

UNIVERSITE LOUIS PASTEUR - STRASBOURG 1

THESE de DOCTORAT

Discipline : Sciences du Vivant

Domaine : Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie

Présentée par Marie-Noëlle Delyfer

Pour obtenir le grade de Docteur de l'Université Louis Pasteur – Strasbourg 1

Etude de l'effet du GDNF sur un transporteur du glutamate dans un modèle de rétinopathie pigmentaire.

*Mode d'action d'un facteur de croissance utilisé pour la neuroprotection des
photorécepteurs ?*

Soutenue publiquement le 30 juin 2005

Membres du jury :

Président et rapporteur interne :

Professeur Alain Beretz

Université Louis Pasteur – Strasbourg 1

Rapporteurs externes :

Professeur Jean-François Korobelnik

Université Victor Ségalen - Bordeaux 2

Professeur Michel Weber

Université de Médecine de Nantes

Directeur de Thèse :

Professeur José-Alain Sahel

Université Pierre et Marie Curie - Paris VI

University College of London

Directeur Inserm U592

Co-directeur de Thèse :

Docteur Thierry Lévillard

CR1 – Inserm, U592 Paris

Introduction

Les rétinopathies pigmentaires (RP) regroupent un ensemble hétérogène d'affections rétiniennes dégénératives héréditaires, caractérisées par la mort progressive des photorécepteurs, les bâtonnets et les cônes. Les photorécepteurs sont le siège de la phototransduction, permettant ainsi la conversion de l'énergie lumineuse (photons) en signal électrique. Les bâtonnets sont impliqués dans la vision périphérique, la détection du mouvement et la vision scotopique. Les cônes permettent la vision chromatique et la vision fine en conditions photopiques. La dégénérescence des photorécepteurs conduit à une perte irréversible de la fonction visuelle. Les manifestations cliniques des RP sont extrêmement variables en fonction de la cause et du degré d'évolution de la maladie. Elles peuvent être isolées (RP dites "non syndromiques") ou associées à des anomalies extra-oculaires (RP "syndromiques"), voire s'intégrer dans un tableau de dégénérescence neuronale plus large affectant la rétine et/ou le nerf optique et d'autres structures du système nerveux central. Les progrès réalisés ces dernières années dans la compréhension des mécanismes moléculaires et cellulaires qui concourent à la perte des cellules photoréceptrices ont été remarquables et ont permis l'émergence de nouvelles pistes thérapeutiques : thérapie génique, neuroprotection pharmacologique, transplantation ou encore implants rétiniens électriques. Dans ce contexte, notre travail a consisté à explorer **une hypothèse physio-pathogénique** : "*le glutamate participe-t-il au processus de dégénérescence des bâtonnets ?*", ainsi qu'**une hypothèse concernant le mécanisme de l'action pharmacologique du Glial cell line-Derived Neurotrophic Factor (ou GDNF)** : "*GDNF exerce-t-il son action neuroprotectrice vis-à-vis des photorécepteurs en potentialisant des mécanismes endogènes de défense contre la toxicité médiée par le glutamate ?*".

Après une introduction bibliographique traitant de l'état actuel des connaissances des sujets abordés dans cette thèse, nous présenterons les techniques utilisées au cours de nos travaux, les résultats obtenus seront ensuite décrits et discutés. Le manuscrit soumis et les publications issues de ce travail figurent pour leur part en annexe.

I. LES RETINOPATHIES PIGMENTAIRES

A. Epidémiologie

Les rétinopathies pigmentaires représentent la principale cause de cécité d'origine héréditaire dans les pays industrialisés. La prévalence des RP non syndromiques est estimée entre 1 / 3 500 et 1 / 4 000 (Ammann et coll., 1965 ; Boughman et coll., 1980 ; Jay, 1982). En France, on évalue à 30 000 le nombre de patients atteints (<http://www.snof.org/>).

B. Génétique des rétinopathies pigmentaires

1. Hétérogénéité génétique

La localisation, en 1984, d'un gène responsable de RP récessive liée à l'X sur le bras court du chromosome X dans la population britannique par Bhattacharya et coll. (1984) a marqué le point de départ de l'étude génétique et chromosomique des RP. A la fin des années 80, la localisation puis l'identification de différentes mutations sur le bras long du chromosome 3 affectant le gène codant pour la rhodopsine et induisant des RP autosomiques dominantes (McWilliam et coll., 1989 ; Dryja et coll., 1990 ; Lester et coll., 1990) ont laissé entrevoir l'hétérogénéité génétique associée au " phénotype RP ".

A ce jour, 158 gènes responsables de dystrophies rétiniennes ont été localisés, parmi lesquels 110 ont déjà été clonés (Fig. 1 ; <http://www.sph.uth.tmc.edu/RetNet/disease.htm>). La plupart des mutations identifiées affectent des gènes exprimés exclusivement par les bâtonnets et induisent, par un mécanisme non encore identifié, leur mort par activation de la cascade apoptotique (Chang et coll., 1993).

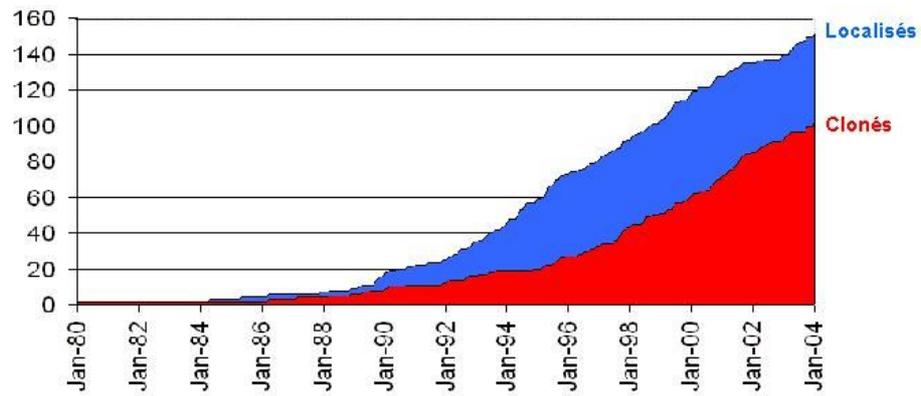


Figure 1. Gènes responsables de dystrophies rétiniennes, localisés et clonés depuis 1980
(d'après <http://www.sph.uth.tmc.edu/RetNet/disease.htm>)

Virtuellement, une mutation affectant n'importe quel gène codant pour une protéine spécifique des segments externes des bâtonnets peut induire un tableau clinique de RP (Hims et coll. 2003 ; <http://www.sph.uth.tmc.edu/RetNet>). Ainsi, des mutations sur les gènes codant pour des protéines de la cascade de phototransduction, des protéines de structure ou du métabolisme ont été identifiées chez des patients présentant une RP parmi lesquelles :

- protéines de la cascade de phototransduction : rhodopsine (Berson et coll., 1991; Rosenfeld et coll., 1992; Li et coll., 1994), transducine (Dryja et coll., 1996), sous-unités alpha et bêta de la phosphodiesterase GMPc-dépendante (Huang et coll., 1995 ; McLaughlin et coll., 1993), sous-unités alpha et bêta des canaux GMPc-dépendants (Dryja et coll., 1995 ; Bareil et coll., 2001), guanylate cyclase (Perrault et coll., 1996), arrestine (Fuchs et coll., 1995).
- protéines du cytosquelette des bâtonnets : périphérine/RDS (Kajiwara et coll., 1991), ROM1 (Bascom et coll., 1995), Fascine (Wada et coll., 2001).
- facteurs de transcription : NRL (Bessant et coll., 1999), PNR (Gerber et coll., 2000)
- protéines d'épissage : HPRP3 (Chakarova et coll., 2002), PRPF8 (Goliath et coll., 1995), PRPF31 (Vithana et coll., 2001).
- protéines du métabolisme : ABCA4/ABCR (Cremers et coll., 1998) ; PIM-1 kinase (Inglehearn et coll., 1993), IMPDH1 (Bowne et coll., 2002), TULP1 (Banerjee et coll., 1998), CRB1 (den Hollander et coll., 1999).
- protéines dont le rôle exact reste encore à préciser : RPGR (Andréasson et coll., 1997), RP1 (Blanton et coll., 1991), RP2 (Bhattacharya et coll., 1984 ; Hardcastle et coll., 1999).

Plus rarement, les mutations responsables de RP affectent des gènes exprimés non pas au niveau des photorécepteurs mais au niveau de l'épithélium pigmentaire adjacent et codant pour des protéines impliquées dans le métabolisme de la vitamine A [CRALBP (Maw et coll., 1997) ; RPE65 (Morimura et coll., 1998) ; LRAT (Thompson et coll., 2001)] ou dans la phagocytose des disques des segments externes des bâtonnets [Mertk, D'Cruz et coll., 2000].

L'hétérogénéité génétique des RP apparaît aujourd'hui considérable et constitue, de

façon évidente, un frein au développement des techniques de dépistage et de diagnostic moléculaire. Par ailleurs, au-delà de la multiplicité des gènes impliqués dans les RP, il existe une grande variabilité des modes de transmission de ces affections.

2. Hétérogénéité des modes de transmission

La plupart des RP sont transmises sur un mode mendélien, quelques unes cependant le sont sur un mode non mendélien et sont le résultat de mutations mitochondriales ou consécutives à un digénisme.

Les *cas sporadiques* représentent 45% des cas.

Les 55% de *cas familiaux* se répartissent ainsi (Fig. 2) :

- autosomiques dominants 40-45%
- autosomiques récessifs 40-45%
- récessifs liés à l'X 10%
- autosomiques digéniques 1-2%

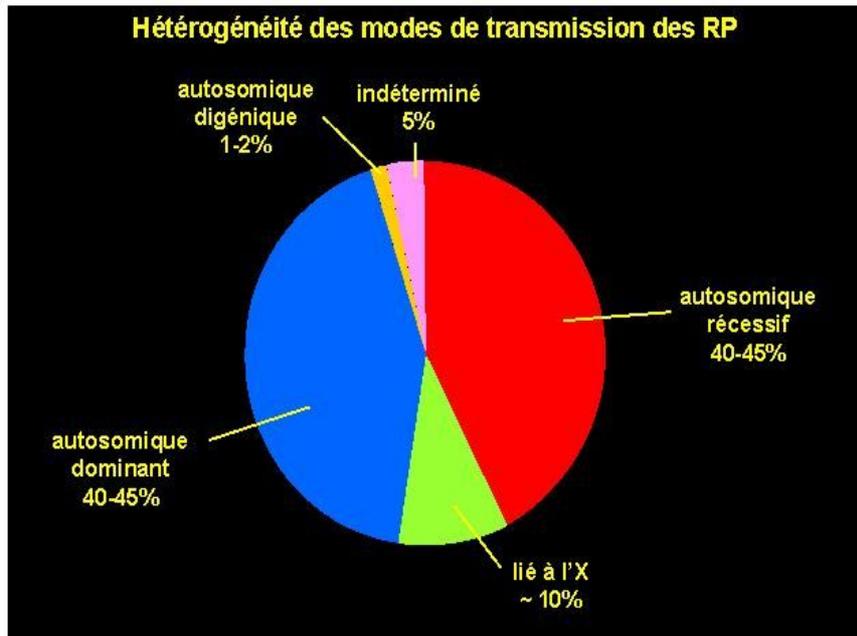
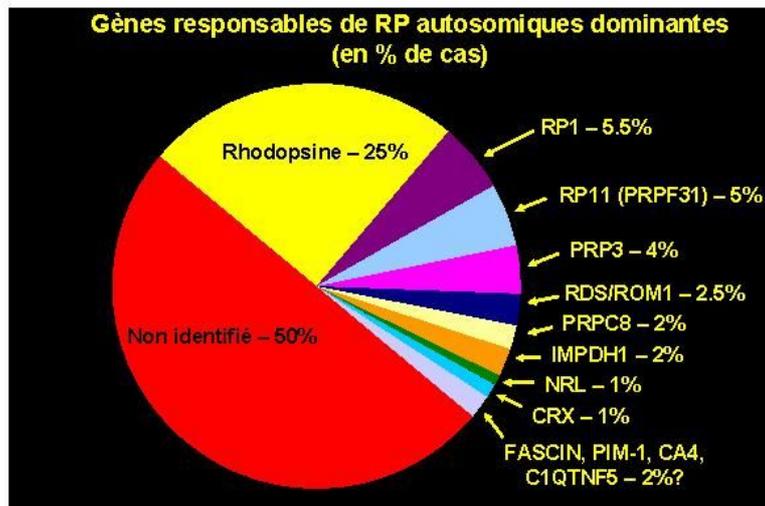


Figure 2. Hétérogénéité des modes de transmission des RP

a) RP autosomiques dominantes ou AD-RP

Un phénotype est dit “ dominant ” quand le caractère génétique s’impose. Lors de la transmission autosomique dominante, les caractères génétiques sont transmis par les chromosomes non sexuels (autosomiques) sur un mode dominant. Bien qu'hétérozygote, le sujet exprimera le phénotype altéré. Ces rétinopathies sont d'assez bon pronostic et sont les plus fréquentes.

Les gènes responsables de AD-RP sont résumés dans les graphe et tableau de la Fig. 3.



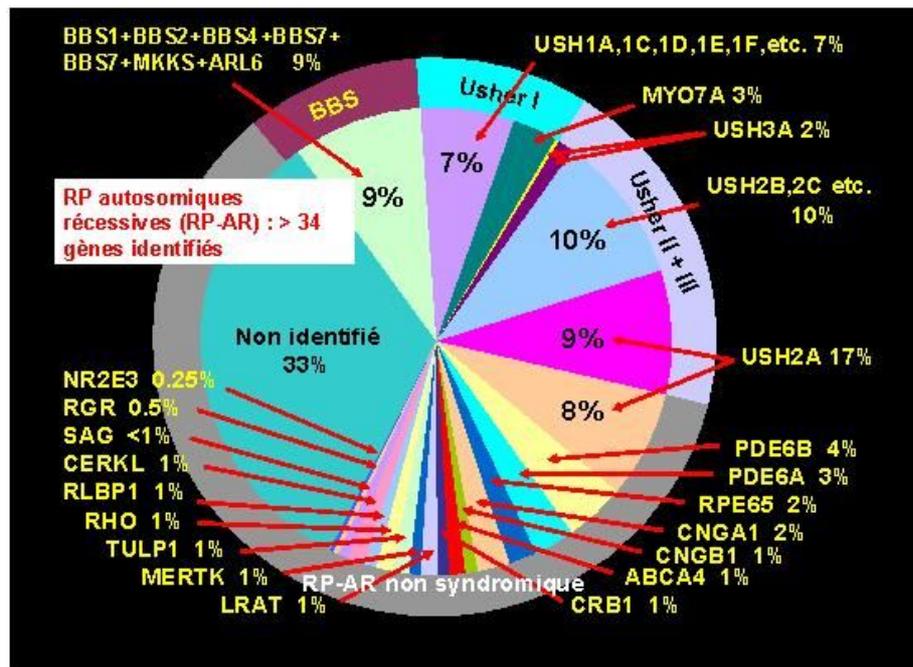
Gène	Famille, Fonction	Localisation
CA4	Anhydrase carbonique type 4	17q23.2
C1QTNF5	Collagène à chaîne courte	
CRX	Cone-Rod homeobox protein (Facteur de transcription)	19q13.32
FASCIN-2	Assemblage des filaments d'actine dans les segments internes	17q25.3
HPRP3	Facteur d'épissage des ARNs	1q21.2
IMPDH1 (RP10)	Inosine monophosphate dehydrogenase type 1	7q32.1
NRL (RP27)	Neural Retina Leucine zipper (Facteur de transcription)	14q11.2
PIM-1(RP9)	Homologue oncogène	7p14.3
PRPF8	Facteur d'épissage des ARNs	17p13.3
PRPF31	Facteur d'épissage des ARNs	19q13.42
RDS/périphérique	Protéine structurale des segments externes	6p21.2
Rhodopsine	Phototransduction	3q22.1
ROM1	Rod outer segment membrane protéine 1	11q12.3
RP1	Rôle possible au niveau du cil connecteur	8q12.1

Figure 3. Hétérogénéité génétique des RP autosomiques dominantes
(graphe et tableau élaborés d'après les données du site <http://www.sph.uth.tmc.edu/RetNet/disease.htm>)

b) RP autosomiques récessives ou AR-RP

Un phénotype est dit “récessif” quand le caractère génétique, pour s’imposer, doit être présent sous forme homozygote. Lors de la transmission autosomique récessive, les caractères génétiques sont transmis par les chromosomes non sexuels (autosomiques) sur un mode récessif. Il faut que le sujet soit homozygote pour que la pathologie apparaisse.

Les gènes responsables de AR-RP sont résumés dans les graphe et tableau de la Fig. 4.



Gène	Famille, Fonction	Localisation
ABCA4 (ABCR/RP19)	ATP-binding cassette type A-4	1p22.1
CERKL (RP26)	Ceramide kinase-like protein	2q31.3
CNGA1	Rod cGMP-gated channel alpha subunit	4p12
CNGB1	Rod cGMP-gated channel beta subunit	16q13
CRB1 (RP12)	Crumbs homolog 1	1q31.3
LRAT	Retinol acyltransferase	4q32.1
MERTK	c-mer protooncogene receptor tyrosine kinase	2q13
NR2E3 (ESCS/ PNR)	Nuclear receptor subfamily 2 group E3	15q23
NRL (RP27)	Neural retina leucine zipper	14q11.2
PDE6A	cGMP phosphodiesterase alpha subunit	5q33.1
PDE6B (CSNB3)	Rod cGMP phosphodiesterase beta subunit	4p16.3
RGR	RPE-retinal G protein-coupled receptor	10q23.1
RHO (RP4)	Rhodopsine	3q22.1
RLBP1 (CRALBP)	Cellular retinaldehyde-binding protein	15q26.1
RPE65 (LCA2/RP20)	Retinal pigment epithelium-specific 65 kD protein	1p31.2
SAG	Arrestine (S-antigen)	2q37.1
TULP1 (RP14)	Tubby-like protein 1	6p21.31
USH2A	Usherin	1q41

Figure 4. Hétérogénéité génétique des RP autosomiques récessives
(d'après les données répertoriées dans <http://www.sph.uth.tmc.edu/RetNet/disease.htm>)

c) RP récessives liées à l'X ou XL-RP (X-linked RP)

Au niveau des chromosomes sexuels, le chromosome X porte la grande majorité de l'information génétique. Les femmes porteuses d'une mutation récessive sur l'X à l'état hétérozygote sont appelées "conductrices" car elles n'expriment pas le gène altéré (ou peu, voir infra) mais le transmettent à leur descendance : statistiquement, 50% de leurs filles seront conductrices à leur tour et 50% de leurs garçons seront atteints. En effet, ces derniers ne possédant qu'un seul X (hémizygotés) ils sont nécessairement homozygotes pour les gènes portés par l'X et expriment les allèles récessifs. Chez les individus de sexe féminin, le phénomène d'inactivation aléatoire, ou "lyonisation", explique l'expression de certains traits de l'affection à minima chez les conductrices. De ce fait, l'examen minutieux de la mère et des sœurs d'un patient présentant une XL-RP est important afin d'identifier les conductrices. Les XL-RP sont les rétinopathies pigmentaires qui ont le plus mauvais pronostic et représentent 8% de l'ensemble des RP.

Ces formes de RP sont consécutives à des mutations affectant les gènes RP2 ou RP3 (RPGR ou Retinitis Pigmentosa GTPase Regulator) :

- le gène RP2 est constitué de 5 exons et n'est pas exprimé spécifiquement dans la rétine. Ce gène présente des homologies avec le co-facteur C humain qui joue un rôle dans le repliement de la tubuline bêta, pré-requis nécessaire avant son hétéro-dimérisation avec la tubuline alpha.
- Le gène RP3, ou RPGR, est impliqué dans la régulation et la stabilisation du GTP.

Les gènes des loci RP6 (Breuer et coll., 2000), RP23 (Hardcastle et coll., 2000) et RP24 (Gieser et coll., 1998) pourraient également être responsables de XL-RP ; ils ont été localisés mais, à ce jour, n'ont pas été clonés.

d) Formes consécutives à un digénisme

On parle de “ digénisme di-allélique ” lorsque le développement d’une maladie nécessite la présence d’une mutation sur deux gènes différents. Des mutations hétérozygotes de ROM1 en 11q12.1 associées à des mutations hétérozygotes de RDS/périphérine en 6p21.2 ont ainsi été impliquées dans le développement de formes “ digéniques ” de RP (Kajiwara et coll., 1994 ; Dryja et coll., 1997). Dans ces études, l’équipe de Dryja a démontré que dans les familles étudiées, parmi les individus présentant une mutation hétérozygote sur le gène RDS et/ou une mutation hétérozygote sur le gène ROM1, seuls les individus présentant les deux mutations distinctes développaient la maladie.

Un digénisme “ tri-allélique ” a été rapporté dans le syndrome de Bardet-Biedl. Dans ce cas, les patients développant la maladie présentent deux mutations sur un même gène associées à une autre sur un gène différent (Katsanis et coll., 2000 ; 2001).

3. Hétérogénéité allélique

Au-delà de l’hétérogénéité génétique et de la variabilité des modes de transmission, les RP se caractérisent également par une grande hétérogénéité allélique.

On parle d’hétérogénéité allélique quand des mutations différentes sur un même gène induisent une seule et même maladie. Concernant les RP, l’exemple de la rhodopsine est particulièrement éloquent en ce sens. En effet, depuis 1989 (McWilliam et coll., 1989), plus de 100 mutations différentes sur le gène codant pour la rhodopsine (locus 3q21-24) ont été identifiées chez des patients porteurs de RP autosomiques dominantes.

De plus, en 1992, l’équipe de Dryja a identifié la première mutation de la rhodopsine responsable d’une RP autosomique récessive (Rosenfeld et coll., 1992); deux nouvelles mutations sur le gène codant pour la rhodopsine ont depuis été isolées chez des patients présentant une AR-RP.

Aujourd'hui, on estime que les différentes mutations sur le gène codant pour la rhodopsine sont responsables de 10% de l'ensemble des cas de RP observés en clinique.

C. Physiopathogénie de la dégénérescence des photorécepteurs

(cf. Annexe 1- Rapport SFO
2004)

1. Caractéristiques des photorécepteurs les prédisposant à la mort neuronale

Les photorécepteurs sont soumis à un équilibre biochimique fragile. Au cours de la phototransduction (Fig. 5), l'activation du pigment visuel induit l'activation de la transducine puis de la phosphodiesterase-GMPc dépendante (PDE). Le taux de GMPc intra-cellulaire baisse et induit une hyperpolarisation des photorécepteurs par diminution de la fréquence d'ouverture des canaux cationiques GMPc dépendants, ainsi qu'une diminution de la concentration de calcium intra-cellulaire. L'intervention de la PDE confère aux photorécepteurs une grande capacité à moduler le signal mais, en même temps, les fragilise (Travis, 1998). En effet, les photorécepteurs requièrent un substrat énergétique important au repos alors que, les canaux cationiques GMPc dépendants étant ouverts, il existe une activité continue des canaux Na^+/K^+ -ATPase afin de maintenir les gradients électro-chimiques membranaires (Travis, 1998). De plus, les membranes des disques des segments externes subissent des dommages irréversibles qui nécessitent leur renouvellement en permanence. Pour répondre à ces besoins métaboliques, les photorécepteurs sont dotés d'un nombre important de mitochondries et consomment beaucoup d'oxygène (Travis, 1998). Le moindre dysfonctionnement d'un des acteurs de l'activité métabolique des photorécepteurs responsable d'une augmentation de la consommation ou d'une diminution des apports en énergie conduit à terme à la mort cellulaire. La multiplicité des mutations génétiques à l'origine de la

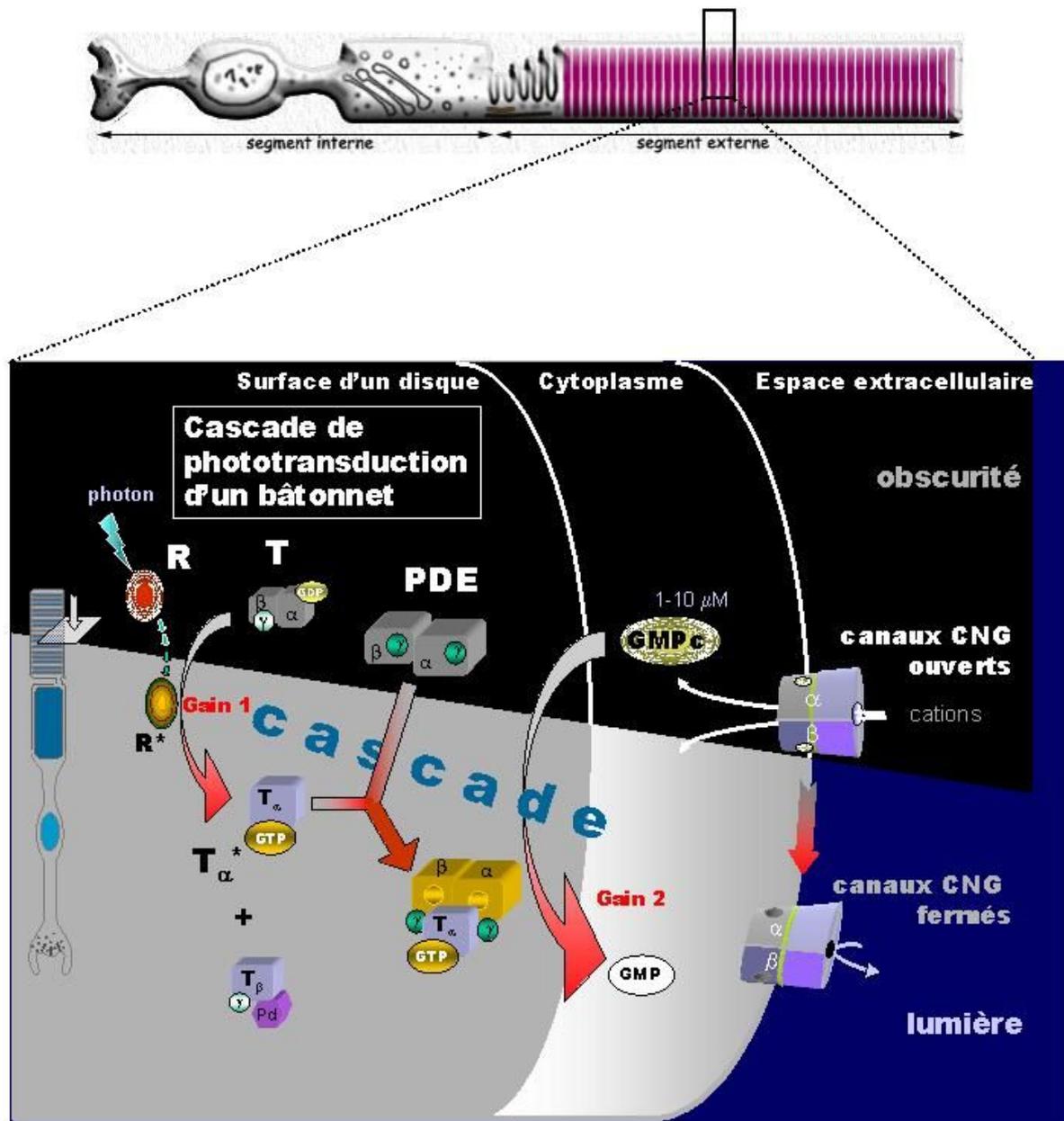


Figure 5. Cascade de phototransduction d'un bâtonnet
 (d'après Polans A, Baehr W, and Palczewski K (1996). *Turned on by Calcium! The physiology and pathology of calcium binding proteins in the retina.* Trends in Neuroscience 19, 547-554)

dégénérescence des photorécepteurs illustre parfaitement la fragilité de l'équilibre biochimique auquel ils sont soumis.

2. Les photorécepteurs dégèrent par apoptose

Les mécanismes cellulaires et moléculaires aboutissant à la dégénérescence des neurones rétiniens, et en particulier des photorécepteurs, sont peu connus chez l'homme en raison de la rareté des spécimens oculaires humains analysés. Les études conduites sur différents modèles animaux de dégénérescences rétiniennes humaines ont permis de mettre en évidence l'implication d'un processus commun de mort neuronale quel que soit le (ou les) gène(s) en cause : l'apoptose (Chang et coll., 1993 ; Lolley et coll., 1994 ; Portera-Cailliau et coll., 1994 ; Tso et coll., 1994 ; Cook et coll., 1995 ; Molthagen et coll., 1996 ; Abler et coll., 1996).

L'apoptose est un processus génétiquement contrôlé jouant un rôle fondamental dans le développement et l'homéostasie cellulaire (Ellis et coll., 1991). Elle participe à l'équilibre entre les phénomènes de prolifération et de mort cellulaire et permet l'élimination de cellules anormales et/ou potentiellement dangereuses. Elle survient selon un programme cellulaire intrinsèque préétabli et précisément régulé, consistant en l'activation d'une cascade enzymatique protéolytique qui aboutit à la fragmentation de l'ADN et au suicide de la cellule (Kerr et coll., 1972) et qui implique soit les "caspases" (protéases à cystéine atteignant les protéines au niveau d'un aspartate) soit l'AIF (Apoptosis Inducing Factor ; Susin et coll., 1999). D'un point de vue morphologique, l'apoptose se caractérise par une diminution du volume de la cellule qui perd ses contacts avec les cellules voisines, une condensation puis une dégradation de la chromatine en fragments réguliers sous l'action d'endonucléases (profil électrophorétique caractéristique dit en "barreaux d'échelle"), puis une fragmentation des membranes plasmiques et nucléaires en corps apoptotiques rapidement phagocytés et éliminés par les cellules avoisinantes sans libération de leur contenu, prévenant ainsi la constitution d'une réaction inflammatoire (Wyllie, 1980 ; Savill et coll., 1993) (Fig. 6). Elle se différencie de la *nécrose* qui est un processus de mort cellulaire passif et désordonné, secondaire à un collapsus métabolique cellulaire, caractérisé par un œdème cellulaire et une lyse de la

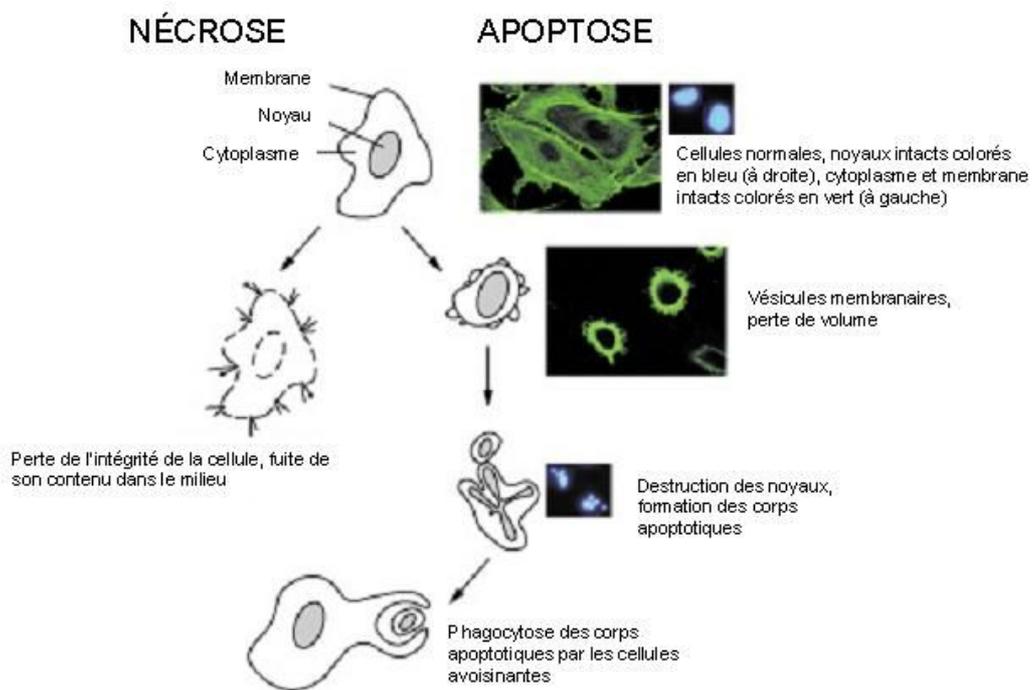


Figure 6. Mécanismes de mort cellulaire : apoptose versus nécrose.
 (d'après www.acfas.ca/concours/eureka98/apoptose.htm)

membrane plasmique avec relargage dans le milieu environnant du contenu cytoplasmique à l'origine d'une réaction inflammatoire ; l'ADN nucléaire, dans ce cas, est dégradé de manière aléatoire (Fig. 6).

Une dérégulation des processus apoptotiques est impliquée dans de nombreuses pathologies. Il s'agit de situations où il existe un défaut d'apoptose (cancers, infections rétrovirales) ou, au contraire, un excès de mort cellulaire programmée (maladies neuro-dégénératives, maladies auto-immunes). La compréhension des mécanismes en cause dans l'activation du processus d'apoptose permettra de proposer de nouvelles stratégies thérapeutiques afin de prévenir la mort cellulaire dans les pathologies neurodégénératives.

3. Voies possibles d'activation de la cascade apoptotique

L'étude des modèles animaux a permis d'énoncer un certain nombre d'hypothèses quant aux voies possibles d'activation de la cascade apoptotique (Travis, 1998 ; Pierce, 2001 ; Fig. 7) :

a) Toxicité métabolique directe : perturbation de l'homéostasie calcique

La souris *rd1* est un bon exemple de toxicité directe par surcharge calcique. Ce modèle animal présente une mutation spontanée sur le gène codant pour la sous-unité bêta de la PDE-GMPc dépendante. La PDE privée de sa sous-unité bêta est inefficace et ne peut dégrader le GMPc qui s'accumule anormalement (Farber et Lolley, 1974, 1977). Les canaux cationiques GMPc-dépendants sont alors surstimulés et laissent passer un influx massif de calcium et de sodium ; le calcium libre en large excès active directement le programme d'apoptose. La toxicité directe du calcium dans ce modèle a été formellement établie dans notre laboratoire par Frasson et coll. (1999a) qui ont démontré que le blocage des récepteurs calciques permettait de retarder la dégénérescence des photorécepteurs (voir chapitre IV-2.3).

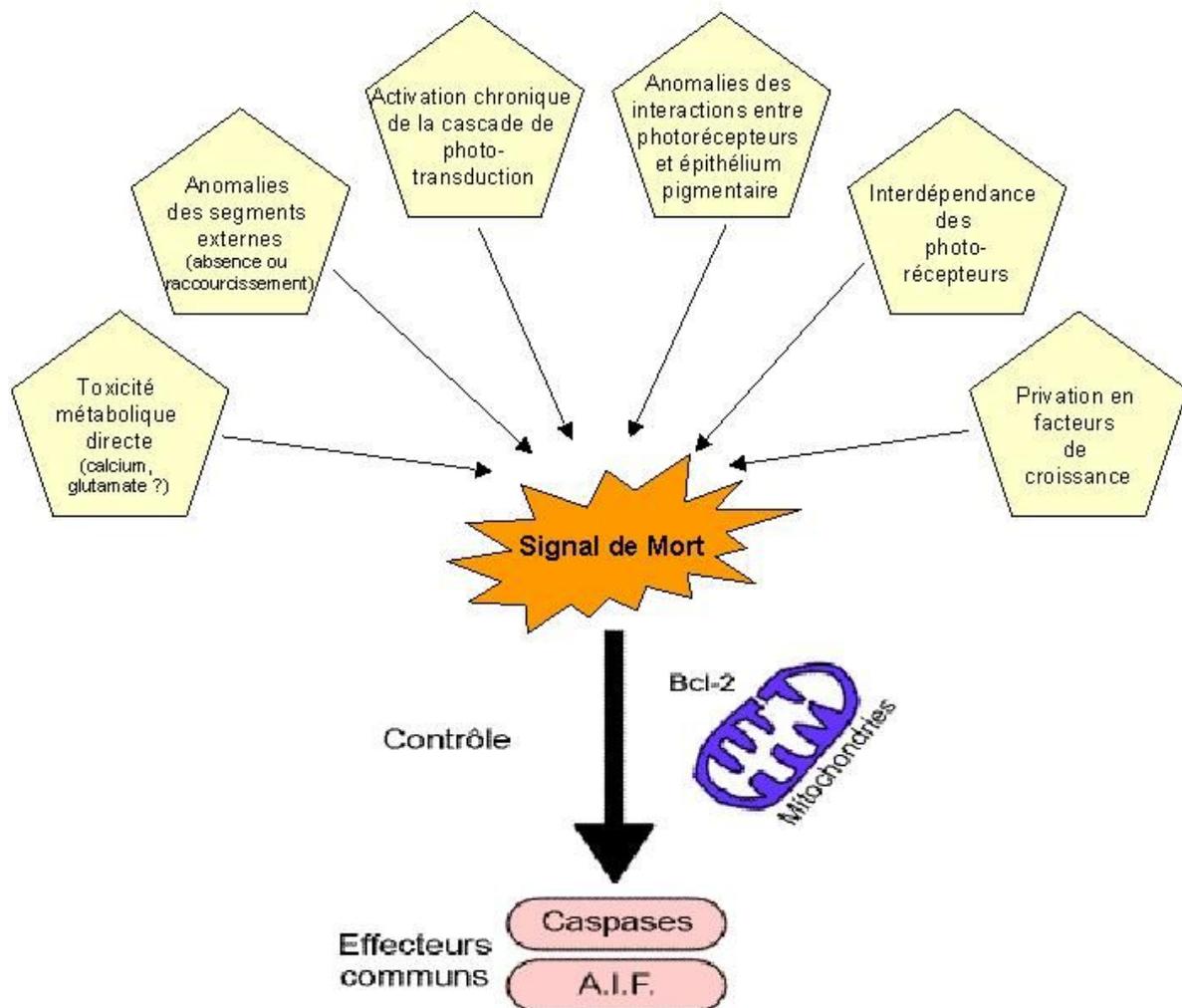


Figure 7. Voies possibles d'activation de la cascade apoptotique au cours des rétinopathies pigmentaires.

La mitochondrie joue un rôle clé dans la régulation de l'apoptose (Zamzami et al., 1996; Kroemer, 1997; Brenner et al., 1998). En effet, la phase effectrice de l'apoptose comporte l'ouverture des pores de transition de perméabilité des mitochondries et la libération de molécules apoptogènes telle que le cytochrome c, les caspases 2, 3 et 9 ainsi que le facteur AIF. Cette phase de libération est sous le contrôle de membres de la famille Bcl-2. Ainsi, Bcl-2 est capable de bloquer la sortie du cytochrome c (Kluck et al., 1997; Vander Heiden et al., 1997; Wang, 1997) alors que Bax peut l'induire (Jurgensmeier et al., 1998).

Inversement, un défaut de calcium peut s'avérer délétère. Nous l'avons vu, dans les cellules photoréceptrices, la synthèse et l'hydrolyse du GMPc constituent des étapes clés de la phototransduction. Le retour au niveau intra-cellulaire de "base" de GMPc (conditions d'obscurité) est permis grâce à la guanylate cyclase (GC), dont l'activation est sous la dépendance de guanylate cyclase-activating proteins (GCAPs). Les mutations affectant les gènes codant pour une des GCAP (1A ou 1B) empêchent l'activation de la GC et donc le renouvellement du GMPc, une fermeture prolongée des canaux GMPc-dépendants et par voie de conséquence une diminution de calcium. Cette chute de la concentration intra-cellulaire de calcium est toxique pour les photorécepteurs qui dégènèrent (Payne et coll., 1998 ; Downes et coll., 2001 ; Payne et coll., 1999 ; Sato et coll., 2005).

b) Anomalies des segments externes des photorécepteurs

De nombreuses mutations sont responsables d'une absence ou d'un raccourcissement des segments externes des photorécepteurs. La souris *rds/rds* en est un exemple : elle présente une absence de développement des segments externes des photorécepteurs suite à une mutation sur le gène codant pour une protéine structurale, la périphérine (Jansen et Sanyal, 1984 ; Travis et coll., 1989). Dans ce modèle, la dégénérescence des photorécepteurs serait secondaire à une élévation excessive du taux d'oxygène, due, pour une part, à une diminution de la consommation d'oxygène en l'absence de segments externes et, pour une autre part, à une proximité plus grande entre les corps cellulaires des photorécepteurs et la choriocapillaire (Travis, 1998). L'excès d'oxygène au voisinage direct des photorécepteurs serait à l'origine de la formation de radicaux libres et du déclenchement du mécanisme apoptotique (Travis, 1998).

D'autres mutations, dont celles affectant le gène codant pour la rhodopsine, induisent des anomalies de développement des segments externes des photorécepteurs (Naash et coll., 1993 ; Li et coll., 1996 ; Liu et coll., 1997). Dans ces cas, la mort neuronale pourrait être secondaire soit à une toxicité de l'oxygène comme chez la souris *rds*, soit à une accumulation de protéines non fonctionnelles.

c) Activation chronique de la cascade de phototransduction

Il est acquis que l'exposition continue et prolongée à la lumière induit une dégénérescence irréversible des photorécepteurs. En se basant sur ce fait, Fain et Lisman ont proposé l'hypothèse appelée “ *equivalent-light hypothesis* ”, selon laquelle l'opsine mutée lors de certaines formes de rétinopathies pigmentaires ou l'opsine libre lors de carence en vitamine A (constitutive ou nutritionnelle), constitue un stimulus continu “ *équivalent lumière* ” qui suractive la cascade enzymatique de phototransduction et provoque à terme la mort des photorécepteurs (Fain et Lisman, 1993 ; Lisman et Fain, 1995). Ainsi, certaines mutations de la rhodopsine (Rim et Oprian, 1995) comme certaines mutations responsables d'une absence ou d'une diminution de canaux cationiques GMPc-dépendants fonctionnels (Dryja et coll., 1995) réalisent un équivalent de stimulus lumineux et activent la cascade enzymatique de phototransduction. Le ou les mécanismes par lesquels l'activation continue de la cascade de phototransduction induit la dégénérescence des photorécepteurs sont mal compris. Une possible toxicité de l'oxygène a été avancée : en effet, les canaux cationiques GMPc-dépendants sont plus souvent fermés lors d'une stimulation lumineuse ou de son équivalent biochimique, l'influx cationique est alors moindre et la consommation d'énergie par les pompes Na^+/K^+ -ATPase diminue ainsi que la consommation d'oxygène au niveau des mitochondries. La pression partielle en oxygène augmente alors dans le micro-environnement des photorécepteurs et pourrait atteindre un seuil toxique (Travis, 1998).

d) Anomalies des interactions entre les photorécepteurs et l'épithélium pigmentaire

Les processus apicaux des cellules de l'épithélium pigmentaire (EP) et les segments externes des photorécepteurs sont anatomiquement et fonctionnellement intriqués. Les cellules de l'EP permettent en particulier l'élimination des disques qui ne sont plus fonctionnels par un processus de phagocytose et participent au cycle de la vitamine A (Travis, 1998). Dans le cas d'une mutation sur un gène exprimé dans les cellules de l'EP et codant pour une protéine impliquée dans le processus de phagocytose, les débris membranaires des photorécepteurs ne

peuvent plus être correctement éliminés. Le rat RCS présente ainsi une mutation sur le gène codant pour le récepteur à activité tyrosine kinase *Mertk* (D'Cruz et coll., 2000). Cette mutation est exprimée dans les cellules de l'EP et rend impossible la phagocytose des disques des segments externes des photorécepteurs qui s'accumulent dans l'espace sous-rétinien. Les photorécepteurs meurent secondairement alors qu'eux-mêmes n'expriment pas la mutation.

Une anomalie d'interaction entre les photorécepteurs et l'EP est également impliquée dans certaines formes d'amaurose congénitale de Leber où une mutation sur un gène exprimé spécifiquement par les cellules de l'EP et codant pour une protéine impliquée dans le cycle de la vitamine A (RPE65) induit la dégénérescence des photorécepteurs (Marlhens et coll., 1997 ; Nicoletti et coll., 1995).

4. Interdépendance des photorécepteurs

Une proportion très significative des dégénérescences rétiniennes héréditaires sont dues à des mutations sur des gènes exprimés spécifiquement par les bâtonnets. On observe cependant une perte séquentielle et systématique des deux types de photorécepteurs, bâtonnets puis cônes. La mort secondaire des cônes génétiquement normaux ne peut être liée à la mutation génétique puisqu'ils ne l'expriment pas.

Différentes hypothèses peuvent être avancées pour expliquer la perte des cônes : 1) les bâtonnets pourraient libérer lors de leur dégénérescence une toxine responsable de la mort des cônes (notamment du glutamate), 2) la dégénérescence des bâtonnets induit une perte de l'architecture de la couche nucléaire externe qui pourrait être fatale aux cônes, 3) Milam et coll. (1998) ont mis en évidence des altérations des cellules de l'épithélium pigmentaire et des cellules gliales de Müller au cours des rétinoopathies pigmentaires qui pourraient être impliquées dans la mort des cônes, 4) Banin et coll. (1999) ont rapporté des anomalies post-synaptiques aux cônes par défaut de maturation qui pourraient jouer un rôle, 5) enfin, il pourrait exister une interdépendance trophique entre les deux types de cellules photoréceptrices.

La construction d'animaux chimères à partir de souris "sauvages" et de souris

porteuses d'une mutation sur le gène de la rhodopsine permet d'obtenir une rétine "mosaïque" constituée de zones exprimant la mutation et de zones saines. L'étude de ces chimères a mis en évidence une dégénérescence uniforme des photorécepteurs à la fois dans les zones de rétine exprimant la mutation et dans celles qui ne l'expriment pas, la cinétique de la dégénérescence étant proportionnelle à l'étendue des zones mutées (Huang et coll., 1993). Des résultats similaires ont été obtenus dans un autre modèle d'étude (Kedzierski et coll., 1998). Ces observations démontrent que la dégénérescence des photorécepteurs initialement sains est due à la mort des photorécepteurs voisins, soit que ces photorécepteurs dégénérés libèrent des facteurs pro-apoptotiques, soit au contraire qu'ils ne synthétisent plus de facteurs trophiques (Travis, 1998). La nature du facteur diffusible responsable de la mort secondaire des cônes n'a pas encore été identifiée. Certaines études sont en faveur de la libération par les photorécepteurs d'un facteur pro-apoptotique, qui pourrait être le NO ou le Tumor Necrosis Factor (TNF) (Travis, 1998 ; Goureau et coll., 1993). Il semble cependant plus probable que la mort secondaire des cônes soit liée à un défaut de libération d'un facteur trophique par les bâtonnets dégénérés (Mohand-Saïd et coll., 1998, 2000 ; Fintz et coll., 2003). Les études *in vivo* menées chez la souris *rd1* montrent en effet que la transplantation de photorécepteurs dans l'espace sous-rétinien de ce modèle de rétinopathie pigmentaire permet une survie significative et prolongée des cônes (Mohand-Saïd et coll., 2000). Les études *in vitro* démontrent par ailleurs que les bâtonnets permettent la survie des cônes par la libération d'un facteur de survie diffusible, de nature protéique et sensible à la chaleur (Mohand-Saïd et coll., 1998 ; Fintz et coll., 2003). Récemment, notre laboratoire a identifié un de ces facteurs de survie appelé Rod-derived Cone Viability Factor ou RdCVF (Léveillard et coll., 2004 ; voir paragraphe IV-B.4.c).

