

UNIVERSITE LOUIS PASTEUR DE STRASBOURG

**Thèse présentée en vue d'obtenir le grade de
Docteur de l'Université Louis Pasteur de Strasbourg**

Discipline : Sciences du vivant

Spécialité : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

**Présentée par
Agnès BORDAIS**

**Organisation moléculaire des synapses
photorécepteurs-neurones secondaires
Rôle des dystrophines**

Soutenue le 17 décembre 2004 devant le jury composé de :

Prof. Philippe POINDRON	Rapporteur interne
Prof. Alain SEBILLE	Rapporteur externe
Dr. Helmut BRANDSTATTER	Rapporteur externe
Prof. Pedro DE LA VILLA	Examineur
Dr. Alvaro RENDON	Directeur de la Thèse

<u>PREFACE</u>	4
<u>A. INTRODUCTION</u>	9
1. <u>LA RETINE</u>	11
1.1 <u>Les différents types cellulaires</u>	12
1.1.1. <u>Les cellules neuronales</u>	12
1.1.1.a. <u>Les photorécepteurs</u>	12
1.1.1.b. <u>Les cellules horizontales</u>	13
1.1.1.c. <u>Les cellules bipolaires</u>	14
1.1.1.d. <u>Les cellules interplexiformes</u>	15
1.1.1.e. <u>La couche plexiforme externe</u>	16
1.1.1.f. <u>Les cellules amacrines</u>	17
1.1.1.g. <u>Les cellules ganglionnaires</u>	18
1.1.1.f. <u>La couche plexiforme interne</u>	18
1.1.2. <u>Les cellules non neuronales</u>	18
1.1.2.a. <u>Les cellules de l'épithélium pigmentaire (RPE)</u>	18
1.1.2.b. <u>Les cellules gliales</u>	19
1.2. <u>La transmission</u>	22
1.2.1. <u>Composantes de l'électrorétinogramme (ERG)</u>	22
1.2.2. <u>Pathologies liées à des défauts de transmission synaptique mises en évidence par une anomalie de l'onde b de l'ERG</u>	24
2. <u>LA SUPERFAMILLE DES DYSTROPHINES</u>	27
2.1. <u>La dystrophine</u>	27
2.1.1. <u>Le domaine N-terminal</u>	28
2.1.2. <u>Le domaine central</u>	28
2.1.3. <u>La région riche en cystéines</u>	29
2.1.4. <u>Le domaine C-terminal</u>	30
2.1.5. <u>Les isoformes de la dystrophine</u>	31
2.2. <u>Les produits courts du gène DMD</u>	31
2.2.1. <u>La Dp260</u>	32
2.2.2. <u>La Dp140</u>	32
2.2.3. <u>La Dp116</u>	33
2.2.4. <u>La Dp71</u>	34
2.2.5. <u>La Dp45</u>	35
2.3. <u>Epissages alternatifs</u>	35
2.4. <u>Les Protéines homologues de la dystrophine ou DRP (Dystrophin Related Protein)</u>	36
2.4.1. <u>L'Utrophine et ses produits courts</u>	37
2.4.2. <u>Phénomènes compensatoires</u>	39
2.4.3. <u>La DRP2</u>	40
2.4.4. <u>Les dystrobrevines</u>	40
2.5. <u>Expression des produits de la superfamille des dystrophines et des protéines associées dans des espèces inférieures</u>	43
3. <u>LES PROTEINES ASSOCIEES AUX DYSTROPHINES</u>	45
3.1. <u>Le complexe dystroglycane</u>	45
<u>Pathologies liées aux dystroglycanes</u>	48
3.2. <u>Le complexe sarcoglycane</u>	48
3.2.1. <u>L'α-sarcoglycane</u>	48
3.2.2. <u>Le β-sarcoglycane</u>	49

3.2.3. Le γ -sarcoglycane	49
3.2.4. Le δ -sarcoglycane	49
3.2.5. L' ϵ -sarcoglycane	50
3.2.6. Le ζ -sarcoglycane	50
3.2.7. Interactions et fonctions des sarcoglycanes	50
3.2.8. Pathologies liées aux sarcoglycanes	52
3.3. <i>Le sarcospane</i>	52
3.4. <i>Le complexe syntrophine</i>	53
3.4.1. L' α 1-syntrophine	54
3.4.2. La β 1-syntrophine	54
3.4.3. La β 2-syntrophine	54
3.4.4. les γ 1- et γ 2-syntrophines	55
3.4.5. Capacité d'interactions des syntrophines	55
3.4.5. Rôles fonctionnels	56
4. INTERACTIONS ENTRE MEMBRES DE LA SUPERFAMILLE DES DYSTROPHINES ET PROTEINES ASSOCIEES DANS LE MUSCLE SUQELETTIQUE	58
5. EXPRESSION ET LOCALISATION DES DYSTROPHINES ET PROTEINES ASSOCIEES DANS LE SYSTEME NERVEUX PERIPHERIQUE	60
6. LE SYSTEME NERVEUX CENTRAL	62
6.1. <i>le cerveau</i>	62
6.1.1. Pathologies observées chez les patients DMD et les modèles animaux	62
Chez les patients DMD	62
Les modèles murins	62
6.1.2. Expression des protéines de la superfamille des dystrophines et protéines associées	63
Protéines de la superfamille des dystrophines	63
Protéines associées à la dystrophine /Complexes macromoléculaires du cerveau	66
6.1.3. Rôles fonctionnels des protéines de la superfamille des dystrophines et des protéines associées dans le cerveau	68
6.1.4. En résumé	70
6.2. <i>La rétine</i>	71
6.2.1. Pathologies observées chez les patients DMD et les modèles animaux	71
Chez les patients DMD	71
Les modèles murins	73
6.2.2. Expression et localisation des membres de la superfamille des dystrophines	73
6.2.3. Expression et localisation des protéines associées aux membres de la superfamille des dystrophines	75
6.2.4. Hypothèses sur les rôles fonctionnels des dystrophines dans la neurotransmission rétinienne	77
Dans les cellules gliales de Müller	77
Dans la couche synaptique photorécepteurs-neurones secondaires	77
7. CONCLUSION	79
B. RESULTATS	81
1. LE POISSON ZEBRE	81
1.1. <i>Le poisson zèbre, un nouveau modèle pour étudier la DMD</i>	81
Résultats	82
1.2. <i>La dystrophine et la Dp71 lors du développement du poisson zèbre</i>	84
Résultats	85
1.3. <i>Depuis</i>	86

<u>2. LA SOURIS</u>	88
<u>2.3. Conséquences de l'inactivation du produit court du gène DMD, la Dp71</u>	88
<u>Résultats</u>	89
<u>Conclusion</u>	89
<u>2.2. Localisation des produits du gène DMD dans la couche plexiforme externe</u>	91
<u>Résultats</u>	91
<u>Conclusion</u>	92
<u>3. LE PORC</u>	94
<u>Caractérisation des produits du gène DMD chez le porc</u>	94
<u>Résultats</u>	94
<u>Conclusion</u>	95
<u>C. DISCUSSION</u>	97
<u>D. PERSPECTIVES</u>	102
<u>1. Rôle du complexe dystrophines-protéines associées dans la transduction du signal visuel</u>	102
<u>2. Rôle du complexe dystrophines-protéines associées dans l'attachement à la matrice extra-cellulaire</u>	105
<u>E. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</u>	106
<u>F. ANNEXES</u>	152
<u>PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES RELATIVES AU TRAVAIL DE THESE</u>	152
<u>PRESENTATIONS AFFICHEES</u>	153

Préface

L'étude de la transmission de l'information dans le cerveau est difficile à réaliser de part le fait de la structure même du cerveau et de la difficulté d'isoler les types cellulaires concernés. La rétine dérive, elle aussi du tube neural et du fait de son accessibilité et de sa structure stratifiée qui apparaît simplifiée en comparaison du cerveau, la rétine est un composant idéal du système nerveux central (SNC) pour réaliser des études portant sur la plasticité synaptique et la neurotransmission.

La rétine est l'élément de l'œil le plus important pour la vision. Elle est composée de cellules neuronales et gliales permettant la réception, la modulation et la transmission vers les centres supérieurs de l'information lumineuse après transformation en information électrique. L'activité des cellules excitables de la rétine peut être enregistrée sous forme d'électrorétinogramme (ERG) composés de plusieurs ondes dont l'onde a caractéristique des photorécepteurs et l'onde b. L'onde b est l'élément le plus important de l'ERG en condition d'adaptation à l'obscurité. L'origine de l'onde b a été attribuée en premier lieu aux cellules bipolaires ON mais aussi aux flux potassiques traversant la cellule gliale de Müller (CGM). Depuis les neurones de troisième ordre semblent aussi intervenir dans la modulation de cette onde. De nombreux troubles de l'ERG pouvant avoir des origines multiples sont pour la plupart du temps associés avec des perturbations de l'onde b.

Dans le système nerveux central, la transmission de l'information nerveuse se fait par libération du neurotransmetteur dans la fente synaptique. Un stimulus entraîne l'entrée de calcium dans la terminaison synaptique qui va conduire au processus d'exocytose. Le neurotransmetteur libéré va alors interagir avec des récepteurs postsynaptiques. Ce processus nécessite l'agrégation et la stabilisation de récepteurs, de transporteurs et/ou autres canaux ioniques à des sites spécifiques des membranes cellulaires pré- et post-synaptiques. Le maintien à la membrane de ces protéines requiert un échafaudage protéique dont la déstabilisation peut conduire à des défauts de transmission de l'information.

Ainsi, des altérations de la neurotransmission rétinienne ont été observées chez 80% de patients atteints de la Dystrophie Musculaire de Duchenne. Ces patients présentent un ERG scotopique négatif caractérisé par une diminution de l'amplitude de l'onde b mais aucun autre trouble visuel n'a été révélé. Hormis le phénotype ERG, des troubles du SNC tels que des déficits de l'apprentissage, de la rétention à long terme ont été rapportés chez ces patients. Tous ces troubles sont mineurs en comparaison de l'affection musculaire très invalidante qui entraîne une perte de la marche au cours de la première décennie et le décès par insuffisance respiratoire ou cardiaque au cours de la deuxième ou troisième décennie. Cette maladie génétique de transmission récessive liée à l'X qui touche 1 garçon sur 3500 fait de la Dystrophie Musculaire de Duchenne (DMD), la plus sévère et la plus fréquente des dystrophies musculaires.

Le gène humain de la dystrophine est le plus grand décrit et engendre un messager de 14kb composé de 79 exons. De nombreux épissages alternatifs et l'existence de sept promoteurs donnent naissance à de nombreux transcrits. L'ensemble des produits du gène DMD qui partagent le même domaine C-terminal, constituent la famille des dystrophines. De plus, la superfamille des dystrophines regroupe aussi les protéines homologues telles que l'utrophine, la DRP2 et les dystrobrevines. Toutes ces protéines partagent une forte homologie de séquence due à leur origine ancestrale commune.

Au niveau fonctionnel, la dystrophine joue un rôle mécanique et structural dans le muscle squelettique en reliant, via sa partie N-terminale, le cytosquelette d'actine sous-sarcolemmique à un complexe de glycoprotéines transmembranaires qui lie la mérosine. Ce complexe transmembranaire est composé des complexes dystroglycane et sarcoglycane ainsi que du sarcospane. En plus de ce complexe, des protéines cytoplasmiques (syntrophines et dystrobrevines) se lient à la dystrophine. L'ensemble de ces protéines joue un rôle essentiel dans la stabilité et l'intégrité des fibres musculaires au cours des cycles contraction/relaxation. De plus, ces protéines permettent l'ancrage et l'agrégation de canaux ou récepteurs à des sites spécifiques de la membrane des fibres musculaires.

Dans le système nerveux central, le rôle des dystrophines et de leurs protéines associées a été mis en lumière par l'identification de troubles spécifiques associés à la DMD, caractérisés par des phénotypes plus subtils, traduisant néanmoins des fonctions importantes. La présence de la dystrophine, des produits courts du gène DMD ainsi que celles des protéines homologues complique fortement l'étude du rôle fonctionnel des dystrophines dans ce tissu. La forte homologie entre ces protéines favoriserait l'existence de phénomènes de compensation qui expliqueraient l'absence, chez les patients DMD, de phénotypes plus marqués au niveau du SNC.

A partir de ces observations, la rétine semble être le tissu le mieux indiqué afin d'étudier les rôles que pourraient jouer les dystrophines et protéines associées dans la neurotransmission et plus particulièrement dans la physiopathologie rétinienne observée chez les patients DMD. Plusieurs études ont montré l'expression des dystrophines dans la couche synaptique photorécepteurs-neurones secondaires, autour des vaisseaux ainsi que dans la couche limitante interne de la rétine. Afin d'étudier la participation des cellules gliales de Müller dans la génération de l'onde b de l'ERG nous avons utilisé la souche de souris invalidée pour la *Dp71*, le produit court du gène DMD uniquement exprimé dans ce type cellulaire. Une étude électrophysiologique réalisée chez cette souche réfute l'hypothèse de la genèse de l'onde b par les CGM. Ce résultat suggère que le déficit de l'ERG observé chez les patients DMD ainsi que la souris mutante *mdx^{3cv}* ne prend pas origine exclusivement dans les CGM mais résulterait de l'absence des autres produits du gène DMD dans la couche plexiforme externe (CPE) (Daloz, Sarig, Fort et al. 2003). La CPE renferme les connections synaptiques entre les photorécepteurs cônes et bâtonnets et les cellules bipolaires et horizontales. Elle est le premier niveau de transmission et de modulation de l'information nerveuse au sein de la rétine.

Dans le but de comprendre le rôle des dystrophines et des complexes macromoléculaires qui leurs sont associés et qui vont assurer l'agrégation de récepteurs, transporteurs et/ou canaux ioniques impliqués dans la transmission de l'information visuelle nous nous sommes intéressés, dans ce travail de thèse, à définir l'expression des dystrophines dans trois modèles animaux.

Le zebrafish est considéré comme un excellent modèle d'étude de nombreuses maladies humaines. Du fait de son développement rapide et de sa facilité de manipulation, il a été largement utilisé pour l'étude et la compréhension du développement chez les vertébrés. Afin de pouvoir utiliser le zebrafish comme modèle d'étude de l'implication des dystrophines dans la mise en place de la transmission de l'information visuelle au sein de la rétine nous avons dans un premier temps analysé l'expression des dystrophines dans ce modèle et effectué une étude comparative de la Dp427 et la Dp71 au cours du développement.

Plusieurs modèles animaux tels que les souris transgéniques ou mutantes pour le gène de la dystrophine ont été utilisés pour étudier la fonction des dystrophines dans la rétine. A la différence du phénotype observé chez l'homme, l'absence de tous les produits du gène DMD semble nécessaire à l'obtention du phénotype ERG ce qui suggère la possibilité de phénomènes de compensation au sein de la rétine. Comme nous l'avons précédemment énoncé il semblerait que la transmission de l'information visuelle se fasse essentiellement à travers la couche plexiforme externe. Comme une étude préalable à toute analyse fonctionnelle, nous avons donc étudié la localisation des produits du gène DMD au sein de cette couche afin de pouvoir par la suite mieux comprendre leur rôle dans la neurotransmission rétinienne. De nombreuses difficultés dues à l'organisation même de la couche plexiforme externe, à l'imbrication des prolongements de plusieurs types cellulaires au sein d'une même zone synaptique nous ont alors obligé à utiliser plusieurs techniques expérimentales afin de déterminer la localisation précise des dystrophines. Par ailleurs, l'anatomie de la rétine de souris est très différente de celle de la rétine humaine c'est pourquoi il nous a semblé nécessaire de trouver un nouveau modèle plus proche de l'homme ; le porc est considéré comme un animal approprié. En effet, les caractéristiques anatomiques et physiologiques de la rétine de porc sont très proches de celles de l'homme et a été utilisée comme modèle de nombreuses pathologies humaines. Nous avons alors défini l'expression et la localisation des dystrophines au sein de la rétine de porc afin de pouvoir par la suite l'utiliser comme modèle d'étude de la neurotransmission de l'information visuelle et la fonction des dystrophines dans la production de l'onde b de l'ERG dans de la rétine humaine.

Mais avant de présenter nos résultats, la première partie de ce travail consistera à la synthèse des connaissances bibliographiques acquises relatives à ce travail. Après un chapitre portant sur la structure de la rétine et la neurotransmission de l'information visuelle nous détaillerons le complexe macromoléculaire, formé des membres de la superfamille des dystrophines et de leurs protéines associées, au niveau musculaire puis dans le système nerveux central c'est à dire le cerveau et la rétine.

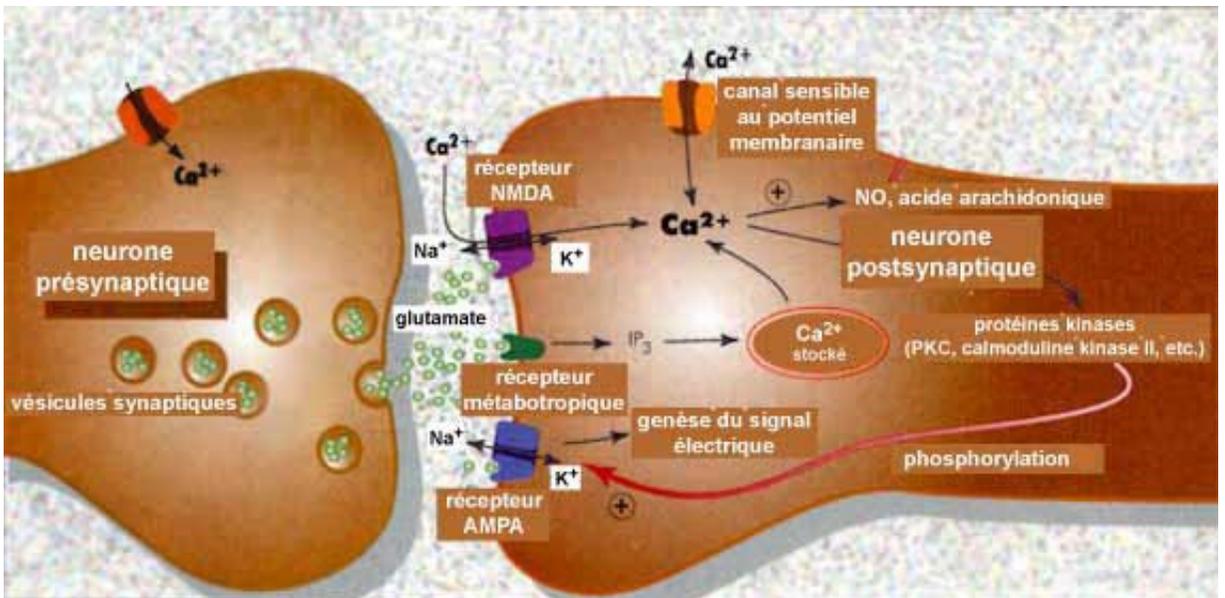


Figure 1: Représentation schématique d'une synapse chimique. L'activation du neurone présynaptique entraîne le processus d'exocytose dépendant du calcium des vésicules de neurotransmetteurs. A travers la fente synaptique, les neurotransmetteurs agissent sur les récepteurs membranaires postsynaptiques entraînant des cascades de réaction intracellulaire (récepteurs métabotroques) ou bien l'ouverture de canaux ioniques (récepteurs ionotropiques: NMDA et AMPA).

A. INTRODUCTION

L'être humain capte les informations du monde qui l'entoure de façon continue. Les stimuli environnementaux sont perçus par les organes sensoriels et transformés, codifiés en signaux électriques. L'information se propage sous forme de potentiel d'action d'une cellule à une autre par l'intermédiaire d'un « engrenage » (Ramón y Cajal, 1889) dénommé synapse (Sherrington, 1897). Les connexions entre les cellules nerveuses se divisent en deux groupes : les synapses chimiques et les synapses électriques. Les synapses électriques peuvent moduler l'amplitude et la fréquence de l'information. Les synapses chimiques modulent l'information par libération de substances neuroactives (figure 1).

L'arrivée d'un flux de potentiel d'actions dans la terminaison synaptique va entraîner l'ouverture des canaux calcique et augmentation de la concentration de calcium intracellulaire. Cette augmentation de calcium conduit à la libération de neurotransmetteurs ou neuromédiateurs dans la fente synaptique par la voie d'exocytose. Ces substances activent vont agir sur des récepteurs post-synaptiques. Les neurotransmetteurs agissent sur les récepteurs ionotropiques et génèrent une action directe en faisant varier la conductance de la membrane. Les neuromédiateurs agissent sur des récepteurs métabotropiques générant une action indirecte par l'intermédiaire d'une cascade de réactions. Les substances actives restantes dans la fente synaptique sont alors re-pompées afin d'être dégradées ou recyclées.

La transmission de l'information nerveuse au sein du système nerveux central nécessite l'agrégation de récepteurs, transporteurs et/ou canaux ioniques à des sites spécifiques des membranes cellulaires pré- et post-synaptique.

Une altération des synapses peut conduire à une modulation ou une perte de l'information. Un grand nombre de maladies ont été connues pour la première fois sous la terminologie « synaptopathie » parce que le mécanisme pathologique est associé à la transmission synaptique soit entre deux neurones soit entre un motoneurone et une fibre musculaire.



Figure 2: Ramón y Cajal

La rétine fait partie du système nerveux central. Du fait d'une anatomie très structurée et de son accessibilité, elle est très couramment utilisée comme modèle d'étude du système nerveux central. De nombreuses altérations de la transmission de l'information nerveuse ont été étudiées dans la rétine. L'une d'elle a été observée chez 80% des patients atteints de la Dystrophie Musculaire de Duchenne (DMD) et se traduit par une diminution de l'amplitude de l'onde b de l'électrorétinogramme.

Cette maladie est due à une mutation sur le gène de la dystrophine entraînant principalement une dégénérescence musculaire mais aussi des troubles cognitifs. Cette protéine fait partie d'un complexe glycoprotéique transmembranaire qui permet le maintien à la membrane de la fibre musculaire des récepteurs ou canaux ioniques. Un même rôle pourrait lui être attribué au sein de la rétine qui en son absence entraînerait une altération de la transmission de l'information visuelle.

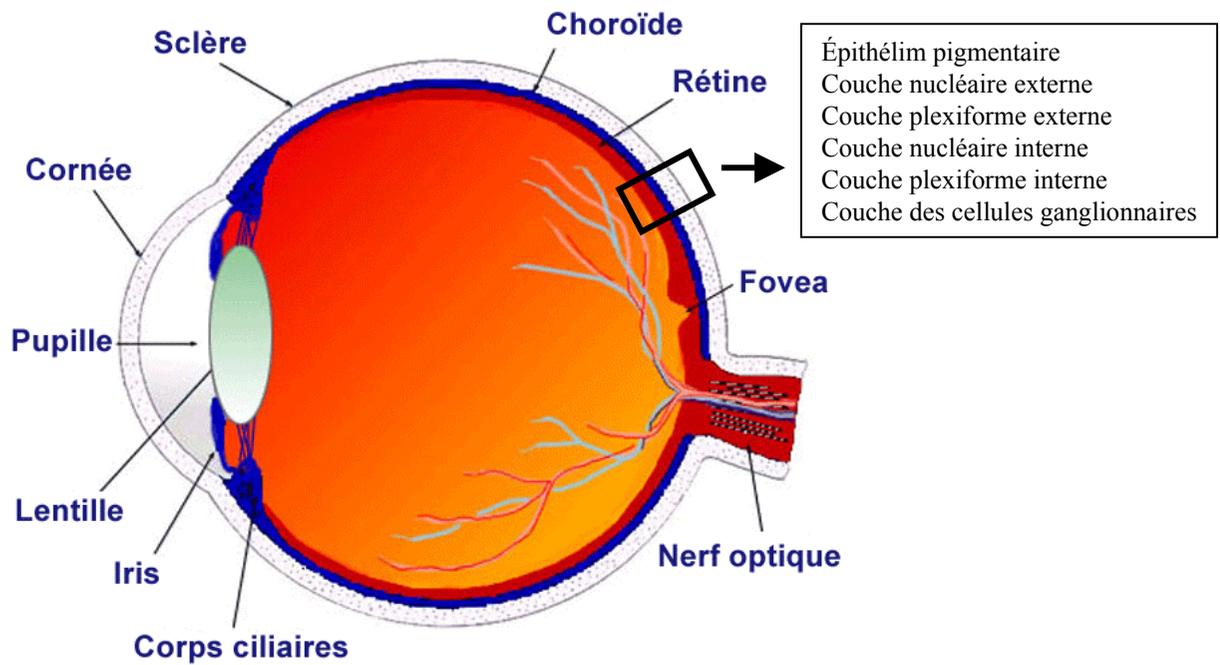


Figure 3 : Anatomie de l'oeil

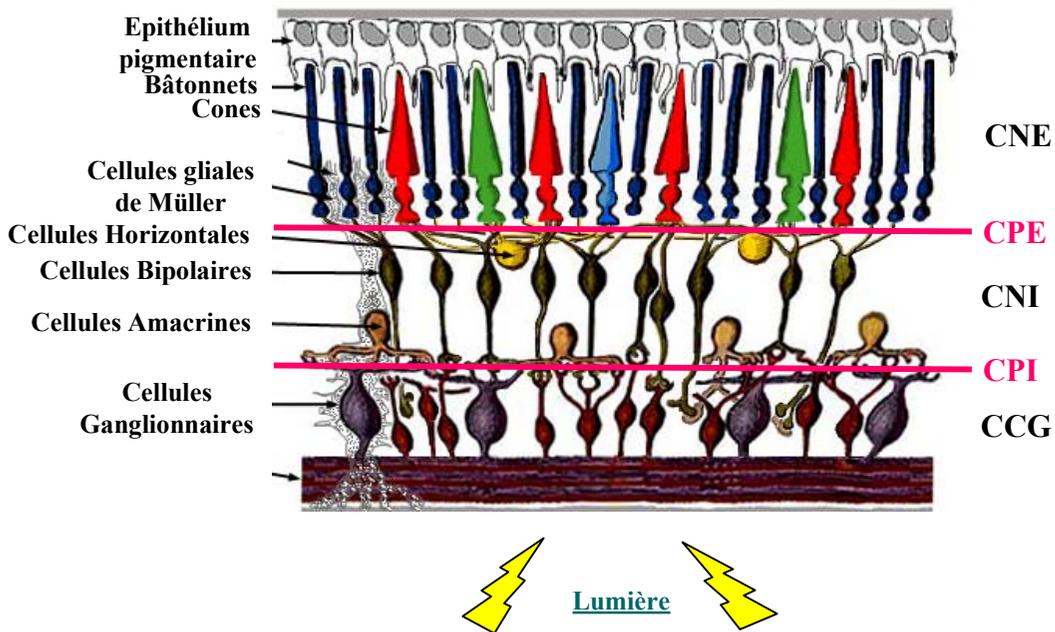


Figure 4 : Structure et organisation cellulaire de la rétine. CNE: couche nucléaire externe; CPE: couche plexiforme externe; CNI: couche nucléaire interne; CPI: couche plexiforme interne; CCG: couche des cellules ganglionnaires

Tiré de <http://webvision.med.utah.edu>

1. La rétine

La vision est sans doute le plus fondamental de nos sens. Bien que toutes les parties de l'œil soient importantes pour percevoir une bonne image, l'élément le plus important pour la vision, pour la perception de l'image est la rétine. La compréhension de l'organisation de la rétine a été le but de nombreux travaux scientifiques dont Ramón y Cajal qui en 1893 (figure 2) a donné une description anatomique des types cellulaires constituant la rétine de nombreuses espèces de vertébrés ainsi qu'une interprétation fonctionnelle des connexions nerveuses (figure 3).

L'origine embryonnaire de la rétine est commune au reste du système nerveux central (SNC) et dérive du neur ectoderme.

De façon schématique, la rétine est composée de cellules neuronales et gliales disposées en trois couches de corps cellulaires et deux couches synaptiques (figure 4).

La couche nucléaire externe (CNE) est constituée des corps cellulaires des photorécepteurs cônes et bâtonnets. **La couche nucléaire interne (CNI)** contient les corps cellulaires des cellules bipolaires, des cellules horizontales, des cellules amacrines, des cellules gliales de Müller ainsi que les cellules plexiformes. **La couche des cellules ganglionnaires (CCG)** est composée des corps cellulaires des cellules ganglionnaires et des cellules amacrines déplacées.

Entre ces couches de cellules s'intercalent les couches plexiformes externe et interne. **La couche plexiforme externe (CPE)** renferme les connexions synaptiques très spécialisées entre les photorécepteurs cônes et bâtonnets d'une part et les cellules bipolaires, horizontales et interplexiformes d'autre part. **La couche plexiforme interne (CPI)** est le lieu de contacts synaptiques entre les axones des cellules bipolaires et les dendrites des cellules ganglionnaires mais aussi avec les prolongements des cellules amacrines.

Anatomiquement, dans la rétine on considère l'existence de deux fines couches.

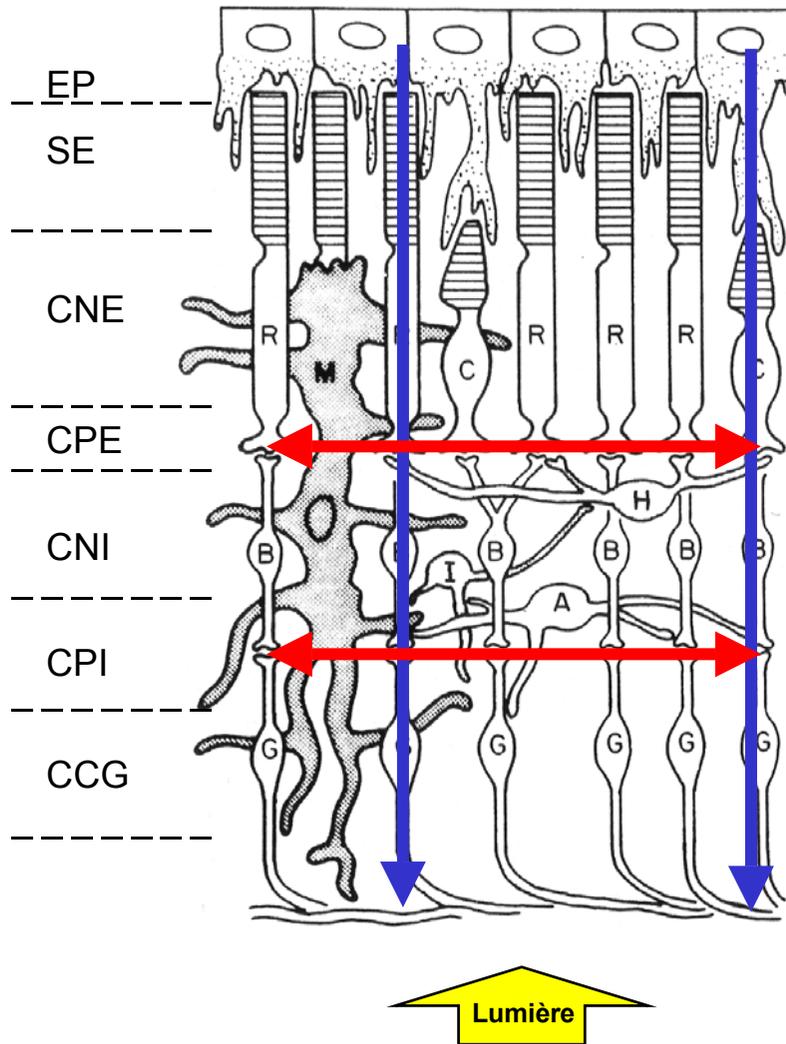


Figure 5: Représentation schématique des différentes voies de la transmission de l'information visuelle.

EP: épithélium pigmentaire; SE: segments externes des photorécepteurs; CNE: couche nucléaire externe; CPE: couche plexiforme externe; CNI: couche nucléaire interne; CPI: couche plexiforme interne; CCG: couche des cellules ganglionnaires

- voie transversale
- voie verticale

La membrane limitante externe (MLE) est formée par des jonctions adhérentes entre les cellules gliales de Müller et les segments internes des photorécepteurs. Cette membrane constitue une barrière entre l'espace sous-rétinien, dans lequel les segments externe et interne des photorécepteurs sont en contact étroit avec l'épithélium pigmentaire, et la rétine neurale proprement dite.

La membrane limitante interne (MLI) correspond aux pieds des cellules gliales de Müller associés aux éléments de la membrane basale. Elle est la surface interne de la rétine bordant le vitré et formant ainsi une barrière de diffusion entre la rétine neurale et l'humeur vitrée comme la barrière hémato-encéphalique.

L'organisation laminaire de la rétine permet de distinguer deux voies de transmission de l'information : une voie verticale qui traverse toute la rétine et deux voies transversales qui traversent la rétine au niveau des couches plexiformes (Boycott and Wässle, 1991; Wässle and Boycott, 1991; Kolb and Marshak, 2003) (figure 5).

1.1 Les différents types cellulaires

1.1.1. Les cellules neuronales

1.1.1.a. Les photorécepteurs

Ces neurones, polarisés captent les signaux lumineux par l'intermédiaire de pigments visuels inclus dans des disques membranaires constituant le segment externe de ces photorécepteurs (figure 6). Cette énergie lumineuse est transformée via le processus de phototransduction en message chimique qui se traduit par une libération des neurotransmetteurs par exocytose dans la fente synaptique (Chabre, 1985). Les photorécepteurs sont le point de départ de la transmission verticale du signal dont le neurotransmetteur est le glutamate. Chez les mammifères il existe deux types de photorécepteurs, les bâtonnets, responsables de la vision scotopique ou nocturne (lumière de faible intensité) et les cônes qui interviennent dans la vision photopique ou diurne ainsi que la vision des couleurs.

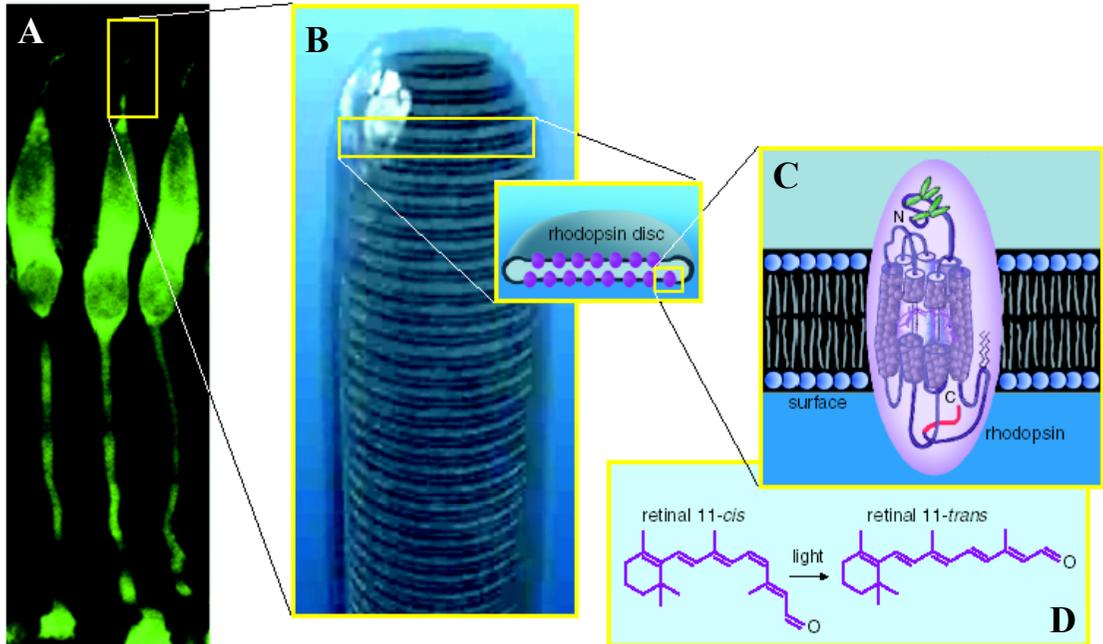


Figure 6: Cône marqué au fluorescent green dye (A). Agrandissement d'un segment externe, les disques membranaires sont visibles (B). Le complexe rhodopsine (C). Changement de conformation du rétinol après exposition à la lumière (D). D'après Kolb et coll., 2003.

Le pédicule des cônes fournit de nombreuses synapses permettant le transfert du signal lumineux des cônes vers les cellules bipolaires et horizontales (figure 7). Suivant la localisation au sein de la rétine, les pédicules des cônes larges de 5 à 8 μm , contiennent entre 20 (fovéa) et 42 (rétine périphérique) synapses invaginantes (Missotén, 1965; Calkins et al., 1996; Chun et al., 1996). Les synapses sont appelées triades du fait qu'elles contiennent trois éléments post-synaptiques : deux dendrites des cellules horizontales constituant les éléments latéraux et un ou deux dendrites des cellules bipolaires correspondant à l'élément central. En plus des synapses invaginantes, les cellules bipolaires font contact avec la base des pédicules des cônes (Dowling and Boycott, 1966). De plus, en dessous des pieds des cônes des jonctions « desmosome-like » ont été décrites entre les dendrites des cellules bipolaires et/ou des cellules horizontales (Missotén, 1965; Raviola and Gilula, 1975; Boycott and Hopkins, 1993).

Les bâtonnets présentent à leur terminaison synaptique : le sphérule une seule synapse composée des terminaisons dendritiques des cellules bipolaires et horizontales.

Les photorécepteurs sont continuellement dépolarisés à l'obscurité (Tomita, 1965), les canaux calciques de type-L restent ouverts entraînant ainsi une libération continue du glutamate (Copenhagen and Jahr, 1989). Les photorécepteurs répondent à la lumière en s'hyperpolarisant et en diminuant le taux de libération du neurotransmetteur. Le maintien d'un influx constant de calcium durant l'obscurité implique l'existence d'un mécanisme d'expulsion du calcium via une pompe Ca^{2+} -ATPase (PMCA : Plasma Membrane Calcium ATPase) localisée dans les pieds des photorécepteurs (Morgans et al., 1998).

1.1.1.b. Les cellules horizontales

Les cellules horizontales établissent des connexions avec les photorécepteurs au niveau de la synapse « triade ». On distingue deux types de cellules horizontales : les cellules H1 qui établissent des connexions dendritiques avec les cônes et des connexions axonales avec les bâtonnets, et les cellules

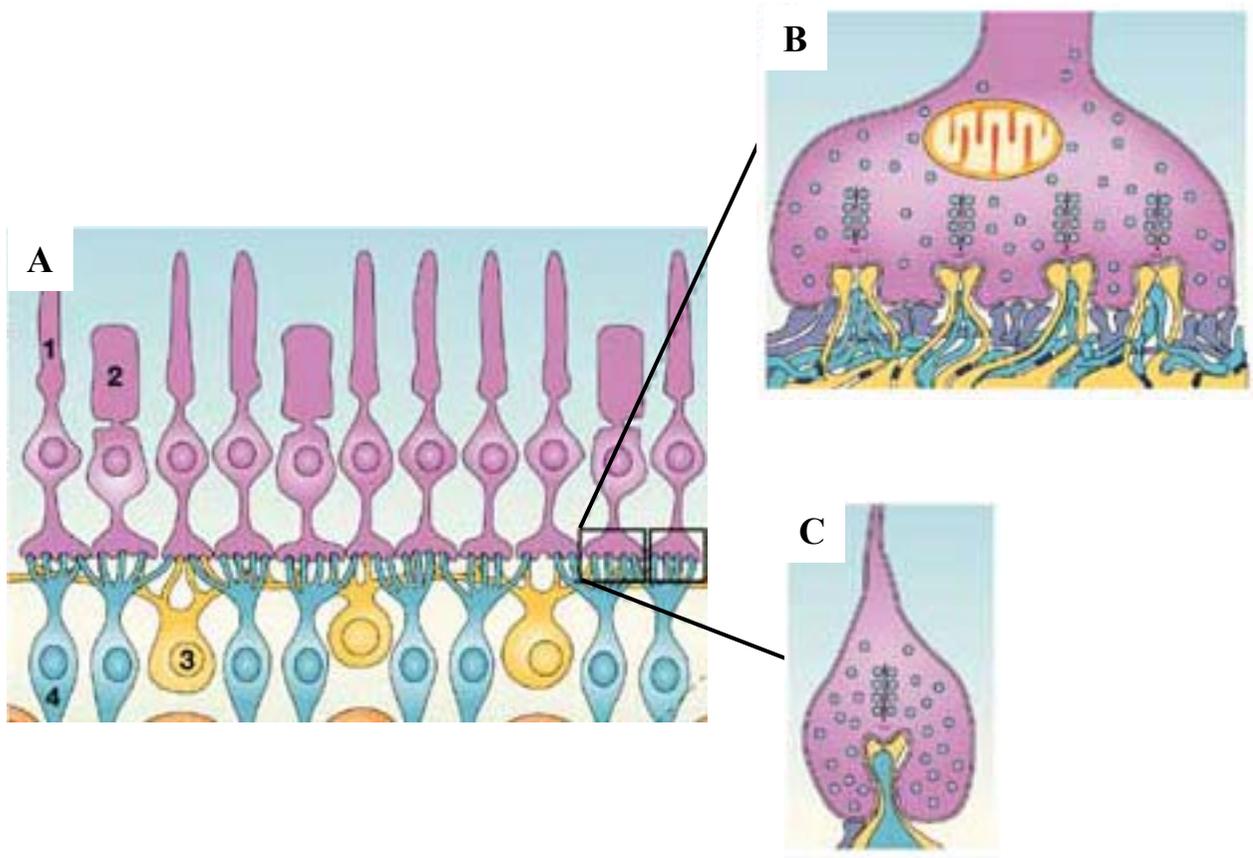


Figure 7: Représentation schématique de la couche plexiforme externe (A). 1: bâtonnet; 2: cône; 3: cellule horizontale; 4: cellule bipolaire.

Représentation schématique d'un pédicule (cône) (B) présentant 4 rubans présynaptiques apposés aux terminaisons dendritiques des cellules horizontales (jaune) et des cellules bipolaires ON (bleu). Les terminaisons dendritiques des cellules bipolaires à cône OFF font contact à la base du pédicule (violet).

Représentation schématique d'un sphérule (bâtonnet) (C). Le ruban présynaptique est apposé aux terminaisons dendritiques des cellules horizontales (jaune) et des cellules bipolaires ON (bleu). Les terminaisons dendritiques des cellules bipolaires à cône OFF font contact à la base (violet).

D'après Wassle, 2004.

H2 qui se branchent uniquement sur les cônes par l'intermédiaire de leur arbre dendritique et d'un court axone. Il a été proposé que les cellules horizontales moduleraient l'information visuelle provenant des photorécepteurs en envoyant à la cellule réceptrice un signal de nature opposée à celui reçu : c'est le phénomène d'inhibition latérale. Le GABA (acide γ -aminobutyrique) serait libéré sans exocytose de manière calcium indépendante par des transporteurs (Attwell et al., 1993; Schwartz, 1993) et va hyperpolariser les cônes. Il a été observé dans plusieurs espèces, la présence d'un transporteur vésiculaire du GABA (VGAT) ou transporteur vésiculaire d'acides aminés inhibiteur (VIAAT) le long de la membrane des cellules horizontales et plus particulièrement à la terminaison des photorécepteurs à leurs contacts invaginants (Haverkamp et al., 2000; Cueva et al., 2002; Jellali et al., 2002).

1.1.1.c. Les cellules bipolaires

Les cellules bipolaires transmettent les signaux des photorécepteurs (cônes et bâtonnets) vers les cellules amacrines et ganglionnaires. Deux groupes de cellules bipolaires sont présents dans la rétine de mammifères : les cellules bipolaires à cônes et les cellules bipolaires à bâtonnets (Sterling, 1995).

Ramon y Cajal (Ramón y Cajal, 1893) a reconnu les cellules bipolaires à bâtonnets comme une classe à part. Leurs dendrites font des contacts invaginants dans les sphérules des bâtonnets, et leurs axones terminent dans la partie la plus interne de la couche plexiforme interne (figure 8) (Boycott and Dowling, 1969; Boycott and Kolb, 1973; Dacheux and Raviola, 1986; Greferath et al., 1990; Wassle and Boycott, 1991; Euler et al., 1996). Ces cellules sont uniquement de type ON.

Les cellules bipolaires à cônes diffèrent dans leur schéma d'embranchement dendritique, le nombre de cônes contactés et, le plus important, le niveau de stratification de leurs terminaisons axoniques dans la couche plexiforme interne. Il existe au moins neuf types de cellules bipolaires à cônes dans la rétine de mammifères (Famiglietti, 1981; Kolb et al., 1981; McGuire et al., 1984; Boycott and Wassle, 1991; Euler and Wassle, 1995; Euler et al., 1996; Ghosh et al., 2004).

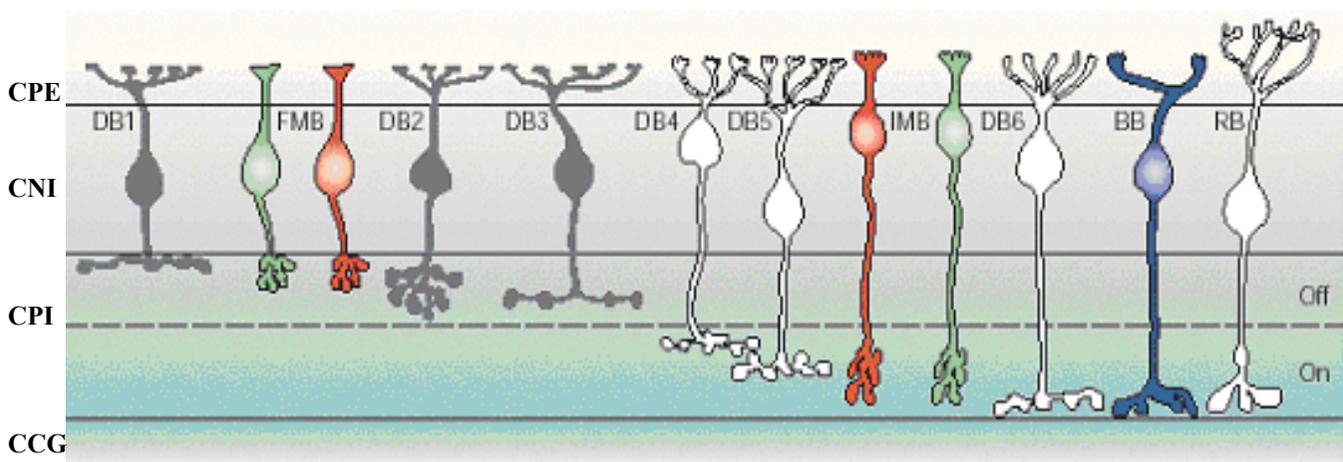


Figure 8: Représentation schématique des différents types de cellules bipolaires. Les axones des cellules bipolaires OFF terminent dans la partie la plus externe de la CPI, les axones des cellules bipolaires ON terminent dans la partie la plus interne de la CPI.
 CPE: couche plexiforme externe; CNI: couche nucléaire interne; CPI: couche plexiforme interne; CCG: couche des cellules ganglionnaires
 D'après Wassle et coll.,2004.

Fonctionnellement les cellules bipolaires à cônes peuvent être subdivisées en cellules ON et cellules OFF suivant leurs réponses à la lumière. Les cellules bipolaires ON qui présentent une dépolarisation en réponse à la lumière ont leurs terminaisons axoniques dans la moitié interne de la couche plexiforme interne (Ramón y Cajal, 1893; Boycott and Dowling, 1969; Nelson and Kolb, 1983; Wassle et al., 1991) alors que les cellules bipolaires OFF, qui s'hyperpolarisent en réponse à la lumière ont leurs terminaisons axoniques dans la moitié externe de la couche plexiforme interne (Euler et al., 1996; Hartveit, 1997).

De plus, la diversité fonctionnelle des cellules bipolaires est le résultat de l'expression des différents types de récepteurs du glutamate (GluRs) à la synapse photorécepteurs-cellules bipolaires. Les cellules bipolaires ON expriment le récepteur du glutamate métabotrope mGluR6 à leurs terminaisons dendritiques en contact avec les photorécepteurs (Nomura et al., 1994; Masu et al., 1995; Vardi et al., 2000). Les cellules bipolaires OFF expriment différents récepteurs du glutamate ionotropes à leurs contacts «à plat» avec les photorécepteurs (Brandstatter et al., 1997).

