactéries et Archaeobactéries. Ce type cellulaire a une structure très simple et ne contient pas d'organites, toutes les réactions biochimiques se font donc en solution au sein du cytoplasme. Le matériel génétique est libre et forme un chromosome circulaire, unique. Les organismes procaryotes sont des organismes unicellulaires. A contrario, la cellule eucaryote possède un matériel génétique physiquement séparé du reste de la cellule par une enveloppe nucléaire, et sa structure est plus complexe que celle de la cellule procaryote. Sa taille est comprise entre 10 et 100  $\mu\text{m}$  soit un volume de  $10^3$  à  $10^6$  supérieure à celui de la cellule procaryote. Les organismes eucaryotes peuvent être unicellulaires ou multicellulaires. Chez la levure, organisme unicellulaire, une seule cellule accomplit toutes les fonctions, elle est donc non spécialisée. Les eucaryotes rassemblent aussi les organismes pluricellulaires, tels que les végétaux et les animaux. Pris ici comme exemple, le corps humain comprend entre 60 et 100 milliards de cellules spécialisées. Il existe de nombreux types cellulaires qui produisent préférentiellement des réactions biochimiques particulières qui requièrent des structures propres et des protéines que d'autres types cellulaires n'expriment pas.

En 1859, Charles Darwin publia « L'origine des espèces par la sélection naturelle ». Dans ce manuscrit, il énonce la théorie de l'évolution qui stipule que tous les êtres vivants descendent d'un même ancêtre commun: d'où le terme d'origine monophylétique. Cette théorie associée à la théorie cellulaire va constituer le concept structurant la biologie et va influencer la plus grande partie des travaux de recherche. La théorie de l'évolution donnera naissance à la phylogénie qui est l'étude de la formation et de l'évolution des espèces en vue d'établir leur parenté depuis les origines du vivant. Une phylogénie est couramment représentée par un arbre phylogénique où la proximité des branches de cet arbre représente le degré de parenté entre les taxons (du grec, "taxis": placement) et les nœuds, les ancêtres communs des taxons (Figure 12). Certaines données permettent de dater la naissance du premier organisme vivant à plus de 4 milliard d'année, soit seulement 800 millions d'années après la formation de la terre. Les premiers fossiles d'eucaryotes datent de 2 milliards d'années et les premiers organismes pluricellulaires sont apparus il y a 600 millions d'années, voire peut être 2 milliards (El Albani et al., 2010). Eucaryotes et procaryotes dérivent d'un ancêtre commun proche des bactéries, le « Progénote », la branche des eucaryotes s'étant séparée de l'arbre relativement tôt durant l'évolution. Pour la théorie de l'endosymbiose, la cellule eucaryote ancestrale est un prédateur qui se nourrissait en capturant d'autres cellules. Cet eucaryote primitif comportant un noyau et un cytosquelette (architecture du cytoplasme) aurait ingéré une eubactérie libre capable de métaboliser l'oxygène. Il en résulta une cellule issue de la symbiose de ces deux organismes, l'eubactérie constituant l'origine des mitochondries. Cette association semble s'être produite il y a 1,5 milliards d'années en parallèle à l'enrichissement en oxygène de l'atmosphère terrestre. Certaines cellules eucaryotiques ont acquis plus tard des chloroplastes en ingérant des bactéries photosynthétiques, ce second saut dans l'évolution est à l'origine des cellules végétales.

## I.2.2. Techniques d'étude de la cellule

### I.2.2.1 Généralités

C'est grâce à l'invention du microscope en 1668 qu'Antony Van Leeuwenhoek (Figure 13A) a pu observer les premières cellules, tels que les globules rouges sanguins vus pour la première fois en 1673 (Figure 13B). Pendant près de 200 ans l'étude des cellules n'évolua pas au-delà de simples observations. Ce n'est qu'au XIX<sup>ème</sup> siècle, avec la formulation de la théorie cellulaire, qu'une nouvelle science émergea: la biologie cellulaire. Cette science à part entière étudie les manifestations de la vie à l'échelle cellulaire. L'étude de la biologie cellulaire commença avec des études microscopiques, car la plupart des organites cellulaires n'est visible qu'au microscope photonique. Les protéines furent découvertes au milieu du XIX<sup>ème</sup> siècle par le Néerlandais Mulder qui mis en évidence que le blanc d'œuf est une substance constituée d'une molécule contenant du carbone, de l'hydrogène, de l'oxygène et de l'azote et un peu de phosphore et de soufre. En raison de l'abondance de substances analogues, et sur la suggestion de son confrère Berzelius, il les nomma protéines (du grec

"proto": premier chez les êtres vivants). Cette découverte initia le développement de techniques d'études biochimiques de la cellule. Pendant bien longtemps les scientifiques pensèrent que les protéines, dont on avait perçu l'immense diversité durant des années, semblaient de bonnes candidates pour véhiculer l'information génétique héritée de cellule mère à cellule fille. Or en 1928, l'anglais Fred Griffith, publia ses travaux suggérant qu'il existe chez les cellules, un "facteur transformant", libéré par la chaleur, susceptible d'être intégré par d'autres bactéries, leur conférant de façon héréditaire de nouvelles propriétés. La nature biochimique de ce facteur transformant ne fut élucidée qu'en 1944 lorsqu'Oswald Avery découvrit que l'acide désoxyribonucléique (ADN), porte cette activité transformante. A partir du milieu du XX<sup>ème</sup> siècle, l'étude de l'ADN donna naissance à une nouvelle discipline : la biologie moléculaire. Il existe à l'heure actuelle une multitude de techniques qui permettent d'étudier la cellule et son fonctionnement mais la technique sur laquelle le travail présenté ici repose est principalement la culture cellulaire.