D. Présentations cliniques

Dans 90 à 95% des cas de dystrophie rétinienne héréditaire, il s'agit de rétinopathie à bâtonnets prédominants, appelée "rod-cone dystrophy" par les anglo-saxons et, plus largement, "retinitis pigmentosa" (Fig. 8). Ces affections se caractérisent par une perte initiale des bâtonnets puis secondairement des cônes. Les signes cliniques et l'évolution sont fonction du type de transmission de la rétinopathie pigmentaire. Ainsi les formes autosomiques dominantes sont considérées comme les moins graves, alors que les formes

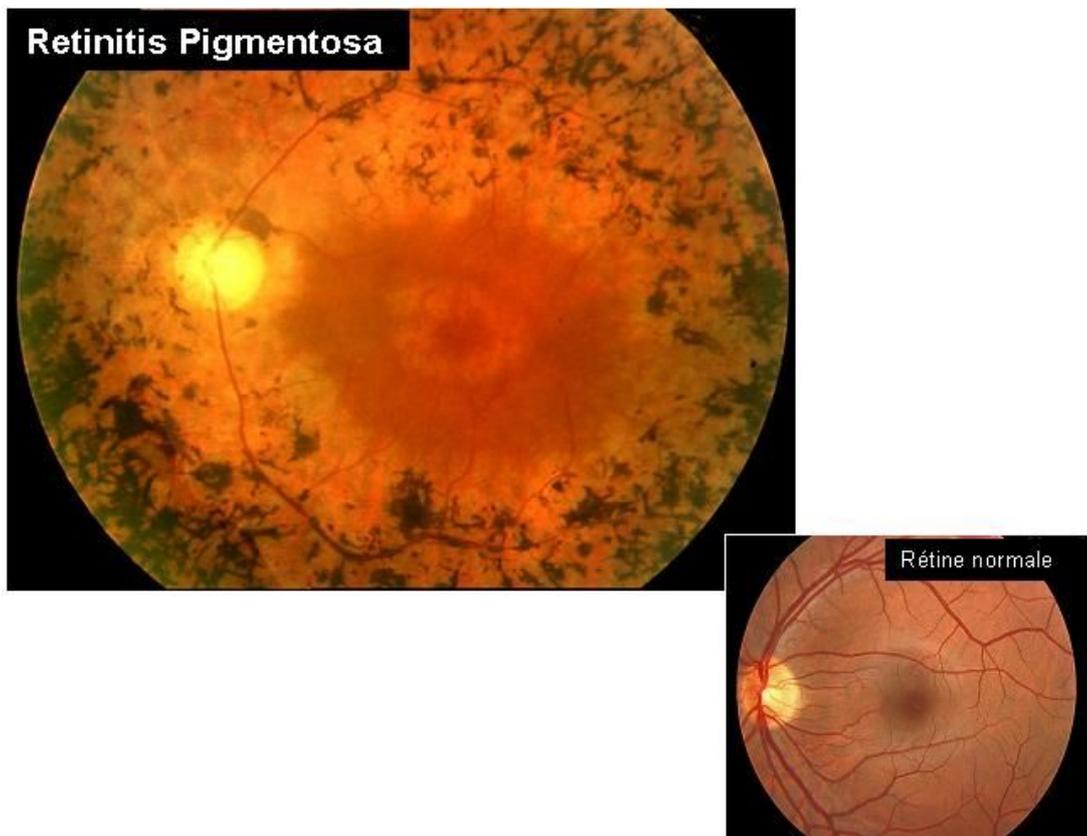
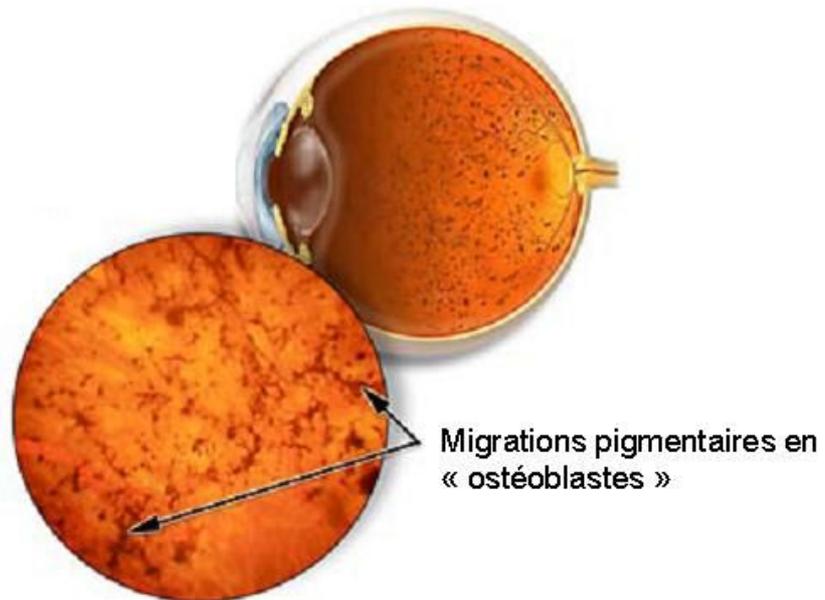


Figure 8. Fond d'œil de rétinopathie pigmentaire associant migrations pigmentaires en « ostéoblastes », vaisseaux grêles et papille pâle.

récessives ou liées à l'X sont plus sévères et auront, de ce fait, une symptomatologie clinique plus précoce et une évolution plus rapide.

1. Signes fonctionnels

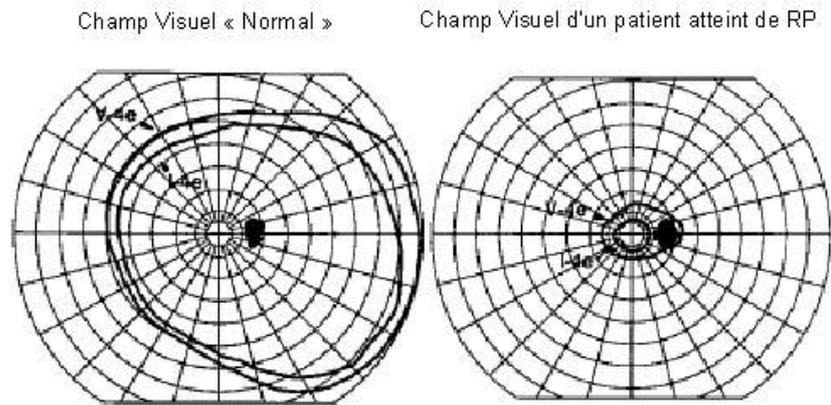
Le premier signe fonctionnel est la cécité nocturne ou héméralopie. Une photophobie peut ensuite apparaître. L'acuité visuelle reste conservée dans les stades débutants et moyennement évolués.

2. Signes cliniques

Cliniquement, l'examen biomicroscopique du segment antérieur est le plus souvent normal. Le fond d'œil met typiquement en évidence des lésions bilatérales associant (Fig. 8) :

- des anomalies pigmentaires : dans les stades de début, il existe une dépigmentation de l'épithélium pigmentaire donnant un aspect " poivre et sel " ; par la suite, on observe des migrations pigmentaires en moyenne périphérie rétinienne réalisant le tableau caractéristique d' " ostéoblastes "
- une réduction du calibre des artères rétiniennes
- une pâleur cireuse du nerf optique
- associés à des degrés variables d'atrophie rétinienne ou d'œdème maculaire cystoïde
- selon les cas, on pourra observer : une cataracte sous-capsulaire postérieure, une myopie, un kératocône, un glaucome, des drüsen papillaires ou des condensations vitréennes.

A.



B.



Figure 9.

A, Champ Visuel de rétinopathie pigmentaire type « rod-cone dystrophy » évoluée.

B, Illustration approximative de la vision d'un patient atteint de RP évoluée.

3. Explorations paracliniques

a) Champ visuel

Le champ visuel peut être normal dans les formes débutantes, les conditions mésopiques de réalisation de l'examen pouvant faire passer à côté des premiers déficits campimétriques. Des scotomes périphériques apparaissent par la suite et s'étendent progressivement. Enfin, dans les stades évolués, il existe une constriction du champ visuel (champ visuel tubulaire ou en " canon de fusil "), limitant considérablement l'autonomie du patient (Fig. 9).

b) Électrorétinogramme (ERG)

Au tout début de la maladie, l'enregistrement ERG peut être normal si l'étendue des lésions est très limitée. Le plus souvent, l'examen objective une diminution de l'amplitude de l'onde a (correspondant à l'activité des photorécepteurs) et de l'onde b (reflétant la transmission dans la rétine interne), prédominant en conditions scotopiques, ainsi qu'une augmentation des latences.

Aux stades moyens de l'évolution de l'affection, l'ERG scotopique est éteint, la réponse des cônes (ERG photopique, flickers 30 Hz) est diminuée.

Aux stades évolués de la rétinopathie, l'ERG est éteint en conditions scotopique et photopique (Fig. 10).

L'ERG multifocal devient de plus en plus utilisé et permet de mieux évaluer les fonctions maculaires.

c) Vision des couleurs

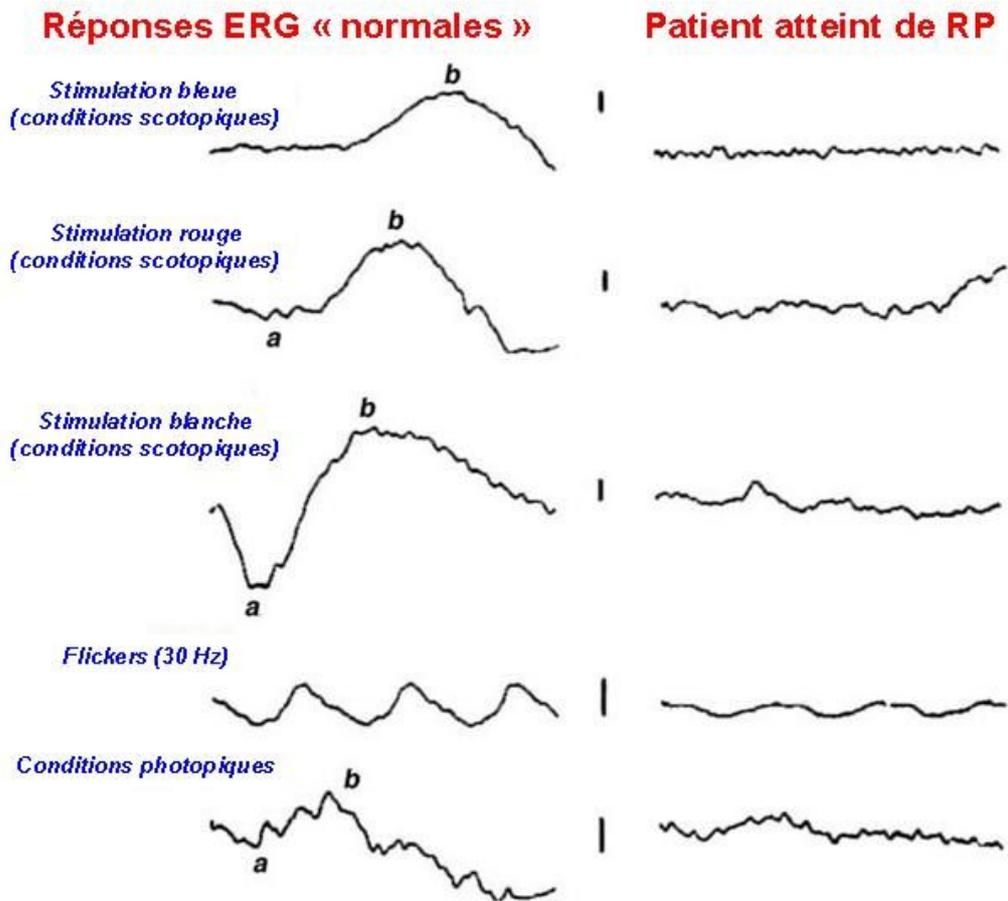


Figure 10. Electro-rétino-gramme d'un patient présentant une rétinopathie pigmentaire à bâtonnets prédominants (d'après <http://webvision.med.utah.edu/ClinicalERG.htm>)

Une dyschromatopsie bleu-jaune peut être décelée dès les stades moyens de l'évolution de l'affection témoignant de l'atteinte associée des cônes ou du réseau de neurones post-synaptiques (cellules horizontales, bipolaires, ...).

d) Optical Coherence Tomography (OCT)

L'OCT permet de mesurer de façon non invasive l'épaisseur de la rétine qui diminue au cours des rétinopathies pigmentaires.

4. Formes cliniques

a) Cone-rod dystrophy et Dystrophie des cônes

Dans certaines dystrophies rétiniennes héréditaires (5 à 10% des cas), les cônes peuvent être affectés en premier, les bâtonnets dégénèrent secondairement ; on qualifie ces affections de rétinopathies à cônes prédominants ou "cone-rod dystrophy" (CRD). La symptomatologie clinique est inversée par rapport à celle des rod-cone dystrophies. L'acuité visuelle chute précocement, les patients rapportent une photophobie importante. Au fond d'œil, on observe des dépôts pigmentaires dans l'aire maculaire, avec un amincissement du calibre des artères et une pâleur du nerf optique (Fig. 11). Le champ visuel met en évidence un scotome central, il existe une dyschromatopsie dès le début de l'affection et l'ERG montre une diminution des ondes a et b prédominant en ambiance photopique. Dans un deuxième temps, apparaîtront l'héméralopie, les altérations périphériques du champ visuel et l'extinction de l'ERG photopique et scotopique.

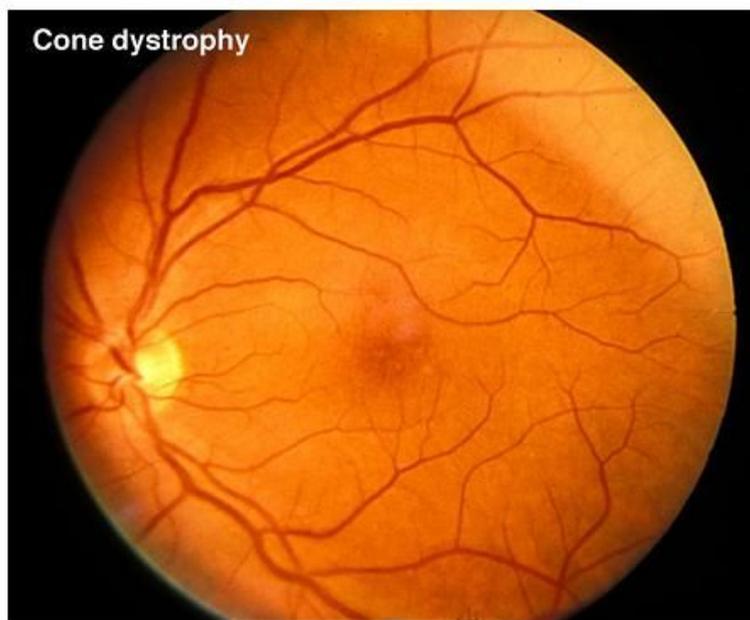
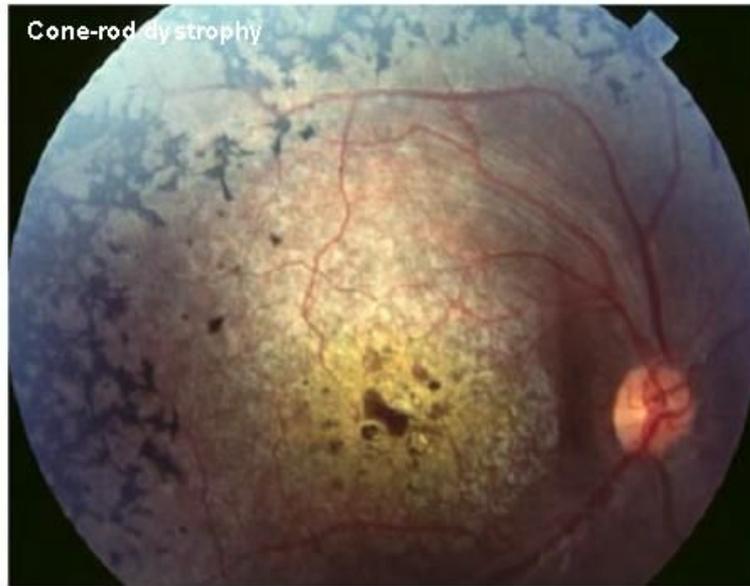
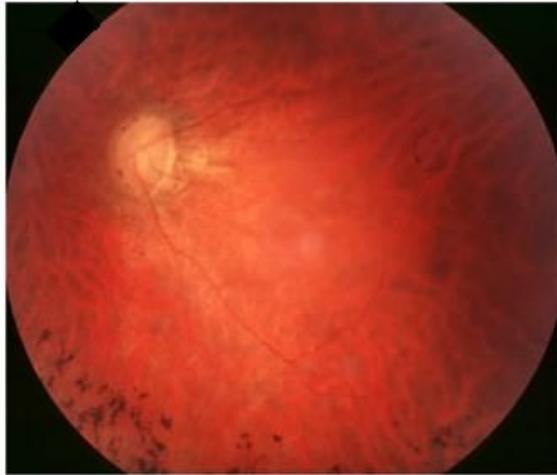


Figure 11. Formes cliniques de RP (1) : Cone-rod dystrophy et cone dystrophy



Homme de 35 ans présentant une mutation sur le gène RPGR. Au fond d'œil, il existe des migrations pigmentaires en ostéoblastes, des artères grêles et une pâleur du nerf optique.



Femme conductrice de 65 ans, mère du patient présenté à gauche, présentant une mutation sur le gène RPGR à l'état hétérozygote. Au fond d'œil, il existe une atrophie péri-papillaire en rapport avec la myopie de la patiente. Cette myopie est secondaire à la mutation sur le gène RPGR.

Figure 12. Formes cliniques de RP (2) : Aspect du fond d'œil d'un patient présentant une XL-RP et de sa mère conductrice (d'après *Zhao et coll., 2001*)

Parfois seuls les cônes sont affectés, on parle alors de dystrophie des cônes ou “ cone dystrophies ” (COD).

b) RP récessives liées à l’X

Dans ces formes de dystrophie rétinienne, les hommes présentent une RP et les femmes conductrices peuvent présenter des signes cliniques a minima de l’affection.

Zhao et coll. (2001) ont ainsi rapporté, dans une famille chinoise, une délétion de 28-bp au niveau de l’exon 7 du gène codant pour RPGR, introduisant un codon stop et tronquant l’extrémité carboxy-terminale de la protéine. Cliniquement les hommes atteints présentaient une RP sévère, les femmes conductrices étaient myopes avec de petites anomalies campimétriques et électro-rétino-graphiques (Fig. 12).

c) RP syndromiques

Dans 15 à 30% des cas les RP sont associées à des signes généraux, on parle alors de “ RP syndromiques ”.

La table 1 ci-après résume les principales RP syndromiques et leurs caractéristiques.

SYNDROME	SIGNES EXTRA-OPHTALMOLOGIQUES	CARACTÉRISTIQUES OPHTALMOLOGIQUES
Adréno-leucodystrophie [Maladie peroxysomale avec accumulation d'acides gras saturés à très longue chaîne]	Atteinte progressive des fonctions supérieures débutant entre 5 et 15 ans : - Troubles de l'audition - Troubles du comportement - Épilepsie - +/- déficit cortico-surrénalien (30%)	XL-RP
Alport (syndrome d')	Glomérulo-néphropathie progressive Surdité	Cristallin : lenticonus antérieur, shérophakie, cataracte Rétine : Tâches jaunâtres autour de la macula ou fundus albipunctatus +/- myopie
Alström (syndrome d')	obésité diabète myocardiopathie dilatée acanthosis nigricans +/- tubulo-néphropathie	CRD autosomale récessive nyctagmus
Ataxie cérébelleuse de type II (SCA7) autosomique dominante	Syndrome cérébelleux	CRD
Ataxie de Friedreich	ataxie progressive dysarthrie	AR-RP
Bassen-Kornzweig (syndrome de)	Abétalipoprotéïnémie ataxie progressive stéatorrhée	rétinopathie poivre et sel +/- ptosis
Bietti (dystrophie cristalline de)		AR-RP dépôts cornéens à types de cristaux jaunâtres
Bardet-Biedl (syndrome de)	retard mental hexadactylie postaxiale obésité hypogonadisme +/- malformations rénales	AR-CRD
Cohen (syndrome de)	dysmorphie faciale (philtrum court, nez proéminent, une hypoplasie malaire) retard psychomoteur petite taille, microcéphalie mains étroites, petits pieds obésité granulo-cytopenie +/- PVM, RGO, HH	AR-RP Myopie
Cockayne (syndrome de)	Nanisme, microcéphalie Progeria retard neuro-psychologique progressif dysmorphie faciale	rétinopathie avec punctuations fines +/- cataracte
Cystinose	tubulopathie arrêt de croissance	AR-RP cristaux de cystine dans la cornée
Duchenne (myopathie de)	Myopathie fascio-scapulo-humérale	XL-RP
Dystrophie myotonique de Steinert		AD-RP, diminution de l'onde b à l'ERG
Hallervorden-Spatz (syndrome de)	dysarthrie progressive dystonie rigidité choréathétose tremblements démence accumulation de fer dans le cerveau, essentiellement dans les noyaux gris centraux	RP (20-30 % des cas) Maculopathie en « œil de bœuf »
Hyperoxalurie type 1 ou oxalose [Maladie peroxysomale]	lithiases urinaires puis néphrocalcinose Secondairement : HTA, troubles du rythme, artérite par accumulation d'oxalate	AR-RP
Jeune (syndrome de) ou dystrophie thoracique asphyxiante	- cage thoracique étroite - membres (bras et jambes) courts - néphropathie	AR-RP
Joubert (syndrome de)	- hypoplasie du vermis cérébelleux - alternance d'épisodes de tachypnée et d'apnée en période néonatale - kystes rénaux	AR-RP
Kearns-Sayre	cardiomyopathie (troubles de la conduction) myopathie (encéphalomyopathies mitochondriales) troubles neurologiques (ataxie, leucoencéphalite) petite taille surdité ± troubles respiratoires et endocriniens ± retard mental ± hyperprotéinorachie du liquide céphalo-rachidien	RP ptosis ophtalmoplégie externe progressive
Laurence-Moon (syndrome de)	Retard mental Ataxie, paraplégie spastique progressive Hypogonadisme hypogonadotrope Obésité Petite taille	AR-RP +/- cataracte, strabisme, colobome irien
Neuronal Ceroid-Lipofuscinosis ou maladie de Batten	Épilepsie myoclonies ataxie rigidité démence progressive	macula rouge cerise
Mucopolysaccharidoses	Hypocousie Hydrocéphalie Petite taille ± retard psychomoteur ± anomalies cardiaques	RP Opacités cornéennes glaucome
Retsum (syndrome de) [Maladie peroxysomale, anomalie du métabolisme de l'acide phytanique]	ataxie cérébelleuse polynéuropathie distale motrice symétrique ± syndrome pyramidal ± dysarthrie ± anosmie ± surdité ± troubles de la conduction cardiaque ± ichtyose cutanée ± dysplasie modérée des épiphyses	AR-RP
Senior-Loken (syndrome de) Syndrome rétinéo-rénal	Néphronophthisis, anomalies rénales nécessitant souvent une transplantation rénale	RP sévère, parfois diagnostiquée LCA
Usher (syndrome de) 12% des cas	Surdité ± ataxie Usher type 1, affection congénitale : - surdité de perception profonde - absence de fonction vestibulaire Usher type 2, affection congénitale : - surdité congénitale moins sévère / type 1 - fonction vestibulaire préservée Usher type 3, surdité et RP à début retardé	AR-RP
Zellweger (syndrome de) [Maladie peroxysomale]	Syndrome cérébro-hépaté-rénal dysmorphie faciale hypotonie néo-natale surdité petite taille	RP

Table 1. Principales caractéristiques des RP syndromiques

E. Conclusions

Les rétinopathies pigmentaires héréditaires se caractérisent par une immense diversité clinique et génétique. De fait, aujourd’hui, “ la RP ” représente l’affection génétique connue la plus hétérogène qui soit. Ses différentes formes se caractérisent toutes néanmoins par leur cible commune : les photorécepteurs qui, suite à un défaut génétique, dégèrent.

II. LA SOURIS *rd1* COMME MODELE D’ETUDE

La souris “ *retinal degeneration* ” (*rd*) est un modèle de dégénérescence rétinienne héréditaire spontanée largement répandu en Europe et Amérique du Nord. Son phénotype rétinien a été décrit pour la première fois en 1924 par Keeler (Keeler, 1924). De très nombreuses études ont permis de préciser les variations morpho-anatomiques, physiopathologiques, biochimiques, génétiques et moléculaires des rétines *rd* par rapport à une population “ *sauvage* ” (Farber et coll., 1994). La souris *rd* constitue de ce fait l’un des modèles les mieux connus de rétinopathie pigmentaire. Comme d’autres modèles de dégénérescence rétinienne ont été décrits depuis (Chang et coll., 2002), la souris *rd* est devenue la souris *rd1*.

A. Etudes morphologiques de la rétine *rdl* au cours du développement

1. Effet de la mutation *rd1* sur la synaptogenèse et les photorécepteurs :

Avant le 8^{ème} jour de vie (J_8), l'aspect morphologique des rétines *rdl* est sensiblement identique à celui de rétines sauvages.

Décrites dès 1974 par Blanks et coll. (1974 a), les anomalies de la terminaison synaptique des bâtonnets à J_7 - J_8 constituent le premier signe anatomique détectable dans les rétines *rdl*. A cet âge, dans une rétine sauvage, les terminaisons synaptiques entre les photorécepteurs et les cellules bipolaires passent d'un contact "double" (configuration en "dyade") à un contact "triple" plus fin (configuration en "triade") (Blanks et coll., 1974 b). Dans les rétines *rdl*, les terminaisons immatures en dyade persistent. L'absence de développement de synapses en triade entre les bâtonnets et les cellules bipolaires témoigne probablement d'un défaut d'interaction entre les bâtonnets mutés et les cellules bipolaires (Blanks et coll., 1974 a).

A partir de J_8 , on observe un gonflement des mitochondries et des inclusions vacuolaires dans les segments internes des bâtonnets (Lasansky et DeRobertis, 1960 ; Sonohora et Shiose, 1968 ; Shiose et Sonohora, 1969 ; Caley et coll., 1972 ; Blanks et coll., 1974 b ; Farber et coll., 1994). Immédiatement après, apparaissent des anomalies structurales au niveau des disques des segments externes.

A J_{10} , le noyau des bâtonnets commence à devenir pycnotique, laissant présager de la mort prochaine de ces cellules. Dans les jours qui suivent, la couche nucléaire externe s'affine très rapidement (Tansley, 1951 ; Sorsby et coll., 1954) (Fig. 13). Des monocytes-macrophages migrent dans la couche des photorécepteurs et phagocytent les cellules photoréceptrices en cours d'apoptose (Sanyal, 1972).

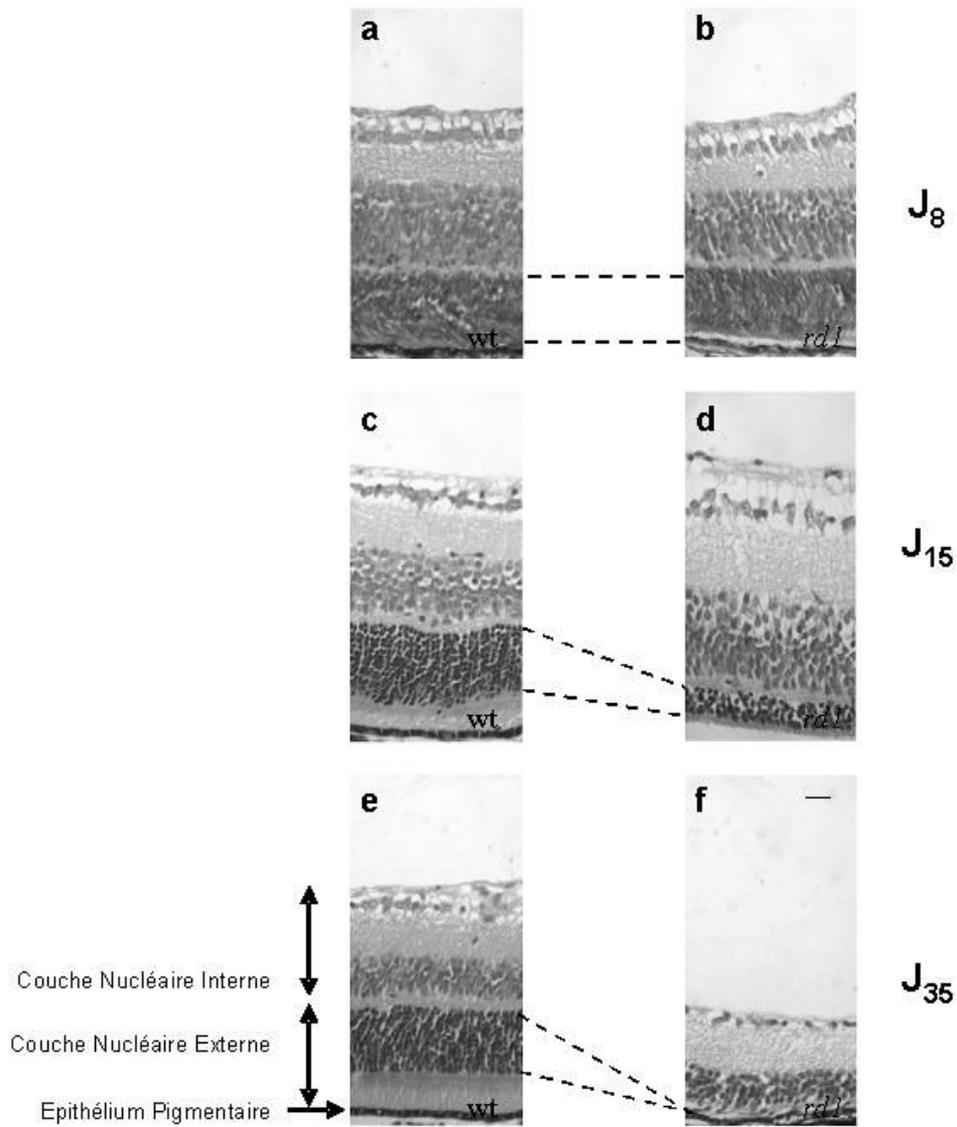


Figure 13. Coupes transversales de rétines de souris sauvages (*wt*; a-c-e) et *rd1* (b-d-f) à J₈ (a-b), J₁₅ (c-d) et J₃₅ (e-f).
 A J₈, il n'existe pas de différences morphologiques évidentes entre les rétines *rd1* et sauvages. A J₁₅, environ la moitié des photorécepteurs ont dégénérés. A J₃₅, il n'y a plus de bâtonnets. Barre d'échelle = 20 μm.

A J₃₆, l'ensemble des bâtonnets a dégénéré au pôle postérieur (Carter-Dawson et coll., 1978).

Les cônes, bien que n'exprimant pas la mutation, dégèrent également. Leur dégénérescence est cependant plus lente que celle des bâtonnets et apparaît de manière décalée. Ainsi à J₁₇, selon Carter Dawson et coll. (1978), 75% des cônes initiaux sont présents. A 18 mois post-natal, on trouve encore 5% des cônes en périphérie.

La cause de la dégénérescence secondaire des cônes n'est pas liée directement à la mutation qu'ils n'expriment pas, mais serait plutôt la conséquence de la raréfaction de facteurs de viabilité des cônes sécrétés par les bâtonnets sur un mode paracrine (voir paragraphe IV-B.4.c.).

2. Effet de la mutation rd1 sur les autres cellules neuronales de la rétine et des voies visuelles

Au cours de la dégénérescence des photorécepteurs et immédiatement après leur dégénérescence, aucune anomalie morphologique n'est constatée sur les autres types de cellules rétinienne. Dans un deuxième temps, après plusieurs mois, apparaissent des signes d'atrophie neuro-rétinienne diffuse (Brückner, 1951 ; Karli, 1952 ; Sorsby et coll., 1954 ; Grafstein et coll., 1972). La couche nucléaire interne s'affine alors et la densité de cellules ganglionnaires diminue. Les lésions des cellules neuronales non photoréceptrices s'expliquent par l'absence d'activité métabolique et synaptique entre les photorécepteurs et leurs cellules post-synaptiques. La dégénérescence touche donc, à terme, l'ensemble des cellules neuronales en aval des photorécepteurs, on observe même une diminution de la densité neuronale au niveau du corps genouillé latéral et du colliculus supérieur (Ward, 1982).

3. Effet de la mutation *rd1* sur la vascularisation rétinienne

Une raréfaction de la vascularisation rétinienne est observée à partir de J₁₄. Celle-ci s'expliquerait par le dysfonctionnement métabolique rétinien et ne serait pas due directement à la mutation génétique (Matthes et Bok, 1984 ; Blanks et Johnson, 1986 ; Farber et coll., 1994).

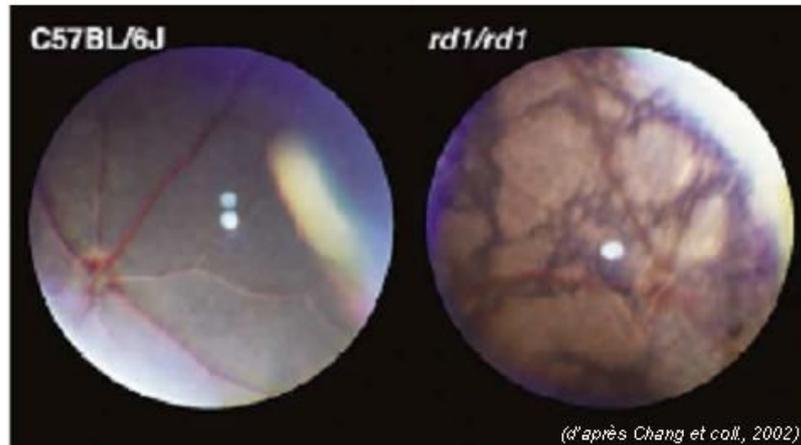
B. Données physiologiques

Bien que mutés, les photorécepteurs des jeunes souris *rd1* présentent une activité de phototransduction qui peut être objectivée et quantifiée en réalisant un ERG (Fig. 14). Ainsi, à J₁₁, l'ERG de souris *rd1* est semblable à celui d'une souris sauvage. A partir de J₁₂ cependant, on observe une altération rapide des tracés ERG des souris *rd1*, le développement de l'onde a étant bloqué par la perte croissante des photorécepteurs (Noell, 1965). Entre J₂₀ et J₂₈, on ne mesure plus d'activité électrique au niveau des rétines dystrophiques (Bonaventure et coll., 1985).

C. Données biochimiques

Différents travaux ont permis de démontrer une diminution progressive et attendue de “ marqueurs ” des photorécepteurs au cours de la dégénérescence, comme la rhodopsine (Caravaggio et Bonting, 1963) et l'Inter-photoreceptor Retinoid Binding Protein ou IRBP (Carter-Dawson et coll., 1986) ; une perturbation du métabolisme de glycolyse aérobie a également été observée dans les rétines *rd1* (Noell, 1965) ainsi qu'un retard de développement du métabolisme lipidique (Scott et coll., 1988).

A.



B.

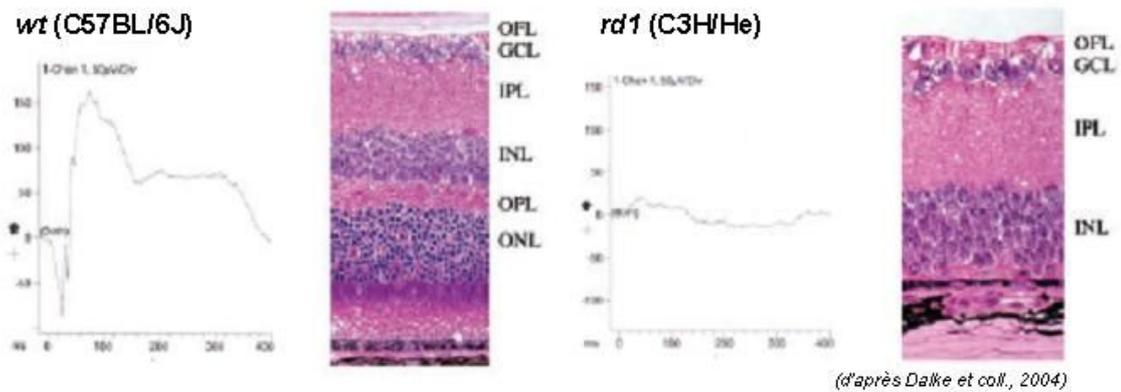


Figure 14. La souris *rd1*.

A, Fond d'œil de souris sauvage (C57BL/6J) et *rd1* (C3H/He).

B, ERGs et coupes transversales de rétine sauvage et *rd1*.

Les études biochimiques conduites par l'équipe de Farber comparant des rétines de souris sauvages à des rétines de souris *rd1* ont, quant à elles, mis particulièrement en évidence une augmentation du niveau de GMPc autour de J_8 (Farber et Lolley, 1974) associée à une réduction de l'activité de la phosphodiesterase GMPc-dépendante dans les photorécepteurs *rd1* par rapport aux contrôles (Farber et Lolley, 1976), ces anomalies biochimiques précédant l'apparition des altérations ultra-structurales déjà décrites (voir précédemment, paragraphe II-A.). Ces observations ont permis de suggérer que l'enzyme tétramérique phosphodiesterase GMPc-dépendante, composée de deux grandes sous-unités catalytiques (alpha et beta) et de deux sous-unités inhibitrices (gamma), était impliquée dans la survenue de la dégénérescence des photorécepteurs chez la souris *rd1*.

L'arrivée des nouvelles techniques de protéomique a, depuis, permis de mettre en évidence, à plus large échelle, une diminution de toutes les protéines impliquées dans la cascade de phototransduction des bâtonnets ainsi que la régulation positive de l'expression de protéines de stress appartenant à la famille des cristallines (Cavusoglu et coll., 2003).

D. Apports de la biologie moléculaire

1. Identification du gène *rd1* et des mutations

Le gène “ *rd1* ” a été localisé sur le chromosome 5 dès 1965 (Sidman et Green, 1965). Suite aux travaux de Farber et Lolley (1974, 1976), les analyses de linkage ont permis de localiser les gènes codant pour les différentes sous-unités de la phosphodiesterase GMPc-dépendante : les gènes codants pour les sous-unités alpha et gamma ont été localisés respectivement sur les chromosomes 18 et 11 (Danciger et coll., 1989 et 1990), tandis que celui codant pour la sous-unité bêta a été localisé sur le chromosome 5 (Bowes et coll., 1990) comme précédemment le locus *rd1*, faisant de celui-ci le siège le plus probable de la mutation responsable du phénotype rétinien de la souris *rd1* (Bowes et coll., 1990 ; Danciger et coll., 1990 ; Lem et coll., 1992). Le gène *rd1* est actuellement dénommé “ Pde6b ” et son expression est restreinte spécifiquement aux bâtonnets (Phelan et Bok, 2000).

Les études génétiques visant à identifier la ou les mutation(s) responsable(s) de la dégénérescence rétinienne chez la souris *rdl* ont depuis permis d'isoler deux mutations au niveau du gène *Pde6b* : une mutation non-sens sur le codon 347 de l'exon 7 présente à l'état homozygote (Pittler et Baehr, 1991) ainsi qu'une insertion d'un pro-virus de la leucémie murine sur l'intron I (*Xmv-28*) également présente à l'état homozygote (Bowes et coll., 1993).

2. Etude du transcriptome de la souris *rdl*

Avec le développement des techniques de génomique fonctionnelle, l'approche actuelle tend à appréhender de manière globale les variations d'expression du transcriptome. De telles analyses "systématiques" pourraient enfin permettre de mieux comprendre la succession d'événements résultant au déclenchement du processus apoptotique. Deux études récentes ont porté sur l'analyse du transcriptome de la souris *rdl* au cours de la dégénérescence des photorécepteurs.

L'équipe de Donald J. Zack à Baltimore, MD, a mis au point des puces de microarray comprenant des fragments d'ADNc de gènes connus ou suspectés d'être exprimés par la rétine (5376 gènes). Le profil d'expression des gènes a alors été comparé entre des souris *rdl* et des souris sauvages à trois âges différents : au "pic" de la dégénérescence des bâtonnets (J_{14}), à la fin de la dégénérescence des bâtonnets et à un temps précoce de celle des cônes (J_{35}) et, enfin, à un temps plus avancé de la dégénérescence des cônes (J_{50}). Les résultats ces travaux ont permis de mettre en évidence l'activation de différentes voies de signalisation moléculaire au cours de la dégénérescence (Hackam et coll., 2004).

Une étude plus systématique et plus approfondie a été conduite dans notre laboratoire en collaboration avec le laboratoire de bioinformatique d'Olivier Poch (IGBMC, Strasbourg). Différentes préparations d'ARN ont été réalisées à partir de souris *rdl* et sauvages à 11 âges différents, répartis sur la période précédant la dégénérescence de bâtonnets et sur la dégénérescence elle-même (J_1 , J_4 , J_5 , J_8 , J_9 , J_{10} , J_{11} , J_{14} , J_{15} , J_{35}). Les préparations d'acides nucléiques ont ensuite été hybridées sur des puces Affymetrix® permettant d'évaluer l'expression de 37 000 gènes différents (U74v2). 1324 gènes ont plus particulièrement retenu l'attention de l'équipe de travail et ont été caractérisés de manière exhaustive d'un point de vue fonctionnel. Ainsi à J_8 , dans les rétines *rdl*, un groupe de gènes codant pour des facteurs de transcription est régulé positivement par rapport aux rétines sauvages; suivi à J_9 par un

défaut d'expression d'un autre groupe de gènes impliqués dans le développement des contacts synaptiques entre les photorécepteurs et les neurones de la couche nucléaire interne (Fig. 15). Ce défaut de connexion, particulièrement entre les photorécepteurs et les cellules bipolaires, pourrait être impliqué dans la dégénérescence des bâtonnets observée immédiatement après, ainsi que le démontre l'effondrement des gènes exprimés par ces derniers entre J₁₀ et J₃₅ (Fig. 15, Chalmel et coll., soumis).

Les progrès dans la connaissance morphologique, physiologique, biochimique et moléculaire de la souris *rdl*, nous l'avons vu, sont immenses. La mise en évidence de nouvelles voies de signalisation grâce aux études transcriptomiques permet désormais de mieux cibler les études à venir visant à définir la succession des événements conduisant à l'activation de la cascade apoptotique.

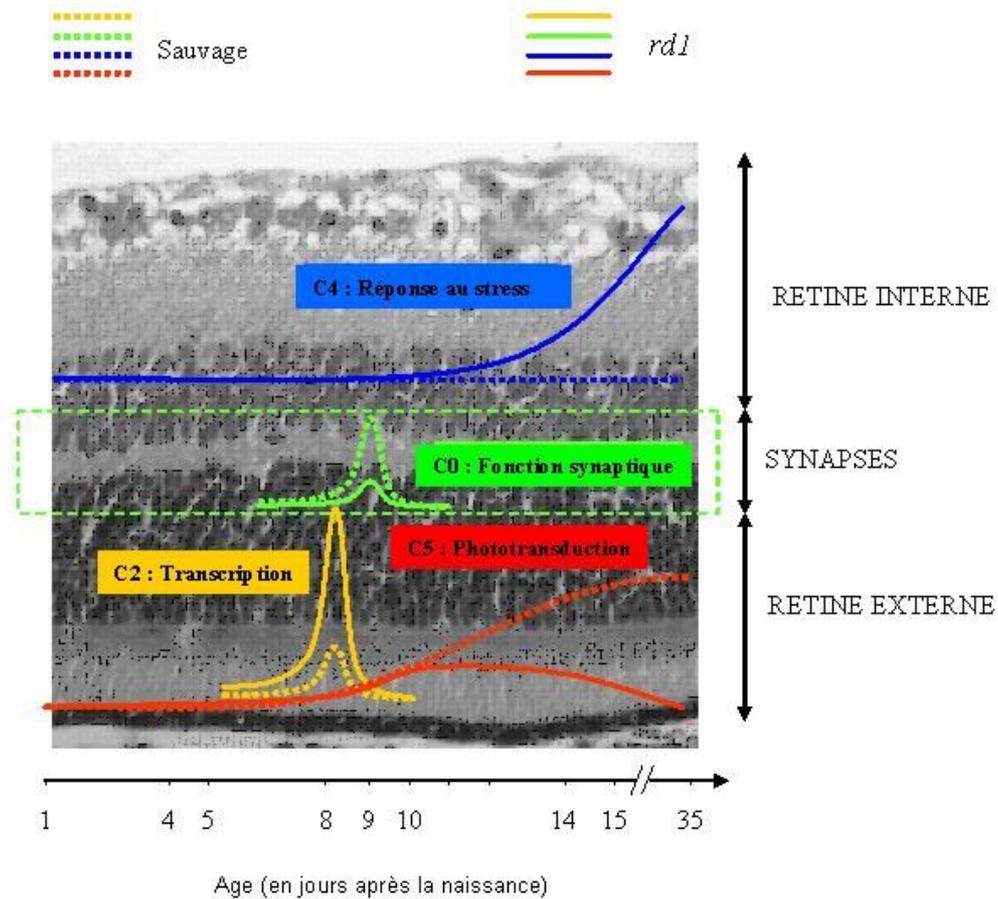


Figure 15 : Expression des différents « groupes » (clusters) de gènes au cours de la dégénérescence des photorécepteurs (d'après Chalmel et coll., soumis).
 Le groupe 2 (jaune) réunit des facteurs de transcription dont l'expression augmente à J_8 chez la souris *rd1*.
 Le groupe 0 (vert) réunit des gènes impliqués dans le développement des connexions synaptiques entre la rétine externe et interne, et dont l'expression est déficitaire à J_9 chez la souris *rd1*.
 Le groupe 5 (rouge) réunit les gènes codant pour les protéines de la cascade de phototransduction, dont l'expression – restreinte à la rétine externe – diminue chez la souris *rd1* entre J_{10} et J_{35} .
 Le groupe 4 (bleu) réunit des gènes codant pour des protéines de stress dont l'expression augmente de J_{10} - J_{11} à J_{35} dans la rétine interne des souris *rd1*.

E. Hypothèse de la toxicité du glutamate

Une étude mathématique sur la cinétique de dégénérescence des cellules neuronales dans différentes pathologies neurodégénératives a permis de séparer ces affections en deux grands groupes (Clarke et coll., 2000) :

- les affections aux cours desquelles le risque de dégénérescence des cellules neuronales est constant, quelque soit le stade d'évolution de l'affection (“ one-hit hypothesis ”)
- les affections aux cours desquelles le risque de dégénérescence pour chaque cellule s'accroît au fur et à mesure que les cellules voisines dégènèrent (“ cumulative damage hypothesis ”)

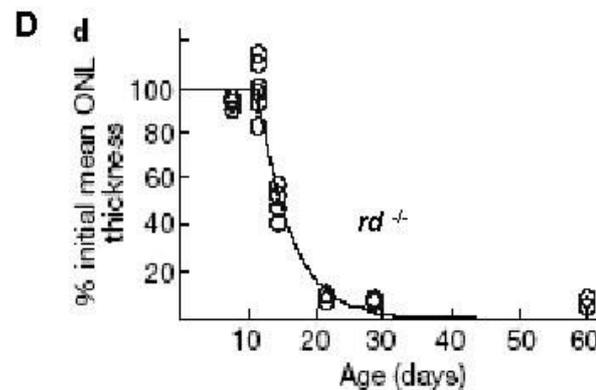
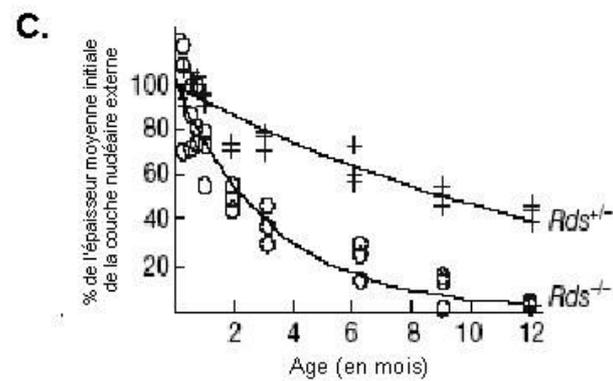
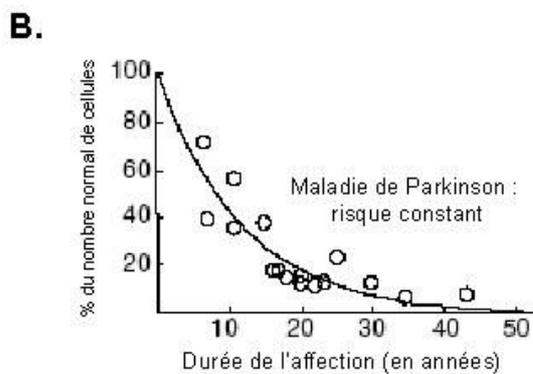
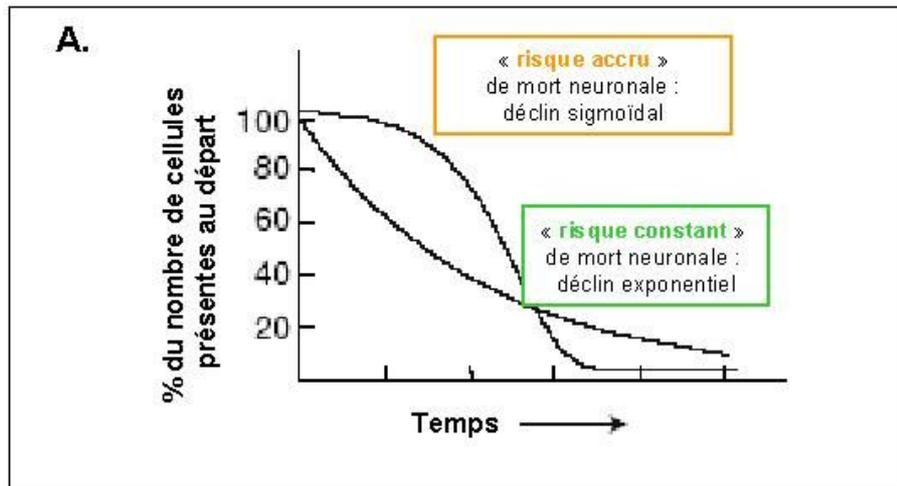


Figure 16. Modèles mathématiques de dégénérescence neuronale.

A, Modèle général illustrant les deux modes de dégénérescence : « **risque constant** » de mort neuronale (courbe exponentielle) et « **risque accru** » (courbe sigmoïdale).

B, Modèle animal de maladie de Parkinson : la cinétique de mort neuronale suit une courbe exponentielle : le risque de dégénérescence est constant.