Cette ambivalence ON/OFF se retrouve par la suite au niveau de la connexion cellules bipolaire/ganglionnaire de la couche plexiforme interne. Les cellules bipolaires ON, dépolarisées à la lumière, libèrent le neuromédiateur qui dépolarise à son tour les cellules ganglionnaires ON. A l'inverse, à l'obscurité, les cellules bipolaires OFF libèrent le même neuromédiateur qui dépolarise les cellules ganglionnaires OFF.

1.1.1.d. Les cellules interplexiformes

Les cellules interplexiformes décrites pour la première fois par Gallego (Gallego, 1971) dans la rétine de chat ont été étudiées dans la rétine de poisson rouge (Dowling and Ehinger, 1975) mais aussi dans la rétine humaine (Kolb and West, 1977; Linberg and Fisher, 1986; Kolb et al., 1992). Ces cellules ont été proposées comme modulateur de la transmission du signal entre les couches plexiformes externe et

interne. Suivant l'espèce les cellules peuvent être de type dopaminergique (poisson rouge) ou GABAergique (humain).

1.1.1.e. La couche plexiforme externe

La CPE est la première synapse de la rétine, c'est-à-dire le complexe synaptique des cônes et bâtonnets. Elle est unique parmi toutes les synapses du système nerveux central, à la fois par sa complexité et sa spécialisation (Sterling, 1995) (voir figure 7).

La CPE est le premier niveau de transmission et de modulation de l'information nerveuse après transformation du signal lumineux en signal électrique au niveau des photorécepteurs. Elle est constituée d'une imbrication des dendrites des cellules bipolaires et horizontales au niveau des pieds des cônes et bâtonnets. Une invagination au niveau des pieds des cônes et bâtonnets, correspondant à un arrangement en « triade » comprend la zone du ruban présynaptique ainsi que les dendrites de 2 cellules horizontales et de 1 ou 2 cellules bipolaires (Dowling and Boycott, 1966; Calkins et al., 1996). Il existe aussi des contacts au niveau de la jonction basale des pieds des cônes avec les dendrites des cellules bipolaires (Dowling and Boycott, 1966) mais aussi des jonctions desmosomes réalisées par les dendrites des cellules horizontales (Haverkamp et al., 2000).

La libération du glutamate se fait à des sites bien spécifiques en association avec les rubans qui guident les vésicules dans la région d'exocytose (Rao-Mirotnik et al., 1995). La libération du glutamate est dépendante du Ca^{2+} et vésiculaire (Schmitz and Witkovsky, 1997; Morgans, 1999). La concentration de glutamate dans la fente synaptique qui représente le signal de l'intensité lumineuse est déterminée par trois facteurs : la libération, la recapture et la diffusion (Vandenbranden et al., 1996).

Afin de supporter le taux important de libération du glutamate, chaque zone synaptique de la terminaison du photorécepteur présente une synapse en ruban avec un réservoir d'environ une centaine de vésicules synaptiques. Quand la vésicule synaptique libère le neurotransmetteur, la concentration dans la fente synaptique augmente rapidement et décline dans le temps et l'espace (Clements et al., 1996; Rao-Mirotnik et al., 1998).

La géométrie de la synapse est importante puisque la glie isolerait une synapse d'une autre à l'intérieur d'une même terminaison ou bien les synapses d'une même terminaison de celles d'une terminaison voisine. Burriss et coll., (2002b) montrent qu'il existe une cellule gliale de Müller pour chaque terminaison d'un cône et décrivent comment les CGM entourent et isolent les terminaisons des cônes, promouvant ainsi un flux principalement dans une seule dimension.

1.1.1.f. Les cellules amacrines

Les cellules amacrines constituent le groupe le plus divers des types cellulaires de la rétine (Dowling, 1987; Strettoi and Masland, 1996). Ces cellules ne possèdent pas d'axone et sont classées suivant les caractéristiques morphologiques de leur arbre dendritique et leur niveau de localisation dans la couche plexiforme interne. Elles sont responsables de la modulation latérale de la voie de transmission verticale du signal en établissant des synapses avec les cellules bipolaires et entre elles. Les cellules amacrines peuvent être divisées en deux groupes principaux : les cellules amacrines glycinergiques et GABAergiques. Les cellules amacrines glycinergiques regroupent une dizaine de types morphologiques différents dont les cellules amacrines AII, les plus étudiées. Ces cellules sont des interneurons importants dans la voie des bâtonnets, ce sont les seules cellules amacrines qui font partie de la voie de transmission verticale. Elles reçoivent un message provenant des cellules bipolaires à bâtonnets et renvoient un message aux cellules bipolaires à cônes ON via des « gap junctions » (Masland, 2001; Veruki and Hartveit, 2002) et aux cellules bipolaires à cônes OFF via des synapses chimiques (Kolb and Famiglietti, 1974). Les cellules amacrines GABAergiques présentent environ une vingtaine de types morphologiques différents (MacNeil and Masland, 1998; Cueva et al., 2002). En plus d'être GABAergiques, de nombreuses cellules amacrines sont cholinergiques (Tauchi and Masland, 1984; Rodieck and Marshak, 1992) ou dopaminergiques (Haverkamp and Wassle, 2000).

1.1.1.g. Les cellules ganglionnaires

Les cellules ganglionnaires sont les neurones de sortie de la rétine. Elles collectent les messages électriques concernant le signal visuel provenant des deux couches cellulaires les précédant. Le prétraitement de l'information est accompli par les neurones de la voie verticale de transmission et par les voies horizontales avant présentation aux cellules ganglionnaires représentant l'ultime maillon dans le transfert de l'information de la rétine vers les centres supérieurs de l'information visuelle. Plusieurs types de cellules ont été décrits sur la base de la morphologie de leur arborisation dendritique (Boycott and Wassle, 1974 ; Kolb et al., 1981; Peichl, 1991 ; Silveira and Perry, 1991 ; Nelson et al., 1993 ; Haverkamp and Wassle, 2000).

1.1.1.f. La couche plexiforme interne

Les cellules bipolaires fournissent l'information aux cellules ganglionnaires, et cette information est modulée par environ une vingtaine de types de cellules amacrines.

1.1.2. Les cellules non neuronales

1.1.2.a. Les cellules de l'épithélium pigmentaire (RPE)

Les cellules de l'épithélium pigmentaire forment la couche la plus externe de la rétine. Le RPE est constitué d'une seule couche de cellules séparant la rétine neurale de la choroïde (Newman, 1994). Sa membrane apicale présente des microvilli en face des segments externes des photorécepteurs délimitant ainsi l'espace sous-rétinien. Ces cellules contiennent la mélanine, un pigment grâce auquel elles peuvent absorber la lumière incidente qui n'a pas été captée par les photorécepteurs, ces cellules participent également à la régénération des segments externes des photorécepteurs. Le RPE aide au maintien d'un environnement ionique approprié pour la fonction des photorécepteurs en transportant des ions, métabolites et autres substances de l'espace sous-rétinien au petit compartiment

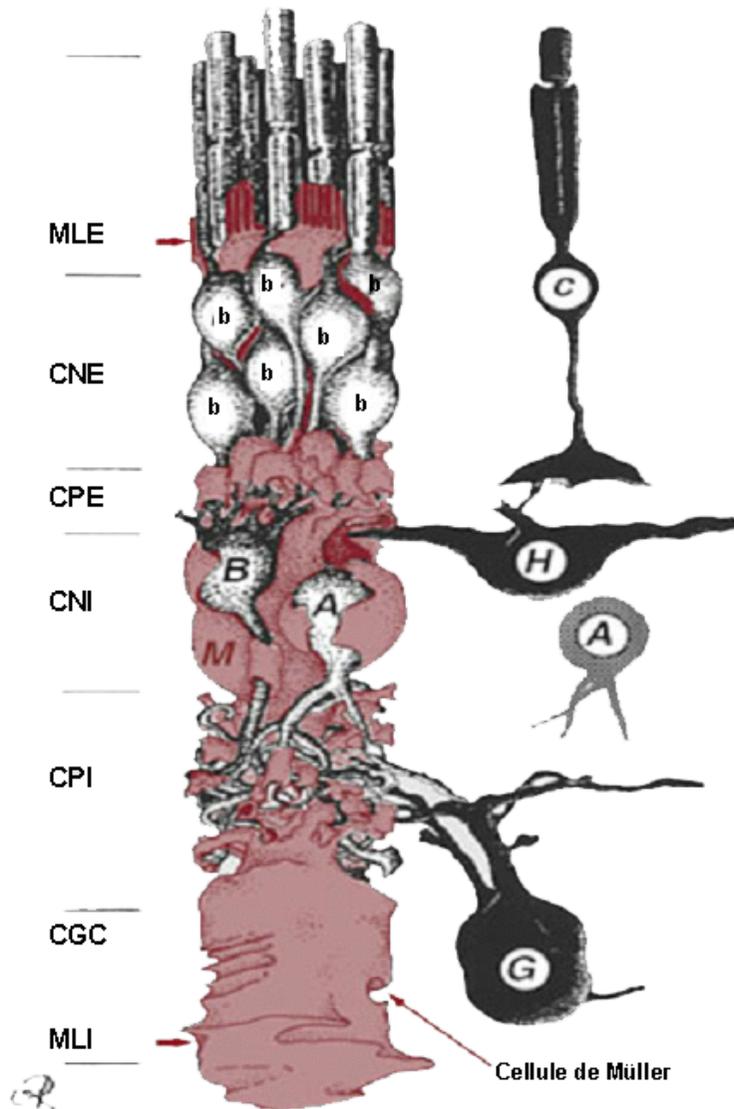


Figure 9: Représentation *in situ* de la cellule gliale de Müller. On remarque l'imbrication des extensions provenant du tronc commun avec les neurones avoisinants. C= cônes, b= bâtonnets, B= cellules bipolaires, H= cellules horizontales, I= interneurons, A= cellules amacrines, G= cellules ganglionnaires, M= cellules de Müller, MLE= membrane limitante externe, CNE= couche nucléaire externe, CPE= couche plexiforme externe, CNI= couche nucléaire interne, CPI= couche plexiforme interne, CCG= couche des cellules ganglionnaires, MLI= membrane limitante interne. D'après Reichenbach et coll., 1991.

extracellulaire délimité par la membrane apicale du RPE, les prolongements apicaux des cellules gliales de Müller et les segments externes des photorécepteurs et inversement. Des canaux K^+ (Kir4.1, Kir7.1) exprimés dans les microvilli joueraient un rôle dans le maintien de la concentration extracellulaire de K^+ et dans la formation de l'onde c de l'électrorétinogramme (Newman, 1994 ; Ishii et al., 1997; Kusaka et al., 1999; Yang et al., 2003).

1.1.2.b. Les cellules gliales

Trois grandes populations gliales ont été décrites au niveau de la rétine:

Les cellules gliales de Müller

Les cellules gliales de Müller sont les principales cellules gliales de la rétine et présentent la plupart des fonctions des astrocytes, oligodendrocytes et cellules ependymales des autres régions du SNC. Du fait de l'accessibilité de la rétine, les CGM sont un excellent modèle pour l'investigation des cellules gliales. Elles ont été décrites pour la première fois par Müller en 1851 (Müller, 1851) (figure 9).

Les CGM sont des cellules gliales radiales qui traversent entièrement l'épaisseur de la rétine neurale (Uga and Smelser, 1973a; Uga and Smelser, 1973b; Reichenbach et al., 1989). Elles sont présentes dans toutes les espèces vertébrées. Elles constituent un support architectural à travers l'épaisseur de la rétine et forment les limites de celle-ci au niveau de la limitante externe en réalisant des jonctions avec les segments externes des photorécepteurs et au niveau de la limitante interne par liaison de leurs pieds. Leurs corps cellulaires sont présents dans la couche nucléaire interne. Des prolongements secondaires dans la CPE provenant du tronc principal de la CGM forment d'importants fourreaux qui entourent les corps cellulaires neuronaux, les dendrites et, dans la couche des fibres optiques, les axones des cellules ganglionnaires (Newman and Reichenbach, 1996; Burris et al., 2002a). Elles se retrouvent ainsi au contact de tous les types cellulaires rétiniens, de l'épithélium pigmentaire et des vaisseaux sanguins et jouent un rôle essentiel dans l'architecture et le maintien du tissu rétinien.

Les CGM présentent de nombreuses fonctions dont certaines sont vitales pour la rétine. Elles protègent les neurones d'une exposition excessive de neurotransmetteurs en régulant le milieu extra-cellulaire. En effet, les cellules gliales de Müller possèdent de nombreux récepteurs et transporteurs de neurotransmetteurs tels que le glutamate (Brew and Attwell, 1987; Schwartz, 1993; Harada et al., 1998) ou le GABA (Malchow et al., 1989; Biedermann et al., 1994). Les CGM, comme les autres cellules gliales, expriment une large variété de canaux ioniques dépendant du voltage (Newman, 1985; Newman, 1993; Chao et al., 1994a, 1994b; Puro and Stuenkel, 1995). Leur conductance membranaire est dominée par les canaux rectificateurs de K⁺ (Brew et al., 1986; Newman, 1993), qui donnent à ces cellules une résistance membranaire extrêmement faible (Newman, 1987a, b). Elles interviennent également dans le maintien de l'homéostasie rétinienne en régulant la concentration extra-cellulaire en potassium. Il avait été proposé que ces cellules participeraient ainsi à la génération de l'onde b de l'électrorétinogramme (Miller and Dowling, 1970 ; Newman and Odette, 1984).

Les astrocytes

Les astrocytes ne sont pas des cellules gliales provenant du neuroépithélium rétinien mais originaires du neuroectoderme. Elles pénètrent le long du nerf optique lors du développement de la rétine (Stone and Dreher, 1987). Les corps cellulaires des astrocytes et leurs prolongements sont presque entièrement restreints à la partie la plus interne de la rétine où ils enveloppent les axones des cellules ganglionnaires et entrent en contact avec les vaisseaux sanguins (Bussow, 1980). Ainsi ces cellules joueraient un rôle important dans la mise en place et le maintien de la barrière hémato-rétinienne (Chan-Ling and Stone, 1991). De plus, comme les CGM, ces cellules pourraient être impliquées dans l'homéostasie ionique en régulant la concentration de potassium extra-cellulaire et le métabolisme des neurotransmetteurs tels que le GABA.

Les microglies

Les microglies sont retrouvées dans toutes les couches de la rétine. Elles pénètrent dans la rétine depuis le mésenchyme du nerf optique à un stade précoce du développement. Ces cellules peuvent être stimulées pour des fonctions macrophagiques suite à des traumatismes de la rétine ou bien pour la phagocytose des neurones dégénérant. Issues du mésoderme, les microglies forment une famille indépendante de cellules gliales.

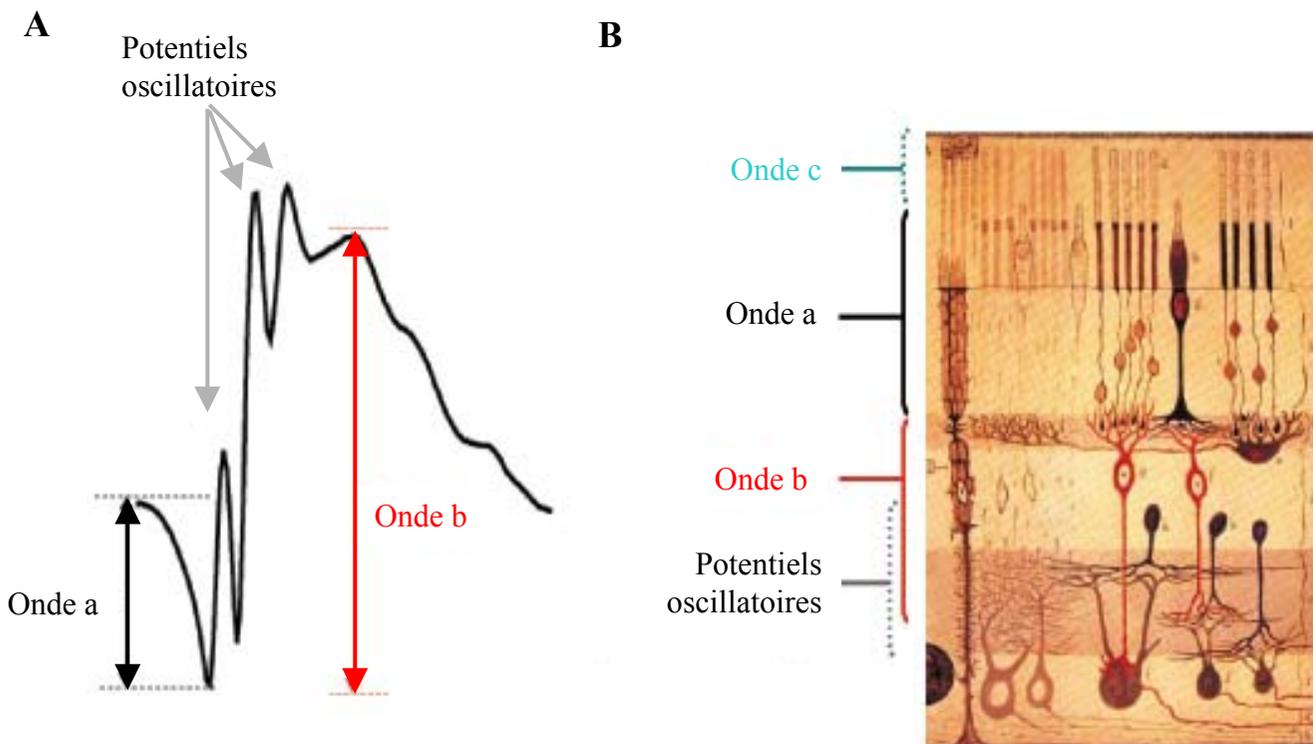


Figure 10: Electrorétinogramme (ERG) de souris et schéma représentant l'origine cellulaire de l'enregistrement. (A) Electrorétinogramme de souris représentant les ondes les plus souvent étudiées par cette technique: l'onde a, l'onde b et les potentiels oscillatoires). (B) Schéma de rétine d'après un dessin de Ramón y Cajal qui représente l'origine cellulaire des ondes de l'ERG.

1.2. La transmission

1.2.1. Composantes de l'électrorétinogramme (ERG)

L'ERG en « champs plein » est le test électrophysiologique oculaire le plus utilisé. En 1989, un protocole de base pour l'étude chez l'homme a été standardisé (Marmor et al., 2004). L'ERG est un enregistrement du signal électrique généré par l'activité électrique des cellules rétiniennes (Dowling, 1987). Cet enregistrement correspond à la variation de potentiel trans-rétinien en réponse à une stimulation lumineuse, il serait constitué de la sommation algébrique et dans le temps des réponses individuelles de chaque catégorie de cellule excitable.

Parce que l'ERG peut être enregistré de manière non invasive, il est utilisé comme outil d'estimation des fonctions rétiniennes en recherche fondamentale, en diagnostic clinique chez l'homme et chez les modèles animaux de différents troubles visuels.

L'enregistrement électrorétinographique est effectué après stimulation par un flash lumineux.

En plus de l'ERG en « champs plein », des enregistrements après adaptation à l'obscurité (ERG scotopique) ou bien à la lumière (ERG photopique) peuvent aussi être réalisés afin de pouvoir visualiser toutes les ondes composant l'ERG (figure 10).

L'onde a apparaît comme la première variation de potentiel enregistré, elle est négative (figure 10). A l'obscurité, les canaux ioniques permettent l'entrée de Na^+ et la sortie de K^+ maintenant ainsi à une valeur fixe la différence de potentiel. Le stimulus lumineux entraîne la diminution de perméabilité ionique au sodium de la membrane du bâtonnet provoquant une hyperpolarisation de la cellule qui est à l'origine de l'onde a. Les cônes participent également à la génération de l'onde a mais de façon beaucoup plus rapide et moindre en amplitude.

L'onde b, est la deuxième variation de potentiel enregistrée, elle est positive, et c'est la composante la plus importante en amplitude de l'ERG. Son origine cellulaire est encore discutée. En premier lieu, on a attribué l'origine de l'onde b aux cellules bipolaires (Hashimoto et al., 1961). Selon cette hypothèse,

les cellules bipolaires ON expriment le récepteur métabotrope du glutamate nommé mGluR6 (Nomura et al., 1994). En effet, des enregistrements électrorétinographiques effectués chez les souris invalidées pour le mGluR6 montrent une diminution de l'amplitude de l'onde b (Masu et al., 1995). Cependant en 1984, une autre hypothèse basée sur la contribution des cellules de Müller à ce potentiel fut introduite par Newman et Odette. Les CGM captent en effet le potassium extra-cellulaire au niveau distal et le relâchent à leur extrémité ou pieds venant au contact du vitré ainsi que des vaisseaux. Ces flux ioniques portent le nom de « potassium siphoning ». Selon l'hypothèse de Newman et Odette ces flux potassiques par l'intermédiaire des canaux K^+ de type Kir4.1 pourraient être à l'origine de l'onde b. Cependant, les résultats d'études récentes ont montré que l'augmentation de K^+ extracellulaire aurait un effet moindre sur la génération de l'onde b et suggèreraient ainsi que la contribution des cellules gliales de Müller à l'onde b serait limitée (Xu and Karwoski, 1994a, b; Hanitzsch et al., 1996; Karwoski and Xu, 1999; Wurziger et al., 2001). En effet, différentes études réfutent cette hypothèse au profit des cellules bipolaires ON exclusivement (Stockton and Slaughter, 1989; Gurevich and Slaughter, 1993; Hanitzsch et al., 1996. De plus, Kofugi et coll. (2000) ont montré que la génération de l'onde b n'est pas affectée chez une lignée de souris dont les canaux Kir4.1 sont inactivés de façon génétique. Ils concluent que l'onde b n'est pas générée par les courants K^+ traversant la cellule gliale de Müller.

Bien que l'activité des cellules bipolaires ON soit considérée comme étant l'élément majeur dans la formation de l'onde b (Stockton and Slaughter, 1989; Xu and Karwoski, 1994a; Tian and Slaughter, 1995; Green and Kapousta-Bruneau, 1999; Karwoski and Xu, 1999) il existe des évidences croissantes que les neurones de 3^{ème} ordre : les cellules amacrines et ganglionnaires peuvent aussi contribuer directement ou indirectement à la réponse (Gottlob et al., 1985; Dong and Hare, 2000; Kapousta-Bruneau, 2000; Awatramani et al., 2001; Wurziger et al., 2001). Cependant, le mécanisme exact à travers lequel ces neurones contribueraient à la génération de l'onde b n'est toujours pas établi.

L'onde c est l'onde avec une origine plus certaine puisqu'elle disparaît si l'ERG est enregistré sur rétine entière *in vitro* (Hanitzsch et al., 1996), dans cette préparation il n'y a pas d'épithélium pigmentaire. L'onde c a donc pour origine les variations de potentiel généré à travers l'épithélium



Figure 11: Ragnar Granit, prix Nobel de Physiologie et de M^edecine en 1954

pigmentaire rétinien (EPR). Elle possède trois composantes (négative ou positive) qui varient en fonction des espèces mammaliennes (Steinberg et al., 1970; Hanitzsch and Lichtenberger, 1997) ont montré que cette onde est produite par un changement de concentration en potassium dans l'espace sous rétinien.

L'onde d est surtout observée lors d'enregistrements effectués sur des rétines riches en cônes. C'est un potentiel positif qui apparaît dans l'ERG photopique à l'arrêt de la lumière. Dans l'ERG scotopique son existence est discutée (Brown, 1968). L'origine de cette onde est loin d'être clairement établie : tout d'abord décrite comme une déflexion positive qui représenterait l'activité des récepteurs dans la rétine distale (Whitten and Brown, 1973; Yonemura et al., 1974). Xu et coll., (1995) la définissent comme la réponse des cellules bipolaires hyperpolarisées dans la rétine de grenouille. Le seul élément ne variant pas d'un auteur à l'autre concerne la contribution des cellules gliales de Müller à cette onde.

Les potentiels oscillatoires représentent un ensemble d'oscillations lors de la phase ascendante de l'onde b de l'ERG (Granit, 1968) (figure 11). Leur génération implique les axones terminaux des cellules bipolaires, les prolongements des cellules amacrines et les dendrites des cellules ganglionnaires. Ce sont de bons indicateurs de mécanismes neuronaux adaptatifs de la rétine et ils sont utilisés comme instrument d'étude du développement post-natal et de l'adaptation neuronale rétinienne (Yonemura et al., 1962; Gur et al., 1987; Hara and Miura, 1994; Tremblay et al., 1995).

1.2.2. Pathologies liées à des défauts de transmission synaptique mises en évidence par une anomalie de l'onde b de l'ERG

Comme nous venons de l'exposer, l'ERG des mammifères est une combinaison de nombreux composants. Des perturbations de l'ERG reflètent des altérations du système visuel et en particulier de la rétine qui peuvent avoir des origines multiples et diverses. Le plus important élément de l'ERG en adaptation à l'obscurité est la réponse « cornée-positive » correspondant à l'onde b. De nombreuses

pathologies décrivent plus particulièrement des troubles associés à l'onde b. C'est le cas pour la cécité congénitale autosomale récessive ou liée au chromosome X, le syndrome Goldmann-Favre, certains types de rétinopathies pigmentaires, des neuropathies optiques, la rétinopathie diabétique et lors de troubles vasculaires rétinien.

Les altérations de la transmission synaptique glutamatergique de la rétine (voie verticale) peuvent s'accompagner d'une altération de l'onde b de l'ERG. En effet, la concentration de glutamate au niveau de la fente cellulaire est cruciale pour la rétine, une trop grande concentration devient excitotoxique (Harada et al., 1998).

Quelques exemples d'altérations de la neurotransmission :

Le neurotransmetteur des photorécepteurs, le glutamate (Massey and Miller, 1990; Kalloniatis and Tomisich, 1999; Thoreson and Witkovsky, 1999) est libéré par les vésicules dans la région d'exocytose au niveau des rubans synaptiques (Rao-Mirotznik et al., 1995). Cette libération se fait après entrée de calcium via les canaux calciques voltage-dépendent de type L dans les terminaisons des photorécepteurs. L'importance de ces canaux a été récemment mise en évidence par la découverte de mutations de la sous-unité $\alpha 1$ du canal calcique, mutations responsables de troubles liés à l'X induisant chez l'homme la cécité nocturne congénitale « incomplete congenital stationary night blindness (CSNB2) ». Ces patients présentent une réduction de l'amplitude de l'onde b de l'ERG en condition d'adaptation à l'obscurité ainsi qu'une sensibilité visuelle réduite (Bech-Hansen et al., 1998; Strom et al., 1998). Une étude réalisée chez la souris a montré que l'élimination de la sous-unité $\beta 2$ des canaux calciques entraîne un phénotype similaire à celui observé chez les patients atteints de CSNB2 alors que la perte des sous-unités $\beta 1$, $\beta 3$ ou $\beta 4$ n'engendre pas de modification de l'ERG (Ball et al., 2002). Une diminution significative de l'épaisseur de la CPE ainsi qu'une désorganisation de celle-ci a aussi été observée chez ces souris. Dans la rétine de rat et de poulet, la distribution de la sous-unité $\alpha 1F$ des canaux calciques dans la zone active des bâtonnets (synapse ruban) (Firth et al.,

2001; Morgans, 2001; Morgans et al., 2001) est dépendante de l'expression de la sous-unité $\beta 2$ (Ball et al., 2002).

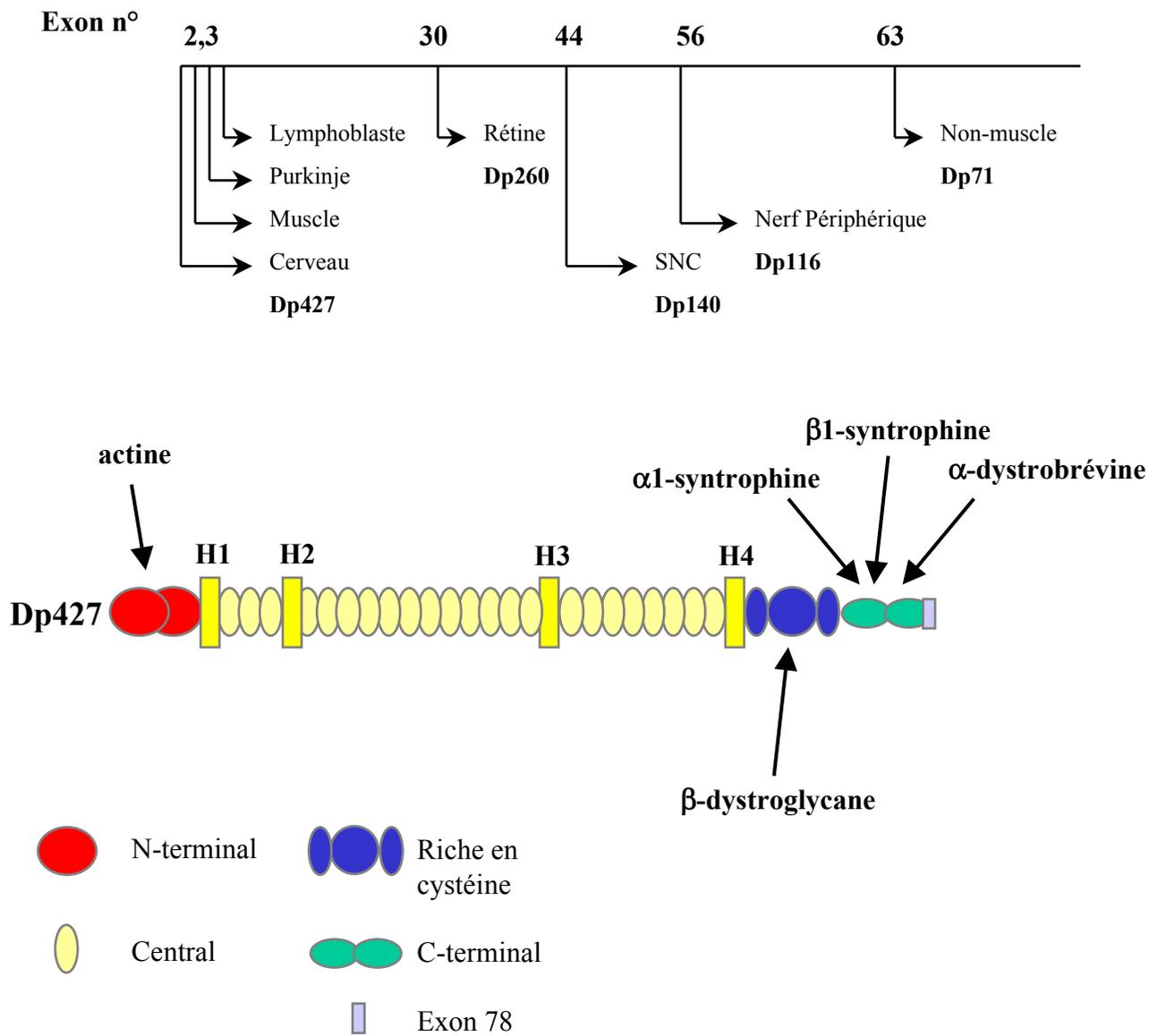
La suppression de l'expression des récepteurs du glutamate mGluR6 provoque la diminution de l'amplitude de l'onde b de l'électrorétinogramme (Masu et al., 1995). Il en est de même pour la souris $Go_{\alpha}^{-/-}$ qui n'exprime plus la protéine Go_{α} associée à ces récepteurs (Vardi et al., 1998; Dhingra et al., 2000).

La transmission glutamatergique n'est pas la seule impliquée dans les altérations de l'ERG. L'inhibition de la nitric oxide synthase (NOS) dans la rétine affecte également l'amplitude de l'onde b de l'ERG (Ostwald et al., 1995; Ostwald et al., 1997).

Dong et coll. (2002) ont montré que le blocage du feedback GABA_c au niveau de la couche plexiforme interne atténue l'amplitude de l'onde b et augmente de façon significative le délai de la réponse sans influencer l'onde a.

Des altérations de la neurotransmission rétinienne ont été révélées par électrorétinogramme (Cibis et al., 1993; Pillers et al., 1993; De Becker et al., 1994; Fitzgerald et al., 1994) chez 80% des patients DMD (Sigesmund et al., 1994). Ces troubles se caractérisent par une forte diminution de l'amplitude de l'onde b de l'ERG en conditions d'adaptation à l'obscurité bien que ces patients ne présentent aucun autre troubles de la vision. Chez ces patients, des mutations du gène DMD engendrent l'absence totale ou partielle des dystrophines en fonctions des tissus considérés.

Cette anomalie de l'électrorétinogramme suggère donc un dysfonctionnement de la transmission de l'information lié à des perturbations de flux ioniques au sein de la rétine pouvant être une conséquence directe de mutations du gène DMD.



H1-H4 zones charnières riche en proline

Figure 12: Localisation génomique des promoteurs des différents produits du gène DMD. Organisation structurale de la dystrophine Dp427. Domaines d'interactions avec les protéines du complexe.

2. La superfamille des dystrophines

La superfamille des dystrophines regroupe la dystrophine, les produits courts du gène DMD ainsi que leurs protéines homologues telles que l'utrophine, la DRP2 et les dystrobrevines.

Le gène humain de la dystrophine a été localisé sur le chromosome X en position Xp21. Ce gène est le plus grand décrit avec une taille d'environ 2.5 mégabases (Mb) (Coffey et al., 1992) et engendre un messenger principal de 14kb composé de 79 exons (Koenig et al., 1987; Koenig et al., 1988; Roberts et al., 1993).

L'expression du transcrit de la dystrophine Dp427, nommée ainsi en raison de sa masse moléculaire apparente de 427 kDa (protéine de 3685 acides aminés) est contrôlée par trois promoteurs indépendant spécifiques du tissu. De plus l'activation de promoteurs internes en 3' du gène DMD entraîne la production de produits courts nommés Dp260, Dp140, Dp116, Dp71 et Dp45 (figure 12).

Toutes ces dystrophines sont issues d'un même gène à la suite de l'activation d'un promoteur spécifique, elles possèdent donc toutes une structure primaire identique.

2.1. La dystrophine

La dystrophine, protéine de 427kDa aussi bien que les autres membres de la superfamille, appartient à la famille des protéines du cytosquelette β -spectrine/ α -actinine (Koenig et al., 1988). Sur la base de sa séquence primaire, la dystrophine est constituée de quatre domaines distincts : un domaine N-terminal liant l'actine (Hammonds, 1987), un large domaine central constitué de 24 répétitions de motifs en triple hélice, un domaine riche en cystéine et un domaine C-terminal pouvant se lier à d'autres protéines membres du complexe associé à la dystrophine (figure 12).

2.1.1. Le domaine N-terminal

Ce domaine est constitué de quatre domaines liant l'actine ou ABD (« actin binding domain »). A l'aide de diverses techniques (résonance magnétique, co-sédimentation...), trois sites d'interaction avec l'actine-F ont pu être identifiés dans cette région (Levine et al., 1990; Hemmings et al., 1992; Levine et al., 1992; Way et al., 1992; Fabrizio et al., 1993; Corrado et al., 1994). Ces segments sont nommés respectivement ABS1 (résidus 18 à 27), ABS2 (résidus 86 à 120) et ABS3 (résidus 128 à 149) (ABS : actin binding site).

Au niveau de cette région N-terminale de la dystrophine, deux sites d'interaction avec la calmoduline ont été identifiés (Madhavan et al., 1992). Ils recouvrent en partie les sites ABS1 et ABS2 et ont été dénommés CaMBS1 (résidus 18 à 42) et CaMBS2 (résidus 104 à 125) (CaMBS : calmodulin binding site) (Bonet-Kerrache et al., 1994; Jarrett and Foster, 1995). La région N-terminale de la dystrophine a été montré fonctionnellement homologue à celle de l' α -actinine (Byers et al., 1989; Hemmings et al., 1992). En conclusion, la région N-terminale de la dystrophine est essentielle à l'interaction avec le réseau d'actine et joue donc un rôle dans le maintien de l'architecture cellulaire.

2.1.2. Le domaine central

Formé de 2705 acides aminés, il correspond à la partie la plus longue de la dystrophine. Il est composé de 24 séquences répétées de 109 résidus (Koenig and Kunkel, 1990). Ces éléments structuraux sont organisés en triple hélice alpha (Speicher and Marchesi, 1984), comparables aux éléments répétés dans l' α -actinine et la β -spectrine (Davison et Critchley, 1988). Malgré l'homologie entre la triple hélice de la dystrophine avec celle de la spectrine, aucune association en homodimère n'a été clairement démontrée pour la dystrophine, alors que cela a été mis en évidence pour la spectrine (Yan et al., 1993). Au contraire diverses approches (fragments recombinants, overlay, immunoprécipitation) ont permis de démontrer que les fragments du domaine central ne semblent pas interagir entre eux (Chan

and Kunkel, 1997) et que par conséquent la dystrophine est organisée sous forme de monomère (Kahana et al., 1997).

Enfin, les répétitions de séquences sont encadrées par deux zones charnières, riches en résidus proline. Deux autres zones charnières existent entre les éléments 3-4 et les éléments 19-20. Ces quatre régions sont appelées H1 à H4, elles rompent l'organisation répétitive du domaine central et pourraient assurer la flexibilité de cette partie de la molécule (Koenig and Kunkel, 1990). Rybakova et coll. (1996) ont identifié un nouveau site d'interaction avec l'actine dans la région centrale, au niveau des séquences répétées 12 à 16. L'affinité pour ce site étant comparable à celle pour les sites de la région N-terminale. Ce site a été dénommé ABS4. Winder (1997) a identifié un deuxième site d'interaction avec l'actine, dénommé ABS5, situé au niveau de la séquence répétée 18. Ces travaux démontrent que les sites de liaison à l'actine ne sont pas limités à la partie N-terminale de la dystrophine, mais sont présents tout le long de la protéine. En conséquence, les produits courts du gène DMD qui possèdent cette région centrale sont également susceptibles d'interagir avec le cytosquelette d'actine.

2.1.3. La région riche en cystéines

Elle contient un domaine WW, des motifs poignée EF et un domaine ZZ.

Le domaine WW, nommé ainsi à cause de la conservation de deux résidus tryptophane, a été décrit comme étant un module de fixation protéique trouvé dans de nombreuses protéines de signalisation et de régulation (Bork and Sudol, 1994). Ce domaine correspond à un domaine d'interaction protéique et fixe les motifs riches en proline. Avec le domaine en poignée EF, ils constituent le domaine de liaison entre la dystrophine et la partie C-terminale de la protéine transmembranaire β -dystroglycane (Suzuki et al., 1994; Jung et al., 1995; Rosa et al., 1996; Rentschler et al., 1999).

La dystrophine interagit avec le β -dystroglycane dans un premier temps via les aminoacides 3054-3271 puis de façon secondaire via les aminoacides 3271-3446, ceux-ci sont nécessaires pour un accrochage maximal et lui confèrent ainsi une affinité d'accrochage 5 à 20 fois supérieure. La

substitution d'un résidu cystéine situé en 3340 par une tyrosine est associée à des troubles mentaux et une absence de l'onde d de l'ERG chez ces patients (Lenk et al., 1996).

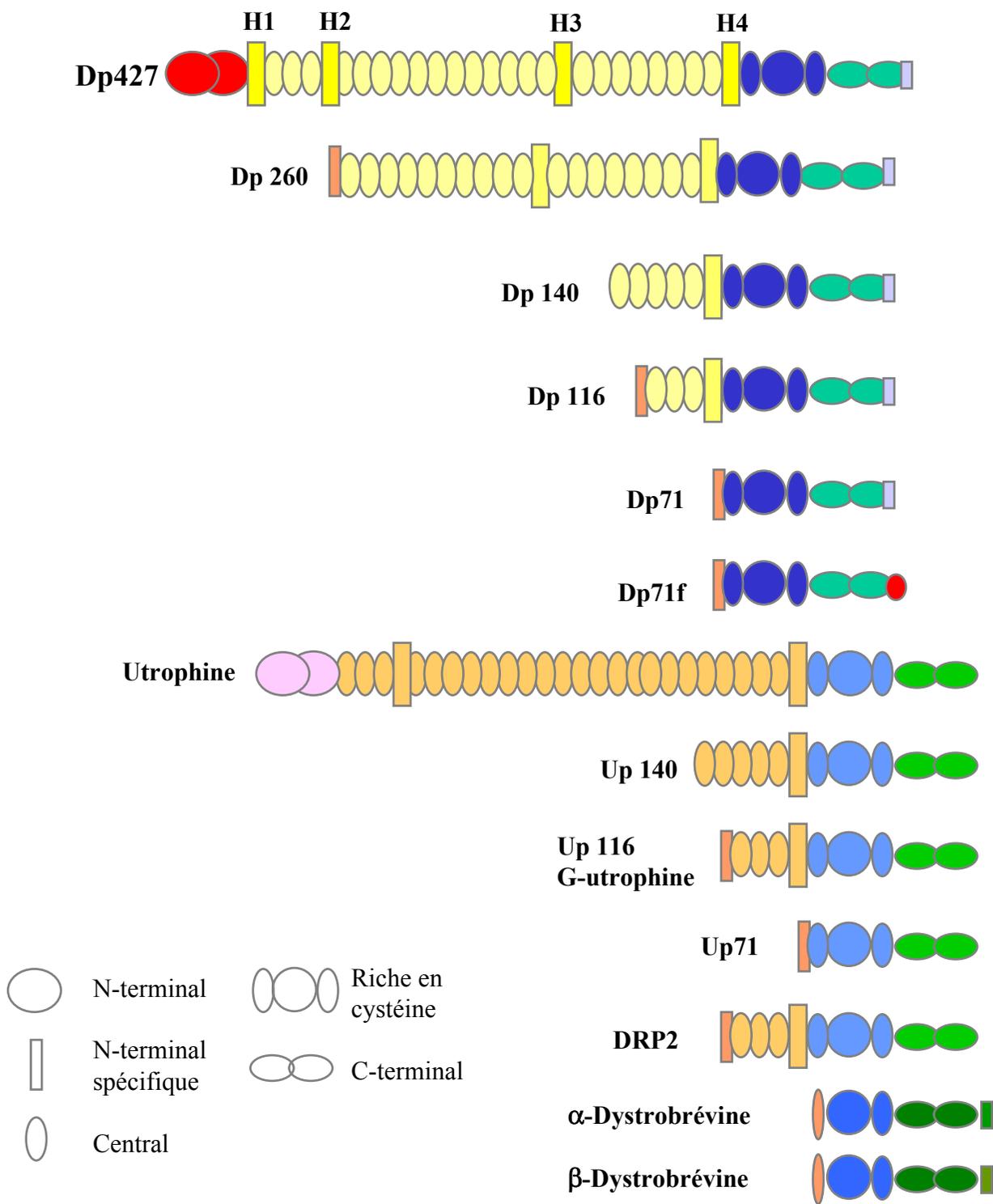
Cette partie de la protéine présente une homologie de séquence avec le domaine C-terminal de l' α -actinine qui contient des motifs poignées EF, capables de lier le calcium (Koenig et al., 1988).

Le domaine ZZ fait aussi partie du domaine riche en cystéine (Ponting et al., 1996). Il correspond à une structure dite en doigt de zinc qui est impliquée dans les interactions protéine-protéine. Ce domaine est composé de deux paires de résidus cystéine qui ont la capacité de lier le zinc (Michalak et al., 1996). Ce domaine s'accroche à la calmoduline via son site de liaison CaCM3 de manière calcium dépendante (Madhavan and Jarrett, 1994 ; Anderson et al., 1996) mais ne semble pas être requis pour l'interaction avec le β -dystroglycane.

2.1.4. Le domaine C-terminal

Contrairement aux domaines précédemment décrits, cette séquence ne présente aucune homologie avec l' α -actinine ou la spectrine (Koenig et al., 1988) mais est caractéristique de la superfamille des dystrophines. Ce domaine est nommé CC (Coiled Coil). Il est composé de deux hélices alpha permettant la formation de dimères parallèles hélice alpha/hélice alpha (CC-H1 et CC-H2) séparées par des résidus proline (Blake et al., 1995a). Cette région CC forme le site de liaison pour les syntrophines $\alpha 1$ et $\beta 1$ et l' α -dystrobrevine et modulerait l'interaction entre les syntrophines et les autres protéines associées à la dystrophine (Ahn and Kunkel, 1995; Suzuki et al., 1995; Sadoulet-Puccio et al., 1997 ; Nawrotzki et al., 1998). Cette partie de la protéine est sensible à la phosphorylation par différentes protéines kinases. En particulier, il existe deux enzymes, sous la dépendance du calcium et de la calmoduline, responsables de la phosphorylation et de la déphosphorylation de ce domaine (protéine kinase II Ca^{2+} /CaM et la calcineurine) (Michalak et al., 1996).

Le site de liaison à la calmoduline tout comme les sites de phosphorylation sont susceptibles de moduler les interactions entre la dystrophine et les protéines associées à la dystrophine.



H1-H4 zones charnières riche en proline

Figure 13: Comparaison de la structure des différentes protéines constituant la superfamille des dystrophines: la dystrophine et les produits courts du gène DMD; les utrophines, la DRP2 et les dystrobrevines.

2.1.5. Les isoformes de la dystrophine

La Dp427 est exprimée à haut niveau dans de très nombreux tissus tels que le cerveau, les muscles cardiaque, l'œil, l'intestin, les poumons, le muscle squelettique, et plus faiblement dans le foie, les reins, thymus...

L'expression de la dystrophine est sous contrôle de trois promoteurs indépendants trouvés la première fois dans le cerveau (C), le muscle (M) et les cellules de Purkinje (P), situés en 5' du gène DMD (Feener et al., 1989 ; Nudel et al., 1989; Boyce et al., 1991). Le promoteur C est actif dans les neurones du cortex et des aires CA de l'hippocampe (Barnea et al., 1990). Le promoteur musculaire conduit à un haut niveau d'expression de la dystrophine dans les muscles squelettique, cardiaque et strié et plus faiblement dans les cellules gliales du cerveau alors que le promoteur P s'exprime dans les cellules de Purkinje mais aussi dans le muscle squelettique (Holder et al., 1996).

La séquence primaire de chacune des dystrophines présente peu de différences, car le cadre de lecture n'est pas modifié lors de la transcription de ces différents messagers. De ce fait, ces trois formes longues de la dystrophine possèdent des extensions N-terminales uniques et différent par leurs premiers exons (Gorecki et al., 1992). Ainsi, les 11 premiers acides aminés de la dystrophine musculaire sont remplacés dans la dystrophine cérébrale par trois nouveaux acides aminés.

2.2. Les produits courts du gène DMD

Des promoteurs internes ont été décrits dans la partie codant le domaine central de la dystrophine (Ahn and Kunkel, 1993; Sadoulet-Puccio and Kunkel, 1996) entraînant la production de produits courts dénommés Dp260, Dp140, Dp116, Dp71 et Dp45 (figure 13).

Ces différents produits ont été identifiés dans un premier temps dans des types cellulaires ou des tissus particuliers. Cependant des travaux de Tokarz et coll. (Tokarz et al., 1998) ont démontré que leur

expression est plus complexe : les différents transcrits du gène DMD s'expriment, à différents taux, dans une large gamme de tissus (cerveau, muscles cardiaques et squelettiques, intestin, foie, poumon, estomac...). Cette observation met en avant la complexité de la régulation de l'expression et des fonctions des différentes dystrophines.

2.2.1. La Dp260

Cette protéine de 260 kDa a été identifiée pour la première fois dans la rétine de souris où elle semble impliquée dans la neurotransmission (D'Souza et al., 1995). Elle est issue d'un transcrit de 10.5kb contenant un premier exon original épissé en phase avec l'exon 30 de la dystrophine (D'Souza et al., 1995). La séquence de la Dp260 diffère de celle de la dystrophine de 13 nouveaux aminoacides N-terminaux hydrophiles spécifiques. Elle possède une grande partie du domaine central de la dystrophine (15 séquences répétées) et toute la partie C-terminale. Elle possède donc le site ABS4 et est capable de lier l'actine.

Des analyses par RT-PCR ont permis de détecter le messenger de la Dp260 dans de nombreux tissus à des niveaux variables d'expression : le transcrit est très fortement exprimé dans le cerveau, la rétine et les intestins alors qu'il l'est nettement moins dans le foie, le muscle squelettique et le rein (D'Souza et al., 1995; Kameya et al., 1997; Howard et al., 1998b ; Tokarz et al., 1998).