### I.2.2.2 Historique de la culture cellulaire

La culture cellulaire représente un ensemble de techniques qui permet de faire survivre des cellules en dehors de leur organisme, ces cellules ne sont pas organisées en tissu mais elles sont capables dans certains cas de se diviser *in vitro*, de sécréter des protéines et de maintenir des fonctions spécifiques. La culture en laboratoire de cellules animales est devenue une technique développée dans les années 1950 mais le maintien des cellules vivantes hors de leur tissu d'origine avait été essayé dès le XIX<sup>ème</sup> siècle. A cette époque, le physiologiste anglais Sydney Ringer formula une solution saline contenant des chlorures, de sodium, de potassium, de calcium et de magnésium afin de maintenir les battements cardiaques d'un cœur isolé du reste du corps de la grenouille (Moore, 1911). En 1885, Wilhelm Roux enleva une portion du canal médullaire d'un embryon de poulet et réussit à le maintenir en vie pendant plusieurs jours dans une solution saline chaude. Ces expériences établirent le principe de la culture de tissus. En 1910, Ross Granville Harrison qui travaillait à l'université John Hopkins à Baltimore, publia ses recherches sur des neuroblastes de grenouilles. Il plaçait un morceau de tissus nerveux d'embryon de grenouille sur du fluide lymphatique et observait que, non seulement celui-ci ne mourrait pas, mais de plus il continuait de grandir (Nicholas, 1960). Il démontrait donc que les fonctions cellulaires peuvent se maintenir *in vitro* et mit au point une technique qui est considérée aujourd'hui comme la première culture cellulaire. Au début du XX<sup>ème</sup> siècle, le médecin et biologiste français Alexis Carrel développa les techniques de culture de tissus selon trois axes principaux: l'amélioration des techniques de préparation des tissus, l'élaboration des règles d'asepsie et l'étude des besoins nutritionnels. La culture cellulaire comme elle est aujourd'hui pratiquée, n'apparaît qu'à partir de 1962 lors de l'introduction de la trypsinisation des tissus par Aaron Moscona (Moscona, 1962). La trypsinisation est la digestion du tissu avec la trypsine afin d'obtenir des cellules isolées ou des amas de cellules capables de se diviser *in vitro*. La trypsine est une protéase issue du suc pancréatique qui hydrolyse les liaisons peptidiques en C-terminal des acides aminés basiques tels que les résidus Lysine et Arginine. Les premières salles de culture cellulaire ont été mises en place par l'armée américaine dans les années 1940 à Fort Detrick (Figure 14) à des fins peu glorieuses, puisqu'ils ont mis en place ces salles de culture afin de mettre au point des armes biologiques (L'histoire secrète des guerres biologiques, Patrick Berche, Edition Robert Laffont, 15 février 2009). La technique de culture cellulaire va être abondamment utilisée au milieu du XX<sup>ème</sup> siècle pour la recherche en virologie. C'est en effet grâce aux techniques de culture cellulaire que les virologistes parviendront à obtenir de grandes quantités de suspensions virales purifiées destinées à la production de vaccins thérapeutiques. Le vaccin contre la Polio fut le premier à être produit selon ce protocole, et grâce aux travaux de recherches en culture cellulaire de John Enders, Thomas Weller, et Frederick Robbins (Enders et al., 1949). Ceci leur valut le prix Nobel de physiologie et de médecine de 1954. A l'heure actuelle, il existe deux types distincts de culture cellulaire: la culture primaire, dans laquelle le tissu est extrait d'un organisme vivant, dissocié et mis en culture sur des supports de culture, avec des milieux appropriés, dans des conditions atmosphériques spécifiques et pour un temps défini (souvent pas plus d'un mois), et la culture de lignées immortalisées ou non (Todaro and Green, 1963). Les lignées immortalisées peuvent être repiquées indéfiniment sur de nouveaux supports de culture et celles-ci peuvent être stockées pendant de longues périodes dans l'azote

liquide à la température de moins 183,6°C.

### I.2.2.3 Culture Cellulaire du Système Nerveux Central

Les différentes structures anatomiques du système nerveux peuvent être regroupées selon qu'elles appartiennent au système nerveux central (SNC) ou au système nerveux périphérique (SNP). Le système nerveux central comprend l'encéphale, la rétine ainsi que la moelle épinière. Ces organes du système nerveux central sont des centres d'intégration qui analysent et interprètent les informations sensorielles afin de donner des commandes motrices. Le système nerveux périphérique est composé des organes du système nerveux situés à l'extérieur de la cavité crânienne et du canal rachidien donc externe au système nerveux central. En revanche le nerf olfactif, le nerf optique ainsi que la rétine et l'épithélium olfactif appartiennent au système nerveux central.

La mise en culture des différents types cellulaires du SNC permet de les étudier isolément et ainsi de contrôler leur environnement. Il est possible de mettre en culture des neurones provenant d'une zone précise du cerveau. Au sein de ces cultures primaires, les neurones se reconnaissent, émettent des ramifications et établissent des connexions. Les principaux types cellulaires du système nerveux central peuvent être maintenus en culture, que se soient les différents neurones du SNC (neurones de Purkinje, motoneurones, photorécepteurs, etc...), les astrocytes, oligodendrocytes, et microglies, ou bien l'endothélium.

La culture de cellules de rétine est une technique de recherche couramment utilisée, offrant de nombreuses applications dans les domaines des neurosciences, en général et de l'ophtalmologie, en particulier. L'architecture cellulaire spécifique de la rétine, ainsi que son accessibilité, ont permis de développer différents modèles de cultures primaires des principaux types cellulaires. Ces modèles ont été conçus dans le but de répondre à des questions spécifiques à chacun des types ou sous-types cellulaires.

**Culture d'explant rétinien** : Cette technique de culture tissulaire appelée aussi culture de rétines entières ou culture *ex vivo* consiste à mettre en culture une rétine mise à plat sur un support appelé insert et ceci dans du milieu de culture avec tous les apports nutritionnels nécessaires à la survie des cellules de la rétine. Celle-ci apparaît vers les années 1980. En 1988, un groupe à l'université de Colombie Britannique à Vancouver parvient à maintenir *in vitro* des explants de rétines humaines adultes prélevées post-mortem, une première mondiale pour un tissu du système nerveux central (Kim and Takahashi, 1988). La culture d'explant a la particularité de préserver l'architecture caractéristique de la rétine *in situ*, c'est pourquoi cette technique est essentiellement utilisée dans l'étude des interactions entre cellules (Figure 15).

**Culture de cellules en monocouche** : Il est devenu possible d'obtenir des modèles de cultures mixtes de rétine de mammifères dans les années 1970. Cependant ces cultures ont un intérêt limité par le fait qu'elles ne permettent pas l'étude exclusive d'un type cellulaire donné (Figure 16). En 1988, le groupe de Barres à Harvard réussit à purifier les cellules ganglionnaires rétiniennes par capture d'un antigène de surface (ou immuno-panning en anglais) grâce à des anticorps spécifiques dirigés contre des antigènes de ces cellules (Barres et al., 1988). En 1990, Hicks et Courtois mettent au point une technique afin d'obtenir à partir de rétines de rats nouveaux nés, des cultures de cellules gliales de Müller pures ainsi que des cultures d'EPR (Hicks and Courtois, 1990). L'obtention de ces cellules pures a été utilisée par notre laboratoire afin d'accroître la survie des neurones, en les maintenant en co-culture sur une couche de cellules gliales de Müller (Picaud et al., 1998). En 1998, des chercheurs de notre laboratoire arrivèrent à séparer la couche de photorécepteurs des autres couches cellulaires de la rétine grâce à une technique de coupe dans l'épaisseur du tissu avec un vibratome (Fontaine et al., 1998). Cependant, ces cultures de photorécepteurs comprennent les cônes et les bâtonnets, il faudra attendre 2005 pour que, toujours dans notre laboratoire, une équipe de chercheurs mette au point une technique de purification des photorécepteurs à cônes en s'inspirant de la technique de capture de cellules ganglionnaire de Barres (Balse et al., 2005). Toutes ces cultures se font à partir de rétines d'animaux de laboratoire : souris et rats. Or chez les rongeurs, la rétine est composée de 97% de photorécepteurs à bâtonnets et 3 % de photorécepteurs, il est donc difficile d'obtenir des cultures pures de cônes en grande quantité. Chez les oiseaux la proportion des photorécepteurs est inversée : 86% de cônes et 14 % de