C, Souris « *retinal degeneration slow* » hétérozygote (*Rds*^{+/-}) et homozygote (*Rds*^{-/-}) porteuse d'une mutation sur le gène de la périphérine/*rd*s : risque constant (courbe exponentielle)

D, Souris *rd1* : la cinétique de dégénérescence est mixte.
(d'après Clarke et coll., 2000)

Ainsi que le montre la figure 16, contrairement à d'autres modèles de neuro-dégénérescence rétinienne et non rétinienne, la cinétique de mort des photorécepteurs chez la souris *rd1* ne suit pas une courbe de risque constant. Si la seule cause de mort des photorécepteurs chez la souris *rd1* était la mutation génétique sur le gène *Pde6b*, alors les photorécepteurs à bâtonnets dégénéraient sur un mode autonome, c'est-à-dire indépendamment les uns des autres et sans influence de leur micro-environnement (“*cell-autonomous mechanisms*”). Le profil de mort des photorécepteurs suggère au contraire l'existence de dommages cumulés aboutissant à une accélération de la perte des photorécepteurs. Parmi les hypothèses avancées pour expliquer un “emballement” de la mort des cellules photoréceptrices, un mécanisme de toxicité directe lié au glutamate a été évoqué, et ce, pour différentes raisons :

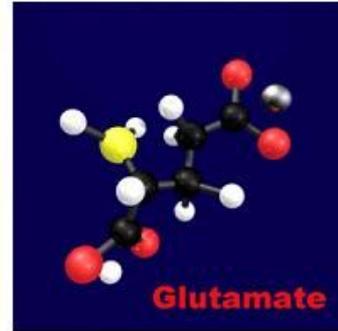
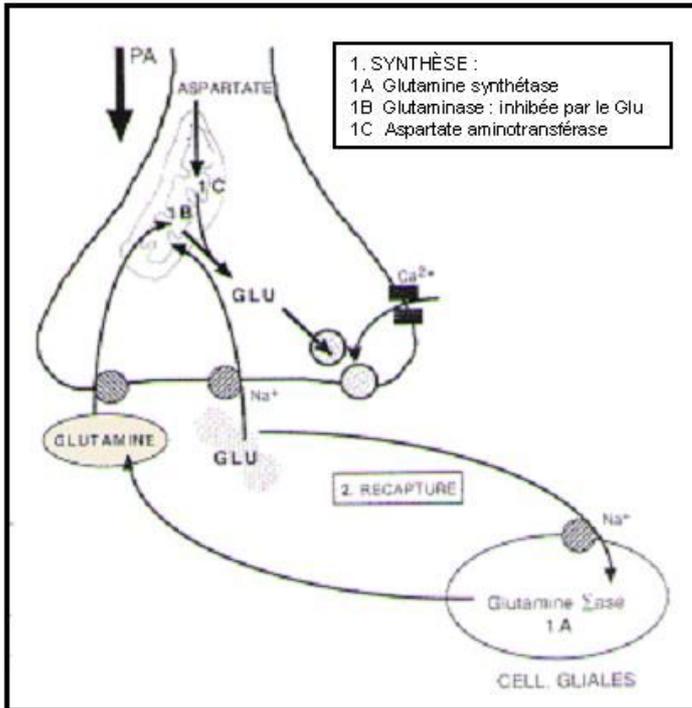
- tout d'abord, par analogie avec les phénomènes de libération massive de neurotransmetteurs observés au niveau du SNC lors des ischémies et des traumatismes (Farber et coll., 1994). Les neurones endommagés libèrent alors en effet de grandes quantités du glutamate qui se fixent à des récepteurs membranaires présents sur la membrane de cellules avoisinantes non affectées initialement et couplés à des canaux cationiques. La fixation du glutamate à ces récepteurs induit un afflux cationique massif à l'origine de phénomènes d'excito-toxicité (Choi, 1988), augmentant la taille du site lésionnel. Il est tout à fait concevable que, lors de leur dégénérescence, les photorécepteurs libèrent leur glutamate et que ce dernier soit toxique pour les cellules avoisinantes.
- par ailleurs, les études morphologiques conduites par Blanks (1974) et les études transcriptomiques récentes (Chalmel et coll., soumis) mettent en évidence un défaut de maturation des synapses. Celui-ci pourrait être secondaire à une altération des interactions glutamatergiques entre les photorécepteurs et les cellules de la couche nucléaire interne (Marc et coll., 2003).
- enfin, Farber et Lolley ont démontré que la mutation sur le gène *Pde6b* induit une accumulation de GMPc dans les bâtonnets chez la souris *rd1* (Farber et Lolley, 1974). Il semble raisonnable d'imaginer qu'une telle augmentation du taux de GMPc intracellulaire induise une ouverture continue des canaux GMPc-dépendants et, de ce fait, une dépolarisation prolongée des bâtonnets. L'activation, par la suite, des canaux calciques voltage-dépendants pourrait entraîner une libération prolongée de glutamate.

L'examen de l'hypothèse d'une toxicité du glutamate vis-à-vis des photorécepteurs au cours du processus de dégénérescence chez la souris *rd1* a constitué le premier axe de notre travail de thèse.

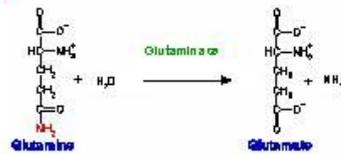
III. GLUTAMATE, RECEPTEURS ET TRANSPORTEURS DU GLUTAMATE, PHENOMENES D'EXCITO-TOXICITE

A. Le glutamate : neurotransmetteur exciteur majeur du systeme nerveux central et, en particulier, de la retina

Le glutamate (Fig. 17) est le principal neurotransmetteur exciteur du systeme nerveux central (SNC) et de la retina (Hayashi, 1954 ; Fonnum, 1984). Il repond aux criteres d'un neurotransmetteur endogene : (1) sa liberation est dependante du calcium ; (2) il est soumis a un systeme d'inactivation par recapture neuronale et/ou gliale ; (3) sa synthese s'effectue au sein des tissus nerveux et son stockage pre-synaptique est vesiculaire. Le glutamate joue un role essentiel dans le developpement et la synaptogenese (McDonald et Johnston, 1990), la plasticite synaptique (Bliss et Collingridge, 1993) et dans la survenue de nombreuses affections neurodegeneratives (Choi, 1987 ; Meldrum et Garthwaite, 1990). On appelle acides amines exciteurs (AAE) un groupe d'analogues structuraux du glutamate comprenant de nombreux membres dont l'aspartate, l'acide cysteique et certains de ses derives, connus pour représenter de puissants exciteurs neuronaux.



Voie de synthèse 1 B



Voie de synthèse 1 C

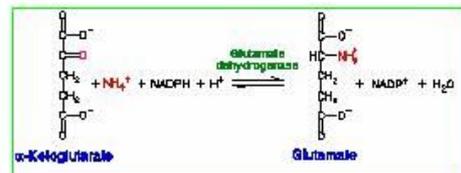
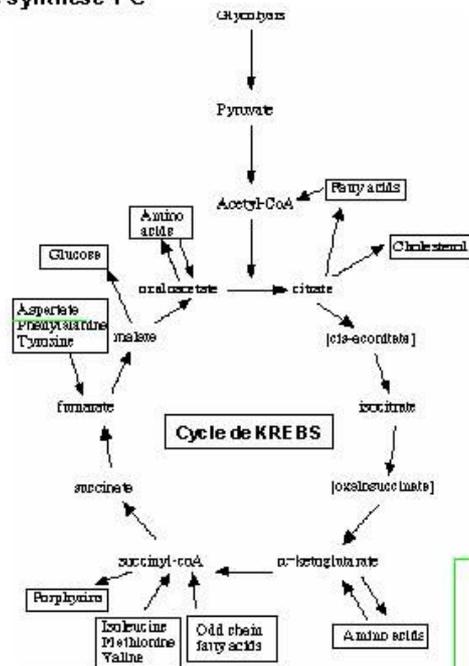


Figure 17. Métabolisme du glutamate

La synthèse du glutamate se fait au niveau des terminaisons nerveuses à partir du glucose, via le cycle de Krebs et la transamination de l'alpha-kéto-glutarate. Il peut également être synthétisé à partir de la glutamine produite par les cellules gliales puis transportée dans les neurones où elle est convertie en glutamate via l'activité de la glutaminase (Fig. 17).

Au niveau des terminaisons " glutamatergiques ", le glutamate est stocké dans des vésicules synaptiques, sa libération dans l'espace extra-cellulaire se fait par un processus d'exocytose calcium-dépendant.

Le glutamate est le principal neurotransmetteur libéré par les photorécepteurs (Massey, 1990) et le long de la voie de transmission " verticale " de l'information dans la rétine (entre photorécepteurs, cellules bipolaires et ganglionnaires) (Ehinger et coll, 1988, Marc et coll., 1990, Van Haesendonck et Missotten, 1990, Kalloniatis et Fletcher, 1993, Yang et Yazulla, 1994, Jojich et Pourcho, 1996, Fig. 18). Sa libération répond à un fonctionnement unique dans le SNC. Les segments externes des photorécepteurs présentent comme particularité d'avoir un potentiel membranaire à l'obscurité de -30 mV (contrairement aux autres neurones du SNC ayant un potentiel membranaire de repos autour de -65 mV). Cette dépolarisation découle de l'entrée constante de sodium par les canaux GMPc-dépendants, le GMPc étant produit en continu par la guanylate cyclase en condition d'obscurité : c'est le courant d'obscurité (Fig. 18) ; ce courant est associé à une libération continue de glutamate.

L'activation par les photons lumineux du pigment photosensible des bâtonnets ou des cônes, nous l'avons déjà vu, induit un changement de conformation de ce pigment (rhodopsine ou opsine) qui active la transducine (protéine G), entraînant (Fig. 18) : 1) une diminution du taux de GMPc par activation de la phosphodiesterase, 2) la fermeture des canaux GMPc-dépendants, 3) l'hyperpolarisation de la cellule photoréceptrice et 4) la diminution de la libération du glutamate dans la fente synaptique.

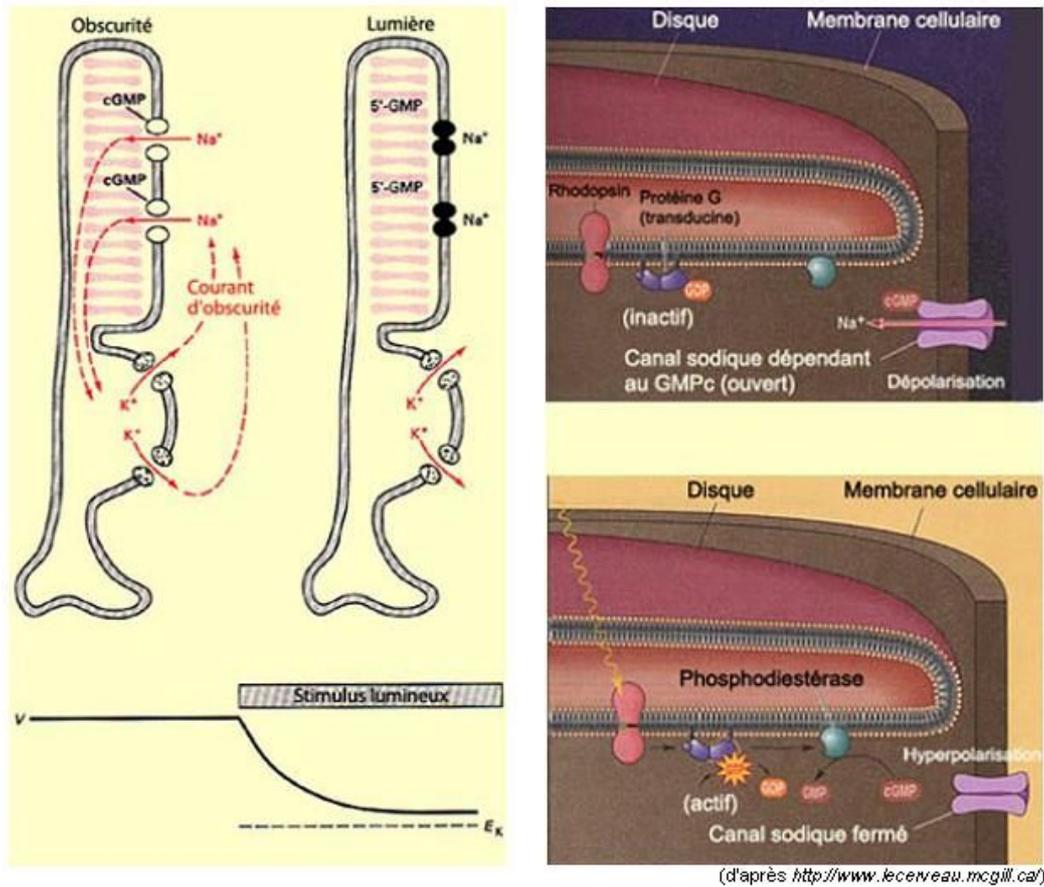


Figure 18. Potentiel de membrane du bâtonnet en condition de repos (obscurité) et de stimulation (lumière).

A l'obscurité, il existe une entrée constante de sodium par les canaux GMPC-dépendants : c'est le courant d'obscurité, le bâtonnet est dépolarisé. Lors du stimulus lumineux, il existe un changement de conformation du pigment (rhodopsine) qui active la transducine (protéine G), entraînant : 1) une diminution du taux de GMPC par activation de la phosphodiesterase, 2) la fermeture des canaux GMPC-dépendants et 3) l'hyperpolarisation de la cellule photoréceptrice.

A.

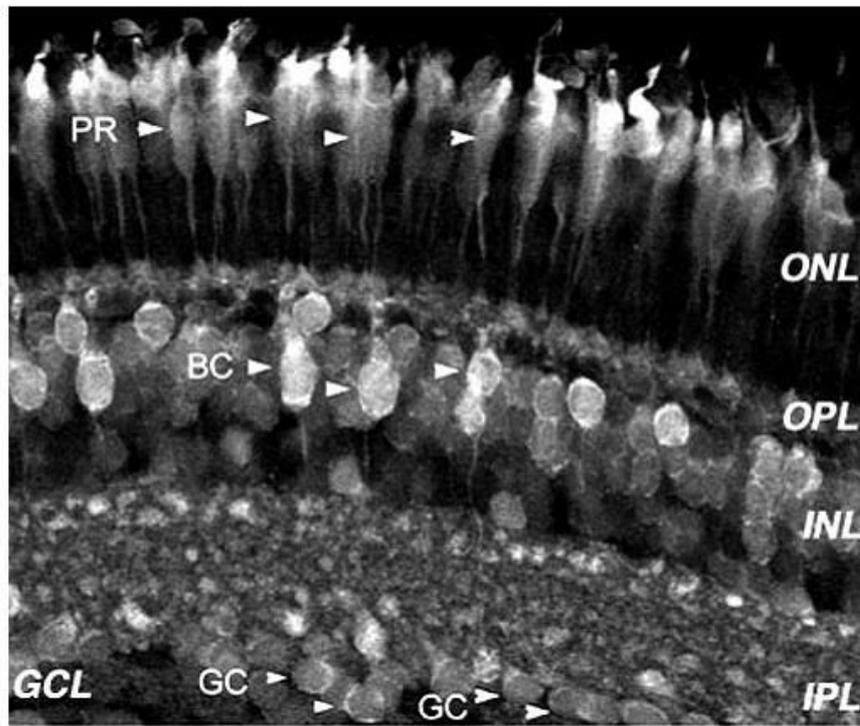


Photo d'après Steve Massey

B.

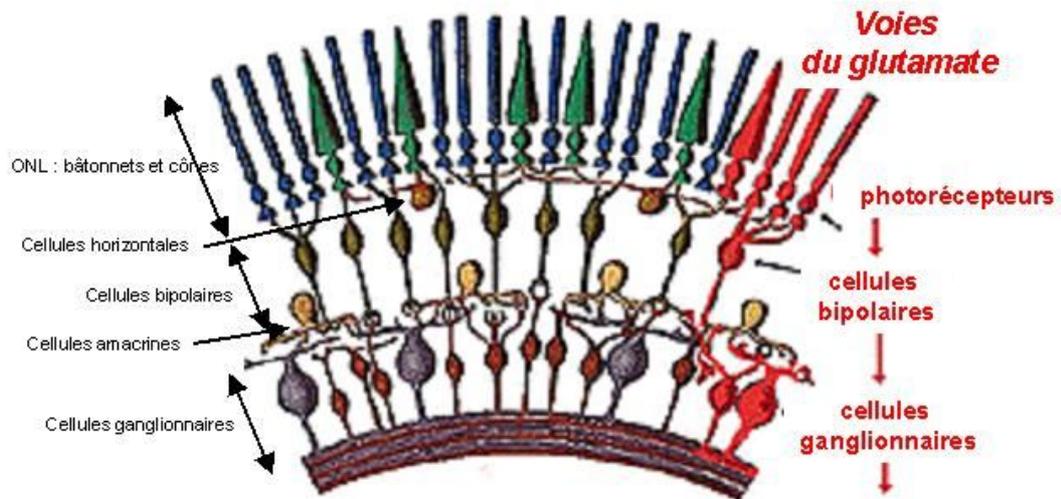


Figure 19. Neurones glutamatergiques.

A, Sur une coupe transversale de rétine, l'immuno-réactivité glutamatergique est observée au niveau des photorécepteurs (PR), des cellules bipolaires (BC) et des cellules ganglionnaires (GC). ONL, outer nuclear layer ou couche nucléaire externe; OPL, outer plexiform layer ou plexiforme externe; INL, inner nuclear layer ou couche nucléaire interne; IPL, inner plexiform layer ou plexiforme interne; GCL, ganglion cell layer ou couches des cellules ganglionnaires.

B, Vision schématique de la voie glutamatergique « verticale ».

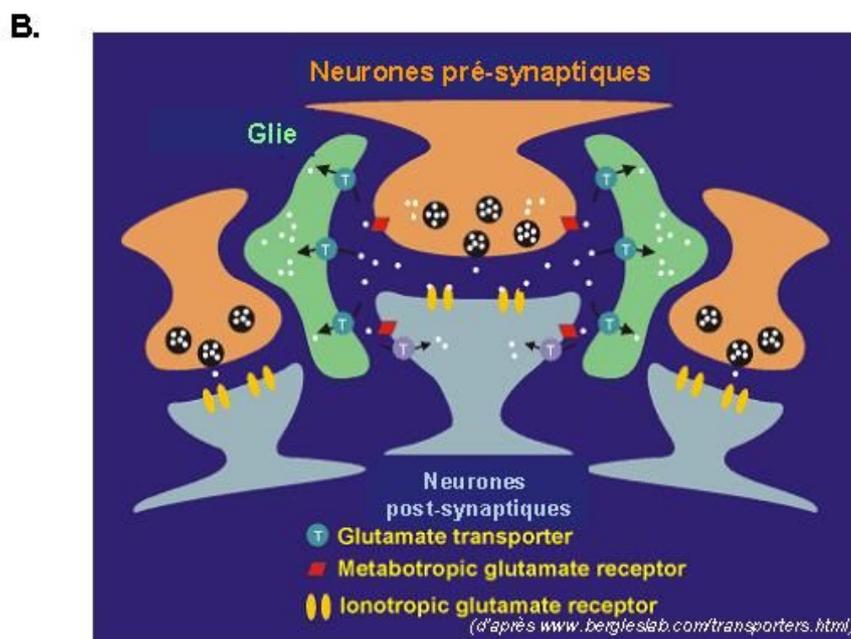
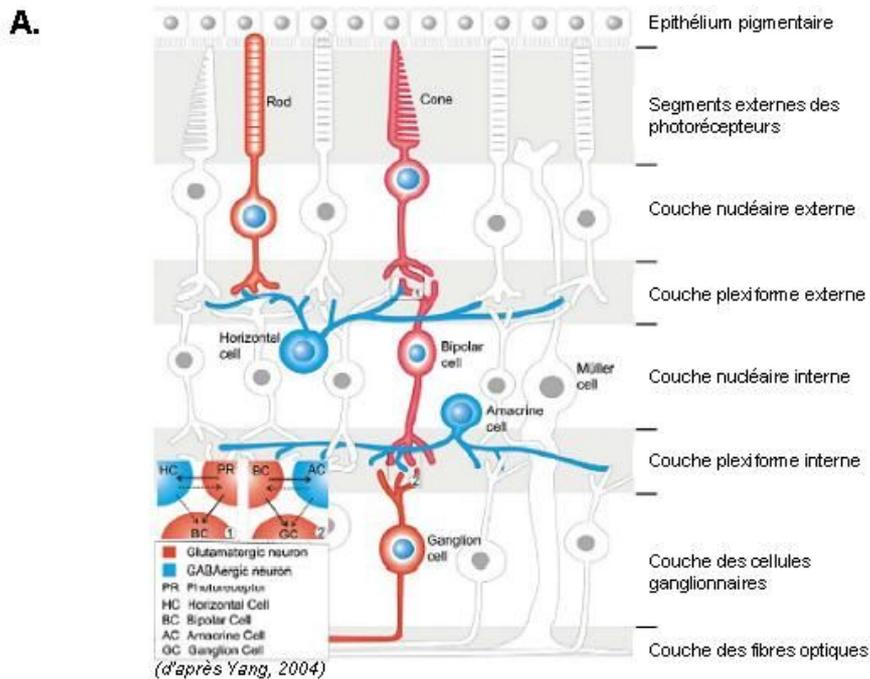


Figure 20. Récepteurs et transporteurs du glutamate.

A. Vision schématique de la voie glutamatergique activatrice verticale et des voies de régulation GABAergiques horizontales dans la rétine de vertébré.

B. Le glutamate libéré dans la fente synaptique par le neurone pré-synaptique peut aller se fixer sur des récepteurs ionotropiques post-synaptiques (AMPA/kainate ou NMDA) ou encore des récepteurs métabotropiques (pré ou post-synaptiques). La concentration en glutamate dans la fente synaptique est régulée par les transporteurs du glutamate neuronaux et surtout gliaux.

B. Les récepteurs du glutamate

L'action du glutamate est consécutive à sa liaison avec un de ses nombreux récepteurs (Fig. 19 et 20), classés en différentes catégories selon des bases pharmacologiques, biochimiques et électrophysiologiques (Monaghan et coll., 1989 ; Nakanishi, 1992).

On distingue :

- les récepteurs ionotropiques classés, selon l'action préférentielle de différents agonistes, en : type NMDA (fixant le glutamate ou le N-méthyl-D-Aspartate, NMDA) et type non-NMDA ou AMPA/kaïnate (fixant le glutamate, l'alpha-Amino-3-hydroxy-5-Methyl-4-isoxazolePropionic Acid ou AMPA, le kaïnate ou le quisqualate et pas le NMDA).
- les récepteurs métabotropiques (couplés à des protéines G), répartis en trois groupes selon la protéine G impliquée et dénommés mGluR (numérotés de 1 à 8).

1. Les récepteurs ionotropiques

Les récepteurs ionotropiques sont des récepteurs-canaux couplés à des changements de conductance ionique dépendant de la présence du ligand. Ils sont constitués de plusieurs sous-unités oligomériques. L'importante variété des sous-unités identifiées et clonées ainsi que la structure de leur assemblage, homo- ou hétéro-mérique, explique la très grande diversité de cette famille de récepteurs.

L'activation des récepteurs ionotropiques de type AMPA/kaïnate ouvre des canaux cationiques perméables au sodium (Na^+) et au potassium (K^+) mais non au calcium (Ca^{2+}) (Mayer et Westbrook, 1987 ; Yang, 2004). Ainsi, la fixation du glutamate induit un courant entrant très rapide entraînant une dépolarisation post-synaptique. Ces récepteurs sont exprimés dans la rétine par les cellules bipolaires, ganglionnaires, horizontales et amacrines (Yang, 2004).

L'activation des récepteurs ionotropiques de type NMDA ouvre également des canaux cationiques perméables au sodium (Na^+) et potassium (K^+) mais également au calcium (Ca^{2+}) aboutissant à un changement de conductance des cellules post-synaptiques mais, de part la

perméabilité au calcium (Ca^{2+}), selon une cinétique beaucoup plus progressive et prolongée. Ces récepteurs sont exprimés dans la rétine par les cellules ganglionnaires, horizontales et amacrines (Yang, 2004).

2. Les récepteurs métabotropiques

Les récepteurs métabotropiques au glutamate sont des récepteurs à sept passages transmembranaires présentant comme particularité d'avoir le site de fixation du ligand (glutamate) au niveau du domaine amino-terminal (Conn et Pin, 1997). La fixation du glutamate à ces types de récepteurs induit une cascade enzymatique intracellulaire (Nestler et Duman, 1994).

Ce type de récepteurs est très répandu dans le SNC : au niveau pré-synaptique, ils agissent comme des autorécepteurs permettant ainsi de moduler la libération de glutamate ; au niveau post-synaptique, ils ont des fonctions variées et peuvent, en particulier, influencer les courants générés par l'activation des récepteurs ionotropiques (Yang, 2004). Dans la rétine, ils sont présents sur tous les types de cellules neuronales (Yang, 2004). Les récepteurs mGluR6 représentent un type particulier de récepteurs métabotropiques puisqu'ils ne sont exprimés que dans la rétine et sont impliqués dans l'inversion du sens des synapses au niveau des cellules bipolaires de la voie ON (Nomura et coll., 1994 ; Masu et coll., 1995 ; Vardi et Morigiwa, 1997).

C. Les transporteurs du glutamate

Si le glutamate est le principal neurotransmetteur excitateur dans le SNC, son action prolongée au niveau des récepteurs est à même de provoquer des lésions cellulaires par excitotoxicité (voir paragraphe suivant). Après sa libération à partir des vésicules pré-synaptiques et l'activation des différents types de récepteurs glutamatergiques (ionotropiques et métabotropiques), le glutamate doit donc être recapté (Fig. 20B). Les processus de recapture du glutamate mettent en jeu des transporteurs dépendant de la concentration de sodium extracellulaire et présentent une spécificité relative vis-à-vis du glutamate puisqu'ils transportent également l'aspartate et les autres AAE. Ces transporteurs sont localisés :

- au niveau pré-synaptique,
- au niveau post-synaptique,
- et/ou sur la membrane des cellules gliales avoisinantes.

Depuis quelques années, les transporteurs des AAE constituent une cible d'intérêt majeur pour toutes les recherches de neuroprotection dans le cadre de processus de cytotoxicité aiguë ou associée au développement des maladies neurodégénératives du SNC.

A ce jour, 5 sous-types de transporteurs ont été clonés chez l'homme : GLAST (ou Excito-Amino-Acid Transporter 1 ou EAAT1), GLT-1 (ou EAAT2), EAAT3 (ou EAAC1) EAAT4 et EAAT5 (Arriza et coll., 1994; 1997; Fairman et coll., 1995). Les études de biologie structurale suggèrent que ces transporteurs appartiennent à une même famille de protéines ayant en commun dix segments transmembranaires (Vandenberg, 1998). Les mécanismes du transport ne sont pas parfaitement identifiés (Takahashi et coll., 1997), l'entrée de glutamate dans la cellule s'accompagnant d'un co-transport de sodium et peut-être d'une sortie de potassium (Kanai et coll., 1993). Dès lors, il apparaît que le transport est électrogénique en générant une charge positive à l'intérieur de la cellule, les apports d'énergie nécessaires étant fournis par les gradients de sodium et potassium maintenus par les pompes Na⁺/K⁺ ATPase. Un déficit énergétique membranaire, tel qu'on peut en rencontrer dans certains états pathologiques, aurait ainsi pour effet d'inverser le fonctionnement des transporteurs d'AAE (Madl et Burgesser, 1993). Ainsi, lors d'une ischémie cérébrale par exemple, l'excès de glutamate extracellulaire au niveau synaptique – responsable de la neuro-dégénérescence (Budd, 1998) – a été rapporté à un fonctionnement inversé des transporteurs de glutamate consécutif à une inhibition de l'Na⁺/K⁺ ATPase (Rossi et coll., 2000).

Au niveau rétinien, GLAST est exprimé exclusivement par les cellules gliales de Müller (Pow et Barnett, 1999; Rauen et coll., 1996), GLT-1 par les cônes et certaines cellules bipolaires (Rauen et Kanner, 1994), EAAT3 par des neurones dont les ramifications atteignent la couche plexiforme interne : principalement les cellules amacrines (Schultz et Stell, 1996), EAAT4 n'est pas exprimé [il n'est présent qu'au niveau des cellules de Purkinje du cervelet (Dehnes et coll., 1998)], enfin EAAT5 est un transporteur exclusivement rétinien, sa localisation est actuellement sujette à débat, il a été localisé au niveau des photorécepteurs et des cellules bipolaires (Pow et Barnett, 2000). Parmi les 4 transporteurs exprimés dans la rétine, GLAST – comparé aux autres transporteurs – joue un rôle essentiel dans la clairance du glutamate afin de prévenir les phénomènes de toxicité et permettre une bonne transmission du

signal entre les photorécepteurs et les cellules bipolaires (Derouiche et Rauen, 1995 ; Harada et coll., 1998 ; Rauen et coll., 1998 ; Izumi et coll., 2002).

D. L'excito-toxicité et ses mécanismes

Les premières observations sur la neuro-toxicité des acides aminés excitateurs remontent à plus de trente ans. En effet, pour étudier un éventuel effet protecteur du glutamate sur des dégénérescences rétiniennes de caractère héréditaire, du glutamate de sodium avait alors été administré chez des souris nouveau-nées par voie systémique. Les résultats ont montré, à l'inverse, que cette injection provoquait une dégénérescence des cellules rétiniennes (Lucas et Newhouse, 1957). Le développement de ces travaux, notamment par le groupe de Olney (1969), a montré que, chez ces animaux, les lésions n'étaient pas restreintes à la rétine mais concernaient de nombreuses structures centrales dont certaines régions hypothalamiques ainsi que les organes circumventriculaires. Les lésions étaient caractérisées par une atteinte cellulaire isolée, les fibres nerveuses semblant intactes. Les travaux d'Hayashi (1954) et de Curtis (1959) ayant précédemment caractérisé les mécanismes cellulaires de la dépolarisation induite par le glutamate et ses analogues structuraux (augmentation de la conductance sodique), il a alors été proposé une corrélation entre effets neuro-excitateurs et effets cytotoxiques du glutamate (Olney et coll., 1971). Dès lors, le concept d'excito-toxicité était avancé.

Par la suite, le concept a été largement développé (Rothman, 1984 ; Choi, 1988) et l'excito-toxicité s'est révélée être un processus pathologique majeur impliqué dans de nombreuses affections neurologiques dégénératives du SNC, aussi bien aiguës (accidents vasculaires cérébraux, hypoglycémies) que chroniques (chorée de Huntington, sclérose latérale amyotrophique ou SLA, maladie de Parkinson, maladie d'Alzheimer et certaines formes d'épilepsie), ainsi que dans de nombreuses affections dégénératives rétiniennes comme le glaucome ou la rétinopathie diabétique.

La "sur-libération" de glutamate dans l'espace extra-cellulaire (que ce soit par relargage neuronal ou par réduction du transport) induit une activation prolongée des récepteurs. Les phénomènes d'excito-toxicité alors observés relèvent de deux composantes :

- une composante rapide, indépendante du calcium (Ca^{2+}) mais dépendante du sodium (Na^+)

et peut-être du chlore (Cl⁻), résultant en une entrée d'eau dans la cellule alors détruite par " swelling " (gonflement)

- une autre composante, plus lente, ferait intervenir les ions calcium (Ca²⁺) (Choi, 1987). Dans ce cas, l'excito-toxicité serait liée à de trop fortes augmentations de la concentration de calcium ionisé intracellulaire qui activerait une cascade de réactions enzymatiques impliquant des caspases et une production accrue de radicaux libres détruisant, *in fine*, le neurone.

Compte tenu du caractère voltage-dépendant de l'activation des récepteurs NMDA, l'action cytotoxique des AAE implique très probablement : 1) une stimulation initiale des récepteurs ionotropiques AMPA/kaïnate à l'origine de la dépolarisation, 2) cette dépolarisation active secondairement les récepteurs NMDA entraînant une entrée massive de calcium (Ca²⁺). Dans ces conditions, la capacité de la cellule à réguler son taux de calcium intracellulaire serait un élément critique déterminant la mort cellulaire.

La vitesse d'élimination synaptique des AAE constitue objectivement, de ce fait, un des éléments essentiels de lutte contre l'excito-toxicité. Toute altération du transport du glutamate – que ce soit par déficit énergétique dans des conditions aiguës, par défaut de transcription ou de traduction, ou encore par atteinte des processus de régulation post-traductionnels – peut aboutir à une accumulation de glutamate, ou d'AAE, et induire un processus excito-toxique. Ainsi, de nombreux travaux ont démontré l'implication d'un déficit du transport des AAE dans le développement de certaines affections neurodégénératives, comme au cours de la SLA (Rothstein et coll., 1992) ou encore de la chorée de Huntington (Arzberger et coll., 1997).

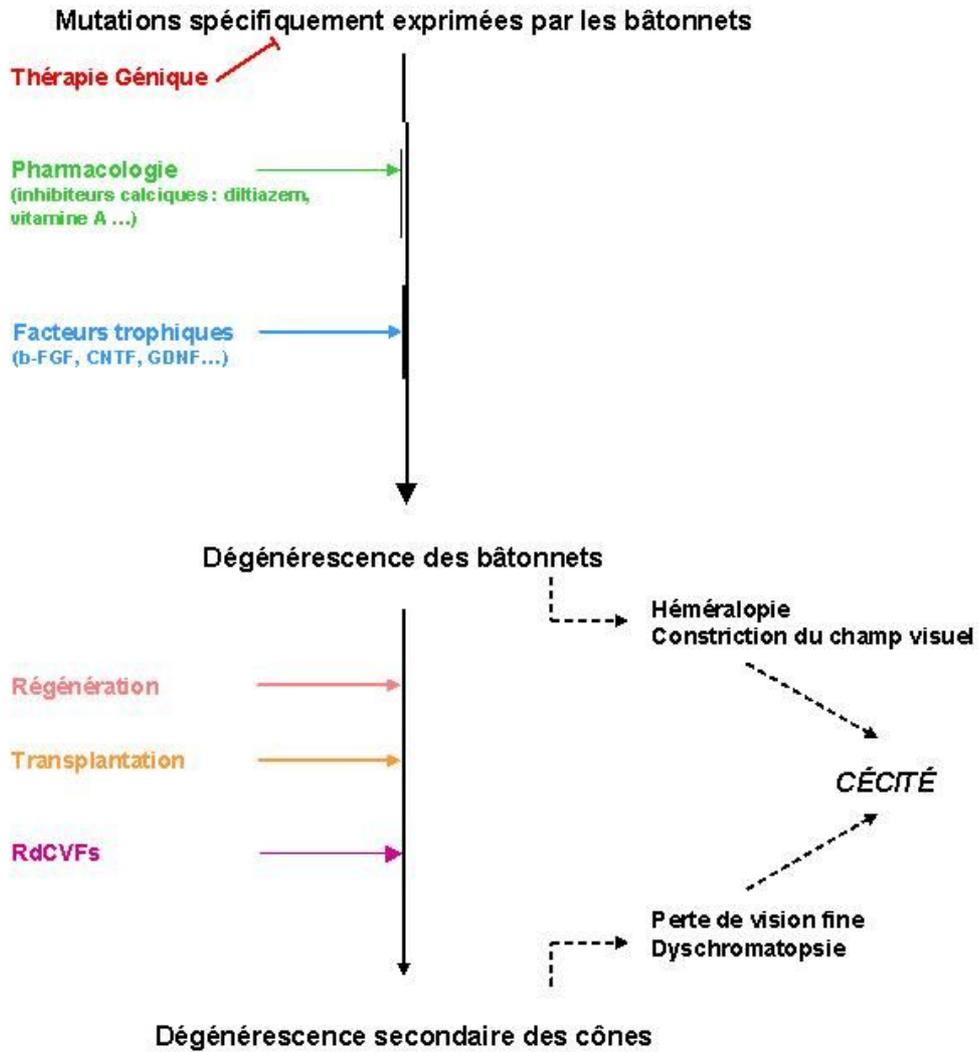


Figure 21. Approches thérapeutiques au cours des rétinites pigmentaires (Rod-cone dystrophies)

IV. POSSIBILITES THERAPEUTIQUES AU COURS DES RETINOPATHIES PIGMENTAIRES

(cf. Annexe 2 – Delyfer et coll., Biol Cell 2004 ; 96:261-9)

Les attentes des patients en matière de traitement sont immenses. Les traitements aujourd'hui à l'étude peuvent être séparés en deux grandes catégories : ceux qui ont pour objectif une récupération fonctionnelle et ceux qui visent à stabiliser la perte de vision (Fig. 21).

A. Restauration fonctionnelle

Différentes approches thérapeutiques pourraient permettre une récupération fonctionnelle :

1. Thérapie génique :

La thérapie génique vise à corriger la ou les anomalies génétiques responsables d'une affection héréditaire et constitue le seul moyen de guérir les dégénérescences rétiniennes héréditaires. Dans cette optique thérapeutique, on distingue principalement deux grands groupes de dégénérescences rétiniennes héréditaires : 1) les affections autosomiques récessives ou liées à l'X, dues à une " perte de fonction " d'un gène essentiel à la survie des photorécepteurs, et 2) les affections autosomiques dominantes, dues à un " gain de fonction " toxique pour les photorécepteurs, à un déséquilibre quantitatif (haploinsuffisance, duplication) ou encore à une inactivation en deux temps de Knudson.

Au cours des mutations perte de fonction, le traitement consiste à transférer le gène manquant à la cellule cible. Le transfert de gènes est réalisé grâce à des vecteurs viraux (adénovirus,

Adeno-Associated Virus ou AAV, lentivirus) et l'expression du transgène est limitée aux cellules cibles grâce à l'utilisation de promoteurs spécifiques (exemple : le promoteur de la rhodopsine pour les bâtonnets) ou à des modifications de la capsid virale (Auricchio et coll., 2001 ; Rabinowitz et coll., 2002). La démonstration la plus frappante de l'efficacité de tels traitements a été faite sur des chiens RPE65 (-/-). Les chiens RPE65 (-/-) sont un modèle d'amaurose congénitale de Leber ; ils présentent une mutation perte de fonction pour un gène exprimé spécifiquement par les cellules de l'épithélium pigmentaire et codant pour une protéine impliquée dans le cycle de la vitamine A (RPE65). Chez le chien RPE65 (-/-), l'injection sous-rétinienne d'AAV-RPE65 réalisée à l'âge de 4 mois permet la restauration de la fonction visuelle, ainsi qu'en attestent les tests électrophysiologiques (réponse des cônes et des bâtonnets) et psychophysiques (pupillométrie, conduites d'évitement) (Acland et coll., 2001). Les effets sont durables puisque, 2 ans après traitement, les tests de fonction visuelle sont stables (Bennett, 2002). Chez les rongeurs, le transfert du gène de la bêta-PDE chez la souris *rd1* ainsi que celui du gène *Mertk* par adénovirus chez le rat RCS se sont avérés également efficaces quoique moins démonstratifs (Bennett et coll., 1996 ; Vollrath et coll., 2001).

Au cours des affections autosomiques dominantes, le traitement consiste à lutter contre l'expression et/ou la production d'une protéine toxique. Dans ces cas, la thérapie génique utilise des ribozymes. Les ribozymes sont des molécules d'ARN qui comportent deux parties : l'une correspond à une zone d'appariement à l'ARN messager du gène muté et l'autre à une zone catalytique qui permet la destruction du complexe. Ce processus permet de cliver l'ARN muté tout en conservant l'ARN sauvage utile. Un tel procédé a été utilisé chez le rat transgénique porteur de la mutation P23H sur le gène codant pour la rhodopsine, et a permis de ralentir significativement la dégénérescence des photorécepteurs (Lewin et coll., 1998 ; LaVail et coll., 2000). Plus récemment, les ribozymes ont été supplantés par les techniques d'ARN interférence ou " ARNi " (Cashman et coll., 2005).

Malgré les avancées certaines de la thérapie génique, nous sommes cependant loin d'une application clinique chez l'homme. En effet, si de précédents essais cliniques ont démontré la capacité du génie génétique à guérir des pathologies héréditaires mettant en jeu le pronostic vital (par exemple, l'immunodéficience sévère ou SCID syndrome, Cavazzano-Calvo et coll., 2000), ils ont également mis en avant des effets secondaires aussi sévères qu'inattendus : leucémies chez les patients affectés de SCID (Hacein-Bey-Abina et coll., 2003; Check, 2003a, 2003b) ou encore réponse inflammatoire systémique majeure et létale

suivant le transfert de gène chez un patient affecté d'un déficit en ornithine transcarbamylase (Raper et coll., 2003). De nouveaux progrès au niveau des systèmes de délivrance des gènes " médicaments " sont nécessaires afin d'assurer à la fois efficacité thérapeutique et sécurité des patients, et permettre, par la suite, de conduire des essais cliniques dans des affections ne mettant pas en jeu le pronostic vital comme la RP.

Outre ces problèmes de sécurité thérapeutique, se pose également celui du nombre très important de mutations responsables de dégénérescence rétinienne héréditaire, la RP étant la maladie génétique la plus hétérogène qui soit. Ainsi, en raison des problèmes de sécurité d'une part et de l'hétérogénéité génétique de l'affection d'autre part, les alternatives thérapeutiques qui pourraient avoir une application à court ou moyen terme conservent tout leur intérêt.

2. Neurogenèse et réparation tissulaire : vers un nouveau concept ?

La grande majorité des neurones d'un individu sont produits avant ou autour de sa naissance. Cependant, depuis le milieu des années 90, il a été formellement établi qu'une activité de neurogenèse persiste à l'âge adulte et que des neurones sont produits en continu à partir de cellules progénitrices dans différentes régions du système nerveux central (McKay, 1997 ; Gage, 2000 ; Momma et coll., 2000 ; Zhao et coll., 2003). Elle est particulièrement importante au niveau du bulbe olfactif et du gyrus denté de l'hippocampe et peut être induite en réponse à une lésion ou à un traumatisme (McKay, 1997 ; Gage, 2000 ; Momma et coll., 2000 ; Zhao et coll., 2003). Au niveau de la rétine, des phénomènes endogènes de neurogenèse ont été mis en évidence *in vivo* au niveau de la marge ciliaire chez les amphibiens et les oiseaux (Fischer et Reh, 2000) et *in vitro* au niveau du corps ciliaire chez les mammifères adultes (Ahmad et coll., 2000 ; Tropepe et coll., 2000). Ces cellules progénitrices sont multipotentes, capables de se différencier dans les trois grands types cellulaires du système central : neurones, astrocytes et oligodendrocytes (Ahmad et coll., 2000 ; Ahmad, 2001). D'autre part, des phénomènes de trans-différenciation de cellules gliales en neurones rétinien ont également été observés chez l'oiseau adulte (Fischer et Reh, 2001). Ces différentes données ouvrent des perspectives thérapeutiques intéressantes dans la prise en charge des rétinopathies dégénératives. En effet, une augmentation de la neurogenèse – à partir de progéniteurs ou par trans-différenciation

giale – pourrait compenser les pertes cellulaires. Afin de déterminer si de tels mécanismes de neurogenèse interviennent au cours de la dégénérescence des photorécepteurs chez le mammifère atteint de RP, notre laboratoire a récemment étudié l'activité de neurogenèse chez la souris *rd1* (Menu dit Huart et coll., 2004). Les résultats démontrent qu'il existe des phénomènes de réparation de l'ADN des photorécepteurs en dégénérescence, à terme dépassés par l'importance de la "vague" apoptotique, dont la potentialisation pourrait être intéressante dans une optique de neuroprotection.

Par ailleurs, certaines équipes ont étudié la possibilité de réaliser une injection de cellules progénitrices allogéniques isolées à partir d'embryons ou d'individus adultes et préalablement sélectionnées (Young et coll., 2000 ; Nishida et coll., 2000). Les deux principaux problèmes à résoudre étant d'obtenir que les cellules progénitrices se différencient exclusivement en photorécepteurs et que ces derniers établissent des connexions efficaces avec le réseau post-synaptique hôte en place. D'autres ont proposé, dans un modèle de maladie de Huntington, de modifier les cellules progénitrices par thérapie génique avant injection afin d'induire, en plus, la libération *in situ* de facteurs destinés à améliorer leur survie et/ou à protéger les cellules hôtes encore fonctionnelles (Kordower et coll., 1997).

Récemment, une autre approche a été développée par l'équipe de Friedlander. Considérant qu'une raréfaction vasculaire est associée aux dégénérescences rétinienne et pourrait être un facteur aggravant la perte neuronale, Otani et coll. (2004) ont injecté par voie intra-vitréenne des cellules progénitrices hématopoïétiques adultes afin de limiter les remaniements vasculaires. Leurs résultats ont été impressionnants : non seulement l'injection de cellules progénitrices hématopoïétiques a permis la stabilisation des phénomènes d'altération vasculaire, mais elle a également permis de ralentir la perte des cônes, soulignant ainsi l'importance des liens qui unissent la dégénérescence des vaisseaux rétiniens et celle des cônes (Otani et coll., 2004).

3. Transplantation de tissu rétinien

Dans la majorité des dégénérescences rétiniennes héréditaires, la dégénérescence des photorécepteurs est secondaire à une anomalie des photorécepteurs eux-mêmes ou de

l'épithélium pigmentaire (EP) adjacent, alors que les autres types cellulaires sont relativement bien conservés. En se basant sur ces données, de nombreuses équipes ont proposé de remplacer les cellules défectueuses par une greffe. Deux grands types de transplantation ont été développés : 1) la transplantation de cellules épithéliales pour prévenir la dégénérescence des photorécepteurs secondaire à une anomalie de l'EP et 2) la transplantation de cellules nerveuses dans le but de remplacer le tissu dégénéré.

a) Transplantation d'EP

Chez le rat RCS, les cellules de l'EP sont incapables d'assurer la phagocytose des disques des segments externes qui s'accumulent, entraînant la mort des photorécepteurs. De nombreux travaux réalisés sur ce modèle ont démontré un ralentissement significatif de la dégénérescence des photorécepteurs après transplantation d'EP (Li et Turner, 1988 ; Sheedlo et coll., 1989 ; Gouras et Lopez, 1989), une normalisation métabolique (LaVail et coll., 1992) ainsi qu'une amélioration de la fonction visuelle (Jiang et Hamasaki, 1994; Whiteley et coll., 1996).

Sur la base de ces résultats, Algvere et coll. ont réalisé des greffes allogéniques d'EP chez l'homme sur des formes évoluées de dégénérescence maculaire liée à l'âge (Algvere et coll., 1994). Ces interventions n'ont pas démontré de bénéfice en terme de récupération fonctionnelle et ont été compliquées d'un haut pourcentage de rejet [75% (Algvere et coll., 1999)]. Compte tenu du risque général que représenterait une thérapie immunosuppressive associée, par rapport au bénéfice escompté, Thumann et coll. ont proposé de réaliser des greffes autologues d'épithélium pigmenté irien dans l'espace sous-rétinien (Thumann et coll., 1999). Les résultats chez le lapin montrent que cet épithélium irien est bien toléré et est capable de s'organiser en une monocouche sur la membrane de Bruch et de phagocyter des segments externes (Thumann et coll., 1999). Une étude récente montre un prolongement de la survie des photorécepteurs en regard des greffons d'épithélium irien (Crafoord et coll., 2002), mais la capacité de cet épithélium à assurer le métabolisme de la vitamine A reste cependant hypothétique.

b) Transplantation de cellules nerveuses

Dans les cas de dégénérescence rétinienne où la perte des photorécepteurs est secondaire à une anomalie des photorécepteurs eux-mêmes (mutation exprimée par les cônes ou les bâtonnets), de nombreuses équipes ont proposé de remplacer les cellules défectueuses par des cellules photoréceptrices foetales ou adultes avec, pour objectif, leur intégration dans la rétine hôte et une restauration fonctionnelle (del Cerro et coll., 1989 ; Gouras et coll., 1991 ; Silverman et Hughes, 1989). Différentes techniques ont été utilisées. Certaines équipes ont transplanté des photorécepteurs immatures, préalablement dissociés, dans l'espace sous-rétinien de modèles animaux présentant une dégénérescence rétinienne fonctionnelle (del Cerro et coll., 1989 ; Gouras et coll., 1991). D'autres équipes ont préconisé la transplantation de la couche nucléaire externe dans sa totalité afin de préserver l'intégrité des photorécepteurs dans leur environnement et d'optimiser les chances de rétablir une connexion " normale " avec les cellules post-synaptiques (Silverman et Hughes, 1989 ; Tezel et Kaplan ; 1998). Dans les deux cas, les résultats histologiques et fonctionnels ont été peu encourageants.

c) Rôle paracrine des transplants

Quelle que soit la transplantation réalisée, épithéliale ou neurologique, il a été observé très vite que les transplants permettaient la survie des cellules photoréceptrices bien au-delà des régions situées directement en regard des greffons. Il a donc été proposé que la survie des cellules photoréceptrices soit liée à la libération de facteurs trophiques par les cellules greffées (Sahel et coll., 2001). Le greffon constituerait ainsi une sorte de " réservoir " de facteurs de viabilité. En ce qui concerne les greffes de cellules épithéliales, la libération de FGF-2 a notamment été suggérée (Sahel et coll., 2001). L'étude approfondie des facteurs diffusibles libérés par les transplants de cellules nerveuses a permis, quant à elle, l'identification de nouveaux facteurs de viabilité : les " Rod-derived Cone Viability Factors " (Mohand-Saïd et coll., 1997, 1998 et 2000 ; Fintz et coll., 2003 ; Lévillard et coll., 2004 – voir paragraphe IV-B.4.c).

4. Vision artificielle

Différents groupes de recherche développent actuellement des implants rétiniens électriques dans le but de restaurer un certain degré de vision chez les patients atteints de dégénérescence rétinienne évoluée. Le principe est de court-circuiter le rôle des photorécepteurs dégénérés dans le traitement de l'information visuelle. Deux grandes familles d'implants sont à l'étude : les implants sous-rétiniens et les implants épi-rétiniens (Loewenstein et coll., 2004).