Des études ont mis en relation des mutations du gène DMD autour de l'exon 50, empêchant l'expression de la Dp260, avec des altérations de la neurotransmission rétinienne (Fitzgerald et al., 1999; Pillers et al., 1999a).

2.2.2. La Dp140

La protéine de 140 kDa est issue d'un transcrit de 7,5 kb généré par un promoteur situé en amont de l'exon 45 et exprimé à des taux variables dans différents tissus et suivant le développement (Durbeej et al., 1997). Ce produit du gène DMD a été identifié en premier dans le cerveau, au niveau des bulbes

olfactifs, des leptoméniges et du parenchyme. Il est faiblement exprimé au niveau du rein, du thymus et du foie contrairement au cerveau, à l'oeil, au muscle squelettique et à l'estomac (Tokarz et al., 1998).

Le premier exon de ce transcrit est localisé dans l'intron 44 du gène DMD (Lidov et al., 1995). De plus, le site d'initiation de la traduction est localisé à la hauteur de l'exon 51, correspondant à la troisième région charnière (H3) du domaine central, entre les répétitions 19 et 20. La Dp140 possède ainsi une séquence identique à celle de la dystrophine (à partir de l'exon 51) et comprend les cinq derniers motifs répétés du domaine central de la dystrophine et la totalité de sa partie C-terminale.

2.2.3. La Dp116

Elle est issue d'un messager de 5.2 kb, généré par un promoteur localisé environ 850 paires de bases en amont de l'exon 56 du gène DMD (Byers et al., 1993). La protéine possède 15 résidus N-terminaux spécifiques de la Dp116. Le cadre de lecture n'étant pas modifié, cette protéine présente, en plus de cette séquence N-terminal, l'ensemble de la partie distale de la dystrophine à partir de la séquence répétée 22 jusqu'au domaine C-terminal.

L'expression du transcrit et de la protéine Dp116 a été rapportée dans le système nerveux périphérique et dans les cellules de Schwann en culture (Byers et al., 1993). Dans le système nerveux périphérique de l'homme et du rat, la Dp116 a été localisée en fine couche autour des fibres nerveuses myélinisées (Matsumura et al., 1993). Elle est localisée dans la membrane des cellules de Schwann, en particulier dans les nœuds de Ranvier, alors qu'elle est absente des axones entourés par ces cellules gliales (Fabrizio et al., 1995).

Son expression dans le système nerveux central est encore controversée. Il semble cependant qu'elle soit exprimée dans le cerveau (Finn and Ohlendieck, 1997) au niveau du cervelet et du cortex cérébral (Kim et al., 1992), ainsi que dans la cochlée (Dodson et al., 1995). Ces observations ont été corrélées par celles de Schofield et coll. (Schofield et al., 1994) qui ont détecté un fort taux de Dp116 dans le cerveau humain fœtal et adulte. Une étude de Tokarz et coll. (Tokarz et al., 1998) a révélé son

expression dans divers tissus comme le cerveau, le muscle cardiaque, l'oeil, l'intestin, les poumons ou encore le muscle squelettique, à des taux variables en fonction du tissu considéré.

2.2.4. La Dp71

Etant sous la dépendance d'un promoteur de type « housekeeping » situé dans l'intron 62 du gène DMD l'expression de la Dp71 est ubiquitaire (Lederfein et al., 1993). Cette protéine est codée par un messager de 6.5 kb dont le premier exon code une séquence protéique spécifique de 7 acides aminés N-terminaux (Bar et al., 1990; Lederfein et al., 1992; Lederfein et al., 1993). Un domaine de liaison à l'actine, spécifique de la Dp71 a été localisé à ce niveau (Howard et al., 1998a) lui conférant à l'image de la dystrophine, la capacité d'interagir avec l'actine. Les études d'Howard et coll. (1998b) et Claudepierre et coll. (2000b) montrent que la Dp71 est localisée près des filaments d'actine respectivement dans les cellules musculaires et les cellules gliales rétinienne en culture. De plus, la Dp71 qui contient seulement une partie du domaine WW est tout de même capable de se lier au β -dystroglycane (Rosa et al., 1996). Contrairement aux autres produits du gène DMD, la Dp71 apparaît glycosylée (Jung et al., 1993; Fabrizio et al., 1994).

La Dp71 constituerait le produit principal du gène DMD dans tous les tissus étudiés, à l'exception des tissus musculaires et du système nerveux périphérique. Protéines et transcrits se retrouvent donc dans de multiples tissus à un fort niveau d'expression : dans le système nerveux central, tant au niveau des neurones que des glias, mais aussi dans le foie, le cœur, les reins, les poumons, le pancréas, les testicules, l'estomac, (Lederfein et al., 1992; Rapaport et al., 1992; Jung et al., 1993; Lambert et al., 1993; Tokarz et al., 1998). Dans le cerveau adulte, des méthodes d'hybridation *in situ* ont permis de mettre en évidence l'expression de la Dp71 essentiellement dans le gyrus denté de l'hippocampe, et à des taux plus faibles au niveau du bulbe olfactif, de l'aire CA3 de l'hippocampe et du cortex cérébral (Gorecki and Barnard, 1995).

2.2.5. La Dp45

Tinsley et coll. (1993) ont cloné et séquencé un transcrit de 2.2kb dont la traduction conduirait à une protéine de 45 kDa. Ce transcrit a été identifié dans la plupart des tissus humains incluant le muscle, le cerveau, le foie et les poumons. Sa distribution ressemble à celle du transcrit de la Dp71 à la différence qu'il s'exprime très tôt au cours du développement. En comparant la séquence nucléotidique avec celle de la dystrophine, la séquence protéique de la Dp45 serait composée de la fin de la répétition 26, de la séquence riche en cystéines et des 48 premiers acides aminés du domaine C-terminal.

2.3. Epissages alternatifs

La région 3' du gène de la dystrophine est soumise à des épissages alternatifs générant de nombreuses isoformes exprimées de façon différentielle en fonction du tissu ou du stade de développement (Feener et al., 1989 ; Bies et al., 1992). Ces épissages n'affectent pas seulement la dystrophine mais aussi les produits courts du gène DMD tels que la Dp140 et la Dp71.

Il a été mis en évidence l'existence d'épissages alternatifs générant divers isoformes de la Dp140 dans le cerveau et les reins (Lidov and Kunkel, 1997). En particulier, la Dp140 pourrait subir l'épissage des exons 71-74 et de l'exon 78.

La Dp71 est soumise à de nombreux épissages alternatifs. Dans la partie C-terminale, l'épissage de l'exon 78 permet la traduction de l'exon 79 générant ainsi une séquence originale de 31 acides aminés qui remplace les 13 acides aminés normalement issus de l'exon 78 (Austin et al., 1995). Cette séquence spécifique est nommée founder séquence, la Dp71 épissée pour l'exon 78 est appelée Dp71f (Cisneros et al., 1996). Cette séquence de 31 acides aminés est hydrophobe contrairement à la séquence de 13 acides aminés qu'elle remplace (Lederfein et al., 1992).

De plus, des épissages des exons 71 (Austin et al., 1995), 71-74 (Austin et al., 2000; Austin et al., 2002) et 72-74 (Ceccarini et al., 1997) ont été décrits respectivement dans les tissus adultes et au cours

du développement. Chez le poisson zèbre, trois transcrits issus de l'épissage alternatif des exons 66-68, 71 et 73 s'expriment de façon tissu-spécifique dans le muscle, le cœur ou le cerveau (Bolanos-Jimenez et al., 2001).

Ces différents épissages réguleraient la liaison des dystrophines à leurs protéines membranaires associées (Crawford et al., 2000). En effet il a été observé que la région essentielle d'accrochage des syntrophines $\alpha 1$ et $\beta 1$ correspond à la séquence encodée par les exons 73 et 74 (Ahn and Kunkel, 1995; Suzuki et al., 1995).

En conclusion, dans le cadre d'études portant sur la détermination de la localisation des produits du gène DMD, il est nécessaire de souligner la difficulté suivante : la plupart des membres de la famille des dystrophines ont un patron d'expression plus large qu'initialement supposé (Tokarz et al., 1998). De plus, ces protéines ne diffèrent que par de courtes séquences spécifiques, certaines telle la Dp140 n'en possédant aucune. A ce jour il est donc impossible de disposer d'anticorps spécifiques de chacun des membres de la famille des dystrophines. La localisation cellulaire des dystrophines au sein d'un tissu doit donc s'appuyer sur plusieurs techniques complémentaires.

2.4. Les Protéines homologues de la dystrophine ou DRP (Dystrophin Related Protein)

Il existe plusieurs protéines codées à partir de gènes distincts du gène DMD mais présentant des homologies de séquences plus ou moins grandes avec la dystrophine. Ceci suggère l'existence d'un gène ancestral commun. L'ensemble de ces protéines a été regroupé dans ce que l'on a dénommé la superfamille des dystrophines et dont la phylogénie a été retracée (Roberts and Bobrow, 1998; Wang et al., 1998). Une série de duplications du gène ancestral commun, présent chez les métazoaires, aurait conduit à l'émergence des dystrobrevines et des dystrophines d'invertébrés ou « Invertebrate Dystrophine Like Protein » (IDL), puis de la DRP2 et enfin à la dystrophine et l'utrophine (figure 13).

2.4.1. L'Utrophine et ses produits courts

L'utrophine ou DRP1 (Dystrophin Related Protein 1) est une protéine de 395 kDa constituée de 3433 acides aminés, elle est issue d'un transcrit long de 13kb localisé localisé sur le chromosome 6 humain (chromosome 10 chez la souris). La structure primaire prédite possède une forte homologie de séquence avec celle de la dystrophine à travers toute sa longueur et plus spécifiquement à 80% pour les régions N- et C-terminale (Khurana et al., 1991 ; Love et al., 1991; Tinsley et al., 1992).

Comme la dystrophine, l'utrophine est capable de lier des membres du complexe de glycoprotéines associées à la dystrophine tels que les dystroglycanes, les sarcoglycanes, les syntrophines et l' α -dystrobrevine via ses domaines riches en cystéines et C-terminal (Matsumura et al., 1992a).

L'utrophine est capable d'interagir directement avec la F-actine et indirectement avec les protéines associées aux synapses comme la rapsyne et l'agrine, par l'intermédiaire du complexe dystroglycane (Campanelli et al., 1994; Gee et al., 1994; Sealock and Froehner, 1994; Sugiyama et al., 1994; Winder and Kendrick-Jones, 1995; Bartoli et al., 2001).

On retrouve également l'utrophine localisée au niveau des sites spécialisés dans les contacts cellule-cellule ou cellule-matrice extra-cellulaire. Au cours du développement, l'utrophine est localisée dans le sarcolemme puis son expression se restreint aux jonctions neuromusculaires et myotendineuses chez l'adulte (Khurana et al., 1991; Ohlendieck et al., 1991).

Tout comme pour la dystrophine, les messagers issus du gène UTRN sont transcrits à partir de plusieurs promoteurs (Dennis et al., 1996; Burton et al., 1999). Un ensemble de produits courts C-terminaux ainsi que différents schémas d'épissages ont été décrits (Blake et al., 1995b; Lumeng et al., 1999b; Wilson et al., 1999).

L'utrophine est présente dans de nombreux tissus (Love et al., 1989; Love et al., 1993). Elle est largement exprimée non seulement dans les muscles squelettiques, cardiaques (Pons et al., 1994) et lisses (Nguyen et al., 1991) mais aussi par exemple dans les cellules endothéliales vasculaire (Matsumura et al., 1993) et cellules gliales de la rétine (Claudepierre et al., 1999), les cellules de

Schwann des nerfs périphériques (Matsumura et al., 1993) et certains types cellulaires du rein (Loh et al., 2000; Raats et al., 2000).

Dans le muscle squelettique la majorité des protéines et messagers utrophine est trouvée associée avec les structures nerveuses et vasculaires (Khurana et al., 1991 ; Vater et al., 1998). Dans les fibres musculaires elles-mêmes, l'utrophine est distribuée différemment de la dystrophine, c'est-à-dire au niveau des jonctions neuromusculaires et myotendineuses (Nguyen et al., 1991; Ohlendieck et al., 1991).

A la jonction neuromusculaire, l'utrophine est trouvée dans les crêtes des replis jonctionnels, alors que la dystrophine se trouve principalement dans les creux (Bewick et al., 1992). De plus les récepteurs de l'acétylcholine sont concentrés dans les crêtes (Flucher and Daniels, 1989). Cette colocalisation des agrégats de récepteurs Ach et de l'utrophine est aussi trouvée durant le développement musculaire et les cultures de cellules musculaires (Phillips et al., 1993; Campanelli et al., 1994; Bewick et al., 1996) suggérant ainsi un rôle de cette protéine dans l'agrégation des récepteurs de l'acétylcholine et/ou leur maintien durant la différenciation de la jonction neuromusculaire.

Des souris déficientes pour l'utrophine présentent des anomalies limitées à la jonction neuromusculaire, mais pas de nécrose des fibres musculaires (Deconinck et al., 1997a; Grady et al., 1997). Les jonctions neuromusculaires sont normales à la naissance mais développent peu de plissements, peut être est-ce une conséquence du nombre réduits de récepteurs de l'acétylcholine. La fonction de la jonction neuromusculaire cependant ne semble pas être troublée, peut être est-ce dû au fait de la redondance de l'utrophine et de la dystrophine. Ces études montrent que l'utrophine est effectivement impliquée mais n'est pas essentielle à la localisation des récepteurs de l'acétylcholine ou au développement fonctionnel de la jonction neuromusculaire.

Comme pour le gène DMD il existe des produits courts du gène UTRN. Le premier produit court du gène UTRN issu d'un transcrite de 5.5 kb a été caractérisé par Blake et coll. (1995b). Il code une protéine de 113 kDa appelée G-utrophine ou Up113 qui contient les deux dernières séquences répétées du domaine central et la région C-terminale de l'utrophine. La G-utrophine est l'homologue autosomal

de la Dp116. Cette protéine s'exprime abondamment dans le cerveau adulte et dans les ganglions sensoriels au cours du développement (Blake et al., 1995b).

Deux autres produits courts ont été identifiés par Wilson et coll. (1999) et nommés Up140 et Up71 par analogie avec la Dp140 et la Dp71. Leur transcrits sont issus de promoteurs situés respectivement au niveau de l'exon 44 et 62 de l'utrophine. L'Up140 est issue d'un messager de 6.75 kb et la protéine d'environ 155 kDa correspond aux six dernières répétitions du domaine central, la partie riche en cystéines et le domaine C-terminal de l'utrophine. L'Up71 provient d'un messager de 4 kb et sa séquence protéique comprend la région riche en cystéines et la partie C-terminale de l'utrophine. Tout comme l'utrophine leur patron d'expression est très large et ces protéines s'expriment notamment dans le muscle squelettique. De plus, de la même manière que la Dp71 et la Dp140, les transcrits Up71 et Up140 peuvent subir des épissages alternatifs de l'exon 71.

2.4.2. Phénomènes compensatoires

La similarité de structure et de ligands potentiels entre la dystrophine et l'utrophine suggère que celles-ci peuvent avoir des fonctions redondantes. Cette idée est appuyée par de nombreuses études fonctionnelles utilisant des transgènes de l'utrophine. En 1993, Tinsley et coll. (1993) ont montré pour la première fois qu'une augmentation de taux de l'utrophine chez les souris mdx (déficiente pour la Dp427) restaurait les protéines du complexe associé à la dystrophine. Des études histologiques et de fonctions du muscle montrent que la pathologie serait fortement réduite (Deconinck et al., 1997b; Goudemant et al., 1998; Tinsley et al., 1998). Ces études concernent la forme longue du gène DRP ou l'utrophine. Etant donné les homologues existant entre les produits des gènes DMD et UTRN, il serait intéressant d'étudier le rôle que pourraient avoir les formes courtes du gène UTRN en l'absence des produits du gène DMD. De plus nous avons observé dans la rétine une augmentation du niveau d'expression de l'utrophine chez la souris invalidée pour la Dp71 (Daloz, Sarig et Fort, 2003).

2.4.3. La DRP2

La DRP2 est un autre membre de la famille des « dystrophin-related protein » qui n'est pas exprimée dans les muscles squelettiques et cardiaques (Roberts et al., 1996). Cette protéine est issue d'un gène localisé en Xp22 et présente une taille et une composition similaire à la dystrophine Dp116 (Byers et al., 1993). Elle est exprimée dans le cerveau où elle est associée avec les densités post-synaptiques et les neurones cholinergiques (Roberts and Sheng, 2000) mais aussi au niveau de la rétine, des reins, des dents, de l'œsophage ou encore des ovaires (Dixon et al., 1997).

Sa séquence protéique comporte un domaine N-terminal riche en prolines, deux répétitions du domaine central de la dystrophine, et des sites de liaison aux β -dystroglycane, syntrophine et dystrobrevine. Il est donc envisageable que la DRP2 ait des fonctions similaires à celles de la dystrophine. De plus, Roberts et Sheng (2000) ont montré que la DRP2 est associée avec les membranes fortement enrichies en fractions PSD (post-synaptic densities) dans le cerveau.

La DRP2 s'accroche directement à la L-periaxine une protéine contenant un domaine PDZ et exprimée dans les nerfs périphériques (Gillespie et al., 1994). La perte de la L-periaxine chez des souris déficientes entraîne une réduction sélective de la DRP2 et une rupture du complexe DRP2-dystroglycane, ces souris présentent de sévères neuropathies démyélinisantes (Gillespie et al., 2000; Sherman et al., 2001).

2.4.4. Les dystrobrevines

Les dystrobrevines forment une sous-famille qui partagent des homologies de séquence variables avec les autres membres de la superfamille des dystrophines (figure 13).

La dystrobrevine a été initialement identifiée comme étant une protéine de 87 kDa associée au récepteur de l'acétylcholine dans l'organe électrique du poisson *Torpedo* (Carr et al., 1989). Ces études ont montré que cette protéine est copurifiée avec le récepteur de l'acétylcholine et était enrichie à la jonction neuromusculaire mais aussi trouvée dans le sarcolemme (Wagner et al., 1993). Le

clonage de l'orthologue *Torpedo* de la dystrobrevine a montré que la dystrobrevine présente des homologies de séquences avec le domaine C-terminal de la dystrophine (Wagner et al., 1993). Cette famille de protéine est encodée par deux gènes différents.

Le gène de l' α -dystrobrevine est localisé sur le chromosome 18 chez l'homme et la souris (Blake et al., 1996; Sadoulet-Puccio et al., 1996). La complexité des isoformes de l' α -dystrobrevine est reflétée par l'existence de trois promoteurs (Holzfeind et al., 1999). De plus, contrairement au poisson torpille où seul un messager de 4.6 kb est détecté, le clonage de la dystrobrevine a révélé de multiples transcrits chez l'homme et la souris résultant au total en six isoformes nommées α -dystrobrevine1, 2a, 2b, 3, 4 et 5 issues d'épissages alternatifs tissus-sélectifs (Blake et al., 1996; Ambrose et al., 1997). Ces messagers sont exprimés dans le muscle squelettique, le cœur, le cerveau et le foie chez la souris ainsi que chez l'homme (Enigk and Maimone, 1999).

L' α -dystrobrevine possède des domaines riches en cystéine (poignées EF) contenant deux motifs capables de lier le calcium, un domaine en doigt de zinc (ZZ) pouvant lier la calmoduline, un domaine de liaison aux syntrophines suivi d'un domaine contenant deux hélices α (H1 et H2). La partie C-terminale de l' α -dystrobrevine est spécifique et baptisée DUR (Dystrobrevin Unique Region), et contient quatre sites de phosphorylation. (Wagner et al., 1993; Balasubramanian et al., 1998).

Les isoformes, α -dystrobrevine 1 et 2 ont été trouvées concentrées à la jonction neuromusculaire (Nawrotzki et al., 1998; Peters et al., 1998; Newey et al., 2001). L' α -dystrobrevine 1 peut interagir avec la dystrophine via leurs hélices H1 respectives (Sadoulet-Puccio et al., 1997) de même qu'avec l'utrophine *in vivo* (Nawrotzki et al., 1998). En revanche, si l' α -dystrobrevine 2a possède les mêmes domaines que l' α -dystrobrevine 1, cette protéine interagit avec la dystrophine mais pas avec l'utrophine (Balasubramanian et al., 1998; Nawrotzki et al., 1998; Peters et al., 1998; Newey et al., 2001). L' α -dystrobrevine 3 est clairement un composant des muscles squelettique et cardiaque mais sa localisation n'est pas définie.

Des expériences plus récentes suggèrent l'existence d'interactions entre l' α -dystrobrevine et le β -dystroglycane de même qu'avec le complexe sarcoglycane (via la région N-terminale des dystrobrevines) (Chung and Campanelli, 1999; Yoshida et al., 2000).

L'analyse des souris déficientes pour l' α -dystrobrevine a permis de mettre en évidence un rôle fonctionnel de cette protéine au cours de la synaptogénèse de la fibre musculaire squelettique. L' α -dystrobrevine 1 interviendrait dans la pathogénèse des dystrophies musculaires probablement dû à son rôle dans la stabilisation des agrégats des récepteurs de l'Ach à la jonction neuromusculaire (Grady et al., 1999; Grady et al., 2000). De plus, ces travaux montrent qu'en absence de l' α -dystrobrevine, l'expression des syntrophines et de la nNOS (neuronal nitric oxyde synthase) diminue suggérant un rôle de l' α -dystrobrevine dans l'ancrage de ces deux protéines à la face cytoplasmique de la membrane post-synaptique. Toutes ces études suggèrent que l' α -dystrobrevine peut être impliquée dans des fonctions de signalisation et de maturation de l'appareil post-synaptique.

La β -dystrobrevine qui est encodée par un gène localisé chez l'homme sur le chromosome 2 (souris 12) présente de nombreux épissages alternatifs en C-terminal (Peters et al., 1997b). D'une masse apparente de 69 kDa, la séquence protéique de la β -dystrobrevine comprend une séquence EF, un domaine d'interaction protéine-protéine ZZ avant la région C-terminale qui apparaît tronquée par rapport à l' α -dystrobrevine (90 acides aminés au lieu de 180 chez α -dystrobrevine 1 par exemple) (Peters et al., 1997b). La β -dystrobrevine est essentiellement détectée dans le cerveau ainsi que dans les poumons, le foie et les reins mais absente des tissus musculaires contrairement à l' α -dystrobrevine. La β -dystrobrevine est capable de s'associer directement avec la dystrophine et des produits courts du gène DMD comme la Dp140 et la Dp71, ainsi qu'avec les syntrophines (Ahn et al., 1996 ; Sadoulet-Puccio et al., 1997). De récents travaux de Loh et coll. (2001) ont mis en évidence un rôle de la β -dystrobrevine dans l'ancrage de protéines à la membrane basale des reins et du foie. En effet, chez les souris invalidées pour la β -dystrobrevine, ces auteurs observent une diminution de l'expression de la Dp71 et des syntrophines dans ces tissus. La β -dystrobrevine pourrait donc jouer un rôle dans la

localisation de molécules de signalisation mais sans pour autant intervenir dans la fonction ou la morphologie de ces tissus.

2.5. Expression des produits de la superfamille des dystrophines et des protéines associées dans des espèces inférieures

Chez les mammifères, les études sur la fonction des dystrophines et protéines associées sont difficile à mener du fait des nombreuses isoformes et des duplications de gènes au cours de l'évolution. La dystrophine est très proche de l'utrophine et DRP2 (Love et al., 1989; Tinsley et al., 1992), dont les rôles recouvrent partiellement celui de la dystrophine (Tinsley et al., 1996). Des comparaisons de séquences réalisées chez de nombreuses espèces vertébrées et invertébrées suggèrent que les gènes de la dystrophine et de l'utrophine ont été séparés par duplication durant l'évolution précoce des vertébrés (Roberts and Bobrow, 1998; Wang et al., 1998).

Roberts et Bobrow (1998), par la technique de PRC en utilisant des oligonucléotides redondants, ont cloné des fragments de la région 3' terminale des messagers des protéines DRP de nombreux organismes. Ces observations suggèrent ainsi l'existence largement répandue de ces protéines chez les invertébrés. Chez *Caenorhabditis elegans*, le gène *dys-1* a été caractérisé (Bessou et al., 1998) de même que le gène *dyb-1* codant pour la dystrobrevine (Gieseler et al., 1999b; Gieseler et al., 1999a; Gieseler et al., 2001). Les protéines contiennent les mêmes caractéristiques structurales que leurs homologues mammifères, suggérant que leurs fonctions physiologiques et leurs partenaires sont conservés à travers l'évolution. Le génome de *C. elegans* contient plusieurs gènes codant pour des protéines du complexe associé à la dystrophine : un gène dystroglycane, un gène δ/γ -sarcoglycane, un gène α/β -syntrophine (Grisoni et al., 2002). Des protéines ressemblent faiblement à l' α et au β -sarcoglycanes, et aucun gène sarcospane n'a été trouvé. Trois des protéines du complexe associé à la dystrophine sont hautement conservées : la syntrophine, la dystrobrevine, et les δ/γ -sarcoglycanes. De plus, l'inactivation partielle de ces gènes conduit à des phénotypes similaires aux mutations

dystrophine chez l'animal (Grisoni et al., 2002). Ces données confirment la validité de *C. elegans* comme modèle animal pour étudier la fonction des dystrophines et les mécanismes conduisant à la dégénérescence musculaire.

Les complexes glycoprotéiques chez *C. elegans* et la drosophile sont probablement de nature similaire, depuis qu'une composition similaire a été rapporté chez la drosophile (Greener and Roberts, 2000).

Le gène dmDLP (*drosophila melanogaster* Dystrophin Like Protein) chez la Drosophile tout comme le gène DMD chez l'homme présente une structure complexe. Il code au moins trois isoformes de la protéine de grande taille dystrophine-like (dmDLP1, dmDLP2, et dmDLP3), et au moins un produit plus petit (dmDp186), régulé par un promoteur interne (Neuman et al., 2001).

Dans l'oursin, Wang et coll., (1998) ont cloné un messenger codant une protéine de 98kDa (suDp98) présentant un haut degré d'identité de séquence en acides aminés avec la région C-terminale de la dystrophine et de l'utrophine. Cette protéine serait un homologue de la Dp116 humaine. De plus, le gène coderait pour une plus grande protéine, dystrophine-like suDLP. Cette protéine de 448kDa contient les quatre domaines de la dystrophine : le domaine d'accrochage à l'actine, 25 répétitions spectrine-like, une région riche en cystéine et un domaine C-terminal (Neuman et al., 2001).

Chez le poisson zèbre, nous avons pu mettre en évidence l'expression de la Dp427 et de la Dp71 (Bolanos-Jimenez et al., 2001).

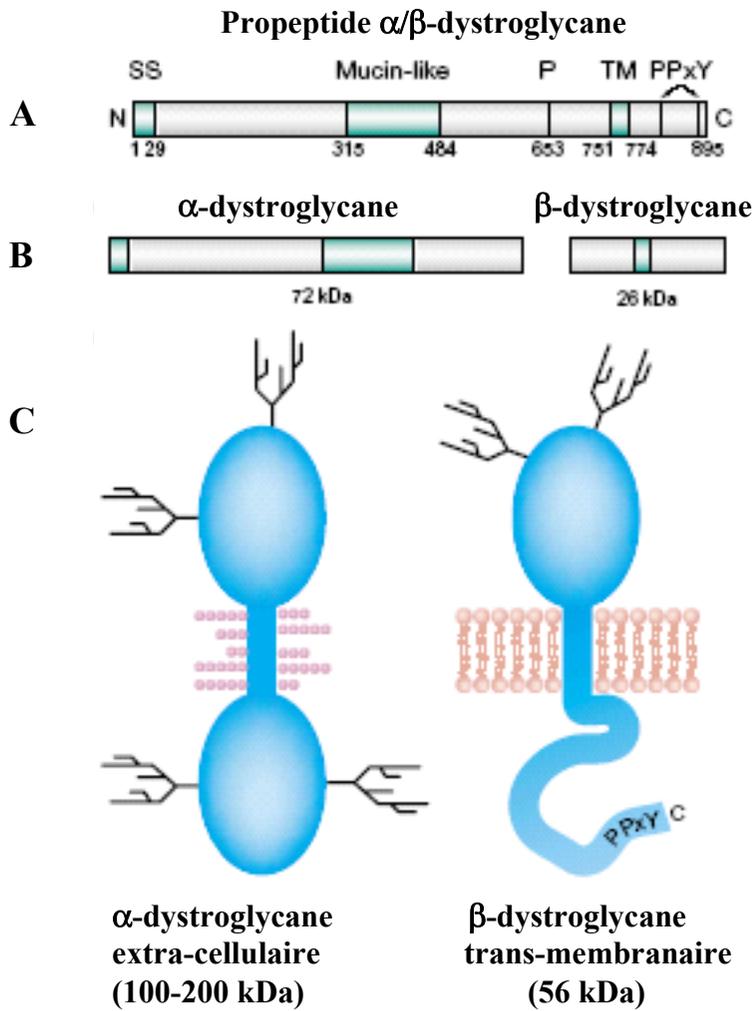


Figure 14: Représentation schématique de la synthèse des protéines du complexe dystroglycane. D'après Winder et coll., 2001. (A) Propeptide. (B) après clivage. (C) Maturation posttranslationnelle

3. Les protéines associées aux dystrophines

Les protéines associées à la dystrophine (DAPs : Dystrophin Associated Proteins) interagissent entre elles afin de constituer un complexe protéique dit d'échafaudage. Ce complexe traverse la membrane et lie le cytosquelette d'actine à la lame basale du muscle. Yoshida et coll. (1994) ont montré que le complexe de protéines associées à la dystrophine pouvait être dissocié en trois complexes distincts basés sur leur localisation à l'intérieur de la cellule et leur association physique entre eux : le complexe dystroglycane, le complexe sarcoglycane-sarcospane et le complexe cytoplasmique composé des dystrobrevines et syntrophines (Campbell and Kahl, 1989; Ervasti et al., 1990; Yoshida and Ozawa, 1990 ; Blake and Kroger, 2000).

3.1. Le complexe dystroglycane

Le dystroglycane est le premier composant du complexe protéique à avoir été cloné (Ibraghimov-Beskrovnaya et al., 1992). Les deux sous-unités du dystroglycane, l' α -dystroglycane et le β -dystroglycane respectivement 156 et 43 kDa sont générés par clivage post-translational de la proprotéine de 97 kDa, qui est codée par un seul gène (Ibraghimov-Beskrovnaya et al., 1993) (figure 14). L' α -dystroglycane est largement exprimé et considéré fortement glycosylé, mais son schéma de glycosylation varie d'une manière spécifique du tissu et suivant le développement (Henry and Campbell, 1999; Leschziner et al., 2000). Ces glycosylations semblent être essentielles au positionnement de ces protéines à travers la membrane plasmique et au niveau de la matrice extra-cellulaire, à leur fonction ainsi qu'à leur capacité de lier d'autres protéines. Les dystroglycanes sont également soumis à d'autres modulations telles que des phosphorylations (James et al., 2000).

Les dystroglycanes sont associés à la membrane cellulaire de la manière suivante : l' α -dystroglycane, protéine extra-cellulaire se lie de manière non covalente à la portion extra-cellulaire du β -dystroglycane, protéine transmembranaire (Ervasti and Campbell, 1991) afin de former un complexe

unique dans de nombreux tissus (Ibraghimov-Beskrovnaya et al., 1993; Campanelli et al., 1994 ; Yoshida et al., 1994).

Les dystroglycanes sont exprimés dans de nombreux tissus adultes comme les muscles squelettiques et cardiaques, le foie, les poumons, les systèmes nerveux périphérique et central (Yamada et al., 1994; Durbeej et al., 1995; Tian et al., 1996).

Il a été mis en évidence le rôle essentiel des dystroglycanes dans l'embryogenèse, en particulier lors de la mise en place de la membrane de Reichert (Williamson et al., 1997). De même, les dystroglycanes semblent être important lors de la morphogénèse épithéliale dans le rein (Durbeej et al., 1995), dans les processus d'adhésion cellulaire (Matsumura et al., 1997b) et de myélinisation (Matsumura et al., 1997a), ainsi que dans la synaptogénèse (Meier et al., 1997; Jacobson et al., 1998).

Les interactions moléculaires des dystroglycanes sont nombreuses et variées. L' α -dystroglycane interagit de manière dépendante du Ca^{2+} aux domaines laminine G des lamines (chaînes $\alpha 1$ et $\alpha 2$) (Ibraghimov-Beskrovnaya et al., 1992; Sunada et al., 1994) et perlécane (Talts et al., 1999) avec des affinités différentes. L' α -dystroglycane est un récepteur fonctionnel de l'agrine une glycoprotéine sécrétée dans la lame basale de la jonction neuromusculaire (Campanelli et al., 1994; Gee et al., 1994). Cependant la délétion du site de fixation de l' α -dystroglycane sur l'agrine n'a pas d'effets sur l'agrégation des récepteurs Ach induite par l'agrine.

Des travaux de Campanelli et coll. (1994) ont montré que les composants du complexe DPC, incluant l'utrophine et α -sarcoglycane sont recrutés pour l'agrégation des récepteurs après l'induction de l'agrine. Ces observations suggèrent qu'au moment de la synaptogénèse le complexe stabiliserait les agrégats de récepteurs de l'Ach plutôt que de promouvoir l'agrégation de ces récepteurs (Jacobson et al., 2001).

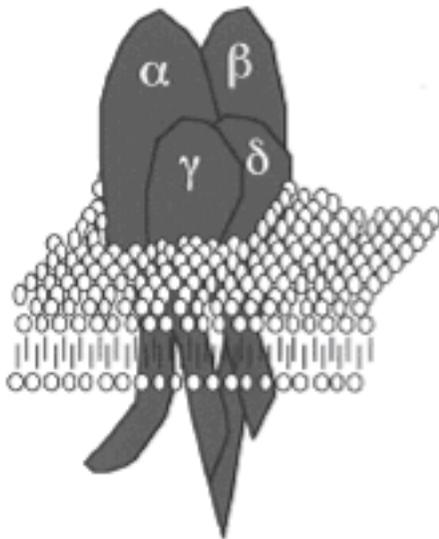
Du côté intra-cellulaire, la liaison avec des éléments cytoplasmiques s'effectue par l'intermédiaire de l'extrémité C-terminale du β -dystroglycane. Les 15 derniers acides aminés du β -dystroglycane semblent se fixer à la région riche en cystéine de la dystrophine. Huang et coll. (2000) ont déterminé la

structure cristal du β -dystroglycane se fixant à la dystrophine et ont montré que le dystroglycane forme des contacts avec à la fois le domaine WW et le domaine des poignées EF de la dystrophine d'où l'importance fonctionnelle de ces domaines dans la familles des dystrophines. Hormis avec la Dp427, le β -dystroglycane est également capable d'interagir avec plusieurs dystrophines telles que la Dp260 (Jung et al., 1995), la Dp116 dans les cellules de Schwann du système nerveux périphérique (Saito et al., 1999), la Dp71 dans la rétine (Claudepierre et al., 2000a) ou le cerveau (Greenberg et al., 1996) et avec l'utrophine (Imamura et al., 2000). En dehors des dystrophines (Chan et al., 1998) ont montré que le β -dystroglycane est associé directement au δ -sarcoglycane.

Le C-terminal du β -dystroglycane fixe aussi une protéine adaptatrice Grb2 (Yang et al., 1995b). Cette interaction est médiée par le domaine SH3 de Grb2 qui fixe la séquence riche en proline de la queue cytoplasmique du β -dystroglycane. Cette interaction favorise l'hypothèse d'une participation du β -dystroglycane à la transduction d'un signal extra-cellulaire vers le cytosquelette du muscle. Des études *in vitro* montrent que la dystrophine inhibe les interactions entre Grb2 et β -dystroglycane. De plus, Grb2 régulerait les interactions dynamiques entre le β -dystroglycane et le complexe de protéines associées à la dystrophine (Russo et al., 2000).

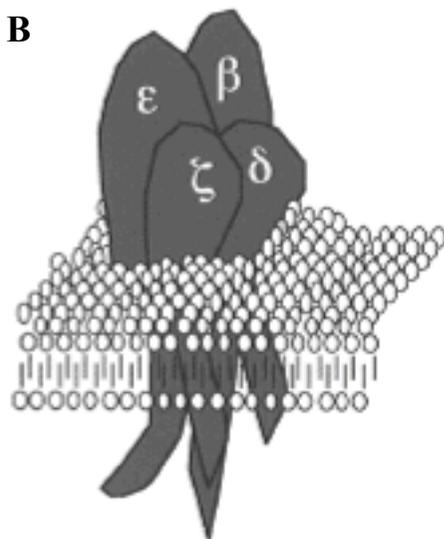
Récemment Sotgia et coll., (2000) ont décrit l'interaction de la cavéoline 3 avec le β -dystroglycane . Les cavéolines sont une famille de protéines transmembranaires qui forment des microdomaines dans la membrane plasmique et sont capables de recruter différentes molécules de signalisation. La cavéoline 3 et la dystrophine apparaissent être en compétition pour le même site d'accrochage du C-terminal du β -dystroglycane qui inclus le tétra-peptide PPPY. La surexpression de la cavéoline 3 dans le muscle cause aussi des dystrophies musculaires associées à une réduction du niveau d'expression de la dystrophine et du β -dystroglycane (Galbiati et al., 2000). En plus de la cavéoline 3 et de Grb2, la rapsyne (Cartaud et al., 1998), protéine essentielle à la formation de la jonction neuromusculaire fixe aussi le β -dystroglycane. Cette interaction a des implications importantes pour le rôle à la fois de l' α - et du β -dystroglycane dans la formation de la jonction neuromusculaire.

A



cardiac and skeletal muscle
sarcoglycan complex

B



smooth muscle
sarcoglycan complex

Figure 15: Représentation des complexes sarcoglycane à la membrane de la fibre musculaire.
(A) Complexe sarcoglycane dans le muscle squelettique et cardiaque.
(B) Complexe sarcoglycane dans le muscle lisse.

Pathologies liées aux dystroglycanes

Le complexe dystroglycane est la première structure capable d'attacher le cytosquelette à la matrice extracellulaire du muscle squelettique, et des ruptures de ce lien sont connues pour causer de nombreuses dystrophies musculaires (Campbell, 1995). Une modification post-translationnelle altérée de l' α -dystroglycane causerait des dystrophies musculaires, bien que le mécanisme ne soit toujours pas élucidé. En effet, Kano et coll. (2002) observent une perte de l'expression de l' α -dystroglycane chez les patients MEB (Muscle-eye-brain disease) alors que le niveau d'expression du β -dystroglycane reste normal. La MEB est un trouble récessif autosomal caractérisé par une dystrophie musculaire, des anomalies oculaires et une malformation cérébrale. Cependant, la MEB serait due à un défaut d'une enzyme de glycosylation plutôt qu'au complexe lui-même suggérant que la glycosylation anormale de l' α -dystroglycane serait à la base d'un nouveau mécanisme pathogène pour quelques dystrophies musculaires.

3.2. Le complexe sarcoglycane

Les sarcoglycanes, six protéines transmembranaires, chacune issue d'un gène différent, sont toutes présentes au niveau du muscle strié squelettique et cardiaque. Cependant, si l'expression de l' α -sarcoglycane serait uniquement restreinte à ces tissus (Yamamoto et al., 1994) il semblerait que les autres sarcoglycanes aient une expression plus large, incluant notamment le SNC (Jung et al., 1996b; Nigro et al., 1996) dont la rétine (Claudepierre et al., 1999). L' ϵ -sarcoglycane quant à lui possède une expression très ubiquitaire qui comprend également le SNC (Ettinger et al., 1997) (figure 15).

3.2.1. L' α -sarcoglycane

L' α -sarcoglycane, est issu d'un transcrite de 1,5 kb, codé par un gène situé en 17q21. Cette protéine d'une masse moléculaire apparente de 50 kDa est également appelée adhaline ou 50 DAG. (Roberds et

al., 1993a; McNally et al., 1994). La séquence protéique comprend une séquence signal N-terminale, un domaine transmembranaire et une extrémité C-terminale cytoplasmique. Deux sites de glycosylation ont été identifiés. De plus, à la suite d'un épissage alternatif une protéine de 35 kDa ayant perdu sa région transmembranaire ainsi qu'une partie de sa région extracellulaire est produite (McNally et al., 1994).

3.2.2. Le β -sarcoglycane

Le β -sarcoglycane est une protéine transmembranaire de 43kDa qui provient d'un transcrit de 4,5 kb, dont le gène est localisé en 4q12 (Lim et al., 1995). La séquence est constituée d'une région N-terminale cytoplasmique largement hydrophobe, un seul site transmembranaire. Trois sites de glycosylation ont été répertoriés pour cette protéine.

3.2.3. Le γ -sarcoglycane

Le γ -sarcoglycane ou 35 DAG est issu d'un transcrit de 1,7 kb, codé par un gène en 13q12 (Noguchi et al., 1995). Ce sarcoglycane d'une masse moléculaire apparente de 35 kDa possède 69% d'homologie de séquence protéique avec le β -sarcoglycane. La position des résidus cystéine est fortement conservée entre ces deux protéines (McNally et al., 1996a).

3.2.4. Le δ -sarcoglycane

Le δ -sarcoglycane, ayant également une masse moléculaire apparente de 35 kDa provient d'un transcrit de 8 kb dont le gène a été localisé en 5q33. Sa séquence protéique présente 67% d'acides aminés similaires à celle du γ -sarcoglycane (Noguchi et al., 1995; Jung et al., 1996b). Certains auteurs ont suggéré que les gènes des δ - et γ -sarcoglycanes seraient issus d'un phénomène de duplication étant

donné qu'ils comportent le même nombre d'exons et du fait de l'homologie des protéines (Nigro et al., 1996).

3.2.5. L' ϵ -sarcoglycane

L' ϵ -sarcoglycane est une glycoprotéine transmembranaire de 45 kDa issue d'un transcrite de 1.8kb dont le gène se situe sur le chromosome 7 (position 7q21) (Ettinger et al., 1997). L' ϵ -sarcoglycane partage une forte homologie de séquence aux niveaux génomique et protéique (62%) avec l' α -sarcoglycane. La protéine comporte une séquence N-terminale, un domaine transmembranaire et une région C-terminale cytoplasmique, cette dernière étant susceptible de varier en raison d'un épissage alternatif (McNally et al., 1998). L' ϵ -sarcoglycane participerait à un nouveau type de complexe sarcoglycane, en remplaçant l' α -sarcoglycane dans le complexe sarcoglycane-sarcospane dans le muscle lisse (Straub et al., 1999).

3.2.6. Le ζ -sarcoglycane

Le ζ -sarcoglycane est le dernier élément de la famille à avoir été identifié (Wheeler et al., 2002). Il présente une masse moléculaire apparente d'environ 40 kDa et est issu d'un gène localisé sur le chromosome 8 (position 8p22) chez l'homme. Ce sarcoglycane présente 57% et 55.7% d'acides aminés similaires avec le δ -sarcoglycane et le γ -sarcoglycane respectivement.

3.2.7. Interactions et fonctions des sarcoglycanes

L' α -sarcoglycane est une protéine transmembranaire de type I (N-terminal du côté extracellulaire) tandis que les β -, δ - et γ -sarcoglycanes sont de type II (N-terminal du côté intracellulaire). La distribution de l' α -sarcoglycane semble être restreinte aux muscles squelettique et cardiaque, alors que β - et δ -sarcoglycane sont aussi exprimés par le muscle lisse (Roberds et al., 1993b; Jung et al., 1996a;

Straub et al., 1999; Barresi et al., 2000). L'association étroite des sarcoglycanes transmembranaires (Koenig et al., 1989) suggère qu'ils fonctionneraient comme une unité unique dans le muscle (Yoshida et al., 1994). L' α -sarcoglycane lie ainsi la séquence riche en cystéines de la dystrophine et l' α -syntrophine (Madhavan and Jarrett, 1995). Des associations γ -sarcoglycane-dystrophine, ζ -sarcoglycane-dystrophine ainsi que sarcoglycane-intégrines ont également été suggérées (Vainzof et al., 1996). De plus, les α -, β - et δ -sarcoglycanes semblent étroitement liés entre eux (Vainzof et al., 1996). Alors que des études *in vitro* utilisant des myotubes suggèrent que β -, γ - et δ -sarcoglycanes seraient étroitement liés avec un autre que l' α -sarcoglycane et que δ -sarcoglycane interagirait fortement avec le dystroglycane (Chan et al., 1998).

Ainsi, l'interaction entre les sarcoglycanes, le β -dystroglycane et des éléments de la MEC a permis à Matsumura et coll. (1999) de suggérer que le complexe sarcoglycane est un élément stabilisateur du complexe associé à la dystrophine.

Certains sarcoglycanes possèdent un domaine EGF à leur extrémité carboxy-terminale pouvant se lier à d'éventuels ligands (McNally et al., 1996b). Des études montrent également que les sarcoglycanes peuvent être impliqués dans la régulation et la signalisation des intégrines au niveau du muscle strié (Yoshida et al., 1998). De plus, un domaine ATPase a été identifié chez l' α -sarcoglycane (Betto et al., 1999) suggérant que cette protéine pourrait intervenir dans la concentration d'ATP extra-cellulaire.

La séquence des sarcoglycanes fournit peu d'informations sur leur rôle fonctionnel dans le muscle. Les γ - et δ -sarcoglycanes sont des paralogues, on peut donc supposer que chaque protéine pourrait avoir une fonction similaire. Plusieurs études sur la fonction des sarcoglycanes suggèrent qu'ils joueraient un rôle dans la transduction d'un signal intracellulaire. Des études de doubles hybrides ont identifié la filamine-2 comme étant une protéine interagissant avec le γ - et le δ -sarcoglycane (Thompson et al., 2000). Les membres de la famille des filamines sont impliqués dans la réorganisation de l'actine et des cascades de transduction du signal associés à la migration cellulaire, l'adhésion, la différenciation et la survie (Liu et al., 2000; Walsh and Goffinet, 2000). L'identification de la filamine comme une

protéine interagissant avec les sarcoglycanes est en faveur du concept que le complexe glycoprotéique ne fonctionne pas seulement comme un support structural mais plutôt que ce complexe a un rôle de signal dans le maintien de l'intégrité du muscle squelettique.

3.2.8. Pathologies liées aux sarcoglycanes

Le déficit d'une des quatre sous-unités sarcoglycanes (α , β , δ et γ) conduit à une importante réduction ou à l'absence de la totalité du complexe sarcoglycane à la membrane des cellules du muscle strié (Duclos et al., 1998; Hack et al., 1998; Araishi et al., 1999; Coral-Vazquez et al., 1999; Liu and Engvall, 1999; Imamura et al., 2000).

Des premières observations ont montré que l' α - et le γ -sarcoglycane étaient spécifiquement absents chez des enfants atteints de dystrophie musculaire autosomale récessive (Matsumura et al., 1992b; Passos-Bueno et al., 1993; Mizuno et al., 1994). Il est maintenant clairement établi que des mutations touchant chacun des gènes codant les sarcoglycanes (hormis l' ε -sarcoglycane) sont à l'origine des dystrophies musculaires des ceintures de type 2 (ou LMGD type 2 pour « limb-girdle muscular dystrophy type 2 »), chaque maladie (LMGD type 2C à 2F) correspond à une mutation sur un gène codant un sarcoglycane en particulier.

Les études portant sur des modèles animaux de dystrophies et de sarcoglycanopathies ont permis d'émettre des hypothèses fonctionnelles quant aux rôles des sarcoglycanes. La perte de la dystrophine dans la fibre musculaire squelettique entraîne une sévère réduction du complexe sarcoglycane chez les patients DMD et les souris *mdx*.

3.3. Le sarcospane

Cette petite protéine de 25 kDa est distincte des dystroglycanes et sarcoglycanes. Contrairement à ces derniers, le sarcospane est constitué d'extrémités N- et C-terminales intracellulaires et comprend

quatre domaines transmembranaires, rendant le sarcospane structurellement analogue aux protéines de la famille tétraspanes (Crosbie et al., 1997). Cette protéine est issue d'un transcrit de 6,5 kb, spécifique des muscles striés squelettiques et cardiaques dont le gène est localisé sur le chromosome 12 (position 12p11.2). Un deuxième transcrit de 4.5 kb s'exprime notamment au niveau des muscles striés, du thymus et des intestins, mais pas au niveau du cerveau (Crosbie et al., 1997).