bâtonnets. Il existe une technique pour obtenir une culture enrichie en cônes, préparée à partir de rétines d'embryons de poulet. Cette technique est d'une importance capitale dans ce mémoire et sera par conséquent plus amplement développée dans le chapitre résultats.

## II. Les dégénérescences rétiniennes héréditaires

### II.1 Les Rétinopathies pigmentaires

Les dégénérescences rétiniennes héréditaires forment un ensemble hétérogène de maladies génétiques. Parmi celles-ci, la Rétinopathie Pigmentaire (RP) a des caractéristiques communes qui consistent en une dégénérescence progressive des cellules photoréceptrices à bâtonnet de la rétine, suivie plus tardivement des cônes. Il en résulte un affaiblissement irréversible de la vision périphérique, puis de l'acuité visuelle ainsi qu'un dépôt pigmentaire visible au fond d'œil (Figure 17), des événements conduisant à la cécité. Ces pathologies sont des maladies rares qui affectent 40.000 personnes en France, environ 400.000 en Europe, 100.000 aux États Unies et 1 nouveau-né sur 3.000 en France. La RP reste la cause la plus fréquente de cécité chez des adultes d'âge moyen, dans les pays industrialisés. En 1989, le gène *RHO*, codant pour la rhodopsine et responsable de la RP d'une famille irlandaise a été identifié et localisé sur le bras long du chromosome 3. Cette découverte marquait le point de départ des études génétiques de la RP. Quelques temps après fut découvert une mutation dans le gène de la rhodopsine au sein d'une population de malades américains présentant une RP. Ceci permit de faire des progrès dans la compréhension de ces pathologies. Depuis les années 1990, les mutations décrites pour les RP, touchent principalement des gènes exprimés par les bâtonnets (Kajiwara et al., 1994; McLaughlin et al., 1993; Rosenfeld et al., 1992). A ce jour, 137 gènes responsables de dégénérescences rétiniennes héréditaires ont été identifiés (Hims et al., 2003) (Figure 18), notamment les gènes codant pour des protéines de la cascade de phototransduction (rhodopsine,...), des protéines du cytosquelette des bâtonnets, des facteurs de transcription comme CRX (Swain et al., 1997), des facteurs d'épissage comme PRPF31 (Vithana et al., 2001), mais aussi des protéines exprimés par l'EPR comme MERTK (Nandrot et al., 2000) ou RPE65 impliqué dans une forme grave de dégénérescence des photorécepteurs, l'amaurose congénitale de Leber (Gu et al., 1997). Dans 45% des cas, la mutation est un événement sporadique mais, pour les autres cas restants (55%) elle résulte d'une transmission héréditaire. Il existe différents modes de transmissions héréditaires :

Le mode autosomique dominant qui représente 40-50% des cas

Le mode autosomique récessif = 30-40%

Le mode lié au chromosome X = 10-15% (mode de transmission maternelle)

Le mode digénique = 1 à 2%, l'individu ne peut être affecté de la maladie que si deux différents gènes responsables de la RP lui sont transmis simultanément par son père et sa mère.

Le mode mitochondrien < 1% (mode de transmission maternelle)

Il existe plusieurs formes cliniques, la forme la plus fréquemment rencontrée étant la rétinopathie pigmentaire (retinitis pigmentosa en anglais) qui représente 90 à 95% des cas, une autre forme étant la « cone rod dystrophy » ou rétinopathie à cônes prédominant (5 à 10%). Il existe également une autre forme, très grave, l'amaurose congénitale de Leber. Elle constitue l'une des principales causes de cécité chez l'enfant, puisqu'elle est impliquée dans environ 10 à 20% des cas d'enfants aveugles. Cette maladie héréditaire est principalement transmise sur le mode autosomique récessif. Sept gènes responsables de cette maladie : *CRX*, *CRB1*, *GUCY2B*, *AILP1*, *RDH12*, *GPGRIP1* et *RPE65* ont été identifiés.

Nous allons nous intéresser plus particulièrement à la rétinopathie pigmentaire. Le premier symptôme est une gêne visuelle ressentie par le patient lorsque la nuit tombe, c'est l'héméralopie (du grec "héméra" : le jour, et "ops" : la vision). Cela est dû à la dégénérescence des bâtonnets qui servent à la vision crépusculaire. Cette première étape est suivie d'un rétrécissement du champ visuel (vision tubulaire) qui correspond à la mort des bâtonnets qui se trouvent non loin de la fovéa. Puis dans un deuxième temps, la perte de la vision centrale correspond à la dégénérescence des photorécepteurs à cônes (Figure 19). Lorsque tous les

photorécepteurs ont disparu, on observe dans le fond de l'œil du patient une migration des pigments de mélanines de l'EPR vers les couches internes de la rétine, ce qui donne l'aspect pigmenté de la rétine, caractéristique de la rétinopathie pigmentaire.

Chez les patients, les études génétiques ont révélé que les gènes mutés étaient très souvent exprimés sélectivement par les photorécepteurs à bâtonnets. Ceci n'explique donc pas la mort secondaire des cônes. Cela signifie que leur dégénérescence peut être une conséquence indirecte de la disparition des bâtonnets. Notre équipe a réussi à démontrer par des expériences de greffes (Mohand-Said et al., 2000; Mohand-Said et al., 1997) et en culture (Fintz et al., 2003; Mohand-Said et al., 1998) que la dégénérescence des cônes était liée à la perte d'un signal de survie sécrété par les bâtonnets. La mort des bâtonnets, affectés directement par les mutations, entraînerait ainsi indirectement la perte des cônes.