B. Stabilisation fonctionnelle : neuroprotection pharmacologique

A côté des thérapies visant à traiter l'anomalie génétique causale (thérapie génique corrective), de très nombreux travaux ont démontré la capacité de molécules pharmacologiques à ralentir la progression de la dégénérescence des photorécepteurs dans de nombreux modèles. Ainsi, en modulant le micro-environnement des photorécepteurs, en prévenant l'activation de la cascade apoptotique ou en préservant une partie des bâtonnets, ces molécules "neuroprotectrices" pourraient stabiliser l'évolution de l'affection avant la perte secondaire des cônes et, de ce fait, limiter le handicap visuel. La perte d'acuité visuelle pourrait ainsi être limitée le plus souvent à une cécité nocturne et "transformerait", en quelque sorte, la RP en "Cécité Nocturne Congénitale Stationnaire" (Congenital Stationary Night Blindness ou CSNB), or nous savons que les patients atteints de CSNB sont peu handicapés dans de bonnes conditions d'éclairage et en milieu urbain.

De telles stratégies pharmacologiques ne guériront jamais les dystrophies rétiniennes mais permettraient de court-circuiter l'immense hétérogénéité génétique des RP (puisque non ciblée sur le défaut génétique initial) et, ainsi, d'élaborer des traitements applicables à moyen terme à une grande majorité des patients.

1. Vitamine A

Berson et coll. ont montré par une étude randomisée, contrôlée et en double aveugle, le rôle bénéfique de la vitamine A dans la prise en charge thérapeutique des rétinopathies pigmentaires communes. La dose préconisée est de 15 000 UI/jour, sous contrôle médical (Berson et coll., 1993a, 1993b).

L'étude de l'action de la vitamine A sur des modèles animaux de RP montre que, dans certaines formes de RP liées à une mutation de classe II sur le gène de la rhodopsine (mutations responsables d'une instabilité thermique de l'opsine), la vitamine A induit un ralentissement de la dégénérescence des photorécepteurs et pourrait agir en stabilisant l'opsine mutée grâce à une augmentation de la disponibilité du chromophore (Li et coll., 1998).

Récemment, Berson et coll. ont démontré que, au cours des deux premières années de traitement, les prescriptions combinées [vitamine A (15 000 UI/jour) + acide docosahexaénoïque (DHEA, 1200 mg/j)] ou [vitamine A (15 000 UI/jour) + régime alimentaire riche en oméga-3 (plus de 0,2 g/j)] permettent de ralentir encore davantage la progression des atteintes campimétriques et électrorétinographiques que lors des prescriptions de vitamine A seule (Berson et coll., 2004a et 2004b). Selon les auteurs, les traitements combinés permettraient d'accélérer l'efficacité de la vitamine A, ce qui expliquerait que, après 2 ans, l'effet des associations [vitamine A + DHEA] ou [vitamine A + oméga-3] ne soit plus statistiquement différent de celui observé avec la vitamine A seule.

2. Blocage de la cascade apoptotique

Pour les dégénérescences rétiniennes où aucun gène causal n'a pu être identifié, une thérapie génique dirigée contre des cibles communes aux différentes formes de dégénérescences peut être envisagée. En effet, toutes les dégénérescences rétiniennes partagent la même voie terminale : l'activation du programme de mort cellulaire programmée qui conduit à la perte des photorécepteurs. Le traitement par thérapie génique consiste alors à potentialiser l'action de gènes codant pour des protéines anti-apoptotiques ou, au contraire, à inhiber l'action de

gènes pro-apoptotiques, ou encore à bloquer l'action des protéases (caspases) impliquées dans la cascade enzymatique conduisant à la mort cellulaire. Ainsi, le transfert du gène anti-apoptotique *bcl-2*, grâce à un vecteur viral et sous contrôle du promoteur de la rhodopsine, permet de ralentir la dégénérescence des photorécepteurs chez la souris *rd1* (Bennett et coll., 1998). L'inhibition de l'action de gènes pro-apoptotiques, grâce à l'utilisation d'oligonucléotides anti-sens, apparaît plus compliquée à obtenir et se heurte, actuellement, à une méconnaissance des gènes apoptotiques impliqués de manière spécifique dans les dégénérescences rétiniennes (Ogilvie et coll., 1998). Enfin, le transfert de gènes codant pour des protéines capables de bloquer la cascade apoptotique (protéines inhibitrices de caspases) a permis, dans deux modèles drosophiles de dégénérescence rétinienne, de bloquer la dégénérescence des photorécepteurs et de maintenir la fonction visuelle (Davidson et Steller, 1998).

3. Inhibiteurs calciques

L'augmentation de la concentration en calcium libre intracellulaire constitue une des voies d'activation de la cascade apoptotique. Dans les photorécepteurs, le taux du calcium intracellulaire passe par l'ouverture prolongée des canaux cationiques GMPc-dépendants et est donc lié au taux de GMPc intracellulaire. En effet, un excès de GMPc conduit à une sur-activation des canaux GMPc-dépendants, à son tour responsable de la dépolarisation prolongée des bâtonnets. Cette dépolarisation induit un influx calcique au travers des canaux qui, s'il est maintenu, pourrait s'avérer létal pour la cellule. Une augmentation du GMPc est observée dans de nombreuses formes de dégénérescence rétinienne. Cette augmentation n'est pas restreinte aux formes associées à une mutation sur le gène codant pour une des sous-unités de la GMPc-PDE (Farber et Lolley, 1974 ; Aquirre et coll., 1978), puisqu'elle peut également être observée au cours de certaines formes de dégénérescences avec une GMPc-PDE fonctionnelle (Woodford et coll., 1982 ; Kommonen et coll., 1996). Prévenir un influx calcique majeur au cours des RP pourrait donc être de premier intérêt.

Certains antagonistes calciques connus pour inhiber les canaux calciques de type L ont également une action sur les canaux calciques GMPc-dépendants (Stern et coll., 1986 ; Nicol, 1987, 1993). Sahly et coll. ont ainsi démontré le rôle protecteur du diltiazem sur la

dégénérescence des photorécepteurs chez la drosophile mutante *rdgB* (Sahly et coll., 1992). Notre laboratoire a confirmé cet effet chez la souris *rcl* chez qui le diltiazem permet une préservation de la fonction visuelle corrélée à un ralentissement de la dégénérescence des photorécepteurs (Frasson et coll., 1999a). L'effet neuroprotecteur de cet antagoniste est cependant discuté actuellement (Pawlyk et coll., 2002). Dans certains modèles de dégénérescence rétinienne, le diltiazem s'est avéré sans effet sur la cinétique de dégénérescence des photorécepteurs (Bush et coll., 2000 ; Pearce-Kelling et coll., 2001). Dans d'autres modèles enfin, alors que le diltiazem est rapporté sans effet, un autre antagoniste calcique, la nilvadipine, s'est révélé efficace (Ohguro et coll., 2001 ; Yamazaki et coll., 2002).

En fait, l'efficacité des inhibiteurs calciques pour ralentir la dégénérescence des photorécepteurs apparaît variable d'un modèle et d'une molécule à l'autre. Cet effet pourrait être restreint à certaines mutations, ou être fonction des conditions expérimentales, des souches d'animaux et de l'inhibiteur calcique utilisé. L'identification des mécanismes d'action de ces inhibiteurs permettrait d'expliquer les variations dans les effets observés et de mieux cibler les indications.

L'utilisation du diltiazem et d'autres antagonistes calciques depuis de nombreuses années en cardiologie devrait, une fois les indications mieux définies, faciliter l'obtention des autorisations pour conduire des essais cliniques à large échelle. Récemment, une première étude clinique très prometteuse a démontré que le diltiazem, en association avec une prescription de taurine et de vitamine E, permet de ralentir les pertes campimétriques chez des patients atteints de RP (Pasantes-Morales et coll., 2002).

4. Intérêt des facteurs neurotrophiques

Les facteurs neurotrophiques sont des protéines qui participent à la régulation de la survie et à la différenciation de certains neurones au cours du développement, puis au maintien de fonctions spécifiques à ces neurones à l'âge adulte.

Différents facteurs de croissance ont été testés au cours des dégénérescences rétiniennes :

a) Le basic Fibroblast Growth Factor (bFGF ou FGF-2)

Le FGF-2 a été historiquement le premier facteur trophique étudié au cours de dégénérescences rétiniennes (Faktorovich et coll., 1990). Il est impliqué dans le développement et la différenciation des photorécepteurs (Hicks et Courtois, 1992). Il permet la survie des photorécepteurs dans deux modèles de dégénérescence rétinienne : chez le rat RCS (Faktorovich et coll., 1990 ; Uteza et coll., 1999) et dans les dégénérescences induites par exposition continue à la lumière (Faktorovich et coll., 1992). Par contre, cet effet neuroprotecteur n'a pas été retrouvé chez la souris *rd1*. FGF-2 exerce son effet neuroprotecteur directement sur les photorécepteurs, sans intervention de cellules intermédiaires (Fontaine et coll., 1998).

Il est néanmoins apparu rapidement que si le FGF-2 permettait une conservation anatomique et fonctionnelle des photorécepteurs (Faktorovich et coll., 1990; Ali et coll., 2000; Akimoto et coll., 1999; Uteza et coll., 1999; Lau et coll., 2000), il induisait également une néovascularisation rétinienne (Perry et coll., 1995), le rendant inapplicable en clinique.

b) Le Ciliary NeuroTrophic Factor ou CNTF

Depuis, de nombreux facteurs trophiques ont démontré leur capacité à ralentir la dégénérescence des photorécepteurs, le plus couramment étudié étant le CNTF. Le CNTF ralentit le processus de dégénérescence des photorécepteurs dans de très nombreux modèles de dystrophie rétinienne (Cayouette et Gravel, 1997; LaVail et coll., 1998; Liang et coll., 2001; Bok et coll., 2002). Il exerce son action neuroprotectrice vis-à-vis des photorécepteurs de manière indirecte, par l'intermédiaire des cellules gliales de Müller (Wahlin et coll., 2001). Cependant, si le CNTF permet une survie " anatomique " des photorécepteurs, les évaluations fonctionnelles rétiniennes (électro-rétino-grammes) ont montré une diminution paradoxale des réponses scotopiques et photopiques des rétines traitées avec le CNTF (Liang et coll., 2001; Bok et coll., 2002). L'identification des mécanismes cellulaires et moléculaires responsables de tels effets paradoxaux pourrait sembler un pré-requis nécessaire avant l'utilisation du CNTF lors d'essais cliniques ; néanmoins, des essais de Phase I sont actuellement en cours

aux Etats-Unis (Neurotech®).

D'autres facteurs trophiques sont également à l'étude, parmi lesquels le Brain Derived Neurotrophic Factor [BDNF, (LaVail et coll., 1998)] et surtout le Glial cell line-Derived Neurotrophic Factor (GDNF, voir paragraphe IV-C).

c) Les Rod-derived Cone Viability Factors ou RdCVFs

Nous avons vu que, dans les rod-cone dystrophies, la mort secondaire des cônes est liée à une carence en un ou plusieurs facteurs trophiques libérés en temps normal par les bâtonnets et appelés RdCVFs (Mohand-Saïd et coll., 1998, 2000 ; Streichert et coll., 1999 ; voir paragraphe I-C.4). Les travaux de Fintz et coll. (2003) ont permis de déterminer que les RdCVFs sont de nature protéique et sensibles à la chaleur, et conservent leur action trophique vis-à-vis des cônes à travers la barrière des espèces.

Afin d'isoler et de caractériser ces facteurs, notre laboratoire a développé un modèle d'étude simple, adapté à la réalisation de clonage par expression (Léveillard et coll., 2004). Après avoir criblé l'ensemble des facteurs diffusibles présents dans le surnageant d'explants rétiniens réalisés à partir de rétines de souris sauvages adultes (5 semaines), Thierry Léveillard a ainsi construit une "bibliothèque d'ADNc" et purifié les plasmides correspondants. L'action des différents plasmides vis-à-vis des cônes a été ensuite évaluée sur des cultures des photorécepteurs de poulet naturellement riches en cônes. Ce criblage systématique a permis d'isoler RdCVF₁. RdCVF₁ exerce une action neuroprotectrice de manière dose-dépendante chez le poulet *in vitro*, et permet la survie des cônes de souris *rd1* à la fois *ex vivo* (explants) et *in vivo* (~ 40 % de survie en moyenne). Cet effet neuroprotecteur est aboli par l'utilisation d'un anticorps bloquant. Les analyses quantitative et qualitative des transcrits de RdCVF₁ (RT-PCR temps-réel et hybridation *in situ*) et de la protéine RdCVF₁ (Western blots et immuno-marquages) démontrent que RdCVF₁ est exprimé par les bâtonnets que ce soit chez la souris *rd1*, le rat RCS ou le rat S334ter (Léveillard et coll., 2004 ; Danan et coll., soumis). Enfin, les analyses de séquences montrent que RdCVF₁ est une nouvelle protéine "thioredoxine-like", dont le gène est actuellement enregistré sous la dénomination Txnl6

(OMIM # 608791 ; Léveillard et coll., 2004).

L'effet fonctionnel de RdCVF₁ est actuellement à l'étude. Des travaux sont en cours afin de caractériser d'autres RdCVFs.

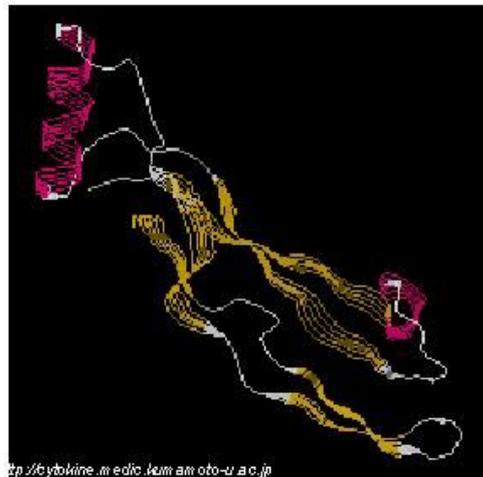
C. Intérêt du Glial cell line-Derived Neurotrophic Factor ou GDNF

1. Le GDNF

GDNF a été purifié en 1993 à partir de cellules de gliome et identifié comme un facteur de croissance capable de promouvoir la survie, *in vitro*, de neurones dopaminergiques du mésencéphale embryonnaire, autrement dit des neurones qui dégèrent au cours de la maladie de Parkinson (Lin et coll., 1993). Le rôle neuroprotecteur de GDNF vis-à-vis des neurones dopaminergiques a depuis été largement confirmé *in vivo* dans différents modèles (Tomac et coll., 1995). Par ailleurs, il a été démontré que GDNF ralentit la dégénérescence des motoneurones spinaux au cours de la Sclérose Latérale Amyotrophique (Henderson et coll., 1994) ainsi que celle des neurones noradrénergiques du locus ceruleus dont le dysfonctionnement est impliqué dans les maladies de Huntington, de Parkinson ou encore d'Alzheimer (Arenas et coll., 1995).

GDNF est un peptide glycosylé de 20 kDa, actif biologiquement sous forme homodimérique (deux chaînes identiques de 134 acides aminés reliées par des ponts disulfures, Fig. 22A). GDNF constitue, avec la neurturin (NRTN), l'artemin (ART) et la persephin (PSP), la famille des ligands " GDNF " qui s'intègre dans la super-famille des TGF- β . Contrairement aux autres membres de cette super-famille qui transduisent le signal via des récepteurs à activité serine/thréonine kinase, les ligands de la famille GDNF activent des cascades de signalisation intra-cellulaire via le récepteur à activité tyrosine kinase Ret (Saarma, 2000).

A.



B.

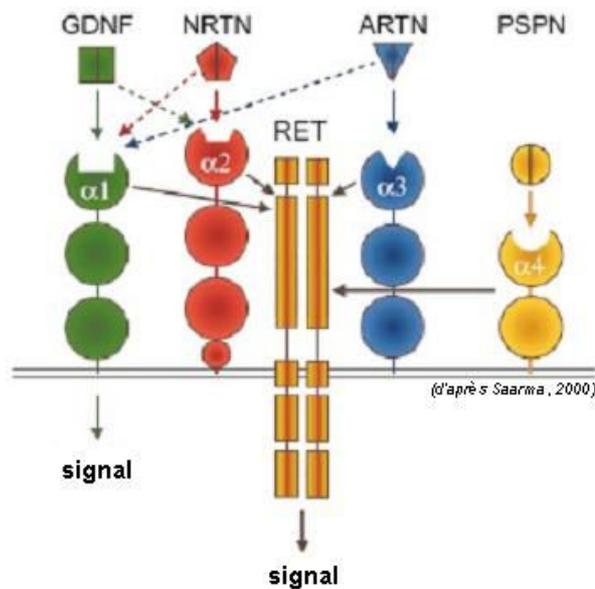


Figure 22. GDNF et son complexe-récepteur.

A, Homodimère de GDNF : 2 chaînes de 134 acides aminés sont reliées par des ponts disulfures (en rose).

B, Les ligands de la famille GDNF (GDNF, neurturin ou NRTN, artemin ou ARTN, persephin ou PSPN) se lient spécifiquement à un groupement glycosyl-phosphatidyl-inositol ancré sur la membrane externe de la membrane plasmique appelé « co-récepteur » et spécifique de chacun d'eux (respectivement GFRalpha-1, 2, 3 ou 4), et d'un récepteur trans-membranaire à activité tyrosine kinase commun à tous : Ret (REarranged during Transfection). De rares interactions croisées entre certains ligands et co-récepteurs ont été rapportées : GDNF-GFRalpha2, NRTN-GFRalpha1 ou ARTN-GFRalpha-1. GDNF peut également induire un signal sans passer par Ret.

2. Complexe-récepteur de GDNF

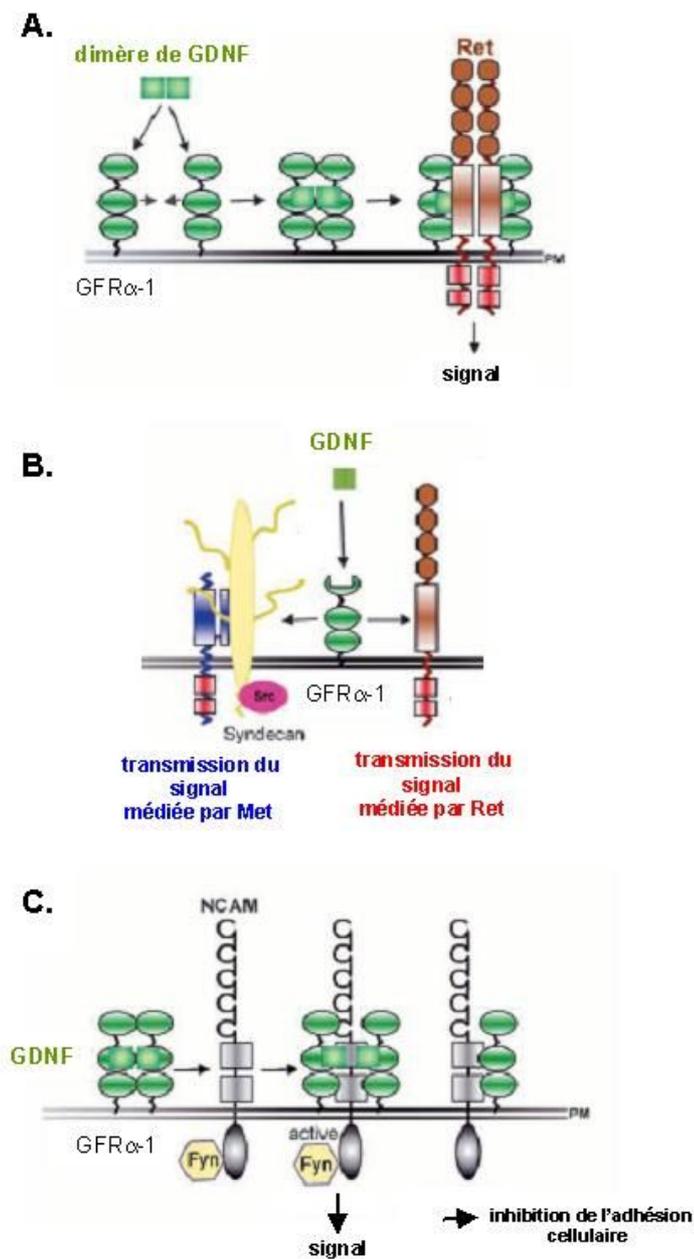
Les ligands de la famille GDNF (GDNF, NRTN, ARTN et PSPN) agissent par l'intermédiaire d'un " complexe-récepteur " composé :

- d'un groupement glycosyl-phosphatidyl-inositol ancré sur la membrane externe de la membrane plasmique, appelé " co-récepteur " et spécifique de chacun d'entre eux (respectivement GFRalpha-1, 2, 3 ou 4),
- et d'un récepteur trans-membranaire à activité tyrosine kinase commun à tous : Ret (pour REarranged during Transfection) (Fig. 22B).

Il est à noter que de rares interactions croisées entre les ligands et les co-récepteurs ont été rapportées (voir Fig. 22B ; Saarma, 2000).

Classiquement, un dimère de GDNF induit la réunion de deux molécules GFRalpha-1, ce complexe " dimérise " à son tour deux molécules Ret, induisant ainsi la transphosphorylation de leur domaine tyrosine kinase et la transduction du signal en intracellulaire (Fig. 23A). Les cascades enzymatiques pouvant être activées par la suite sont multiples (Sariola et Saarma, 2003):

- la voie des MAP-kinase, impliquée dans la néphrogenèse, le développement neuritique et la survie neuronale
- la voie de la phosphoinositide 3-kinase (PI3K), cruciale pour le développement neuritique et la survie neuronale
- la voie de la phospholipase C, régulant le taux intra-cellulaire de Ca^{2+} par l'augmentation de l'inositol (1,4,5)-triphosphate
- la voie des kinases de la famille Src, impliquée également dans la croissance neuritique et la survie neuronale, ainsi que la connexion urétérale



(d'après Sariola et Saarma, 2003)

Figure 23. Voies de signalisation de GDNF.

A. Un dimère de GDNF réunit deux molécules de GFR α -1. Le complexe ainsi formé lie à son tour deux molécules de Ret induisant ainsi la transphosphorylation de leur domaine tyrosine kinase.

B. GDNF peut agir indépendamment de Ret via la phosphorylation de Met. L'activation de Met se fait de manière indirecte par l'intermédiaire de Kinases de type Src.

C. Un dimère de GDNF, en l'absence de GFR α -1, peut se lier à NCAM. Ici, la liaison GDNF-NCAM induit, par exemple, l'activation de Fyn (une kinase de type Src) inhibant ainsi l'adhésion cellulaire.

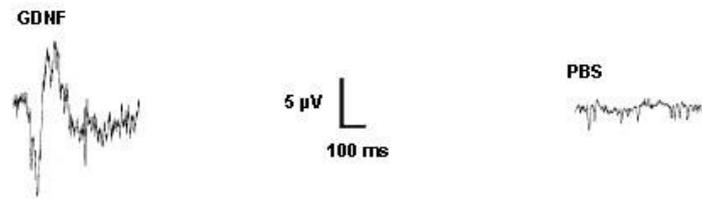
Enfin, depuis peu, il a été démontré que GDNF peut induire un signal indépendamment de Ret :

- le complexe GDNF/GFRalpha-1 peut en effet induire la phosphorylation du récepteur à activité tyrosine kinase Met de manière indirecte via les kinases de la famille Src (Fig. 23B)
- en l'absence de GFRalpha-1, GDNF peut également se lier avec NCAM (N-Cell Adhesion Molecule). La liaison GDNF-NCAM est une liaison de faible affinité, elle ne se réalise donc qu'en l'absence de GFRalpha-1 (Fig. 23C).

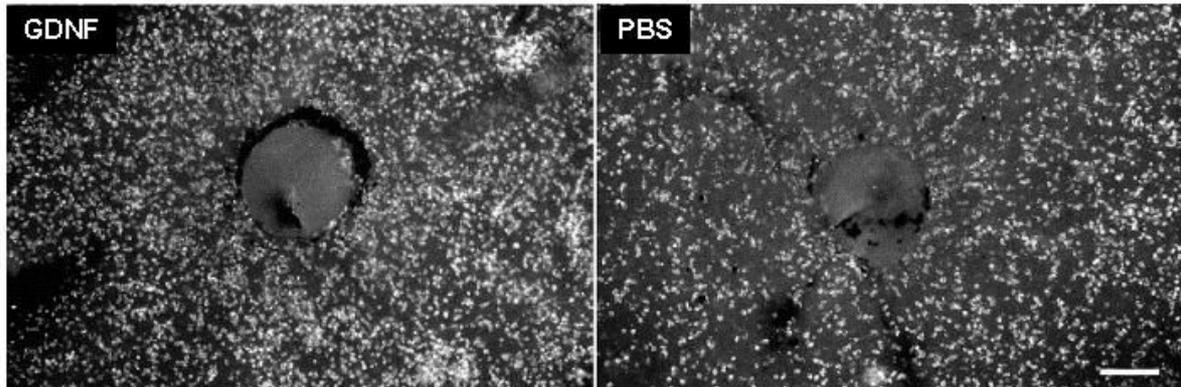
3. Effet du GDNF chez la souris *rdl*

Notre laboratoire a étudié l'effet du GDNF sur la survie de bâtonnets de souris *rdl*. Deux groupes de souris *rdl* ont été constitués : le premier recevant deux injections sous-rétiniennes de GDNF (à J₁₃ et J₁₇), le deuxième recevant deux injections sous-rétiniennes de PBS. L'effet fonctionnel a été apprécié grâce à des enregistrements ERG réalisés à J₂₂, l'effet histologique par le marquage des rétines entières à J₂₃ avec un anticorps dirigé contre la rhodopsine, suivi du comptage des cellules marquées pour chaque rétine (Frasson et coll., 1999b). Les résultats ont été prometteurs : alors que les tracés ERG des souris traitées avec le PBS étaient plats, les souris traitées avec le GDNF conservaient une activité électrique rétinienne enregistrable (Fig. 24A). Les comptages stéréologiques des bâtonnets marqués ont, quant à eux, démontré une augmentation significative du nombre de bâtonnets chez les souris ayant reçu le GDNF (Fig. 24B & C). Pour la première fois, le rôle neuroprotecteur morphologique et fonctionnel de GDNF était démontré dans un modèle de dégénérescence rétinienne.

A.



B.



C.

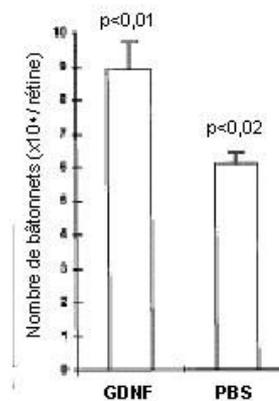


Figure 24. Effet neuroprotecteur de GDNF chez la souris *rd1*.

A. A J₂₂, les souris *rd1* traitées avec GDNF conservent une activité électrique rétinienne enregistrable à l'ERG. A l'inverse, les souris contrôles traitées avec du PBS ont un tracé ERG plat.

B. Photographies de rétines de souris *rd1* traitées avec du GDNF ou du PBS (contrôles), marquées avec un anticorps dirigé contre la rhodopsine, puis montées à plat. Le nombre de bâtonnets marqués est plus important chez les souris ayant reçu du GDNF. Barre d'échelle = 100 μm .

C. Les comptages stéréologiques du nombre de bâtonnets présents à J₂₃ dans les rétines traitées avec du GDNF, du PBS, ou non traitées, démontrent que, en moyenne, GDNF permet une survie de 30% des bâtonnets.

Depuis, l'action neuroprotectrice de GDNF vis-à-vis des photorécepteurs a été confirmée dans différents modèles de dégénérescences rétiniennes, héréditaires [le rat transgénique S334ter, (McGee Sanftner et coll., 2001) ; le rat RCS (Lawrence et coll., 2004)] et non héréditaires [dans un modèle de décollement de rétine, (Wu et coll., 2002)].

A l'heure actuelle, GDNF est considéré comme l'un des facteurs trophiques les plus prometteurs pour les affections neurodégénératives, notamment pour la maladie de Parkinson. Des essais cliniques sont actuellement conduits chez des patients parkinsoniens (Gill et coll., 2003) et ont confirmé l'efficacité du GDNF et l'absence d'effets secondaires importants lorsque celui-ci est administré localement directement dans le putamen. Néanmoins, si les études démontrant le rôle neuroprotecteur de GDNF dans différentes affections neurodégénératives sont nombreuses, très peu de travaux se sont attachés à comprendre les mécanismes sous-tendant l'action du GDNF. La compréhension des voies de signalisation impliquées permettrait pourtant, sans aucun doute, de proposer d'autres alternatives pharmacologiques et d'ouvrir ainsi de nouvelles pistes de recherche.

L'étude d'un mécanisme possible de GDNF chez la souris <i>rd1</i> a constitué le second axe de notre travail de thèse.
--

V. OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THÈSE :

Dans le travail présenté ici, nous avons cherché à répondre aux questions suivantes :

A. Dégénérescence des photorécepteurs et toxicité du glutamate :

- Existe-t-il des altérations du métabolisme du glutamate au cours de la dégénérescence des photorécepteurs chez la souris *rdl* ?
- Existe-t-il des arguments en faveur d'une toxicité du glutamate vis-à-vis des photorécepteurs au cours de la dégénérescence des photorécepteurs chez la souris *rdl* ?

B. Etude du rôle neuroprotecteur de GDNF :

- Neuroprotection de GDNF chez la souris *rdl* : mécanisme direct et/ou indirect ?
- GDNF exerce-t-il son rôle neuroprotecteur chez la souris *rdl* en modulant les mécanismes endogènes de lutte contre la toxicité médiée par le glutamate et les niveaux intra-rétiens de glutamate ?

Matériels & méthodes

I. MODÈLE ANIMAL

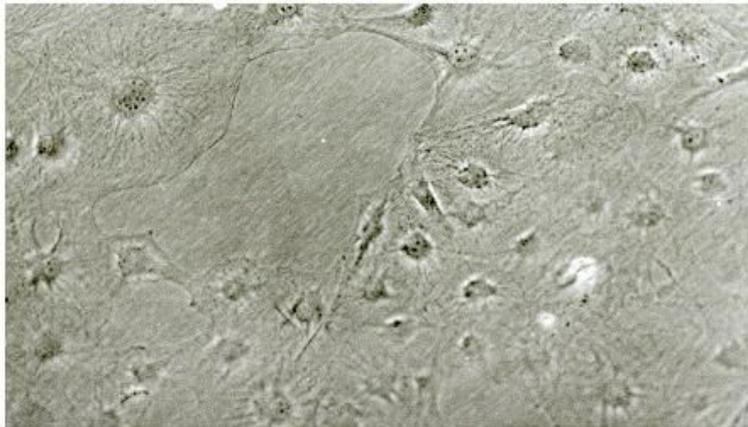
Parmi les nombreux modèles animaux décrits de RP, nous avons choisi de faire nos recherches sur des souris *rd1*. Ce modèle est très intéressant car il présente une mutation retrouvée chez 4% des patients en clinique. Bien que très bien caractérisé, il pose cependant un problème méthodologique. En effet, la souris *rd1* présentant une mutation spontanée sur le gène *Pde6b*, il n'existe pas de contrôle ayant un fond génétique strictement identique. Nous avons donc dû utiliser des souris C57BL/6 (dites "sauvages") comme contrôles. Pour palier ce problème, notre laboratoire a, depuis quelques mois, entrepris l'élevage de souris *rd/rd* [ou *rd (-/-)*] et *wt/wt* [ou *rd (+/+)*]. Il s'agit d'animaux issus de colonies congéniques de souris C3H de l'Université de Rotterdam (Pays-Bas). Les souris *wt/wt* ont été obtenues à partir de souris *rd/rd* en substituant l'allèle *Pde6b* muté par l'allèle sauvage de souris C7BL/LiA (Vicizian et coll., 1992). Certains de nos résultats ont été confirmés en utilisant ces lignées congéniques.

Tous les animaux ont été élevés et soignés selon les recommandations de *l'Association for Research in Vision and Ophthalmology* (ARVO). Les souris étaient maintenues dans des cages de plastique transparentes, soumises à des cycles de 12 heures de luminosité - 12 heures d'obscurité et disposaient d'eau et de nourriture ad libitum.

II. BIOLOGIE CELLULAIRE

A. Cultures primaires de cellules gliales de Müller (CGM) et application de GDNF *in vitro*.

La technique de mise en culture des CGM de souris a été adaptée à partir de celle décrite chez le rat par Hicks et Courtois (1990). Dans la mesure où le gène *Pde6b* muté est exprimé spécifiquement par les bâtonnets et uniquement après le 8^{ème} jour de vie (Phelan et Bok, 2000), nous avons considéré que les CGM de souris *rdl* et sauvages étaient similaires avant le début de la dégénérescence et utilisé des souris sauvages de 8 jours pour réaliser les cultures. Immédiatement après leur sacrifice, les yeux des souris sont énucléés et placés dans du milieu “*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*” (DMEM, Invitrogen, Carlsbad, CA) contenant 10 U/ml de pénicilline et 10 µg/ml de streptomycine puis conservés à l'obscurité et à température ambiante pour la nuit. Le lendemain, les yeux sont incubés à 37 °C dans du DMEM contenant 0,1% de trypsine (pour lyser la sclère) et 70 U/ml de collagenase (pour aider à la séparation de l'épithélium pigmenté et de la rétine neurosensorielle) pendant 30 minutes. Les rétines sont ensuite séparées de l'épithélium pigmentaire adjacent, coupées en fragments de 1 mm², placées dans une boîte de Pétri contenant du DMEM avec 10% de sérum de veau foetal (FCS, Invitrogen, Carlsbad, CA) et maintenues à 37 °C dans un incubateur humidifié avec un taux de CO₂ réglé à 5%. Deux jours plus tard, les agrégats rétiens sont retirés. A confluence, les cultures de CGM sont re-suspendues et repiquées dans 2 boîtes de Pétri différentes. Après deux jours (juste avant confluence, Fig. 25) le milieu est retiré et les boîtes rincées deux fois avec du DMEM, puis les CGM sont immédiatement immergées dans du DMEM contenant 5 µg/ml d'insuline, 5µg/ml de transferrine, 5 ng/ml de sélénite de sodium, 1mM de pyruvate de sodium, 10 U/ml de pénicilline, 10 µg/ml de streptomycine, et supplémenté ou non en GDNF (50 ng/ml, rhGDNF, Promega, Madison, WI). Après 24 heures, le milieu est retiré, les cellules sont rincées deux fois avec du tampon phosphate (Phosphate buffered saline, PBS) et les ARN sont extraits.



Culture de cellules gliales de Müller avant traitement

Figure 25 : Cultures de cellules gliales de Müller avant traitement

B. Cultures mixtes de cellules rétiniennes

La technique de mise en culture des cellules rétiniennes de souris a été adaptée de celle décrite par Jing et coll. (1996) et Fintz et coll. (2003). Les cultures sont élaborées à partir de souris sauvages de 8 jours. Immédiatement après le sacrifice des animaux, les rétines sont disséquées, séparées de l'épithélium pigmentaire adjacent et coupées en fragments de 2 mm² dans du milieu CO₂-indépendant. Les rétines sont ensuite incubées dans de la papaïne activée (2 U/ml, Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, NJ) pendant 20 minutes à 37 °C. La réaction enzymatique est stoppée grâce à l'addition de milieu [Neurobasal + 10% FCS + 33 U/ml DNase (Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, NJ)], la DNase permettant de désagréger les "clumps" formés par la libération d'ADN par les cellules mortes. Les cellules sont ensuite dissociées à l'aide d'une pipette Pasteur rodée à la flamme et centrifugées pendant 5 minutes à 7 g (800 tours/minute) Après centrifugation, le culot contenant les cellules dissociées est re-suspendu dans du milieu [Neurobasal + B27 1/50^{ème} (v/v) + 2 mM L-glutamine] et les cellulesensemencées à faible densité (2,5 x 10⁵ cellules/cm²) dans des boîtes pré-traitées à la poly-D-lysine et la laminine afin de permettre leur adhésion au support.

C. Explants rétiniens

Les souris *rdl* sont sacrifiées à 15 jours (J₁₅). Les rétines sont immédiatement disséquées et séparées de la sclère et de l'épithélium pigmentaire sous microscope stéréoscopique. Les explants rétiniens sont ensuite cultivés dans un milieu chimiquement défini permettant la survie des neurones rétiniens (CDM, Chemically Defined Medium, 1,5 ml/rétine) en l'absence (yeux gauches) ou la présence (yeux droits) de GDNF (50 ng/ml). Le CDM est composé de DMEM supplémenté avec 5 µg/ml insuline, 5 µg/ml transferrine, 6,36x10⁻⁵ mM progestérone, 0,1 mM putrescine, 5 ng/ml sodium sélénite, 3 mM taurine,

2,7x10⁻³ mM cytidine 5'-diphosphoethanolamine, 5,2x10⁻³ mM cytidine 5'-diphosphocholine, 0,55 M hydrocortisone, 2,9x10⁻³ mM 3-3'-5-triiodo-L-thyronine, 1 mM sodium pyruvate, 3,1x10⁻⁴ mM prostaglandine D₂, 10 U/ml pénicilline et 10 µg/ml streptomycine. Les explants sont maintenus à 37 °C dans un incubateur humidifié avec un taux de CO₂ réglé à 5%. Après 48 heures d'incubation, le milieu est retiré et les protéines extraites. Les niveaux d'expression protéique des yeux droit (GDNF) et gauche (contrôle) sont comparés pour chaque animal.

D. Problèmes de stabilité du GDNF

Au cours de nos expériences utilisant le GDNF nous avons rencontré de nombreuses difficultés. En effet, nos résultats n'étaient pas reproductibles d'une expérience à une autre, nous obligeant ainsi à multiplier, pendant plus d'une année, les modèles d'expérimentation : *in vitro*, *ex vitro* et *in vivo*. Après avoir remis en cause toutes les étapes de nos protocoles, nous avons été conduits à analyser en spectrométrie de masse (MALDI®) le contenu de tubes achetés dans le commerce et " fraîchement " livrés. Il s'est avéré que les tubes ne contenaient plus aucune trace de GDNF mais renfermaient des produits de dégradation. Alarmés par cette constatation, nous avons changé de fournisseur et nous sommes procurés du GDNF chez Peprtech® sur les recommandations du Christopher Henderson (Unité Inserm U382, Marseille) qui avait rencontré des problèmes similaires avec le GDNF commercial. Nous avons eu les mêmes problèmes avec ce GDNF " Peprtech® ", ainsi qu'avec un troisième produit par R&D Systems®. Nous avons donc décidé de confirmer les résultats que nous avons obtenus *in vivo* et que nous n'arrivions plus à reproduire, par des analyses *ex vitro* en développant un système de co-cultures associant des explants *rdl* cultivés en milieu conditionné à des cellules COS-1 transfectées synthétisant du GDNF. Les concentrations en GDNF étaient secondairement déterminées à l'issue des 48 heures de co-cultures par technique ELISA (voir paragraphe V-D). Après avoir obtenu la confirmation de l'induction de l'expression de GLAST par GDNF grâce à ce système de co-cultures, nous avons voulu le reproduire *in vivo*. Ne pouvant faire synthétiser par les cellules COS-1 une solution de GDNF suffisamment concentrée pour être administrée par injection sous-rétinienne *in vivo*, nous avons ajouté une nouvelle étape à notre protocole consistant à tester par ELISA le contenu de chaque aliquot de GDNF avant toutes les injections. L'état de conservation du GDNF injecté

étant alors assuré, nous avons enfin réussi à reproduire tous les résultats que nous avons obtenus auparavant.

E. Culture d'une lignée cellulaire : les cellules COS-1

La lignée de cellules COS-1 a été développée à partir d'une lignée de fibroblastes de rein simiesque (singe vert d'Afrique ou *Cercopithecus aethiops*) transformée par un virus simiesque SV40 mutant (i.e. dépourvu de son origine de réplication) codant pour l'antigène T. Des aliquots de cellules COS-1, provenant d'une culture à confluence et congelés dans l'azote liquide (dans une solution de sérum contenant 9% de DMSO), sont décongelés à température ambiante, puis repris dans du [DMEM + 10% FCS], dissociés à l'aide d'une pipette Pasteur rodée à la flamme et ensemencés dans des flasques à la densité de $3,5 \cdot 10^5$ cellules/ml. Les flasques sont maintenues à 37 °C, dans un incubateur humidifié avec 5% de CO₂. A ~ 70% de confluence, le surnageant est retiré, les cellules rincées avec du PBS puis trypsinisées (trypsine 0,05%, 2 minutes, 37 °C), dissociées et re-ensemencées à la densité de $3,5 \cdot 10^5$ cellules/ml dans du [DMEM + 10% FCS] à 37 °C.

F. Transfection d'ADN

Des problèmes de stabilité du GDNF recombinant acheté dans le commerce nous ont amenés à vérifier nos résultats avec du GDNF produit par transfection transitoire d'un plasmide d'expression dans les cellules COS-1. Pour cela, un plasmide d'expression a été préparé en insérant les régions codantes du GDNF murin dans le vecteur pcDNA3 (Invitrogen, Carlsbad, CA).

Pour réaliser la transfection transitoire des cellules COS-1 avec pcDNA-GDNF (ou le contrôle pcDNA3), les cellules sont ensemencées dans une flasque la veille de telle façon que

la confluence estimée soit de 70-80% le lendemain. Le jour de la transfection, les cellules COS-1 sont trypsinisées puis re-ensemencées dans des plaques de 12 puits à la densité de $3,5 \cdot 10^5$ cellules/ml dans du [DMEM + 10% FCS] à 37 °C. Pendant ce temps, le mélange de transfection est réalisé dans un tube stérile en déposant dans l'ordre et par puits : 18,8 µl de tampon CaCl_2 1M, 46,2 µl d'eau stérile puis 10 µl d'ADN à la concentration de 0,1 µg/µl (soit 1 µg). L'ensemble est vigoureusement agité. Puis 150 µl de BBS 2X (constitué de [4,3 mM BES + 280 mM NaCl + 1,3 µM NaHPO_4]) sont ajoutés. L'ensemble est mélangé par inversion à température ambiante (Chen et Okayama, 1987). 2 heures 15 après le repiquage des cellules COS-1, le mélange de transfection est ajouté goutte à goutte au [DMEM + 10% FCS] qui baigne les cellules COS-1, puis l'ensemble est homogénéisé par mouvements horizontaux circulaires et laissé à l'étuve à 37°C sous une atmosphère de 5% en CO_2 . Les cellules en culture phagocytent l'ADN présent sous forme d'un précipité de phosphate de calcium/ADN et le transportent jusqu'au noyau par l'intermédiaire de vésicules. Le précipité apparaît au bout de 30 minutes d'incubation à 37 °C sous forme de fines particules soumises à des mouvements browniens autour des cellules COS-1. Les cellules sont laissées toute la nuit dans l'incubateur à 37 °C - 5% CO_2 . Le lendemain (J_2), les cellules sont lavées 2 fois avec du DMEM puis les cellules sont incubées à 37 °C dans du DMEM seul. Au bout de 48 heures (J_4), les surnageants sont retirés, immergés dans l'azote liquide et conservés à - 80 °C.

Un témoin de transfection permet de visualiser et de quantifier l'efficacité de la transfection. Pour cela on co-transfecte un vecteur d'expression contenant le gène de la β -galactosidase (CMV- β Gal). 24 heures après la transfection (J_3), les cellules sont rincées avec du PBS, fixées dans un mélange glutaraldéhyde/formaldéhyde pendant 10 minutes puis incubées dans une solution contenant du X-Gal, substrat de la β -galactosidase, qui, une fois métabolisé, donne un produit bleu facilement identifiable sous microscope à contraste de phase. L'efficacité de transfection obtenue était en moyenne de 50% (Fig. 26)

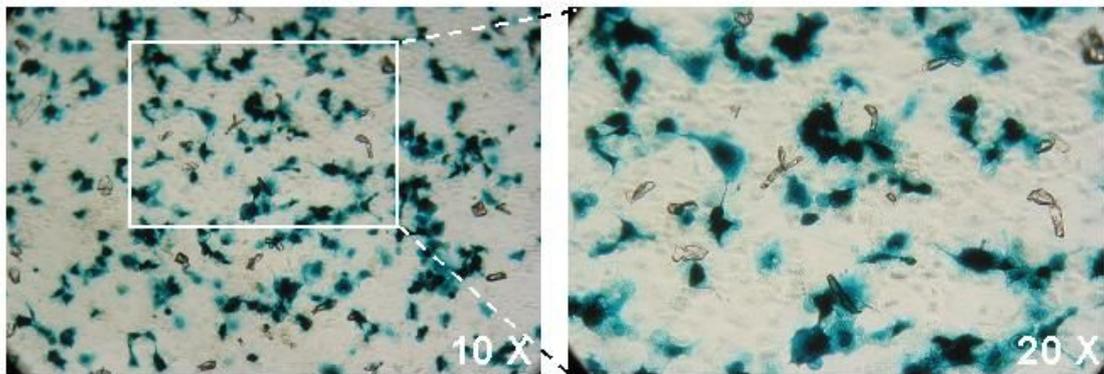


Figure 26. Témoin de transfection permettant la visualisation l'efficacité de la transfection.

Le GDNF contenu dans le surnageant de transfection est ensuite quantifié par technique ELISA (voir paragraphe V-D).

G. Co-cultures

Afin de vérifier les résultats obtenus sur les explants avec du GDNF “ commercial ”, nous avons réalisé des co-cultures d’explants de souris *rd1* avec des cellules COS-1ensemencées dans des plaques de 12 puits et fraîchement transfectées avec le plasmide pcDNA-GDNF. Dans ce cas, le lendemain de la transfection (J₂ du protocole, voir paragraphe précédent) le précipité est lavé 2 fois avec du DMEM, puis les cellules sont incubées à 37 °C, non pas dans du DMEM seul, mais dans 2 ml de CDM (voir paragraphe II-C) qui permet la survie des neurones rétiniens. Les souris *rd1* âgées de 15 jours sont alors sacrifiées, les rétines immédiatement disséquées sous microscope et placées individuellement dans des inserts pourvus d’une membrane semi-perméable (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) immergés dans le surnageant de cellules COS-1. Au bout de 48 heures (J₄), les explants sont récupérés et les protéines extraites.

III. TECHNIQUES D’EXPERIMENTATION *IN VIVO*

A. Mise au point d’un système d’injection sous-rétinienne de GDNF



Figure 27. Injection sous-rétinienne chez une souris *rd1* de 15 jours.

Le GDNF est injecté chez des souris *rdl* à J₁₅. Les souris sont anesthésiées par injection intra-péritonéale d'etomidate (0,5 mg/ml ; Janssen-Cilag, Boulogne-Billancourt, France) et de midazolam (0,5 mg/ml ; Roche, Neuilly-sur-Seine, France). Le GDNF, sous forme lyophilisée, est solubilisé dans du PBS stérile à la concentration de 330 ng/μl. 1μl de GDNF est injecté avec une micro-seringue de 10 μl (Unimetrics, Folsom, CA), un micro-injecteur (UltraMicroPump II-Micro 4, World Precision Instruments, Sarasota, FL) et une aiguille de 30 ½ gauge. Sous visualisation stéréo-microscopique (Microscope opératoire Zeiss, Allemagne), l'œil est immobilisé avec une pince de Troutman et l'aiguille est insérée en arrière du limbe, à travers la sclère (presque tangentiellement à cette dernière) en direction du pôle postérieur dans l'espace sous-rétinien (Fig. 27). 1μl de PBS est injecté dans l'œil adelphe pour servir de contrôle. 48 heures après l'injection, les rétines droite et gauche de chaque animal sont comparées.

B. Administration de CNQX, NBQX, véhicule (solubilisation, abaque, courbe de poids)

Les antagonistes des récepteurs ionotropiques au glutamate testés sont le 6-cyano-2,3-dihydroxy-7-nitro-quinoline (CNQX, formule chimique : $C_9H_4N_4O_4$) et le 1,2,3,4-Tetrahydro-6-nitro-2,3-dioxobenzol[f]quinoline-7-sulfonamide (NBQX, formule chimique : $C_{12}H_8N_4O_6S$). Le CNQX et le NBQX, achetés sous forme de sels afin de faciliter leur solubilisation (CNQX sodium salt et NBQX disodium salt), sont repris en conditions stériles dans du sérum physiologique à 9 ‰ (véhicule) à une concentration de 15 mM, puis aliquotés et conservés à l'obscurité et à 4 °C jusqu'à utilisation. Avant chaque utilisation, un aliquot est ramené à température ambiante, vigoureusement vortexé et brièvement immergé dans un bain à ultra-sons afin de bien solubiliser les sels. Les individus de chaque portée *rdl* sont numérotés à la naissance de manière à les identifier. Pour chaque portée traitée, une moitié de la fratrie reçoit le véhicule, l'autre l'antagoniste testé. En tout, 9 portées ont été traitées, soit 64 animaux.

En raison d'une forte mortalité observée après l'administration des antagonistes glutamatergiques (notamment avec le NBQX), des abaques fixant le volume exact de CNQX ou de NBQX à injecter en fonction du poids ont été élaborés. Un pesage systématique de chaque animal est donc nécessaire avant son traitement quotidien. Ces courbes de poids nous ont permis ainsi d'améliorer la durée de survie des animaux et de suivre leur tolérance au traitement, une perte de poids observée d'un jour à un autre étant systématiquement associée à la mort de l'animal à très courte échéance.

Poids de l'animal	CNQX (injection pour 30mg/kg) C=15mM	NBQX (injection pour 30mg/kg) avec C=15mM	NBQX (injection pour 30mg/kg) avec C=7.5mM
1g	7,25 µl	5,26 µl	10,52 µl
2g	14,5 µl	10,52 µl	21,04 µl
3g	21,75 µl	15,78 µl	31,56 µl
4g	29 µl	21,04 µl	42,08 µl
5g	36,2 µl	26,30 µl	
6g	43,46 µl	31,56 µl	
7g	50,7 µl	36,82 µl	
8g	58 µl	42,08 µl	
9g	65,2 µl	47,34 µl	
10g	72,43 µl	52,6 µl	
11g	79,7 µl	57,86 µl	
12g	87 µl	63,124 µl	
13g	94,17 µl	68,38 µl	
14g	101,41 µl	73,64 µl	
15g	108,65 µl	78,9 µl	

Table 2. Volume d'antagoniste glutamatergique administré en fonction du poids.