De plus, le sarcospane précipite avec le complexe de glycoprotéines associées à la dystrophine et son expression semble dépendante de celle du complexe sarcoglycane (Crosbie et al., 1999). Cependant, sa fonction précise reste encore à établir.

3.4. Le complexe syntrophine

La syntrophine a été observée pour la première fois au niveau des membranes postsynaptiques des organes électriques du poisson torpille *Torpedo* (Froehner, 1984; Froehner et al., 1987). Des expériences d'électrophorèse sur gel bi-dimensionnel ont ensuite montré qu'il s'agissait d'un triplet de protéines pouvant être séparées en fonction de leur point isoélectrique en trois isoformes : l' α 1-syntrophine légèrement acide, et les β 1- et β 2-syntrophines, basiques (Adams et al., 1993; Ahn et al., 1996). Ces trois protéines issues de gènes différents mais ayant une séquence protéique comparable, possèdent une masse moléculaire apparente de 59 kDa et partagent 50% d'identité de séquence. Elles possèdent deux domaines plectine (PH1 et PH2) caractéristiques des protéines de signalisation, un domaine PDZ retrouvé dans les protéines PSD (Post Synaptic Density protein) servant aux interactions protéine-protéine (Morais Cabral et al., 1996) et enfin un domaine C-terminal de 56 amino acides hautement conservé, spécifique aux syntrophines et nommé domaine SU (Peters et al., 1997a). Des possibilités de phosphorylation par la CaM kinase II ont été mises en évidence *in vitro* et *in vivo* (Hasegawa et al., 1999; Madhavan and Jarrett, 1999). Actuellement, la famille des syntrophines est composée de 5 membres, α -syntrophine, β 1- et β 2-syntrophine et γ 1- et γ 2-syntrophine (Adams et al.,

1993; Ahn et al., 1994; Ahn et al., 1996; Piluso et al., 2000). Les syntrophines sont distribuées de façon différentielle dans le muscle et interagissent directement avec la dystrophine et la dystrobrevine.

3.4.1. L' α 1-syntrophine

L' α 1-syntrophine est le produit d'un transcrite de 2,1 kb issu d'un gène localisé en 20q11 (Adams et al., 1993). L' α -syntrophine est présente dans le sarcolemme des fibres des muscles squelettique et strié mais aussi dans le muscle cardiaque et le rein.

3.4.2. La β 1-syntrophine

La β 1-syntrophine est exprimée de façon ubiquitaire (cerveau, muscles striés, foie, rein, pancréas ...). Le gène de la β 1-syntrophine est localisé en 8q23 et produit deux messagers de 5.8 ou 1.5 kb. Ce dernier est exprimé surtout dans le foie, à taux plus modéré dans le muscle squelettique et les reins, et très faiblement dans le muscle cardiaque (Ahn et al., 1994).

3.4.3. La β 2-syntrophine

La β 2-syntrophine est le produit d'un gène localisé en 16q23 dont les messagers (10.5 ou 2 kb) sont exprimés dans de nombreux tissus (Adams et al., 1993).

Les β 1- et β 2-syntrophines ont été identifiées dans de nombreux tissus dont le muscle squelettique où leur localisation semble différer : la β 1-syntrophine est concentrée au niveau du sarcolemme avec l' α 1-syntrophine alors que l'expression de la β 2-syntrophine semble restreinte à la jonction neuromusculaire (Adams et al., 1993; Peters et al., 1994; Ahn et al., 1996; Peters et al., 1997a; Kramarcy and Sealock, 2000). L' α 1-syntrophine est également localisée dans le système nerveux central, dans le cerveau et dans les cellules gliales de Müller de la rétine (Gorecki et al., 1997; Claudepierre et al., 1999).

3.4.4. les γ 1- et γ 2-syntrophines

Plus récemment, les γ 1- et γ 2-syntrophines ont été mises en évidence. Elles sont issues de gènes différents localisés respectivement sur les chromosomes humains 8 (8q11) et 2 (2p25). L'expression de la γ 1-syntrophine semble restreinte au système nerveux central alors que la γ 2-syntrophine est identifiée dans divers tissus (muscles, foie, rein). Des épissages alternatifs seraient à l'origine de plusieurs isoformes de ces protéines (Piluso et al., 2000).

3.4.5. Capacité d'interactions des syntrophines

Les syntrophines sont potentiellement impliquées dans de nombreuses fonctions cellulaires et pourraient être considérées comme des protéines adaptatrices qui lient les protéines associées à la membrane au complexe glycoprotéique associée à la dystrophine. Récemment il a été montré la présence de deux sites de fixation pour les syntrophines dans la partie C-terminale de la dystrophine de même que deux sites sur l' α -dystrobrevine (Newey et al., 2000). Ces sites sont formés par deux hélices alpha adjacentes.

Plusieurs études ont montré que les syntrophines avaient la capacité d'interagir via leurs domaines PH2 et SU avec les protéines de la superfamille des dystrophines comme la Dp427, la Dp71, l'utrophine ou les dystrobrevines (Kramarcy et al., 1994; Ahn and Kunkel, 1995; Dwyer and Froehner, 1995; Suzuki et al., 1995; Yang et al., 1995a; Peters et al., 1997a; Claudepierre et al., 2000a). Cependant, si toutes les syntrophines ont la potentialité de lier les membres de la superfamille des dystrophines *in vitro* (Ahn and Kunkel, 1995; Ahn et al., 1996), leurs localisations respectives *in vivo* suggèrent que des interactions préférentielles existent. En effet, dans la fibre musculaire squelettique, l' α 1-syntrophine est localisée au niveau du sarcolemme tout comme la dystrophine alors que la jonction neuromusculaire est enrichie en β 2-syntrophine et utrophine. Des interactions entre syntrophines et α -sarcoglycane ont également été mises en évidence (Madhavan and Jarrett, 1995).

Les syntrophines fixent de nombreuses protéines dans le muscle et le cerveau. Plusieurs de ces interactions utilisent les domaines PDZ des syntrophines et la queue C-terminale de protéines transmembranaires. Dans le muscle squelettique, l'interaction entre nNOS et l' α -syntrophine est médiée par un doigt β -hairpin de nNOS s'accrochant au domaine PDZ de l' α -syntrophine (Adams et al., 1993; Brenman et al., 1996; Hillier et al., 1999; Tochio et al., 1999; Adams et al., 2001). Une réduction du niveau de nNOS associé à la membrane est observée chez les patients DMD et BMD et la souris *mdx* (Chao et al., 1996).

En plus de nNOS, un canal aqueux, l'aquaporine 4 (AQP4) est aussi sous dépendance de l' α -syntrophine pour sa localisation au niveau du sarcolemme. En effet, l'aquaporine 4 est absente du sarcolemme quand l' α -syntrophine disparaît due à la perte du complexe associé à la dystrophine chez la souris *mdx* (Frigeri et al., 1998; Frigeri et al., 2001; Frigeri et al., 2002) ou à la perte spécifique de l' α -syntrophine chez la souris invalidée pour le gène (Yokota et al., 2000).

Les protéines du complexe syntrophine sont capables d'interagir avec la calmoduline de manière dépendante du calcium ou non. Le calcium influence alors la fixation de la calmoduline à l'extrémité C- ou N-terminale de la syntrophine (Newbell et al., 1997; Iwata et al., 1998). Des interactions avec le phosphatidylinositol 4.5 biphosphate peuvent s'effectuer au niveau du premier domaine PH de la syntrophine (Chockalingam et al., 1999).

De plus, la syntrophine lie aussi les canaux sodiques dépendants du voltage (Gee et al., 1998) et la protéine kinase 3 (Hasegawa et al., 1999).

Oak et coll. (2001) ont mis en évidence une interaction entre l' α 1-syntrophine et la protéine Grb2 via des régions riches en prolines situées dans la partie N-terminale de la syntrophine et des domaines SH3 (src homology 3) de la protéine adaptatrice.

La β 2-syntrophine, quant à elle, est capable de lier différentes sérine/thréonine kinases telles que SAST ou MAST205 ainsi que le récepteur tyrosine ICA512 (Lumeng et al., 1999a; Ort et al., 2000).

3.4.5. Rôles fonctionnels

Le rôle fonctionnel des syntrophines reste encore à préciser, d'autant que chez l'homme, aucune maladie n'a pu être rattachée à des mutations liées aux gènes codant ces protéines. Cependant, les nombreuses interactions rendues possibles par la présence d'un domaine PDZ suggèrent que les syntrophines sont des protéines adaptatrices, permettant le recrutement à la membrane de produits impliqués dans la signalisation cellulaire (Froehner et al., 1997).

Une étude d'Adams et coll. (2000) a ainsi récemment montré que l' α 1-syntrophine joue un rôle important dans la formation des synapses cependant les souris déficientes pour l' α 1-syntrophine ne semblent pas présenter de myopathie, bien que ces animaux aient des jonctions neuromusculaires anormales avec un niveau d'expression réduit du récepteur de l'acétylcholine (Kameya et al., 1999; Adams et al., 2000). En outre, ces souris montrent une réduction du niveau d'expression de nNOS au niveau du sarcolemme et aussi une réduction spécifique de l'immunoréactivité de l'utrophine à la jonction neuromusculaire (Kameya et al., 1999; Adams et al., 2000). Cette étude montre également que la sur-expression de la β 1-syntrophine ne pallie pas l'absence de l' α 1-syntrophine et suggère que les protéines du complexe syntrophine peuvent jouer des rôles différents dans un même tissu.

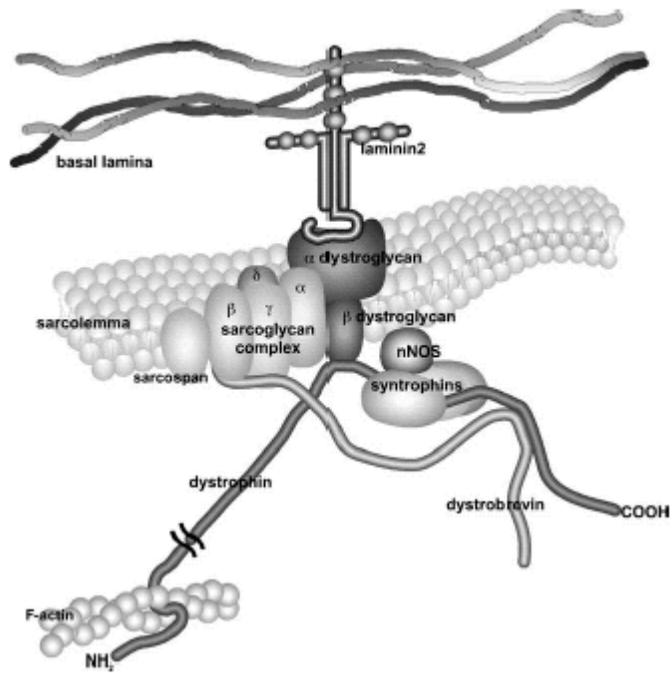


Figure 16: Représentation schématique du complexe dystrophine-protéines associées dans le muscle strié. D'après Chambers et coll., 2003.

4. Interactions entre membres de la superfamille des dystrophines et protéines associées dans le muscle squelettique

L'ensemble des protéines associées interagissent entre elles pour former un complexe macromoléculaire nécessaire à la fonction des dystrophines (tableau 1).

La description détaillée des membres de la superfamille des dystrophines et des protéines associées met en évidence la large distribution de ces protéines au travers de nombreux tissus, tant dans le muscle que dans le système nerveux central. La mise en évidence d'interactions entre protéines de la superfamille des dystrophines et protéines associées a abouti à l'identification de complexes macromoléculaires situés dans la fibre musculaire squelettique (figure 16).

A partir d'études en microscopie confocale réalisée chez des patients présentant des déficiences pour l'un des composants du complexe glycoprotéique, Draviam et coll. (2001) ont pu fournir une visualisation directe des interactions et interdépendances des protéines du complexe. L'interruption du gène dystroglycane est létale chez l'embryon de souris (Williamson et al., 1997; Henry and Campbell, 1998), il est possible qu'il en soit de même pour l'homme. Le β -dystroglycane apparaît être un lien critique entre la membrane basale et les sarcoglycanes. En son absence, les sarcoglycanes restant sont exprimés à un faible niveau et ne sont pas intégrés correctement dans la membrane plasmique. L'expression et la localisation de la β 1-intégrine et du β -dystroglycane semblent être indépendant de la formation du complexe dystrophine-DAPs puisque leur expression et localisation plasmique sont relativement bien préservées dans les myopathies étudiées. Ceci suggère que leur expression se ferait avant celle des autres membres du complexe. L'intégration des δ - et γ -sarcoglycanes dans la membrane plasmique se fait de manière indépendante de la dystrophine puisque les auteurs observent une localisation normale de ces derniers en l'absence de la dystrophine.

De nombreuses études portant sur le rôle fonctionnel des dystrophines ont été réalisées dans la fibre musculaire squelettique étant donné la grande facilité d'étude de ce tissu, associé au fait que le phénotype le plus marquant observé chez les patients atteints de la Dystrophie Musculaire de

Membres du complexe	Superfamille des dystrophines et protéines associées
β -dystroglycane	Dystrophine Dp260, Dp116, Dp71 utrophine δ -sarcoglycane
α -sarcoglycane	Dystrophine α -syntrophine
γ -sarcoglycane	Dystrophine
syntrophine	Dystrophine (α 1-syntrophine) Dp71 utrophine (β 2-syntrophine) dystrobrévine α -sarcoglycane
α -dystrobrévine 1	Dystrophine utrophine
α -dystrobrévine 1, 2, 3	Complexe sarcoglycanes-sarcospane
β -dystrobrévine	Dystrophine Dp140, Dp71 syntrophine

Tableau 1 : Résumé des interactions entre les différents produits de la super famille des dystrophines et les membres du complexe associé.

Duchenne consiste en la dégénérescence des cellules musculaires. Ces études ont révélé la complexité des relations existantes entre les protéines de la superfamille des dystrophines et les protéines associées ainsi que la mise en évidence de complexes macromoléculaires impliquant ces diverses protéines. Deux principaux concepts fonctionnels ont émergé de ces études : la dystrophine est indispensable à la fonction normale du muscle et permet le maintien de l'intégrité de la cellule musculaire ; les complexes dystrophines-protéines associées seraient impliqués dans les voies de signalisation cellulaire en jouant un rôle dans la stabilisation ou le maintien à la membrane de récepteurs de neurotransmetteurs, de canaux ioniques et/ou autres protéines participant à ces voies. Cependant, les mécanismes moléculaires restent encore à définir.

5. Expression et localisation des dystrophines et protéines associées dans le système nerveux périphérique

La Dystrophie Musculaire de Duchenne associe la dégénérescence musculaire à des troubles cognitifs et des troubles de la vision. En plus du SNC, les dystrophines et glycoprotéines associées au complexe sont aussi exprimées dans le système nerveux périphérique. Il a été montré dans le système nerveux périphérique que les cellules de Schwann expriment uniquement l'utrophine, la Dp116 (Byers et al., 1993; Matsumura et al., 1993) ainsi que l'Up116 (Rivier et al., 1996). Des protéines associées telles que les syntrophines et les dystrobrevines ont aussi été observées dans les cellules de Schwann (Fabrizio et al., 1997).

A l'image de ce qui se passe dans le muscle strié, un défaut dans l'une des quatre sous-unités (α , β , γ et δ) sarcoglycane conduit à une importante réduction voir l'absence du complexe sarcoglycane dans les cellules de Schwann (Mizuno et al., 1994; Bonnemann et al., 1995; Lim et al., 1995; Noguchi et al., 1995; Roberds and Campbell, 1995; Nigro et al., 1996). Une étude en immunofluorescence montre clairement une réduction du niveau d'expression de l' ϵ - et du δ -sarcoglycane dans le nerf périphérique des souris déficientes pour le β -sarcoglycane alors que l' ϵ - et le β -sarcoglycane sont réduits chez le hamster déficient pour le δ -sarcoglycane.

Imamura et coll. (2000) ont observé une co-expression des β -, δ - et ϵ -sarcoglycanes avec les dystroglycanes, la Dp116 et l'utrophine dans la membrane protoplasmique de la couche la plus externe des cellules de Schwann. L'interaction de l' α -dystroglycane avec la mérosine ou l'agrine, protéines de la MEC, est dépendante du calcium (Yamada et al., 1994; Yamada et al., 1996b; Yamada et al., 1996a; Imamura et al., 2000) de plus, la glycosylation de l' α -dystroglycane est également nécessaire à l'interaction avec la mérosine (Matsumura et al., 1997a). Les complexes protéiques semblent ainsi impliqués dans le maintien de l'architecture cellulaire en permettant la liaison entre le cytosquelette des cellules de Schwann et la lame basale. De plus, il a été suggéré un rôle du complexe

Dp116/protéines associées dans la myélinogénèse périphérique et son maintien via la laminine 2 (Matsumura, 1997).

Par ailleurs, l'individualisation d'une forme de dystrophie musculaire congénitale (CMD), due à l'absence de mérosine (Tome et al., 1994; Shorer et al., 1995) et caractérisée par une démyélinisation des nerfs périphériques, a mis en lumière le rôle des dystroglycane dans ce système (Sunada et al., 1994). De plus, il est intéressant de remarquer que l' α -dystroglycane peut servir de porte d'entrée à des éléments pathogènes lors d'infections cellulaires (Cao et al., 1998). En effet, l' α -dystroglycane serait le récepteur clé du *Micobactérium leprea* lors de l'infection par cette bactérie (Rambukkana et al., 1998).



Figure 17: Guillaume-Benjamin Duchenne de Boulogne.

6. Le système nerveux central

6.1. le cerveau

6.1.1. Pathologies observées chez les patients DMD et les modèles animaux

Chez les patients DMD

De nombreuses études réalisées chez les patients DMD indiquent une implication significative des dystrophines dans le SNC en plus des pathologies moléculaires caractéristiques des patients DMD. En effet, c'est Duchenne de Boulogne (1868) (figure 17) lui-même qui a rapporté les premiers troubles mentaux observés chez un patient de 17 ans atteint de Dystrophie Musculaire de Duchenne. La moyenne du QI des patients DMD est de 85 et environ 1/3 des patients présentent un QI inférieur à 70 (Bresolin et al., 1994). Des déficits de l'expression verbale, de l'apprentissage, de la lecture, de la mémoire et de l'attention ont tous été rapportés chez ces patients (Karagan et al., 1980; Billard et al., 1992; Emery, 1993). Anatomiquement, la morphologie des cerveaux des patients DMD semble normale. Cependant, quelques anomalies ont été rapportées telles qu'une migration, une orientation et une polarité des neurones altérées, une réduction de l'arborisation dendritique des neurones pyramidaux du cortex et un hyper-métabolisme du cervelet (Jagadha and Becker, 1988; Bresolin et al., 1994).

Bien qu'il n'existe pas de corrélation directe entre les déficits cognitifs et la position des mutations du gène DMD (Bushby et al., 1995), les délétions se produisant vers l'extrémité 3' du gène et au niveau de l'exon 52 auraient des conséquences plus importantes sur les déficits cognitifs (Hoffman et al., 1991; Rapaport et al., 1991; Lenk et al., 1993b; Lenk et al., 1996; Moizard et al., 2000). En effet, Rapaport et coll. (1991) ont montré que 70% des patients avec une délétion dans l'exon 52 présentent des troubles cognitifs. Plus récemment, une association entre le degré de troubles cognitifs et la présence de mutations sur la Dp71 a été rapportée par Moizard et coll. (2000).

Les modèles murins

Chez les modèles animaux de la DMD on retrouve des troubles similaires. Ainsi les souris *mdx*, qui n'expriment pas la dystrophine, présentent un déficit de la rétention à long terme mais pas dans les mécanismes d'acquisition (Vaillend et al., 1995). Au niveau biochimique, des troubles du métabolisme ont été décrits chez les souris *mdx* (Tracey et al., 1996). Ils se traduisent notamment par une diminution de la créatine et une augmentation du phosphate inorganique et du pH. De façon étonnante, mis à part une émotivité accrue, la souris *mdx*^{3cv} (déficiente pour toutes les dystrophines) ne présente pas de troubles comportementaux plus prononcés que la souris *mdx* (Vaillend and Ungerer, 1999). Cette observation semble en désaccord avec l'hypothèse du rôle prépondérant des produits courts du gène DMD au niveau du cerveau.

L'ensemble de ces résultats semble indiquer que les phénomènes de compensation entre dystrophines sont très développés au niveau du système nerveux central, expliquant par là même les déficits subtils observés dans la plupart des cas. Cette hypothèse est renforcée par le fait que les atteintes les plus sévères du SNC apparaissent chez des patients DMD présentant des mutations dans la partie C-terminale, commune à toutes les dystrophines (Lenk et al., 1993a), ce qui empêche toute compensation d'une dystrophine par une autre.

6.1.2. Expression des protéines de la superfamille des dystrophines et protéines associées

De nombreuses études ont fait apparaître que le système nerveux central exprime l'ensemble des produits du gène DMD et certains des produits associés à la dystrophine dans différentes structures.

Protéines de la superfamille des dystrophines

La dystrophine est largement distribuée à travers tout le cerveau et est plus particulièrement abondante dans le cortex cérébral, l'hippocampe, le cervelet et la moëlle épinière aussi bien exprimée par les cellules neuronales que non neuronales (Lidov et al., 1993).

La dystrophine issue du promoteur musculaire est exprimée dans de nombreux tissus, entre autre la rétine et les cellules gliales (Ahn and Kunkel, 1993; Tinsley et al., 1994). Le promoteur C est

responsable de la transcription de la dystrophine exprimée préférentiellement dans les neurones de structures cérébrales telles que le néocortex, l'hippocampe (régions CA1-3) et le cervelet (Chelly et al., 1988; Lidov et al., 1990; Gorecki et al., 1991). Ces promoteurs neuronaux sont hautement spécifiques des neurones et sont silencieux dans les cellules non neuronales (Chelly et al., 1990). L'isoforme issue du promoteur P est présente au niveau du cortex cérébral fœtal et des cellules de Purkinje matures (Lidov et al., 1990; Lidov et al., 1993).

Des études immunohistochimiques ont montré la forte association de la Dp427 avec la membrane postsynaptique des neurones corticaux et pyramidaux de l'hippocampe et des cellules de Purkinje mais semble absente des glies (Lidov et al., 1990; Kim et al., 1992; Lidov et al., 1993). La Dp427 est aussi présente dans les synapses inhibitrices du SNC où son absence chez la souris *mdx* affecte l'agrégation ou la stabilisation des récepteurs GABA_A (Knuesel et al., 1999). A partir de double et triple marquages réalisés sur des cultures de neurones hippocampaux Brunig et coll. (2002) ont observé la colocalisation des dystrophines avec les récepteurs GABA_A dans les synapses GABAergiques (Levi et al., 2002; Fritschy et al., 2003).

L'expression de la Dp140 est essentiellement gliale. La Dp140 est retrouvée dans les prolongements des astrocytes à travers le neuropil durant le développement, à la surface des leptoméniges et au niveau des vaisseaux sanguins, entourant le nerf olfactif et dans la neurohypophyse (Lidov et al., 1995; Adam and Matus, 1996).

Le produit du gène DMD majoritaire dans le cerveau : la Dp71, est exprimée par les glies et les neurones dans le cortex cérébral, les cellules granulaires du gyrus denté de l'hippocampe, le bulbe olfactif et la glande pituitaire (Gorecki et al., 1992; Ahn and Kunkel, 1995; Gorecki and Barnard, 1995; Mehler, 2000). Des études antérieures ont montré que la dystrophine est alternativement épissées pour les exons 71-74 dans les fibres Purkinje cardiaque (Bies et coll., 1992) et les cellules cérébrales (Feener et al., 1989). A partir d'étude par RT-PCR, Austin et coll. (2000) ont observés que le cerveau humain adulte exprime une sous-population de transcrits de la Dp71 qui ne contiennent pas les exons 71 à 74, induisant une délétion de 330 pb codant le domaine de fixation à la syntrophine. Ces

transcrits tronqués présentent aussi un épissage de l'exon 78. Ces résultats indiquent que le cerveau humain adulte contient une variété de transcrits de la Dp71 entraînant la production de protéines Dp71 distinctes ayant potentiellement des fonctions cellulaires différentes.

La Dp71 est localisée principalement au niveau des membranes synaptiques (Jung et al., 1993). Elle a été observée dans les synaptosomes isolés à partir de neurohypophyse de rat ainsi que dans des astrocytes en culture (Dorbani-Mamine et al., 1998; Imamura and Ozawa, 1998). Jancsik et Hajos (1999) suggèrent également que l'expression des dystrophines coïncident avec le développement de la barrière hémato-encéphalique et ainsi qu'elles contribueraient à la formation de ce système. Des isoformes de la Dp71 ont également été localisée dans les microsomes et dans les mitochondries du cerveau (Chavez et al., 2000). L'utilisation de lignées cellulaires (cellules PC12) ou cultures de neurones hippocampaux a également permis de constater que la Dp71f (épissée pour l'exon 78) est présente principalement dans le cytoplasme, les varicosités et les cônes de croissance alors que la Dp71d (non-épissée pour l'exon 78) est localisée à travers toute la cellule incluant le noyau (Gonzalez et al., 2000; Aleman et al., 2001; Marquez et al., 2003). Ces observations soulignent l'importance des épissages alternatifs sur la localisation sub-cellulaire des différentes formes de la Dp71 et suggèrent qu'elles sont impliquées dans des fonctions différentes. De plus, l'expression normale de la Dp71 est essentielle à la croissance neuritique des cellules PC12 et constitue une première évidence directe de l'implication de la Dp71 dans une fonction neuronale (Acosta et al., 2004).

D'autres membres de la superfamille des dystrophines sont détectés dans le cerveau. L'utrophine est présente principalement dans les régions vascularisées, dans le plexus choroïdien, et les pieds des cellules astrogliales (Khurana et al., 1992) mais a aussi été détectée dans des sites postsynaptiques de certains neurones corticaux (Kamakura et al., 1994).

La G-utrophine est le produit majoritaire du gène UTRN dans le cerveau, elle est présente dans les neurones du cortex cérébral, des noyaux gris centraux de l'hypothalamus et du bulbe olfactif (Blake et al., 1995b).

La DRP2 est exprimée dans toutes les régions du cerveau, plus particulièrement dans l'hippocampe, le gyrus denté, le bulbe olfactif et le thalamus (Roberts et al., 1996; Dixon et al., 1997).

L' α -dystrobrevine 1 est trouvée dans les astrocytes périvasculaires et la glie de Bergmann du cervelet (Blake et al., 1999). Les auteurs ont montré que la β -dystrobrevine est neuronale, et tout particulièrement enrichie dans les densités postsynaptiques. Sa localisation est similaire à celle décrite pour la dystrophine puisqu'on la retrouve dans le cortex, l'hippocampe et le cervelet au niveau du soma, des dendrites et des noyaux des neurones (Lidov et al., 1990; Lidov et al., 1993). Dans le cervelet elle est essentiellement exprimée dans les cellules granulaires et le soma des cellules de Purkinje. Contrairement à l' α -dystrobrevine, elle ne semble pas être présente au niveau vasculaire (Blake et al., 1998; Loh et al., 1998).

Protéines associées à la dystrophine /Complexes macromoléculaires du cerveau

Dans le cerveau, la dystrophine est associée avec un complexe protéique traversant la membrane et pouvant lier efficacement le cytosquelette à la matrice extra-cellulaire. Plusieurs protéines du complexe ont été décrites dans des structures cérébrales.

L' α -dystroglycane est détecté dans l'hippocampe, dans les corps cellulaires des cellules pyramidales aussi bien que dans les cellules granulaires du gyrus denté. L' α -dystroglycane est aussi trouvé autour des vaisseaux sanguins et dans les cellules de Purkinje du cervelet et le bulbe olfactif (Gorecki et al., 1994; Durbeej et al., 1998; Moukhles and Carbonetto, 2001). On retrouve également cette protéine dans le plexus choroïdien et le thalamus. De plus, Tian et coll. (1996) ont montré que l' α -dystroglycane, l' α -dystrobrevine 1 et la chaîne $\alpha 2$ de la laminine s'associent au niveau de la microvascularisation cérébrale et sont exprimés à des forts taux à l'interface glie-vaisseaux.

Le β -dystroglycane est présent dans les cellules neuronales ainsi que dans les pieds des astrocytes périvasculaires du cervelet. Une étude de fractionnement cellulaire a montré que cette protéine est exprimée au niveau des membranes postsynaptiques (Mummery et al., 1996; Tian et al., 1996).

Blake et coll. (1999) ont rapporté une localisation différentielle de l' α -dystrobrevine et la β -dystrobrevine dans le cerveau où ces protéines constituent des complexes différents : un complexe neuronal comprenant la β -dystrobrevine, la dystrophine et la syntrophine, et un complexe glial constitué de l' α -dystrobrevine 1, la Dp71 et la syntrophine. Ces données ont été confirmées par Moukhles et Carbonetto (2001) qui à partir d'une étude d'immunoprécipitation ont émis l'hypothèse de la formation de trois complexes comprenant chacun un produit différent du gène DMD. La dystrophine et le complexe dystroglycane sont associés dans les neurones, alors qu'au niveau des glies, la Dp140 lie le complexe dystroglycane et une syntrophine (utilisation d'un anticorps reconnaissant toutes les syntrophines). Les auteurs ont également mis en évidence un dernier complexe formé par la Dp71, une syntrophine et le complexe dystroglycane et suggèrent que le complexe serait aussi bien exprimé par les neurones que les cellules gliales (Mehler, 2000).

Plusieurs études ont rapporté la présence des sarcoglycane dans de nombreux tissus, notamment dans le système nerveux périphérique et le cerveau (Jung et al., 1996a; Ettinger et al., 1997). Nishiyama et coll. (2004) ont montré la présence de deux isoformes de l' ϵ -sarcoglycane : ϵ -sarcoglycane1 et ϵ -sarcoglycane2 dans tout le cerveau mais plus spécifiquement dans le bulbe olfactif, l'hippocampe, le cortex cérébral et le cervelet et ce, aussi bien dans les cellules neuronales que non-neuronales incluant les cellules endothéliales des capillaires et les astrocytes.

A l'heure actuelle aucun complexe dystrophine-DAPs contenant un sarcoglycane n'a été mis en évidence dans le cerveau bien que le schéma d'expression de la Dp427, la Dp140 et la Dp71 recouvre totalement celui de l' ϵ -sarcoglycane excepté pour les neurones de la substance noire.

Les syntrophines sont localisées de façon différentielle dans le cerveau en fonction de l'isoforme considérée. Le messenger de l' α 1-syntrophine s'exprime au niveau de structures telles que le plexus choroïdien, le gyrus denté alors que celui de la β 2-syntrophine est présent dans la corne d'Ammon et les cellules granulaires du cervelet. Le transcrite de la β 1-syntrophine est quant à lui très peu exprimé au niveau cérébral (Ahn et al., 1994; Gorecki et al., 1997). La localisation de l' α 1- et la β 2-syntrophine montre une distribution spécifique dans différentes aires du cerveau avec une co-

Matrice extra-cellulaire

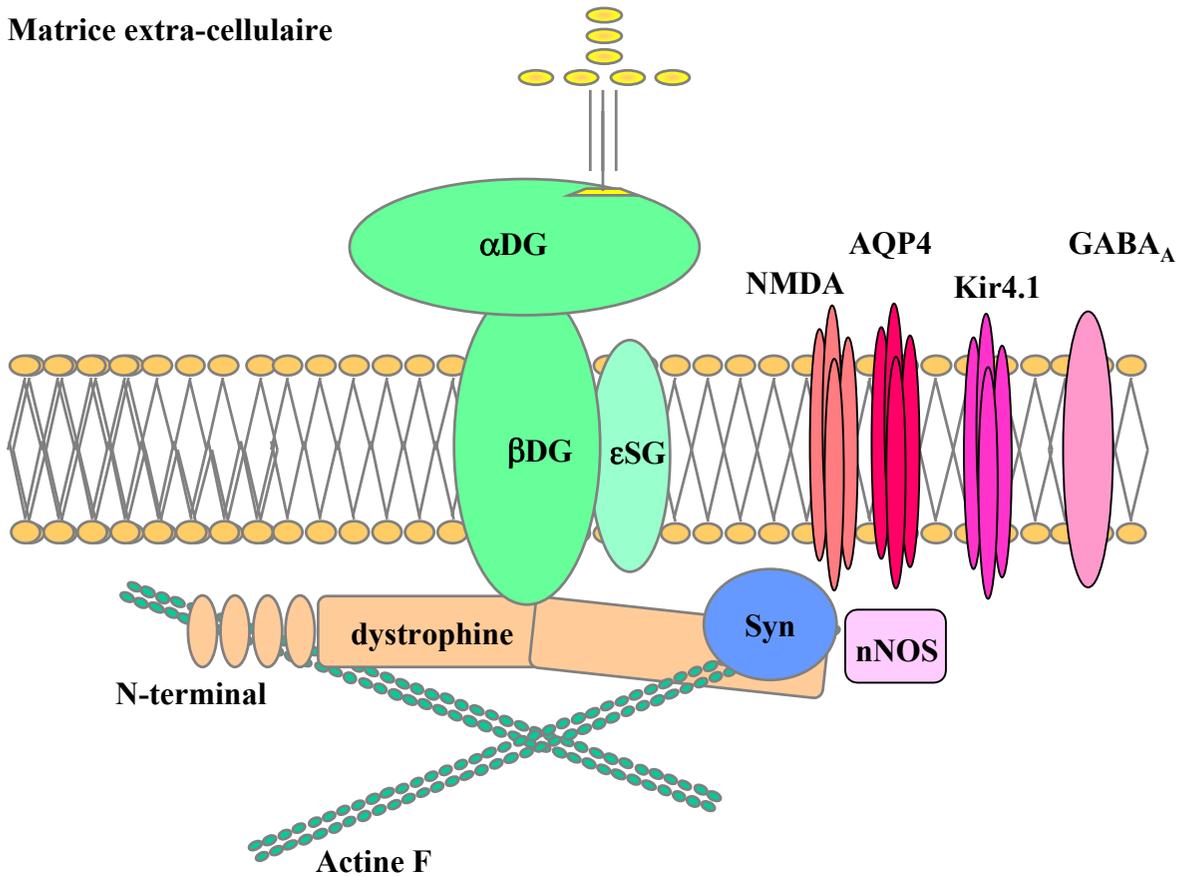


Figure 18: Représentation d'un schéma hypothétique du complexe protéique dystrophine-protéines associées au niveau des neurones du système nerveux central.
DG: dystroglycan; SG: sarcoglycane; Syn: syntrophine
nNOS: « neuronal nitric oxide synthase »; récepteur NMDA; récepteur GABA_A; canal aqueux AQP4; canal potassique Kir4.1.

localisation différentielle avec certaines protéines de la superfamille des dystrophines : l' α 1-syntrophine co-localise avec la dystrophine alors que la β 2-syntrophine est présente dans les mêmes aires que la Dp71 (Gorecki et al., 1997).

6.1.3. Rôles fonctionnels des protéines de la superfamille des dystrophines et des protéines associées dans le cerveau

Dans le SNC il a été montré des interactions entre les protéines associées à la dystrophine et d'éventuels ligands tels que des molécules de signalisation ou des canaux ioniques (figure 18).

Tracey et coll. (1996) ont rapporté une augmentation extracellulaire et une diminution intracellulaire des volumes dans le cerveau des souris *mdx*. Des études récentes suggèrent que les canaux aqueux aquaporine 4 (AQP4) sont déficients dans les pieds des astrocytes chez les souris *mdx* (Frigeri et al., 2001; Nico et al., 2003). L'expression et la localisation subcellulaire d'AQP4 dépend de son association avec le complexe dystrophine via son interaction avec l' α -syntrophine (Neely et al., 2001). Une importante diminution de l'AQP4 dans les pieds des astrocytes périvasculaires a également été observé dans le cerveau des souris déficientes pour l' α -syntrophine (Yokota et al., 2000; Amiry-Moghaddam et al., 2003b; Amiry-Moghaddam et al., 2003a). L'expression de protéines telles que les dystrobrevines, syntrophines et les produits courts du gène DMD dans les pieds astrocytaires périvasculaires suggère que ces protéines pourraient être impliquées dans l'adhésion de la glie périvasculaire avec la MEC via une interaction de l' α -dystroglycane avec la laminine (Tian et al., 1996). Dans des cultures de cellules hippocampiques, Guadagno et Moukhles. (2004) montrent que la laminine a un rôle dans l'agrégation des canaux Kir4.1 et AQP4 et suggèrent que ce rôle serait médié par le complexe dystroglycane. Cette étude révèle un nouveau rôle fonctionnel des dystroglycans dans la régulation de l'homéostasie (K^+ , eau) dans le cerveau.

Mehler et coll. (1992) ont montré chez la souris *mdx* que les neurones pyramidaux de l'hippocampe présentent une sensibilité accrue à l'hypoxie. L'hypoxie et l'hyperexcitation entraînent une augmentation de calcium intracellulaire dans les neurones qui conduit par la suite à la mort cellulaire. Une augmentation de la perte neuronale a été décrite chez des patients DMD (Jagadha and Becker, 1988).

Dans le cerveau, nNOS interagit directement avec l' α 1-syntrophine à travers son domaine PDZ (Brenman et al., 1995; Brenman et al., 1996; Hashida-Okumura et al., 1999; Hillier et al., 1999). La PSD-95 est co-exprimée avec nNOS dans de nombreuses populations neuronales en développement ou dans le système nerveux mature (Bredt et al., 1990; Bredt and Snyder, 1990), elle est également impliquée dans l'ancrage et l'agrégation des récepteurs NMDA et de certains types de canaux potassiques au niveau des densités postsynaptiques (Brenman et al., 1996; O'Brien et al., 1998). En plus de ces interactions Gee et coll., (1998) ont rapporté à partir d'une étude de coimmunoprécipitation l'interaction des canaux sodiques dépendant du voltage avec la syntrophine et la dystrophine.

Des données sur la localisation du β -dystroglycane dans le cerveau renforcent l'hypothèse de l'implication d'un complexe dystrophine-protéines associées dans la plasticité synaptique et l'organisation structurale et fonctionnelle des synapses. En effet, cette protéine transmembranaire, abondante aux sites postsynaptiques, a été purifiée à partir de synaptosomes bovin (Mummery et al., 1996; Cavaldesi et al., 1999). Dans ces structures le complexe dystroglycane est isolé avec la Grb2, protéine adaptatrice impliquée dans la transduction des signaux qui lie FAK (focal adhesion kinase), elle-même impliquée dans l'activation des récepteurs de neurotransmetteurs. De plus, une étude de Sugita et coll. (2001) a montré que les neurexines constituent un ligand pour le complexe dystroglycane dans le cerveau or les neurexines font partie intégrante de la cascade de la synaptogénèse. La concentration du complexe dystroglycane et de la dystrophine à des sites synaptiques indique que ces protéines pourraient avoir un rôle important dans la transduction du signal. En effet, Zaccaria et coll. (1998; 2000) ont montré que le β -dystroglycane se situe dans des aires du cerveau conjointement à la dystrophine, les récepteurs de l'acétylcholine ou les récepteurs du GABA_A. Ces auteurs suggèrent un rôle pour le β -dystroglycane dans la stabilisation et l'agrégation du

récepteur de l'acétylcholine au niveau du ganglion sympathique de la souris et évoquent le rôle potentiel du complexe dans la stabilisation des récepteurs GABA_A. D'autres études ont pu montrer la colocalisation de la Dp427 avec le récepteur GABA_A dans le cortex cérébral, l'hippocampe et le cervelet de souris (Knuesel et al., 1999; Knuesel et al., 2001). Une investigation au niveau du cerveau de la souris *mdx* montre que l'absence de la Dp427 affecte l'agrégation de ces récepteurs.

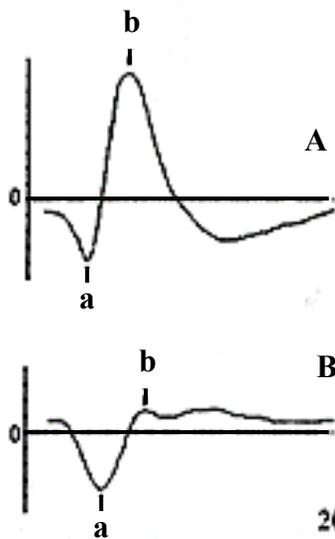
6.1.4. En résumé

Comme souligné précédemment, le cerveau exprime l'ensemble des produits du gène DMD, mais l'absence d'anticorps spécifiques pour chacune des dystrophines et l'absence de modèle cellulaire d'étude des dystrophines dans ce système rendent ardue l'analyse des interactions entre dystrophines et membres du complexe.

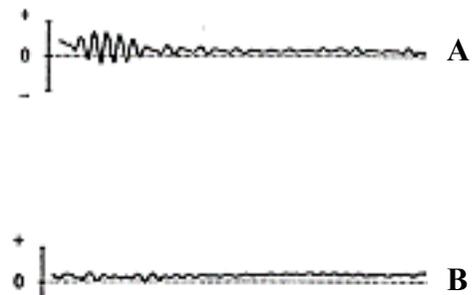
Des expériences de localisation et de co-localisation fournissent des informations partielles sur l'organisation du complexe dystrophines/protéines associées au niveau du système nerveux central. De façon similaire au muscle, de nombreuses observations dans le SNC nous incite à penser que ces protéines pourraient jouer un rôle soit au niveau des synapses, soit dans le maintien de l'architecture cellulaire par des liaisons à la matrice extracellulaire. La capacité de liaison avec des protéines de la cascade de signalisation et l'implication potentielle dans le maintien à la membrane de récepteurs de neurotransmetteurs ont permis d'émettre l'hypothèse de la participation des dystrophines et protéines associées dans les voies de signalisation cellulaire ou au cours de la synaptogénèse.

Les études sur la fonctionnalité d'un complexe formé par des composants de la superfamille des dystrophines-DAPs restent rares et difficiles dans le cerveau. C'est notamment pour cela que la rétine constitue un modèle de choix pour développer cette approche dans le système nerveux central.

ERG Scotopiques



Potentiels Oscillatoires



150 μ V
20 ms

Figure 19: ERG scotopiques chez un sujet normal (A) et un patient DMD (B). On constate une forte réduction de l'amplitude de l'onde b chez le patient DMD. Potentiels oscillatoires chez un sujet normal (A) et un patient DMD (B). On note une atténuation de ces potentiels chez le patient DMD. D'après Girlanda et coll., 1997.

6.2. La rétine

Suite à l'observation de troubles de l'ERG chez 80% des patients DMD caractérisés par une diminution de l'amplitude de l'onde b, de nombreux travaux ont porté sur l'étude des dystrophines dans la rétine et ce, afin de progresser dans la compréhension de leurs rôles dans la neurotransmission au niveau du système nerveux central.

6.2.1. Pathologies observées chez les patients DMD et les modèles animaux

Chez les patients DMD

La principale anomalie de l'ERG observée chez 80% des patients DMD est une réduction de l'onde b pouvant avoir diverses origines physiologiques. Chez l'homme, Fitzgerald et coll. (1994) ont suggéré que cette perturbation aurait pour origine un dysfonctionnement de la transmission impliquant les cellules bipolaires ON suite à l'hyperpolarisation des bâtonnets. Une autre subtile anomalie détectée chez les patients DMD consiste en la disparition du potentiel oscillatoire O2, onde constituant la branche ascendante de l'onde b (figure 19). Ceci suggère que la transmission entre les cônes et les cellules bipolaires ON est également affectée (Cibis et al., 1993; Sieving, 1993; Fitzgerald et al., 1994). En revanche, la voie utilisant les cellules bipolaires OFF ne semble pas touchée. Malgré ces altérations de l'ERG, il faut noter qu'aucun autre trouble visuel n'est observé chez les patients DMD.

Il est difficile d'établir une corrélation génotype-phénotype qui permette de définir clairement quel produit du gène DMD est essentiel à la neurotransmission rétinienne. Cependant, le fait que les patients DMD ne présentent pas tous des troubles de l'ERG alors qu'ils sont tous déficients en Dp427, permet d'établir que la Dp427 ne semble pas primordiale dans le mécanisme de neurotransmission rétinienne (Sigesmund et al., 1994).

En étudiant des patients DMD et des mères porteuses au sein d'une même famille, Fitzgerald et coll. (1999) ont montré qu'il existait une corrélation entre les délétions au niveau de l'exon 50 qui empêchent l'expression de la Dp260 et les anomalies de l'ERG.

De plus, la diminution de l'amplitude de l'onde b est le plus souvent observée chez les patients DMD lorsque les mutations se produisent dans une zone comprise entre les exons 30 et 62. Ces mutations affectent l'expression de la Dp427, Dp260 et Dp140 mais pas celle de la Dp71. Ceci suggère que la Dp260 est à l'origine de cette diminution alors que l'expression de la Dp71 seule ne suffit pas à maintenir une amplitude normale (Pillers et al., 1993; Sigismund et al., 1994; Jensen et al., 1995; Fitzgerald et al., 1999; Pillers et al., 1999b).

Cependant, les mutations touchant le gène DMD étant tellement diverses et variées, il est assez difficile d'établir une cartographie précise des corrélations avec le phénotype ERG observé chez l'homme, d'autant plus que des mécanismes de compensation peuvent biaiser les analyses.

Il n'y a pas d'anomalies cliniques visuelles mesurables chez les patients DMD (Cibis and Fitzgerald, 2001), ce qui indiquerait que malgré l'ERG anormal les signaux atteignent la rétine proximale et le cerveau. Quand la réponse ON est isolée pharmacologiquement par le blocage des cellules bipolaires hyperpolarisées on observe une réponse de grande amplitude et de latence courte. Ainsi Cibis et Fitzgerald (2001) suggèrent que la réponse ON est présente mais que le temps de latence est altéré, permettant une vision normale mais induisant des troubles de l'ERG. Chez les patients DMD seuls les signaux des cellules bipolaires dépolarisées sont altérés, ainsi les auteurs proposent que le rôle de la Dp260 est de stabiliser les synapses invaginant photorécepteur/cellule bipolaire dépolarisée/cellule horizontale et que l'instabilité de cette connexion engendre une altération du temps de latence du signal et du phénotype ERG sans perte de la vision.

Fitzgerald et coll. (1999) ont aussi rapporté en comparant l'étude d'une famille DMD avec le modèle murin invalidé pour l'exon 52, que l'absence des mêmes produits du gène DMD chez les deux espèces aboutissait à des phénotypes ERG différents. En effet, chez la souris, seul le temps de latence apparaît modifié alors qu'on observe une diminution de l'amplitude de l'onde b chez les patients DMD. Ces différences inter-espèces sont à prendre très sérieusement en considération.

	<i>mdx</i>	<i>mdx</i> ^{2cv}	<i>mdx</i> ^{4cv}	<i>mdx</i> ^{5cv}	<i>Exon 52 ko</i> *	<i>mdx</i> ^{3cv}
dystrophine	-	-	-	-	-	-
Dp260	+	-	-	+	-	-
Dp140	+	+	-	+	-	-
Dp71	+	+	+	+	+	-
Amplitude onde b	NM	NM	NM	NM	NM	↓

Tableau 2 : Tableau récapitulatif des modifications associées au temps de latence et à l'amplitude de l'onde b de l'électrorétinogramme scotopique en fonction de la perturbation de l'expression de certains produits du gène DMD (d'après Kameya et coll., 1997* ; Pillers et coll., 1999)

Abréviations : NM : non modifié

Les différences physiologiques, anatomiques et phénotypiques entre l'homme et la souris suggèrent que les voies de transmission du signal peuvent varier entre ces espèces.