## *II.2 Approches thérapeutiques de la rétinopathie pigmentaire.*

A l'heure actuelle, il n'existe aucun traitement pour guérir les patients atteints de rétinopathie pigmentaire. Quelques précautions peuvent néanmoins ralentir temporairement la progression de la maladie. Ainsi, le port de verres protecteurs et filtrants protégeant de la luminosité et des rayons ultraviolets est recommandé, car il semble que certaines pathologies soient aggravées par la lumière du soleil. Le recours à des aides optiques comme des lunettes grossissantes et des loupes peuvent sensiblement améliorer la vision des patients. Même si à ce jour cette maladie est incurable, de nombreuses recherches de traitements sont en cours d'aboutissement.

La première, la thérapie génique, consiste à réintroduire une copie normale du gène muté dans des cellules cibles, le transfert de gènes se fait grâce à des vecteurs viraux et ce transgène ne pourra s'exprimer que dans les cellules cibles, éventuellement sous contrôle d'un promoteur spécifique. Les premiers essais, prometteurs, ont été réalisés sur des modèles animaux de l'amaurose congénitale de Leber, les chiens RPE65<sup>(mut/mut)</sup>. Les chercheurs ont injecté dans l'espace sous rétinien, un vecteur viral recombinant AAV-RPE65, à des chiens de 4 mois d'âge, RPE65<sup>(mut/mut)</sup> et ont obtenu une restauration de la fonction visuelle (Acland et al., 2001) mesurée par électrorétinogramme (ERG) et pupillométrie. De plus, cette même équipe a procédé à un suivi longitudinal, et 3 ans post-injections, les chiens ont conservé les fonctions visuelles et ont très bien toléré les vecteurs viraux (Acland et al., 2005). D'autres essais similaires ont confirmé le succès de cette technique chez cet animal (Le Meur et al., 2007). Chez l'homme, les premiers résultats de trois essais cliniques indépendants pour l'Amaurose congénitale de Leber sont très encourageants (Bainbridge et al., 2008; Cideciyan et al., 2008; Maguire et al., 2008), trois des patients traités ont, au bout de 30 jours, eu une augmentation significative de la sensibilité visuelle montrant l'activation du cycle rétinien, mais avec une cinétique bien plus lente que la normale (Cideciyan et al., 2008). La restauration des capacités visuelles a pu être enregistrée au niveau du cortex (Ashtari et al., 2011).

La deuxième approche est la thérapie cellulaire. Celle-ci consiste à transplanter des cellules saines afin de remplacer les cellules défectueuses. Les premiers essais consistèrent à transplanter des cellules immatures issues de tissus embryonnaires, en faisant l'hypothèse que comme ces cellules sont immatures, elles conserveraient assez de plasticité pour s'intégrer au tissu hôte. Malheureusement, ces essais ont été infructueux car même si ces cellules sont capables de survivre, et de migrer dans la rétine, elles sont incapables d'établir des connections synaptiques avec les autres types cellulaires. En revanche si ces cellules sont prélevées à un stade bien précis du développement qui correspond au pic de genèse des bâtonnets représenté par l'expression du facteur de transcription NRL, ces cellules s'intègrent, se différencient en bâtonnets, établissent des connections synaptiques avec les autres cellules et améliorent les fonctions visuelles (MacLaren et al., 2006).

Les implants rétinien ou rétines artificielles quant à eux reposent sur l'observation que les cellules qui communiquent avec le cerveau via le nerf optique, appelées cellules ganglionnaires, restent en grande partie intactes et fonctionnelles dans les dégénérescences rétinien, même à la suite de la perte des photorécepteurs. L'idée est venue de les stimuler par une micro-prothèse rétinienne. Les premiers essais menés aux Etats-Unis chez l'homme ont montré l'aptitude des patients implantés à suivre une tache lumineuse, ou bien à visualiser des objets bien contrastés (Humayun et al., 2009).

L'approche nutritionnelle consiste en un régime enrichi en vitamine A, qui devrait ralentir la dégénérescence des bâtonnets dans le cas des rétinopathies pigmentaires présentant une mutation de classe II au niveau de la rhodopsine. En effet, selon Li (Li et al., 1998), la vitamine A stabiliserait l'opsine mutante en rendant plus disponible le chromophore. Une approche particulière par neuroprotection a été développée au laboratoire et fait l'objet du chapitre suivant.

### II.3 La neuroprotection des photorécepteurs

La neuroprotection des photorécepteurs dans la rétinopathie pigmentaire vise à limiter la perte de fonction de ce type cellulaire. Il existe deux types de neuroprotection, la première repose sur l'administration de facteurs de croissance et la deuxième sur l'utilisation de facteurs de survie.

#### II.3.1 Les facteurs de croissance

Les facteurs de croissance sont des polypeptides de poids moléculaire peu élevé (6-30 kDa) qui régulent la croissance et les fonctions des cellules, grâce à une fixation sur des récepteurs spécifiques de grande affinité exprimés à la surface des cellules cibles. L'activation de la cellule se traduit par une activation de signaux transmembranaires, puis par une cascade de phénomènes cytoplasmiques qui aboutit à l'activation de l'expression de gènes dont les produits sont directement impliqués dans la réponse cellulaire. A la différence des hormones sécrétées à distance du tissu effecteur (sécrétion endocrine), la plupart des facteurs de croissance agissent sur les cellules proximales (sécrétion paracrine). Ils agissent comme les hormones à des concentrations très faibles. Certaines cellules expriment le récepteur du facteur de croissance qu'elles produisent (sécrétion autocrine).

De très nombreux facteurs de croissance sont directement impliqués dans le développement de l'œil et plus particulièrement dans la différenciation des cellules de la rétine. Il est d'ailleurs intéressant de noter que c'est l'analyse de la différenciation des photorécepteurs R7 chez la drosophile qui a permis de réunir les facteurs de croissance à la voie de transduction impliquant les MAP Kinases (Nagaraj and Banerjee, 2004). Ce n'est qu'en 1990 que Faktorovich a montré les effets protecteurs du facteur de croissance Fibroblast Growth Factor 2 (FGF2) sur un modèle de dégénérescence rétinienne chez le rat Royal College of Surgeons (RCS) (Faktorovich et al., 1990). Ce facteur ayant des effets angiogéniques importants, son utilisation en clinique n'a pu être envisagée. Le facteur le plus prometteur actuellement: le Ciliary Neurotrophic Factor (CNTF) a donné lieu à un essai clinique par utilisation d'un mode de délivrance particulier reposant sur des cellules recombinantes encapsulées (Cayouette and Gravel, 1997; Sieving et al., 2006). Cependant le traitement au CNTF montre une diminution de la réponse au niveau de l'électrorétinogramme (ERG). Les résultats paradoxaux du CNTF ont conduit à l'étude d'autres facteurs de croissance dont le Glial cell line Derived Neurotrophic Factor (GDNF). Il a donc été démontré au sein du laboratoire que celui-ci exerçait un effet neuroprotecteur, tant au niveau fonctionnel qu'au niveau histologique, sur les photorécepteurs à bâtonnets chez la souris *rdl*, qui est un modèle animal de la rétinopathie pigmentaire (Frasson et al., 1999).