Les souris *rdl* sont injectées à l'aide d'une seringue à insuline de 1 ml et d'une aiguille de 30 ½ gauge. La dose d'antagoniste administrée est fixée à 30 mg/kg/j (Sheardown et coll., 1990; Sugaya K et de Groat, 1994) et les animaux reçoivent, soit l'antagoniste, soit le volume correspondant de véhicule. L'injection est réalisée en fosse iliaque gauche, en intra-péritonéal. Les souris sont traitées quotidiennement de J₃ à J₂₁. Les tests opto-moteurs sont réalisés à J₂₁. L'ERG est effectué à J₂₂ après 24 heures d'adaptation à l'obscurité. Les rétines sont ensuite immédiatement récupérées.

IV. BIOLOGIE MOLÉCULAIRE

A. Purification des ARN

Deux techniques différentes ont été utilisées :

- Les ARN de cultures cellulaires ont été purifiés en utilisant un kit Qiagen Rneasy Kit (Qiagen, Valencia, CA) et en suivant le protocole recommandé par le fournisseur.
- Les ARN de rétines ont été purifiés sur gradient de césium (d'après Glissin et coll., 1974). Immédiatement après dissection, les rétines sont immergées dans 2,4 ml d'hydrochlorure de guanidine 6 M et homogénéisées à l'aide d'un Polytron. Il s'agit d'un agent dénaturant puissant des protéines qui n'interagit pas avec les acides nucléiques (Cox, 1968). Il assure donc une bonne protection des ARN contre la dégradation par les ribonucléases endogènes. 270 μ l d'acétate de potassium 2 M ajusté à pH 5 sont ajoutés à la solution, le tout étant agité vigoureusement à l'horizontale pendant 10 minutes. Cette étape permet de séparer les acides nucléiques des protéines. 5,3 ml de tampon [100 mM Tris HCl pH 8 + 1% N-Laurylsarcosine] sont ajoutés à ce mélange ainsi que 3,2 g de chlorure de césium. Après dissolution du chlorure de césium, la solution est déposée délicatement sur 1,8 ml d'une solution de [5,6 M chlorure de césium + 0,1 M EDTA pH 8] dans un tube d'ultracentrifugation autoclavé. Les ARN sont alors purifiés par centrifugation pendant 24 heures à 12 000 g (32 000 tours/minute) dans un rotor SW41 sur ce gradient préformé. Les ARN possèdent une densité de flottaison supérieure à la concentration maximum d'une solution de chlorure de césium ($\rho = 1.91 \text{ g/cm}^3$), ils seront donc culottés au fond du tube et séparés de l'ADN ($\rho = 1.7 \text{ g/cm}^3$). Après aspiration délicate de la solution et rinçage du fond du tube avec 160 μ l de chlorure de guanidine 6 M, le précipité d'ARN est repris dans 330 μ l de [10mM Tris HCl pH 7,5 + 1 mM EDTA + 0,05% SDS]. Puis on rajoute 1/10 de volume d'acétate de sodium 3 M pH 5 et les ARN sont précipités par deux volumes d'éthanol glacial, conservés pendant 30 minutes à $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ et centrifugés 30 minutes à 2500 g (15 000 tours/minute) à $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Le tube est rincé deux fois à l'éthanol 70%, brièvement centrifugé et séché. Le culot d'ARN est alors repris dans 30 μ l d'eau ultra-pure RNase & DNase-free (Invitrogen, Carlsbad, CA).

La concentration et la pureté de la préparation d'ARN sont évaluées par mesure de la densité optique (DO). Les préparations d'ARN ont conservées à $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Le profil des ARN est évalué par électrophorèse en conditions dénaturantes. L'agent dénaturant utilisé est le formaldéhyde (Lehrach et coll., 1977). Pour éviter la dégradation des ARN, les appareils d'électrophorèse, ainsi que tout le matériel utilisé, sont préalablement placés pendant 10 minutes dans une solution de 3% de peroxyde d'hydrogène puis rincés à l'éthanol absolu. Un gel d'agarose 1% est coulé et immergé dans le tampon de migration suivant [9 mM d'hydrogénophosphate disodique + 1 mM de dihydrogénophosphate de sodium + 2,2 M de formaldéhyde]. Les échantillons (5 à 10 μg) sont dénaturés par chauffage (15 minutes à $65\text{ }^{\circ}\text{C}$) en présence de [13,3 M formamide + 2,2 M formaldéhyde + 9 mM d'hydrogénophosphate disodique + 1 mM de dihydrogénophosphate de sodium], puis placés sur glace. Chaque échantillon est ensuite complété par $\frac{1}{4}$ de tampon de chargement [11,1 M formamide + 5,4 M glycérol + 0,1 $\mu\text{g/ml}$ bromure d'éthidium]. L'électrophorèse s'effectue pendant 1 heure sous une tension de 80 Volts. Le gel est ensuite rincé dans un bain de 2 x SSC puis analysé sous ultraviolets. La présence de deux bandes nettes correspondant aux ARN ribosomiaux 28 S et 18 S (S pour Svedberg) indique que les ARN de la préparation ne sont pas dégradés.

B. Oligonucléotides de synthèse

Les amorces oligonucléotidiques ont été déterminées avec le logiciel Infobiogen®, en utilisant les numéros d'accèsion ("accession number") de la base de données Genbank®. Les amorces utilisées figurent dans la Table 3.

	Forward (1) and reverse (2) primer sequences	Température d'hybridation (°C)	Taille du produit (bp)	Accession number (GenBank)	Application
ABCR	1: ACTTCACCCTCTACCTACCACAC 2: GAACCAACCTTCACCACCAAGCC	57	355	AF000149	Standard RT-PCR (Fig. 41D)
β-actin	1: AAAGACCTCTATGCCAACACAG 2: AAAGAAAGGGTGTAAAACGCAG	57	296	M12481	Standard & real time RT-PCR (Fig. 41D)
GDNF	1: ACCAGATAAACAAAGCGGCAG 2: TCAGATACATCCACACCGTTTAG	60	402	XM122804	Real time RT-PCR (Fig. 44)
GFRa-1	1: GCAAGGAAACCAACTTCAGC 2: TCGTATGGGGAATCTTCCAG	54	202	AF014117	Real time RT-PCR (Fig. 41A)
GFRa-1	1: GAAGATTCCTCATACGAGCC 2: TGCCAATCAGTCCCAGTAG	60	535	AF014117	Standard RT-PCR (Fig. 41D)
GFRa-2	1: CCTGAACGACAACGCAAGA 2: CAGTTGGGCTTCTCCTTGTCT	50	246	AF002701	Real time RT-PCR (Figure 41B)
GLAST	1: GAAGGGGAGGCAACCTGAAATGAG 2: AAGGGGGAGTGGGAAAATGAAAA	56	287	D63816	Standard RT-PCR (Fig. 41D)
GLAST	1: GAAAGTCTCCAGACGTTCTAATCC 2: GCTCTGAAACCGCCACTTACTATC	58	303	D63816	Real time RT-PCR (Fig. 38A, Fig. 42)
GLT-1	1: ATGCTCATCCTCCTCTTATCATC 2: CTTTCTTTGTCACTGTCTGAATCTG	56	313	AB007810	Real time RT-PCR (Fig. 38B)
GS	1: TGTACCTCCATCCTGTTGCC 2: GTCCCCGTAATCTTGACTCC	56	349	U09114	Real time RT-PCR (Fig. 39A)
RET	1: ATCCACACCTTCGACTCAC 2: AACCCAGTGTAGTGCCATC	54	201	AF209436	Real time RT-PCR (Fig. 41C)
RET	1: AGTATGCCAAGTATGGCTCTGTG 2: ACTCCAAGGACCAACATCAC	60	403	AF209436	Standard RT-PCR (Fig. 41D)
rod arrestin	1: CTATTACGTCAAGCCTGTAGCC 2: CATCCTCATCTTCTTCCCTTC	56	434	M24086	Real time RT-PCR (Fig. 35B)
vimentin	1: TTTTGCCCTTGAAAGCTGCTAAC 2: TCACCTGTCCATCTCTGTCTC	56	314	M26251	Real time RT-PCR (Fig. 39B)

Table 3. Oligonucléotides de synthèse utilisés

C. Reverse transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

1. Transcription inverse

Les ADNc sont synthétisés par transcription inverse en utilisant des amorces aléatoires. Ainsi 2,5 µg d'ARN purifiés sont chauffés à 65°C pendant 5 minutes puis incubés pendant 2 heures à 37 °C dans une solution de réaction d'un volume final de 50 µl contenant 10 mM dithiothreitol, 0,5 mM dNTPs (N = A, T, G et C), 2.5 µg d'amorces aléatoires (pdN₆), 40 U Rnasin (Promega, Madison, WI), 1000 U de Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA). 2 heures après, la réaction est arrêtée par immersion des échantillons dans la glace. Les ADNc sont extraits par adjonction de 100 µl de phénol/chloroforme/alcool isoamylique pH 8 (24/25/1 ; v/v/v), puis précipités à l'éthanol glacial. 0,2 µl de ADNc sont utilisés pour chaque réaction de PCR.

2. PCR “ classique ”

Les réactions de PCR “ standards ” comprennent, outre les 0,2 µl d'ADNc, 260 µM dNTPs, 2 µM de chaque oligonucléotide, 2,5 U de Taq polymérase (Invitrogen, Carlsbad, CA) dans un volume final de 25 µl. L'amplification est réalisée avec un appareil RoboCycler-Gradient-96 (Stratagene) dans les conditions suivantes : dénaturation initiale à 95 °C pendant 5 minutes, puis 35 cycles de dénaturation (95 °C pendant 30 secondes) – hybridation pendant 30 secondes (voir températures d'hybridation des amorces dans la Table 3) – élongation (72 °C pendant 1 minute), et enfin élongation finale à 72 °C pendant 3 minutes. Les produits de PCR (10 µl/puits) sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose 1,2% contenant 0,5 µg/ml de bromure d'éthidium, visualisés sous ultraviolets et quantifiés grâce au logiciel Phoretix 1D image analysis software (Phoretix International, Newcastle-upon-Tyne, Royaume Uni).

3. PCR semi-quantitative en temps réel

Les PCR semi-quantitatives en temps réel sont réalisées sur un appareil LightCycler® (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN) en utilisant du SYBR Green I® qui permet la détection en fluorescence de l'ADN double brin. La réaction de PCR s'effectue dans un volume final de 20 µl contenant 0,2 µl d'ADNc, 3,5 mM de chlorure de magnésium, 2,8 mM de chaque amorce et 1x PCR LcDNA master SYBR Green I® (Roche Molecular Biochemicals, Meylan, France). Les conditions d'amplification sont les suivantes : dénaturation initiale à 95 °C pendant 2 minutes, puis 40 cycles de dénaturation (95 °C instantanée) – hybridation des amorces pendant 5 secondes (voir températures d'hybridation des amorces dans la Table 3) – élongation (72 °C pendant 15 secondes). Une étape dite de “ fusion ” est associée. Cette étape permet de caractériser le produit de PCR obtenu à l'issue de l'amplification. Le point de fusion de chaque fragment est fonction de sa longueur et du nombre de “ G/C ” qu'il contient. Ainsi, la détermination de la température de fusion, ou T_m (pour melting temperature), de chaque amplicon permet de l'identifier. Cette étape de fusion comprends trois temps : dénaturation à 95 °C pendant 2 minutes afin de dénaturer tous les ADN, refroidissement en dessous de la température d'hybridation du fragment considéré (65 °C) pendant 2 minutes, puis augmentation progressive de la température jusqu'à 95 °C (0,1 °C/seconde) pour visualiser l'instant “ T_m ” où l'ADN double brin fusionne.

Toutes les réactions sont réalisées en triplicate. Pour chaque échantillon, l'expression des gènes d'intérêt est normalisée par rapport à celle du gène de ménage ubiquitaire β -actine.

V. IMMUNOHISTOCHEMIE & BIOCHIMIE

A. Immunomarquage en fluorescence

Les yeux sont fixés dans du [paraformaldéhyde 4%, PBS] pendant 6 heures à 4 °C puis

inclus en paraffine ou cryocongelés en “ OCT ” (ornithine carbamyl transferase). Des coupes transversales de 6 μm (paraffine) ou 8 μm (OCT) sont réalisées. Les coupes sont perméabilisées pendant 15 minutes avec du [Triton X-100 0,1%, PBS]. Les sites de fixation non spécifiques sont saturés par immersion dans une solution de blocage pendant 1 heure (voir Table 4) ; les coupes sont enfin incubées la nuit à 4 °C avec l’anticorps primaire (voir Table 4).

Table 4. Anticorps primaires utilisés.

Anticorps primaires utilisés	Type	Références	Dilution	Solution de blocage
GLAST	Cochon d'Inde polyclonal	Chemicon International (Temecula, CA) # AB1782	1:4000	BSA 3%, PBS, Tween 20 0,1%
Kir4.1	Lapin polyclonal	Alomone Labs (Jérusalem, Israël) # APC-035	1:200	BSA 3%, PBS, Tween 20 0,1%
Rho4-D2	Souris monoclonal	don de David Hicks	1:50	BSA 0.1%, PBS, Tween 20 0,1%
RET	Chèvre polyclonal	R&D Systems (Minneapolis, MN) # AF482	1:20	5% sérum de cheval, PBS, Tween 20 0,1%
RET	Lapin polyclonal	Santa Cruz Biotechnologies (Santa Cruz, CA) # sc-187	1:20	BSA 3%, PBS, Tween 20 0,1%
RET	Lapin polyclonal	don de Dane S Worley (Biogen, Inc., Cambridge, MA) # 1429	1:150	5% sérum de cheval, PBS, Tween 20 0,1%
GFRalpha-1	Chèvre polyclonal	R&D Systems # AF560	1:20	5% sérum de cheval, PBS, Tween 20 0,1%
GFRalpha-1	Chèvre polyclonal	Santa Cruz Biotechnologies (Santa Cruz, CA) # sc-6157	1:20	BSA 3%, PBS, Tween 20 0,1%
GFRalpha-1	Lapin polyclonal	don de Dane S Worley (Biogen, Inc., Cambridge, MA) # 1371	1:350	5% sérum de cheval, PBS, Tween 20 0,1%

Après 5 rinçages avec du [PBS, Tween 20 0,1%, BSA 0,1%], les coupes sont incubées pendant 1 heure à température ambiante avec l’anticorps secondaire approprié, couplé à un fluorochrome (Alexa Fluor® 488 ou Alexa Fluor® 594, 1:1000; Molecular Probes, Leiden, Netherlands).

Après 5 rinçages, les coupes sont montées entre lame et lamelle avec du FluorSave®.

Les contrôles réalisés comprennent l'omission de l'anticorps primaire, et la pré-absorption de l'anticorps primaire avec le peptide correspondant. Les images sont prises avec un microscope confocal (TCS-SP Leica microscope ; Leica Microsystems Inc., Bannockburn, IL) à l'objectif 40 X (plan apo ; NA = 1,25). Des paramètres et un temps d'exposition identiques ont été utilisés pour toutes les acquisitions.

B. Montage des rétines à plat et comptages cellulaires

La détermination précise et reproductible du nombre de bâtonnets non dégénérés à l'issue des différents traitements (antagonistes des récepteurs du glutamate ou contrôle) est essentielle afin de pouvoir mesurer un effet neuroprotecteur potentiel. Plutôt que de mesurer la survie des bâtonnets à partir de coupes transversales (en nombre forcément limité), nous avons opté pour le marquage des rétines entières puis leur mise à plat afin de réaliser un comptage cellulaire sur l'ensemble de chaque rétine.

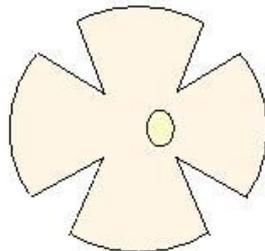
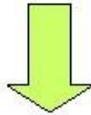
1. Marquage et montage à plat des rétines

Les rétines d'animaux traités et leurs contrôles sont fixées pendant 12 heures dans du [paraformaldéhyde 4%, PBS], rincées dans du PBS, perméabilisées pendant 5 minutes avec du [Triton X-100 0,1%, PBS], saturées pendant 1 heure dans du [BSA 0,1%, Tween 20 0,1%, PBS], puis incubées 2 heures durant à température ambiante avec un anticorps monoclonal anti-souris dirigé contre l'opsine des bâtonnets (Rho4D2, 10 μ g/ μ l, don de David Hicks). Après rinçages, les rétines sont incubées pendant 1 heure à température ambiante avec un anticorps secondaire anti-souris couplé au fluorochrome Alexa Fluor® 594.

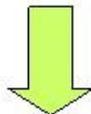
Enfin, pour chaque rétine, quatre incisions radiales sont réalisées sous microscope, permettant son montage à plat entre lame et lamelle “ photorécepteurs orientés vers le haut ”. Afin d'éviter que les rétines ne soient écrasées, des cales sont insérées entre les lames et les lamelles, l'espace résiduel étant comblé par du FluorSave® (Fig. 28).



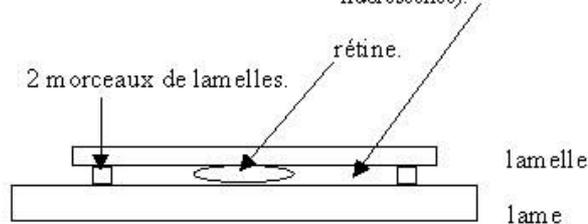
**Dissection des rétines
+
Fixation des tissus
+
Immuno-marquage dirigé contre
la rhodospine**



**Réalisation de
4 incisions radiales**



Introduction de PBS glycérol ou de
FluorSave® Reagent (conserve la
fluorescence).



**Montage à plat
entre lame et lamelle**

Figure 28. Technique de montage à plat des rétines marquées

Après dissection et marquage, quatre incisions radiales sont réalisées sous microscope, permettant le montage à plat des rétines entre lame et lamelle « photorécepteurs orientés vers le haut ». Afin d'éviter que les rétines ne soient écrasées, des cales sont insérées entre les lames et les lamelles, l'espace résiduel étant comblé par du FluorSave® Reagent.

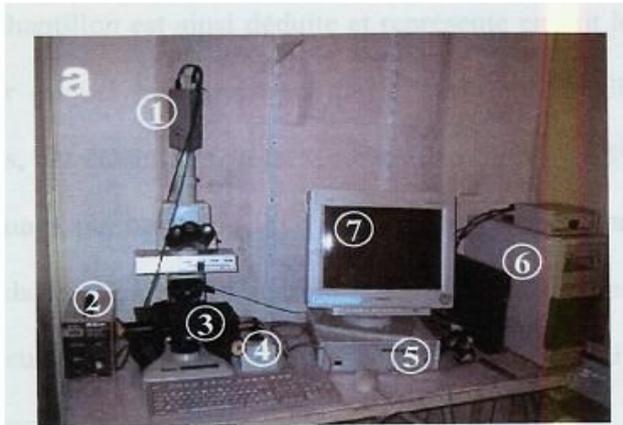
2. Comptages stéréologiques

L'évaluation du nombre de bâtonnets sur rétine à plat est rendue possible car, à l'âge où les souris *rdl* sont sacrifiées (J_{22}), elles ne présentent qu'une monocouche de bâtonnets et, de ce fait, il n'y a pas de problème de superposition de cellules marquées. Néanmoins, parcourir la surface entière d'une seule rétine au microscope à fort grossissement représente des comptages sur des milliers de champs, des centaines de milliers de cellules. Malgré l'exactitude des valeurs que fournirait cette méthode, elle ne pouvait être envisagée dans nos protocoles en raison des délais extrêmement longs qu'elle requérait. Nous avons donc réalisé les comptages cellulaires en utilisant la technique de comptage stéréologique mise au point dans notre laboratoire par Saddek Mohand-Saïd (Mohand-Saïd et coll., 1998 ; Frasson et coll., 1999b). Grâce à un échantillonnage randomisé, cette technique permet de déterminer un nombre de champs représentatifs de l'ensemble de la surface rétinienne et ainsi d'extrapoler avec fiabilité les résultats obtenus sur la surface comptée à l'ensemble de la rétine. 121 champs répartis de façon pseudo-aléatoire ont ainsi été analysés pour chaque rétine (Fig. 29).

C. Extraction des protéines et analyse en Western blot

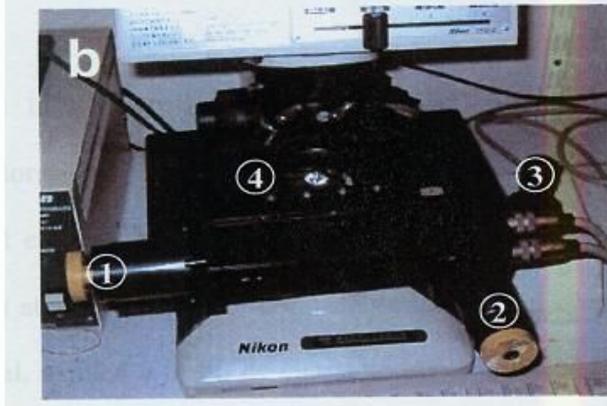
1. Extraction des protéines

Les yeux sont énucléés et les rétines rapidement disséquées sur glace dans du PBS stérile. Les rétines sont soniquées dans un tampon d'extraction composé de 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 mM PMSF (Phenylmethylsulfonyl fluoride), 1 mM EDTA, 1 mM dithiothreitol, 1% Triton X-100, 1x inhibiteurs de protéase Sigma (comprenant : 4-(2-aminoethyl) benzenesulfonyl fluoride, E-64, bestatine, leupeptine et aprotinine), 45 µg/ml TLCK (**N_a-Tosyl-L-lysine chloromethyl ketone hydrochloride**), 1 mM fluorure de sodium et 1 mM orthovanadate de sodium (ces deux derniers étant des inhibiteurs de phosphatases). Les concentrations en protéines sont estimées par technique de Bradford puis les échantillons protéiques plongés dans l'azote liquide et conservés à - 80 °C jusqu'à analyse.



a : Vue d'ensemble de l'équipement

- Caméra vidéo CCD
- Alimentation et contrôle des lampes à fluorescence
- Platine motorisée
- Manette de contrôle de la platine motorisée
- Moteur de la platine
- Unité centrale, contrôle de la caméra et de la platine motorisée
- 7. Moniteur vidéo



b : Agrandissement de la platine motorisée

1. Contrôle manuel des déplacements dans l'axe des « x »
- Contrôle manuel des déplacements dans l'axe des « y »
- Manette de contrôle électronique des déplacements
4. Porte lames

D'après Mohand-Saïd S. Neuroprotection des photorécepteurs à cônes dans les rétinas pigmees. Thèse 2001, Université Louis Pasteur.

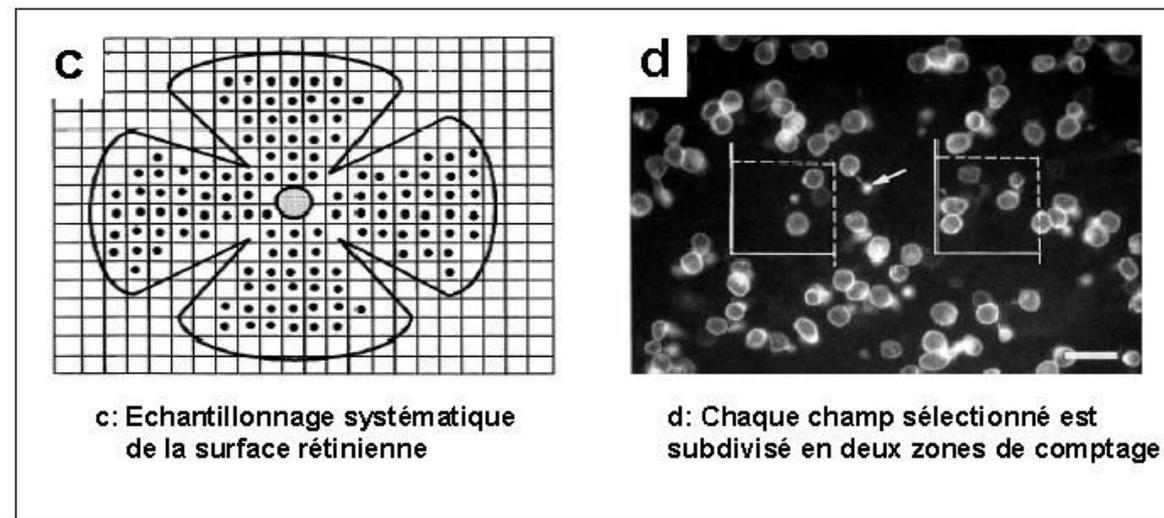


Figure 29. Comptages stéréologiques. Equipement et technique.

2. Western blots

Les échantillons sont dilués de manière isovolumique dans un tampon (concentrations finales: 10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA, 20 mM dithiothreitol, 3% SDS, 10% glycerol, 0.1% bleu de bromophénol, 4 M urée) et chauffés à 50 °C pendant 45 minutes. Les protéines (10 µg/puits) sont séparées sur un gel d'électrophorèse 10% SDS-PAGE contenant 4 M d'urée, puis transférées sur membranes de nitrocellulose. Les membranes sont immergées 12 heures dans un tampon de blocage [0,1% Tween 20, 3% lait et 5% sérum de cheval, PBS] à 4 °C, puis incubées avec l'anticorps polyclonal anti-GLAST (1:15 000) pendant 2 heures à température ambiante. Après rinçages, les membranes sont incubées avec l'anticorps secondaire approprié couplé à la peroxydase (1:15 000; Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA) pendant 1 heure à température ambiante. La fixation des anticorps est visualisée en utilisant le kit Enhanced Chemiluminescence detection system (ECL+; Amersham, Arlington Heights, IL) selon les instructions du fabricant. Pour s'assurer que la quantité de protéines déposée dans chaque puits est identique, les membranes sont décapées et incubées avec un anticorps monoclonal dirigé contre une protéine ubiquitaire : l'alpha-tubuline (1:500; T5168, Sigma, Saint Louis, MO). De manière alternative, un gel identique est réalisé en parallèle puis coloré avec du Coomassie. L'intensité des bandes visualisées est quantifiée par le logiciel Phoretix 1D.

D. Quantification du GDNF par méthode “ sandwich ” ELISA immunométrique

Cette quantification est réalisée avec un kit “ *GDNF Emax ImmunoAssay System* ” (Promega, Madison, MI) en suivant les recommandations du fournisseur. Dans un premier temps, une plaque 96-puits (Maxisorp®, Nunc, Danemark) est "coatée" (recouverte) avec un anticorps monoclonal dirigé contre la protéine GDNF pendant une nuit entière à 4°C. Le lendemain, les sites aspécifiques sont bloqués pendant une heure. Les standards, les contrôles (positif et négatif), et les échantillons sont ensuite déposés dans les différents puits et la plaque incubée pendant 6 heures à température ambiante. Après lavages, on ajoute un anticorps polyclonal de poulet dirigé contre GDNF et on laisse la plaque incuber pendant une nuit à 4 °C. Le troisième jour, l'addition d'un anticorps anti-poulet couplé à la peroxydase, puis du substrat de la peroxydase donne une réaction colorée en bleu qui vire au jaune après

adjonction d'acide chlorhydrique (Fig. 30). La quantification se fait dans un lecteur de plaque (modèle 680 Bio-Rad) par mesure de l'absorbance à 450 nm dans les différents puits.

VI. QUANTIFICATION DES ACIDES AMINES “ LIBRES ” PAR HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY (HPLC)

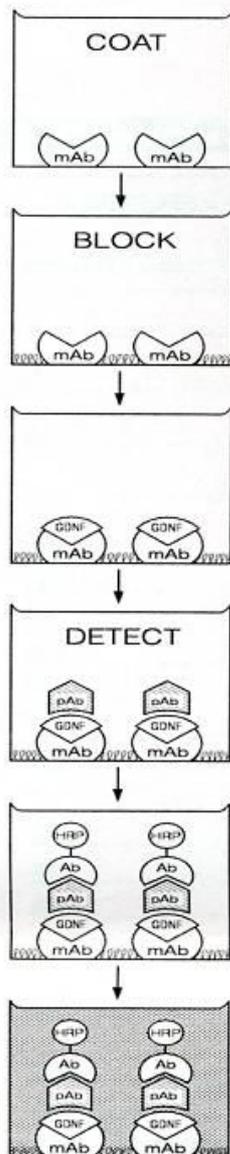
On désigne par “ acides aminés ” les unités élémentaires qui constituent les protéines. Les acides aminés comportent :

- une chaîne carbonée : le squelette carboné des acides aminés est fourni par des [intermédiaires des grandes voies métaboliques](#) (glycolyse, voie des pentoses phosphate et cycle de Krebs, voir Fig. 31) ;
- un groupement α -aminé et, en fonction de la chaîne latérale, de 1 ou 2 groupement(s) aminé(s) supplémentaire(s). Ces groupements aminés trouvent leur origine dans l'ammoniac : NH_3 . L'ammoniac résulte de la fixation de l'azote de l'atmosphère (et de dérivés oxydés de l'azote) par des micro-organismes en symbiose ou non avec certaines plantes.

figure31.jpg

On désigne par “ acides aminés libres ” l'ensemble des acides aminés présents dans l'espace intra-cellulaire et l'espace extra-cellulaire du tissu considéré.

Le dosage biochimique des acides aminés uniquement extra-cellulaires n'étant pas techniquement réalisable, nous avons dosé les niveaux d'acides aminés libres dans des rétines de souris C3H/He (*rdl*), C57BL/6 (contrôle), C3H/He *rd/rd* et C3H/He *wt/wt* à des âges correspondants aux stades pré-dégénératifs (J_1 , J_4), au début de la dégénérescence des photorécepteurs (J_8), à des stades intermédiaires du processus de dégénérescence (J_{15} , J_{21}) et à la fin de la dégénérescence des bâtonnets (J_{35}). Des dosages des aminoacides libres intra-rétiniens chez des souris *rdl* après traitement par GDNF ou par PBS ont également été effectués.



- Les puits d'une plaque de 96 puits sont recouverts avec un anticorps Anti-GDNF monoclonal (mAb)

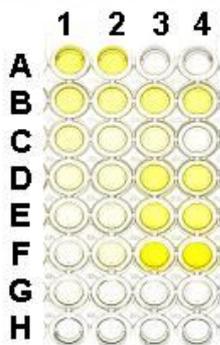
- Les sites aspécifiques sont saturés avec un tampon de blocage

- Hybridation des anticorps anti-GDNF mAb fixés sur le support avec les échantillons (standard, contrôles positif et négatif, échantillons à tester)

- Après rinçage, les molécules « GDNF » fixées au mAb sont incubées avec un anticorps anti-GDNF humain polyclonal pAb (Sandwich)

- Le complexe mAb-GDNF-pAb est ensuite mis en présence d'anticorps de poulet dirigés contre les immunoglobulines et conjugués à la peroxydase

- Le substrat de la peroxydase est ensuite ajouté. En présence de peroxydase, une coloration bleue apparaît (d'autant plus intense qu'il y a de peroxydase et donc de GDNF). Cette réaction est stoppée au bout de 15 mn par l'addition d'HCl réaction colorimétrique bleue



- Exemple de résultat :
 - les colonnes 1 et 2 sont identiques. Elles représentent l'échelle de dilution d'un standard de concentration connue, et sert de référence pour la quantification de GDNF dans les échantillons à tester.
 - A3 et A4 : contrôles négatifs
 - B3 et B4 : contrôles positifs
 - C3, C4, D3, D4, E3, E4, F3, F4 : échantillons testés. Les colorations jaunes correspondent à une réaction positive en présence de GDNF

Figure 30. Technique ELISA

A. Préparation des échantillons

Les rétines des animaux étudiés sont rapidement disséquées sur glace dans 40 µl de PBS stérile. Les rétines sont déprotéinisées dans 20 µl d'une solution réfrigérée (4 °C) comprenant [10% acide trichloroacétique (v/v), 0,5 mM EDTA]. Les échantillons sont ensuite soniqués dans un bain à ultra-sons, laissés sur glace pendant 10 minutes puis centrifugés (140 g ou 3500 tours/minute) pendant 10 minutes à 4 °C. Finalement, les surnageants sont récupérés et stockés à – 80 °C jusqu'à analyse.

B. Analyse

Les acides aminés sont séparés par chromatographie échangeuse d'ions (dite ionique) avec à un Amino Acid Analyzer (AminoTac JLC-500/V; JEOL, Tokyo, Japon). Les échantillons, une fois décongelés, sont injectés dans l'appareil un par un au niveau d'une colonne analytique tapissée d'une résine échangeuse de cations. La chromatographie ionique est la méthode la plus adaptée pour séparer les acides aminés car, en phase aqueuse, ils se présentent sous forme ionique. De plus, les acides aminés étant des composés amphotères, leur réactivité vis-à-vis de la résine échangeuse d'ions (appelée phase "stationnaire") peut facilement être modifiée par des variations de pH ou par des modifications de la composition ionique (ions Na⁺) du tampon (appelé phase "mobile"). Ainsi en faisant varier progressivement d'une part le pH (de valeurs acides à basiques) et d'autre part la force ionique (ions Na⁺, des valeurs les plus basses aux plus élevées) de la phase mobile, les acides aminés acides, neutres puis basiques sont séparés.

La quantification des différents acides aminés isolés s'effectue grâce à une réaction colorimétrique mettant en jeu la ninhydrine. La ninhydrine réagit avec le groupement amino-terminal des amino-acides pour produire une couleur violette détectée à 570 nm (Fig. 32).

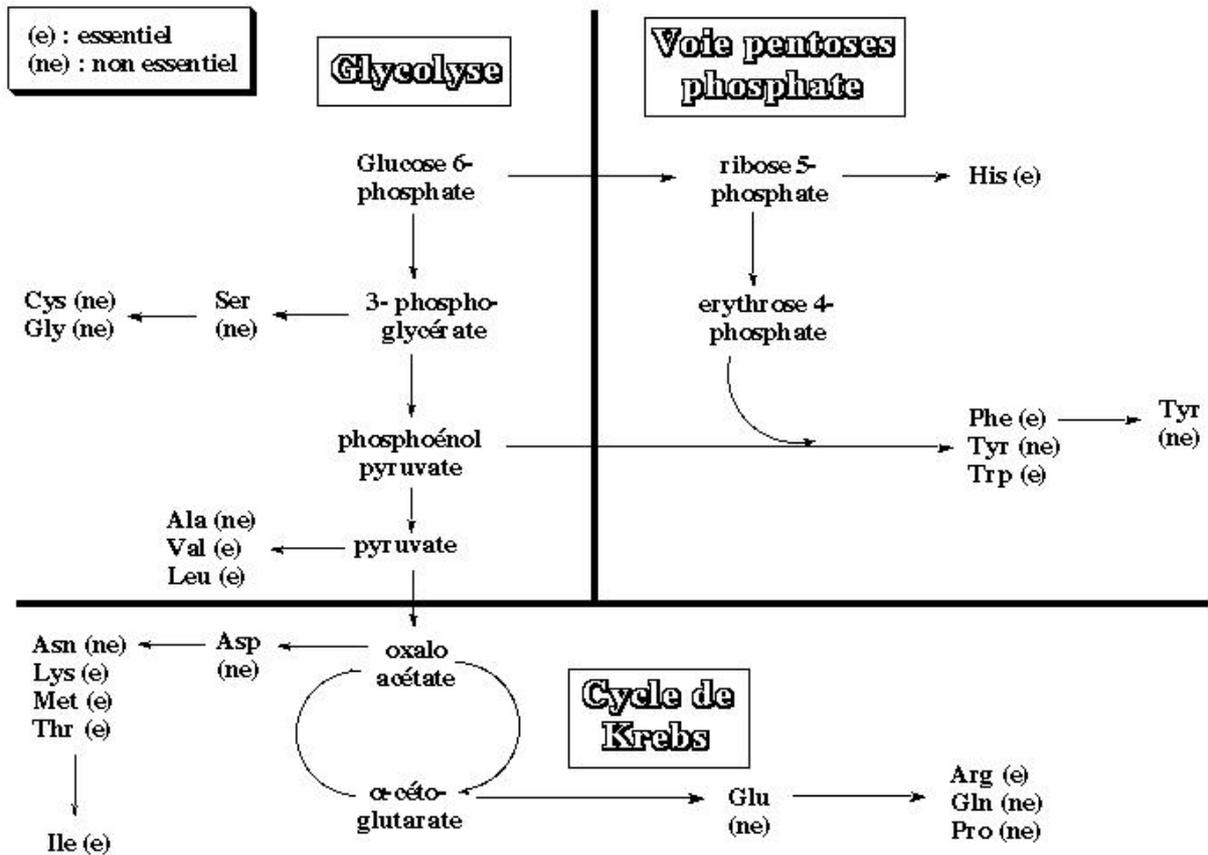
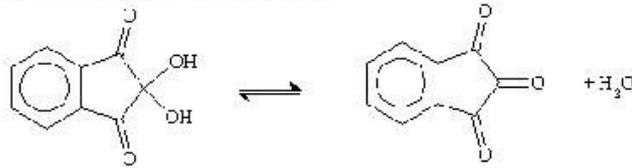
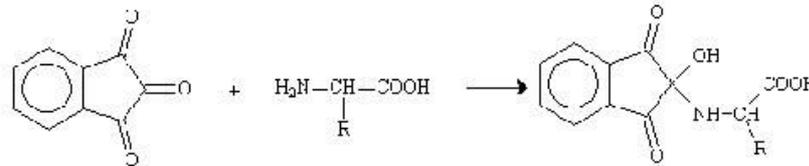


Figure31 : Provenance des squelettes carbonés à l'origine des acides aminés.

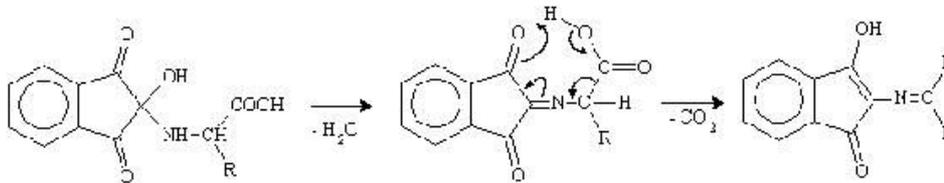
1. Très utilisée comme réactif révélateur des acides aminés en chromatographie. La ninhydrine est sous forme hydratée la 2,2-dihydroxyindan-1,3-dione, soit:



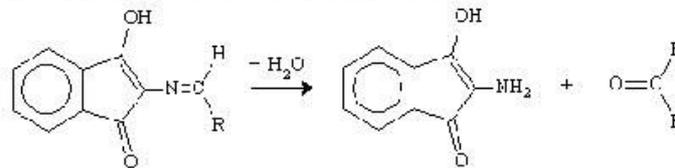
2. La fonction cétone centrale est très électrophile et réagit avec la fonction amine des acides aminés



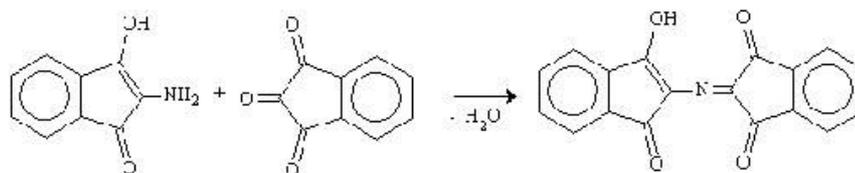
3. L'amino-alcool perd une mole d'eau, puis une mole de CO_2 , en donnant une imine,



4. Cette imine est hydrolysée et libère un aldéhyde et une amine,



5. L'amine libérée réagit avec une autre mole de ninhydrine pour donner une nouvelle cétimine,



Ce composé fortement délocalisé est coloré, on le nomme Pourpre de Ruheman. Il est à noter qu'il ne reste qu'un atome d'azote provenant de l'acide aminé initial dans le colorant final. Les amines primaires donnent une réaction analogue excepté le départ de CO_2 remplacé par une expulsion de proton.

Figure 32. Réactions avec la ninhydrine

Dans nos travaux, nous avons choisi d'exprimer les concentrations de chaque aminoacide en pourcentage de la somme de l'ensemble des concentrations en acides aminés quantifiés par l'Amino Acid Analyzer (c'est-à-dire la somme des concentrations en taurine, thréonine, serine, asparagine, aspartate, glutathion, glutamate, glutamine, glycine, alanine, citrulline, valine, isoleucine, leucine, tyrosine, phénylalanine, ornithine, lysine et arginine).

VII. ÉVALUATION FONCTIONNELLE

A. Test opto-moteur

1. Principe

Ce test exploite le réflexe de poursuite oculaire de l'animal et permet une évaluation indirecte de l'acuité visuelle. Il est réalisé successivement en ambiance scotopique puis photopique afin de tester la fonction des bâtonnets puis des cônes.

2. Mise en condition des animaux, déroulement de l'examen et interprétation des résultats

Les animaux sont mis à l'obscurité complète la veille dans la salle d'examen (24 heures d'adaptation). Le jour de l'examen, sous lampe inactinique rouge, chaque animal est mis à son tour dans l'appareil. Celui-ci se compose d'un cylindre à l'intérieur duquel est placé à mi-hauteur une grille horizontale sur laquelle l'animal est posé. Les parois du cylindre sont motorisées et sur ces parois s'adaptent des optotypes constitués de bandes noires et blanches alternées de largeurs identiques, correspondant à des fréquences spatiales différentes (Fig. 33). On débute l'examen par les optotypes avec les bandes les plus larges, puis on change d'optotype en allant vers ceux ayant des bandes plus fines. Un fois l'animal déposé sur la

grille, on attend 5 minutes qu'il soit adapté à son nouvel environnement, puis on enclenche la rotation des parois dans le sens horaire. La réaction de l'animal est enregistrée grâce à une caméra digitale infra-rouge et suivie grâce à un écran de contrôle. Au bout d'une minute, le cylindre est arrêté, le système immobilisé pendant 10 secondes, puis la rotation est réenclenchée mais, cette fois, dans le sens anti-horaire. La lumière de la salle d'examen est ensuite rétablie et l'examen est refait dans des conditions photopiques.

Si l'animal perçoit le déplacement des bandes noires et blanches alors il se déplace dans le même sens et à la même vitesse qu'elles ; dans le cas inverse il ne bouge pas ou de façon non synchrone au cylindre (sens, vitesse).

B. Électro-rétino-gramme (ERG)

L'électrorétinogramme (ERG) est l'enregistrement électrophysiologique de la réponse de la rétine à une stimulation lumineuse brève. Il traduit, à un instant donné, la différence entre la valeur du potentiel de référence de la rétine et celle de la cornée. C'est un examen objectif qui ne requiert pas la participation volontaire du sujet. Il peut traduire préférentiellement la réponse des cônes ou celles des bâtonnets (et des cellules sous leur dépendance) selon la composition spectrale de la stimulation utilisée, son niveau lumineux, l'ambiance photopique ou scotopique dans laquelle elle est délivrée et enfin l'état d'adaptation de la rétine à la lumière ou à l'obscurité. Pour nos travaux, nous avons réalisé des ERG en ambiance scotopique afin de tester la fonction des bâtonnets.

1. Anesthésie et installation des animaux

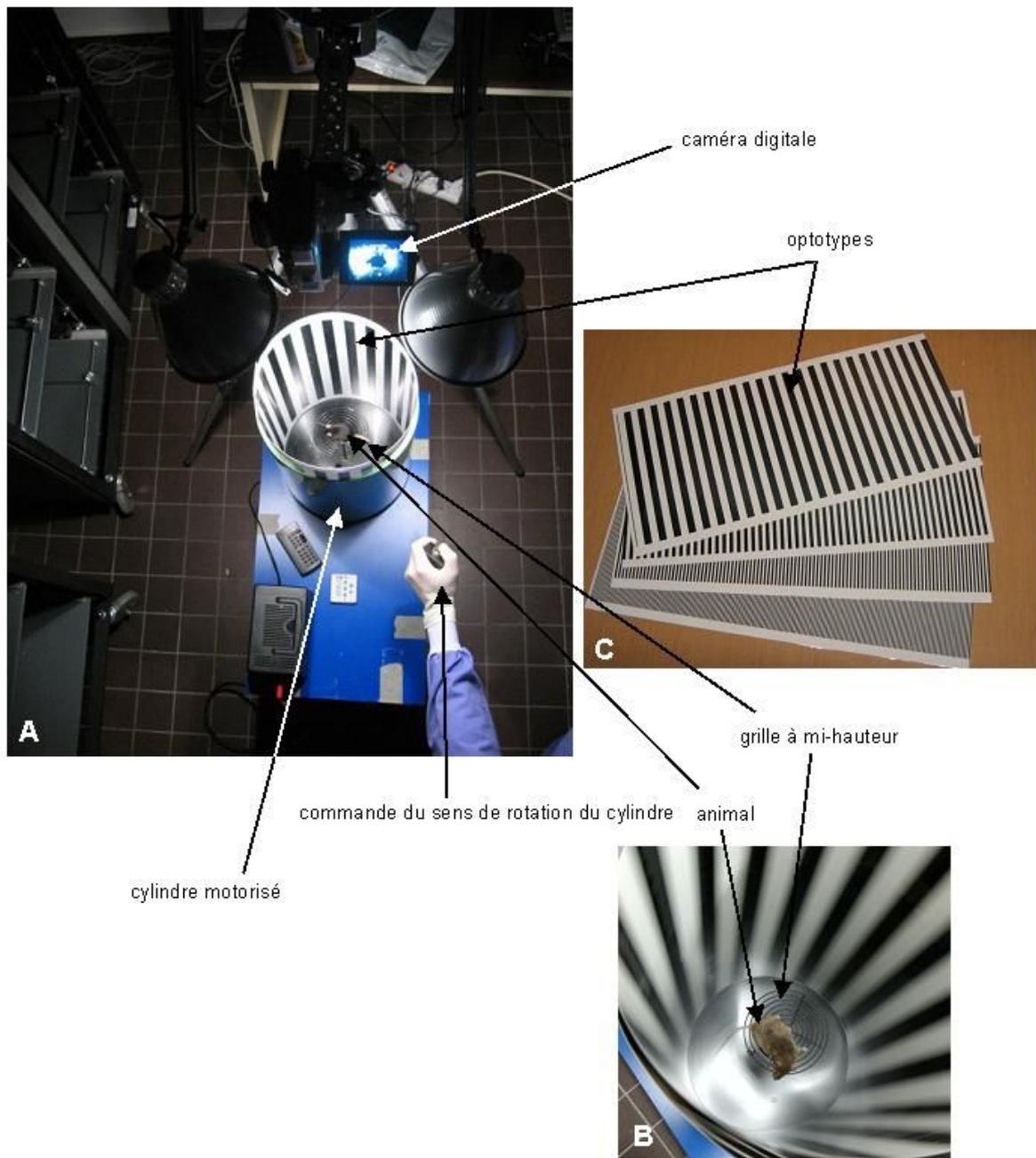


Figure 33. Test opto-moteur.

A,B. L'appareil pour effectuer le test se compose d'un cylindre à l'intérieur duquel est placé à mi-hauteur une grille horizontale sur laquelle l'animal est posé. Les parois du cylindre sont motorisées et sur ces parois s'adaptent des optotypes constitués de bandes noires et blanches alternées de largeurs identiques, correspondant à des fréquences spatiales différentes (C).

Au 21^{ème} jour de vie, les animaux sont pesés puis mis à l'obscurité complète en salle d'examen. Le jour de l'examen (J_{22}), sous lampe inactinique rouge, chaque animal est anesthésié à tour de rôle par une injection intra-musculaire de kétamine (100 mg/kg) et de xylazine 2% (10 mg/kg) quelques minutes avant de procéder à l'enregistrement ERG. Une instillation de collyre mydriatique (tropicamide, 2 mg/0,4 ml) est pratiquée. Les animaux sont installés en décubitus ventral sur un coussin chauffant, les paupières sont maintenues ouvertes à l'aide de pinces "bulldog" et les électrodes sont mises en place : l'électrode active est composée d'une lentille avec un anneau d'or et est posée sur la cornée de l'animal (1 pour chaque œil), l'électrode de référence (aiguille de 30 ½ gauge) est placée en sous-cutané au sommet du crâne, l'électrode de terre (aiguille de 30 ½ gauge) est placée en sous-cutané au niveau de la queue (Fig. 34). La rampe sur laquelle est placée l'animal est avancée dans la cage de Faraday et la coupole de Ganzfeld. La cage de Faraday est ensuite refermée.

2. Protocole de stimulation et recueil des données

10 stimulations flash de 10 candelas/m² sont émises en ambiance scotopique au rythme de 1 flash toutes les 2 minutes et ce jusqu'à la 20^e minute (appareil Jaeger/Toennies Höchberg, Allemagne). Les stimulations sont délivrées de façon concomitante aux deux yeux et l'enregistrement de la réponse de chaque œil se fait sur des voies séparées et indépendantes (Logiciel Toennies Multiliner Vision, Höchberg, Allemagne).

L'ERG obtenu à l'issue du moyennage des 10 mesures pour chaque œil est visualisé sur un écran informatique. On effectue la mesure des temps de culmination des ondes "a" et "b" et de leurs amplitudes. La mesure de l'amplitude de l'onde "a" s'effectue entre le niveau de référence et le sommet du pic négatif. La mesure de l'amplitude de l'onde "b" s'effectue de la crête de l'onde "a" à la crête de l'onde "b".