Les modèles murins

L'analyse des différents enregistrements électrorétinographiques effectués chez plusieurs modèles murins présentant des mutations du gène DMD nous apporte des données à ce sujet. Les modèles murins de la DMD sont regroupés sous la série de souris mutantes *mdx* et *mdx2cv-5cv*. Comme chez l'homme, la souris *mdx* qui est déficiente en Dp427 ne présente pas de trouble de l'ERG (Cibis et al., 1993), excluant ainsi la participation exclusive de cette protéine dans la diminution de l'amplitude de l'onde b. Des études ont également démontré que seule la souris *mdx^{3cv}* déficiente pour toutes les formes des dystrophines (Pillers et al., 1995) présente une onde b perturbée alors que des enregistrements électrorétinographiques réalisés chez les souris mutantes *mdx^{2cv}* (perte de la Dp427 et Dp260), *mdx^{4cv}* (perte de la Dp427, Dp260 et Dp140), et invalidées pour l'exon 52 (perte de la Dp427, Dp260 et Dp140) ne présentent qu'une augmentation du temps de latence de l'onde b sans réduction de son amplitude (Kameya et al., 1997; Pillers et al., 1999b) (tableau 2). Ces observations indiqueraient que l'expression de la Dp71 à elle seule suffirait à maintenir une onde b normale. De plus, ces expériences ont montré l'existence d'une augmentation du temps de latence de l'onde b qui serait liée à l'absence de la Dp260.

La perte des produits du gène DMD chez la souris *mdx^{3cv}* n'entraîne pas de modifications de l'épaisseur des couches cellulaires, ni de la densité nucléaire (communication personnelle, Cécile Dalloz). De même, Blank et coll. (1999) ont effectué une comparaison quantitative du nombre de cônes et bâtonnets en l'absence des dystrophines et n'observent pas de différences entre la souche sauvage et la souche *mdx^{3cv}*.

6.2.2. Expression et localisation des membres de la superfamille des dystrophines

C'est dans la rétine de souris que D'Souza et coll. (1995) ont observé pour la première fois l'expression de la Dp260. La Dp427, la Dp140 et la Dp71 ont été mis en évidence dans la rétine de nombreux mammifères (Zhao et al., 1991; Pillers et al., 1993; Schmitz et al., 1993; D'Souza et al., 1995; Ueda et al., 1995b; Rodius et al., 1997; Claudepierre et al., 1999; Dalloz et al., 2001). Dans la rétine de souris, les transcrits de la Dp427 ont été amplifiés par RT-PCR et il a été démontré qu'ils provenaient des promoteurs de type muscle et cerveau ; les produits issus de ce dernier étant majoritaires (Tamura et al., 1993). La Dp71 est le produit du gène DMD le plus exprimé dans la rétine de rat et de souris (Claudepierre et al., 1999; Dalloz et al., 2001).

Etant donné la forte homologie de séquence entre les différents produits du gène DMD, de nombreuses études de localisation en utilisant des anticorps pan-spécifiques ont permis de localiser les dystrophines dans la CPE mais aussi dans la membrane limitante interne et autour des vaisseaux (Miyatake et al., 1991; Pillers et al., 1993; Schmitz et al., 1993; D'Souza et al., 1995; Montanaro et al., 1995; Ueda et al., 1995b; Drenckhahn et al., 1996; Schmitz and Drenckhahn, 1997; Ueda et al., 1997a; Ueda et al., 1997b; Claudepierre et al., 1999; Dalloz et al., 2001; Blank et al., 2002).

A partir de plusieurs expériences Howard et coll. (1998b) et Claudepierre et coll. (1999; 2000b) ont montré que la Dp71, le seul produit du gène DMD exprimé par les CGM, est localisé au niveau de la membrane limitante interne, dans les pieds des cellules gliales de Müller et dans les processus gliaux des CGM venant au contact des vaisseaux sanguins. Plusieurs études démontrent l'expression de l'utrophine dans la rétine mais divergent quant à sa localisation (Montanaro et al., 1995; Ueda et al., 1995a; Rodius et al., 1997). En utilisant différentes approches expérimentales (immunohistochimie sur coupes de rétine totale ou sur cultures de cellules gliales de Müller chez le rat), Claudepierre et coll. (1999; 2000b) mettent en évidence que l'utrophine est localisée exclusivement dans les cellules gliales de Müller.

En conclusion, l'ensemble de ces travaux montre l'expression de la Dp71 et de l'utrophine uniquement dans la CGM alors que la Dp427, la Dp260 et la Dp140 sont exprimés dans la CPE.

Etant donné l'association étroite des prolongements neuronaux photorécepteurs et neurones secondaires à l'intérieur de la cavité synaptique, il est très difficile d'établir une localisation précise

des dystrophines. La présence des dystrophines dans la couche plexiforme externe conduit alors à l'affrontement de deux hypothèses. La première hypothèse suggère l'expression des dystrophines du côté postsynaptique chez le bovin et le lapin (Schmitz et al., 1993; Koulen et al., 1998). La deuxième hypothèse suggère l'expression des dystrophines uniquement par les photorécepteurs en périphérie des rubans synaptiques (Schmitz et al., 1993; Ueda et al., 1995b; Schmitz and Drenckhahn, 1997; Ueda et al., 1997a; Ueda et al., 1997b; Blank et al., 1999).

Les contradictions apparentes entre les espèces peuvent être dues au fait de la difficulté d'isoler chacun des types cellulaires constituant la CPE. De plus l'utilisation d'anticorps pan-spécifiques ne permet pas de connaître l'identité de chacun des produits du gène DMD présents dans les neurones constituant la première synapse de la rétine.

6.2.3. Expression et localisation des protéines associées aux membres de la superfamille des dystrophines

Les évidences en faveur d'un complexe entre les dystrophines, ou l'utrophine, et leurs protéines associées sont peu nombreuses dans la rétine.

L' α -dystroglycane est encodée par un seul gène et présente plusieurs épissages alternatifs et glycosylations (Ibraghimov-Beskrovnaya et al., 1992; Ervasti et al., 1997). Moukhles et coll. (2000) montrent une localisation différentielle des isoformes de l' α -dystroglycane dans la rétine de rat. En effet une des isoformes s'exprime au niveau de la membrane limitante interne, la couche des cellules ganglionnaires et la couche plexiforme interne alors qu'une autre est restreinte à la membrane limitante interne et aux vaisseaux sanguins.

De même, le β -dystroglycane co-localise avec l'utrophine et les dystrophines ainsi que la laminine dans la membrane limitante interne et autour des vaisseaux sanguins suggérant la présence de cette protéine dans les extensions des cellules de Müller ou les astrocytes venant au contact des vaisseaux (Montanaro et al., 1995; Blank et al., 1997; Schmitz and Drenckhahn, 1997; Howard et al., 1998b; Claudepierre et al., 1999). Ce complexe pourrait également interagir avec l'agrine, un autre ligand du

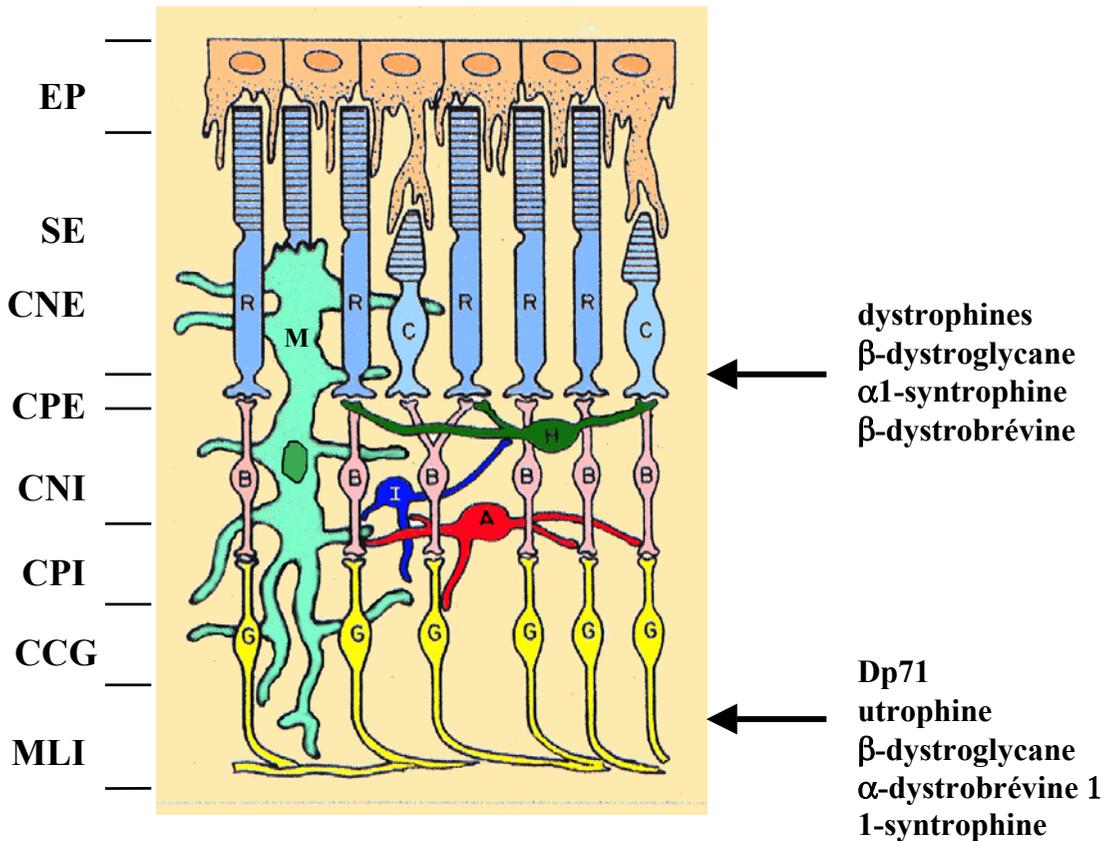


Figure 20: Localisation schématique des produits du gène DMD, utrophine, dystrobrevine et membres du complexe dans la rétine. C= cônes, R= bâtonnets, B= cellules bipolaires, H= cellules horizontales, I= interneurones, A= cellules amacrines, G= cellules ganglionnaires, M= cellules de Müller. Les différentes couches de la rétine sont identifiées par : EP= épithélium pigmentaire, SE= segments externes, CNE= couche nucléaire externe, CPE= couche plexiforme externe, CNI= couche nucléaire interne, CPI= couche plexiforme interne, CCG= couche des cellules ganglionnaires, MLI= membrane limitante interne.

β -dystroglycane, présent au niveau de la membrane limitante interne (Kroger and Mann, 1996). Dans des cultures de CGM, Mehes et coll. (2003) ont montré la colocalisation d'agrégats β -dystroglycane et utrophine dans toute la cellule alors que la Dp71f (épissée pour l'exon 78) est localisée dans le cytoplasme périnucléaire.

Le β -dystroglycane co-localise avec les dystrophines dans les synapses des photorécepteurs dans la couche plexiforme externe, concentré en particulier dans les extensions distales des bâtonnets comme des cônes (Drenckhahn et al., 1996; Blank et al., 1997; Blank et al., 1999). Dans la rétine de poulet, le β -dystroglycane co-localise aussi à cet endroit avec les canaux calciques dépendants du voltage de type N (Blank et al., 1997). Il a également été rapporté qu'il était exprimé dans la partie post-synaptique de la couche plexiforme externe, au niveau des cellules bipolaires dans la rétine de lapin (Koulen et al., 1998).

L'étude de différents mutants murins, déficients pour une ou plusieurs dystrophines a permis de montrer que l'absence des dystrophines chez la souris *mdx*^{3cv} induit la disparition du β -dystroglycane dans la couche plexiforme externe, alors qu'il est toujours présent dans la membrane limitante interne et autour des vaisseaux (Blank et al., 1999; Dalloz et al., 2001). Ces observations suggèrent une interaction entre les dystrophines et le β -dystroglycane au niveau de la couche plexiforme externe.

Récemment dans la rétine de poulet, Blank et coll. (2002) ont suggéré l'existence de deux complexes protéiques : l'un au niveau de la membrane limitante interne, composé de l'utrophine, l' α -dystrobrevine 1 et le dystroglycane et l'autre, dans la CPE comprenant les dystrophines, la β -dystrobrevine et le dystroglycane, suggérant des rôles distincts de ces deux complexes.

Seuls Claudepierre et coll. (2000a), dans notre laboratoire, ont montré à partir de la technique d'immunoprécipitation, l'existence d'un complexe macromoléculaire dans la cellule gliale de Müller de rétine de rat impliquant la Dp71, les dystroglycane, le δ -sarcoglycane, l' α -syntrophine et la dystrobrevine liant le cytosquelette d'actine et la matrice extra-cellulaire (figure 20).

6.2.4. Hypothèses sur les rôles fonctionnels des dystrophines dans la neurotransmission rétinienne

Le fait que les perturbations de l'onde b puissent être liées à l'activité de plusieurs types cellulaires, dont les photorécepteurs et les cellules bipolaires au niveau de la couche plexiforme externe, les cellules gliales de Müller et des neurones de 3^{ème} ordre tels que les cellules amacrines complique l'individualisation des fonctions des dystrophines dans la rétine.

Ces mécanismes nécessitent tous une haute organisation membranaire dans laquelle les dystrophines joueraient un rôle crucial pour l'agrégation et le maintien de canaux ioniques et de récepteurs de neurotransmetteurs et ce, en interagissant avec le complexe formé par les protéines associées.

Dans les cellules gliales de Müller

Claudepierre et coll. (2000a) ont montré l'existence dans la CGM d'un complexe macromoléculaire contenant la Dp71 qui pourrait avoir un rôle structural et/ou d'attachement de la cellule à la matrice extracellulaire afin de participer ainsi au maintien de l'architecture tissulaire. Ce complexe permettrait ainsi l'agrégation et la stabilisation à la membrane des CGM de canaux et/ou récepteurs impliqués dans la régulation de la concentration extracellulaire en glutamate.

Dans la couche synaptique photorécepteurs-neurones secondaires

Dans la rétine il existe deux voies cellulaires principales : la voie verticale permettant le transfert de l'information des photorécepteurs vers les cellules ganglionnaires en utilisant le glutamate comme neurotransmetteur, et la voie transversale modulant l'information visuelle par les cellules horizontales et amacrines par le biais du GABA (Wassle and Boycott, 1991; Kolb et al., 1994; Boycott and Wassle, 1999).

Des modulations de la transmission glutamatergique ont des répercussions sur la neurotransmission rétinienne. En effet, la perte de l'expression du récepteur métabotrope du glutamate mGluR6 entraîne une diminution de l'amplitude de l'onde b (Masu et al., 1995). De plus, une sous-unité spécifique du récepteur du glutamate de type NMDA (sous-unité NR1C2') a récemment été observée concentrée dans les terminaisons des photorécepteurs à une position similaire à celle de la dystrophine, du β -dystroglycane et de la β -dystrobrevine (Fletcher et al., 2000), augmentant la possibilité que cette sous-unité du récepteur NMDA soit associée avec le DPC dans les terminaisons des photorécepteurs.

Une modulation de l'homéostasie calcique aurait des conséquences sur la libération du glutamate calcium-dépendante. Les sous-unités $\alpha 1f$ et $\beta 2$ des canaux calciques voltage-dépendant sont présentes dans les terminaisons des photorécepteurs (Morgans, 2001; Morgans et al., 2001; Ball et al., 2002). De plus, la sous-unité $\alpha 1\beta$ des canaux calciques voltage-dépendant de type N est trouvée colocalisée avec le β -dystroglycane dans la CPE de rétine de poulet (Blank et al., 1997). Ainsi, des modulations de la libération ou de la réception du neurotransmetteur peuvent avoir un impact sur l'onde b de l'ERG.

Le maintien à la membrane de canaux ou transporteurs nécessite une organisation bien définie à laquelle peuvent participer les membres de la superfamille des dystrophines associés au DAPs. Nous pouvons donc supposer que les dystrophines participent de façon directe (par le maintien des récepteurs membranaires) ou indirecte (en perturbant la libération de glutamate au niveau des photorécepteurs) aux modifications de l'onde b.

De plus, le maintien de l'intégrité de la synapse photorécepteur/neurones secondaires via l'interaction avec des composants de la MEC semble essentiel à une bonne transmission de l'information visuelle.

7. Conclusion

Les dystrophines sont impliquées dans de nombreuses fonctions tant au niveau du tissu musculaire que du SNC. A partir de toutes ces informations, la rétine semble être le tissu le mieux indiqué afin de comprendre les rôles que pourraient jouer les dystrophines et protéines associées dans la neurotransmission.

Les dystrophines sont exprimées au niveau de la couche plexiforme externe, de la membrane limitante interne et autour des vaisseaux. A la différence de l'homme où la Dp260 semble primordiale à l'observation du phénotype ERG chez les patients DMD, l'absence de tous les produits du gène DMD semble nécessaire à l'obtention d'un phénotype similaire chez la souris. Des phénomènes de compensation au sein de la rétine semblent donc possibles et nous incitent à penser que la souris n'est peut être pas le meilleur modèle pour étudier le rôle des dystrophines dans la transmission de l'information visuelle.

C'est pourquoi nous avons dans un premier temps recherché de nouveaux modèles d'études qui nous permettront de mieux comprendre la fonction des dystrophines dans la rétine. Nous avons d'abord utilisé le poisson zèbre qui est considéré comme un excellent modèle d'étude de nombreuses maladies humaines. Puis la rétine de porc qui présente des caractéristiques anatomiques et physiologiques très proches de celles de l'homme et très souvent utilisée comme modèle de nombreuses pathologies humaines telles que le glaucome et la rétinite pigmentaire.

Nous avons en parallèle à ces recherches continuer à travailler avec la souris afin de pouvoir répondre aux différentes hypothèses précédemment énoncées. De nombreuses difficultés dues à l'imbrication cellulaire au sein de la synapse photorécepteurs-neurones secondaires, au manque d'anticorps spécifiques de chacun des produits du gène DMD ainsi qu'aux limites de résolutions des techniques

expérimentales nous ont alors obligé à cumuler plusieurs méthodes afin de déterminer la localisation précise des dystrophines.

B. Résultats

1. Le poisson zèbre

1.1. Le poisson zèbre, un nouveau modèle pour étudier la DMD

La souris a été intensément utilisée comme modèle de la Dystrophie Musculaire de Duchenne (Allamand and Campbell, 2000). Cependant, la physiopathologie de la souris *mdx* déficiente pour la dystrophine Dp427 ne mime pas entièrement la maladie humaine. En effet il semblerait que l'utrophine compense la perte de la dystrophine. Dans ce sens, d'autres modèles semblent nécessaires pour comprendre les événements moléculaires qui soutiennent la DMD (McArdle et al., 1995; Sweeney and Barton, 2000).

Au moment où nous avons commencé nos travaux, le poisson zèbre (*Danio rerio*, *Brachydanio rerio*) représentait un excellent modèle pour l'étude du développement des vertébrés (Kimmel, 1989, 1993; Driever et al., 1996), l'embryologie, l'analyse génétique ainsi qu'un modèle émergeant pour les maladies humaines (Detrich et al., 1999; Zon, 1999; Barbazuk et al., 2000; Dodd et al., 2000).

Le poisson zèbre présente un développement extra-utérin rapide de plus, les embryons sont transparents ce qui permet la visualisation facile des organes internes tels que le cerveau, le cœur, les muscles.

Le développement du muscle strié et du système nerveux central du poisson zèbre ont été décrit en détail et des criblages génétiques ont permis d'identifier un certain nombre de gènes impliqués dans ces développements. (van Raamsdonk et al., 1978; van Raamsdonk et al., 1982a; van Raamsdonk et al., 1982b; Felsenfeld et al., 1990; Westerfield et al., 1990; Driever et al., 1994; Kuwada, 1995; Haffter et al., 1996).

Du fait de la forte homologie entre les différents gènes des vertébrés, un gène provenant d'un organisme fournit un accès facile à son homologue dans une autre espèce. Ainsi, l'identification et la caractérisation de gènes affectés par ces mutations fourniront des informations pour la compréhension

des mécanismes qui sous-tendent le développement musculaire chez le poisson zèbre mais aussi chez les autres espèces vertébrées.

Afin de pouvoir utiliser le poisson zèbre comme modèle d'étude de la DMD nous avons dans un premier temps caractérisé l'expression de deux produits du gène DMD : la dystrophine (Dp427) et la Dp71 à partir d'embryon de 24h ainsi que de différents tissus du poisson adulte.

Résultats

A partir des approches expérimentales de biologie moléculaire nous avons pu mettre en évidence la présence du messenger de la Dp427 et de la Dp71 chez le poisson zèbre. En utilisant des amorces spécifiques nous avons observé la présence de ces deux produits du gène DMD dans de nombreux tissus tels que le cerveau, les yeux, le cœur, les intestins. Le muscle n'exprimant que la Dp427 comme il a déjà été montré dans de nombreuses espèces.

La présence des protéines issus de ces transcrits a été confirmée dans l'embryon entier par la technique d'immunoempreinte.

De plus nous avons caractérisé des épissages alternatifs des exons 71 et 73 pour la Dp427 et des exons 66-68 pour la Dp71. Les transcrits résultant de ces épissages présentent un schéma d'expression tissu spécifique.

Ces résultats nous permettent de valider la poisson zèbre comme un nouveau modèle qui nous permettra d'étudier le rôle des dystrophines au cours du développement et leurs implications dans des pathologies telles que la DMD.

Ce travail a dait l'objet de la publicaiton suivant :

Molecular cloning and characterization of dystrophin and Dp71, two products of the Duchenne Muscular Dystrophy gene, in zebrafish

Francisco Bolaños-Jiménez, **Agnès Bordais**, Martine Behra, Uwe Strähle, Dominique Mornet, José Sahel, Alvaro Rendón

Gene, 2001, 274, 217–226.

1.2. La dystrophine et la Dp71 lors du développement du poisson zèbre

Le développement précoce de l'œil et de la rétine du poisson zèbre a été décrit en détail (Schmitt and Dowling, 1994; Connaughton and Dowling, 1998; Stenkamp et al., 2000). Comme chez les autres vertébrés, les cellules ganglionnaires sont les premiers neurones à apparaître dans la rétine de ce poisson (Nawrocki et al., 1985). A 60 heures après fertilisation la majorité des neurones de la rétine centrale sont déjà présents et organisés en trois couches nucléaires séparées par deux couches plexiformes. Cette stratification devient plus distincte aux dernières étapes du développement (figure 21). L'anatomie de la rétine continue à se développer jusqu'à trois jours après fertilisation (Branchek and Bremiller, 1984). Ceci fournit une opportunité de comparer le développement de la structure de la rétine avec la physiologie visuelle et le comportement. De nombreuses mutations génétiques affectant le développement de la rétine du poisson zèbre ont été étudiées (Karlstrom et al., 1996). De plus, des études sur le développement et la maturation du système visuel ont été réalisées afin de déterminer le moment où le poisson zèbre commence à voir et à déplacer les yeux (Easter and Nicola, 1996). Toutes ces caractéristiques font du poisson zèbre un modèle précieux non seulement pour l'étude du développement du système visuel mais aussi du système nerveux central en général.

De nombreuses techniques d'étude de la vision au préalable utilisées chez la souris ont pu être transposées au poisson zèbre (Bilotta and Saszik, 2001; Saszik and Bilotta, 2001). Des tests optocinétiques ainsi que des enregistrements électrorétinographiques ont permis d'isoler certains mutants (Brockhoff et al., 1995). Ainsi plusieurs mutants présentant des troubles de l'ERG ont pu être identifiés dont le mutant *nrc* (no optokinetic response c). Ce mutant présente une onde b de l'ERG significativement retardée et diminuée en amplitude (Allwardt et al., 2001; Van Epps et al., 2001). De plus, les auteurs suggèrent que le phénotype des mutants *nrc* présente de forte similarité avec celui des patients DMD.

Comme nous l'avons précédemment exposé, la Dp427 et la Dp71 sont exprimées dans différents tissus chez le poisson zèbre. Afin de pouvoir utiliser le poisson zèbre comme modèle d'étude pour la compréhension de l'implication des dystrophines dans la mise en place de la transmission de

l'information visuelle au sein de la rétine nous avons analysé l'expression des dystrophines au cours du développement.

Résultats

Une étude par hybridation *in situ* nous a permis d'observer une expression différentielle spatio/temporelle de la Dp427 et de la Dp71 lors du développement embryonnaire du poisson zèbre.

Le transcrit de la Dp71 est le premier détecté à 9-10h après fertilisation au départ dans la notochorde puis au cours du développement dans tout l'axe du corps, alors que le transcrit de la Dp427 s'exprime plus tardivement et uniquement dans les somites.

Nous avons aussi étudié l'expression de la Dp71 au cours du développement de la rétine. A 36h après fertilisation le transcrit de la Dp71 est exprimé par toutes les cellules précurseurs de la rétine puis son expression se restreint à la couche nucléaire interne et la couche des cellules ganglionnaires quand la majorité des cellules de la rétine sont différenciées.

Suite à ces observations nous suggérons que la Dp71 exercerait des fonctions essentielles pour le développement embryonnaire du poisson zèbre.

Ce travail a dait l'objet de la publicaiton suivant :

Dystrophin and Dp71, two products of the DMD gene, show a different pattern of expression during embryonic development in zebrafish

Francisco Bolaños-Jiménez, **Agnès Bordais**, Martine Behra, Uwe Strähle, José Sahel, Alvaro Rendón
Mechanisms of Development, 2001, 102, 239-241.

1.3. Depuis

Nous avons été les premiers à montrer l'expression de la dystrophine chez le poisson zèbre et ce dans plusieurs organes dont le muscle, le cerveau et la rétine. Tout comme nous l'avons observé, Chambers et coll. (Chambers et al., 2001) montrent la présence d'un orthologue du gène de la dystrophine humaine codant pour une protéine localisée dans le sarcolemme.

De plus, des expériences d'immunoempreintes et d'immunomarquages montrent la présence de protéines du complexe associé à la dystrophine (Parsons et al., 2002; Chambers et al., 2003; Guyon et al., 2003). Ainsi, le β -dystroglycane, les β -, δ - et γ -sarcoglycanes sont exprimés au niveau du sarcolemme. L'injection de Morpholino dystrophine conduit à des perturbations du développement embryonnaire concomitantes à une diminution de la dystrophine et des sarcoglycanes. Une mutation du gène de la dystrophine observée chez le mutant *sapje* entraîne une dégénérescence musculaire ainsi que des altérations membranaires dans le muscle embryonnaire du poisson zèbre (Bassett et al., 2003). Ces résultats ont été récemment confirmés après injection dans l'embryon de poisson zèbre de siRNAs ciblant le gène de la dystrophine (Dodd et al., 2004). Ces observations fournissent la première évidence génétique *in vivo* que la dystrophine peut être nécessaire non seulement pour la morphologie normale et l'ultrastructure des attachements (jonctions myotendineuses) des muscles des vertébrés comme il a été observé chez la souris *mdx*, mais aussi pour leur stabilité, et que la rupture de ces attachements pourrait conduire à une dystrophie musculaire progressive.

Le modèle standard des laboratoires est la souris. Or ces animaux sont nocturnes et présentent une faible vision des couleurs à la différence de l'homme. En effet, la rétine est dominée par les photorécepteurs bâtonnets et les cônes ne représentent que 3% du nombre des photorécepteurs. C'est pourquoi ces dernières années de nombreuses investigations au niveau de la rétine de poisson zèbre ont été réalisées.

Parce que la rétine du poisson zèbre se développe rapidement et que l'embryon est transparent, Kay et coll. (Kay et al., 2004) ont été capable de surveiller de façon continue le développement de la couche plexiforme interne de la rétine, de sa formation jusqu'à la ségrégation en « sublaminae » ON et OFF.

C'est ainsi la première observation *in vivo* du « comment » des couches synaptiques distinctes surviennent dans une structure du système nerveux central durant le développement. La mise en place des circuits neuronaux, l'organisation des différents types cellulaires au sein de la rétine (Connaughton et al., 2004; Glass and Dahm, 2004) suggèrent que le poisson zèbre représente un excellent modèle d'étude afin de mieux comprendre les bases génétiques impliquées dans le développement de la rétine (Pujic and Malicki, 2004) ainsi que les désordres visuels observés chez l'homme (Goldsmith and Harris, 2003).

La présence des glycoprotéines du complexe associé à la dystrophine ainsi que les nombreuses études réalisées au niveau de la rétine de poisson zèbre nous laisse penser que celui-ci serait un excellent modèle pour l'étude de la neurotransmission de l'information visuelle et plus particulièrement de la compréhension du phénotype ERG observé chez les patients DMD.

2. La souris

2.3. Conséquences de l'inactivation du produit court du gène DMD, la Dp71

Il existe de nombreux modèles murins de la DMD. La souris *mdx*, chez laquelle seule l'expression de la Dp427 est affectée, ne présente pas de phénotype ERG, comme il a été observé chez l'homme. De même des enregistrements électrorétinographiques réalisés chez les souches *mdx^{2cv}* (n'exprime pas la Dp427 et la Dp260), *mdx^{4cv}* et la souris invalidée pour l'exon 52 (n'expriment pas la Dp427, la Dp260 et la Dp140) ne présentent qu'une augmentation du temps de latence de l'onde b (Kameya et al., 1997; Pillers et al., 1999b). Seule la souche *mdx^{3cv}* déficiente pour tous les produits du gène DMD présente un phénotype ERG similaire à celui observé chez les patients DMD (Pillers et al., 1995). Ces observations indiquent que l'expression de la Dp71 à elle seule pourrait être suffisante pour maintenir une onde b normale en l'absence des autres produits du gène.

Comme nous l'avons précédemment énoncé, plusieurs types cellulaires tels que les cellules bipolaires, les cellules gliales de Müller ou bien les neurones de 3^{ème} ordre peuvent intervenir dans la génération ou la modulation de l'onde b de l'ERG. Dans des sections de rétines de souris et de rat, on a observé que la Dp71 est localisée dans les CGM autour des vaisseaux sanguins ainsi que de la membrane limitante interne (MLI) (Howard et al., 1998b; Sarig et al., 1999). Dans la rétine de rat, Claudepierre et coll., (Claudepierre et al., 2000a; Claudepierre et al., 2000b) ont mis en évidence dans les CGM l'expression de la Dp71 associée à un complexe glycoprotéique constitué entre autre du β -dystroglycane, du δ -sarcoglycane, de l' α -dystrobrevine et de l' α 1-syntrophine.

A partir de ces données, nous nous sommes intéressés à la participation de la Dp71 dans la neurotransmission de l'information rétinienne et plus particulièrement à son rôle dans le phénotype ERG. Pour cela nous avons utilisé la souris invalidée pour la Dp71 obtenue en collaboration avec les Prs D. Yaffe et U. Nudel de l'Institut Weizmann (Israël).

Nous avons analysé l'effet de l'absence de la Dp71 sur les enregistrements ERG scotopiques et sur la localisation des membres du complexe β -dystroglycane et utrophine. Nous avons ensuite observé les conséquences de la perte de la Dp71 sur la localisation et la fonctionnalité des canaux potassiques Kir4.1, sur la localisation des canaux AQP4, ainsi que sur le maintien de l'intégrité de la rétine après un phénomène ischémique.

Résultats

Nous n'observons pas chez la souris invalidée pour la Dp71 de modifications de l'amplitude de l'onde b mais uniquement une diminution de l'amplitude de l'onde a de l'ERG.

La perte de la Dp71 est accompagnée d'une augmentation du niveau d'expression de l'utrophine mais aussi d'une diminution du β -dystroglycane localisé dans la membrane limitante interne. A partir des résultats d'immunomarquages utilisant un anticorps reconnaissant tous les produits du gène DMD nous avons pu déduire que le marquage observé dans la CPE de la souris invalidée pour la Dp71 correspondait à l'expression de la Dp427, de la Dp260 et de la Dp140.

La perte de la Dp71 perturbe l'agrégation à la membrane des CGM des canaux AQP4 et Kir4.1 mais n'altère en rien l'activité de ces derniers.

Suite à une ischémie transitoire réalisée chez les souris contrôles et invalidées pour la Dp71 nous observons une diminution du nombre de cellules ganglionnaires chez la souris invalidée.

Conclusion

Nous avons montré chez la souris invalidée pour la Dp71 que cette protéine à elle seule n'est pas responsable du phénotype ERG, nous en avons déduit que l'absence concomitante de la Dp427, de la Dp260, de la Dp140 et de la Dp71 est nécessaire pour provoquer une diminution de l'amplitude de l'onde b chez la souris.

Nous avons mis en évidence le rôle de la Dp71 dans la localisation à la MLI du β -dystroglycane, ainsi que son rôle dans l'agrégation des canaux Kir4.1 et AQP4 dans les pieds ainsi que dans les extensions des CGM venant autour des vaisseaux. Cependant, l'implication du produit court du gène DMD dans la localisation des canaux Kir4.1 ne semble pas perturber leur fonctionnalité et donc les flux potassiques traversant la CGM ne participeraient pas au phénotype ERG observé chez la souris *mdx*^{3cv}. Par contre, la diminution du nombre de cellules ganglionnaires suite à une ischémie suggèrent que la Dp71 jouerait un rôle important dans les processus qui préviennent les dommages des cellules ganglionnaires causés par l'ischémie.

Bien que la Dp71 et la CGM ne semblent pas intervenir dans le phénotype ERG ces résultats suggèrent tout de même un rôle essentiel de la Dp71 dans l'agrégation et la stabilisation de protéines importantes pour le contrôle de l'homéostasie rétinienne, les canaux Kir4.1 et AQP4.

Ces résultats ont alors orienté mon travail vers la CPE afin de définir si les protéines Dp427, Dp260 et Dp140 sont exprimées du côté pré- ou post-synaptique mais aussi de connaître la localisation cellulaire de chacune d'entre elles afin de pouvoir par la suite déterminer leurs rôles dans le phénotype ERG.

Ce travail a fait l'objet de la publication suivante :

Targeted inactivation of dystrophin gene product Dp71: phenotypic impact in mouse retina

Cécile Dalloz*, Rachel Sarig*, Patrice Fort*, David Yaffe, **Agnès Bordais**, Thomas Pannicke, Jens Grosche, Dominique Mornet, Andreas Reichenbach, José Sahel, Uri Nudel and Alvaro Rendon
Human Molecular Genetics, 2003, Vol. 12, No. 13 1543–1554

* The authors wish it to be known that, in their opinion, the first three authors should be regarded as joint First Authors.

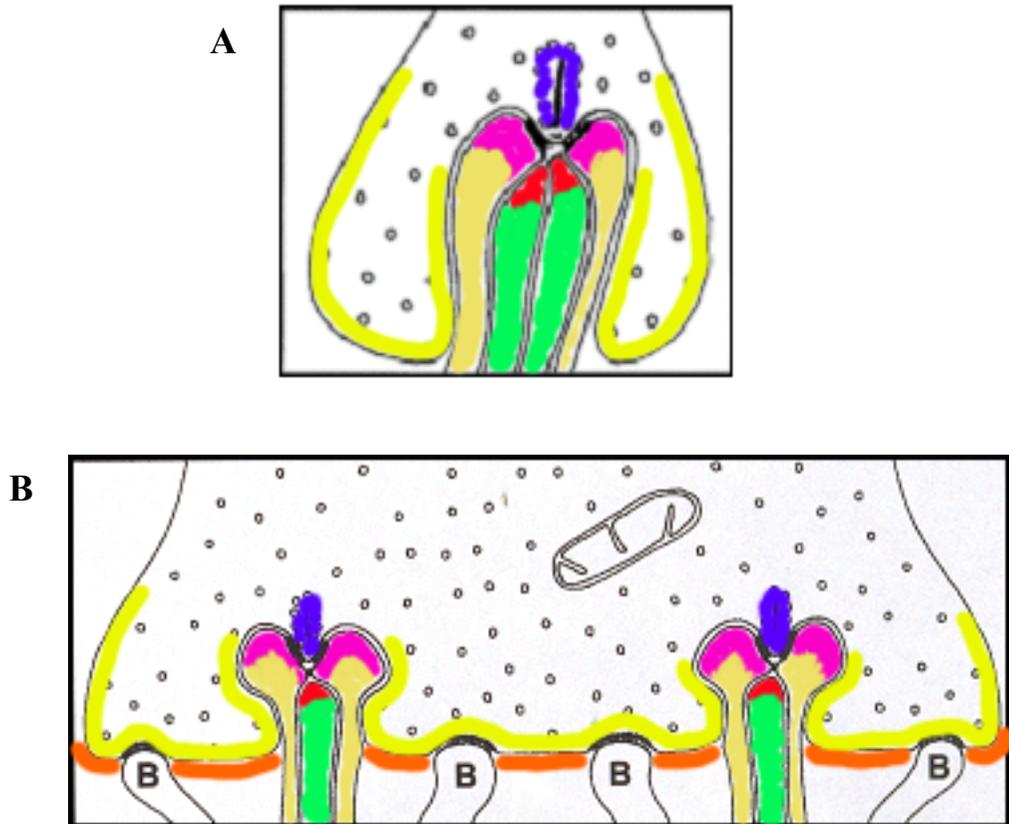


Figure 22: Représentation schématique d'un sphérule de bâtonnet (A) et d'un pédicule d'un cône (B).

Localisation des différents immunomarquages.

Marqueurs des terminaisons des photorécepteurs: synaptotagmine, PSD 95, PMCA (vert clair); PNA (orange); ruban synaptique: Bassoon (bleu).

Marqueurs des extrémités dendritiques des cellules horizontales: calbindine (beige) et VIAAT (violet)

Marqueurs des extrémités dendritiques des cellules bipolaires: PKC α et G0 α (vert), mGluR6 (rouge).

2.2. Localisation des produits du gène DMD dans la couche plexiforme externe

En partant de l'hypothèse que le rôle fonctionnel des dystrophines serait d'assurer le maintien et l'agrégation des récepteurs aux neurotransmetteurs et/ou canaux ioniques dans la synapse, il nous est apparu essentiel dans un premier temps de préciser leur localisation cellulaire au niveau des différents types cellulaires qui forment la CPE.

Une des difficultés majeures pour réaliser ce projet vient du fait que les dystrophines : produits du gène DMD, sont dues à l'activation de promoteurs internes et ne diffèrent entre elles que par de courtes séquences spécifiques, il est donc pratiquement impossible de disposer d'anticorps spécifiques pour chaque protéine. Afin de contourner cette difficulté nous avons établi la stratégie expérimentale suivante : une première approche a consisté à étudier par des techniques de biologie moléculaire et de biochimie l'expression de chacun des messagers des produits du gène DMD chez une souris mutante présentant une dégénérescence des photorécepteurs. La deuxième approche par microscopie confocale et électronique en utilisant des anticorps pan-spécifiques qui reconnaissent toutes les dystrophines a été réalisée dans le but de localiser l'ensemble des dystrophines dans la CPE (figure 22).

Résultats

L'étude de l'expression des dystrophines dans la rétine de souris C3H donne des premières évidences sur la localisation des dystrophines dans la CPE. En effet par RT-PCR en temps réel, technique qui permet de quantifier le niveau d'expression des messagers ainsi que par immunoprecipitation nous avons pu observer que le niveau d'expression de la Dp260 diminue très fortement après dégénérescence des bâtonnets à 35 jours post-natal alors que celui pour la Dp427 et Dp140 diminue très légèrement. Ces trois protéines sont encore exprimées à 90 jours post-natal.

Nous avons utilisé pour l'étude en microscopie confocale par double immunomarquage des anticorps anti-dystrophines et des anticorps spécifiques dirigés contre des protéines marqueurs de chaque type cellulaire. Nous avons observé que le marquage ponctué dystrophine coïncide avec les pieds des photorécepteurs cônes et bâtonnets. On ne distingue pas de colocalisation mais une « contra-position » du marquage dystrophine avec les extrémités dendritiques des cellules horizontales. Le marquage dystrophine se superpose avec les extrémités dendritiques des cellules bipolaires à bâtonnets et cellules bipolaires ON. Un agrandissement du double marquage dystrophines-mGluR6 présente une différence entre les deux marquages suggérant un marquage dystrophine plus central encadré par le marquage mGluR6.

La technique de microscopie confocale a ses limites de résolution et ne nous permet pas de dire avec certitude si les dystrophines sont exprimées du côté pré et/ou postsynaptique, nous avons donc réalisé une étude en microscopie électronique. En utilisant un anticorps pan-spécifique (reconnaît tous les produits du gène DMD) nous avons pu observé un marquage dystrophines dans les terminaisons des photorécepteurs cônes et bâtonnets mais pas dans les extrémités dendritiques des neurones secondaires. Cependant, nous n'avons pas non plus obtenu de marquage des extrémités des cellules bipolaires marquées avec l'anticorps anti-PKC α (marqueur des cellules bipolaires).

Conclusion

Malgré le fait que nous ne puissions pas encore apporter une réponse claire à la question qui était de savoir de quel côté de la synapse sont exprimées les dystrophines Dp427, Dp260 et Dp140, l'ensemble de ces données nous laisse tout de même entrevoir la possibilité que ces dystrophines pourraient être exprimées dans les terminaisons des photorécepteurs ainsi que dans les extrémités dendritiques des cellules bipolaires.

Le fait d'avoir un marquage contrôle positif en microscopie électronique nous permettrait de répondre définitivement à la question, en considérant alors que toutes les conditions sont réunies pour obtenir un marquage dystrophine postsynaptique s'il a lieu d'y être.

Des phénomènes de compensation tels que l'augmentation du niveau d'expression de l'utrophine en l'absence de la Dp71 complique la compréhension du phénotype ERG observé chez la souris. Il nous a alors semblé nécessaire de chercher un nouveau modèle d'étude. Nous avons alors choisi d'utiliser la rétine de porc de part le fait de son émergence comme modèle d'étude de nombreuses maladies neurodégénératives de la rétine.

Ce travail fait l'objet de la publication suivante :

Detailed Localization of Dystrophins Dp427, Dp260 and Dp140 at the Outer Plexiform Layer of Mouse Retina

Agnès Bordais, Yannick Schwab, Carolina Varela-Rodriguez, Patrice Fort, Colette Hindelang, Valerie Messent, Serge Picaud, José-Alain Sahel, Michel Roux and Alvaro Rendon

Article préparé pour soumission à Journal of Comparative Neurology

3. Le porc

Caractérisation des produits du gène DMD chez le porc

Du fait des différences entre les circuitières rétiniennes des modèles de souris et de l'homme, les conclusions concernant l'implication des dystrophines dans l'organisation synaptique et le phénotype ERG observé chez les patients DMD sont difficiles à établir.

La rétine de porc a été utilisée comme modèle de nombreuses pathologies humaines (Glovinsky et al., 1991; Quigley et al., 1995; Vickers et al., 1995; Dkhissi et al., 1999), telles que des maladies neurodégénératives comme l'ischémie rétinienne, la rétinopathie diabétique et le glaucome.

C'est pourquoi afin de pouvoir comprendre l'importance des dystrophines dans la neurotransmission visuelle, nous nous sommes intéressés dans un premier temps à étudier l'expression des dystrophines et protéines associées dans la rétine de porc.

Résultats

Après amplification puis séquençage de fragments du messenger de la dystrophine, nous avons pu reconstituer la totalité du messenger codant pour cette protéine. La séquence protéique déduite de ce messenger présente les différents domaines fonctionnels décrits pour cette protéine chez l'homme. De plus, les séquences spécifiques de chacun des produits courts Dp260, Dp140 et Dp71 ont pu être séquencées. Tout comme il a déjà été observé chez l'homme dans le SNC et le poisson zèbre, le transcrit de la Dp71 présente plusieurs épissages alternatifs.

L'analyse par immuno-empreinte confirme la présence de ces différentes protéines dans la rétine de porc.

Des expériences d'immunomarquages en utilisant un anticorps pan-spécifique dystrophines a permis d'établir leur localisation dans la couche plexiforme externe, autour des vaisseaux ainsi que dans la

couche limitante interne aussi bien dans la rétine de porc que dans la rétine humaine. Ces résultats sont en accord avec les observations faites dans plusieurs autres espèces.

Des doubles marquages dystrophine-marqueur cellulaire présentent une colocalisation du marquage dystrophine avec un marqueur des pieds des cônes ainsi que des extrémités dendritiques des cellules bipolaires.

De plus, des expériences de doubles marquages montrent une colocalisation du marquage β -dystroglycane avec le marquage dystrophine alors que le marquage de l' α 1-syntrophine est aussi retrouvé dans la CPE mais diffère de celui des dystrophines.

Conclusion

Nous avons donc observé dans la rétine de porc l'expression des différents produits du gène DMD ainsi que la présence de deux membres du complexe glycoprotéique associé à la dystrophine. De plus, les résultats en microscopie confocale de double marquage suggèrent l'expression des dystrophines du côté présynaptique (photorécepteurs) mais aussi postsynaptique (cellules bipolaires).

Le fait que les marquages dystrophine et α 1-syntrophine ne soient pas identiques nous laisse supposer que l' α 1-syntrophine s'accrocherait à un complexe ne faisant pas intervenir les dystrophines.

Ces observations nous permettent d'établir une cartographie des dystrophines et nous serviront de bases à des études ultérieures. Les fortes homologues architecturales et physiologiques entre la rétine de porc et celle de l'homme nous permettront alors de transposer nos résultats à l'homme.

Ce travail fait l'objet de la publication suivante :

Characterization of a Novel Model to Study the Neurobiology of the Duchenne Muscular Dystrophy:
the Porcine Retina.

Agnès Bordais, Francisco Bolaños-Jimenez, Patrice Fort, Carolina Varela, José-Alain Sahel, Serge
Picaud and Alvaro Rendon

Article soumis à Neuromuscular Disorders

C. Discussion

Dans le but de comprendre l'implication des dystrophines dans la transmission de l'information visuelle nous nous sommes intéressés à déterminer l'expression et la localisation des produits du gène DMD au sein de la rétine. Pour cela nous avons utilisé plusieurs modèles animaux présentant certains avantages pour l'utilisation expérimentale mais aussi des limites dues à chaque espèce. Les études réalisées chez le poisson zèbre et le porc étaient fondamentales et nécessaires pour pouvoir les utiliser comme modèle de la DMD. De nombreuses études ayant déjà été réalisées pour les modèles rat et souris, il n'était alors plus nécessaire d'effectuer des travaux de valorisation.

En effet on savait que les différents produits du gène DMD s'expriment dans la rétine de rat et de souris. Il avait été montré la présence de la Dp427, Dp260 et Dp140 dans la couche plexiforme externe (CPE) et de la Dp71 dans les pieds et les extensions des CGM localisés autour des vaisseaux sanguins (CGM) et au niveau de la membrane limitante interne (Howard et al., 1998b; Claudepierre et al., 1999; Claudepierre et al., 2000b; Dalloz et al., 2003). Claudepierre et coll. (Claudepierre et al., 2000a), avaient montré l'existence d'un complexe macromoléculaire dans les CGM de rat associé à la Dp71 et composé par les dystroglycane, le δ -sarcoglycane, l' α -syntrophine et la dystrobrevine liant le cytosquelette d'actine et la matrice extra-cellulaire.

C'est à partir de ces données que nous avons travaillé avec les souris invalidée pour la Dp71 et nous avons montré que l'absence de cette protéine n'induisait pas le phénotype ERG. Cependant, nous avons mis en évidence une perturbation de l'agrégation des canaux Kir4.1 et AQP4 dans les pieds ainsi que dans les extensions des CGM venant autour des vaisseaux, mais également une importante diminution du niveau d'expression d'AQP4 chez la souris invalidée pour la Dp71 montrant ainsi, que la Dp71 pourrait participer à la formation d'un complexe macromoléculaire permettant l'agrégation de ces canaux au niveau de la membrane des CGM (Dalloz et al., 2003).