#### II.3.2 Les facteurs de survie « Rod-derived Cone Viability Factors »

La rétinopathie pigmentaire est une maladie héréditaire qui provoque la dégénérescence primaire des photorécepteurs à bâtonnets puis dans un deuxième temps celle des photorécepteurs à cônes, cette dernière étape menant à la cécité, la protection des cônes est donc une stratégie médicalement rationnelle. Cette maladie résulte dans la plupart des cas de mutations dans des gènes exprimés préférentiellement par les bâtonnets. Notre équipe s'est donc intéressé aux mécanismes conduisant à la dégénérescence secondaire des cônes, dans un modèle de RP, la souris « retinal degeneration » (*rdl*). La souris *rdl* porte une mutation récessive sur un gène spécifiquement exprimé par les bâtonnets, le gène *Pde6<sub>-</sub>*, qui est d'ailleurs muté dans la RP et suit les deux mêmes stades de la pathologie : perte des bâtonnets puis des cônes. Notre équipe a montré que si l'on transplantait des bâtonnets sains dans l'œil d'une souris *rdl*, la perte secondaire des cônes était significativement retardée (Mohand-Said

et al., 2000; Mohand-Said et al., 1997). Ces résultats ont conduit l'équipe à émettre l'hypothèse qu'il existait une ou plusieurs molécules sécrétées par les bâtonnets et qui avaient un effet de survie sur les cônes (Mohand-Said et al., 1998). Par une approche de criblage à haut contenu d'une banque d'expression de rétine de souris normales, notre équipe a identifié un facteur de survie des photorécepteurs à cônes nommé RdCVF «Rod-derived cone viability factor» (Leveillard et al., 2004). Ce facteur RdCVF est une protéine sécrétée par les bâtonnets et qui est codée par le gène *Nxn11*. Récemment il a été démontré que RdCVF était également exprimé dans les couches internes de la rétine : dans les cellules bipolaires (Reichman et al., 2010). Le gène *Nxn11* code, par épissage alternatif, pour deux formes de protéines, une forme tronquée en C terminal qui a l'activité trophique envers les cônes et une forme longue qui a une activité thioredoxine. Une étude récente menée dans notre laboratoire montre que l'injection de la forme courte de RdCVF augmente le nombre de cônes présents dans la rétine mais, surtout que les animaux traités ont une vision photopique deux fois supérieure aux animaux non traités (Yang et al., 2009). Ces résultats indiquent que la protéine n'assure pas seulement la survie des cônes mais préserve significativement leur fonction et ralentit ainsi la perte visuelle. De plus, les études menées sur la souris dont le gène *Nxn11* a été inactivé, montre qu'en plus de ces effets thérapeutiques, ce gène a un rôle essentiel dans la maintenance des photorécepteurs, mais aussi assure un rôle de résistance face au stress oxydatif rétinien (Cronin et al., 2010). La forme longue codée par le gène *Nxn11*, RdCVFL possède les caractéristiques d'une thioredoxine (Figure 20), mais son rôle dans la protection des photorécepteurs était jusqu'à présent inconnu. Or récemment, nous avons montré au sein du laboratoire, l'interaction de RdCVFL avec la protéine TAU, qui est une protéine qui a un rôle dans l'assemblage et la stabilisation des microtubules (Fridlich et al., 2009). La protéine TAU est hyperphosphorylée dans les cerveaux des patients atteints de la maladie d'Alzheimer (Grundke-Iqbal et al., 1986). Cette hyperphosphorylation de TAU conduit à l'agrégation de la protéine et à une diminution de l'interaction de celle-ci avec les microtubules, entraînant la mort cellulaire. L'interaction entre RdCVFL et TAU inhibe la phosphorylation de TAU dans la rétine et protège la protéine TAU contre les atteintes du stress oxydatif (Fridlich et al., 2009). Notre laboratoire a aussi identifié la protéine RdCVF2 codée par le gène paralogue *Nxn12* (Chalmel et al., 2007).



### III. Problématique

Les travaux menés dans notre laboratoire de transplantation de photorécepteurs chez la souris *rd1* et des tests de co-cultures d'explant de souris *rd1* avec des milieux conditionnés de rétine de souris saines (Mohand-Said et al., 1998), ont montré dans tous les cas, une protection d'uniquement 40% des cônes (Figure 21). Ces observations nous ont conduits à proposer l'hypothèse qu'il existait des facteurs trophiques additionnels provenant de tissus autres que la rétine neurale. L'EPR, qui est un tissu proximal de la rétine neurale, semble être un candidat prometteur, car il a déjà été rapporté qu'il existait des facteurs trophiques issus de l'EPR (Sheedlo et al., 1995). En 1999, Cayouette (Cayouette et al., 1999), ont d'ailleurs montré que le « Pigment Epithelium-derived factor » (PEDF), un membre de la super famille des inhibiteurs de protéases à sérine, avait une action protectrice sur les photorécepteurs. L'objectif de mon travail a été d'identifier des facteurs de survie des photorécepteurs à cônes additionnels issus de l'EPR. Pour atteindre cet objectif nous avons initié une recherche de tels facteurs en reprenant la stratégie et l'expertise acquise pour le programme d'identification de RdCVF (Leveillard et al., 2004). Cette stratégie repose sur le criblage d'une banque d'ADNc d'épithélium pigmentaire rétinien de rat sur le modèle cellulaire de culture enrichie en photorécepteurs à cônes d'embryons de poulet. Ce modèle cellulaire simple et rapide est particulièrement approprié à l'identification de facteurs trophiques impliqués dans la survie de photorécepteurs car après 7 jours en culture, 90% des photorécepteurs meurent. Si ces cellules sont mises en présence d'un facteur ayant un effet de survie, cet effet sera facilement identifiable et quantifiable.