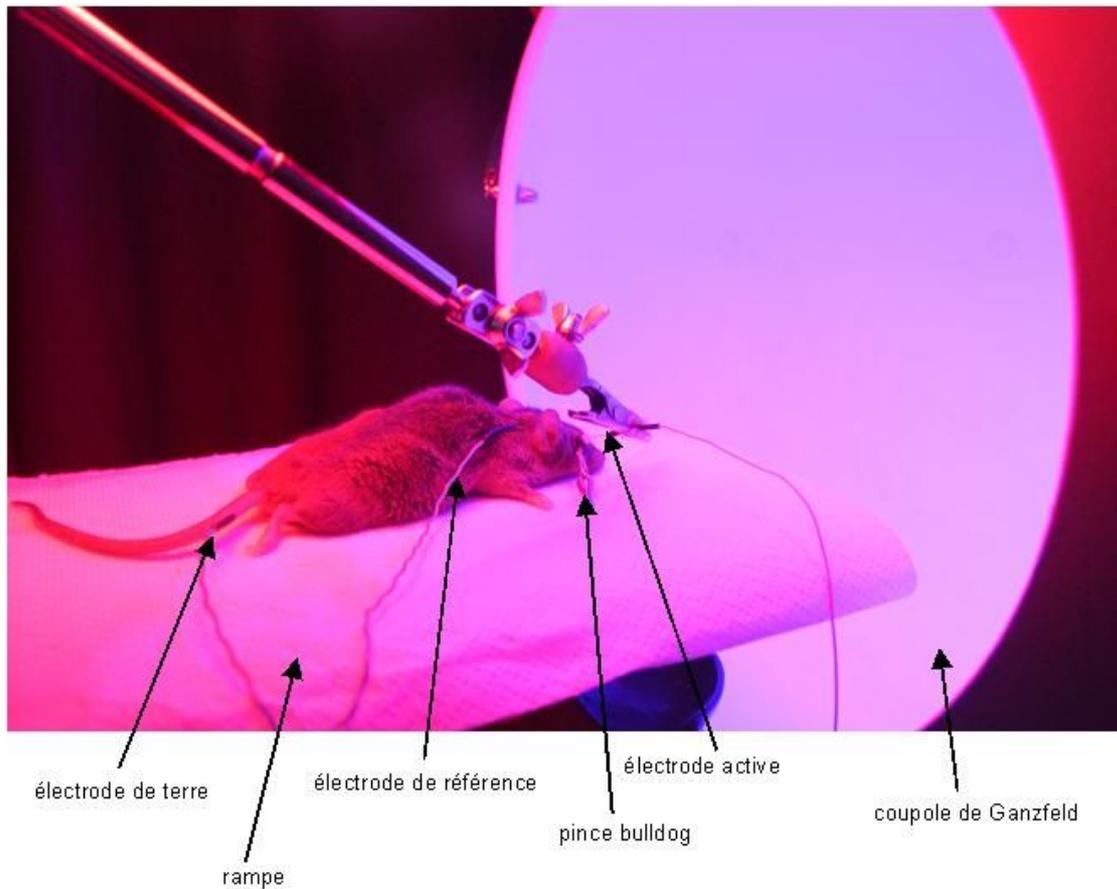


Figure 34. Conditionnement des animaux pour l'enregistrement des ERG.

Les animaux sont installés en décubitus ventral sur un coussin chauffant, les paupières sont maintenues ouvertes à l'aide de pinces « bulldog » et les électrodes sont mises en place : l'électrode active est composée d'une lentille avec un anneau d'or et est posée sur la cornée de l'animal (1 pour chaque œil), l'électrode de référence (aiguille de 30 ½ gauge) est placée en sous-cutané au sommet du crâne, l'électrode de terre (aiguille de 30 ½ gauge) est placée en sous-cutané au niveau de la queue. La rampe sur laquelle est placée l'animal est avancée dans la cage de Faraday et la coupole de Ganzfeld. La cage de Faraday est ensuite refermée.

Résultats

I. CINÉTIQUE DE LA DÉGÉNÉRESCENCE DES BÂTONNETS CHEZ NOS

SOURIS *rdl*

Une revue de la littérature nous a permis de déterminer que, chez la souris *rdl*,

- J_8 représente le début du processus de dégénérescence des photorécepteurs (Lasansky et DeRoberti, 1960 ; Shiose et sonohara, 1968 ; Caley et coll., 1972 ; Blanks et coll., 1974 ; Farber et coll., 1994 ; Phelan et Bok, 2000),
- J_{35} peut être considéré comme la phase terminale de la dégénérescence des bâtonnets (Carter-Dawson et coll., 1978),
- J_{15} représente une étape intermédiaire entre les deux.

Avant de commencer nos travaux, nous avons voulu confirmer ces données en réalisant des coupes histologiques de rétines avec nos souris *rdl* et contrôles à ces différents stades. Comme le montre la figure 13, à J_8 , il n'existe pas de différence morphologique évidente entre les rétines *rdl* et sauvages. A J_{15} , l'épaisseur de la couche nucléaire externe (CNE) est réduite d'un facteur 2 dans les rétines *rdl*. A J_{35} , il ne persiste plus que quelques rares cellules au niveau de la CNE des rétines *rdl*.

Nous avons ensuite mesuré par PCR semi-quantitative en temps réel les niveaux d'expression des messagers codant pour des marqueurs des bâtonnets à ces différentes étapes de la dégénérescence, et comparé les résultats chez la souris *rdl* à ceux obtenus chez la souris sauvage. La figure 35 montre l'évolution des niveaux d'expression des ARNm de la rhodopsine (Fig. 35A) et de l'arrestine des bâtonnets (Fig. 35B). A J₈, il n'existe pas de différence significative des niveaux d'expression des ARNm codant pour la rhodopsine et pour l'arrestine entre les rétines *rdl* et sauvages. A J₁₅ puis à J₃₅, en revanche, alors que les messagers de la rhodopsine et de l'arrestine augmentent avec le temps dans les rétines contrôles, ils s'effondrent dans les rétines *rdl*.

Nos résultats histologiques et de RT-PCR sont donc bien en accord avec les données déjà publiées concernant l'évolution de la dégénérescence des bâtonnets chez la souris *rdl*. Ces étapes de la dégénérescence seront celles utilisées ultérieurement au cours de nos travaux.

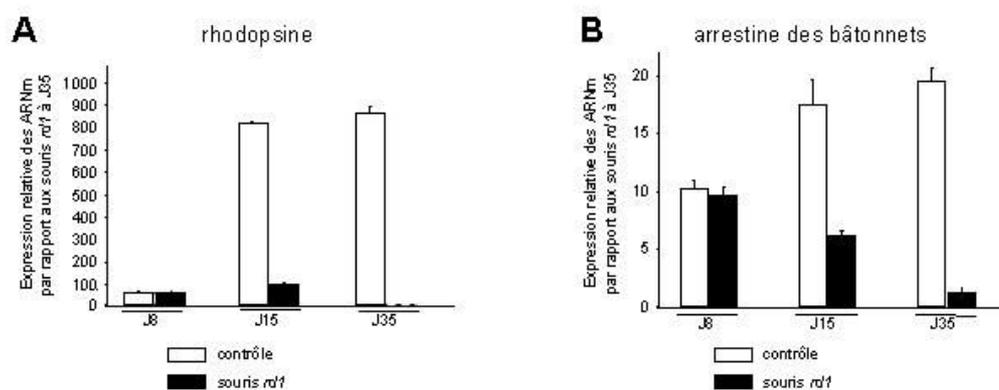


Figure 35. Etude comparative des niveaux d'expression de messagers exclusivement exprimés par les bâtonnets à différents stades de la dégénérescence (J8, J15 et J35) dans les rétines contrôles et *rd1* : rhodopsine (**A**) et arrestine des bâtonnets (**B**). Les données numériques correspondent à la moyenne \pm SEM de trois mesures.

II. GLUTAMATE ET DÉGÉNÉRESCENCE DES PHOTORÉCEPTEURS CHEZ LA SOURIS *rd1* – *Annexe 3, Manuscrit Soumis*

A. Étude du métabolisme du glutamate chez la souris *rd1*

Des altérations du métabolisme des acides aminés – et notamment du glutamate – ont été rapportées dans différents modèles de dystrophies rétiniennes (Ulshafer et coll., 1990 ; Fletcher et Kalloniatis, 1996 ; Fletcher, 2000 ; Kalloniatis et Tomisich, 1999 ; Nakazawa, 1993 ; Noro et coll., 1994 ; Schmidt et Berson, 1978 ; Okada et coll., 2000). Bien que, dans la rétine de souris *rd1*, aucune modification des concentrations en glutamate n'ait été mise en évidence au cours d'études antérieures (Orr et coll., 1976), nous avons entrepris l'étude des niveaux d'acides aminés libres dans des rétines de souris *rd1* à différents stades de dégénérescence et comparé les résultats à ceux obtenus chez les contrôles.

1. Dosage des acides aminés libres rétiniens

Les dosages en acides aminés ont été réalisés par HPLC, en utilisant un Amino Acid Analyzer (JEOL AminoTac®).

a) Comparaison des mesures entre souris *rd1* et souris sauvages

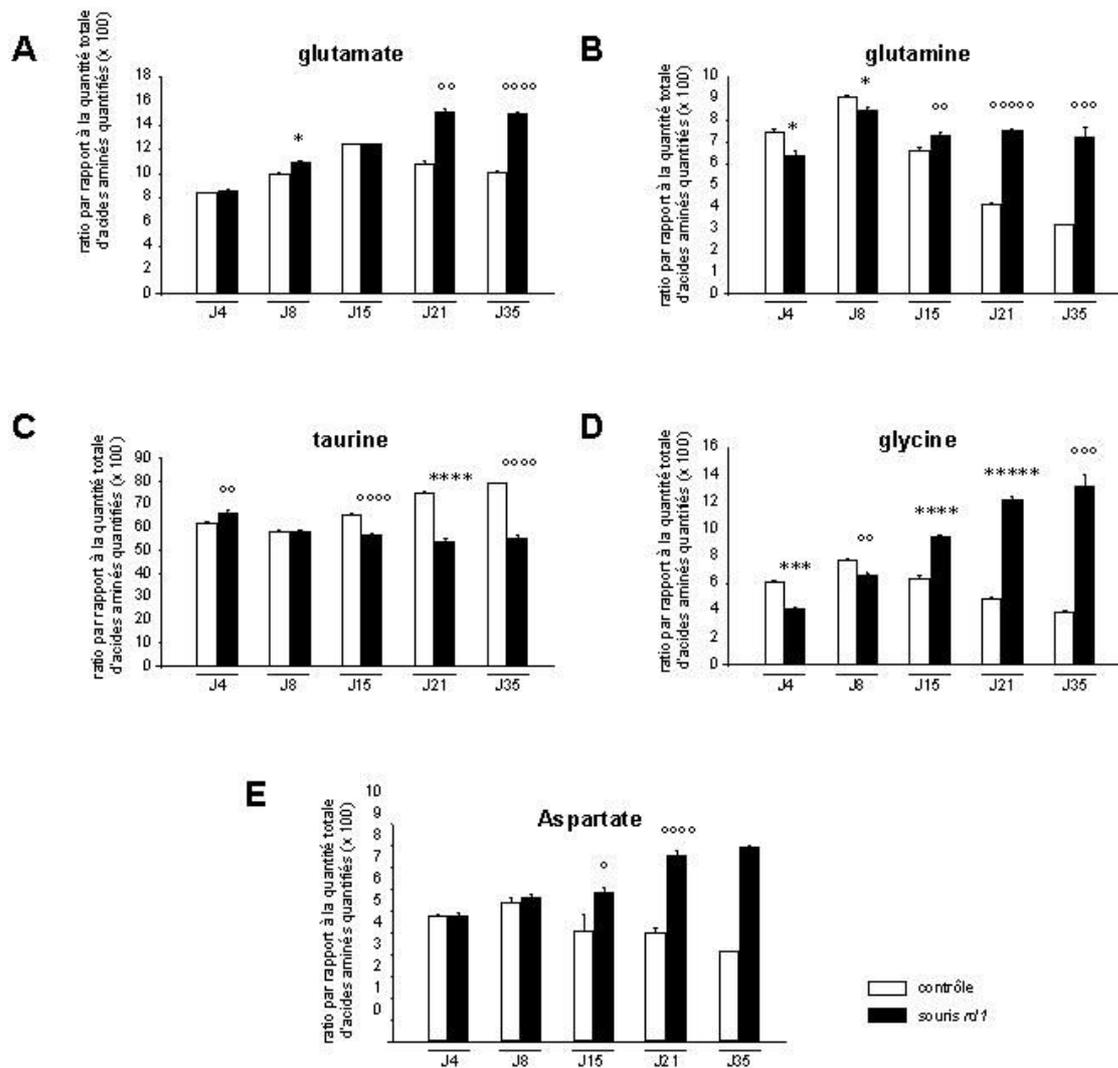


Figure 36. Niveaux des acides aminés libres contenus dans les rétines *rd1* et contrôles au cours du processus de dégénérescence (entre J₄ et J₃₅).

A : glutamate, **B** : glutamine, **C** : taurine, **D** : glycine, **E** : aspartate. Les niveaux d'acides aminés sont exprimés en pourcentage par rapport à la somme de l'ensemble des acides aminés quantifiés par l'Analyzer. Les données numériques correspondent à la moyenne ± SEM de trois mesures indépendantes (n = 3 pour chaque âge et souche, * p<0.01, *** p<0.0001, **** p<0.0001, ***** p<0.00001, ° p<0.05, °° p<0.005, °°° p<0.0005, °°°° p<0.0005, °°°°° p<0.00005).

Les résultats des dosages sont présentés à la figure 36. Entre J₄ et J₈, soit avant le début de la dégénérescence des photorécepteurs, les niveaux rétiens de glutamine et glycine sont plus bas dans les rétines *rdl* que dans les rétines contrôles C57BL/6, alors que le niveau de taurine est légèrement plus élevé chez les souris *rdl* et que celui du glutamate est équivalent dans les deux souches. Au début de la dégénérescence (J₈) le niveau de glutamate augmente légèrement dans les rétines *rdl* (Fig. 36A), il revient à la normale à J₁₅, puis augmente à nouveau progressivement de J₂₁ à J₃₅ (avec une augmentation relative de 1,39 et 1,46 pour les rétines *rdl*). Les niveaux de glutamine diminuent chez les contrôles alors qu'ils restent élevés dans les rétines *rdl*, respectivement 1,1 fois plus à J₁₅, 1,8 fois plus à J₂₁ et 2,26 fois plus à J₃₅ (Fig. 36B). Les niveaux de taurine restent stables chez les souris *rdl* entre J₈ et J₁₅ puis diminuent très légèrement alors qu'ils augmentent progressivement avec l'âge dans les rétines contrôles (Fig. 36C). Inversement, les niveaux de glycine augmentent avec l'âge dans les rétines *rdl* tandis qu'ils diminuent dans les rétines contrôles (Fig. 36D). Les résultats concernant les niveaux d'aspartate sont par contre difficiles à interpréter car le temps de rétention de l'aspartate se confond avec celui du glutathion ; néanmoins, d'après nos mesures, les niveaux d'aspartate suivent une évolution proche de celle des niveaux de glutamate et de glutamine avec une augmentation nette avec le temps dans les rétines *rdl* (Fig. 36E).

b) Comparaison des mesures entre souris *rdl* (-/-) et souris *rdl* (+/+)

L'existence d'altérations des niveaux d'acides aminés rétiens – mêmes modérées – avant le début de l'expression du gène muté (à J₈, Phelan et Bok, 2000) et avant la dégénérescence des photorécepteurs apparaît cependant inattendue. Nous avons cherché à savoir si les différences observées n'étaient pas dues à des différences de fond génétique plutôt qu'à la mutation sur le gène *Pde6b* ou au processus de dégénérescence. Pour cela, nous avons mesuré les niveaux d'acides aminés rétiens dans les rétines de souris *rdl/rdl* [ou *rdl* (-/-)] et de leurs contrôles *wt/wt* [ou *rdl* (+/+)] (Fig. 37).

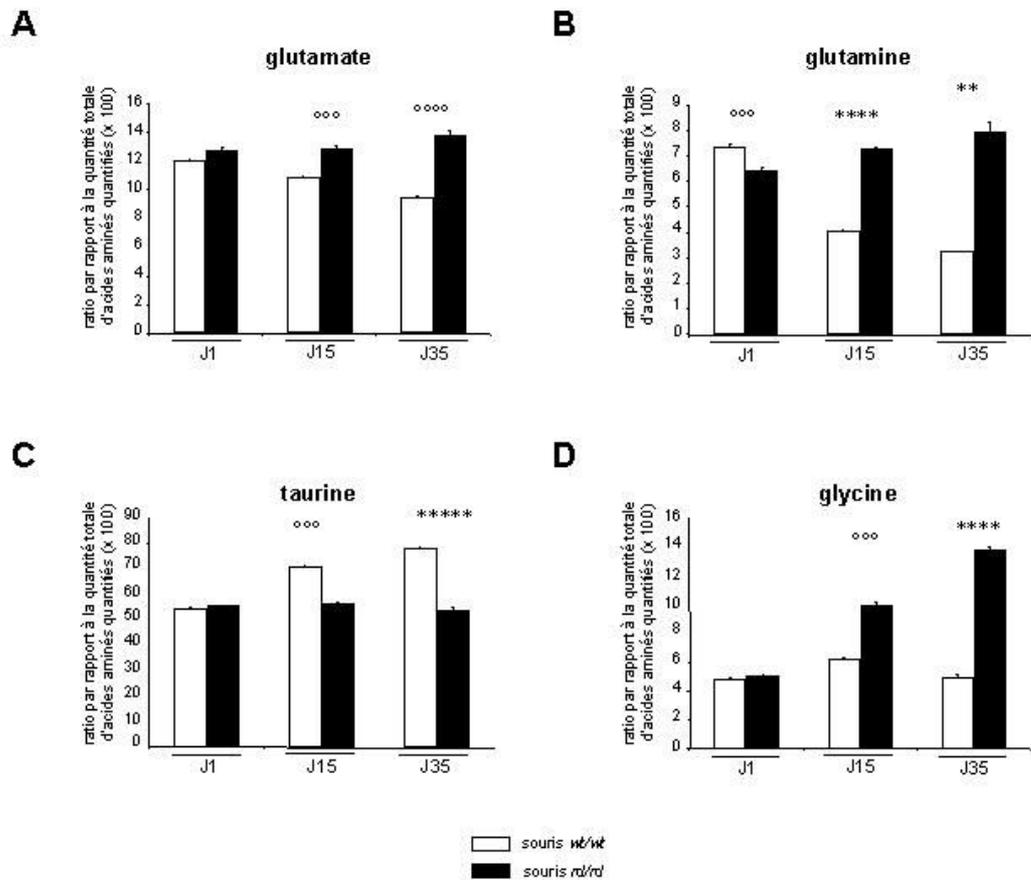


Figure 37. Niveaux des acides aminés libres contenus dans les rétines *rd1* et contrôles au cours du processus de dégénérescence (entre J1 et J35). **A** : glutamate, **B** : glutamine, **C** : taurine, **D** : glycine. Les niveaux d'acides aminés sont exprimés en pourcentage par rapport à la somme de l'ensemble des acides aminés quantifiés par l'Analyzer. Les données numériques correspondent à la moyenne \pm SEM de trois mesures indépendantes ($n = 3$ pour chaque âge et souche, ** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$, ***** $p < 0.00001$, *** $p < 0.0005$, **** $p < 0.0005$).

Le profil des résultats obtenus est très proche de celui observé lors des mesures comparatives entre souris *rd1* et C57BL/6. On retrouve une augmentation précoce des niveaux de glutamate rétiniens chez les *rd/rd*, croissant avec l'âge, mais avec cependant une différence plus marquée à J₁₅ (Fig. 37A). Comme précédemment, les niveaux de glutamine sont plus bas dans les rétines *rd/rd* avant le début de la dégénérescence et augmentent de manière très marquée avec l'âge (Fig. 37B). Les niveaux de taurine restent stables chez les *rd/rd* alors qu'ils augmentent chez les *wt/wt* (Fig. 37C). Concernant les niveaux de glycine, les différences observées avant le début de l'expression du gène muté *Pde6b*, entre les souris *rd1* et C57BL/6 (Fig. 36D), ne sont pas retrouvées entre les souris *rd/rd* et *wt/wt* (Fig. 37D), indiquant que les différences objectivées avant J₈ à la figure 36D sont probablement liées à une différence de fond génétique. Au-delà de J₈, par contre, les niveaux de glycine augmentent chez les *rd/rd* alors qu'ils diminuent chez les *wt/wt* (Fig. 37D) comme précédemment observé entre les souris *rd1* et les souris C57BL/6.

Nos résultats nous permettent d'affirmer qu'il existe donc, chez la souris *rd1*, une augmentation des niveaux rétiniens de glutamate, glutamine, aspartate et glycine, ainsi qu'une diminution du niveau de taurine, au cours de la dégénérescence des photorécepteurs.

2. Mécanismes endogènes de lutte contre l'excito-toxicité

Le glutamate pouvant exercer une toxicité sur les neurones rétiniens (Lucas et Newhouse, 1957 ; Olney, 1969 ; Yazulla et Kleinschmidt, 1980 ; Olney, 1982 ; Ingham et Morgan, 1983 ; Sattayasai et Ehrlich, 1987 ; Sattayasai et coll., 1989 ; Sahel et coll., 1991), nous avons étudié les mécanismes endogènes de défense contre l'excito-toxicité permettant le recaptage et l'élimination du glutamate.

a) Étude des mécanismes de recaptage du glutamate : étude de l'expression de GLAST

Comme une augmentation de glutamate induit une régulation positive de l'expression du transporteur glial du glutamate GLAST (L-GLutamate L-ASpartate Transporter) dans différents modèles d'étude (Gegelashvili et coll., 1996 ; Duan et coll., 1999 ; Taylor et coll., 2003), nous avons cherché à savoir si l'augmentation des niveaux de glutamate rétinien observée chez la souris *rdl*, pendant la dégénérescence des photorécepteurs, était associée à une modification de l'expression de GLAST. Dans un premier temps, nous avons étudié par PCR semi-quantitative l'expression des messagers codant pour GLAST dans des rétines *rdl* et contrôles à des âges correspondant à un stade pré-dégénératif (J_1), au début de la dégénérescence des photorécepteurs (J_8), à un stade intermédiaire de la dégénérescence (J_{15}) et à la fin de la dégénérescence des bâtonnets (J_{35}) (Fig. 38A). A J_1 , aucune différence significative d'expression des ARNm de GLAST n'est observée entre les rétines *rdl* et contrôles. A J_8 , l'ARNm de GLAST est exprimé 1,2 fois plus dans les rétines *rdl* que dans les contrôles, à J_{15} , 2,2 fois plus et à J_{35} , 2,3 fois plus. A l'inverse, à J_{35} , l'expression du messenger d'un autre transporteur du glutamate exprimé en particulier par les cônes, GLT-1 (Rauen et Kanner, 1994), chute de 2,7 fois dans les rétines *rdl* par rapport aux contrôles, reflétant ainsi la perte des cônes (Fig. 38B). L'analyse par Western blot confirme une augmentation précoce, progressive et importante de la protéine GLAST au cours du processus de dégénérescence (Fig. 38C). A J_1 , aucune différence n'est observée entre les deux souches. Dès J_8 , GLAST est plus exprimé dans les rétines *rdl* que dans les rétines contrôles et cette différence augmente avec le temps jusqu'à J_{35} .

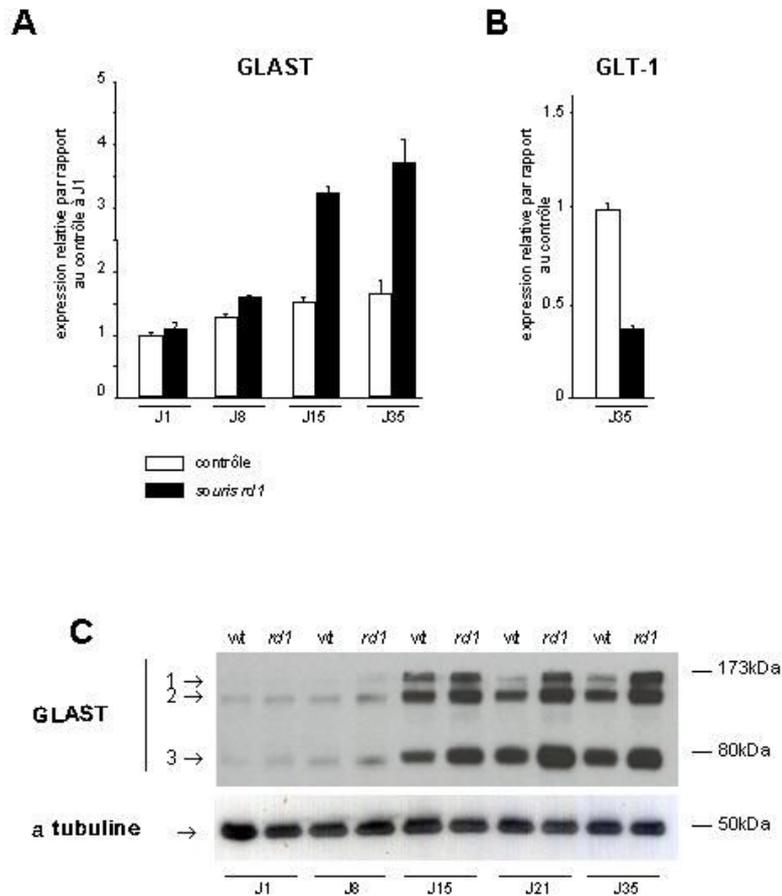


Figure 38. Expression de GLAST sous forme de transcrite et de protéine *in vivo* au cours du processus de dégénérescence des bâtonnets.

La comparaison de l'expression des messagers codants pour les transporteurs du glutamate GLAST (cellules gliales de Müller, **A**) et GLT-1 (exprimés principalement par les cônes, **B**) a été réalisée en PCR temps réel. Les données numériques correspondent à la moyenne \pm SEM de trois mesures. **C** : Après extraction des protéines totales présentes dans des rétines sauvages (contrôles ou *wt*) et des rétines *rd1* à différents âges, 10 μ g de chaque échantillons ont été déposés pour électrophorèse. Les blots ont ensuite été hybridés avec un anticorps anti-GLAST puis anti-alpha-tubuline. Ainsi que le montre la figure 35-C différentes bandes ont été obtenues : à ~50kDa (alpha-tubuline), à ~76kDa (forme monomérique de GLAST, 3) et à ~160kDa (formes multimériques de GLAST, 1 et 2). Les résultats présentés sont représentatifs de trois expériences indépendantes.

Nos résultats montrent qu'il existe une augmentation précoce (dès J₈) et progressive au cours de la dégénérescence des photorécepteurs de l'expression de GLAST sous forme de transcrit et de protéine.

b) Étude des mécanismes d'élimination du glutamate : niveaux d'expression des messagers codant pour la glutamine synthétase

Dans la mesure où les niveaux de glutamate et de glutamine augmentent parallèlement dans les rétines *rd1* au cours de la dégénérescence et que la glutamine synthétase (GS) catalyse la transformation du glutamate en glutamine lorsque le glutamate est excédentaire, nous avons étudié les niveaux des messagers codant pour la GS dans les rétines *rd1* et contrôles par PCR semi-quantitative, ainsi que ceux codant pour la vimentine, un marqueur des cellules gliales rétinienne de Müller (Fig. 39). Les ARNm de GS sont 1,3 et 1,5 fois plus exprimés dans les rétines *rd1* que dans les contrôles à J₈ et J₁₅ respectivement. Les niveaux d'ARNm de la vimentine, en revanche, restent à des niveaux similaires dans les deux souches.

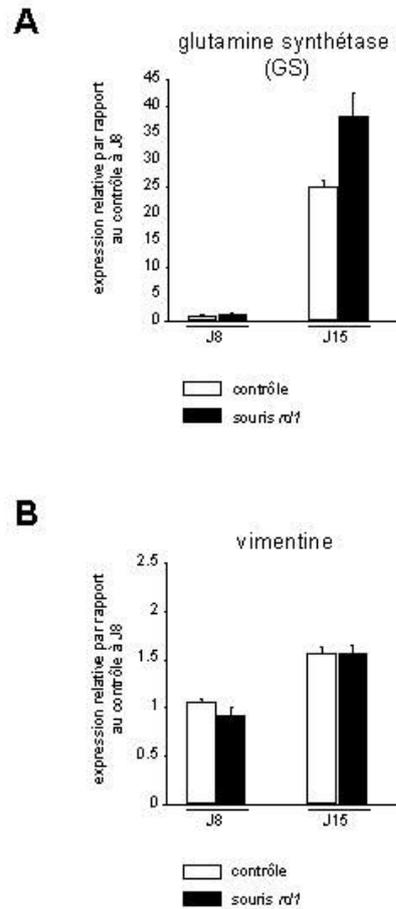


Figure 39. Expressions des messagers codant pour la glutamine synthétase (GS) et la vimentine *in vivo*.

L'étude *in vivo* de l'expression des ARNm de la GS (A) et de la vimentine (B) dans les rétines *rd1* et contrôles à J₈ et J₁₅ a été réalisée en RT-PCR temps réel. Les données numériques correspondent à la moyenne ± SEM de trois mesures.

Nos expériences démontrent donc que, chez la souris *rdl*, il existe des altérations des niveaux de certains acides aminés et notamment du glutamate. Ces perturbations sont associées à une augmentation du turn-over du glutamate puisque les mécanismes de recapture (GLAST) et de dégradation du glutamate (GS) sont régulés positivement. L'efficacité de cette dégradation est matérialisée par l'augmentation de la glutamine parallèlement à GLAST et GS.

B. Étude de l'effet du glutamate sur la dégénérescence des photorécepteurs chez la souris *rdl* : effet des antagonistes ionotropiques des récepteurs du glutamate

L'augmentation des niveaux de glutamate et du turn-over du glutamate ne préjuge en rien d'une éventuelle toxicité associée. Afin d'évaluer l'implication potentielle du glutamate dans un mécanisme de toxicité vis-à-vis des photorécepteurs qui pourrait accélérer la dégénérescence et expliquer – au moins pour partie – l'hypothèse de dommages cumulés chez la souris *rdl*, nous avons administré à nos souris *rdl* des antagonistes des récepteurs ionotropiques du glutamate de type AMPA/kainate (CNQX et NBQX) et évalué morphologiquement et fonctionnellement l'effet de tels traitements.

1. Effet morphologique

A J₂₂, après la réalisation des tests fonctionnels (voir paragraphe 2 ci-après), les souris *rdl* sont sacrifiées. Les rétines sont isolées dans des tubes de 1,5 ml, fixées dans du paraformaldéhyde 4%, marquées avec un anticorps dirigé contre la rhodopsine et montées à plat entre lame et lamelle. Les comptages stéréologiques pratiqués démontrent, dans le groupe traité par CNQX, une augmentation de la survie des bâtonnets de 25% par rapport au groupe

traité avec du sérum physiologique ($n = 7$ dans chaque groupe, $p < 0,05$) (Fig. 40). Concernant le groupe traité avec du NBQX, seuls 5 des 20 animaux traités ont atteint le 22^e jour, et sur ces 5 animaux aucun effet de survie statistiquement significatif n'a été mis en évidence.

2. Effet fonctionnel

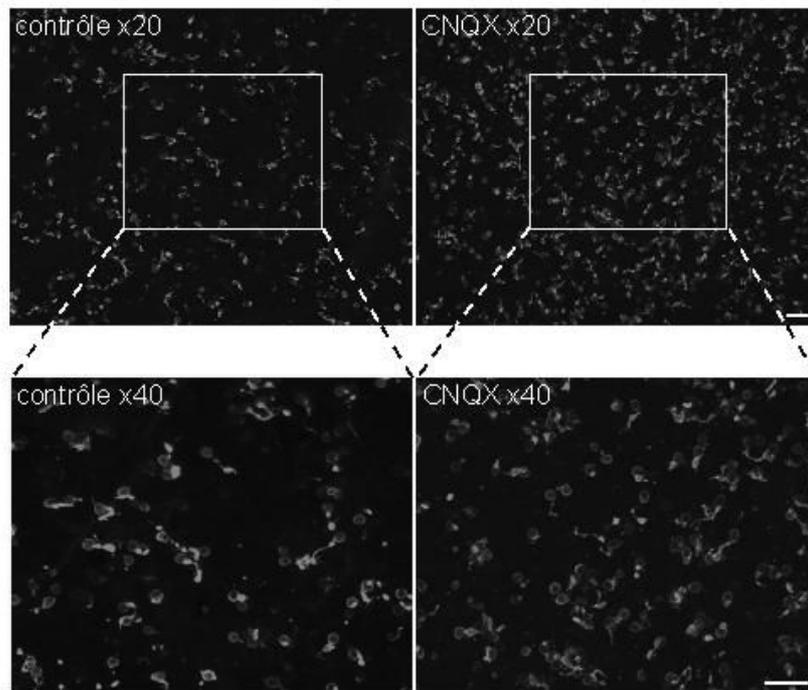
a) Tests opto-moteurs

Les tests opto-moteurs ont été réalisés sur des animaux de 21 jours en conditions scotopiques, après 24 heures d'adaptation à l'obscurité, puis en conditions photopiques. Les souris contrôles comme les souris traitées (NBQX ou CNQX), n'ont montré aucun signe comportemental suggérant qu'elles voyaient les optotypes. Tous les tests ont donc été considérés comme négatifs.

b) ERG

Les enregistrements ERG en conditions scotopiques à J_{22} des souris *rdl* contrôles et des souris *rdl* traitées par NBQX sont plats. Les enregistrements des souris *rdl* traitées par CNQX montrent des disparités interindividuelles importantes, avec, pour certains animaux, la conservation d'une faible activité électrique. La moyenne des résultats montre une "tendance" à la préservation de l'activité électrique chez les animaux traités par CNQX par rapport aux contrôles. Ce résultat n'est cependant pas statistiquement significatif.

A.



B.

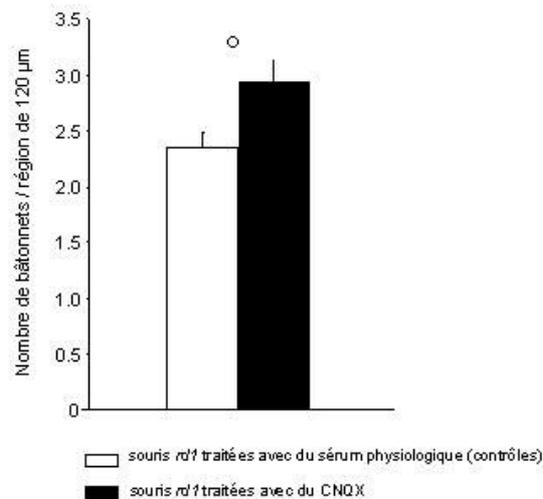


Figure 40. Effet du CNQX sur la survie des bâtonnets de souris *rd/1*.

Du CNQX ou du sérum physiologique ont été injectés quotidiennement par voie intra-péritonéale à des souris *rd/1* de J_3 à J_{21} . A la fin du traitement, les rétines ont été disséquées, fixées, hybridées avec l'anticorps Rho-4D2 (un anticorps dirigé contre la rhodopsine) puis montées à plat photorécepteurs « vers le haut ». **A** : Photographies de rétines de souris *rd/1* traitées avec le CNQX ou le sérum physiologique et marquées avec Rho-4D2 dans une région proche de la tête du nerf optique (même distance, mêmes paramètres). Un plus grand nombre de bâtonnets est observé chez les souris traitées avec le CNQX. Barre d'échelle, 25 μm . **B** : Résultats de la quantification des bâtonnets marqués sur rétines entières. Les données numériques correspondent à la moyenne des résultats obtenus \pm SEM ($n = 7$ dans chaque groupe, * $p < 0.05$).

3. Conclusions

Nos résultats démontrent que l'administration d'antagonistes des récepteurs glutamatergiques de type AMPA/kainate (CNQX) ralentit la perte des bâtonnets chez la souris *rd1*, suggérant l'occurrence de phénomènes de toxicité médiée par le glutamate dans la rétine en dégénérescence. Cette protection "morphologique" n'est cependant pas associée à une conservation significative de la fonction des photorécepteurs.

III. ÉTUDE D'UN MECANISME POSSIBLE DE L'EFFET NEUROPROTECTEUR DE GDNF – *Annexe 4,* *Publication dans " Molecular Vision ", sous presse*

Les facteurs trophiques apparaissent à l'heure actuelle comme l'un des moyens thérapeutiques les plus prometteurs pour les rétinopathies pigmentaires. En effet, par une modulation du micro-environnement des photorécepteurs, ces facteurs permettent de ralentir voire stopper le processus de neuro-dégénérescence et ce, indépendamment de la mutation causale. Au regard de l'impressionnante hétérogénéité génétique associée au "phénotype RP" (Hims et coll., 2003), une approche thérapeutique "mutation-indépendante" présente un intérêt réel, puisque de tels traitements pourraient être applicables à une majorité de patients en clinique.

Après l'abandon du FGF-2, eu égard à ses effets secondaires, et l'enthousiasme mitigé suscité par le CNTF, le GDNF pourrait bien être l'un des meilleurs candidats dans cette optique thérapeutique. En effet, non seulement GDNF a fait la preuve de sa capacité à ralentir la dégénérescence des photorécepteurs mais aussi, et contrairement au CNTF, à préserver la fonction visuelle dans de nombreux modèles de dégénérescence des photorécepteurs, aussi

bien héréditaires (Frasson et coll., 1999 ; McGee Sanftner et coll., 2001 ; Lawrence et coll., 2004) que non héréditaires (Wu et coll., 2002).

Les mécanismes qui sous-tendent l'action neuroprotectrice de ces facteurs restent cependant à préciser. Le FGF-2 exercerait son effet trophique vis-à-vis des photorécepteurs de manière directe (Fontaine et coll., 1998), tandis que le CNTF – ainsi que de nombreux autres facteurs – agirait de manière indirecte par l'intermédiaire des cellules gliales de Müller (CGM) (Wahlin et coll., 2000 ; Zack et coll., 2000 ; Wahlin et coll., 2001). En ce qui concerne le GDNF, des données contradictoires ont été rapportées. *In vitro*, un effet neuroprotecteur direct sur des photorécepteurs immatures a été observé (Jing et coll., 1996 ; Politi et coll., 2001) cependant que, *in vivo*, des marquages immuno-histo-chimiques pratiqués avec des anticorps différents ont localisé les récepteurs de GDNF soit exclusivement sur les photorécepteurs (Harada et coll., 2003), soit à la fois sur les CGM, la couche plexiforme interne et les cellules ganglionnaires (Koeberle et Ball, 2002).

Nous avons donc, dans un premier temps, chercher à localiser les récepteurs de GDNF.

A. Étude des récepteurs de GDNF

GDNF agit principalement par l'intermédiaire d'un " complexe-récepteur " composé d'un groupement glycosyl-phosphatidyl-inositol ancré sur la membrane externe de la membrane plasmique, appelé " co-récepteur " (GFRalpha-1 préférentiellement, GFRalpha-2 alternativement), et d'un récepteur trans-membranaire à activité tyrosine kinase (Ret) (Jing et coll., 1996 ; Treanor et coll., 1996 ; Durbec et coll., 1996 ; Trupp et col ; 1996).

1. Marquages immuno-histo-chimiques

Au début de notre travail, nous avons essayé de réaliser des marquages immuno-histo-chimiques en fluorescence dirigés contre GFRalpha-1 et Ret sur des coupes de rétine de souris

rdl. Nous avons utilisé différents anticorps (voir *Matériels et Méthodes*) qui n'ont jamais donné de résultats probants ni reproductibles quels que soient les dilutions et les tampons de blocages utilisés d'une part (dans la Table 4 – page 69 – sont présentés ceux qui ont donné les moins mauvais résultats), ou qu'il s'agisse de coupes d'yeux congelés ou de coupes d'yeux inclus en paraffine d'autre part. Afin de s'assurer que ce n'était pas notre technique de marquage qui était en cause, nous nous sommes procuré des souris KO pour GFRalpha-1 (GFRalpha-1 *-/-*) par l'intermédiaire du Docteur Odile de Lapeyriere (Unité Inserm U382 dirigée par le Docteur Christopher Henderson, Marseille). Quel que soit l'anticorps anti-GFRalpha-1 utilisé, les marquages de rétine de souris *rdl* donnaient les mêmes résultats aspécifiques que les marquages sur des rétines de souris KO pour GFRalpha-1.

Au cours de nos recherches d'anticorps “ fiables ”, nous sommes entrés en contact notamment avec Marc Billaud et son équipe (CNRS UMR 5641, Université Claude Bernard Lyon 1) qui ont beaucoup travaillé sur le GDNF et ses récepteurs. Ayant testé tous les anticorps dirigés contre les récepteurs de GDNF présents sur le marché, il leur est apparu qu'aucun d'entre eux n'était fiable, expliquant ainsi notre absence de résultat. Les données contradictoires des marquages dirigés contre les récepteurs de GDNF publiés depuis (Koeberle et Ball, 2002 ; Harada et coll., 2003) ne font que confirmer l'absence d'anticorps valable disponible. Nous avons donc envisagé une approche différente pour déterminer la distribution des récepteurs de GDNF dans la rétine de souris *rdl*.

2. Expression des messagers codant pour les récepteurs de GDNF

L'étude comparative de l'expression des messagers codant pour les récepteurs de GDNF *in vivo* et *in vitro* nous a permis d'apporter quelques réponses quant à la localisation de GFRalpha-1, GFRalpha-2 et Ret dans la rétine de souris *rdl*.

Étude comparative de l'expression des messagers codant pour les récepteurs de GDNF *in vivo* chez la souris *rdl* et la souris sauvage au cours de la dégénérescence des photorécepteurs

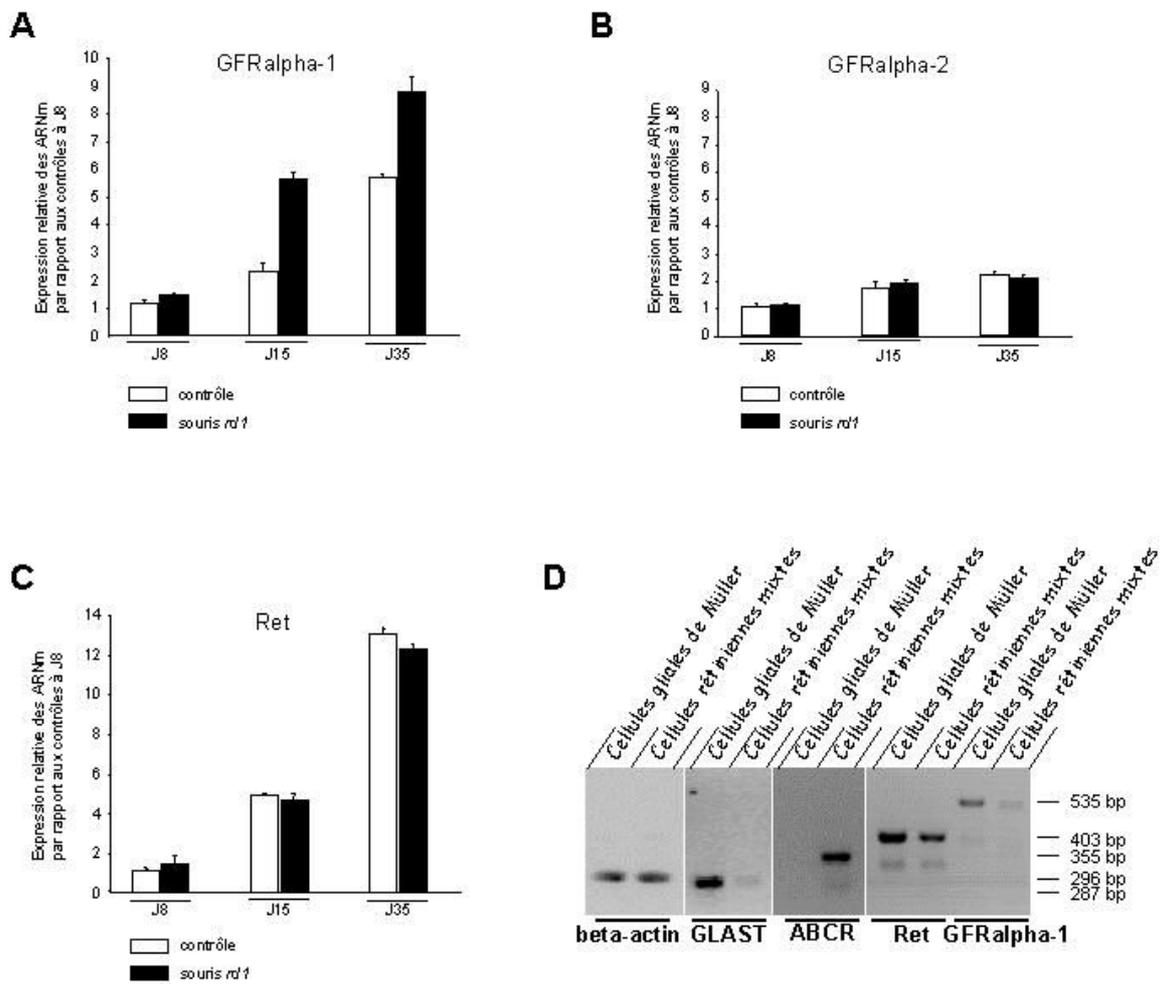


Figure 41. Expression des messagers de GFRalpha-1, GFRalpha-2 et Ret dans la rétine de souris *rd1*.

L'étude comparative des niveaux d'expression des ARNm de GFRalpha-1 (A), GFRalpha-2 (B) et Ret (C) *in vivo* dans des rétines *rd1* et contrôles a été réalisée par PCR en temps-réel à différents stades de la dégénérescence des bâtonnets (J₈, J₁₅ et J₃₅). Les données numériques correspondent à la moyenne ± SEM de trois mesures.

D : Gel d'électrophorèse des produits de PCR après amplification d'ADNc issu de cultures de Cellules Gliales de Müller pures et de cultures mixtes de cellules rétinienne : beta-actine (296bp), GLAST (287bp), ABCR (355bp), Ret (403bp) et GFRalpha-1 (535bp). Les résultats présentés sont représentatifs de trois expériences indépendantes.

Nous avons comparé par PCR semi-quantitative en temps réel l'expression des messagers codant pour GFRalpha-1, GFRalpha-2 et Ret à ces différentes étapes de la dégénérescence, et comparé les résultats chez la souris *rdl* à ceux obtenus chez la souris sauvage.

Aussi bien chez la souris contrôle que chez la souris *rdl*, l'expression de l'ARNm de GFRalpha-1 augmente avec l'âge (Fig. 41A). Cependant, quel que soit l'âge, le niveau d'expression de l'ARNm de GFRalpha-1 est significativement plus important chez la souris *rdl* que chez la souris contrôle. A J₈, le niveau d'ARNm de GFRalpha-1 est 1,3 fois plus élevé chez la souris *rdl* que chez le contrôle. A J₁₅, la différence d'expression atteint une valeur maximum de 2,4. A J₃₅, l'augmentation du niveau d'expression de l'ARNm de GFRalpha-1 est 1,5 fois plus élevée chez la souris *rdl* que chez le contrôle.

Une signalisation de GDNF par l'intermédiaire de GFRalpha-2 ayant été occasionnellement observée (Jing et coll., 1997 ; GFRalpha Nomenclature Committee, 1997 ; Baloh et coll., 2000), nous avons mesuré et comparé l'expression des messagers de GFRalpha-2 chez les souris *rdl* et contrôles aux mêmes stades que précédemment (Fig. 35). Les niveaux des ARNm de GFRalpha-2 augmentent proportionnellement avec l'âge dans les deux souches de souris, sans différence notable de niveaux d'expression entre les souris *rdl* et sauvages (Fig. 41B).

L'étude des niveaux d'expression de l'ARNm de Ret de J₈ à J₃₅ montre un profil similaire à celui de GFRalpha-2 (Fig. 41C), retrouvant une augmentation des niveaux d'expression avec l'âge mais sans différence significative à chaque âge entre les souris *rdl* et les souris contrôles.

Le profil d'expression des ARNm codant pour les récepteurs de GDNF au cours de la dégénérescence des photorécepteurs chez la souris *rdl* montre donc que les ARNm de Ret, GFRalpha-1 et GFRalpha-2 ne diminuent pas, celui de GFRalpha-1 étant même augmenté. L'expression des récepteurs de GDNF n'est donc pas exclusivement restreinte aux photorécepteurs dans la rétine en dégénérescence.

a) Étude comparative de l'expression des messagers codant pour les récepteurs de GDNF *in vitro* dans des cultures pures de cellules gliales de Müller (CGM) et des cultures mixtes de cellules rétiniennes

Nous avons poursuivi notre étude en comparant par PCR les niveaux d'expression des messagers codant pour Ret et GFRalpha-1 dans des cultures pures de CGM et des cultures mixtes de cellules rétiniennes (comprenant tous les types cellulaires rétiniens : glial et neuronal). Les messagers de la bêta-actine (gène de ménage), du transporteur glial GLAST et du gène ABCR spécifique des photorécepteurs ont également été mesurés afin de s'assurer de la qualité de nos cultures. La figure 41D montre que les ARNm de Ret ainsi que ceux de GFRalpha-1 sont exprimés à un niveau plus élevé dans les cultures pures de CGM que dans celles de cellules rétiniennes mixtes, alors que le gène de la bêta-actine est exprimé de manière similaire dans les deux types de cultures. L'ARNm de GLAST est plus abondant dans les cultures pures de CGM que dans celles de cellules rétiniennes mixtes tandis que l'expression du gène ABCR n'est détectée que dans les cultures mixtes. La mesure quantitative des produits de PCR, grâce au logiciel *Phoretix ID®*, nous a permis de démontrer que, *in vitro* et dans nos conditions de RT-PCR, les ARNm de Ret et GFRalpha-1 sont respectivement 1,7 et 5,3 fois plus abondants dans les cultures pures de CGM que dans les cultures mixtes de cellules rétiniennes. La comparaison des niveaux d'expression des ARNm codant pour GFRalpha-1 (5,3) et GLAST (8,7) entre les cultures de CGM et celles de cellules rétiniennes mixtes suggère que le messenger de GFRalpha-1 n'est pas exclusivement exprimé par les CGM comme celui de GLAST, mais seulement de manière prédominante par les CGM. L'ARNm de Ret, quant à lui, est exprimé de manière plus large, à la fois par les CGM et par d'autres types cellulaires rétiniens.