Par ailleurs, différentes protéines du complexe associé à la dystrophine sont exprimées au travers de la rétine et pourraient être impliquées dans des fonctions distinctes, certaines pouvant provoquer des perturbations de la transmission de l'information visuelle. Dalloz et coll., (Dalloz et al., 2001) ont

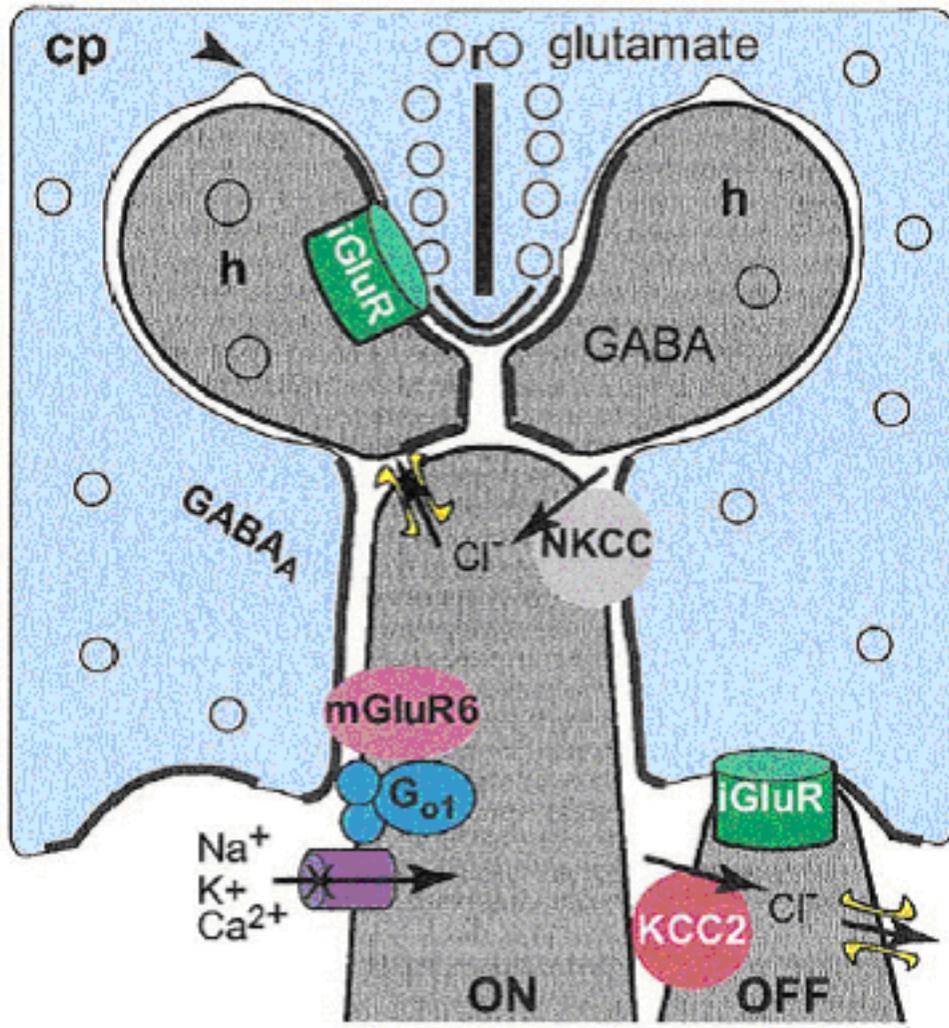


Figure 23: Représentation schématique d'un pédicule d'un cône. Localisation des différentes protéines de signalisation pouvant intervenir dans la modulation de la neurotransmission de l'information visuelle. D'après Vardi et coll., 2001.

observé la présence de l' α - et du β -dystroglycane, de l' α 1-syntrophine et de l' α -dystrobrevine au sein de la CPE, de même nous avons montré l'expression du β -dystroglycane et de l' α 1-syntrophine dans la CPE de la rétine de porc (Bordais et al., 2004a). La présence des dystrophines dans la CPE sans doute des deux côtés de la synapse (Bordais et al., 2004b) nous permet de formuler l'hypothèse que celles-ci pourraient assurer le maintien, l'agrégation et/ou la stabilisation de « protéines clés » dans la transmission de l'information telles que des récepteurs, transporteurs et/ou autres canaux ioniques à des sites spécifiques des membranes cellulaires pré- et post-synaptiques (figure 23).

En effet, depuis le processus d'exocytose jusqu'à la réception du neurotransmetteur sur les récepteurs post-synaptiques en passant par la modulation de l'information au niveau des voies transversales, toutes ces étapes ont leur importance dans la transmission de l'information visuelle et la génération de l'onde b de l'ERG. Il existe deux voies de transmission de l'information : une voie verticale (glutamatergique) placée tout le long de la rétine et deux voies transversales (GABAergiques) qui traversent la rétine au niveau des couches plexiformes (Wassle and Boycott, 1991; Boycott and Wassle, 1999; Kolb and Marshak, 2003). Mais il faut garder à l'esprit que si on élimine ou bloque la voie glutamatergique principale bien évidemment on n'obtient plus de transmission de l'information et donc plus d'onde b de l'ERG.

La transmission de l'information entre les photorécepteurs, cellules bipolaires et cellules horizontales est dépendante dans un premier temps de l'expression au niveau de la CPE de canaux calciques voltage-dépendant qui joueraient un rôle dans la libération du glutamate (Firth et al., 2001; Morgans, 2001; Morgans et al., 2001; Ball et al., 2002). Puisque dans la rétine de poulet il a été montré une colocalisation du β -dystroglycane avec les canaux calciques voltage-dépendants de type N (Blank et al., 1997) on peut imaginer que le complexe dystrophine-protéines associées pourrait intervenir dans la régulation de l'homéostasie calcique en assurant la localisation dans les terminaisons des photorécepteurs de ces canaux calciques modulant ainsi la libération du glutamate.

Les cellules bipolaires ON détectent le glutamate libéré par les bâtonnets et les cônes par l'intermédiaire du récepteur métabotrope mGluR6 (Nakajima et al., 1993; Nomura et al., 1994).

Une souche de souris chez laquelle l'expression de ce récepteur a été invalidée présente une absence de l'onde b de l'ERG (Masu et al., 1995). Il en est de même pour la souris invalidée pour la protéine Go_{α} associée aux récepteurs mGluR6 (Vardi, 1998; Dhingra et al., 2000). Le récepteur mGluR6 a un rôle pivot dans la transmission de l'information visuelle, d'où son importance dans l'hypothèse du rôle des cellules bipolaires ON dans la génération de l'onde b. Il a été évoqué à plusieurs reprises dans la littérature le possible rôle des dystrophines dans l'ancrage du récepteur mGluR6. De part les résultats de Kameya qui a montré que l'absence des dystrophines ne semblait pas influencer la localisation de mGluR6 et nos propres résultats, il est clair qu'il est nécessaire d'étudier en détail la localisation de mGluR6 chez les souris *mdx*^{3cv}.

L'information glutamatergique est aussi perçue par les récepteurs ionotropiques exprimés par les dendrites des cellules bipolaires OFF qui font contact à la base des terminaisons des photorécepteurs (Vardi et al., 2002). De nombreuses études dans la CPE ont montré la présence de différentes sous-unités des récepteurs au glutamate (GluRs) dans les extrémités dendritiques des cellules bipolaires mais aussi des cellules horizontales (Vardi et al., 2000; Brandstatter and Hack, 2001; Haverkamp et al., 2001a, b; Schultz et al., 2001). On peut donc imaginer que les dystrophines pourraient jouer un rôle dans l'ancrage de ces récepteurs.

Les principales causes pouvant affecter la transmission rétinienne dans la fente synaptique sont liées à la transmission glutamatergique entre les photorécepteurs et cellules bipolaires. La régulation de la concentration du glutamate au niveau de la synapse est cruciale pour la rétine, une trop grande concentration devient excitotoxique (Harada et al., 1998). Cette régulation intra- et extracellulaire se fait d'une part par l'intermédiaire des transporteurs d'acides aminés excitateurs dénommés EAAT (excitatory amino acid transporter). Les transporteurs EAAT2 (GLT1) et EAAT5 sont exprimés dans les photorécepteurs et les cellules bipolaires (Rauen et al., 1996). Une perturbation de leur localisation aurait pour conséquence une augmentation de la concentration du glutamate extracellulaire qui induirait un état d'hyperpolarisation des cellules bipolaires ON, et vraisemblablement une réduction de l'onde b de l'ERG. C'est pourquoi il serait important pour vérifier cette hypothèse d'étudier l'expression et l'activité de ces transporteurs du glutamate dans la souris *mdx*^{3cv}.

Burris et coll. (2002) décrivent une relation particulière entre les CGM et les terminaisons des cônes. Les prolongements provenant du tronc central de la CGM entourent les pieds des photorécepteurs dans la CPE où les CGM éliminent les substances neuroactives (K^+ , GABA, glutamate) libérés dans l'espace extracellulaire par l'activité synaptique (Newman et al., 1984; Witkovsky et al., 1985; Newman and Reichenbach, 1996).

Dans les CGM, la régulation de la concentration du glutamate fait intervenir le transporteur du glutamate GLAST (EAAT1) Rauen et coll., 1998) dont l'invalidation entraîne une diminution de l'amplitude de l'onde b ainsi qu'une réduction des potentiels oscillatoires (Harada et al., 1998). Mais on peut écarter ici le rôle de GLAST dans le phénotype ERG puisque celui-ci n'est pas délocalisé chez la souris invalidée pour la Dp71 (communication personnelle, Patrice Fort).

Cependant, il peut aussi exister des altérations de la voie transversale GABAergique qui résultent en une altération de l'onde b de l'ERG. En effet, il a été observé la présence des sous-unités $\rho 1$, $\rho 2$ et $\rho 3$ du récepteur GABA_C dans la CPE de rétine de mammifères (Enz et al., 1996; Wassle et al., 1998) permettant une modulation de l'information visuelle par les cellules horizontales. Les récepteurs GABA_A et GABA_C ont été mis en évidence dans les pédicules des cônes mais pas directement associés avec la triade ou la jonction basale (Vardi et al., 1992; Greferath et al., 1994; Enz et al., 1996; Vardi et al., 1998). Ces récepteurs ont également été trouvés exprimés dans des cultures de photorécepteurs de porc et de souris (Picaud et al., 1998; Pattnaik et al., 2000). Il a été montré que l'onde b peut être diminuée soit par l'administration extracellulaire de GABA exogène, soit par l'augmentation de GABA endogène. Ces résultats suggèrent que les récepteurs du GABA peuvent contribuer à la génération de l'onde b de l'ERG. En conséquence, si les dystrophines sont responsables de la localisation de ces récepteurs, leurs délocalisations pourraient engendrer des anomalies dans la transmission synaptique.

Dans les CGM de rétine humaine, Biedermann et coll. (Biedermann et al., 2004) ont mis en évidence des récepteurs GABA_A localisés dans les pieds, au niveau du soma et dans les zones en contact avec les photorécepteurs *in situ*. Des récepteurs GABA_A de type neuronaux avaient déjà été décrits dans les astrocytes (von Blankenfeld and Kettenmann, 1991; Fraser et al., 1994). Ces récepteurs pourraient

permettre la régulation du pH comme il a été suggéré pour les astrocytes de l'hippocampe (Fraser et al., 1995) ou bien faciliteraient la recapture du GABA par les transporteurs. Une perturbation de la localisation de ces récepteurs pourrait aussi avoir une répercussion dans la transmission synaptique.

Comme nous venons de la souligner à plusieurs reprises la modulation de la neurotransmission rétinienne n'est pas due à des facteurs exprimés dans un seul type cellulaire mais pourrait être le résultat de la participation des différents types cellulaires de la rétine. Le fait qu'on observe une localisation différentielles des produits du gène DMD et qu'il faille une mutation qui élimine tous ces produits est en faveur de cette hypothèse.

Nous avons analysé une série d'hypothèses concernant le rôle des dystrophines dans la localisation et l'ancrage des protéines impliquées dans la transmission synaptique dans la rétine.

Cependant dans le muscle squelettique, la Dp427 lie le cytosquelette d'actine à la chaîne $\alpha 2$ de la laminine de la MEC via le complexe glycoprotéique (Rybakova et al., 1996). On pourrait imaginer que le complexe dystroglycane présent dans la CPE pourrait servir de lien entre les dystrophines et la MEC. En effet, les chaînes $\beta 2$, $\alpha 4$ et $\gamma 3$ de la laminine sont exprimées à différents niveaux dans la rétine dont la CPE. Ces protéines ne sont pas à proprement parlé des protéines de « communication » telles que des récepteurs ou canaux et pourtant l'absence de la chaîne $\beta 2$ de la laminine entraîne une désorganisation de la CPE se traduisant par une forte diminution de l'amplitude de l'onde b (Libby et al., 1999). Parce que des mutations du gène de la dystrophine et de la chaîne $\beta 2$ de la laminine produisent des atténuations similaires de l'onde b, et que la CPE contient au moins une partie des membres du complexe associé à la dystrophine qui permettent le lien entre la dystrophine et les laminines, nous pouvons spéculer que ces deux composants agiraient de concert dans la différenciation et la stabilisation des synapses des photorécepteurs.

D. Perspectives

Nous venons de montrer que les dystrophines pourraient être exprimées dans les terminaisons des photorécepteurs cônes et bâtonnets mais aussi du côté post-synaptique dans les extrémités dendritiques des cellules bipolaires. Nous avons alors suggéré l'existence d'un complexe échafaudage permettant la mise en place, l'agrégation et/ou le maintien à la membrane de protéines candidates précédemment décrites impliquées dans des troubles de la neurotransmission visuelle. Nous avons aussi soulevé l'hypothèse d'une interaction des dystrophines et protéines associées non pas avec ces protéines candidates mais avec des éléments de la matrice extra-cellulaire (MEC) permettant alors de maintenir une structure synaptique fonctionnelle.

1. Rôle du complexe dystrophines-protéines associées dans la transduction du signal visuel

Les données accumulées sur la localisation dans la rétine des différents produits du gène DMD nous semblent suffisantes pour nous focaliser à présent sur le rôle fonctionnel des dystrophines dans la CPE et leurs implications dans la neurotransmission de l'information visuelle.

Pour cela, nous possédons au laboratoire plusieurs souches de souris mutantes ou transgéniques dont les souris *mdx* et *mdx^{3cv}* ou les souris invalidées pour la Dp260 et la Dp71. Ces différentes souches nous permettront de préciser les répercussions de la perte d'une ou plusieurs dystrophines sur l'expression, la localisation et la fonction de récepteurs, transporteurs et/ou canaux ioniques impliqués dans la génération de l'onde b.

Ainsi, à partir d'immunomarquages nous allons pouvoir observer l'influence de la perte d'un ou plusieurs produits du gène DMD sur la localisation à la membrane, dans un site stratégique de la synapse, des protéines impliquées dans la neurotransmission. *Mais le fait d'avoir une localisation correcte ne donne aucune indication sur la fonction physiologique des protéines candidates. C'est pourquoi nous allons étudier l'impact de la perte d'une dystrophine sur la physiologie de la rétine en*

réalisant des études électrophysiologiques sur des tranches de rétine qui maintiennent alors l'intégrité de la synapse ou bien sur des cellules isolées. Toutes ces études seront réalisées en parallèle chez la souris sauvage et les souris mutantes ou transgéniques. Nous pourrions alors tester les réponses au GABA et au glutamate dans les cellules bipolaires ou les photorécepteurs par la technique de *patch clamp* en configuration cellule entière sur des tranches de rétine. Plusieurs résultats sont envisageables :

- soit nous obtenons une différence dans les réponses des photorécepteurs et dans ce cas nous réaliserons une étude sur les photorécepteurs isolés (cette étude étant plus difficile à réaliser car les photorécepteurs chez la souris sont petits)
- soit nous obtenons une différence dans les réponses des cellules bipolaires et dans ce cas nous réaliserons une étude sur les cellules bipolaires isolées. En plus du GABA et du glutamate nous pourrions tester les concentrations intracellulaires de chlorure par la technique de patch clamp perforé afin de contrôler la fonctionnalité des transporteurs chlorure NKCC et KCC2
- soit nous obtenons une différence dans les réponses des deux côtés de la synapse

Suivant les résultats obtenus sur cellules isolées nous pourrions alors émettre plusieurs hypothèses :

- si nous obtenons une différence dans les réponses des cellules bipolaires isolées et/ou des photorécepteurs isolés nous pourrions alors suggérer que les dystrophines auraient un rôle à jouer dans le maintien ou l'agrégation à la membrane des cellules bipolaires et/ou des photorécepteurs de protéines impliquées dans les réponses glutamate- ou GABAergiques
- si nous n'obtenons pas de variations dans les réponses aussi bien pour les cellules bipolaires que pour les photorécepteurs isolés alors que nous en avons une dans les tranches de rétine nous pourrions alors suggérer que l'intégrité de la synapse pourrait être altérée chez les souris mutantes ou transgéniques et donc que les variations de neurotransmission seraient dues à la synapse dans sa globalité et non pas à un type cellulaire en particulier. A partir de ce raisonnement nous pouvons suggérer que le contexte synaptique influence les fonctions physiologiques des éléments pré- et postsynaptiques.

Des phénomènes de compensation comme ceux observés chez la souris invalidée pour la Dp71 rendent difficile la compréhension du phénotype ERG c'est pourquoi nous utiliserons des modèles animaux (précédemment décrits dans nos travaux) autres que la souris.

Comme nous l'avons déjà énoncé le poisson zèbre est un excellent modèle d'étude du développement. Le fait que celui-ci présente un développement extra-utérin rapide mais surtout que les tests optocinétiques et les enregistrements électrorétinographiques ont pu être transposés à cette espèce nous permettent d'envisager de nouvelles techniques d'approche pour la compréhension du rôle des dystrophines dans la neurotransmission visuelle.

Ainsi, l'injection de Morpholino dystrophine (Guyon et al., 2003) tout comme celle de siRNAs (short interfering RNAs) ciblant le gène de la dystrophine (Dodd et al., 2004) conduisent à des perturbations du développement embryonnaire concomitantes à une diminution de l'expression de la dystrophine et des sarcoglycanes. Il serait alors intéressant d'observer quels pourraient être les effets de ces injections sur les autres membres du complexe et les protéines candidates ainsi que leur impact sur la mise en place de la synapse et de la physiologie de la rétine. De plus, des tests comportementaux ainsi que des ERG pourraient être réalisés afin de visualiser dans son ensemble l'influence de la perte d'un des produits du gène DMD sur la transmission nerveuse à travers la rétine.

Depuis quelques années la rétine de porc est considérée comme un modèle d'étude de pathologies de la rétine humaine (Glovinsky et al., 1991; Quigley et al., 1995; Vickers et al., 1995; Dkhissi et al., 1999). Tout comme, (Wehrwein et al., 2004) Wehrwein et coll. (2004) qui ont isolés par la technique « d'immuno-panning » les cellules ganglionnaires de rétine de porc, Balse et coll. (Balse et al., 2004) ont réussi à séparer sélectivement les cônes des autres types cellulaires. L'utilisation des cellules en culture primaire nous permettrait alors de pouvoir identifier et travailler sur le complexe dystrophine-protéines associées par des techniques biochimiques.

De plus, le porc pourrait être utilisé comme modèle dans l'étude de la transmission nerveuse normale et/ou perturbée après blocage de l'expression de gène candidat par ajout d'oligonucléotides anti-sens ou iRNAs en organo-culture. Nous pourrions alors réaliser les mêmes études électrophysiologiques que celles exposées pour les souris.

2. Rôle du complexe dystrophines-protéines associées dans l'attachement à la matrice extra-cellulaire

Comme nous l'avons déjà énoncé, l'absence de la chaîne $\beta 2$ de la laminine entraîne une diminution de l'amplitude de l'onde b de l'ERG (Libby et al., 1999). Il paraît alors essentiel d'étudier la localisation des chaînes $\beta 2$, $\alpha 4$ et $\gamma 3$ exprimées dans la CPE, en absence d'un ou plusieurs produits du gène DMD chez les souris mutantes mais aussi dans les autres modèles animaux. Ces expériences nous permettront alors de confirmer ou d'infirmer l'hypothèse d'une interaction entre le complexe d'échafaudage et les éléments de la matrice.

Ces études nous permettront alors de structurer l'intégralité des échafaudages protéiques nécessaires à la transmission de l'information visuelle au niveau de la zone synaptique photorécepteurs-neurones secondaires. Elles nous apporteront des réponses essentielles à la compréhension de la fonction des dystrophines dans la neurotransmission rétinienne et donc par conséquent de leur rôle dans le phénotype ERG.

Ces observations pourraient alors être extrapolées au SNC dans son intégralité et permettraient alors de mieux comprendre le rôle de ces complexes dans d'autres pathologies liées à des troubles de la neurotransmission synaptique.

Nos résultats et observations se situent aux frontières de la recherche fondamentale et de la recherche clinique. En effet, nous pensons que toute avancée dans les connaissances des fonctions des dystrophines aurait des répercussions dans la recherche des thérapies dans les affections dues à la Dystrophie Musculaire de Duchenne.

E. Références bibliographiques

- Acosta R, Montanez C, Fuentes-Mera L, Gonzalez E, Gomez P, Quintero-Mora L, Mornet D, Alvarez-Salas LM, Cisneros B (2004) Dystrophin Dp71 is required for neurite outgrowth in PC12 cells. *Exp Cell Res* 296:265-275.
- Adam G, Matus A (1996) Role of actin in the organisation of brain postsynaptic densities. *Brain Res Mol Brain Res* 43:246-250.
- Adams ME, Mueller HA, Froehner SC (2001) In vivo requirement of the alpha-syntrophin PDZ domain for the sarcolemmal localization of nNOS and aquaporin-4. *J Cell Biol* 155:113-122.
- Adams ME, Butler MH, Dwyer TM, Peters MF, Murnane AA, Froehner SC (1993) Two forms of mouse syntrophin, a 58 kd dystrophin-associated protein, differ in primary structure and tissue distribution. *Neuron* 11:531-540.
- Adams ME, Kramarcy N, Krall SP, Rossi SG, Rotundo RL, Sealock R, Froehner SC (2000) Absence of alpha-syntrophin leads to structurally aberrant neuromuscular synapses deficient in utrophin. *J Cell Biol* 150:1385-1398.
- Ahn AH, Kunkel LM (1993) The structural and functional diversity of dystrophin. *Nat Genet* 3:283-291.
- Ahn AH, Kunkel LM (1995) Syntrophin binds to an alternatively spliced exon of dystrophin. *J Cell Biol* 128:363-371.
- Ahn AH, Freener CA, Gussoni E, Yoshida M, Ozawa E, Kunkel LM (1996) The three human syntrophin genes are expressed in diverse tissues, have distinct chromosomal locations, and each bind to dystrophin and its relatives. *J Biol Chem* 271:2724-2730.
- Ahn AH, Yoshida M, Anderson MS, Feener CA, Selig S, Hagiwara Y, Ozawa E, Kunkel LM (1994) Cloning of human basic A1, a distinct 59-kDa dystrophin-associated protein encoded on chromosome 8q23-24. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:4446-4450.
- Aleman V, Osorio B, Chavez O, Rendon A, Mornet D, Martinez D (2001) Subcellular localization of Dp71 dystrophin isoforms in cultured hippocampal neurons and forebrain astrocytes. *Histochem Cell Biol* 115:243-254.
- Allamand V, Campbell KP (2000) Animal models for muscular dystrophy: valuable tools for the development of therapies. *Hum Mol Genet* 9:2459-2467.
- Allwardt BA, Lall AB, Brockerhoff SE, Dowling JE (2001) Synapse formation is arrested in retinal photoreceptors of the zebrafish nrc mutant. *J Neurosci* 21:2330-2342.

- Ambrose HJ, Blake DJ, Nawrotzki RA, Davies KE (1997) Genomic organization of the mouse dystrobrevin gene: comparative analysis with the dystrophin gene. *Genomics* 39:359-369.
- Amiry-Moghaddam M, Williamson A, Palomba M, Eid T, de Lanerolle NC, Nagelhus EA, Adams ME, Froehner SC, Agre P, Ottersen OP (2003a) Delayed K⁺ clearance associated with aquaporin-4 mislocalization: phenotypic defects in brains of alpha-syntrophin-null mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:13615-13620.
- Amiry-Moghaddam M, Otsuka T, Hurn PD, Traystman RJ, Haug FM, Froehner SC, Adams ME, Neely JD, Agre P, Ottersen OP, Bhardwaj A (2003b) An alpha-syntrophin-dependent pool of AQP4 in astroglial end-feet confers bidirectional water flow between blood and brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:2106-2111.
- Anderson JT, Rogers RP, Jarrett HW (1996) Ca²⁺-calmodulin binds to the carboxyl-terminal domain of dystrophin. *J Biol Chem* 271:6605-6610.
- Araishi K, Sasaoka T, Imamura M, Noguchi S, Hama H, Wakabayashi E, Yoshida M, Hori T, Ozawa E (1999) Loss of the sarcoglycan complex and sarcospan leads to muscular dystrophy in beta-sarcoglycan-deficient mice. *Hum Mol Genet* 8:1589-1598.
- Attwell D, Barbour B, Szatkowski M (1993) Nonvesicular release of neurotransmitter. *Neuron* 11: 401-407.
- Austin RC, Howard PL, D'Souza VN, Klamut HJ, Ray PN (1995) Cloning and characterization of alternatively spliced isoforms of Dp71. *Hum Mol Genet* 4:1475-1483.
- Austin RC, Morris GE, Howard PL, Klamut HJ, Ray PN (2000) Expression and synthesis of alternatively spliced variants of Dp71 in adult human brain. *Neuromuscul Disord* 10:187-193.
- Austin RC, Fox JE, Werstuck GH, Stafford AR, Bulman DE, Dally GY, Ackerley CA, Weitz JI, Ray PN (2002) Identification of Dp71 isoforms in the platelet membrane cytoskeleton. Potential role in thrombin-mediated platelet adhesion. *J Biol Chem* 277:47106-47113.
- Awatramani G, Wang J, Slaughter MM (2001) Amacrine and ganglion cell contributions to the electroretinogram in amphibian retina. *Vis Neurosci* 18:147-156.
- Balasubramanian S, Fung ET, Huganir RL (1998) Characterization of the tyrosine phosphorylation and distribution of dystrobrevin isoforms. *FEBS Lett* 432:133-140.

- Ball SL, Powers PA, Shin HS, Morgans CW, Peachey NS, Gregg RG (2002) Role of the beta(2) subunit of voltage-dependent calcium channels in the retinal outer plexiform layer. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43:1595-1603.
- Balse E, Tessier LH, Fuchs C, Forster V, Sahel J, Picaud S (2004) Purification of mammalian cone photoreceptors by lectin panning and their increased survival in glia-conditioned medium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* in press.
- Bar S, Barnea E, Levy Z, Neuman S, Yaffe D, Nudel U (1990) A novel product of the Duchenne muscular dystrophy gene which greatly differs from the known isoforms in its structure and tissue distribution. *Biochem J* 272:557-560.
- Barbazuk WB, Korf I, Kadavi C, Heyen J, Tate S, Wun E, Bedell JA, McPherson JD, Johnson SL (2000) The syntenic relationship of the zebrafish and human genomes. *Genome Res* 10:1351-1358.
- Barnea E, Zuk D, Simantov R, Nudel U, Yaffe D (1990) Specificity of expression of the muscle and brain dystrophin gene promoters in muscle and brain cells. *Neuron* 5:881-888.
- Barresi R, Moore SA, Stolle CA, Mendell JR, Campbell KP (2000) Expression of gamma - sarcoglycan in smooth muscle and its interaction with the smooth muscle sarcoglycan-sarcospan complex. *J Biol Chem* 275:38554-38560.
- Bartoli M, Ramarao MK, Cohen JB (2001) Interactions of the rapsyn RING-H2 domain with dystroglycan. *J Biol Chem* 276:24911-24917.
- Bassett DI, Bryson-Richardson RJ, Daggett DF, Gautier P, Keenan DG, Currie PD (2003) Dystrophin is required for the formation of stable muscle attachments in the zebrafish embryo. *Development* 130:5851-5860.
- Bech-Hansen NT, Naylor MJ, Maybaum TA, Pearce WG, Koop B, Fishman GA, Mets M, Musarella MA, Boycott KM (1998) Loss-of-function mutations in a calcium-channel alpha1-subunit gene in Xp11.23 cause incomplete X-linked congenital stationary night blindness. *Nat Genet* 19:264-267.
- Bessou C, Giugia JB, Franks CJ, Holden-Dye L, Segalat L (1998) Mutations in the *Caenorhabditis elegans* dystrophin-like gene *dys-1* lead to hyperactivity and suggest a link with cholinergic transmission. *Neurogenetics* 2:61-72.
- Betto R, Senter L, Ceoldo S, Tarricone E, Biral D, Salviati G (1999) Ecto-ATPase activity of alpha-sarcoglycan (adhalin). *J Biol Chem* 274:7907-7912.

- Bewick GS, Young C, Slater CR (1996) Spatial relationships of utrophin, dystrophin, beta-dystroglycan and beta-spectrin to acetylcholine receptor clusters during postnatal maturation of the rat neuromuscular junction. *J Neurocytol* 25:367-379.
- Bewick GS, Nicholson LV, Young C, O'Donnell E, Slater CR (1992) Different distributions of dystrophin and related proteins at nerve-muscle junctions. *Neuroreport* 3:857-860.
- Biedermann B, Eberhardt W, Reichelt W (1994) GABA uptake into isolated retinal Muller glial cells of the guinea-pig detected electrophysiologically. *Neuroreport* 5:438-440.
- Biedermann B, Bringmann A, Franze K, Faude F, Wiedemann P, Reichenbach A (2004) GABA(A) receptors in Muller glial cells of the human retina. *Glia* 46:302-310.
- Bies RD, Phelps SF, Cortez MD, Roberts R, Caskey CT, Chamberlain JS (1992) Human and murine dystrophin mRNA transcripts are differentially expressed during skeletal muscle, heart, and brain development. *Nucleic Acids Res* 20:1725-1731.
- Billard C, Gillet P, Signoret JL, Uicaut E, Bertrand P, Fardeau M, Barthez-Carpentier MA, Santini JJ (1992) Cognitive functions in Duchenne muscular dystrophy: a reappraisal and comparison with spinal muscular atrophy. *Neuromuscul Disord* 2:371-378.
- Bilotta J, Saszik S (2001) The zebrafish as a model visual system. *Int J Dev Neurosci* 19:621-629.
- Blake DJ, Kroger S (2000) The neurobiology of duchenne muscular dystrophy: learning lessons from muscle? *Trends Neurosci* 23:92-99.
- Blake DJ, Tinsley JM, Davies KE (1996) Utrophin: a structural and functional comparison to dystrophin. *Brain Pathol* 6:37-47.
- Blake DJ, Hawkes R, Benson MA, Beesley PW (1999) Different dystrophin-like complexes are expressed in neurons and glia. *J Cell Biol* 147:645-658.
- Blake DJ, Nawrotzki R, Loh NY, Gorecki DC, Davies KE (1998) beta-dystrobrevin, a member of the dystrophin-related protein family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:241-246.
- Blake DJ, Tinsley JM, Davies KE, Knight AE, Winder SJ, Kendrick-Jones J (1995a) Coiled-coil regions in the carboxy-terminal domains of dystrophin and related proteins: potentials for protein-protein interactions. *Trends Biochem Sci* 20:133-135.
- Blake DJ, Schofield JN, Zuellig RA, Gorecki DC, Phelps SR, Barnard EA, Edwards YH, Davies KE (1995b) G-utrophin, the autosomal homologue of dystrophin Dp116, is expressed in sensory ganglia and brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:3697-3701.
- Blank M, Koulen P, Kroger S (1997) Subcellular concentration of beta-dystroglycan in photoreceptors and glial cells of the chick retina. *J Comp Neurol* 389:668-678.

- Blank M, Blake DJ, Kroger S (2002) Molecular diversity of the dystrophin-like protein complex in the developing and adult avian retina. *Neuroscience* 111:259-273.
- Blank M, Koulen P, Blake DJ, Kroger S (1999) Dystrophin and beta-dystroglycan in photoreceptor terminals from normal and mdx3Cv mouse retinae. *Eur J Neurosci* 11:2121-2133.
- Bolanos-Jimenez F, Bordais A, Behra M, Strahle U, Mornet D, Sahel J, Rendon A (2001) Molecular cloning and characterization of dystrophin and Dp71, two products of the Duchenne Muscular Dystrophy gene, in zebrafish. *Gene* 274:217-226.
- Bonet-Kerrache A, Fabbriozio E, Mornet D (1994) N-terminal domain of dystrophin. *FEBS Lett* 355:49-53.
- Bonnemann CG, Modi R, Noguchi S, Mizuno Y, Yoshida M, Gussoni E, McNally EM, Duggan DJ, Angelini C, Hoffman EP (1995) Beta-sarcoglycan (A3b) mutations cause autosomal recessive muscular dystrophy with loss of the sarcoglycan complex. *Nat Genet* 11:266-273.
- Bordais A, Bolaños-Jimenez F, Fort P, Varela-Rodriguez C, Sahel J-A, Picaud S, Rendon A (2004a) Characterization of a Novel Model to Study the Neurobiology of the Duchenne Muscular Dystrophy: the Porcine Retina. Article soumis à *Neuromuscular Disorders*.
- Bordais A, Schwab Y, Varela-Rodriguez C, Fort P, Hindelang C, Messent V, Picaud S, Sahel J-A, Roux M, Rendon A (2004b) Detailed Localization of Dystrophins Dp427, Dp260 and Dp140 at the Outer Plexiform Layer of Mouse Retina. pour soumission à *Journal of Comparative Neurology*.
- Bork P, Sudol M (1994) The WW domain: a signalling site in dystrophin? *Trends Biochem Sci* 19:531-533.
- Boyce FM, Beggs AH, Feener C, Kunkel LM (1991) Dystrophin is transcribed in brain from a distant upstream promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:1276-1280.
- Boycott B, Wassle H (1999) Parallel processing in the mammalian retina: the Proctor Lecture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40:1313-1327.
- Boycott BB, Dowling JE (1969) Organization of the primate retina: light microscopy. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 255:109-184.
- Boycott BB, Kolb H (1973) The connections between bipolar cells and photoreceptors in the retina of the domestic cat. *J Comp Neurol* 148:91-114.
- Boycott BB, Wassle H (1974) The morphological types of ganglion cells of the domestic cat's retina. *J Physiol* 240:397-419.

- Boycott BB, Wassle H (1991) Morphological Classification of Bipolar Cells of the Primate Retina. *Eur J Neurosci* 3:1069-1088.
- Boycott BB, Hopkins JM (1993) Cone synapses of a flat diffuse cone bipolar cell in the primate retina. *J Neurocytol* 22:765-778.
- Branchek T, Bremiller R (1984) The development of photoreceptors in the zebrafish, *Brachydanio rerio*. I. Structure. *J Comp Neurol* 224:107-115.
- Brandstatter JH, Hack I (2001) Localization of glutamate receptors at a complex synapse. The mammalian photoreceptor synapse. *Cell Tissue Res* 303:1-14.
- Brandstatter JH, Koulen P, Wassle H (1997) Selective synaptic distribution of kainate receptor subunits in the two plexiform layers of the rat retina. *J Neurosci* 17:9298-9307.
- Bredt DS, Snyder SH (1990) Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:682-685.
- Bredt DS, Hwang PM, Snyder SH (1990) Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. *Nature* 347:768-770.
- Brenman JE, Chao DS, Xia H, Aldape K, Bredt DS (1995) Nitric oxide synthase complexed with dystrophin and absent from skeletal muscle sarcolemma in Duchenne muscular dystrophy. *Cell* 82:743-752.
- Brenman JE, Chao DS, Gee SH, McGee AW, Craven SE, Santillano DR, Wu Z, Huang F, Xia H, Peters MF, Froehner SC, Bredt DS (1996) Interaction of nitric oxide synthase with the postsynaptic density protein PSD-95 and alpha1-syntrophin mediated by PDZ domains. *Cell* 84:757-767.
- Bresolin N, Castelli E, Comi GP, Felisari G, Bardoni A, Perani D, Grassi F, Turconi A, Mazzucchelli F, Gallotti D, et al. (1994) Cognitive impairment in Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord* 4:359-369.
- Brew H, Gray PT, Mobbs P, Attwell D (1986) Endfeet of retinal glial cells have higher densities of ion channels that mediate K⁺ buffering. *Nature* 324:466-468.
- Brew H, Attwell D (1987) Electrogenic glutamate uptake is a major current carrier in the membrane of axolotl retinal glial cells. *Nature* 327: 707-709.
- Brockhoff SE, Hurley JB, Janssen-Bienhold U, Neuhauss SC, Driever W, Dowling JE (1995) A behavioral screen for isolating zebrafish mutants with visual system defects. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:10545-10549.
- Brown KT (1968) The electroretinogram: its components and their origins. *Vision Res* 8:633-677.

- Brunig I, Suter A, Knuesel I, Luscher B, Fritschy JM (2002) GABAergic terminals are required for postsynaptic clustering of dystrophin but not of GABA(A) receptors and gephyrin. *J Neurosci* 22:4805-4813.
- Burris C, Klug K, Ngo IT, Sterling P, Schein S (2002a) How Muller glial cells in macaque fovea coat and isolate the synaptic terminals of cone photoreceptors. *J Comp Neurol* 453:100-111.
- Burris C, Klug K, Ngo IT, Sterling P, Schein S (2002b) How Muller glial cells in macaque fovea coat and isolate the synaptic terminals of cone photoreceptors. *J Comp Neurol* 453:100-111.
- Burton EA, Tinsley JM, Holzfeind PJ, Rodrigues NR, Davies KE (1999) A second promoter provides an alternative target for therapeutic up-regulation of utrophin in Duchenne muscular dystrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:14025-14030.
- Bushby KM, Appleton R, Anderson LV, Welch JL, Kelly P, Gardner-Medwin D (1995) Deletion status and intellectual impairment in Duchenne muscular dystrophy. *Dev Med Child Neurol* 37:260-269.
- Bussow H (1980) The astrocytes in the retina and optic nerve head of mammals: a special glia for the ganglion cell axons. *Cell Tissue Res* 206:367-378.
- Byers TJ, Lidov HG, Kunkel LM (1993) An alternative dystrophin transcript specific to peripheral nerve. *Nat Genet* 4:77-81.
- Byers TJ, Husain-Chishti A, Dubreuil RR, Branton D, Goldstein LS (1989) Sequence similarity of the amino-terminal domain of Drosophila beta spectrin to alpha actinin and dystrophin. *J Cell Biol* 109:1633-1641.
- Calkins DJ, Tsukamoto Y, Sterling P (1996) Foveal cones form basal as well as invaginating junctions with diffuse ON bipolar cells. *Vision Res* 36:3373-3381.
- Campanelli JT, Roberds SL, Campbell KP, Scheller RH (1994) A role for dystrophin-associated glycoproteins and utrophin in agrin-induced AChR clustering. *Cell* 77:663-674.
- Campbell KP (1995) Three muscular dystrophies: loss of cytoskeleton-extracellular matrix linkage. *Cell* 80:675-679.
- Campbell KP, Kahl SD (1989) Association of dystrophin and an integral membrane glycoprotein. *Nature* 338:259-262.

- Cao W, Henry MD, Borrow P, Yamada H, Elder JH, Ravkov EV, Nichol ST, Compans RW, Campbell KP, Oldstone MB (1998) Identification of alpha-dystroglycan as a receptor for lymphocytic choriomeningitis virus and Lassa fever virus. *Science* 282:2079-2081.
- Carr C, Fischbach GD, Cohen JB (1989) A novel 87,000-Mr protein associated with acetylcholine receptors in Torpedo electric organ and vertebrate skeletal muscle. *J Cell Biol* 109:1753-1764.
- Cartaud A, Coutant S, Petrucci TC, Cartaud J (1998) Evidence for in situ and in vitro association between beta-dystroglycan and the subsynaptic 43K rapsyn protein. Consequence for acetylcholine receptor clustering at the synapse. *J Biol Chem* 273:11321-11326.
- Cavaldesi M, Macchia G, Barca S, Defilippi P, Tarone G, Petrucci TC (1999) Association of the dystroglycan complex isolated from bovine brain synaptosomes with proteins involved in signal transduction. *J Neurochem* 72:1648-1655.
- Ceccarini M, Rizzo G, Rosa G, Chelucci C, Macioce P, Petrucci TC (1997) A splice variant of Dp71 lacking the syntrophin binding site is expressed in early stages of human neural development. *Brain Res Dev Brain Res* 103:77-82.
- Chabre M (1985) Trigger and amplification mechanisms in visual phototransduction. *Annu Rev Biophys Biophys Chem* 14:331-360.
- Chambers SP, Anderson LV, Maguire GM, Dodd A, Love DR (2003) Sarcoglycans of the zebrafish: orthology and localization to the sarcolemma and myosepta of muscle. *Biochem Biophys Res Commun* 303:488-495.
- Chambers SP, Dodd A, Overall R, Sirey T, Lam LT, Morris GE, Love DR (2001) Dystrophin in adult zebrafish muscle. *Biochem Biophys Res Commun* 286:478-483.
- Chan Y, Kunkel LM (1997) In vitro expressed dystrophin fragments do not associate with each other. *FEBS Lett* 410:153-159.
- Chan YM, Bonnemann CG, Lidov HG, Kunkel LM (1998) Molecular organization of sarcoglycan complex in mouse myotubes in culture. *J Cell Biol* 143:2033-2044.
- Chan-Ling T, Stone J (1991) Factors determining the migration of astrocytes into the developing retina: migration does not depend on intact axons or patent vessels. *J Comp Neurol* 303:375-386.
- Chao T. I, Henke A, Reichelt W, Eberhardt W, Reinhardt-Maelicke S, Reichenbach A (1994) Three distinct types of voltage-dependent K⁺ channels are expressed by Muller (glial) cells of the rabbit retina. *Pflugers Arch* 426: 51-60.

- Chao T. I, Skachkov S. N, Eberhardt W, Reichenbach A (1994) Na⁺ channels of Muller (glial) cells isolated from retinæ of various mammalian species including man. *Glia* 10: 173-185.
- Chao DS, Gorospe JR, Brenman JE, Rafael JA, Peters MF, Froehner SC, Hoffman EP, Chamberlain JS, Brecht DS (1996) Selective loss of sarcolemmal nitric oxide synthase in Becker muscular dystrophy. *J Exp Med* 184:609-618.
- Chavez O, Harricane MC, Aleman V, Dorbani L, Larroque C, Mornet D, Rendon A, Martinez-Rojas D (2000) Mitochondrial expression of a short dystrophin-like product with molecular weight of 71 kDa. *Biochem Biophys Res Commun* 274:275-280.
- Chelly J, Kaplan JC, Maire P, Gautron S, Kahn A (1988) Transcription of the dystrophin gene in human muscle and non-muscle tissue. *Nature* 333:858-860.
- Chelly J, Gilgenkrantz H, Lambert M, Hamard G, Chafey P, Recan D, Katz P, de la Chapelle A, Koenig M, Ginjaar IB, et al. (1990) Effect of dystrophin gene deletions on mRNA levels and processing in Duchenne and Becker muscular dystrophies. *Cell* 63:1239-1248.
- Chockalingam PS, Gee SH, Jarrett HW (1999) Pleckstrin homology domain 1 of mouse alpha 1-syntrophin binds phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Biochemistry* 38:5596-5602.
- Chun MH, Grunert U, Martin PR, Wassle H (1996) The synaptic complex of cones in the fovea and in the periphery of the macaque monkey retina. *Vision Res* 36:3383-3395.
- Chung W, Campanelli JT (1999) WW and EF hand domains of dystrophin-family proteins mediate dystroglycan binding. *Mol Cell Biol Res Commun* 2:162-171.
- Cibis GW, Fitzgerald KM (2001) The negative ERG is not synonymous with nightblindness. *Trans Am Ophthalmol Soc* 99:171-175; discussion 175-176.
- Cibis GW, Fitzgerald KM, Harris DJ, Rothberg PG, Rupani M (1993) The effects of dystrophin gene mutations on the ERG in mice and humans. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 34:3646-3652.
- Cisneros B, Rendon A, Genty V, Aranda G, Marquez F, Mornet D, Montanez C (1996) Expression of dystrophin Dp71 during PC12 cell differentiation. *Neurosci Lett* 213:107-110.
- Claudepierre T, Dalloz C, Mornet D, Matsumura K, Sahel J, Rendon A (2000a) Characterization of the intermolecular associations of the dystrophin-associated glycoprotein complex in retinal Muller glial cells. *J Cell Sci* 113 Pt 19:3409-3417.

- Claudepierre T, Rodius F, Frasson M, Fontaine V, Picaud S, Dreyfus H, Mornet D, Rendon A (1999) Differential distribution of dystrophins in rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40:1520-1529.
- Claudepierre T, Mornet D, Pannicke T, Forster V, Dalloz C, Bolanos F, Sahel J, Reichenbach A, Rendon A (2000b) Expression of Dp71 in Muller glial cells: a comparison with utrophin- and dystrophin-associated proteins. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41:294-304.
- Clements PJ, Sargan DR, Gould DJ, Petersen-Jones SM (1996) Recent advances in understanding the spectrum of canine generalised progressive retinal atrophy. *J Small Anim Pract* 37:155-162.
- Coffey AJ, Roberts RG, Green ED, Cole CG, Butler R, Anand R, Giannelli F, Bentley DR (1992) Construction of a 2.6-Mb contig in yeast artificial chromosomes spanning the human dystrophin gene using an STS-based approach. *Genomics* 12:474-484.
- Connaughton VP, Dowling JE (1998) Comparative morphology of distal neurons in larval and adult zebrafish retinas. *Vision Res* 38:13-18.
- Connaughton VP, Graham D, Nelson R (2004) Identification and morphological classification of horizontal, bipolar, and amacrine cells within the zebrafish retina. *J Comp Neurol* 477:371-385.
- Copenhagen DR, Jahr CE (1989) Release of endogenous excitatory amino acids from turtle photoreceptors. *Nature* 341:536-539.
- Coral-Vazquez R, Cohn RD, Moore SA, Hill JA, Weiss RM, Davisson RL, Straub V, Barresi R, Bansal D, Hrstka RF, Williamson R, Campbell KP (1999) Disruption of the sarcoglycan-sarcospan complex in vascular smooth muscle: a novel mechanism for cardiomyopathy and muscular dystrophy. *Cell* 98:465-474.
- Corrado K, Mills PL, Chamberlain JS (1994) Deletion analysis of the dystrophin-actin binding domain. *FEBS Lett* 344:255-260.
- Crawford GE, Faulkner JA, Crosbie RH, Campbell KP, Froehner SC, Chamberlain JS (2000) Assembly of the dystrophin-associated protein complex does not require the dystrophin COOH-terminal domain. *J Cell Biol* 150:1399-1410.
- Crosbie RH, Heighway J, Venzke DP, Lee JC, Campbell KP (1997) Sarcospan, the 25-kDa transmembrane component of the dystrophin-glycoprotein complex. *J Biol Chem* 272:31221-31224.
- Crosbie RH, Lebakken CS, Holt KH, Venzke DP, Straub V, Lee JC, Grady RM, Chamberlain JS, Sanes JR, Campbell KP (1999) Membrane targeting and stabilization of sarcospan is mediated by the sarcoglycan subcomplex. *J Cell Biol* 145:153-165.