### Bibliographie

- Acland, G.M., Aguirre, G.D., Bennett, J., Aleman, T.S., Cideciyan, A.V., Benniselli, J., Dejneka, N.S., Pearce-Kelling, S.E., Maguire, A.M., Palczewski, K., et al. (2005). Long-term restoration of rod and cone vision by single dose rAAV-mediated gene transfer to the retina in a canine model of childhood blindness. *Mol Ther* 12, 1072-1082.
- Acland, G.M., Aguirre, G.D., Ray, J., Zhang, Q., Aleman, T.S., Cideciyan, A.V., Pearce-Kelling, S.E., Anand, V., Zeng, Y., Maguire, A.M., et al. (2001). Gene therapy restores vision in a canine model of childhood blindness. *Nature genetics* 28, 92-95.
- Adler, A.J., and Martin, K.J. (1982). Retinol-binding proteins in bovine interphotoreceptor matrix. *Biochemical and biophysical research communications* 108, 1601-1608.
- Adler, R., and Hatlee, M. (1989). Plasticity and differentiation of embryonic retinal cells after terminal mitosis. *Science (New York, N.Y)* 243, 391-393.
- Ashtari, M., Cyckowski, L.L., Monroe, J.F., Marshall, K.A., Chung, D.C., Auricchio, A., Simonelli, F., Leroy, B.P., Maguire, A.M., Shindler, K.S., and Bennett, J. (2011). The human visual cortex responds to gene therapy-mediated recovery of retinal function. *The Journal of clinical investigation* 121, 2160-2168.
- Baehr, W., Wu, S.M., Bird, A.C., and Palczewski, K. (2003). The retinoid cycle and retina disease. *Vision research* 43, 2957-2958.
- Bainbridge, J.W., Smith, A.J., Barker, S.S., Robbie, S., Henderson, R., Balaggan, K., Viswanathan, A., Holder, G.E., Stockman, A., Tyler, N., et al. (2008). Effect of gene therapy

on visual function in Leber's congenital amaurosis. *The New England journal of medicine* 358, 2231-2239.

Balse, E., Tessier, L.H., Fuchs, C., Forster, V., Sahel, J.A., and Picaud, S. (2005). Purification of mammalian cone photoreceptors by lectin panning and the enhancement of their survival in glia-conditioned medium. *Investigative ophthalmology & visual science* 46, 367-374.

Ban, Y., and Rizzolo, L.J. (2000). Regulation of glucose transporters during development of the retinal pigment epithelium. *Brain research* 121, 89-95.

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

Beatty, S., Koh, H., Phil, M., Henson, D., and Boulton, M. (2000). The role of oxidative stress in the pathogenesis of age-related macular degeneration. *Survey of ophthalmology* 45, 115-134.

Berche, P (2009), *L'histoire secrète des guerres biologiques*, Edition Robert Laffont.

Blanks, J.C., and Johnson, L.V. (1984). Specific binding of peanut lectin to a class of retinal photoreceptor cells. A species comparison. *Investigative ophthalmology & visual science* 25, 546-557.

Boycott, B.B., Hopkins, J.M., and Sperling, H.G. (1987). Cone connections of the horizontal cells of the rhesus monkey's retina. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing papers of a Biological character* 229, 345-379.

Boycott, B.B., and Wassle, H. (1991). Morphological Classification of Bipolar Cells of the Primate Retina. *The European journal of neuroscience* 3, 1069-1088.

Brown, P.K., and Wald, G. (1963). Visual Pigments in Human and Monkey Retinas. *Nature* 200, 37-43.

Cayouette, M., and Gravel, C. (1997). Adenovirus-mediated gene transfer of ciliary neurotrophic factor can prevent photoreceptor degeneration in the retinal degeneration (rd) mouse. *Human gene therapy* 8, 423-430.

Cayouette, M., Smith, S.B., Becerra, S.P., and Gravel, C. (1999). Pigment epithelium-derived factor delays the death of photoreceptors in mouse models of inherited retinal degenerations. *Neurobiology of disease* 6, 523-532.

Chalmel, F., Leveillard, T., Jaillard, C., Lardenois, A., Berdugo, N., Morel, E., Koehl, P., Lambrou, G., Holmgren, A., Sahel, J.A., and Poch, O. (2007). Rod-derived Cone Viability Factor-2 is a novel bifunctional-thioredoxin-like protein with therapeutic potential. *BMC molecular biology* 8, 74.

Chan-Ling, T. (1997). Glial, vascular, and neuronal cytotogenesis in whole-mounted cat retina. *Microscopy research and technique* 36, 1-16.

Chan-Ling, T., Chu, Y., Baxter, L., Weible Ii, M., and Hughes, S. (2009). In vivo characterization of astrocyte precursor cells (APCs) and astrocytes in developing rat retinae: differentiation, proliferation, and apoptosis. *Glia* 57, 39-53.

Chen, C., and Okayama, H. (1987). High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Molecular and cellular biology* 7, 2745-2752.

Cideciyan, A.V., Aleman, T.S., Boye, S.L., Schwartz, S.B., Kaushal, S., Roman, A.J., Pang,

- J.J., Sumaroka, A., Windsor, E.A., Wilson, J.M., et al. (2008). Human gene therapy for RPE65 isomerase deficiency activates the retinoid cycle of vision but with slow rod kinetics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 15112-15117.
- Cronin, T., Raffelsberger, W., Lee-Rivera, I., Jaillard, C., Niepon, M.L., Kinzel, B., Clerin, E., Petrosian, A., Picaud, S., Poch, O., et al. (2010). The disruption of the rod-derived cone viability gene leads to photoreceptor dysfunction and susceptibility to oxidative stress. *Cell death and differentiation* 17, 1199-1210.
- Dacey, D.M., and Petersen, M.R. (1992). Dendritic field size and morphology of midget and parasol ganglion cells of the human retina. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89, 9666-9670.
- El Albani, A., Bengtson, S., Canfield, D.E., Bekker, A., Macchiarelli, R., Mazurier, A., Hammarlund, E.U., Boulvais, P., Dupuy, J.J., Fontaine, C., et al. (2010). Large colonial organisms with coordinated growth in oxygenated environments 2.1 Gyr ago. *Nature* 466, 100-104.
- Enders, J.F., Weller, T.H., and Robbins, F.C. (1949). Cultivation of the Lansing Strain of Poliomyelitis Virus in Cultures of Various Human Embryonic Tissues. *Science (New York, N.Y)* 109, 85-87.
- Faktorovich, E.G., Steinberg, R.H., Yasumura, D., Matthes, M.T., and LaVail, M.M. (1990). Photoreceptor degeneration in inherited retinal dystrophy delayed by basic fibroblast growth factor. *Nature* 347, 83-86.
- Fintz, A.C., Audo, I., Hicks, D., Mohand-Said, S., Leveillard, T., and Sahel, J. (2003). Partial characterization of retina-derived cone neuroprotection in two culture models of photoreceptor degeneration. *Investigative ophthalmology & visual science* 44, 818-825.
- Fontaine, V., Kinkl, N., Sahel, J., Dreyfus, H., and Hicks, D. (1998). Survival of purified rat photoreceptors in vitro is stimulated directly by fibroblast growth factor-2. *J Neurosci* 18, 9662-9672.
- Frasson, M., Picaud, S., Leveillard, T., Simonutti, M., Mohand-Said, S., Dreyfus, H., Hicks, D., and Sabel, J. (1999). Glial cell line-derived neurotrophic factor induces histologic and functional protection of rod photoreceptors in the rd/rd mouse. *Investigative ophthalmology & visual science* 40, 2724-2734.
- Fridlich, R., Delalande, F., Jaillard, C., Lu, J., Poidevin, L., Cronin, T., Perrocheau, L., Millet-Puel, G., Niepon, M.L., Poch, O., et al. (2009). The thioredoxin-like protein rod-derived cone viability factor (RdCVFL) interacts with TAU and inhibits its phosphorylation in the retina. *Mol Cell Proteomics* 8, 1206-1218.
- Glisin, V., Crkvenjakov, R., and Byus, C. (1974). Ribonucleic acid isolated by cesium chloride centrifugation. *Biochemistry* 13, 2633-2637.
- Gonzalez-Fernandez, F. (2002). Evolution of the visual cycle: the role of retinoid-binding proteins. *The Journal of endocrinology* 175, 75-88.
- Grabarek, Z. (2006). Structural basis for diversity of the EF-hand calcium-binding proteins. *Journal of molecular biology* 359, 509-525.
- Grundke-Iqbal, I., Iqbal, K., Tung, Y.C., Quinlan, M., Wisniewski, H.M., and Binder, L.I. (1986). Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83, 4913-4917.