3. Conclusions

Nos résultats démontrent que, *in vivo*, les messagers codant pour les récepteurs de GDNF ne sont pas exclusivement exprimés par les photorécepteurs. *In vitro*, Les messagers codant pour GFRalpha-1 sont exprimés principalement par les CGM, tandis que ceux codant pour Ret sont plus largement distribués.

B. Étude de l'effet de GDNF sur l'expression de GLAST :

1. In vitro : application de GDNF sur des cultures pures de cellules gliales de Müller

Dans la mesure où les CGM expriment les récepteurs de GDNF (Fig. 41D) et que GDNF régule positivement l'expression du transporteur glial du glutamate GLAST dans le cerveau (Bonde et coll., 2003) et dans un modèle de glaucome (Naskar et coll., 2000), nous avons voulu déterminer si l'application exogène de GDNF pouvait moduler l'expression de GLAST par les CGM. L'effet de GDNF sur le niveau d'expression de l'ARNm de GLAST a tout d'abord été étudié *in vitro* dans des cultures pures de CGM. Après 24 heures de traitement avec du GDNF, les ARNm de CGM ont été extraits et les niveaux d'expression du messenger mesurés par RT-PCR semi-quantitative en temps réel. La figure 42 montre que les CGM cultivées en présence de GDNF expriment l'ARNm de GLAST 5,5 fois plus que les CGM contrôles (n = 3 ; SEM \pm 1,8).

2. Ex vitro : application de GDNF sur des explants rétiniens rd1

Nous avons ensuite étudié l'effet de GDNF sur l'expression de GLAST en utilisant des explants de rétines *rd1* cultivés 48 heures dans un milieu conditionné en présence et en absence de GDNF. Nous avons mesuré les niveaux d'expression protéique de GLAST par Western blotting. Ainsi que précédemment rapporté dans la littérature, les immuno-blots dirigés contre GLAST (Fig. 43A) révèlent deux bandes immuno-réactives correspondant aux

formes monomérique (~76 kDa) et multimérique (~160 kDa) de GLAST (Haugeto et coll., 1996 ; Furuta et coll., 1997 ; Duan et coll., 1999). La figure 43A démontre que GDNF induit une augmentation de la protéine GLAST *ex vitro*. La quantification de l'intensité des bandes immuno-réactives par le logiciel *Phoretix*® révèle que le niveau d'expression protéique de GLAST est 1,48 fois plus élevé dans les explants cultivés en présence de GDNF que dans les contrôles (n = 6, SEM ± 0,1, p<0,005, Fig. 43C).

3. In vivo : injections sous-rétiniennes de GDNF à des souris *rd1*

Nous avons ensuite testé l'action de GDNF *in vivo*. Des souris *rd1* âgées de 15 jours ont reçu une injection sous-rétinienne de GDNF dans un oeil et de PBS dans l'œil contralatéral puis ont été sacrifiées 48 heures après. Les yeux ont été soit disséqués, les rétines isolées et l'expression rétinienne de GLAST quantifiée par Western blot, soit inclus en paraffine pour réaliser des coupes immuno-histo-chimiques.

Les analyses par Western blot confirment les résultats observés *ex vitro* (Fig. 43B & C), montrant une augmentation de l'expression de GLAST de 25% en moyenne suite au traitement par GDNF (n = 6 ; SEM ± 0,02 ; p<0,0005).

Les immuno-marquages en fluorescence démontrent que GLAST est présent sur toute l'épaisseur rétinienne, depuis la limitante externe jusqu'à la limitante interne. Un double marquage avec un anticorps dirigé contre le canal potassique Kir4.1, connu pour être exprimé dans la rétine exclusivement sur les membranes des CGM (Ishii et coll., 1997), démontre que GLAST et Kir4.1 co-localisent strictement chez la souris *rd1* (Fig. 43D). GLAST est donc bien exprimé au niveau des membranes des CGM dans notre modèle. L'analyse immuno-histo-chimique 48 heures après l'injection sous-rétinienne, soit de GDNF (dilué dans du PBS), soit de PBS seul (Fig. 43F et 43H), retrouve le marquage déjà observé sur toute l'épaisseur rétinienne et correspondant aux CGM (Fig. 43D). Cependant, le traitement par GDNF induit une augmentation du marquage dirigé contre GLAST sur toute l'épaisseur rétinienne,

particulièrement significative au niveau de la couche nucléaire externe autour des photorécepteurs en dégénérescence (Fig. 43F et 43G). En raison de la résolution limitée du microscope confocal (par rapport au microscope électronique), nous n'avons pu déterminer si l'augmentation du marquage dirigé contre GLAST était localisé strictement à la membrane cytoplasmique ou présent également au niveau du réticulum cytoplasmique.

4. Niveaux endogènes d'expression de GDNF

Il a été démontré récemment que l'expression de GDNF est augmentée de manière endogène dans un modèle de dégénérescence rétinienne induite par la lumière (Harada et coll., 2003). Nous avons donc voulu déterminer les niveaux endogènes d'expression de GDNF afin de savoir si l'augmentation endogène de GLAST (Fig. 42 & 43) était liée au GDNF endogène.

Nous avons mesuré et comparé par PCR semi-quantitative en temps réel le niveau d'expression rétinien des messagers codant pour GDNF dans des rétines de souris *rdl* et contrôles pendant le processus de dégénérescence des bâtonnets (Fig. 44). Tout d'abord, nous avons pu constater que, quelle que soit la souche considérée, les ARNs messagers de GDNF sont faiblement exprimés dans la rétine. A J₈, aucune différence d'expression n'est observée entre les rétines *rdl* et les contrôles. A J₁₅, l'ARNm de GDNF est exprimé 1,4 fois plus dans les rétines *rdl* que dans les contrôles. A J₃₅, plus aucune différence n'est mesurée entre les deux souches de souris (Fig. 44). Nous avons ensuite cherché à objectiver une éventuelle différence d'expression de la protéine GDNF à J₁₅ dans les rétines *rdl* et contrôles. Pour cela, nous avons réalisé des dosages immuno-métriques par technique ELISA, mais le niveau d'expression de la protéine GDNF, à J₁₅, n'était détectable dans aucune des deux souches.

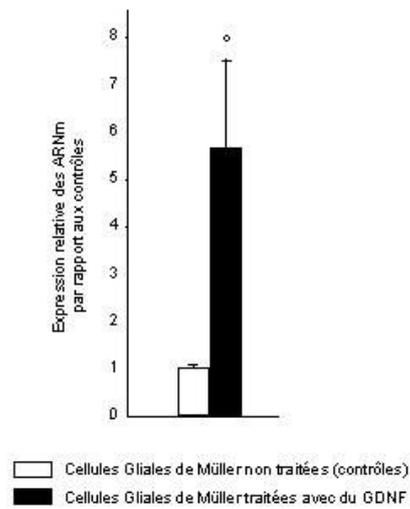


Figure 42. Expressions des messagers codant pour GLAST dans des cultures pures de cellules gliales de Müller (CGM) traitées avec du GDNF.

Les niveaux d'expression des ARNm codant pour GLAST ont été mesurés dans des cultures de CGM en présence et en absence de GDNF par RT-PCR temps réel. Les données numériques correspondent à la moyenne \pm SEM de trois expériences indépendantes ($^{\circ}$ $p < 0.05$, $n = 3$).

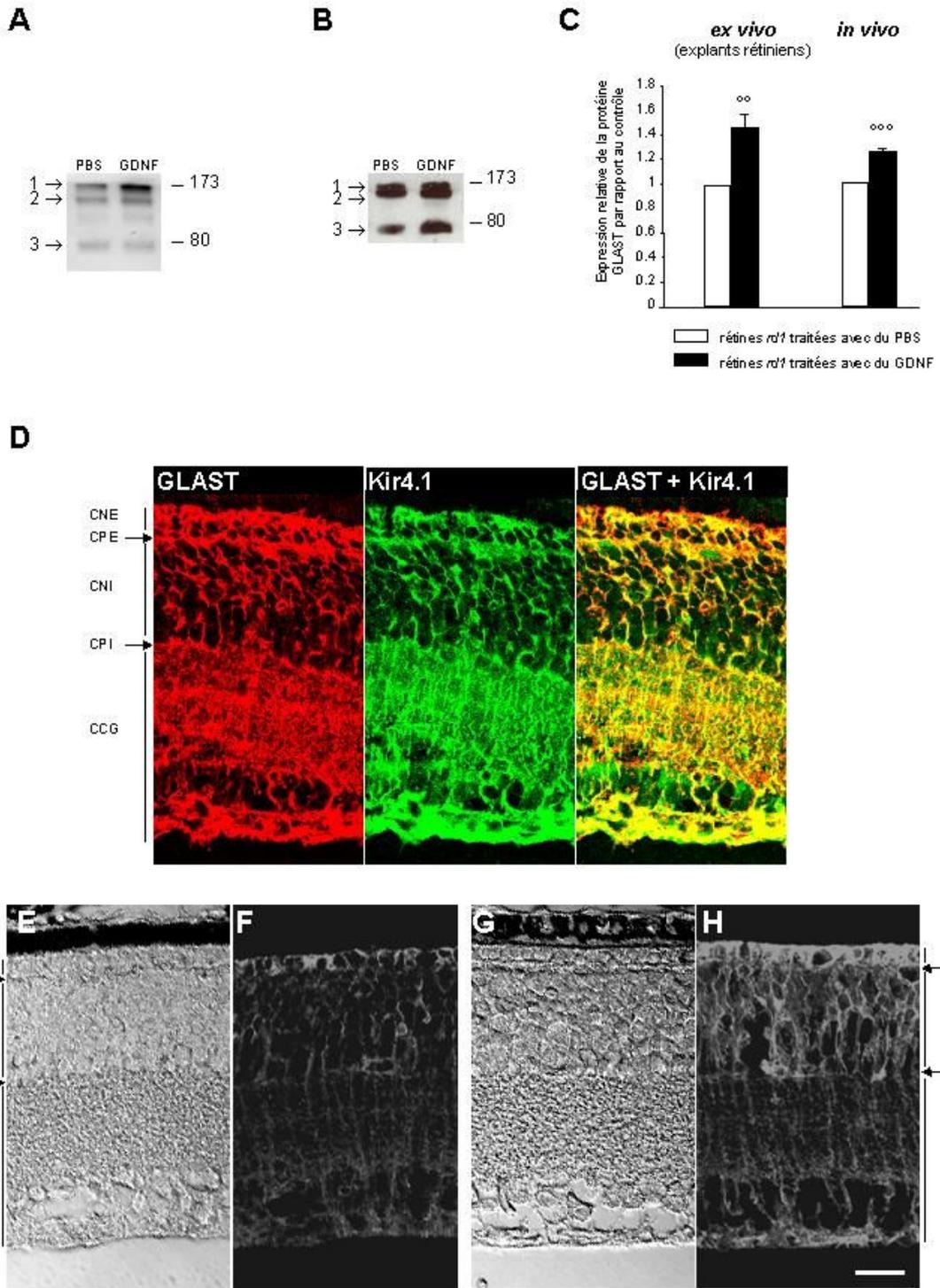


Figure 43.

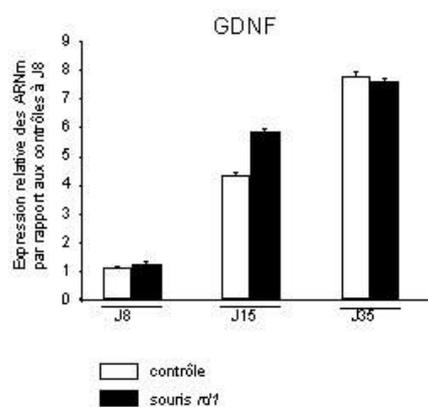


Figure 44. Expression des messagers codant pour GDNF dans la rétine de souris *rd1*. L'étude comparative des niveaux d'expression des ARNm de GDNF *in vivo* dans des rétines *rd1* et contrôles a été réalisée par PCR en temps-réel à différents stades de la dégénérescence des bâtonnets (J8, J15 et J35). Les données numériques correspondent à la moyenne \pm SEM de trois mesures.

Nos résultats montrent donc que l'ARNm de GDNF est modérément et transitoirement augmenté à J₁₅ dans la rétine de souris *rdl*.

5. Conclusions

Nos expériences démontrent que GDNF induit une régulation positive de GLAST *in vitro* dans les cultures de CGM, *ex vitro* sur des explants rétiniens de souris *rdl*, et *in vivo*. Cette augmentation apparaît particulièrement marquée autour des photorécepteurs en dégénérescence.

L'augmentation de GLAST observée au cours de la dégénérescence des photorécepteurs chez la souris *rdl* (II-2.1) ne s'avère pas être liée à une augmentation endogène de GDNF.

C. Étude de l'effet de GDNF sur les niveaux de glutamate rétiniens

Nous avons précédemment démontré qu'il existe une augmentation des niveaux rétiniens de glutamate au cours de la dégénérescence des photorécepteurs dans la rétine de souris *rdl* (Fig. 36 & 37) et que celle-ci est toxique pour les bâtonnets (Fig. 40). Nous avons également montré que l'application de GDNF induit la régulation positive de GLAST. Nous avons donc cherché à déterminer ensuite si l'administration de GDNF s'accompagnait d'une diminution des niveaux de glutamate rétiniens.

Nous avons mesuré en HPLC les concentrations en acides aminés libres 48 heures après injection sous-rétinienne de GDNF dans des rétines de souris *rdl* âgées de 15 et 21 jours. La figure 45 montre que à J₁₅, comme à J₂₁, le traitement par GDNF ne modifie pas de manière significative les niveaux de glutamate ou de glutamine.

D. Conclusions

Les messagers codant pour les récepteurs de GDNF ne sont pas exclusivement exprimés par les photorécepteurs. GFRalpha-1, co-récepteur spécifique de GDNF, est exprimé *in vitro* principalement par les CGM, suggérant qu'un mécanisme neuroprotecteur indirect est probable.

GDNF induit une régulation positive de GLAST *in vitro*, *ex vivo* et *in vivo*. Cette augmentation apparaît particulièrement marquée autour des photorécepteurs en dégénérescence chez la souris *rd1*. L'induction de GLAST par l'application de GDNF confirme la stimulation des CGM par ce facteur et suggère que GDNF pourrait agir en modulant un excès de glutamate dans les rétines *rd1*.

Les mesures de glutamate et de glutamine libres intra-rétiniens après injection sous-rétinienne de GDNF ne mettent cependant pas en évidence de modification de concentration.

Discussion

I. RÉSUMÉ DES PRINCIPAUX RÉSULTATS

Notre travail nous a permis de démontrer qu'il existe au cours de la dégénérescence des photorécepteurs chez la souris *rd1* :

- Une augmentation globale du turn-over du glutamate associant :
 - (1) une augmentation progressive des niveaux de glutamate libre au sein du tissu rétinien,
 - (2) une augmentation des phénomènes de recapture du glutamate via le transporteur GLAST, et (3) une augmentation du processus de dégradation du glutamate grâce à l'action de la GS se traduisant par une augmentation des niveaux de glutamine libres.
- Cet excès de glutamate intra-rétinien contribue à la dégénérescence des bâtonnets puisque l'administration par voie générale d'un antagoniste des récepteurs ionotropiques du glutamate de type AMPA/kainate permet de ralentir leur perte.

Par ailleurs, des travaux dans notre laboratoire ayant établi le rôle neuroprotecteur de GDNF dans ce modèle de rétinopathie pigmentaire (Frasson et coll., 1999b), nous avons cherché à déterminer si GDNF pouvait exercer son rôle neuroprotecteur de manière indirecte via les CGM, en modulant les systèmes endogènes de défense contre le glutamate. Nos résultats montrent que :

- L'expression des messagers codant pour les récepteurs de GDNF ne diminue pas au cours de la dégénérescence des photorécepteurs *in vivo*, impliquant donc que ces messagers ne sont pas exprimés exclusivement par les photorécepteurs dans notre modèle. *In vitro*, ces messagers sont fortement exprimés par les CGM, suggérant ainsi la possibilité d'un mécanisme d'action indirecte faisant intervenir les CGM.
- GDNF induit l'expression de GLAST par les CGM *in vitro*, *ex vivo* et *in vivo*, particulièrement autour des photorécepteurs en dégénérescence.
- En revanche, nos travaux n'ont pas permis de mettre en évidence une modification significative des niveaux de glutamate et de glutamine libres intra-rétiens après administration de GDNF.

II. GLUTAMATE ET DÉGÉNÉRESCENCE DES PHOTORÉCEPTEURS CHEZ LA SOURIS *rd1*

A. Altérations du métabolisme du glutamate au cours de la dégénérescence des photorécepteurs

1. Apport des acquis dans l'état actuel des connaissances

Des altérations du métabolisme des acides aminés ont été observées dans de nombreux modèles de rétinopathie pigmentaire (Ulshafer et coll., 1990 ; Fletcher et Kalloniatis, 1996 ; Fletcher, 2000 ; Orr et coll., 1976 ; Kalloniatis et Tomisich, 1999 ; Nakazawa, 1993 ; Noro et coll., 1994 ; Schmidt et Berson, 1978 ; Okada et coll., 2000). La diminution du niveau rétinien de taurine au cours de la dégénérescence des photorécepteurs ainsi que l'augmentation du niveau de glycine ont déjà été rapportés chez la souris *rd1* et le rat RCS (Orr et coll., 1976 ; Schmidt et Berson, 1978 ; Okada et coll., 2000). La diminution du niveau de taurine, d'une part, s'explique par la perte des cellules photoréceptrices qui contiennent un taux élevé de cet acide aminé (Fletcher, 2000 ; Orr et coll., 1976 ; Schmidt et Berson, 1978). L'augmentation du niveau de glycine, d'autre part, a été rattachée chez le rat RCS à une augmentation de l'immuno-réactivité glycinergique des cellules bipolaires (Fletcher, 2000). Comme les cellules bipolaires obtiennent leur glycine par l'intermédiaire des cellules amacrines au travers de jonctions serrées (ou gap-junctions), il a été proposé que l'augmentation du niveau glycinergique des cellules bipolaires soit liée à une perturbation de la perméabilité de ces jonctions serrées dans la rétine en dégénérescence (Fletcher, 2000).

En ce qui concerne les niveaux de glutamate, Ulshafer et coll. ont été les premiers à démontrer une augmentation du niveau des acides aminés excitateurs (glutamate et aspartate) autour des photorécepteurs en dégénérescence chez le poulet *rd/rd* (Ulshafer et coll., 1990). Chez le rat RCS, Fletcher et Kalloniatis ont observé une augmentation des niveaux d'aspartate et de glutamine (les deux étant soit précurseurs, soit métabolites du glutamate) associée à des perturbations de la synthèse du glutamate et du GABA par dysfonctionnement des CGM

(Fletcher et Kalloniatis, 1996 ; Kalloniatis et Tomisich, 1999 ; Fletcher, 2000). Chez la souris *rds/rds* (qui présente une mutation sur le gène de la peripherine), une accumulation de glutamate a également été constatée dans les segments internes des photorécepteurs (Nakazawa, 1993 ; Noro et coll., 1994). Chez la souris *rdl*, dans une étude remontant à 1976, Orr et coll. n'avaient cependant pas mis en évidence de différence de concentration en glutamate entre les rétines de souris *rdl* et les souris contrôles ; ces résultats sont en contradiction avec les nôtres. Dans la mesure où nos dosages de taurine et de glycine sont très proches de ceux rapportés par ailleurs dans la même étude par Orr et coll. (1976), les résultats contradictoires concernant le glutamate ne peuvent pas s'expliquer par l'utilisation de méthodes de normalisation différentes. En effet, leurs résultats sont exprimés en milli-moles par rapport au poids sec de l'échantillon, alors que nous avons choisi d'exprimer le niveau de chaque acide aminé en pourcentage de la somme de l'ensemble des acides aminés quantifiés dans l'échantillon par l'Amino Acid Analyzer® (voir le chapitre *Matériels et Méthodes*). La technique de quantification enzymatique de faible résolution utilisée à cette époque par Orr et coll. pour réaliser les dosages du glutamate explique probablement les divergences entre nos résultats.

2. Difficultés et limites de nos résultats

a) Dosages des acides aminés “ libres ” rétinien

Le dosage de chaque acide aminé, tel qu'il a été effectué dans notre étude, reflète la quantification globale de cet acide aminé dans le tissu rétinien au moment du dosage, mais ne préjuge en rien de la localisation intra- ou extra-cellulaire de l'augmentation ou de la diminution observée. Les différentes études quantitatives déjà publiées analysant des niveaux d'acides aminés se heurtent toutes à la même limite (Ulshafer et coll., 1990 ; Orr et coll., 1976 ; Okada et coll., 2000). Seules les études qualitatives utilisant des marquages immuno-histo-chimiques permettent une évaluation des variations de compartiment des acides aminés (Ulshafer et coll., 1990 ; Fletcher et Kalloniatis, 1996 ; Fletcher, 2000 ; Kalloniatis et Tomisich, 1999 ; Nakazawa, 1993 ; Noro et coll., 1994). L'association de ces deux approches, dosage quantitatif et immuno-histo-chimie, permettrait d'aborder de manière complémentaire

les variations observées des niveaux de glutamate, glutamine, glycine dans la rétine *rd1* au cours de la dégénérescence.

b) Normalisation des résultats

Le choix de l'expression des résultats de quantification des différents acides aminés considérés en fonction de l'ensemble des acides aminés quantifiés dans chaque échantillon (i.e. taurine, thréonine, serine, asparagine, glutamate, glutamine, glycine, alanine, citrulline, valine, isoleucine, leucine, tyrosine, phénylalanine, ornithine, lysine et arginine) a été retenu car il nous semblait être celui qui biaisait le moins nos données. En effet, dans les autres études, les résultats sont exprimés soit en fonction du poids sec de l'échantillon (Orr et coll., 1976 ; Ulshafer et coll., 1990), soit en fonction des protéines totales contenues dans l'échantillon. La mesure du poids sec de chaque rétine de souris nécessite la lyophilisation de l'échantillon, puis sa pesée, avant l'extraction des acides aminés. Si la pesée d'une rétine adulte sur une balance est déjà difficile et sujette à des aléas, celle de rétine de souris *rd1* de 1 jour s'est avérée peu fiable avec les instruments de mesure dont nous disposions. D'autre part, la quantification des protéines de chaque échantillon nécessite la dilution de l'échantillon dans un tampon d'extraction protéique, ce qui ne peut se faire qu'après avoir extrait les acides aminés afin de ne pas en perdre. Le dosage protéique est donc réalisé classiquement sur le culot obtenu après extraction des acides aminés, et nécessite donc une deuxième manipulation de l'échantillon. De plus, il s'est avéré que les résidus du tampon utilisé pour l'extraction des acides aminés interférait avec la réaction colorimétrique quantitative de Bradford et introduisait de ce fait des erreurs dans la quantification des protéines. Nous avons donc finalement choisi d'exprimer nos résultats en pourcentage de l'ensemble des acides aminés quantifiés dans l'échantillon considéré, cette méthode de normalisation nous semblant limiter au maximum l'introduction de biais, puisque, dans le même temps expérimental, le niveau d'acide aminé d'intérêt et la référence sont mesurés.

B. Arguments en faveur d'une toxicité du glutamate vis-a-vis des photorécepteurs au cours de la dégénérescence rétinienne chez la souris *rdl*.

Dans la mesure où la toxicité du glutamate a été démontrée, à la fois sur les neurones de la rétine interne et sur les terminaisons des photorécepteurs (Lucas et Newhouse, 1957 ; Olney, 1969 ; Yazulla et Kleinschmidt, 1980 ; Olney, 1982 ; Ingham et Morgan, 1983 ; Sattayasai et Ehrlich, 1987 ; Sattayasai et coll., 1989 ; Sahel et coll., 1991), nous avons essayé de déterminer si l'augmentation du glutamate libre intra-rétinien observée pouvait participer au processus de dégénérescence des bâtonnets chez la souris *rdl*.

1. Effet neuroprotecteur d'un antagoniste des récepteurs ionotropiques du glutamate

Dans le système nerveux central, la neurotransmission excitatrice rapide est générée par l'activation par le glutamate des récepteurs ionotropiques glutamatergiques de type AMPA/kaïnate (Hollmann et Heinemann, 1994). La stimulation excessive de ces récepteurs conduit à la mort neuronale par excito-toxicité (Olney et coll., 1972). Nous avons étudié l'effet d'un antagoniste des récepteurs AMPA/kaïnate (CNQX) sur la survie des bâtonnets afin de déterminer si l'augmentation intra-rétinienne de glutamate pouvait jouer un rôle dans la mort des photorécepteurs. L'analyse des rétines de souris *rdl* traitées par CNQX démontre une protection histologique modérée (+ 25%) mais statistiquement significative des bâtonnets, cette protection étant plus particulièrement évidente à proximité de la tête du nerf optique (voir Fig. 40). Un tel résultat peut cependant sembler inattendu dans la mesure où les photorécepteurs n'expriment pas les récepteurs ionotropiques du glutamate (Morigiwa et Vardi, 1999; Pourcho et coll., 2001). En effet, au niveau des photorécepteurs, les deux seules cibles du glutamate sont 1) un transporteur couplé à des canaux calciques (Picaud et coll., 1995a et 1995b) et 2) certains récepteurs métabotropiques dont l'activation permet la modulation de la concentration intra-cellulaire de calcium (Koulen et coll., 1999). L'effet

protecteur du CNQX observé ne peut donc s'exercer directement sur les bâtonnets. L'expression des récepteurs ionotropiques de type AMPA/kainate dans la couche nucléaire externe est concentrée dans la région post-synaptique en regard du site de libération du glutamate (Morigiwa et Vardi, 1999; Pourcho et coll., 2001), nos résultats suggèrent de ce fait que la suppression de l'excitation glutamatergique post-synaptique pourrait ralentir la dégénérescence des photorécepteurs. La possibilité qu'un excès de glutamate puisse affecter les photorécepteurs de manière rétrograde semble confirmée par les changements aigus et chroniques déjà rapportés au niveau des segments externes des photorécepteurs et de leurs terminaisons synaptiques suite à l'injection intra-rétinienne de kainate chez le poulet (Sattayasai et coll., 1989). Il reste cependant regrettable que nous n'ayons pas réussi à conclure sur la protection fonctionnelle potentielle de CNQX. En effet, le bruit de fond trop important de nos enregistrements ERG n'a pas permis de mettre en évidence de différence significative entre le groupe d'animaux traités avec du CNQX et le groupe d'animaux traités avec du sérum physiologique ; il n'a pas permis non plus d'exclure une protection fonctionnelle. Une nouvelle procédure d'enregistrement, actuellement en évaluation dans le laboratoire, devrait permettre de mieux traiter le signal. Elle consiste à enregistrer la réponse électrique, non plus à 10 flashes séparés de 2 minutes, mais à 50 flashes séparés de quelques secondes.

2. Régulation positive des mécanismes endogènes de défense contre l'excitotoxicité glutamatergique au cours du processus de dégénérescence

L'hypothèse de l'occurrence de phénomènes de toxicité liée à un excès de glutamate chez la souris *rd1* est renforcée par l'augmentation des mécanismes endogènes de neuroprotection contre l'excito-toxicité au cours de la dégénérescence des photorécepteurs. En effet, les deux mécanismes endogènes de défense contre l'excito-toxicité dans la rétine et le système nerveux central sont, d'une part, l'augmentation de la recapture du glutamate présent dans la fente synaptique par le transporteur glial GLAST (Rauen et coll., 1998) et, d'autre part, le métabolisme de ce glutamate en glutamine par la GS exprimée sélectivement par les cellules gliales (Linser et coll., 1984 ; Erecinska et Silver, 1990). Nos résultats démontrent que les niveaux d'expression de GLAST augmentent au cours de la dégénérescence des

photorécepteurs (Fig. 38A & C). L'analyse des profils d'expression des gènes dans les rétines *rdl* et contrôles par technique de micro-array réalisée dans le laboratoire par Frédéric Chalmel (sous presse) confirme ce résultat de manière indépendante et précise que le gène codant pour GLAST est l'un des gènes régulés le plus positivement dans la rétine *rdl* par rapport à la rétine contrôle et ce, de manière très précoce. Par ailleurs, les niveaux d'expression des messagers codant pour la GS augmentent à J₈ et J₁₅ dans les rétines *rdl* (Fig. 39A), alors que les messagers codant pour le marqueur glial vimentine restent à un niveau comparable entre les deux souches à J₈ et J₁₅ (Fig. 39B). L'absence de modification du messenger de la vimentine démontre que l'augmentation de GS – et de GLAST – n'est pas la conséquence d'une prolifération des CGM ou de phénomènes de concentration de nos préparations d'ARN de rétines *rdl* (concentration secondaire à la dégénérescence des photorécepteurs). L'augmentation de l'expression de la GS coïncide avec l'augmentation du niveau de glutamine libre observée dans les rétines *rdl* de J₁₅ à J₃₅ (Fig. 36B & 37B).

La persistance cependant d'une augmentation des niveaux de glutamate libre dans les rétines *rdl* alors même que GLAST est régulé de manière positive peut apparaître contradictoire. Dans notre cas, deux hypothèses peuvent être proposées pour expliquer ce résultat.

Premièrement, Rossi et coll. (2000) ont démontré que, au cours de l'ischémie sévère, la libération de glutamate est avant tout le résultat d'un fonctionnement inverse des transporteurs de glutamate exprimés par les cellules neuronales. Dans ce cas, il existe donc une augmentation conjointe de l'expression du transporteur et du glutamate, l'augmentation du glutamate étant secondaire à celle du transporteur. Bien que nous ne puissions exclure une telle hypothèse, cela ne nous semble pas applicable à notre cas d'étude puisque : (1) GLAST n'est pas exprimé par les neurones et (2) les niveaux de glutamine sont très significativement augmentés, ce qui implique un captage efficace du glutamate par les CGM via GLAST et son métabolisme en glutamine via l'activité de la GS.

Nous penchons plutôt en faveur de la deuxième hypothèse qui est la suivante. Il a été démontré que le niveau de glutamate augmente proportionnellement l'expression de GLAST dans des cultures de cellules astrogliales et, plus récemment, dans des cultures de CGM rétinienne (Duan et coll., 1999 ; Gegelashvili et coll. 1996 ; Taylor et coll., 2003). Dans ce

cas, il existe donc également une augmentation conjointe de l'expression du transporteur et du glutamate, mais l'augmentation de l'expression du transporteur est secondaire à celle du glutamate. Nous proposons donc que l'augmentation précoce du glutamate à J₈ induit la régulation positive de GLAST dans la rétine *rdl* (Fig. 38A & 38C). Les CGM capturent le glutamate et le transforment en glutamine grâce à l'activité de la GS, ce mécanisme de neuroprotection endogène étant efficace vers J₁₅ (le glutamate revient à un niveau normal et le niveau de glutamine augmente, voir Fig. 36A & 36B). Plus tardivement au cours de la dégénérescence (entre J₂₁ et J₃₅), la capacité des CGM à maintenir l'homéostasie du glutamate est dépassée, et les niveaux de glutamate montent (Fig. 36A).

Des données de Fletcher et Kalloniatis (1996) concernant la rétine de rat RCS vont dans le sens de cette dernière hypothèse et proposent une interprétation possible pour l'incapacité tardive des CGM à maintenir l'équilibre du glutamate. En mesurant le recaptage de glutamate-[H]³ et la durée de dégradation du glutamate au niveau du cytoplasme des CGM dans la rétine de rat RCS, Fletcher et Kalloniatis montrent tout d'abord que le recaptage de glutamate-[H]³ par les CGM est plus important dans les rétines de rat RCS que dans les contrôles, confortant ainsi notre résultat démontrant l'augmentation de l'expression de GLAST au cours de la dégénérescence dans la rétine *rdl* (Fig. 38). Ils observent ensuite que la dégradation du glutamate dans le cytoplasme des CGM est plus lente dans les rétines dystrophiques que dans les contrôles et expliquent ce dernier résultat par l'inhibition probable de l'activité de la GS par l'accumulation de glutamine (Fig. 36B) (Fletcher et Kalloniatis, 1996 ; Feng et coll., 1990).

3. Glutamate et synaptogenèse

Dans le système nerveux central, l'action des neurotransmetteurs est cruciale pour établir des connexions synaptiques fonctionnelles (Gan et coll., 2003). Le rôle précis du glutamate dans la phase initiale de la synaptogenèse reste mal compris ; il pourrait être impliqué dans la stabilisation des terminaisons pré-synaptiques (Gan et coll., 2003). Des niveaux anormaux de glutamate au cours d'une période critique du développement pourraient donc induire une perturbation des contacts synaptiques dans la rétine *rdl*. Blanks et coll. (1974a) ont ainsi

démontré que le premier changement ultra-structural détectable dans la rétine *rd1* est un défaut de maturation de la couche synaptique externe où des contacts anormaux entre les photorécepteurs et les cellules bipolaires sont observés. Ces anomalies sont dues à l'incapacité des cellules bipolaires à développer l'élément central de la "triade post-synaptique", impliquant que les signalisations inter-cellulaires nécessaires à l'établissement d'un contact synaptique et d'une synapse efficaces sont altérées dans la rétine *rd1* (Marc et coll., 2003). Nous proposons donc que, dans ce modèle, la mutation sur le gène de la beta-PDE, résultant en l'accumulation de GMPc au niveau des bâtonnets (Farber et coll., 1994), puisse également induire une dépolarisation continue des bâtonnets par l'ouverture prolongée de leurs canaux cationiques GMPc-dépendants. Cette dépolarisation des bâtonnets pourrait alors induire à son tour une libération continue de glutamate. La dérégulation des niveaux de glutamate au niveau de la fente synaptique pourrait de ce fait compromettre la connectivité synaptique et entraîner une altération de la maturation des photorécepteurs (Blanks et coll., 1974a ; Sattayasai et coll., 1989).

C. Conclusions

L'étude de la cinétique de dégénérescence des photorécepteurs chez la souris *rd1* démontre que la mort des bâtonnets et des cônes pourrait ne pas être le seul résultat de la mutation génétique sur le gène codant pour la sous-unité bêta de la phosphodiesterase, et qu'il pourrait exister des mécanismes annexes responsables de l'accélération de la perte des cellules photoréceptrices (*hypothèse de dommages cumulés* ou "*cumulative damage hypothesis*" selon Clarke et coll., 2000). A la lumière de nos résultats, il apparaît que l'augmentation des niveaux de glutamate rétinien contribue à la perte des bâtonnets et pourrait ainsi être, chez la souris *rd1*, un des mécanismes amplificateurs du processus dégénératif objectivés par Clarke et coll.

III. ÉTUDE DU MÉCANISME DE NEUROPROTECTION DE GDNF CHEZ LA SOURIS *rd1*

A. ÉTUDE DU RÔLE NEUROPROTECTEUR DE GDNF CHEZ LA SOURIS *rd1* : MÉCANISME DIRECT ET/OU INDIRECT ?

1. Apport des acquis dans l'état actuel des connaissances : les CGM expriment les messagers des récepteurs de GDNF chez la souris *rd1*

Dans le cerveau, GDNF exerce un rôle neuroprotecteur dans des affections neurodégénératives aussi bien aiguës que chroniques (Cunningham et Su, 2002 ; Nicole et coll., 2001). Dans la rétine, nous avons démontré précédemment que l'injection sous-rétinienne de GDNF permet une protection non seulement morphologique mais aussi fonctionnelle des photorécepteurs chez la souris *rd1* (Frasson et coll., 1999b). Le rôle neuroprotecteur de GDNF vis-à-vis des photorécepteurs a, depuis, été confirmé dans d'autres modèles de dégénérescence rétinienne, héréditaire ou non héréditaire (McGee Sanftner et coll., 2001 ; Wu et coll., 2002 ; Lawrence et coll., 2004). Les mécanismes responsables de l'action de GDNF restent toutefois totalement méconnus. Si *in vitro*, un effet neuroprotecteur direct a été observé sur des cultures de photorécepteurs immatures (Jing et coll., 1996 ; Politi et coll., 2001), de nombreux arguments corroborent aujourd'hui l'hypothèse selon laquelle GDNF exercerait également son action trophique sur les photorécepteurs grâce à un/des mécanisme(s) indirect(s) impliquant les CGM.

Premièrement, nos résultats indiquent que les récepteurs de GDNF – GFRalpha-1 et Ret – ne sont pas exprimés exclusivement par les photorécepteurs en dégénérescence dans la rétine *rd1*, dans la mesure où l'expression des ARNm de GFRalpha-1 et de Ret *in vivo* n'est pas réduite par la perte des bâtonnets et des cônes (Fig. 41A & 41C). L'absence de modification de l'expression du messager de Ret au cours de la dégénérescence est en accord avec la localisation en immuno-histo-chimie de Ret, diffuse à l'ensemble du tissu rétinien, observée par Jomary et coll. (1999). La localisation immuno-histo-chimie rétinienne de GFRalpha-1 reste par contre sujette à débat. Pour certains auteurs, GFRalpha-1 est localisé au niveau des CGM, de la couche plexiforme interne et de la couche des cellules ganglionnaires, un faible

marquage étant également observé au niveau des segments externes de photorécepteurs (Koeberle et Ball, 2002) ; pour d'autres l'expression de GFRalpha-1 est restreinte à la couche nucléaire externe (Harada et coll., 2002 ; Harada et coll., 2003). De telles divergences dans des observations immuno-histo-chimiques proviennent probablement de l'utilisation d'anticorps différents (voir également le paragraphe III-A.2.a.1. suivant). Nos résultats de biologie moléculaire démontrent en tous cas que l'expression du messager de GFRalpha-1 ne diminue pas au cours de la dégénérescence dans la rétine *rd1*, comme on aurait pu s'y attendre si son expression avait été restreinte aux photorécepteurs, mais au contraire augmente (Fig. 41A). Ce résultat implique donc que le messager de GFRalpha-1 n'est pas exclusivement exprimé par les photorécepteurs, au moins dans la rétine en dégénérescence.

Deuxièmement, nos études comparatives *in vitro* montrent que l'ARNm de GFRalpha-1 est exprimé de manière prédominante par les CGM, alors que l'ARNm de Ret est plus largement distribué parmi les cellules rétinienne en culture (Fig. 41D).

Ainsi, nos observations suggèrent que GDNF pourrait exercer un effet trophique vis-à-vis des photorécepteurs chez la souris *rd1* par un mécanisme indirect faisant intervenir les CGM. La présence des récepteurs de GDNF au niveau des CGM est encore confirmée par les modifications induites au niveau des CGM suite à l'administration de GDNF. Nous avons ainsi précédemment démontré que l'injection intra-oculaire de GDNF augmente l'immuno-réactivité de la protéine Glial Fibrillar Acidic Protein (GFAP) – un marqueur des CGM – dans la rétine *rd1*, impliquant que les CGM sont activées après le traitement par GDNF (Frasson et coll., 1999b). *In vitro*, GDNF stimule également l'expression de facteurs trophiques endogènes par les CGM (Harada et coll., 2003). Dans notre étude, nous confirmons l'activation secondaire des CGM en démontrant une augmentation, après traitement par GDNF, de la protéine gliale GLAST autour des photorécepteurs en dégénérescence chez la souris *rd1* (Fig. 42 & 43).

2. Difficultés et limites de nos résultats

a) Difficultés méthodologiques

(1) Localisation de GFRalpha-1

La localisation précise et la quantification de l'expression de la protéine GFRalpha-1 dans la rétine *rd1* au cours de la dégénérescence n'ont pas pu être finalisées en raison de l'absence d'anticorps anti-GFRalpha-1 efficace, que ce soit en immuno-histo-chimie (marquages) ou en biochimie (Western blots) (voir *Matériels et Méthodes*). Notre localisation de GFRalpha-1 reste " indirecte ". Nous n'avons en effet pu mesurer que l'expression des messagers codant pour ce récepteur. De plus, même si notre étude de la cinétique d'expression des messagers *in vivo* démontre clairement que l'ARNm de GFRalpha-1 n'est pas exprimé exclusivement par les photorécepteurs, nos résultats auraient tiré avantage à être complétés par une étude de la distribution des ARNm de GFRalpha-1 sur des coupes de rétines *rd1* en utilisant les techniques d'hybridation *in situ*.

(2) GDNF recombinant

Ainsi que cela a été précisé dans le chapitre *Matériels et Méthodes*, nous avons rencontré de nombreuses difficultés à reproduire nos résultats en utilisant le GDNF recombinant. C'est pour cette raison essentiellement que les expériences ont été conduites *in vitro*, *ex vivo* et *in vivo*. L'utilisation des modèles *in vitro* et *ex vivo* nous ont permis d'utiliser des surnageants de cellules COS-1 transfectées synthétisant du GDNF et ainsi de reproduire les résultats que nous avons précédemment obtenus avec le GDNF " commercial ".

Il apparaît, avec le recul, que le rhGDNF est très instable et, que pour obtenir des résultats interprétables, l'expérimentateur doit s'assurer de la qualité de l'aliquot utilisé en veillant à :

- ne jamais vortexer un aliquot contenant du rhGDNF
- utiliser un aliquot contenant du rhGDNF de moins de 3 mois
- confirmer systématiquement l'absence de dégradation en réalisant un test ELISA AVANT et APRES utilisation (afin d'éliminer une dégradation en cours de manipulation). C'est seulement en l'absence de dégradation pré- et post-expérimentation que le résultat pourra convenablement être interprété.

b) Limites de nos résultats

La voie de signalisation de GDNF via l'activation des récepteurs GFRalpha-1 puis Ret est la voie classique de signalisation de ce facteur neurotrophique (Jing et coll., 1996 ; Treanor et coll., 1996 ; Durbec et coll., 19967 ; Trupp et coll., 1996). Néanmoins, afin de démontrer définitivement que l'action neuroprotectrice de GDNF passe par l'activation de GFRalpha-1, nous aurions pu co-injecter du GDNF recombinant et un anticorps bloquant anti-GFRalpha-1 à des souris *rdl* et ensuite mesurer la persistance ou la disparition de l'effet neuroprotecteur :

- en l'absence de tout effet neuroprotecteur, nous aurions pu conclure que GDNF exerce son effet protecteur exclusivement via la voie de signalisation utilisant GFRalpha-1 et, de ce fait, démontrer que les CGM jouent un rôle clé dans la médiation de cet effet neuroprotecteur
- en cas de persistance partielle de l'effet neuroprotecteur de GDNF, nous aurions pu conclure que GDNF exerce son effet neuroprotecteur pour partie via GFRalpha-1 et donc via les CGM
- en cas de persistance complète de l'effet neuroprotecteur, nous aurions pu conclure que l'effet de GDNF ne passe pas par l'activation de GFRalpha-1 mais par celle de GFRalpha-2 ou d'une autre voie non identifiée. Ce dernier cas de figure semble toutefois peu probable.

B. GDNF exerce-t-il son rôle neuroprotecteur chez la souris *rdl* en modulant les niveaux intra-retiniens de glutamate ?

Marco et coll. (2002) ont démontré que, au niveau du striatum, l'injection d'acides aminés excitateurs (quinolinate et kaïnate) induit une augmentation de l'expression des messagers codant pour GDNF et GFRalpha-1, sans modification associée du messenger de GFRalpha-2. Le profil d'expression des ARNm de GDNF et de ses récepteurs au cours de la dégénérescence chez la souris *rdl* suit une évolution similaire. La régulation positive de voies d'activation impliquant GDNF et GFRalpha-1 au cours du processus de dégénérescence

pourrait de ce fait être en rapport avec les perturbations du turn-over du glutamate décrites précédemment et la toxicité qui en découle.

GDNF exerce un rôle neuroprotecteur dans de nombreuses affections neurodégénératives aiguës et chroniques (Cunningham et Su, 2002 ; Nicole et coll., 2001), y compris dans un modèle excito-toxique de maladie de Huntington (Alberch et coll., 2002). L'augmentation de l'expression de GLAST par GDNF dans la rétine *rd1* pose la question de savoir si GDNF pourrait exercer, indirectement via les CGM, partie ou totalité de son action trophique en potentialisant autour des photorécepteurs en dégénérescence des mécanismes endogènes de défense contre l'excito-toxicité. Nous avons donc mesuré les niveaux intra-rétiniens d'acides aminés libres après traitement par GDNF ou PBS (contrôle) chez des souris *rd1* à différents stades de la dégénérescence. Nos résultats (Fig. 45) ne montrent pas de modification significative des niveaux intra-rétiniens de glutamate et glutamine entre les souris *rd1* traitées par GDNF et celles traitées par PBS.

Deux hypothèses peuvent être avancées pour expliquer ces résultats. Premièrement, la régulation positive de GLAST pourrait ne pas être suffisante pour empêcher l'augmentation de glutamate. Deuxièmement, nos mesures des niveaux d'acides aminés libres ne différencient pas les contenus intra- et extra-cellulaires des rétines *rd1* ; le déplacement d'un compartiment à un autre du glutamate grâce au transporteur GLAST (par exemple de l'espace synaptique au cytoplasme des CGM) pourrait ainsi passer totalement inaperçu en l'absence de métabolisme du glutamate en glutamine par la GS.

Au total, il nous est difficile de conclure quant à l'influence de GDNF sur les niveaux extra-cellulaires de glutamate. Néanmoins, il semble peu probable que l'action neuroprotectrice principale de GDNF passe par ce mécanisme.

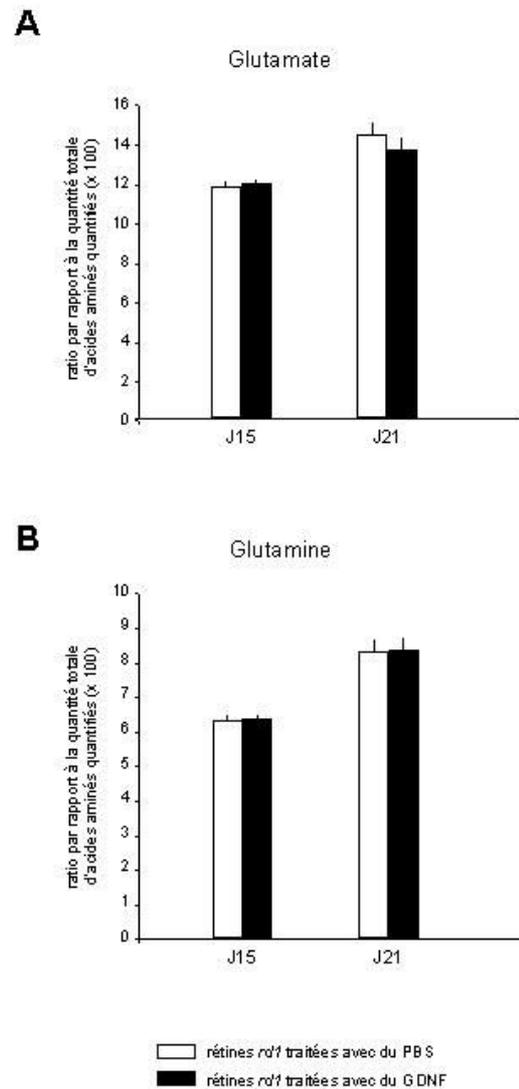


Figure 45. Niveaux de glutamate et de glutamine libres dans les rétines *rd1* et contrôles après injection sous-rétinienne de GDNF ou PBS.

A : glutamate, **B** : glutamine. Les niveaux d'acides aminés sont exprimés en pourcentage par rapport à la somme de l'ensemble des acides aminés quantifiés par l'Analyzer. Les données numériques correspondent à la moyenne \pm SEM de mesures indépendantes ($n = 11$ pour chaque âge et souche).

Conclusions & perspectives

En dépit des difficultés méthodologiques que nous avons rencontrées et des limites de nos résultats, nos données peuvent s'intégrer dans le raisonnement suivant : 1) des altérations du métabolisme rétinien des acides aminés sont présentes chez la souris *rd1* comme dans d'autres modèles de RP (Fletcher, 2000) ; 2) des phénomènes d'excito-toxicité au glutamate existent au cours de la dégénérescence, stimulant les mécanismes de défense endogène : l'augmentation de l'expression du transporteur glial GLAST et de la glutamine synthétase ; 3) Une des voies de l'action neuroprotectrice de GDNF pourrait être la potentialisation, via les CGM, des mécanismes de défense endogène contre l'excito-toxicité, particulièrement autour des photorécepteurs en dégénérescence.