- Cueva JG, Haverkamp S, Reimer RJ, Edwards R, Wassle H, Brecha NC (2002) Vesicular gamma-aminobutyric acid transporter expression in amacrine and horizontal cells. *J Comp Neurol* 445:227-237.
- Dacheux RF, Raviola E (1986) The rod pathway in the rabbit retina: a depolarizing bipolar and amacrine cell. *J Neurosci* 6:331-345.
- Dalloz C, Claudepierre T, Rodius F, Mornet D, Sahel J, Rendon A (2001) Differential distribution of the members of the dystrophin glycoprotein complex in mouse retina: effect of the mdx(3Cv) mutation. *Mol Cell Neurosci* 17:908-920.
- Dalloz C, Sarig R, Fort P, Yaffe D, Bordais A, Pannicke T, Grosche J, Mornet D, Reichenbach A, Sahel J, Nudel U, Rendon A (2003) Targeted inactivation of dystrophin gene product Dp71: phenotypic impact in mouse retina. *Hum Mol Genet* 12:1543-1554.
- De Becker I, Riddell DC, Dooley JM, Tremblay F (1994) Correlation between electroretinogram findings and molecular analysis in the Duchenne muscular dystrophy phenotype. *Br J Ophthalmol* 78:719-722.
- Deconinck AE, Rafael JA, Skinner JA, Brown SC, Potter AC, Metzinger L, Watt DJ, Dickson JG, Tinsley JM, Davies KE (1997a) Utrophin-dystrophin-deficient mice as a model for Duchenne muscular dystrophy. *Cell* 90:717-727.
- Deconinck N, Tinsley J, De Backer F, Fisher R, Kahn D, Phelps S, Davies K, Gillis JM (1997b) Expression of truncated utrophin leads to major functional improvements in dystrophin-deficient muscles of mice. *Nat Med* 3:1216-1221.
- Dennis CL, Tinsley JM, Deconinck AE, Davies KE (1996) Molecular and functional analysis of the utrophin promoter. *Nucleic Acids Res* 24:1646-1652.
- Detrich HW, 3rd, Westerfield M, Zon LI (1999) Overview of the Zebrafish system. *Methods Cell Biol* 59:3-10.
- Dhingra A, Lyubarsky A, Jiang M, Pugh EN, Jr., Birnbaumer L, Sterling P, Vardi N (2000) The light response of ON bipolar neurons requires G α_o . *J Neurosci* 20:9053-9058.
- Dixon AK, Tait TM, Campbell EA, Bobrow M, Roberts RG, Freeman TC (1997) Expression of the dystrophin-related protein 2 (Drp2) transcript in the mouse. *J Mol Biol* 270:551-558.
- Dkhissi O, Chanut E, Wasowicz M, Savoldelli M, Nguyen-Legros J, Minvielle F, Versaux-Botteri C (1999) Retinal TUNEL-positive cells and high glutamate levels in vitreous

- humor of mutant quail with a glaucoma-like disorder. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40:990-995.
- Dodd A, Chambers SP, Love DR (2004) Short interfering RNA-mediated gene targeting in the zebrafish. *FEBS Lett* 561:89-93.
- Dodd A, Curtis PM, Williams LC, Love DR (2000) Zebrafish: bridging the gap between development and disease. *Hum Mol Genet* 9:2443-2449.
- Dodson HC, Piper TA, Clarke JD, Quinlivan RM, Dickson G (1995) Dystrophin expression in the hair cells of the cochlea. *J Neurocytol* 24:625-632.
- Dong CJ, Hare WA (2000) Contribution to the kinetics and amplitude of the electroretinogram b-wave by third-order retinal neurons in the rabbit retina. *Vision Res* 40:579-589.
- Dong CJ, Hare WA (2002) GABA_c feedback pathway modulates the amplitude and kinetics of ERG b- wave in a mammalian retina in vivo. *Vision Res* 42:1081-1087.
- Dorbani-Mamine L, Stoeckel ME, Jancsik V, Ayad G, Rendon A (1998) Dystrophins in neurohypophysial lobe of normal and dehydrated rats: immunolocalization and biochemical characterization. *Neuroreport* 9:3583-3587.
- Dowling JE (1987) *The Retina: an Approachable Part of the Brain*. Cambridge: Belknap.
- Dowling JE, Boycott BB (1966) Organization of the primate retina: electron microscopy. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 166:80-111.
- Dowling JE, Ehinger B (1975) Synaptic organization of the amine-containing interplexiform cells of the goldfish and Cebus monkey retinas. *Science* 188:270-273.
- Draviam R, Billington L, Senchak A, Hoffman EP, Watkins SC (2001) Confocal analysis of the dystrophin protein complex in muscular dystrophy. *Muscle Nerve* 24:262-272.
- Drenckhahn D, Holbach M, Ness W, Schmitz F, Anderson LV (1996) Dystrophin and the dystrophin-associated glycoprotein, beta-dystroglycan, co-localize in photoreceptor synaptic complexes of the human retina. *Neuroscience* 73:605-612.
- Driever W, Stemple D, Schier A, Solnica-Krezel L (1994) Zebrafish: genetic tools for studying vertebrate development. *Trends Genet* 10:152-159.
- Driever W, Solnica-Krezel L, Schier AF, Neuhauss SC, Malicki J, Stemple DL, Stainier DY, Zwartkruis F, Abdelilah S, Rangini Z, Belak J, Boggs C (1996) A genetic screen for mutations affecting embryogenesis in zebrafish. *Development* 123:37-46.
- D'Souza VN, Nguyen TM, Morris GE, Karges W, Pillers DA, Ray PN (1995) A novel dystrophin isoform is required for normal retinal electrophysiology. *Hum Mol Genet* 4:837-842.

- Duclos F, Straub V, Moore SA, Venzke DP, Hrstka RF, Crosbie RH, Durbeej M, Lebakken CS, Ettinger AJ, van der Meulen J, Holt KH, Lim LE, Sanes JR, Davidson BL, Faulkner JA, Williamson R, Campbell KP (1998) Progressive muscular dystrophy in alpha-sarcoglycan-deficient mice. *J Cell Biol* 142:1461-1471.
- Durbeej M, Jung D, Hjalt T, Campbell KP, Ekblom P (1997) Transient expression of Dp140, a product of the Duchenne muscular dystrophy locus, during kidney tubulogenesis. *Dev Biol* 181:156-167.
- Durbeej M, Henry MD, Ferletta M, Campbell KP, Ekblom P (1998) Distribution of dystroglycan in normal adult mouse tissues. *J Histochem Cytochem* 46:449-457.
- Durbeej M, Larsson E, Ibraghimov-Beskrovnaya O, Roberds SL, Campbell KP, Ekblom P (1995) Non-muscle alpha-dystroglycan is involved in epithelial development. *J Cell Biol* 130:79-91.
- Dwyer TM, Froehner SC (1995) Direct binding of Torpedo syntrophin to dystrophin and the 87 kDa dystrophin homologue. *FEBS Lett* 375:91-94.
- Easter SS, Jr., Nicola GN (1996) The development of vision in the zebrafish (*Danio rerio*). *Dev Biol* 180:646-663.
- Emery AE (1993) Duchenne muscular dystrophy--Meryon's disease. *Neuromuscul Disord* 3:263-266.
- Enigk RE, Maimone MM (1999) Differential expression and developmental regulation of a novel alpha-dystrobrevin isoform in muscle. *Gene* 238:479-488.
- Enz R, Brandstatter JH, Wassle H, Bormann J (1996) Immunocytochemical localization of the GABA_A receptor rho subunits in the mammalian retina. *J Neurosci* 16:4479-4490.
- Ervasti JM, Campbell KP (1991) Membrane organization of the dystrophin-glycoprotein complex. *Cell* 66:1121-1131.
- Ervasti JM, Burwell AL, Geissler AL (1997) Tissue-specific heterogeneity in alpha-dystroglycan sialoglycosylation. Skeletal muscle alpha-dystroglycan is a latent receptor for *Vicia villosa* agglutinin b4 masked by sialic acid modification. *J Biol Chem* 272:22315-22321.
- Ervasti JM, Ohlendieck K, Kahl SD, Gaver MG, Campbell KP (1990) Deficiency of a glycoprotein component of the dystrophin complex in dystrophic muscle. *Nature* 345:315-319.

- Ettinger AJ, Feng G, Sanes JR (1997) epsilon-Sarcoglycan, a broadly expressed homologue of the gene mutated in limb-girdle muscular dystrophy 2D. *J Biol Chem* 272:32534-32538.
- Euler T, Wassle H (1995) Immunocytochemical identification of cone bipolar cells in the rat retina. *J Comp Neurol* 361:461-478.
- Euler T, Schneider H, Wassle H (1996) Glutamate responses of bipolar cells in a slice preparation of the rat retina. *J Neurosci* 16:2934-2944.
- Fabrizio E, Leger J, Anjal M, Leger JJ, Mornet D (1993) Monoclonal antibodies targeted against the C-terminal domain of dystrophin or utrophin. *FEBS Lett* 322:10-14.
- Fabrizio E, Latouche J, Rivier F, Hugon G, Mornet D (1995) Re-evaluation of the distributions of dystrophin and utrophin in sciatic nerve. *Biochem J* 312 (Pt 1):309-314.
- Fabrizio E, Pons F, Robert A, Hugon G, Bonet-Kerrache A, Mornet D (1994) The dystrophin superfamily: variability and complexity. *J Muscle Res Cell Motil* 15:595-606.
- Fabrizio E, Rivier F, Bonet-Kerrache A, Robert A, Echenne B, Rendon A, Mornet D, Hugon G (1997) Dystrophin superfamily complexes are different in muscle and the nervous system. *J Peripher Nerv Syst* 2:133-142.
- Famiglietti EV, Jr. (1981) Functional architecture of cone bipolar cells in mammalian retina. *Vision Res* 21:1559-1563.
- Feener CA, Koenig M, Kunkel LM (1989) Alternative splicing of human dystrophin mRNA generates isoforms at the carboxy terminus. *Nature* 338:509-511.
- Felsenfeld AL, Walker C, Westerfield M, Kimmel C, Streisinger G (1990) Mutations affecting skeletal muscle myofibril structure in the zebrafish. *Development* 108:443-459.
- Finn DM, Ohlendieck K (1997) Rabbit brain and muscle isoforms containing the carboxy-terminal domain of 427 kDa skeletal muscle dystrophin exhibit similar biochemical properties. *Neurosci Lett* 222:25-28.
- Firth SI, Morgan IG, Boelen MK, Morgans CW (2001) Localization of voltage-sensitive L-type calcium channels in the chicken retina. *Clin Experiment Ophthalmol* 29:183-187.
- Fitzgerald KM, Cibis GW, Giambone SA, Harris DJ (1994) Retinal signal transmission in Duchenne muscular dystrophy: evidence for dysfunction in the photoreceptor/depolarizing bipolar cell pathway. *J Clin Invest* 93:2425-2430.

- Fitzgerald KM, Cibis GW, Gettel AH, Rinaldi R, Harris DJ, White RA (1999) ERG phenotype of a dystrophin mutation in heterozygous female carriers of Duchenne muscular dystrophy. *J Med Genet* 36:316-322.
- Fletcher EL, Hack I, Brandstatter JH, Wassle H (2000) Synaptic localization of NMDA receptor subunits in the rat retina. *J Comp Neurol* 420:98-112.
- Flucher BE, Daniels MP (1989) Distribution of Na⁺ channels and ankyrin in neuromuscular junctions is complementary to that of acetylcholine receptors and the 43 kd protein. *Neuron* 3:163-175.
- Fraser DD, Mudrick-Donnon LA, MacVicar BA (1994) Astrocytic GABA receptors. *Glia* 11:83-93.
- Fraser DD, Duffy S, Angelides KJ, Perez-Velazquez JL, Kettenmann H, MacVicar BA (1995) GABAA/benzodiazepine receptors in acutely isolated hippocampal astrocytes. *J Neurosci* 15:2720-2732.
- Frigeri A, Nicchia GP, Verbavatz JM, Valenti G, Svelto M (1998) Expression of aquaporin-4 in fast-twitch fibers of mammalian skeletal muscle. *J Clin Invest* 102:695-703.
- Frigeri A, Nicchia GP, Repetto S, Bado M, Minetti C, Svelto M (2002) Altered aquaporin-4 expression in human muscular dystrophies: a common feature? *Faseb J* 16:1120-1122.
- Frigeri A, Nicchia GP, Nico B, Quondamatteo F, Herken R, Roncali L, Svelto M (2001) Aquaporin-4 deficiency in skeletal muscle and brain of dystrophic mdx mice. *Faseb J* 15:90-98.
- Fritschy JM, Schweizer C, Brunig I, Luscher B (2003) Pre- and post-synaptic mechanisms regulating the clustering of type A gamma-aminobutyric acid receptors (GABAA receptors). *Biochem Soc Trans* 31:889-892.
- Froehner SC (1984) Peripheral proteins of postsynaptic membranes from Torpedo electric organ identified with monoclonal antibodies. *J Cell Biol* 99:88-96.
- Froehner SC, Adams ME, Peters MF, Gee SH (1997) Syntrophins: modular adapter proteins at the neuromuscular junction and the sarcolemma. *Soc Gen Physiol Ser* 52:197-207.
- Froehner SC, Murnane AA, Tobler M, Peng HB, Sealock R (1987) A postsynaptic Mr 58,000 (58K) protein concentrated at acetylcholine receptor-rich sites in Torpedo electroplaques and skeletal muscle. *J Cell Biol* 104:1633-1646.
- Galbiati F, Volonte D, Chu JB, Li M, Fine SW, Fu M, Bermudez J, Pedemonte M, Weidenheim KM, Pestell RG, Minetti C, Lisanti MP (2000) Transgenic

- overexpression of caveolin-3 in skeletal muscle fibers induces a Duchenne-like muscular dystrophy phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:9689-9694.
- Gallego A (1971) Horizontal and amacrine cells in the mammal's retina. *Vision Res Suppl* 3:33-50.
- Gee SH, Montanaro F, Lindenbaum MH, Carbonetto S (1994) Dystroglycan-alpha, a dystrophin-associated glycoprotein, is a functional agrin receptor. *Cell* 77:675-686.
- Gee SH, Madhavan R, Levinson SR, Caldwell JH, Sealock R, Froehner SC (1998) Interaction of muscle and brain sodium channels with multiple members of the syntrophin family of dystrophin-associated proteins. *J Neurosci* 18:128-137.
- Gieseler K, Bessou C, Segalat L (1999a) Dystrobrevin- and dystrophin-like mutants display similar phenotypes in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Neurogenetics* 2:87-90.
- Gieseler K, Abdel-Dayem M, Segalat L (1999b) In vitro interactions of *Caenorhabditis elegans* dystrophin with dystrobrevin and syntrophin. *FEBS Lett* 461:59-62.
- Gieseler K, Mariol MC, Bessou C, Migaud M, Franks CJ, Holden-Dye L, Segalat L (2001) Molecular, genetic and physiological characterisation of dystrobrevin-like (dyb-1) mutants of *Caenorhabditis elegans*. *J Mol Biol* 307:107-117.
- Gillespie CS, Sherman DL, Blair GE, Brophy PJ (1994) Periaxin, a novel protein of myelinating Schwann cells with a possible role in axonal ensheathment. *Neuron* 12:497-508.
- Gillespie CS, Sherman DL, Fleetwood-Walker SM, Cottrell DF, Tait S, Garry EM, Wallace VC, Ure J, Griffiths IR, Smith A, Brophy PJ (2000) Peripheral demyelination and neuropathic pain behavior in periaxin-deficient mice. *Neuron* 26:523-531.
- Glass AS, Dahm R (2004) The zebrafish as a model organism for eye development. *Ophthalmic Res* 36:4-24.
- Glovinsky Y, Quigley HA, Dunkelberger GR (1991) Retinal ganglion cell loss is size dependent in experimental glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 32:484-491.
- Goldsmith P, Harris WA (2003) The zebrafish as a tool for understanding the biology of visual disorders. *Semin Cell Dev Biol* 14:11-18.
- Gonzalez E, Montanez C, Ray PN, Howard PL, Garcia-Sierra F, Mornet D, Cisneros B (2000) Alternative splicing regulates the nuclear or cytoplasmic localization of dystrophin Dp71. *FEBS Lett* 482:209-214.
- Gorecki D, Geng Y, Thomas K, Hunt SP, Barnard EA, Barnard PJ (1991) Expression of the dystrophin gene in mouse and rat brain. *Neuroreport* 2:773-776.

- Gorecki DC, Barnard EA (1995) Specific expression of G-dystrophin (Dp71) in the brain. *Neuroreport* 6:893-896.
- Gorecki DC, Derry JM, Barnard EA (1994) Dystroglycan: brain localisation and chromosome mapping in the mouse. *Hum Mol Genet* 3:1589-1597.
- Gorecki DC, Abdulrazzak H, Lukasiuk K, Barnard EA (1997) Differential expression of syntrophins and analysis of alternatively spliced dystrophin transcripts in the mouse brain. *Eur J Neurosci* 9:965-976.
- Gorecki DC, Monaco AP, Derry JM, Walker AP, Barnard EA, Barnard PJ (1992) Expression of four alternative dystrophin transcripts in brain regions regulated by different promoters. *Hum Mol Genet* 1:505-510.
- Ghosh KK, Bujan S, Haverkamp S, Feigenspan A, Wassle H (2004) Types of bipolar cells in the mouse retina. *J Comp Neurol* 469:70-82.
- Gottlob I, Wundsch L, Pflug R (1985) Possible role of amacrine cells in the generation of the mammalian ERG b-wave. *Doc Ophthalmol* 61:55-63.
- Goudemant JF, Deconinck N, Tinsley JM, Demeure R, Robert A, Davies KE, Gillis JM (1998) Expression of truncated utrophin improves pH recovery in exercising muscles of dystrophic mdx mice: a ³¹P NMR study. *Neuromuscul Disord* 8:371-379.
- Grady RM, Teng H, Nichol MC, Cunningham JC, Wilkinson RS, Sanes JR (1997) Skeletal and cardiac myopathies in mice lacking utrophin and dystrophin: a model for Duchenne muscular dystrophy. *Cell* 90:729-738.
- Grady RM, Zhou H, Cunningham JM, Henry MD, Campbell KP, Sanes JR (2000) Maturation and maintenance of the neuromuscular synapse: genetic evidence for roles of the dystrophin--glycoprotein complex. *Neuron* 25:279-293.
- Grady RM, Grange RW, Lau KS, Maimone MM, Nichol MC, Stull JT, Sanes JR (1999) Role for alpha-dystrobrevin in the pathogenesis of dystrophin-dependent muscular dystrophies. *Nat Cell Biol* 1:215-220. [java/Propub/cellbio/ncb0899_0215.fulltext](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10521521)
[java/Propub/cellbio/ncb0899_0215.abstract](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10521521).
- Granit R (1968) The development of retinal neurophysiology. *Science* 160:1192-1196.
- Green DG, Kapousta-Bruneau NV (1999) A dissection of the electroretinogram from the isolated rat retina with microelectrodes and drugs. *Vis Neurosci* 16:727-741.
- Greenberg DS, Schatz Y, Levy Z, Pizzo P, Yaffe D, Nudel U (1996) Reduced levels of dystrophin associated proteins in the brains of mice deficient for Dp71. *Hum Mol Genet* 5:1299-1303.

- Greener MJ, Roberts RG (2000) Conservation of components of the dystrophin complex in *Drosophila*. *FEBS Lett* 482:13-18.
- Greferath U, Grunert U, Wassle H (1990) Rod bipolar cells in the mammalian retina show protein kinase C-like immunoreactivity. *J Comp Neurol* 301:433-442.
- Greferath U, Grunert U, Muller F, Wassle H (1994) Localization of GABA_A receptors in the rabbit retina. *Cell Tissue Res* 276:295-307.
- Grisoni K, Martin E, Gieseler K, Mariol MC, Segalat L (2002) Genetic evidence for a dystrophin-glycoprotein complex (DGC) in *Caenorhabditis elegans*. *Gene* 294:77-86.
- Guadagno E, Moukhles H (2004) Laminin-induced aggregation of the inwardly rectifying potassium channel, Kir4.1, and the water-permeable channel, AQP4, via a dystroglycan-containing complex in astrocytes. *Glia* 47:138-149.
- Gur M, Zeevi YY, Bielik M, Neumann E (1987) Changes in the oscillatory potentials of the electroretinogram in glaucoma. *Curr Eye Res* 6:457-466.
- Gurevich L, Slaughter MM (1993) Comparison of the waveforms of the ON bipolar neuron and the b-wave of the electroretinogram. *Vision Res* 33:2431-2435.
- Guyon JR, Mosley AN, Zhou Y, O'Brien KF, Sheng X, Chiang K, Davidson AJ, Volinski JM, Zon LI, Kunkel LM (2003) The dystrophin associated protein complex in zebrafish. *Hum Mol Genet* 12:601-615.
- Hack AA, Ly CT, Jiang F, Clendenin CJ, Sigrist KS, Wollmann RL, McNally EM (1998) Gamma-sarcoglycan deficiency leads to muscle membrane defects and apoptosis independent of dystrophin. *J Cell Biol* 142:1279-1287.
- Haffter P, Granato M, Brand M, Mullins MC, Hammerschmidt M, Kane DA, Odenthal J, van Eeden FJ, Jiang YJ, Heisenberg CP, Kelsh RN, Furutani-Seiki M, Vogelsang E, Beuchle D, Schach U, Fabian C, Nusslein-Volhard C (1996) The identification of genes with unique and essential functions in the development of the zebrafish, *Danio rerio*. *Development* 123:1-36.
- Hammonds RG, Jr. (1987) Protein sequence of DMD gene is related to actin-binding domain of alpha-actinin. *Cell* 51:1.
- Hanitzsch R, Lichtenberger T (1997) Two neuronal retinal components of the electroretinogram c-wave. *Doc Ophthalmol* 94:275-285.
- Hanitzsch R, Lichtenberger T, Mattig WU (1996) The influence of MgCl₂ and APB on the light-induced potassium changes and the ERG b-wave of the isolated superfused rat retina. *Vision Res* 36:499-507.

- Hara A, Miura M (1994) Decreased inner retinal activity in branch retinal vein occlusion. *Doc Ophthalmol* 88:39-47.
- Harada T, Harada C, Watanabe M, Inoue Y, Sakagawa T, Nakayama N, Sasaki S, Okuyama S, Watase K, Wada K, Tanaka K (1998) Functions of the two glutamate transporters GLAST and GLT-1 in the retina. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:4663-4666.
- Hartveit E (1997) Functional organization of cone bipolar cells in the rat retina. *J Neurophysiol* 77:1716-1730.
- Hasegawa M, Cuenda A, Spillantini MG, Thomas GM, Buee-Scherrer V, Cohen P, Goedert M (1999) Stress-activated protein kinase-3 interacts with the PDZ domain of alpha1-syntrophin. A mechanism for specific substrate recognition. *J Biol Chem* 274:12626-12631.
- Hashida-Okumura A, Okumura N, Iwamatsu A, Buijs RM, Romijn HJ, Nagai K (1999) Interaction of neuronal nitric-oxide synthase with alpha1-syntrophin in rat brain. *J Biol Chem* 274:11736-11741.
- Hashimoto Y, Murakami M, Tomita T (1961) Localization of the ERG by aid of histological method. *Jpn J Physiol* 11:62-70.
- Haverkamp S, Wassle H (2000) Immunocytochemical analysis of the mouse retina. *J Comp Neurol* 424:1-23.
- Haverkamp S, Grunert U, Wassle H (2000) The cone pedicle, a complex synapse in the retina. *Neuron* 27:85-95.
- Haverkamp S, Grunert U, Wassle H (2001a) Localization of kainate receptors at the cone pedicles of the primate retina. *J Comp Neurol* 436:471-486.
- Haverkamp S, Grunert U, Wassle H (2001b) The synaptic architecture of AMPA receptors at the cone pedicle of the primate retina. *J Neurosci* 21:2488-2500.
- Hemmings L, Kuhlman PA, Critchley DR (1992) Analysis of the actin-binding domain of alpha-actinin by mutagenesis and demonstration that dystrophin contains a functionally homologous domain. *J Cell Biol* 116:1369-1380.
- Henry MD, Campbell KP (1998) A role for dystroglycan in basement membrane assembly. *Cell* 95:859-870.
- Henry MD, Campbell KP (1999) Dystroglycan inside and out. *Curr Opin Cell Biol* 11:602-607.
- Hillier BJ, Christopherson KS, Prehoda KE, Brecht DS, Lim WA (1999) Unexpected modes of PDZ domain scaffolding revealed by structure of nNOS-syntrophin complex. *Science* 284:812-815.

- Hoffman EP, Garcia CA, Chamberlain JS, Angelini C, Lupski JR, Fenwick R (1991) Is the carboxyl-terminus of dystrophin required for membrane association? A novel, severe case of Duchenne muscular dystrophy. *Ann Neurol* 30:605-610.
- Holder E, Maeda M, Bies RD (1996) Expression and regulation of the dystrophin Purkinje promoter in human skeletal muscle, heart, and brain. *Hum Genet* 97:232-239.
- Holzfeind PJ, Ambrose HJ, Newey SE, Nawrotzki RA, Blake DJ, Davies KE (1999) Tissue-selective expression of alpha-dystrobrevin is determined by multiple promoters. *J Biol Chem* 274:6250-6258.
- Howard PL, Klamut HJ, Ray PN (1998a) Identification of a novel actin binding site within the Dp71 dystrophin isoform. *FEBS Lett* 441:337-341.
- Howard PL, Dally GY, Wong MH, Ho A, Weleber RG, Pillers DA, Ray PN (1998b) Localization of dystrophin isoform Dp71 to the inner limiting membrane of the retina suggests a unique functional contribution of Dp71 in the retina. *Hum Mol Genet* 7:1385-1391.
- Huang X, Poy F, Zhang R, Joachimiak A, Sudol M, Eck MJ (2000) Structure of a WW domain containing fragment of dystrophin in complex with beta-dystroglycan. *Nat Struct Biol* 7:634-638.
- Ibraghimov-Beskrovnaya O, Ervasti JM, Leveille CJ, Slaughter CA, Sernett SW, Campbell KP (1992) Primary structure of dystrophin-associated glycoproteins linking dystrophin to the extracellular matrix. *Nature* 355:696-702.
- Ibraghimov-Beskrovnaya O, Milatovich A, Ozcelik T, Yang B, Koepnick K, Francke U, Campbell KP (1993) Human dystroglycan: skeletal muscle cDNA, genomic structure, origin of tissue specific isoforms and chromosomal localization. *Hum Mol Genet* 2:1651-1657.
- Imamura M, Ozawa E (1998) Differential expression of dystrophin isoforms and utrophin during dibutyryl-cAMP-induced morphological differentiation of rat brain astrocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:6139-6144.
- Imamura M, Araishi K, Noguchi S, Ozawa E (2000) A sarcoglycan-dystroglycan complex anchors Dp116 and utrophin in the peripheral nervous system. *Hum Mol Genet* 9:3091-3100.
- Ishii M, Horio Y, Tada Y, Hibino H, Inanobe A, Ito M, Yamada M, Gotow T, Uchiyama Y, Kurachi Y (1997) Expression and clustered distribution of an inwardly rectifying

- potassium channel, K_{AB-2}/Kir4.1, on mammalian retinal Muller cell membrane: their regulation by insulin and laminin signals. *J Neurosci* 17:7725-7735.
- Iwata Y, Pan Y, Yoshida T, Hanada H, Shigekawa M (1998) Alpha1-syntrophin has distinct binding sites for actin and calmodulin. *FEBS Lett* 423:173-177.
- Jacobson C, Montanaro F, Lindenbaum M, Carbonetto S, Ferns M (1998) alpha-Dystroglycan functions in acetylcholine receptor aggregation but is not a coreceptor for agrin-MuSK signaling. *J Neurosci* 18:6340-6348.
- Jacobson C, Cote PD, Rossi SG, Rotundo RL, Carbonetto S (2001) The dystroglycan complex is necessary for stabilization of acetylcholine receptor clusters at neuromuscular junctions and formation of the synaptic basement membrane. *J Cell Biol* 152:435-450.
- Jagadha V, Becker LE (1988) Brain morphology in Duchenne muscular dystrophy: a Golgi study. *Pediatr Neurol* 4:87-92.
- James M, Nuttall A, Ilsley JL, Ottersbach K, Tinsley JM, Sudol M, Winder SJ (2000) Adhesion-dependent tyrosine phosphorylation of (beta)-dystroglycan regulates its interaction with utrophin. *J Cell Sci* 113 (Pt 10):1717-1726.
- Jancsik V, Hajos F (1999) The demonstration of immunoreactive dystrophin and its developmental expression in perivascular astrocytes. *Brain Res* 831:200-205. bin/cas/tree/store/bres/cas_sub/browse/browse.cgi?year=1999&volume=1831&issue=1991-1992&aid=15570.
- Jarrett HW, Foster JL (1995) Alternate binding of actin and calmodulin to multiple sites on dystrophin. *J Biol Chem* 270:5578-5586.
- Jellali A, Stussi-Garaud C, Gasnier B, Rendon A, Sahel JA, Dreyfus H, Picaud S (2002) Cellular localization of the vesicular inhibitory amino acid transporter in the mouse and human retina. *J Comp Neurol* 449:76-87.
- Jensen H, Warburg M, Sjo O, Schwartz M (1995) Duchenne muscular dystrophy: negative electroretinograms and normal dark adaptation. Reappraisal of assignment of X linked incomplete congenital stationary night blindness. *J Med Genet* 32:348-351.
- Jung D, Filliol D, Metz-Boutigue MH, Rendon A (1993) Characterization and subcellular localization of the dystrophin-protein 71 (Dp71) from brain. *Neuromuscul Disord* 3:515-518.

- Jung D, Yang B, Meyer J, Chamberlain JS, Campbell KP (1995) Identification and characterization of the dystrophin anchoring site on beta-dystroglycan. *J Biol Chem* 270:27305-27310.
- Jung D, Leturcq F, Sunada Y, Duclos F, Tome FM, Moomaw C, Merlini L, Azibi K, Chaouch M, Slaughter C, Fardeau M, Kaplan JC, Campbell KP (1996a) Absence of gamma-sarcoglycan (35 DAG) in autosomal recessive muscular dystrophy linked to chromosome 13q12. *FEBS Lett* 381:15-20.
- Jung D, Duclos F, Apostol B, Straub V, Lee JC, Allamand V, Venzke DP, Sunada Y, Moomaw CR, Leveille CJ, Slaughter CA, Crawford TO, McPherson JD, Campbell KP (1996b) Characterization of delta-sarcoglycan, a novel component of the oligomeric sarcoglycan complex involved in limb-girdle muscular dystrophy. *J Biol Chem* 271:32321-32329.
- Kahana E, Flood G, Gratzer WB (1997) Physical properties of dystrophin rod domain. *Cell Motil Cytoskeleton* 36:246-252.
- Kalloniatis M, Tomisich G (1999) Amino acid neurochemistry of the vertebrate retina. *Prog Retin Eye Res* 18:811-866.
- Kamakura K, Tadano Y, Kawai M, Ishiura S, Nakamura R, Miyamoto K, Nagata N, Sugita H (1994) Dystrophin-related protein is found in the central nervous system of mice at various developmental stages, especially at the postsynaptic membrane. *J Neurosci Res* 37:728-734.
- Kameya S, Miyagoe Y, Nonaka I, Ikemoto T, Endo M, Hanaoka K, Nabeshima Y, Takeda S (1999) alpha1-syntrophin gene disruption results in the absence of neuronal-type nitric-oxide synthase at the sarcolemma but does not induce muscle degeneration. *J Biol Chem* 274:2193-2200.
- Kameya S, Araki E, Katsuki M, Mizota A, Adachi E, Nakahara K, Nonaka I, Sakuragi S, Takeda S, Nabeshima Y (1997) Dp260 disrupted mice revealed prolonged implicit time of the b-wave in ERG and loss of accumulation of beta-dystroglycan in the outer plexiform layer of the retina. *Hum Mol Genet* 6:2195-2203.
- Kano H, Kobayashi K, Herrmann R, Tachikawa M, Many H, Nishino I, Nonaka I, Straub V, Talim B, Voit T, Topaloglu H, Endo T, Yoshikawa H, Toda T (2002) Deficiency of alpha-dystroglycan in muscle-eye-brain disease. *Biochem Biophys Res Commun* 291:1283-1286.

- Kapousta-Bruneau NV (2000) Opposite effects of GABA(A) and GABA(C) receptor antagonists on the b-wave of ERG recorded from the isolated rat retina. *Vision Res* 40:1653-1665.
- Karagan NJ, Richman LC, Sorensen JP (1980) Analysis of verbal disability in Duchenne muscular dystrophy. *J Nerv Ment Dis* 168:419-423.
- Karlstrom RO, Trowe T, Klostermann S, Baier H, Brand M, Crawford AD, Grunewald B, Haffter P, Hoffmann H, Meyer SU, Muller BK, Richter S, van Eeden FJ, Nusslein-Volhard C, Bonhoeffer F (1996) Zebrafish mutations affecting retinotectal axon pathfinding. *Development* 123:427-438.
- Karwoski CJ, Xu X (1999) Current source-density analysis of light-evoked field potentials in rabbit retina. *Vis Neurosci* 16:369-377.
- Kay JN, Roeser T, Mumm JS, Godinho L, Mrejeru A, Wong RO, Baier H (2004) Transient requirement for ganglion cells during assembly of retinal synaptic layers. *Development* 131:1331-1342.
- Khurana TS, Watkins SC, Kunkel LM (1992) The subcellular distribution of chromosome 6-encoded dystrophin-related protein in the brain. *J Cell Biol* 119:357-366.
- Khurana TS, Watkins SC, Chafey P, Chelly J, Tome FM, Fardeau M, Kaplan JC, Kunkel LM (1991) Immunolocalization and developmental expression of dystrophin related protein in skeletal muscle. *Neuromuscul Disord* 1:185-194.
- Kim TW, Wu K, Xu JL, Black IB (1992) Detection of dystrophin in the postsynaptic density of rat brain and deficiency in a mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:11642-11644.
- Kimmel CB (1989) Genetics and early development of zebrafish. *Trends Genet* 5:283-288.
- Kimmel CB (1993) Patterning the brain of the zebrafish embryo. *Annu Rev Neurosci* 16:707-732.
- Knuesel I, Zuellig RA, Schaub MC, Fritschy JM (2001) Alterations in dystrophin and utrophin expression parallel the reorganization of GABAergic synapses in a mouse model of temporal lobe epilepsy. *Eur J Neurosci* 13:1113-1124.
- Knuesel I, Mastrocola M, Zuellig RA, Bornhauser B, Schaub MC, Fritschy JM (1999) Short communication: altered synaptic clustering of GABAA receptors in mice lacking dystrophin (mdx mice). *Eur J Neurosci* 11:4457-4462.
- Koenig M, Kunkel LM (1990) Detailed analysis of the repeat domain of dystrophin reveals four potential hinge segments that may confer flexibility. *J Biol Chem* 265:4560-4566.

- Koenig M, Monaco AP, Kunkel LM (1988) The complete sequence of dystrophin predicts a rod-shaped cytoskeletal protein. *Cell* 53:219-226.
- Koenig M, Hoffman EP, Bertelson CJ, Monaco AP, Feener C, Kunkel LM (1987) Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals. *Cell* 50:509-517.
- Koenig M, Beggs AH, Moyer M, Scherpf S, Heindrich K, Bettecken T, Meng G, Muller CR, Lindlof M, Kaariainen H, et al. (1989) The molecular basis for Duchenne versus Becker muscular dystrophy: correlation of severity with type of deletion. *Am J Hum Genet* 45:498-506.
- Kofuji P, Ceelen P, Zahs K. R, Surbeck L. W, Lester H. A, Newman E. A (2000) Genetic inactivation of an inwardly rectifying potassium channel (Kir4.1 subunit) in mice: phenotypic impact in retina. *J Neurosci* 20: 5733-5740.
- Kolb H, Famiglietti EV (1974) Rod and cone pathways in the inner plexiform layer of cat retina. *Science* 186:47-49.
- Kolb H, West RW (1977) Synaptic connections of the interplexiform cell in the retina of the cat. *J Neurocytol* 6:155-170.
- Kolb H, Marshak D (2003) The midget pathways of the primate retina. *Doc Ophthalmol* 106:67-81.
- Kolb H, Nelson R, Mariani A (1981) Amacrine cells, bipolar cells and ganglion cells of the cat retina: a Golgi study. *Vision Res* 21:1081-1114.
- Kolb H, Linberg KA, Fisher SK (1992) Neurons of the human retina: a Golgi study. *J Comp Neurol* 318:147-187.
- Kolb H, Fernandez E, Schouten J, Ahnelt P, Linberg KA, Fisher SK (1994) Are there three types of horizontal cell in the human retina? *J Comp Neurol* 343:370-386.
- Koulen P, Blank M, Kroger S (1998) Differential distribution of beta-dystroglycan in rabbit and rat retina. *J Neurosci Res* 51:735-747.
- Kramarcy NR, Sealock R (2000) Syntrophin isoforms at the neuromuscular junction: developmental time course and differential localization. *Mol Cell Neurosci* 15:262-274.
- Kramarcy NR, Vidal A, Froehner SC, Sealock R (1994) Association of utrophin and multiple dystrophin short forms with the mammalian M(r) 58,000 dystrophin-associated protein (syntrophin). *J Biol Chem* 269:2870-2876.
- Kroger S, Mann S (1996) Biochemical and functional characterization of basal lamina-bound agrin in the chick central nervous system. *Eur J Neurosci* 8:500-509.

- Kusaka S, Horio Y, Fujita A, Matsushita K, Inanobe A, Gotow T, Uchiyama Y, Tano Y, Kurachi Y (1999) Expression and polarized distribution of an inwardly rectifying K⁺ channel, Kir4.1, in rat retinal pigment epithelium. *J Physiol* 520 Pt 2:373-381.
- Kuwada JY (1995) Development of the zebrafish nervous system: genetic analysis and manipulation. *Curr Opin Neurobiol* 5:50-54.
- Lambert M, Chafey P, Hugnot JP, Koulakoff A, Berwald-Netter Y, Billard C, Morris GE, Kahn A, Kaplan JC, Gilgenkrantz H (1993) Expression of the transcripts initiated in the 62nd intron of the dystrophin gene. *Neuromuscul Disord* 3:519-524.
- Lederfein D, Yaffe D, Nudel U (1993) A housekeeping type promoter, located in the 3' region of the Duchenne muscular dystrophy gene, controls the expression of Dp71, a major product of the gene. *Hum Mol Genet* 2:1883-1888.
- Lederfein D, Levy Z, Augier N, Mornet D, Morris G, Fuchs O, Yaffe D, Nudel U (1992) A 71-kilodalton protein is a major product of the Duchenne muscular dystrophy gene in brain and other nonmuscle tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:5346-5350.
- Lenk U, Hanke R, Thiele H, Speer A (1993a) Point mutations at the carboxy terminus of the human dystrophin gene: implications for an association with mental retardation in DMD patients. *Hum Mol Genet* 2:1877-1881.
- Lenk U, Hanke R, Kraft U, Grade K, Grunewald I, Speer A (1993b) Non-isotopic analysis of single strand conformation polymorphism (SSCP) in the exon 13 region of the human dystrophin gene. *J Med Genet* 30:951-954.
- Lenk U, Oexle K, Voit T, Ancker U, Hellner KA, Speer A, Hubner C (1996) A cysteine 3340 substitution in the dystroglycan-binding domain of dystrophin associated with Duchenne muscular dystrophy, mental retardation and absence of the ERG b-wave. *Hum Mol Genet* 5:973-975.
- Leschziner A, Moukhles H, Lindenbaum M, Gee SH, Butterworth J, Campbell KP, Carbonetto S (2000) Neural regulation of alpha-dystroglycan biosynthesis and glycosylation in skeletal muscle. *J Neurochem* 74:70-80.
- Levi S, Grady RM, Henry MD, Campbell KP, Sanes JR, Craig AM (2002) Dystroglycan is selectively associated with inhibitory GABAergic synapses but is dispensable for their differentiation. *J Neurosci* 22:4274-4285.
- Levine BA, Moir AJ, Patchell VB, Perry SV (1990) The interaction of actin with dystrophin. *FEBS Lett* 263:159-162.

- Levine BA, Moir AJ, Patchell VB, Perry SV (1992) Binding sites involved in the interaction of actin with the N-terminal region of dystrophin. *FEBS Lett* 298:44-48.
- Libby RT, Lavallee CR, Balkema GW, Brunken WJ, Hunter DD (1999) Disruption of laminin beta2 chain production causes alterations in morphology and function in the CNS. *J Neurosci* 19:9399-9411.
- Lidov HG, Kunkel LM (1997) Dp140: alternatively spliced isoforms in brain and kidney. *Genomics* 45:132-139.
- Lidov HG, Byers TJ, Kunkel LM (1993) The distribution of dystrophin in the murine central nervous system: an immunocytochemical study. *Neuroscience* 54:167-187.
- Lidov HG, Selig S, Kunkel LM (1995) Dp140: a novel 140 kDa CNS transcript from the dystrophin locus. *Hum Mol Genet* 4:329-335.
- Lidov HG, Byers TJ, Watkins SC, Kunkel LM (1990) Localization of dystrophin to postsynaptic regions of central nervous system cortical neurons. *Nature* 348:725-728.
- Lim LE, Duclos F, Broux O, Bourg N, Sunada Y, Allamand V, Meyer J, Richard I, Moomaw C, Slaughter C, et al. (1995) Beta-sarcoglycan: characterization and role in limb-girdle muscular dystrophy linked to 4q12. *Nat Genet* 11:257-265.
- Linberg KA, Fisher SK (1986) An ultrastructural study of interplexiform cell synapses in the human retina. *J Comp Neurol* 243:561-576.
- Liu LA, Engvall E (1999) Sarcoglycan isoforms in skeletal muscle. *J Biol Chem* 274:38171-38176.
- Liu S, Calderwood DA, Ginsberg MH (2000) Integrin cytoplasmic domain-binding proteins. *J Cell Sci* 113 (Pt 20):3563-3571.
- Loh NY, Newey SE, Davies KE, Blake DJ (2000) Assembly of multiple dystrobrevin-containing complexes in the kidney. *J Cell Sci* 113 (Pt 15):2715-2724.
- Loh NY, Nebenius-Oosthuizen D, Blake DJ, Smith AJ, Davies KE (2001) Role of beta-dystrobrevin in nonmuscle dystrophin-associated protein complex-like complexes in kidney and liver. *Mol Cell Biol* 21:7442-7448.
- Loh NY, Ambrose HJ, Guay-Woodford LM, DasGupta S, Nawrotzki RA, Blake DJ, Davies KE (1998) Genomic organization and refined mapping of the mouse beta-dystrobrevin gene. *Mamm Genome* 9:857-862.
- Love DR, Byth BC, Tinsley JM, Blake DJ, Davies KE (1993) Dystrophin and dystrophin-related proteins: a review of protein and RNA studies. *Neuromuscul Disord* 3:5-21.

- Love DR, Hill DF, Dickson G, Spurr NK, Byth BC, Marsden RF, Walsh FS, Edwards YH, Davies KE (1989) An autosomal transcript in skeletal muscle with homology to dystrophin. *Nature* 339:55-58.
- Love DR, Morris GE, Ellis JM, Fairbrother U, Marsden RF, Bloomfield JF, Edwards YH, Slater CP, Parry DJ, Davies KE (1991) Tissue distribution of the dystrophin-related gene product and expression in the mdx and dy mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:3243-3247.
- Lumeng C, Phelps S, Crawford GE, Walden PD, Barald K, Chamberlain JS (1999a) Interactions between beta 2-syntrophin and a family of microtubule-associated serine/threonine kinases. *Nat Neurosci* 2:611-617. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10551111>
- Lumeng CN, Phelps SF, Rafael JA, Cox GA, Hutchinson TL, Begy CR, Adkins E, Wiltshire R, Chamberlain JS (1999b) Characterization of dystrophin and utrophin diversity in the mouse. *Hum Mol Genet* 8:593-599.
- MacNeil MA, Masland RH (1998) Extreme diversity among amacrine cells: implications for function. *Neuron* 20:971-982.
- Madhavan R, Jarrett HW (1994) Calmodulin-activated phosphorylation of dystrophin. *Biochemistry* 33:5797-5804.
- Madhavan R, Jarrett HW (1995) Interactions between dystrophin glycoprotein complex proteins. *Biochemistry* 34:12204-12209.
- Madhavan R, Jarrett HW (1999) Phosphorylation of dystrophin and alpha-syntrophin by Ca(2+)-calmodulin dependent protein kinase II. *Biochim Biophys Acta* 1434:260-274.
- Madhavan R, Massom LR, Jarrett HW (1992) Calmodulin specifically binds three proteins of the dystrophin-glycoprotein complex. *Biochem Biophys Res Commun* 185:753-759.
- Malchow RP, Qian HH, Ripps H (1989) gamma-Aminobutyric acid (GABA)-induced currents of skate Muller (glial) cells are mediated by neuronal-like GABA_A receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:4326-4330.
- Marmor MF, Holder GE, Seeliger MW, Yamamoto S (2004) Standard for clinical electroretinography (2004 update). *Doc Ophthalmol* 108:107-114.
- Marquez FG, Cisneros B, Garcia F, Ceja V, Velazquez F, Depardon F, Cervantes L, Rendon A, Mornet D, Rosas-vargas H, Mustre M, Montanez C (2003) Differential expression and subcellular distribution of dystrophin Dp71 isoforms during differentiation process. *Neuroscience* 118:957-966.

- Masland RH (2001) Neuronal diversity in the retina. *Curr Opin Neurobiol* 11:431-436.
- Massey SC, Miller RF (1990) N-methyl-D-aspartate receptors of ganglion cells in rabbit retina. *J Neurophysiol* 63:16-30.
- Masu M, Iwakabe H, Tagawa Y, Miyoshi T, Yamashita M, Fukuda Y, Sasaki H, Hiroi K, Nakamura Y, Shigemoto R, et al. (1995) Specific deficit of the ON response in visual transmission by targeted disruption of the mGluR6 gene. *Cell* 80:757-765.
- Matsumura K (1997) [Clinicopathological characteristics and molecular genetics of adhalin deficiency (severe childhood autosomal recessive muscular dystrophy/SCARMD)]. *Nippon Rinsho* 55:3154-3158.
- Matsumura K, Yamada H, Shimizu T, Campbell KP (1993) Differential expression of dystrophin, utrophin and dystrophin-associated proteins in peripheral nerve. *FEBS Lett* 334:281-285.
- Matsumura K, Ervasti JM, Ohlendieck K, Kahl SD, Campbell KP (1992a) Association of dystrophin-related protein with dystrophin-associated proteins in mdx mouse muscle. *Nature* 360:588-591.
- Matsumura K, Yamada H, Saito F, Sunada Y, Shimizu T (1997a) Peripheral nerve involvement in merosin-deficient congenital muscular dystrophy and dy mouse. *Neuromuscul Disord* 7:7-12.
- Matsumura K, Saito F, Yamada H, Hase A, Sunada Y, Shimizu T (1999) Sarcoglycan complex: a muscular supporter of dystroglycan-dystrophin interplay? *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 45:751-762.
- Matsumura K, Tome FM, Collin H, Azibi K, Chaouch M, Kaplan JC, Fardeau M, Campbell KP (1992b) Deficiency of the 50K dystrophin-associated glycoprotein in severe childhood autosomal recessive muscular dystrophy. *Nature* 359:320-322.
- Matsumura K, Chiba A, Yamada H, Fukuta-Ohi H, Fujita S, Endo T, Kobata A, Anderson LV, Kanazawa I, Campbell KP, Shimizu T (1997b) A role of dystroglycan in schwannoma cell adhesion to laminin. *J Biol Chem* 272:13904-13910.
- McArdle A, Edwards RH, Jackson MJ (1995) How does dystrophin deficiency lead to muscle degeneration?--evidence from the mdx mouse. *Neuromuscul Disord* 5:445-456.
- McGuire BA, Stevens JK, Sterling P (1984) Microcircuitry of bipolar cells in cat retina. *J Neurosci* 4:2920-2938.
- McNally EM, Ly CT, Kunkel LM (1998) Human epsilon-sarcoglycan is highly related to alpha-sarcoglycan (adhalin), the limb girdle muscular dystrophy 2D gene. *FEBS Lett* 422:27-32.

- McNally EM, Yoshida M, Mizuno Y, Ozawa E, Kunkel LM (1994) Human adhalin is alternatively spliced and the gene is located on chromosome 17q21. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:9690-9694.
- McNally EM, Passos-Bueno MR, Bonnemann CG, Vainzof M, de Sa Moreira E, Lidov HG, Othmane KB, Denton PH, Vance JM, Zatz M, Kunkel LM (1996a) Mild and severe muscular dystrophy caused by a single gamma-sarcoglycan mutation. *Am J Hum Genet* 59:1040-1047.
- McNally EM, Duggan D, Gorospe JR, Bonnemann CG, Fanin M, Pegoraro E, Lidov HG, Noguchi S, Ozawa E, Finkel RS, Cruse RP, Angelini C, Kunkel LM, Hoffman EP (1996b) Mutations that disrupt the carboxyl-terminus of gamma-sarcoglycan cause muscular dystrophy. *Hum Mol Genet* 5:1841-1847.
- Mehes E, Mornet D, Jancsik V (2003) Subcellular localization of components of the dystrophin glycoprotein complex in cultured retinal muller glial cells. *Acta Biol Hung* 54:241-252.
- Mehler MF (2000) Brain dystrophin, neurogenetics and mental retardation. *Brain Res Brain Res Rev* 32:277-307.
- Mehler MF, Haas KZ, Kessler JA, Stanton PK (1992) Enhanced sensitivity of hippocampal pyramidal neurons from mdx mice to hypoxia-induced loss of synaptic transmission. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:2461-2465.
- Meier T, Hauser DM, Chiquet M, Landmann L, Ruegg MA, Brenner HR (1997) Neural agrin induces ectopic postsynaptic specializations in innervated muscle fibers. *J Neurosci* 17:6534-6544.
- Michalak M, Fu SY, Milner RE, Busaan JL, Hance JE (1996) Phosphorylation of the carboxyl-terminal region of dystrophin. *Biochem Cell Biol* 74:431-437.
- Miller RF, Dowling JE (1970) Intracellular responses of the Muller (glial) cells of mudpuppy retina: their relation to b-wave of the electroretinogram. *J Neurophysiol* 33:323-341.
- Missoten L (1965) The synapsis in the human retina. The structure of the eye II symposium Ed. J.W. Rowe:17-28.
- Miyatake M, Miike T, Zhao JE, Yoshioka K, Uchino M, Usuku G (1991) Dystrophin: localization and presumed function. *Muscle Nerve* 14:113-119.
- Mizuno Y, Noguchi S, Yamamoto H, Yoshida M, Suzuki A, Hagiwara Y, Hayashi YK, Arahata K, Nonaka I, Hirai S, et al. (1994) Selective defect of sarcoglycan complex in severe childhood autosomal recessive muscular dystrophy muscle. *Biochem Biophys Res Commun* 203:979-983.