- Gu, S.M., Thompson, D.A., Srikumari, C.R., Lorenz, B., Finckh, U., Nicoletti, A., Murthy, K.R., Rathmann, M., Kumaramanickavel, G., Denton, M.J., and Gal, A. (1997). Mutations in RPE65 cause autosomal recessive childhood-onset severe retinal dystrophy. *Nature genetics* 17, 194-197.
- Hicks, D., and Courtois, Y. (1990). The growth and behaviour of rat retinal Muller cells in vitro. 1. An improved method for isolation and culture. *Experimental eye research* 51, 119-129.
- Hims, M.M., Diager, S.P., and Inglehearn, C.F. (2003). Retinitis pigmentosa: genes, proteins and prospects. *Developments in ophthalmology* 37, 109-125.
- Humayun, M.S., Dorn, J.D., Ahuja, A.K., Caspi, A., Filley, E., Dagnelie, G., Salzmann, J., Santos, A., Duncan, J., daCruz, L., et al. (2009). Preliminary 6 month results from the Argus II epiretinal prosthesis feasibility study. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc 2009*, 4566-4568.
- Kajiwara, K., Berson, E.L., and Dryja, T.P. (1994). Digenic retinitis pigmentosa due to mutations at the unlinked peripherin/RDS and ROM1 loci. *Science (New York, N.Y)* 264, 1604-1608.
- Kim, S.U., and Takahashi, H. (1988). Tissue culture study of adult human retina neurons. *Investigative ophthalmology & visual science* 29, 1372-1379.
- Kolb, H., Fernandez, E., Schouten, J., Ahnelt, P., Linberg, K.A., and Fisher, S.K. (1994). Are there three types of horizontal cell in the human retina? *The Journal of comparative neurology* 343, 370-386.
- Kolb, H., Linberg, K.A., and Fisher, S.K. (1992). Neurons of the human retina: a Golgi study. *The Journal of comparative neurology* 318, 147-187.
- Le Meur, G., Stieger, K., Smith, A.J., Weber, M., Deschamps, J.Y., Nivard, D., Mendes-Madeira, A., Provost, N., Pereon, Y., Cherel, Y., et al. (2007). Restoration of vision in RPE65-deficient Briard dogs using an AAV serotype 4 vector that specifically targets the retinal pigmented epithelium. *Gene therapy* 14, 292-303.
- Lesaffre B, Joliot A, Prochiantz A, Volovitch M (2007). Direct non-cell autonomous Pax6 activity regulates eye development in the zebrafish. *Neural Dev.*17;2:2.
- Leveillard, T., Mohand-Said, S., Lorentz, O., Hicks, D., Fintz, A.C., Clerin, E., Simonutti, M., Forster, V., Cavusoglu, N., Chalmel, F., et al. (2004). Identification and characterization of rod-derived cone viability factor. *Nature genetics* 36, 755-759.
- Leveillard, T., and Sahel, J.A. (2010). Rod-derived cone viability factor for treating blinding diseases: from clinic to redox signaling. *Science translational medicine* 2, 26ps16.
- Li, L., Nakaya, N., Chavali, V.R., Ma, Z., Jiao, X., Sieving, P.A., Riazuddin, S., Tomarev, S.I., Ayyagari, R., Riazuddin, S.A., and Hejtmancik, J.F. (2010). A mutation in ZNF513, a putative regulator of photoreceptor development, causes autosomal-recessive retinitis pigmentosa. *American journal of human genetics* 87, 400-409.
- Li, T., Sandberg, M.A., Pawlyk, B.S., Rosner, B., Hayes, K.C., Dryja, T.P., and Berson, E.L. (1998). Effect of vitamin A supplementation on rhodopsin mutants threonine-17 --> methionine and proline-347 --> serine in transgenic mice and in cell cultures. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 11933-11938.
- Lopez, R., Lopez-Gallardo, M., Busturia, I., Anezary, L., and Prada, C. (2005). Spatial and temporal patterns of growth and differentiation of cone oil droplets in the chick retina. *Journal*

of neuroscience research 79, 401-411.

MacLaren, R.E., Pearson, R.A., MacNeil, A., Douglas, R.H., Salt, T.E., Akimoto, M., Swaroop, A., Sowden, J.C., and Ali, R.R. (2006). Retinal repair by transplantation of photoreceptor precursors. *Nature* 444, 203-207.

MacNeil, M.A., and Masland, R.H. (1998). Extreme diversity among amacrine cells: implications for function. *Neuron* 20, 971-982.

Maguire, A.M., Simonelli, F., Pierce, E.A., Pugh, E.N., Jr., Mingozzi, F., Bennicelli, J., Banfi, S., Marshall, K.A., Testa, F., Surace, E.M., et al. (2008). Safety and efficacy of gene transfer for Leber's congenital amaurosis. *The New England journal of medicine* 358, 2240-2248.

Mariani, A.P. (1984). Bipolar cells in monkey retina selective for the cones likely to be blue-sensitive. *Nature* 308, 184-186.

Mata, N.L., Radu, R.A., Clemmons, R.C., and Travis, G.H. (2002). Isomerization and oxidation of vitamin a in cone-dominant retinas: a novel pathway for visual-pigment regeneration in daylight. *Neuron* 36, 69-80.

McLaughlin, M.E., Sandberg, M.A., Berson, E.L., and Dryja, T.P. (1993). Recessive mutations in the gene encoding the beta-subunit of rod phosphodiesterase in patients with retinitis pigmentosa. *Nature genetics* 4, 130-134.

Mohand-Said, S., Deudon-Combe, A., Hicks, D., Simonutti, M., Forster, V., Fintz, A.C., Leveillard, T., Dreyfus, H., and Sahel, J.A. (1998). Normal retina releases a diffusible factor stimulating cone survival in the retinal degeneration mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 8357-8362.

Mohand-Said, S., Hicks, D., Dreyfus, H., and Sahel, J.A. (2000). Selective transplantation of rods delays cone loss in a retinitis pigmentosa model. *Archives of ophthalmology* 118, 807-811.

Mohand-Said, S., Hicks, D., Simonutti, M., Tran-Minh, D., Deudon-Combe, A., Dreyfus, H., Silverman, M.S., Ogilvie, J.M., Tenkova, T., and Sahel, J. (1997). Photoreceptor transplants increase host cone survival in the retinal degeneration (rd) mouse. *Ophthalmic research* 29, 290-297.

Moore, B. (1911). In Memory of Sidney Ringer [1835-1910]: Some account of the Fundamental Discoveries of the Great Pioneer of the Bio-Chemistry of Crystallo-colloids in Living Cells. *The Biochemical journal* 5, i b3-xix.

Moscona, A.A. (1962). Cellular interactions in experimental histogenesis. *International review of experimental pathology* 1, 371-428.

Nagaraj, R., and Banerjee, U. (2004). The little R cell that could. *The International journal of developmental biology* 48, 755-760.

Nandrot, E., Dufour, E.M., Provost, A.C., Pequignot, M.O., Bonnel, S., Gogat, K., Marchant, D., Rouillac, C., Sepulchre de Conde, B., Bihoreau, M.T., et al. (2000). Homozygous deletion in the coding sequence of the c-mer gene in RCS rats unravels general mechanisms of physiological cell adhesion and apoptosis. *Neurobiology of disease* 7, 586-599.

Nicholas, J.S. (1960). Ross Granville Harrison, 1870-1959. *The Yale journal of biology and medicine* 32, 407-412.

Papermaster, D.S., Schneider, B.G., and Besharse, J.C. (1985). Vesicular transport of newly synthesized opsin from the Golgi apparatus toward the rod outer segment. *Ultrastructural*

immunocytochemical and autoradiographic evidence in *Xenopus* retinas. *Investigative ophthalmology & visual science* 26, 1386-1404.

Picaud, S., Pattnaik, B., Hicks, D., Forster, V., Fontaine, V., Sahel, J., and Dreyfus, H. (1998). GABAA and GABAC receptors in adult porcine cones: evidence from a photoreceptor-glia co-culture model. *The Journal of physiology* 513 ( Pt 1), 33-42.

Reichman, S., Kalathur, R.K., Lambard, S., Ait-Ali, N., Yang, Y., Lardenois, A., Ripp, R., Poch, O., Zack, D.J., Sahel, J.A., and Leveillard, T. (2010). The homeobox gene CHX10/VSX2 regulates RdCVF promoter activity in the inner retina. *Human molecular genetics* 19, 250-261.

Rosenfeld, P.J., Cowley, G.S., McGee, T.L., Sandberg, M.A., Berson, E.L., and Dryja, T.P. (1992). A null mutation in the rhodopsin gene causes rod photoreceptor dysfunction and autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Nature genetics* 1, 209-213.

Sams-Dodd, F. (2006). Drug discovery: selecting the optimal approach. *Drug discovery today* 11, 465-472.

Shannon, M., Hamilton, A.T., Gordon, L., Branscomb, E., and Stubbs, L. (2003). Differential expansion of zinc-finger transcription factor loci in homologous human and mouse gene clusters. *Genome research* 13, 1097-1110.

Sheedlo, H.J., Li, L., Fan, W., and Turner, J.E. (1995). Retinal pigment epithelial cell support of photoreceptor survival in vitro. *In vitro cellular & developmental biology* 31, 330-333.

Sieving, P.A., Caruso, R.C., Tao, W., Coleman, H.R., Thompson, D.J., Fullmer, K.R., and Bush, R.A. (2006). Ciliary neurotrophic factor (CNTF) for human retinal degeneration: phase I trial of CNTF delivered by encapsulated cell intraocular implants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 3896-3901.

Strauss, O. (2005). The retinal pigment epithelium in visual function. *Physiological reviews* 85, 845-881.

Sugasawa, K., Deguchi, J., Okami, T., Yamamoto, A., Omori, K., Uyama, M., and Tashiro, Y. (1994). Immunocytochemical analyses of distributions of Na, K-ATPase and GLUT1, insulin and transferrin receptors in the developing retinal pigment epithelial cells. *Cell structure and function* 19, 21-28.

Swain, P.K., Chen, S., Wang, Q.L., Affatigato, L.M., Coats, C.L., Brady, K.D., Fishman, G.A., Jacobson, S.G., Swaroop, A., Stone, E., et al. (1997). Mutations in the cone-rod homeobox gene are associated with the cone-rod dystrophy photoreceptor degeneration. *Neuron* 19, 1329-1336.

Todaro, G.J., and Green, H. (1963). Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines. *The Journal of cell biology* 17, 299-313.

Trojan, P., Krauss, N., Choe, H.W., Giessl, A., Pulvermuller, A., and Wolfrum, U. (2008). Centrin in retinal photoreceptor cells: regulators in the connecting cilium. *Progress in retinal and eye research* 27, 237-259.

Turner, D.L., and Cepko, C.L. (1987). A common progenitor for neurons and glia persists in rat retina late in development. *Nature* 328, 131-136.

Vithana, E.N., Abu-Safieh, L., Allen, M.J., Carey, A., Papaioannou, M., Chakarova, C., Al-Magthteh, M., Ebenezer, N.D., Willis, C., Moore, A.T., et al. (2001). A human homolog of yeast pre-mRNA splicing gene, PRP31, underlies autosomal dominant retinitis pigmentosa on

chromosome 19q13.4 (RP11). *Molecular cell* 8, 375-381.

Yamagata, K., Goto, K., Kuo, C.H., Kondo, H., and Miki, N. (1990). Visinin: a novel calcium binding protein expressed in retinal cone cells. *Neuron* 4, 469-476.

Yang, Y., Mohand-Said, S., Danan, A., Simonutti, M., Fontaine, V., Clerin, E., Picaud, S., Leveillard, T., and Sahel, J.A. (2009). Functional cone rescue by RdCVF protein in a dominant model of retinitis pigmentosa. *Mol Ther* 17, 787-795.