- Moizard MP, Toutain A, Fournier D, Berret F, Raynaud M, Billard C, Andres C, Moraine C (2000) Severe cognitive impairment in DMD: obvious clinical indication for Dp71 isoform point mutation screening. *Eur J Hum Genet* 8:552-556.
- Montanaro F, Carbonetto S, Campbell KP, Lindenbaum M (1995) Dystroglycan expression in the wild type and mdx mouse neural retina: synaptic colocalization with dystrophin, dystrophin-related protein but not laminin. *J Neurosci Res* 42:528-538.
- Morais Cabral JH, Petosa C, Sutcliffe MJ, Raza S, Byron O, Poy F, Marfatia SM, Chishti AH, Liddington RC (1996) Crystal structure of a PDZ domain. *Nature* 382:649-652.
- Morgans CW (1999) Calcium channel heterogeneity among cone photoreceptors in the tree shrew retina. *Eur J Neurosci* 11:2989-2993.
- Morgans CW (2001) Localization of the alpha(1F) calcium channel subunit in the rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42:2414-2418.
- Morgans CW, Gaughwin P, Maleszka R (2001) Expression of the alpha1F calcium channel subunit by photoreceptors in the rat retina. *Mol Vis* 7:202-209.
- Morgans CW, El Far O, Berntson A, Wassle H, Taylor WR (1998) Calcium extrusion from mammalian photoreceptor terminals. *J Neurosci* 18:2467-2474.
- Moukhles H, Carbonetto S (2001) Dystroglycan contributes to the formation of multiple dystrophin-like complexes in brain. *J Neurochem* 78:824-834.
- Moukhles H, Roque R, Carbonetto S (2000) alpha-dystroglycan isoforms are differentially distributed in adult rat retina. *J Comp Neurol* 420:182-194.
- Mummery R, Sessay A, Lai FA, Beesley PW (1996) Beta-dystroglycan: subcellular localisation in rat brain and detection of a novel immunologically related, postsynaptic density-enriched protein. *J Neurochem* 66:2455-2459.
- Nakajima Y, Iwakabe H, Akazawa C, Nawa H, Shigemoto R, Mizuno N, Nakanishi S (1993) Molecular characterization of a novel retinal metabotropic glutamate receptor mGluR6 with a high agonist selectivity for L-2-amino-4-phosphonobutyrate. *J Biol Chem* 268:11868-11873.
- Nawrocki L, BreMiller R, Streisinger G, Kaplan M (1985) Larval and adult visual pigments of the zebrafish, *Brachydanio rerio*. *Vision Res* 25:1569-1576.
- Nawrotzki R, Loh NY, Ruegg MA, Davies KE, Blake DJ (1998) Characterisation of alpha-dystrobrevin in muscle. *J Cell Sci* 111 (Pt 17):2595-2605.

- Neely JD, Amiry-Moghaddam M, Ottersen OP, Froehner SC, Agre P, Adams ME (2001) Syntrophin-dependent expression and localization of Aquaporin-4 water channel protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:14108-14113.
- Nelson R, Kolb H (1983) Synaptic patterns and response properties of bipolar and ganglion cells in the cat retina. *Vision Res* 23:1183-1195.
- Nelson R, Kolb H, Freed MA (1993) OFF-alpha and OFF-beta ganglion cells in cat retina. I: Intracellular electrophysiology and HRP stains. *J Comp Neurol* 329:68-84.
- Neuman S, Kaban A, Volk T, Yaffe D, Nudel U (2001) The dystrophin / utrophin homologues in *Drosophila* and in sea urchin. *Gene* 263:17-29.
- Newbell BJ, Anderson JT, Jarrett HW (1997) Ca²⁺-calmodulin binding to mouse alpha1 syntrophin: syntrophin is also a Ca²⁺-binding protein. *Biochemistry* 36:1295-1305.
- Newey SE, Benson MA, Ponting CP, Davies KE, Blake DJ (2000) Alternative splicing of dystrobrevin regulates the stoichiometry of syntrophin binding to the dystrophin protein complex. *Curr Biol* 10:1295-1298.
- Newey SE, Gramolini AO, Wu J, Holzfeind P, Jasmin BJ, Davies KE, Blake DJ (2001) A novel mechanism for modulating synaptic gene expression: differential localization of alpha-dystrobrevin transcripts in skeletal muscle. *Mol Cell Neurosci* 17:127-140.
- Newman E, Reichenbach A (1996) The Muller cell: a functional element of the retina. *Trends Neurosci* 19:307-312.
- Newman E. A (1985) Voltage-dependent calcium and potassium channels in retinal glial cells. *Nature* 317: 809-811.
- Newman EA (1987a) Distribution of potassium conductance in mammalian Muller (glial) cells: a comparative study. *J Neurosci* 7:2423-2432.
- Newman EA (1987b) Regulation of potassium levels by Muller cells in the vertebrate retina. *Can J Physiol Pharmacol* 65:1028-1032.
- Newman EA (1993) Inward-rectifying potassium channels in retinal glial (Muller) cells. *J Neurosci* 13:3333-3345.
- Newman EA (1994) A physiological measure of carbonic anhydrase in Muller cells. *Glia* 11:291-299.
- Newman EA, Odette LL (1984) Model of electroretinogram b-wave generation: a test of the K⁺ hypothesis. *J Neurophysiol* 51:164-182.
- Newman EA, Frambach DA, Odette LL (1984) Control of extracellular potassium levels by retinal glial cell K⁺ siphoning. *Science* 225:1174-1175.

- Nguyen TM, Ellis JM, Love DR, Davies KE, Gatter KC, Dickson G, Morris GE (1991) Localization of the DMDL gene-encoded dystrophin-related protein using a panel of nineteen monoclonal antibodies: presence at neuromuscular junctions, in the sarcolemma of dystrophic skeletal muscle, in vascular and other smooth muscles, and in proliferating brain cell lines. *J Cell Biol* 115:1695-1700.
- Nico B, Frigeri A, Nicchia GP, Corsi P, Ribatti D, Quondamatteo F, Herken R, Girolamo F, Marzullo A, Svelto M, Roncali L (2003) Severe alterations of endothelial and glial cells in the blood-brain barrier of dystrophic mdx mice. *Glia* 42:235-251.
- Nigro V, Piluso G, Belsito A, Politano L, Puca AA, Papparella S, Rossi E, Viglietto G, Esposito MG, Abbondanza C, Medici N, Molinari AM, Nigro G, Puca GA (1996) Identification of a novel sarcoglycan gene at 5q33 encoding a sarcolemmal 35 kDa glycoprotein. *Hum Mol Genet* 5:1179-1186.
- Nishiyama A, Endo T, Takeda S, Imamura M (2004) Identification and characterization of γ -sarcoglycans in the central nervous system. *Brain Res Mol Brain Res* 125:1-12.
- Noguchi S, McNally EM, Ben Othmane K, Hagiwara Y, Mizuno Y, Yoshida M, Yamamoto H, Bonnemant CG, Gussoni E, Denton PH, et al. (1995) Mutations in the dystrophin-associated protein gamma-sarcoglycan in chromosome 13 muscular dystrophy. *Science* 270:819-822.
- Nomura A, Shigemoto R, Nakamura Y, Okamoto N, Mizuno N, Nakanishi S (1994) Developmentally regulated postsynaptic localization of a metabotropic glutamate receptor in rat rod bipolar cells. *Cell* 77:361-369.
- Nudel U, Zuk D, Einat P, Zeelon E, Levy Z, Neuman S, Yaffe D (1989) Duchenne muscular dystrophy gene product is not identical in muscle and brain. *Nature* 337:76-78.
- Oak SA, Russo K, Petrucci TC, Jarrett HW (2001) Mouse alpha1-syntrophin binding to Grb2: further evidence of a role for syntrophin in cell signaling. *Biochemistry* 40:11270-11278.
- O'Brien RJ, Lau LF, Huganir RL (1998) Molecular mechanisms of glutamate receptor clustering at excitatory synapses. *Curr Opin Neurobiol* 8:364-369.
- Ohlendieck K, Ervasti JM, Matsumura K, Kahl SD, Leveille CJ, Campbell KP (1991) Dystrophin-related protein is localized to neuromuscular junctions of adult skeletal muscle. *Neuron* 7:499-508.

- Ort T, Maksimova E, Dirkx R, Kachinsky AM, Berghs S, Froehner SC, Solimena M (2000) The receptor tyrosine phosphatase-like protein ICA512 binds the PDZ domains of beta2-syntrophin and nNOS in pancreatic beta-cells. *Eur J Cell Biol* 79:621-630.
- Ostwald P, Goldstein IM, Pachnanda A, Roth S (1995) Effect of nitric oxide synthase inhibition on blood flow after retinal ischemia in cats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 36:2396-2403.
- Ostwald P, Park SS, Toledano AY, Roth S (1997) Adenosine receptor blockade and nitric oxide synthase inhibition in the retina: impact upon post-ischemic hyperemia and the electroretinogram. *Vision Res* 37:3453-3461.
- Parsons MJ, Campos I, Hirst EM, Stemple DL (2002) Removal of dystroglycan causes severe muscular dystrophy in zebrafish embryos. *Development* 129:3505-3512.
- Passos-Bueno MR, Oliveira JR, Bakker E, Anderson RD, Marie SK, Vainzof M, Roberds S, Campbell KP, Zatz M (1993) Genetic heterogeneity for Duchenne-like muscular dystrophy (DLMD) based on linkage and 50 DAG analysis. *Hum Mol Genet* 2:1945-1947.
- Pattnaik B, Jellali A, Sahel J, Dreyfus H, Picaud S (2000) GABAC receptors are localized with microtubule-associated protein 1B in mammalian cone photoreceptors. *J Neurosci* 20:6789-6796.
- Peichl L (1991) Alpha ganglion cells in mammalian retinae: common properties, species differences, and some comments on other ganglion cells. *Vis Neurosci* 7:155-169.
- Peters MF, Adams ME, Froehner SC (1997a) Differential association of syntrophin pairs with the dystrophin complex. *J Cell Biol* 138:81-93.
- Peters MF, Kramarcy NR, Sealock R, Froehner SC (1994) beta 2-Syntrophin: localization at the neuromuscular junction in skeletal muscle. *Neuroreport* 5:1577-1580.
- Peters MF, O'Brien KF, Sadoulet-Puccio HM, Kunkel LM, Adams ME, Froehner SC (1997b) beta-dystrobrevin, a new member of the dystrophin family. Identification, cloning, and protein associations. *J Biol Chem* 272:31561-31569.
- Peters MF, Sadoulet-Puccio HM, Grady MR, Kramarcy NR, Kunkel LM, Sanes JR, Sealock R, Froehner SC (1998) Differential membrane localization and intermolecular associations of alpha-dystrobrevin isoforms in skeletal muscle. *J Cell Biol* 142:1269-1278.

- Phillips WD, Noakes PG, Roberds SL, Campbell KP, Merlie JP (1993) Clustering and immobilization of acetylcholine receptors by the 43-kD protein: a possible role for dystrophin-related protein. *J Cell Biol* 123:729-740.
- Picaud S, Pattnaik B, Hicks D, Forster V, Fontaine V, Sahel J, Dreyfus H (1998) GABAA and GABAC receptors in adult porcine cones: evidence from a photoreceptor-glia co-culture model. *J Physiol* 513:33-42. =S0022375198084609.
- Pillers DA, Weleber RG, Green DG, Rash SM, Dally GY, Howard PL, Powers MR, Hood DC, Chapman VM, Ray PN, Woodward WR (1999a) Effects of dystrophin isoforms on signal transduction through neural retina: genotype-phenotype analysis of duchenne muscular dystrophy mouse mutants. *Mol Genet Metab* 66:100-110.
- Pillers DM, Weleber RG, Woodward WR, Green DG, Chapman VM, Ray PN (1995) mdxCv3 mouse is a model for electroretinography of Duchenne/Becker muscular dystrophy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 36:462-466.
- Pillers DM, Bulman DE, Weleber RG, Sigesmund DA, Musarella MA, Powell BR, Murphey WH, Westall C, Panton C, Becker LE, et al. (1993) Dystrophin expression in the human retina is required for normal function as defined by electroretinography. *Nat Genet* 4:82-86.
- Pillers DM, Fitzgerald KM, Duncan NM, Rash SM, White RA, Dwinnell SJ, Powell BR, Schnur RE, Ray PN, Cibis GW, Weleber RG (1999b) Duchenne/Becker muscular dystrophy: correlation of phenotype by electroretinography with sites of dystrophin mutations. *Hum Genet* 105:2-9.
- Piluso G, Mirabella M, Ricci E, Belsito A, Abbondanza C, Servidei S, Puca AA, Tonali P, Puca GA, Nigro V (2000) Gamma1- and gamma2-syntrophins, two novel dystrophin-binding proteins localized in neuronal cells. *J Biol Chem* 275:15851-15860.
- Pons F, Robert A, Fabbriozio E, Hugon G, Califano JC, Fehrentz JA, Martinez J, Mornet D (1994) Utrophin localization in normal and dystrophin-deficient heart. *Circulation* 90:369-374.
- Ponting CP, Blake DJ, Davies KE, Kendrick-Jones J, Winder SJ (1996) ZZ and TAZ: new putative zinc fingers in dystrophin and other proteins. *Trends Biochem Sci* 21:11-13.
- Pujic Z, Malicki J (2004) Retinal pattern and the genetic basis of its formation in zebrafish. *Semin Cell Dev Biol* 15:105-114.
- Puro D. G, Stuenkel E. L (1995) Thrombin-induced inhibition of potassium currents in human retinal glial (Muller) cells. *J Physiol* 485 (Pt 2): 337-348.

- Quigley HA, Nickells RW, Kerrigan LA, Pease ME, Thibault DJ, Zack DJ (1995) Retinal ganglion cell death in experimental glaucoma and after axotomy occurs by apoptosis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 36:774-786.
- Raats CJ, van den Born J, Bakker MA, Oppers-Walgreen B, Pisa BJ, Dijkman HB, Assmann KJ, Berden JH (2000) Expression of agrin, dystroglycan, and utrophin in normal renal tissue and in experimental glomerulopathies. *Am J Pathol* 156:1749-1765.
- Rambukkana A, Yamada H, Zanazzi G, Mathus T, Salzer JL, Yurchenco PD, Campbell KP, Fischetti VA (1998) Role of alpha-dystroglycan as a Schwann cell receptor for *Mycobacterium leprae*. *Science* 282:2076-2079.
- Ramón y Cajal S (1889) Conexión general de los elementos nerviosos. *La Medicina Práctica*:479-487.
- Ramón y Cajal S (1893) La rétine des vertébrés. *La Cellule* 9:119-225.
- Rao-Mirotznik R, Buchsbaum G, Sterling P (1998) Transmitter concentration at a three-dimensional synapse. *J Neurophysiol* 80:3163-3172.
- Rao-Mirotznik R, Harkins AB, Buchsbaum G, Sterling P (1995) Mammalian rod terminal: architecture of a binary synapse. *Neuron* 14:561-569.
- Rapaport D, Passos-Bueno MR, Brandao L, Love D, Vainzof M, Zatz M (1991) Apparent association of mental retardation and specific patterns of deletions screened with probes cf56a and cf23a in Duchenne muscular dystrophy. *Am J Med Genet* 39:437-441.
- Rapaport D, Lederfein D, den Dunnen JT, Grootscholten PM, Van Ommen GJ, Fuchs O, Nudel U, Yaffe D (1992) Characterization and cell type distribution of a novel, major transcript of the Duchenne muscular dystrophy gene. *Differentiation* 49:187-193.
- Rauen T, Rothstein JD, Wassle H (1996) Differential expression of three glutamate transporter subtypes in the rat retina. *Cell Tissue Res* 286:325-336.
- Raviola E, Gilula NB (1975) Intramembrane organization of specialized contacts in the outer plexiform layer of the retina. A freeze-fracture study in monkeys and rabbits. *J Cell Biol* 65:192-222.
- Reichenbach A, Schneider H, Leibnitz L, Reichelt W, Schaaf P, Schumann R (1989) The structure of rabbit retinal Muller (glial) cells is adapted to the surrounding retinal layers. *Anat Embryol (Berl)* 180:71-79.

- Rentschler S, Linn H, Deininger K, Bedford MT, Espanel X, Sudol M (1999) The WW domain of dystrophin requires EF-hands region to interact with beta-dystroglycan. *Biol Chem* 380:431-442.
- Rivier F, Robert A, Latouche J, Hugon G, Mornet D (1996) Presence of long and short dystrophin and/or utrophin products in *Torpedo marmorata* peripheral nerves. *FEBS Lett* 378:272-276.
- Roberds SL, Campbell KP (1995) Adhalin mRNA and cDNA sequence are normal in the cardiomyopathic hamster. *FEBS Lett* 364:245-249.
- Roberds SL, Anderson RD, Ibraghimov-Beskrovnaya O, Campbell KP (1993a) Primary structure and muscle-specific expression of the 50-kDa dystrophin-associated glycoprotein (adhalin). *J Biol Chem* 268:23739-23742.
- Roberds SL, Ervasti JM, Anderson RD, Ohlendieck K, Kahl SD, Zoloto D, Campbell KP (1993b) Disruption of the dystrophin-glycoprotein complex in the cardiomyopathic hamster. *J Biol Chem* 268:11496-11499.
- Roberts RG, Bobrow M (1998) Dystrophins in vertebrates and invertebrates. *Hum Mol Genet* 7:589-595.
- Roberts RG, Sheng M (2000) Association of dystrophin-related protein 2 (DRP2) with postsynaptic densities in rat brain. *Mol Cell Neurosci* 16:674-685.
- Roberts RG, Coffey AJ, Bobrow M, Bentley DR (1993) Exon structure of the human dystrophin gene. *Genomics* 16:536-538.
- Roberts RG, Freeman TC, Kendall E, Vetrie DL, Dixon AK, Shaw-Smith C, Bone Q, Bobrow M (1996) Characterization of DRP2, a novel human dystrophin homologue. *Nat Genet* 13:223-226.
- Rodieck RW, Marshak DW (1992) Spatial density and distribution of choline acetyltransferase immunoreactive cells in human, macaque, and baboon retinas. *J Comp Neurol* 321:46-64.
- Rodius F, Claudepierre T, Rosas-Vargas H, Cisneros B, Montanez C, Dreyfus H, Mornet D, Rendon A (1997) Dystrophins in developing retina: Dp260 expression correlates with synaptic maturation. *Neuroreport* 8:2383-2387.
- Rosa G, Ceccarini M, Cavaldesi M, Zini M, Petrucci TC (1996) Localization of the dystrophin binding site at the carboxyl terminus of beta-dystroglycan. *Biochem Biophys Res Commun* 223:272-277.

- Russo K, Di Stasio E, Macchia G, Rosa G, Brancaccio A, Petrucci TC (2000) Characterization of the beta-dystroglycan-growth factor receptor 2 (Grb2) interaction. *Biochem Biophys Res Commun* 274:93-98.
- Rybakova IN, Amann KJ, Ervasti JM (1996) A new model for the interaction of dystrophin with F-actin. *J Cell Biol* 135:661-672.
- Sadoulet-Puccio HM, Kunkel LM (1996) Dystrophin and its isoforms. *Brain Pathol* 6:25-35.
- Sadoulet-Puccio HM, Rajala M, Kunkel LM (1997) Dystrobrevin and dystrophin: an interaction through coiled-coil motifs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:12413-12418.
- Sadoulet-Puccio HM, Khurana TS, Cohen JB, Kunkel LM (1996) Cloning and characterization of the human homologue of a dystrophin related phosphoprotein found at the Torpedo electric organ post-synaptic membrane. *Hum Mol Genet* 5:489-496.
- Saito F, Masaki T, Kamakura K, Anderson LV, Fujita S, Fukuta-Ohi H, Sunada Y, Shimizu T, Matsumura K (1999) Characterization of the transmembrane molecular architecture of the dystroglycan complex in schwann cells. *J Biol Chem* 274:8240-8246.
- Sarig R, Mezger-Lallemand V, Gitelman I, Davis C, Fuchs O, Yaffe D, Nudel U (1999) Targeted inactivation of Dp71, the major non-muscle product of the DMD gene: differential activity of the Dp71 promoter during development. *Hum Mol Genet* 8:1-10.
- Saszik S, Bilotta J (2001) Constant dark-rearing effects on visual adaptation of the zebrafish ERG. *Int J Dev Neurosci* 19:611-619.
- Schmitt EA, Dowling JE (1994) Early eye morphogenesis in the zebrafish, *Brachydanio rerio*. *J Comp Neurol* 344:532-542.
- Schmitz F, Drenckhahn D (1997) Localization of dystrophin and beta-dystroglycan in bovine retinal photoreceptor processes extending into the postsynaptic dendritic complex. *Histochem Cell Biol* 108:249-255.
- Schmitz F, Holbach M, Drenckhahn D (1993) Colocalization of retinal dystrophin and actin in postsynaptic dendrites of rod and cone photoreceptor synapses. *Histochemistry* 100:473-479.
- Schmitz Y, Witkovsky P (1997) Dependence of photoreceptor glutamate release on a dihydropyridine-sensitive calcium channel. *Neuroscience* 78:1209-1216.
- Schofield JN, Blake DJ, Simmons C, Morris GE, Tinsley JM, Davies KE, Edwards YH (1994) Apo-dystrophin-1 and apo-dystrophin-2, products of the Duchenne muscular

- dystrophy locus: expression during mouse embryogenesis and in cultured cell lines. *Hum Mol Genet* 3:1309-1316.
- Schultz K, Janssen-Bienhold U, Weiler R (2001) Selective synaptic distribution of AMPA and kainate receptor subunits in the outer plexiform layer of the carp retina. *J Comp Neurol* 435:433-449.
- Schwartz E. A (1993) L-glutamate conditionally modulates the K⁺ current of Muller glial cells. *Neuron* 10: 1141-1149.
- Sealock R, Froehner SC (1994) Dystrophin-associated proteins and synapse formation: is alpha-dystroglycan the agrin receptor? *Cell* 77:617-619.
- Sherman DL, Fabrizi C, Gillespie CS, Brophy PJ (2001) Specific disruption of a schwann cell dystrophin-related protein complex in a demyelinating neuropathy. *Neuron* 30:677-687.
- Sherrington CS (1897) A textbook of physiology, part three: The Central Nervous. McMillan NY.
- Shorer Z, Philpot J, Muntoni F, Sewry C, Dubowitz V (1995) Demyelinating peripheral neuropathy in merosin-deficient congenital muscular dystrophy. *J Child Neurol* 10:472-475.
- Sieving PA (1993) Photopic ON- and OFF-pathway abnormalities in retinal dystrophies. *Trans Am Ophthalmol Soc* 91:701-773.
- Sigesmund DA, Weleber RG, Pillers DA, Westall CA, Panton CM, Powell BR, Heon E, Murphey WH, Musarella MA, Ray PN (1994) Characterization of the ocular phenotype of Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Ophthalmology* 101:856-865.
- Silveira LC, Perry VH (1991) The topography of magnocellular projecting ganglion cells (M-ganglion cells) in the primate retina. *Neuroscience* 40:217-237.
- Sotgia F, Lee JK, Das K, Bedford M, Petrucci TC, Macioce P, Sargiacomo M, Bricarelli FD, Minetti C, Sudol M, Lisanti MP (2000) Caveolin-3 directly interacts with the C-terminal tail of beta -dystroglycan. Identification of a central WW-like domain within caveolin family members. *J Biol Chem* 275:38048-38058.
- Speicher DW, Marchesi VT (1984) Erythrocyte spectrin is comprised of many homologous triple helical segments. *Nature* 311:177-180.
- Steinberg RH, Schmidt R, Brown KT (1970) Intracellular responses to light from cat pigment epithelium: origin of the electroretinogram c-wave. *Nature* 227:728-730.

- Stenkamp DL, Frey RA, Prabhudesai SN, Raymond PA (2000) Function for Hedgehog genes in zebrafish retinal development. *Dev Biol* 220:238-252.
- Sterling P (1995) Vision. Tuning retinal circuits. *Nature* 377:676-677.
- Stockton RA, Slaughter MM (1989) B-wave of the electroretinogram. A reflection of ON bipolar cell activity. *J Gen Physiol* 93:101-122.
- Stone J, Dreher Z (1987) Relationship between astrocytes, ganglion cells and vasculature of the retina. *J Comp Neurol* 255:35-49.
- Straub V, Ettinger AJ, Durbeej M, Venzke DP, Cutshall S, Sanes JR, Campbell KP (1999) epsilon-sarcoglycan replaces alpha-sarcoglycan in smooth muscle to form a unique dystrophin-glycoprotein complex. *J Biol Chem* 274:27989-27996.
- Strettoi E, Masland RH (1996) The number of unidentified amacrine cells in the mammalian retina. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:14906-14911.
- Strom TM, Nyakatura G, Apfelstedt-Sylla E, Hellebrand H, Lorenz B, Weber BH, Wutz K, Gutwillinger N, Ruther K, Drescher B, Sauer C, Zrenner E, Meitinger T, Rosenthal A, Meindl A (1998) An L-type calcium-channel gene mutated in incomplete X-linked congenital stationary night blindness. *Nat Genet* 19:260-263.
- Sugita S, Han W, Butz S, Liu X, Fernandez-Chacon R, Lao Y, Sudhof TC (2001) Synaptotagmin VII as a plasma membrane Ca(2+) sensor in exocytosis. *Neuron* 30:459-473.
- Sugiyama J, Bowen DC, Hall ZW (1994) Dystroglycan binds nerve and muscle agrin. *Neuron* 13:103-115.
- Sunada Y, Bernier SM, Kozak CA, Yamada Y, Campbell KP (1994) Deficiency of merosin in dystrophic dy mice and genetic linkage of laminin M chain gene to dy locus. *J Biol Chem* 269:13729-13732.
- Suzuki A, Yoshida M, Ozawa E (1995) Mammalian alpha 1- and beta 1-syntrophin bind to the alternative splice-prone region of the dystrophin COOH terminus. *J Cell Biol* 128:373-381.
- Suzuki A, Yoshida M, Hayashi K, Mizuno Y, Hagiwara Y, Ozawa E (1994) Molecular organization at the glycoprotein-complex-binding site of dystrophin. Three dystrophin-associated proteins bind directly to the carboxy-terminal portion of dystrophin. *Eur J Biochem* 220:283-292.
- Sweeney HL, Barton ER (2000) The dystrophin-associated glycoprotein complex: what parts can you do without? *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:13464-13466.

- Talts JF, Andac Z, Gohring W, Brancaccio A, Timpl R (1999) Binding of the G domains of laminin alpha1 and alpha2 chains and perlecan to heparin, sulfatides, alpha-dystroglycan and several extracellular matrix proteins. *Embo J* 18:863-870.
- Tamura T, Yoshioka K, Jinno Y, Niikawa N, Miike T (1993) Dystrophin isoforms expressed in the mouse retina. *J Neurol Sci* 115:214-218.
- Tauchi M, Masland RH (1984) The shape and arrangement of the cholinergic neurons in the rabbit retina. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 223:101-119.
- Thompson TG, Chan YM, Hack AA, Brosius M, Rajala M, Lidov HG, McNally EM, Watkins S, Kunkel LM (2000) Filamin 2 (FLN2): A muscle-specific sarcoglycan interacting protein. *J Cell Biol* 148:115-126.
- Thoreson WB, Witkovsky P (1999) Glutamate receptors and circuits in the vertebrate retina. *Prog Retin Eye Res* 18:765-810.
- Tian M, Jacobson C, Gee SH, Campbell KP, Carbonetto S, Jucker M (1996) Dystroglycan in the cerebellum is a laminin alpha 2-chain binding protein at the glial-vascular interface and is expressed in Purkinje cells. *Eur J Neurosci* 8:2739-2747.
- Tian N, Slaughter MM (1995) Correlation of dynamic responses in the ON bipolar neuron and the b-wave of the electroretinogram. *Vision Res* 35:1359-1364.
- Tinsley J, Deconinck N, Fisher R, Kahn D, Phelps S, Gillis JM, Davies K (1998) Expression of full-length utrophin prevents muscular dystrophy in mdx mice. *Nat Med* 4:1441-1444.
- Tinsley JM, Blake DJ, Davies KE (1993) Apo-dystrophin-3: a 2.2kb transcript from the DMD locus encoding the dystrophin glycoprotein binding site. *Hum Mol Genet* 2:521-524.
- Tinsley JM, Blake DJ, Zuellig RA, Davies KE (1994) Increasing complexity of the dystrophin-associated protein complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:8307-8313.
- Tinsley JM, Potter AC, Phelps SR, Fisher R, Trickett JI, Davies KE (1996) Amelioration of the dystrophic phenotype of mdx mice using a truncated utrophin transgene. *Nature* 384:349-353.
- Tinsley JM, Blake DJ, Roche A, Fairbrother U, Riss J, Byth BC, Knight AE, Kendrick-Jones J, Suthers GK, Love DR, et al. (1992) Primary structure of dystrophin-related protein. *Nature* 360:591-593.
- Tochio H, Zhang Q, Mandal P, Li M, Zhang M (1999) Solution structure of the extended neuronal nitric oxide synthase PDZ domain complexed with an associated peptide. *Nat Struct Biol* 6:417-421.

- Tokarz SA, Duncan NM, Rash SM, Sadeghi A, Dewan AK, Pillers DA (1998) Redefinition of dystrophin isoform distribution in mouse tissue by RT-PCR implies role in nonmuscle manifestations of duchenne muscular dystrophy. *Mol Genet Metab* 65:272-281.
- Tome FM, Evangelista T, Leclerc A, Sunada Y, Manole E, Estournet B, Barois A, Campbell KP, Fardeau M (1994) Congenital muscular dystrophy with merosin deficiency. *C R Acad Sci III* 317:351-357.
- Tomita T (1965) Electrophysiological study of the mechanisms subserving color coding in the fish retina. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 30:559-566.
- Tracey I, Dunn JF, Radda GK (1996) Brain metabolism is abnormal in the mdx model of Duchenne muscular dystrophy. *Brain* 119 (Pt 3):1039-1044.
- Tremblay F, Laroche RG, De Becker I (1995) The electroretinographic diagnosis of the incomplete form of congenital stationary night blindness. *Vision Res* 35:2383-2393.
- Ueda H, Tsukahara S, Kobayashi T, Ohno S (1995a) Immunocytochemical study of dystrophin-related protein in the rat retina. *Ophthalmic Res* 27:219-226.
- Ueda H, Kobayashi T, Mitsui K, Tsurugi K, Tsukahara S, Ohno S (1995b) Dystrophin localization at presynapse in rat retina revealed by immunoelectron microscopy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 36:2318-2322.
- Ueda H, Baba T, Terada N, Kato Y, Tsukahara S, Ohno S (1997a) Dystrophin in rod spherules; submembranous dense regions facing bipolar cell processes. *Histochem Cell Biol* 108:243-248.
- Ueda H, Kato Y, Baba T, Terada N, Fujii Y, Tsukahara S, Ohno S (1997b) Immunocytochemical study of dystrophin localization in cone cells of mouse retinas. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 38:1627-1630.
- Uga S, Smelser (1973a) Comparative study of the fine structure of retinal Muller cells in various vertebrates. *Invest Ophthalmol* 12:434-448.
- Uga S, Smelser GK (1973b) Electron microscopic study of the development of retinal Mullerian cells. *Invest Ophthalmol* 12:295-307.
- Vaillend C, Ungerer A (1999) Behavioral characterization of mdx3cv mice deficient in C-terminal dystrophins. *Neuromuscul Disord* 9:296-304.
- Vaillend C, Rendon A, Misslin R, Ungerer A (1995) Influence of dystrophin-gene mutation on mdx mouse behavior. I. Retention deficits at long delays in spontaneous alternation and bar-pressing tasks. *Behav Genet* 25:569-579.

- Vainzof M, Passos-Bueno MR, Canovas M, Moreira ES, Pavanello RC, Marie SK, Anderson LV, Bonnemann CG, McNally EM, Nigro V, Kunkel LM, Zatz M (1996) The sarcoglycan complex in the six autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophies. *Hum Mol Genet* 5:1963-1969.
- Van Epps HA, Yim CM, Hurley JB, Brockerhoff SE (2001) Investigations of photoreceptor synaptic transmission and light adaptation in the zebrafish visual mutant nrc. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42:868-874.
- van Raamsdonk W, Pool CW, te Kronnie G (1978) Differentiation of muscle fiber types in the teleost *Brachydanio rerio*. *Anat Embryol (Berl)* 153:137-155.
- van Raamsdonk W, Pool CW, Heyting C, teKronnie G, Veeken K (1982a) Effects of immobilization and partial denervation on the differentiation of muscle fiber types in the Zebrafish, *Brachydanio rerio*. *Anat Embryol (Berl)* 164:63-74.
- van Raamsdonk W, van't Veer L, Veeken K, Heyting C, Pool CW (1982b) Differentiation of muscle fiber types in the teleost *Brachydanio rerio*, the zebrafish. Posthatching development. *Anat Embryol (Berl)* 164:51-62.
- Vandenbranden CA, Verweij J, Kamermans M, Muller LJ, Ruijter JM, Vrensen GF, Spekrijse H (1996) Clearance of neurotransmitter from the cone synaptic cleft in goldfish retina. *Vision Res* 36:3859-3874.
- Vardi N (1998) Alpha subunit of Go localizes in the dendritic tips of ON bipolar cells. *J Comp Neurol* 395:43-52.
- Vardi N, Masarachia P, Sterling P (1992) Immunoreactivity to GABAA receptor in the outer plexiform layer of the cat retina. *J Comp Neurol* 320:394-397.
- Vardi N, Duvoisin R, Wu G, Sterling P (2000) Localization of mGluR6 to dendrites of ON bipolar cells in primate retina. *J Comp Neurol* 423:402-412.
- Vardi N, Morigiwa K, Wang TL, Shi YJ, Sterling P (1998) Neurochemistry of the mammalian cone 'synaptic complex'. *Vision Res* 38:1359-1369.
- Vardi N, Dhingra A, Zhang L, Lyubarsky A, Wang TL, Morigiwa K (2002) Neurochemical organization of the first visual synapse. *Keio J Med* 51:154-164.
- Vater R, Young C, Anderson LVB, Lindsay S, Blake DJ, Davies KE, Zuellig R, Slater CR (1998) Utrophin mRNA Expression in Muscle Is Not Restricted to the Neuromuscular Junction. *Mol Cell Neurosci* 10:229-242.
- Veruki ML, Hartveit E (2002) AII (Rod) amacrine cells form a network of electrically coupled interneurons in the mammalian retina. *Neuron* 33:935-946.

- Vickers JC, Schumer RA, Podos SM, Wang RF, Riederer BM, Morrison JH (1995) Differential vulnerability of neurochemically identified subpopulations of retinal neurons in a monkey model of glaucoma. *Brain Res* 680:23-35.
- von Blankenfeld G, Kettenmann H (1991) Glutamate and GABA receptors in vertebrate glial cells. *Mol Neurobiol* 5:31-43.
- Wagner KR, Cohen JB, Huganir RL (1993) The 87K postsynaptic membrane protein from Torpedo is a protein-tyrosine kinase substrate homologous to dystrophin. *Neuron* 10:511-522.
- Walsh CA, Goffinet AM (2000) Potential mechanisms of mutations that affect neuronal migration in man and mouse. *Curr Opin Genet Dev* 10:270-274.
- Wang J, Pansky A, Venuti JM, Yaffe D, Nudel U (1998) A sea urchin gene encoding dystrophin-related proteins. *Hum Mol Genet* 7:581-588.
- Wassle H, Boycott BB (1991) Functional architecture of the mammalian retina. *Physiol Rev* 71:447-480.
- Wassle H, Yamashita M, Greferath U, Grunert U, Muller F (1991) The rod bipolar cell of the mammalian retina. *Vis Neurosci* 7:99-112.
- Wassle H, Koulen P, Brandstatter JH, Fletcher EL, Becker CM (1998) Glycine and GABA receptors in the mammalian retina. *Vision Res* 38:1411-1430.
- Way M, Pope B, Cross RA, Kendrick-Jones J, Weeds AG (1992) Expression of the N-terminal domain of dystrophin in *E. coli* and demonstration of binding to F-actin. *FEBS Lett* 301:243-245.
- Wehrwein E, Thompson SA, Coulibaly SF, Linn DM, Linn CL (2004) Acetylcholine protection of adult pig retinal ganglion cells from glutamate-induced excitotoxicity. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45:1531-1543.
- Westerfield M, Liu DW, Kimmel CB, Walker C (1990) Pathfinding and synapse formation in a zebrafish mutant lacking functional acetylcholine receptors. *Neuron* 4:867-874.
- Wheeler MT, Zarnegar S, McNally EM (2002) Zeta-sarcoglycan, a novel component of the sarcoglycan complex, is reduced in muscular dystrophy. *Hum Mol Genet* 11:2147-2154.
- Whitten DN, Brown KT (1973) The time courses of late receptor potentials from monkey cones and rods. *Vision Res* 13:107-135.
- Williamson RA, Henry MD, Daniels KJ, Hrstka RF, Lee JC, Sunada Y, Ibraghimov-Beskrovnaya O, Campbell KP (1997) Dystroglycan is essential for early embryonic

- development: disruption of Reichert's membrane in Dag1-null mice. *Hum Mol Genet* 6:831-841.
- Wilson J, Putt W, Jimenez C, Edwards YH (1999) Up71 and up140, two novel transcripts of utrophin that are homologues of short forms of dystrophin. *Hum Mol Genet* 8:1271-1278.
- Winder SJ (1997) The membrane-cytoskeleton interface: the role of dystrophin and utrophin. *J Muscle Res Cell Motil* 18:617-629.
- Winder SJ, Kendrick-Jones J (1995) Calcium/calmodulin-dependent regulation of the NH₂-terminal F-actin binding domain of utrophin. *FEBS Lett* 357:125-128.
- Witkovsky P, Stone S, Ripps H (1985) Pharmacological modification of the light-induced responses of Muller (glial) cells in the amphibian retina. *Brain Res* 328:111-120.
- Wurziger K, Lichtenberger T, Hanitzsch R (2001) On-bipolar cells and depolarising third-order neurons as the origin of the ERG-b-wave in the RCS rat. *Vision Res* 41:1091-1101.
- Xu X, Karwoski CJ (1994a) Current source density analysis of retinal field potentials. II. Pharmacological analysis of the b-wave and M-wave. *J Neurophysiol* 72:96-105.
- Xu X, Karwoski CJ (1994b) Current source density (CSD) analysis of retinal field potentials. I. Methodological considerations and depth profiles. *J Neurophysiol* 72:84-95.
- Xu X, Karwoski C (1995) Current source density analysis of the electroretinographic d wave of frog retina. *J Neurophysiol* 73:2459-2469.
- Yamada H, Shimizu T, Tanaka T, Campbell KP, Matsumura K (1994) Dystroglycan is a binding protein of laminin and merosin in peripheral nerve. *FEBS Lett* 352:49-53.
- Yamada H, Denzer AJ, Hori H, Tanaka T, Anderson LV, Fujita S, Fukuta-Ohi H, Shimizu T, Ruegg MA, Matsumura K (1996a) Dystroglycan is a dual receptor for agrin and laminin-2 in Schwann cell membrane. *J Biol Chem* 271:23418-23423.
- Yamada H, Chiba A, Endo T, Kobata A, Anderson LV, Hori H, Fukuta-Ohi H, Kanazawa I, Campbell KP, Shimizu T, Matsumura K (1996b) Characterization of dp6troglycan-laminin interaction in peripheral nerve. *J Neurochem* 66:1518-1524.
- Yamamoto H, Mizuno Y, Hayashi K, Nonaka I, Yoshida M, Ozawa E (1994) Expression of dystrophin-associated protein 35DAG (A4) and 50DAG (A2) is confined to striated muscles. *J Biochem (Tokyo)* 115:162-167.

- Yan Y, Winograd E, Viel A, Cronin T, Harrison SC, Branton D (1993) Crystal structure of the repetitive segments of spectrin. *Science* 262:2027-2030.
- Yang B, Jung D, Rafael JA, Chamberlain JS, Campbell KP (1995a) Identification of alpha-syntrophin binding to syntrophin triplet, dystrophin, and utrophin. *J Biol Chem* 270:4975-4978.
- Yang B, Jung D, Motto D, Meyer J, Koretzky G, Campbell KP (1995b) SH3 domain-mediated interaction of dystroglycan and Grb2. *J Biol Chem* 270:11711-11714.
- Yang D, Pan A, Swaminathan A, Kumar G, Hughes BA (2003) Expression and localization of the inwardly rectifying potassium channel Kir7.1 in native bovine retinal pigment epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44:3178-3185.
- Yokota T, Miyagoe Y, Hosaka Y, Tsukita K, Kameya S, Shibuya S, Matsuda R, Wakayama Y, S T (2000) Aquaporin-4 is absent at the sarcolemma and at perivascular astrocyte endfeet in a1-syntrophin knockout mice. *Proc Japan Acad* 76:22-27.
- Yonemura D, Aoki T, Tsuzuki K (1962) Electroretinogram in diabetic retinopathy. *Arch Ophthalmol* 68:19-24.
- Yonemura D, Kawasaki K, Yoshino Y, Yanagida T (1974) [Pharmacological isolation of the P III of albino rabbit ERG in vivo]. *Nippon Ganka Gakkai Zasshi* 78:858-866.
- Yoshida M, Ozawa E (1990) Glycoprotein complex anchoring dystrophin to sarcolemma. *J Biochem (Tokyo)* 108:748-752.
- Yoshida M, Suzuki A, Yamamoto H, Noguchi S, Mizuno Y, Ozawa E (1994) Dissociation of the complex of dystrophin and its associated proteins into several unique groups by n-octyl beta-D-glucoside. *Eur J Biochem* 222:1055-1061.
- Yoshida M, Hama H, Ishikawa-Sakurai M, Imamura M, Mizuno Y, Araishi K, Wakabayashi-Takai E, Noguchi S, Sasaoka T, Ozawa E (2000) Biochemical evidence for association of dystrobrevin with the sarcoglycan-sarcospan complex as a basis for understanding sarcoglycanopathy. *Hum Mol Genet* 9:1033-1040.
- Yoshida T, Pan Y, Hanada H, Iwata Y, Shigekawa M (1998) Bidirectional signaling between sarcoglycans and the integrin adhesion system in cultured L6 myocytes. *J Biol Chem* 273:1583-1590.
- Zaccaria ML, De Stefano ME, Gotti C, Petrucci TC, Paggi P (2000) Selective reduction in the nicotinic acetylcholine receptor and dystroglycan at the postsynaptic apparatus of mdx mouse superior cervical ganglion. *J Neuropathol Exp Neurol* 59:103-112.

- Zaccaria ML, De Stefano ME, Properzi F, Gotti C, Petrucci TC, Paggi P (1998) Disassembly of the cholinergic postsynaptic apparatus induced by axotomy in mouse sympathetic neurons: the loss of dystrophin and beta-dystroglycan immunoreactivity precedes that of the acetylcholine receptor. *J Neuropathol Exp Neurol* 57:768-779.
- Zhao J, Uchino M, Yoshioka K, Miyatake M, Miike T (1991) Dystrophin in control and mdx retina. *Brain Dev* 13:135-137.
- Zon LI (1999) Zebrafish: a new model for human disease. *Genome Res* 9:99-100.

F. Annexes

Publications et communications scientifiques relatives au travail de thèse

Characterization of a Novel Model to Study the Neurobiology of the Duchenne Muscular Dystrophy: the Porcine Retina.

Agnès Bordais, Francisco Bolaños-Jimenez, Patrice Fort, Carolina Varela, José-Alain Sahel, Serge Picaud and Alvaro Rendon

Article soumis à Neuromuscular Disorders

Detailed Localization of Dystrophins Dp427, Dp260 and Dp140 at the Outer Plexiform Layer of Mouse Retina

Agnès Bordais, Yannick Schwab, Carolina Varela-Rodriguez, Patrice Fort, Colette Hindelang, Valerie Messent, Serge Picaud, José-Alain Sahel, Michel Roux and Alvaro Rendon

Article préparé pour soumission à Journal of Comparative Neurology

Voltage-gated channels and calcium homeostasis in mammalian rod photoreceptors.

Cia D, Bordais A, Varela C, Forster V, Sahel JA, Rendon A, Picaud S.

J Neurophysiol. 2004 Oct 13

Targeted inactivation of dystrophin gene product Dp71: phenotypic impact in mouse retina

Cécile Dalloz*, Rachel Sarig*, Patrice Fort*, David Yaffe, Agnès Bordais, Thomas Pannicke, Jens Grosche, Dominique Mornet, Andreas Reichenbach, José Sahel, Uri Nudel and Alvaro Rendon.

Human Molecular Genetics, 2003, Vol. 12, No. 13 1543–1554

Molecular cloning and characterization of dystrophin and Dp71, two products of the Duchenne Muscular Dystrophy gene, in zebrafish

Francisco Bolaños-Jiménez, Agnès Bordais, Martine Behra, Uwe Strähle, Dominique Mornet, José Sahel, Alvaro Rendón.

Gene, 2001, 274, 217–226.

Dystrophin and Dp71, two products of the DMD gene, show a different pattern of expression during embryonic development in zebrafish

Francisco Bolaños-Jiménez, Agnès Bordais, Martine Behra, Uwe Strähle, José Sahel, Alvaro Rendón.

Mechanisms of Development, 2001, 102, 239-241.

Présentations affichées

Calcium homeostasis in mammalian rod photoreceptors. Cia D., Bordais A., Varela C., Forster V., Sahel J., Picaud S. *4th Forum of European Neuroscience*, (Lisbon, Portugal, 2004)

Pre- and post-synaptic localization at the outer plexiform layer of dystrophins DP427, Dp260 and Dp140: functional implications. Bordais A., Varela C., Fort P., Sahel J., Picaud S., Rendon A.. *The Association for Research in Vision and Ophthalmology* (Fort Lauderdale, Floride, 2004)

Localization of dystrophins at a complex synapse : the outer plexiform layer of the retina. Bordais A., Jellali A., Mutterer J., Rondé P., Dalloz C., Mornet D., Picaud S., Sahel J., Rendon A.. *3rd Forum of European Neuroscience* (Paris, France, 2002)

Expression et localisation de la Dystrophine Dp260 dans la rétine humaine. Bordais A., Bolaños-Jimenez F., Pattnaik B., Balse E., Mornet D., Picaud S., Sahel J., Rendon A.. *5^{ème} Colloque de la Société des Neurosciences* (Toulouse, 2001)

Dystrophin-protein 260 (Dp260) is expressed in different cell types in the outer plexiform layer of the human retina : immunohistochemical and single cell RT-PCR analysis. Rendon A., Bolaños-Jimenez F., Pattnaik B., Bordais A., Balse E., Sahel J., Mornet D., Picaud S. *The Association for Research in Vision and Ophthalmology* (Fort Lauderdale, Floride, 2001)

Immunohistochemical and single cell RT-PCR analysis of the expression of the Dystrophin-protein 260 (Dp260) in the human retina. Bordais A., Bolaños-Jimenez F., Pattnaik B., Balse E., Mornet D., Picaud S., Sahel J., Rendon A.. *Regio Neurex Meeting* (Freiburg, 2000)

Dystrophin expression during eye development in zebrafish. Bolaños-Jimenez F., Bordais A., Strähle U., Rendon A. *Congrès AFM-Myology 2000* (Nice, 2000)