Le type d'approche que nous avons utilisée afin d'étudier un mécanisme neuroprotecteur potentiel de GDNF reste cependant limité, car il est difficile d'isoler, *in vivo*, un mécanisme précis parmi de multiples autres probables. La sélection de la voie d'action que nous avons étudiée a reposé sur les données disponibles de la littérature qui indiquaient que GDNF induisait l'expression de certains transporteurs de glutamate (Coccia et coll., 1999 ; Naskar et coll., 2000 ; Bonde et coll., 2003). Si nous avons montré que GDNF module bien en effet l'expression de GLAST par les CGM dans la rétine *rd1*, ce mécanisme s'avère cependant limité et de nombreuses autres voies d'action restent possibles. Seule une analyse globale des variations d'expression du transcriptome entre des rétines *rd1* traitées par GDNF et des rétines contrôles permettrait de distinguer les différentes familles de gènes régulées positivement, ou négativement, de manière significative par GDNF. Une telle approche permettrait ainsi de différencier les mécanismes s'intégrant dans la réponse neuroprotectrice globale au GDNF des épiphénomènes qui, par définition, sont accessoires. Même si GDNF reste un agent pharmacologique prometteur capable de retarder la perte des photorécepteurs dans différents modèles de RP, la compréhension des voies de signalisation sous-tendant l'effet trophique des facteurs de croissance demeure essentielle car elle constitue l'étape préalable nécessaire à l'émergence de nouvelles stratégies thérapeutiques dans les rétinopathies pigmentaires.

Parallèlement aux travaux présentés dans cette thèse, nous avons entrepris l'étude d'un modèle de dégénérescence rétinienne non héréditaire : le décollement de rétine rhégmato-gène chez l'homme. Ce modèle présente des similitudes physiopathologiques avec la rétine *rd1* puisque : 1) il existe une dégénérescence des photorécepteurs, 2) les photorécepteurs meurent

par apoptose (Arroyo et coll., 2005), 3) une augmentation des niveaux intra-vitréens de glutamate est associée (Weber et coll., 1995), 4) et que GDNF exerce une action neuroprotectrice vis-à-vis des photorécepteurs en dégénérescence (Wu et coll., 2002). Les travaux en cours consistent à analyser les variations transcriptomiques entre des rétines “détachées” et des rétines contrôles afin de mieux comprendre les mécanismes qui concourent à la mort des photorécepteurs et de proposer, à terme, des traitements neuroprotecteurs complémentaires à la prise en charge chirurgicale actuelle. La méthodologie utilisée et les premiers résultats sont présentés ci-après.

Travaux en cours

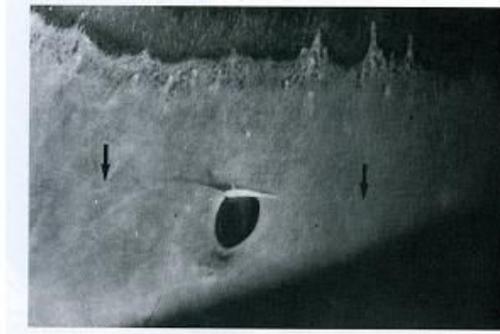
ÉTUDE DES VARIATIONS
TRANSCRIPTOMIQUES AU COURS DU
DÉTACHEMENT DE RÉTINE CHEZ
L’HOMME

I. DÉFINITIONS & OBJECTIFS

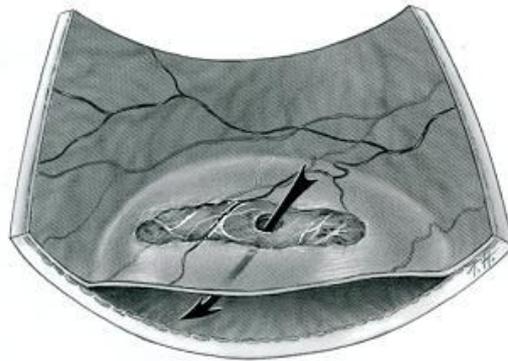
Le décollement de rétine (DR) constitue un autre modèle de dégénérescence des photorécepteurs. Il s'agit d'un modèle de rétinopathie dégénérative non héréditaire au cours de laquelle la rétine neurosensorielle est séparée l'épithélium pigmentaire (EP) et de la choroïde sous-jacents. Ce clivage prive les photorécepteurs d'un support métabolique essentiel puisque les cellules de l'EP jouent un rôle dans le métabolisme de la vitamine A, libèrent des facteurs trophiques, permettent la dégradation des disques des segments externes et apportent aux cellules photoréceptrices de l'oxygène et des nutriments venant de la choroïde.

Le DR "rhegmatogène" survient secondairement à une déchirure rétinienne (du grec *rhegma* = déchirure). Cette déchirure permet le passage de liquide depuis la cavité vitrénne vers l'espace sous-rétinien (Fig. 46). Le DR rhegmatogène se différencie du DR "exsudatif", au cours duquel il apparaît une extravasation liquidienne sous la rétine sans déchirure associée (hypertension artérielle, toxémie gravidique, pathologies vasculaires, tumeurs...), et du DR "tractionnel", observé notamment au cours de la rétinopathie diabétique ischémique proliférante, et au cours duquel la rétine est rétractée par des vaisseaux anormaux.

A.



B.



C.

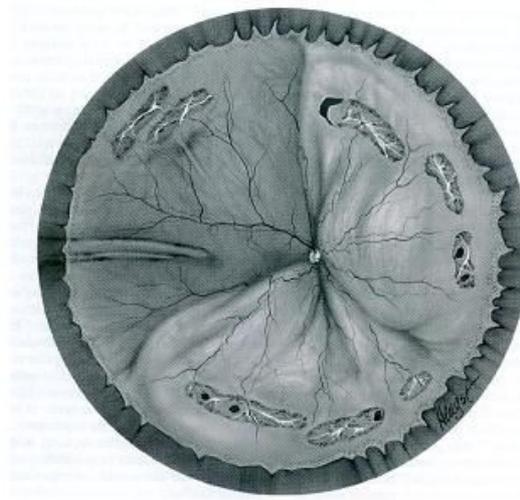


Figure 46. Décollement de rétine rhégmato-gène.

A : Déchirure en « fer à cheval ». **B** : DR rhégmato-gène débutant à partir d'une palissade trouée. Du liquide passe de la cavité vitréenne vers l'espace sous-rétinien entraînant le clivage entre l'EP et la rétine neurosensorielle.

C : Extension du DR de proche en proche à l'ensemble de la rétine (ici DR nasal, inférieur et postérieur)

Les principales étiologies du DR rhégmato-gène sont :

- la myopie (notamment si supérieure à - 6 dioptries)
- la chirurgie de la cataracte (DR de l'aphaque ou du pseudophake) : 2% des patients font un DR au décours, parfois plusieurs années après l'intervention sur le cristallin.
- les traumatismes (DR dit " post-traumatique ")
- l'âge (on parle alors de DR " idiopathique ")

L'évolution spontanée est péjorative : elle se fait vers l'extension inexorable du DR à l'ensemble de la rétine. La rétine décollée subit en quelques semaines des lésions irréversibles pouvant conduire à la cécité.

La complication la plus fréquente du DR est la prolifération vitréo-rétinienne ou PVR (8-10% des DR). Il s'agit de l'organisation de tissus cicatriciels intra-oculaires. On parle de " prolifération " car les cellules prolifèrent, et " vitréo-rétinienne " car la cicatrice affecte la rétine et le vitré. Selon sa topographie et son degré de sévérité, la PVR est classée en différents stades. Sur le plan physiopathogénique, la PVR résulte de la migration de cellules de l'EP dans la cavité vitréenne au travers de la déchirure rétinienne. Les cellules de l'EP se différencient et prolifèrent à la surface de la rétine (et parfois sous la rétine), s'organisant en membranes qui, en se contractant, exercent des tractions rétinienne et entretiennent le DR.

Le traitement, à ce jour, est uniquement chirurgical : son principe est d'obturer la déchirure rétinienne périphérique afin de stopper le passage de liquide sous la rétine. Le liquide sous-rétinien résiduel est ensuite réabsorbé par l'EP et la choroïde, ce qui permet à la rétine de se réappliquer. Dans les DR non compliqués, le pronostic anatomique (environ 90 % de succès) et fonctionnel du traitement chirurgical est d'autant meilleur qu'il est précoce, surtout si la macula est soulevée. Dans les cas compliqués de PVR, une vitrectomie est réalisée, les membranes fibreuses cicatricielles sont disséquées et retirées, puis la rétine réappliquée à l'aide de gaz ou d'huile de silicone. Dans les cas très évolués, il peut être nécessaire de sacrifier la rétine périphérique afin de pouvoir espérer réappliquer la rétine centrale (pôle postérieur) : on réalise alors une " rétinectomie ".

Récemment, des études ont démontré l'intérêt d'un traitement pharmacologique neuroprotecteur afin de prévenir au maximum la dégénérescence des photorécepteurs. Wu et

coll. (2002) ont ainsi démontré que, chez le rat, l'administration intra-oculaire de GDNF retarde la dégénérescence des photorécepteurs et prévient la prolifération gliale sous-rétinienne. Le Nerve Growth Factor (NGF) a également montré un effet neuroprotecteur dans cette indication et pourrait permettre, combiné au traitement chirurgical, d'améliorer la survie des photorécepteurs de manière significative (Sun et coll., 2003).

Afin d'analyser les événements qui concourent à la dégénérescence des photorécepteurs au cours du DR chez l'homme et d'identifier de nouveaux facteurs neuroprotecteurs, nous avons entrepris d'étudier les variations transcriptomiques qui existent entre des rétines " normales " et des rétines " décollées ".

II. MATÉRIELS ET MÉTHODES

Nous avons tout d'abord sollicité et obtenu l'accord du comité d'éthique afin de pouvoir récupérer des fragments de rétines humaines lors de procédures chirurgicales comprenant une rétinectomie. Nous avons ensuite constitué deux groupes d'échantillons à comparer :

- Groupe " DR ", constitué d'échantillons de rétine humaine réséquée lors des procédures de rétinectomies dans différents centres en France et en Grande-Bretagne.
- Groupe " contrôle ", rassemblant des échantillons de rétine humaine de patients indemnes de toute pathologie oculaire, prélevés post-mortem (dans les douze heures suivant le décès) dans les banques de cornées d'Amsterdam (Netherlands Ophthalmic Research Institute, Amsterdam, Pays-Bas) et de Venise (Fondazione Banca degli Occhi del Veneto, Italie).

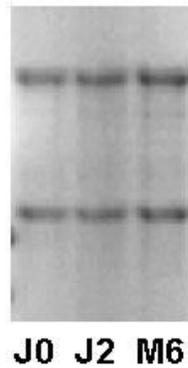
A. Centres participants

Le recueil des échantillons de rétine humaine pathologique a été réalisé dans plusieurs centres hospitaliers :

- CHU de BordeauxPr JF Korobelnik
- Hôpital Lariboisière, ParisPr A Gaudric, Dr R Tadayoni
- CHNO des Quinze-Vingts, ParisPr JA Sahel, Dr PO Barale
- Fondation Rothschild, ParisDrs G Caputo et F Metge
- Hôpital du Kremlin-BicêtreDr E Frau
- Moorfields Eye Hospital, LondresDr DG Charteris

Afin de pouvoir étudier les variations du transcriptome au cours du décollement de rétine chez l'homme, nous avons dû élaborer un moyen de prévenir la dégradation des ARN entre les lieux de prélèvements (blocs opératoires) et le lieu de purification (notre laboratoire).

A.



B.



Figure 47. Purification des ARN sur gradient de chlorure de césium.

A. Les échantillons sont immergés immédiatement après le recueil dans une solution de $\text{GHCl } 6\text{M}$. Le profil des ARN obtenus après purification sur gel dénaturant montre une absence de dégradation des ARN, que ce soit après purification immédiate (J0), après purification différée de 72 heures, ou après une congélation de 6 mois.

B. Kit d'extraction mis au point pour la conservation des échantillons prélevés dans différents centres hospitaliers. **a**, l'échantillon est immédiatement immergé dans un tube de 4 ml contenant 2,4 ml de $\text{GHCl } 6\text{M}$. **b-c-d**, le tube est refermé, retourné, puis placé sur un agitateur pendant 10 mn. **e**, une fiche de renseignements cliniques est remplie anonymement par le préleveur. **f**, le spécimen est placé dans un tube rigide pour le transport puis dans une enveloppe à bulles (**g**) et le bordereau pré-imprimé signé et daté (**h**). **i**, le prélèvement est envoyé au laboratoire. Dès la réception (**j**), l'échantillon est homogénéisé avec un polytron (**k**) et les ARN purifiés par centrifugation sur gradient de césium grâce à une ultracentrifugeuse (**l**).

B. Mise au point d'un système de conservation d'ARN permettant une purification différée sans dégradation – Kit de prélèvement “ JOURNAL ”

Le problème de la conservation des ARN entre les sites de prélèvement des tissus (blocs opératoires) et de purification des ARN (laboratoire) a été résolu grâce à la mise au point et la validation d'un protocole simple d'utilisation permettant la conservation des ARN sans dégradation (72 heures à température ambiante, 6 mois à -80°C).

Nous avons immergé des morceaux de rétine de porc de la taille approximative d'un prélèvement humain dans du chlorure de guanidine 6 M (GHCl 6 M ; Cox, 1968) et avons étudié la durée de conservation des ARN dans ces tissus. Trois conditions ont été arrêtées :

- contrôle : purification sur gradient de chlorure de césium des ARN immédiatement après immersion du tissu dans le GHCl 6 M.
- H₇₂ : immersion dans le GHCl 6 M au bloc opératoire, conservation à température ambiante, purification sur gradient de chlorure de césium 72 heures après au laboratoire. Ces 72 heures représentent le temps maximum estimé pour que l'échantillon nous parvienne grâce à un transporteur privé.
- M₆ : immersion dans le GHCl 6 M au bloc opératoire, conservation à température ambiante 72 heures puis congélation 6 mois à - 80 °C ; purification sur gradient de chlorure de césium 6 mois après réception de l'échantillon congelé.

Après purification, nous avons comparé le profil des ARN obtenus sur gel dénaturant ; aucune dégradation n'a été observée (Figure 47A).

Cela nous a permis de mettre au point un “ kit d'extraction ” (Figure 47B) comprenant :

- des tubes de 4 ml remplis avec 2,4 ml de GHCl 6 M stabilisé sous Argon afin de prévenir

l'oxydation du tampon.

- les instructions à suivre pour l'immersion et l'agitation du specimen
- un système “ prêt-à-envoyer ” (tube de protection de l'échantillon, enveloppe à bulle, bordereau pré-imprimé)
- des feuilles de renseignements cliniques à remplir par le chirurgien, destinées à classer et interpréter les résultats

Actuellement ce kit a été utilisé pour des prélèvements à :

- Paris (Hôpital Lariboisière, Centre Hospitalier National d'Ophtalmologie des Quinze-Vingts, Fondation Adolphe de Rothschild, Hôpital de Bicêtre)
- Bordeaux (CHU Pellegrin)
- Londres (Moorfields Eye Hospital)

Gene	Forward (1) and reverse (2) primer sequences	Annealing Temperature (°C)	Product length (bp)	Accession number (GenBank)
Actin (beta subunit)	1: AGTCCTGGGCAATCCACGAAG 2: TACATGCGCTCAGGAGGCAAAAG	58	202	BC002409
Adrenergic receptor (alpha-1b)	1: GGAGTCAATGAAGGAGATGTCACATCCAAAG 2: GCACAGATGAACATACGCAACACAAAGCC	58	201	U03865
Adrenergic receptor (kidney alpha-2)	1: TTTGGATCGGCTACTGCAACAGCTTC 2: TCCGTCCGAAGAGGATGTCCTGAAAG	57	100	J03853
Adrenergic receptor (beta-1)	1: TCCCAGGGAAACGAGGAGATCTGGTIIAC 2: AGCCACATCTCCCAATCCCCTCCAAACATTC	58	151	J03019
alpha-smooth muscle actin (alpha-SMA)	1: TGACATCAGGAGGACCTCTATGTC 2: AAGGCCCGCCATCACTGATTC	58	242	J05192
Arginine vasopressin receptor 1A	1: TCAGACCTGGGAGGCTGATTCCTC 2: CCCAGTAAATGCAGTGAATGGTATGGTATG	58	184	AF322550
Bombesin receptor subtype-3	1: GCCCCTAAGGAGATGAAATCCCGAAAGAG 2: CGCAAGAAATGCTGAAAGGCCAAACCCG	58	199	L08893
CC chemokine receptor 5	1: GCAGTACCTCTAACAGGTGGATCAGG 2: ATATTTCCCTGCTCCAGTGGATCCG	57	240	U57840
CD4	1: TAACCCAGGCTCCCTGGTCCAGTTC 2: TCCCTGGTAAAGAAATTCGCTCC	58	234	BC025782
CD68	1: TCGAGCTATGTAACAAACCCAGG 2: AAGGACACATGTAATCTCACCGC	58	213	BT009923
c-fos	1: CGTTGGTAAAGACCATGACAGGAGG 2: CTCCGCCTGGAGTGTATGATGAG	58	175	BC004490
Chemokine (C-X-C motif) receptor 4	1: GGCATATGGTATCTTGGGATC 2: GACGTTGGCAAGAGATGAAGTCC	57	235	BT006660
Coagulation factor II (thrombin) (F2R)	1: TTGGCTTCGGACCCACAAACGTCCTC 2: ACTGCTGGATCCGAACTTCTTTTTC	58	218	M62424
Coagulation factor II (thrombin) receptor-like 1 (F2RL1)	1: CACCATCCCTTTGTAAGTCCGAAAGCAG 2: CGGAGCATCTGATCATCAGCAATAGG	58	195	BT009856
Coagulation factor II (thrombin) receptor-like 2 (F2RL2) or Protease-activated receptor 3 (PAR3)	1: TGGTATTTGGAGAGGCTCCCTGCTC 2: AGAAATATGTTGCTCAGCAACAGTCT	58	193	U92971
Complement component 5 receptor 1 (C5a ligand)	1: TATCTTCGGTGGCTTACAGGTTAGCG 2: CACCACGTAGAGATGAGGGTGGATGC	58	151	BT007338
Cone opsin [long (L) wavelength-sensitive]	1: TGTATCACTCCCTCATCTCT 2: GATGCAGTACCCAAAGAT	62	155	NM020061
Cone opsin [medium (M) wavelength-sensitive]	1: TGTATCACTCCCTCATCTCT 2: GATGCAGTACCCAGGAT	62	155	NM000513
Cone opsin [short (S) wavelength-sensitive]	1: AGCTGTAACGGATATCTGGCTTCCG 2: AGAGCCCAATACCAGTGGCTCAG	58	211	NM001708
Crystallin (alpha-B)	1: CACCCTTTGGGAGTCTGATCTTTTCC 2: GCGCTCTTCAATGTTTCCATGCTAC	58	231	BT006770
Cyclin A1	1: TAGGGCTGGTAACTGTAAATGG 2: CCGGTGCTACATCAATACATCTC	57	250	U66838
Cyclin D1	1: AGAAGCTGTGTCATCTACCTCCGAT 2: CATGGAGGGCGGATGGAAATG	58	242	M64349
Cytochrome oxidase	1: TAGTTCCCTAAATAACGGGCTCCCTC 2: ACCCTGCTAGGTGTAGGAGAGAAATGG	58	218	NM173704
Cytokeratin 18	1: AAGCGTACAGAGATGGAGAAAGC 2: CTGTCTCTTGCCTCAGCAAAATG	56	246	BC000180
Frizzled-6	1: ACCCCAGGTTAAGAGAACAGGAC 2: GGTGATCAGGAGAGATGTTGAAAC	58	250	AB012911
Frizzled-10	1: TCTTCTCTGTCTGTAATCCCTG 2: GCTCTGGAGGCTCCAAATCCATCT	58	244	AB027464
GDNF	1: GGCATGAAACCAAGGAGGAAAC 2: ACACTCACACCCTTTAGCGG	62	234	NM000514
GFAP	1: AATACCAATCCGCTGAGACCTTCTC 2: TGTCTCACATCAGATCCCTTGGCTC	58	175	BC041765
GFRalpha-1	1: GCGCATTTACGGAGCTAGTACCAGAG 2: CCGACCCTGATCTCTTCCAAATGCTCTC	58	218	AF042080
GFRalpha-2	1: GGCCTGAGGCTCAATACCTCCAAAGAG 2: AATCTCTGATCTGGTCCCAAGGCTTAC	58	194	AF002700
GLAST	1: TTACGGCAGTCTCTGCTTGGCTAC 2: AAAGCCCTCATAGAGGGCAGTCCCATC	58	244	U03504
Glutamate receptor, metabotropic 5 (GRM5)	1: GCGAAGCCCAATACAGATTTTACTTACC 2: GGAGGCTCCATTAATAAGAGGGCAACG	58	242	NM_000842
Glutamine synthetase (GS)	1: GGAGGCTCATGAGAAACAAAGCAAGC 2: AGAGGGGCTCAGCATCTTCAAAAG	58	217	BC010037
G protein-coupled receptor 19 (GPR19)	1: TGTGCTATCTGGTCTGTAATCCCTG 2: AATTTCAATGCTCTCTCTACCTGCTG	58	247	NM_006143
5-hydroxytryptamine receptor 1A (HTR1A)	1: AGTGAAGACGCTGGGCTATCTC 2: TCACTGGCGGCAGAACTTACATC	58	241	AF498978
Intracellular adhesion molecule-1 or ICAM-1 (CD54 antigen)	1: CCCGAGAGGAGTGAATTTTCTATCGGCAC 2: TGTAAACAGGACAGAGGACAAAGC	58	246	J03132
Lysophingolipid receptor Edg5	1: AATCCCAACAGGCTCAGGAAACAC 2: AGGTTCGCCAGAAACAGGTACATTC	58	197	AF034780

Table 5 (1/2).

Gene	Forward (1) and reverse (2) primer sequences	Annealing Temperature (°C)	Product length (bp)	Accession number (GenBank)
Matrix Metalloproteinase-2 (MMP-2)	1: AGGATGACATCAAGGGCATTCAGGAG 2: CGTCAACAGTC CGCCAAATGAAC	58	191	BC002576
Mitogen-activated kinase kinase kinase 5 (MAPKKK5) or apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1)	1: CAGGGGGCTGAAGAACCGAAACTAAAATGG 2: GGC AAACATCCAGTGGGGCTTGATGTTATG	57	240	U67156
Oxalithine decarboxylase	1: CGAACGGGC GAAAGAGCTAAATATCG 2: CTC CAAC GCTGGGTTGATTACG	58	238	M16650
PCNA	1: AGGCCTC AAGGAC CTCATCAAC 2: TATC CGCGTATCTTC CGCC CTTAG	58	243	NM002592
P2Y8 purinoreceptor	1: CCACTACTTACCTCAAGTCGTGC 2: TTGTAGC CAGGAGATAC GTTGTGC	58	250	U83993
Synaptophysin	1: TGTACTTTGATGCCACC CACTTGC 2: ATGCC GATGAGCTAACTAGCCAC	58	240	BC064550
Rhoducin	1: AGC AAGAAGGAGATTCTCAGGC 2: GGTGCATATC CTGCATAC	54	175	NM002597
RdCVF1 (Tad6)	1: TGTAAATCCCAGC ACTTGGGGAG 2: ACAC CGGGCTAACTTTTAAATTTT CGTAGAG	56	120	BC014127
Rhodopsin	1: CGGAGHTCAAC AAC GAGTCTTTTGT 2: GTGAAGATGTAGAATCC CACGCTG	58	244	E0537381
Secretin receptor (SCTR)	1: TTC GTGC CCTGTCCAACCTTCATC 2: ATC CGAATGCCAC AAATCCCTG	58	228	AY462218
Tissue inhibitor Metalloproteinase-1 (TIMP-1)	1: GGTACTTCCACAGHTCCACAAC 2: CCAGTTTGCAGGGGATGGATAAACAG	58	208	BC000866
Visual pigment-like receptor peropsin (Rho)	1: AGCATTGGCTATC CCATGTCTGCTGC 2: AAAACAGGC CATTGATCCAGGCTCC C	58	238	AF012270

Table 5 (2/2).

C. Biologie moléculaire

1. Purification des ARN

La purification des ARN a été réalisée sur gradient de Césium et l'absence de dégradation vérifiée sur gel dénaturant (voir Thèse section *Matériels et Méthodes* paragraphe IV-A).

2. Oligonucléotides de synthèse

Les amorces oligonucléotidiques ont été déterminées avec le logiciel Infobiogen®, en utilisant les numéros d'accèsion ("accession number") de la base de données Genbank®. Les amorces utilisées figurent dans la Table 5.

3. Reverse transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

a) Transcription inverse

Les ADNc sont synthétisés par transcription inverse en utilisant des amorces aléatoires (voir Thèse section *Matériels et Méthodes* paragraphe IV-C1).

b) PCR semi-quantitative en temps réel

Les réactions de PCR ont été réalisées avec un appareil de PCR temps réel LightCycler Roche® selon les protocoles précédemment décrits (voir Thèse section *Matériels et Méthodes* paragraphe IV-C3). Les produits obtenus à l'issue de l'amplification ont été purifiés puis séquencés.

D. Prélèvements

Nous avons récupéré 79 échantillons (56 pathologiques, 23 contrôles). 3 échantillons ont été éliminés pour cause de dégradation partielle visualisée sur gel dénaturant (2 pathologiques, 1 contrôle) et 38 échantillons pour cause de quantité insuffisante (inférieure à 5 µg) (35 pathologiques, 3 contrôles). Au total, 19 échantillons pathologiques et 19 contrôles ont été retenus (voir Table 6).

ECHANTILLONS PATHOLOGIQUES				
N°	Centre	ARN	C°	Profil sur gel
		(µg)	(µg/µl)	
K1	Bordeaux	8,8	0,255	Aucune dégradation
K5	Bordeaux	7,8	0,164	Aucune dégradation
K6	Bordeaux	15	0,543	Aucune dégradation
K9	Bordeaux	5,9	0,236	Aucune dégradation
K12	Bordeaux	6,3	0,244	Aucune dégradation
K15	Bordeaux	8,3	0,32	Aucune dégradation
K17	Bordeaux	8,7	0,335	Aucune dégradation
K18	Bordeaux	5,9	0,236	Aucune dégradation
K21	Bordeaux	20,0	0,771	Aucune dégradation

K22	Bordeaux	13,9	0,537	Aucune dégradation
K24	Bordeaux	5,8	0,224	Aucune dégradation
K25	Bordeaux	9,2	0,356	Aucune dégradation
K26	Bordeaux	10,5	0,406	Aucune dégradation
L1	Lariboisière	7,5	0,304	Aucune dégradation
L12	Lariboisière	11,6	0,243	Aucune dégradation
L10	Lariboisière	5	0,101	Aucune dégradation
Q10	Quinze-Vingts	6	0,139	Aucune dégradation
AB	Fond. Rothschild	17,5	0,674	Aucune dégradation
AE	Fond. Rothschild	6,5	0,252	Aucune dégradation

CONTROLES				
N°	Expéditeur	ARN (µg)	C° (µg/µl)	Profil sur gel dénaturant
3	Venise	32,9	0,940	Aucune dégradation
4	Venise	21,8	0,624	Aucune dégradation
5	Venise	15,7	0,451	Aucune dégradation
6	Venise	6,1	0,175	Aucune dégradation
98918	Amsterdam	14,1	0,544	Aucune dégradation
98929	Amsterdam	35,7	1,374	Aucune dégradation
98942	Amsterdam	16,9	0,651	Aucune dégradation
98945	Amsterdam	34,7	1,338	Aucune dégradation
98952	Amsterdam	11	0,424	Aucune dégradation
98961	Amsterdam	23,4	0,900	Aucune dégradation
98962	Amsterdam	22,5	0,867	Aucune dégradation
98964	Amsterdam	11,6	0,447	Aucune dégradation
98966	Amsterdam	24,7	0,951	Aucune dégradation
98971	Amsterdam	42,7	1,644	Aucune dégradation
98973	Amsterdam	7,5	0,291	Aucune dégradation
98976	Amsterdam	29,9	1,152	Aucune dégradation
98990	Amsterdam	63,2	2,432	Aucune dégradation
99004	Amsterdam	35,0	1,348	Aucune dégradation
99008	Amsterdam	50,2	1,932	Aucune dégradation

Table 6. Echantillons biologiques retenus.

III. RÉSULTATS

Dans un premier temps, nous avons validé le matériel biologique en mesurant, dans nos deux groupes d'échantillons et par PCR semi-quantitative, l'expression d'une sélection de gènes décrits dans la littérature dans des modèles animaux de décollement de rétine et dont les variations d'expression au cours du DR sont connues. Cette étape nous a permis de valider chez l'homme des résultats rapportés chez l'animal.

Puis, nous avons réalisé le criblage d'un certain nombre de gènes dans nos deux populations. Le choix de ces gènes s'est fait, tout d'abord, en fonction des thèmes de recherche en cours dans notre laboratoire, en particulier GDNF, les récepteurs de GDNF et RdCVF (Léveillard et coll., 2004). Par la suite, il nous a semblé intéressant d'étudier l'expression de récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) qui pourraient être impliqués dans des processus de neuroprotection ou de neuro-toxicité. Nous sommes partis des résultats d'un travail effectué précédemment dans notre laboratoire en collaboration avec Laurent Journot. Il s'agissait d'analyses transcriptomiques réalisées sur puces comparant l'expression des RCPG dans différents modèles animaux qui présentaient, soit une absence de photorécepteurs (rétines de souris *rd1* adultes, absence de cônes rouges/verts chez les souris TR-bêta), soit un excès de photorécepteurs (rétines de souris *rd7* avec un excès de cônes bleus). Nous avons retenu les RCPG dont l'expression était, soit effondrée (souris *rd1* et TR-beta), soit augmentée (souris *rd7*), supposant par là que ces RCPG avaient une forte probabilité d'être exprimés par les photorécepteurs. Nos résultats sont présentés dans la Table 7.

Gène	Rapport de l'expression moyenne du gène considéré dans les DR (n = 8) par rapport aux contrôles (n = 8)	Significativité statistique (Test de Mann- Whitney)
Marqueurs des segments externes des photorécepteurs		
Rhodopsin	0.08	p < 0.0005
S-cone opsin	0.18	p < 0.0005
M-cone opsin	0.15	p < 0.01
L-cone opsin	0.25	p < 0.001
Phosducin	0.17	p < 0.0001
RdCVF-Txnl6	0.40	p < 0.001
Marqueurs des segments internes des photorécepteurs		
Cytochrome oxidase	0.5	p < 0.001
Synaptophysin	0.28	p < 0.0005
Cellules gliales de Müller		
GFAP	7.83	p < 0.0005
GLAST	1.54	NS
Glutamine synthetase	0.39	p < 0.00005
Cytokeratin 18	0.94	NS
Réponse immunitaire		
Complement component 5 receptor 1 (C5a ligand)	1.00	NS
CD4	2.03	p < 0.05
CD68	14.74	p < 0.005
Intercellular adhesion molecule-1 or ICAM-1 (CD54 antigen)	13.95	p < 0.0005
Marqueurs de remodelage tissulaire		
Matrix MetalloProteinase-2 (MMP-2)	4.34	p < 0.0005
Tissue Inhibitor Metalloproteinase-1 (TIMP-1)	10.02	p < 0.0001
Stress		
alpha B crystallin	0.87	NS
Apoptose		
Mitogen-activated kinase kinase kinase 5 (MAPKKK5) or ASK1 apoptosis signal-regulating kinase 1	1.90	p < 0.005
Marqueurs de prolifération cellulaire et dédifférenciation		
PCNA	0.27	p < 0.0005
c-fos	0.29	p < 0.05
Ornithine decarboxylase	1.30	NS
Cyclin A1	0.56	NS
Human cyclin D (Cyclin D1)	6.09	p < 0.01
alpha-smooth muscle actin (alpha-SMA)	10.23	p < 0.05

Table 7. Résultats des analyses en RT-PCR semi-quantitative en temps réel

Gène	Rapport de l'expression moyenne du gène considéré dans les DR (<i>n</i> = 8) par rapport aux contrôles (<i>n</i> = 8)	Significativité statistique (Test de Mann-Whitney)
Signalisation GDNF		
GDNF	1.02	NS
GFRalpha-1	2.10	p < 0.001
GFRalpha-2	0.87	NS
Récepteurs couplés aux protéines G		
Adrenergic alpha-1b receptor	1.02	NS
Kidney alpha-2-adrenergic receptor	4.44	p < 0.005
beta-1-adrenergic receptor	1.077	NS
Arginine vasopressin receptor 1A	1.45	NS
Bombesin receptor subtype-3	1.29	NS
CC chemokine receptor 5	17.97	p < 0.005
Chemokine (C-X-C motif) receptor 4	3.31	p < 0.005
Lysosphingolipid receptor Edg5	2.12	p < 0.01
Thrombin receptor	3.92	p < 0.01
Coagulation factor II (thrombin) receptor-like 1	0.45	p < 0.001
Protease-activated receptor 3 (PAR3)	0.52	p < 0.0005
Frizzled-6	1.38	p < 0.01
Frizzled-10	0.20	p < 0.05
G protein-coupled receptor 19 (GPR19)	1.47	p < 0.05
Glutamate receptor, metabotropic 5 (GRM5)	0.73	NS
5-hydroxytryptamine receptor 1A (HTR1A)	0.87	NS
P2X4 purinoreceptor	1.83	p < 0.005
Visual pigment-like receptor peropsin (Rrh)	1.4	p < 0.05
Secretin receptor (SCTR)	0.28	p < 0.00005

Table 7 (suite). Résultats des analyses en RT-PCR semi-quantitative en temps réel

Comme le montre la figure 48, alors que l'expression du gène ubiquitaire de la beta actine est équivalent dans tous nos échantillons (Fig. 48A), l'expression des gènes codant pour des protéines des segments externes des bâtonnets et des cônes est diminuée dans les rétines décollées par rapport aux contrôles, c'est le cas de la rhodopsine (Fig. 48B), de l'opsine des cônes (Fig. 48C) mais également de RdCVF (Fig. 48D). Ces résultats correspondent à la perte des photorécepteurs.

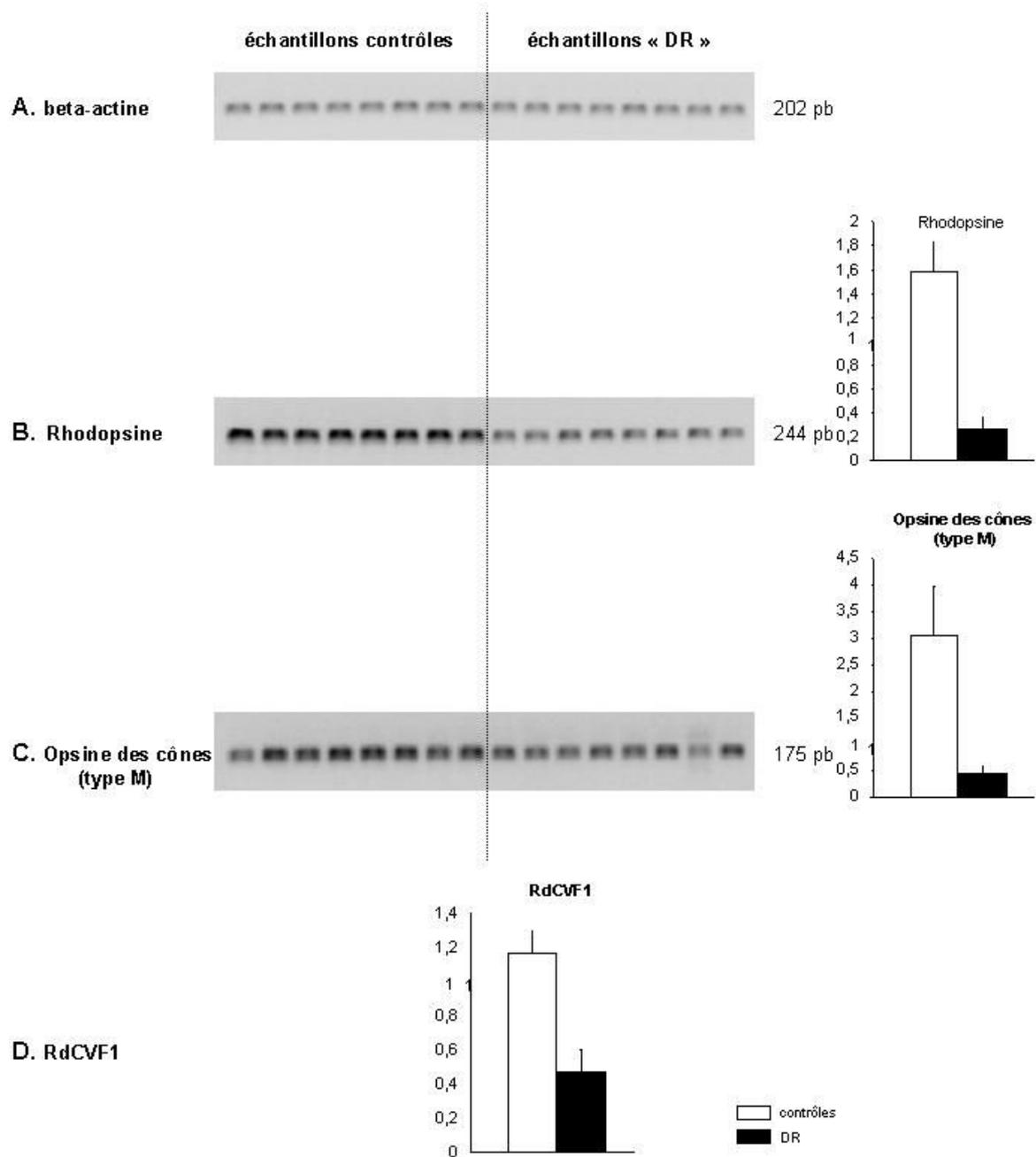


Figure 48. Expression des messagers codant pour la rhodopsine, l'opsine des cônes (type M) et RdCVF1 au cours du décollement de rétine chez l'homme.

Les niveaux d'expression des différents messagers ont été mesurés par RT-PCR temps réel. Les produits d'amplification ont été ensuite déposés sur gel. 8 échantillons contrôles et 8 échantillons de rétines décollées ont été analysés. **A** : gène ubiquitaire beta actine, **B** : rhodopsine, **C** : opsine des cônes (M), **D** : RdCVF1.

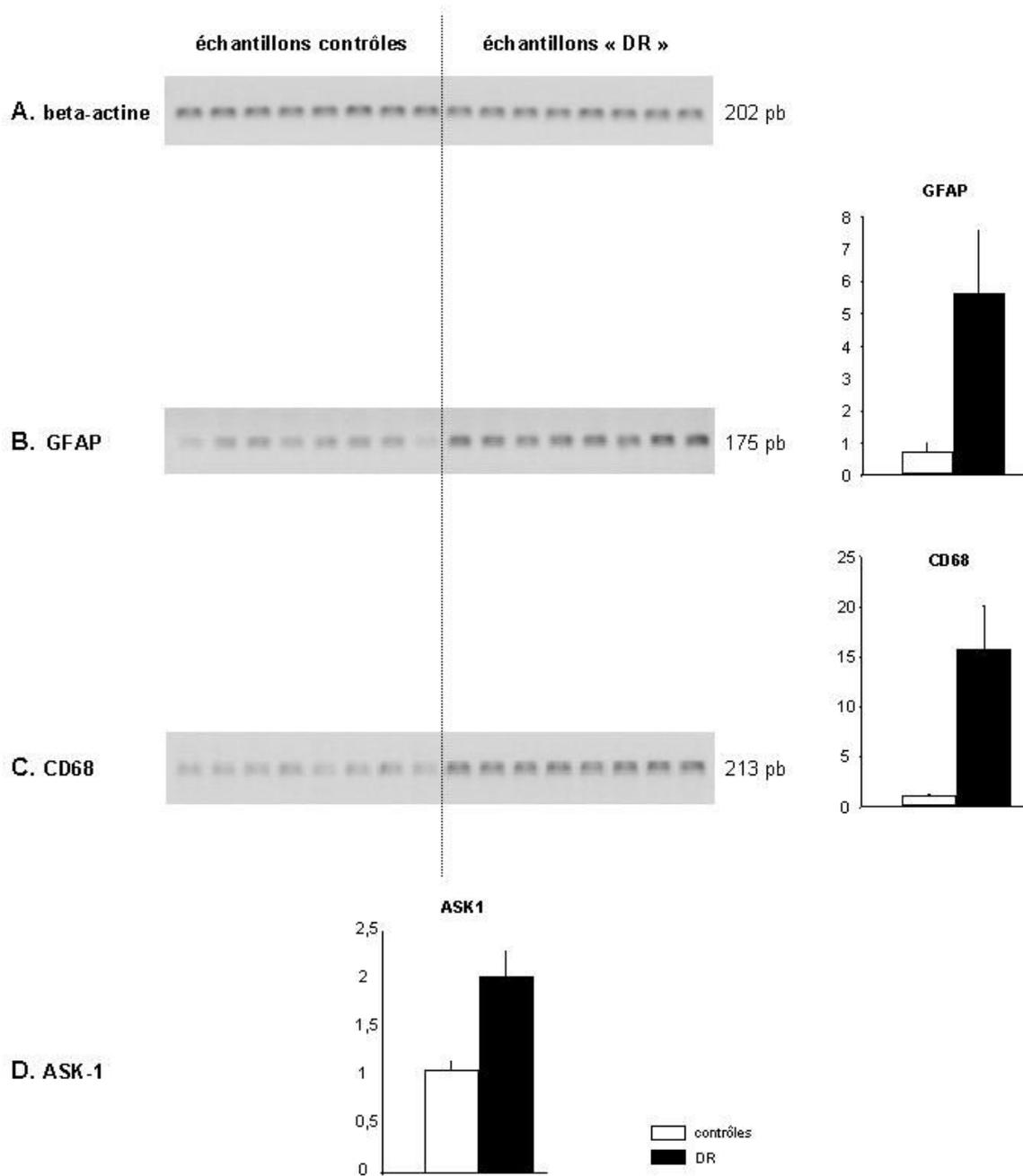


Figure 49. Expression des messagers codant pour la GFAP, le CD68 et ASK-1 au cours du décollement de rétine chez l'homme.

Les niveaux d'expression des différents messagers ont été mesurés par RT-PCR temps réel. Les produits d'amplification ont été ensuite déposés sur gel. 8 échantillons contrôles et 8 échantillons de rétines décollées ont été analysés. **A** : gène ubiquitaire beta actine, **B** : GFAP, **C** : CD68, **D** : ASK1.

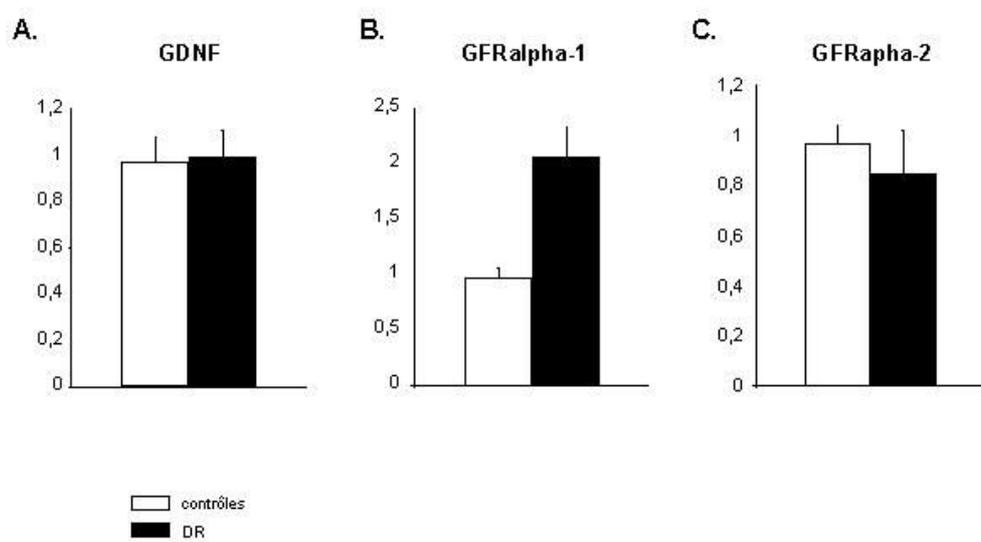


Figure 50. Expression des messagers codant pour GDNF, GFRalpha-1 et GFRalpha-2 au cours du décollement de rétine chez l'homme.
A : GDNF, **B** : GFRalpha-1, **C** : GFRalpha-2.

Inversement, comme le montre la figure 49, l'expression de gènes codant pour des marqueurs des cellules gliales (GFAP, Fig. 49B) et des macrophages (CD68, Fig. 49C) est augmentée dans les rétines décollées, témoignant de la prolifération gliale et de la présence de macrophages dans les rétines remaniées. L'augmentation de l'expression du gène Apoptosis Signal-Regulating Kinase-1 ou ASK-1 dans les échantillons " DR " témoigne quant à elle de l'existence de phénomènes apoptotiques dans les rétines en dégénérescence comme dans les modèles de RP.

Enfin, l'expression des transcrits de GDNF, de GFRalpha-1 et de GFRalpha-2 dans les rétines décollées (Fig. 50) est superposable à celle que nous avons observée chez la souris *rd1* au cours de la dégénérescence des photorécepteurs (Fig. 41 & 44), suggérant que ces deux modèles partagent un certain nombre de mécanismes neuroprotecteurs et/ou neurotoxiques.

IV. TRAVAUX EN COURS : Analyse transcriptomique sur puces Affymetrix®

A. Projet sélectionné par le réseau national des génopoles

Afin de prolonger notre étude des variations transcriptomiques au cours du décollement de rétine, nous avons répondu à un appel d'offre du Ministère de la Recherche afin de pouvoir obtenir un financement pour l'achat de GeneChip Affymetrix (1 pour chacun de nos échantillons, soit 38 au total). Il s'agit de puces qui comportent plus de 60 000 sondes et vont permettre de tester, en un temps, les variations d'expression d'un très grand nombre de gènes. Pour cela, l'échantillon à analyser est déposé sur la puce et l'intensité d'hybridation

pour chaque sonde est traitée et analysée. Notre projet a reçu un avis favorable en septembre 2004 (Fig. 51).

Etape 1. Collection des échantillons humains pathologiques dans les différents centres de prélèvements depuis mai 2002. Le recueil des échantillons continue ; son arrêt sera déterminé par l'analyse des résultats (voir étape 4).

Etape 2. Validation du matériel biologique par RT-PCR temps réel, réalisée sur une sélection de gènes décrits dans la littérature dans des modèles animaux de décollement de rétine.
Fait au 1er août 2004

Etape 3. Hybridations sur puces Affymetrix – Plateforme de Strasbourg √ Fait au 1er juin 2005

Etape 4. Analyses statistique et bioinformatique. Plateforme « Retscope » déjà mise au point et fonctionnelle – Laboratoire de Olivier Poch √ 6 mois

Etape 5. Validation des résultats (6 mois) :

- 5A : par RT-PCR en temps réel sur les gènes sélectionnés à l'étape 3 sur l'ensemble de la collection d'échantillons

-5B : par hybridation in situ, en collaboration avec l'équipe de Pascal Dollé (IGBMC), et immunohisto-chimie

Etape 6. Elaboration de nouvelles stratégies thérapeutiques dans le cadre de la prise en charge des décollements de rétine, basées sur un modèle déduit de l'analyse transcriptomique
√ 3 à 6 mois

Etape 7. Perspective : Mise en place d'un modèle animal de décollement de rétine basé sur les modèles déjà existants afin de tester les nouvelles stratégies envisagées (traitement pharmacologique, RNAi)

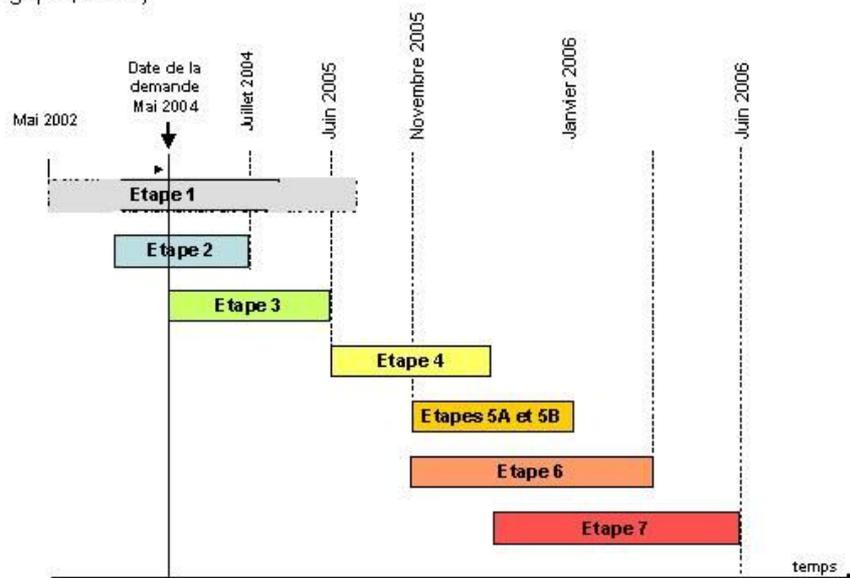


Figure 51. Projet soumis au réseau national des génopoles.

B. Avancement des travaux

1. Traitement des échantillons et analyse bioinformatique

A ce jour, nos 38 échantillons ont été traités par la plateforme Affymetrix de Strasbourg. Les analyses bioinformatiques des résultats vont être conduites très prochainement en collaboration avec l'équipe d'Olivier Poch (IGBMC, Strasbourg).

2. Modèle développé

Afin de pouvoir évaluer ultérieurement – une fois les résultats de nos analyses bioinformatiques connus – le potentiel neuroprotecteur de facteurs candidats à l'égard des photorécepteurs au cours du DR, nous avons mis au point un modèle animal de DR rhéghmatogène. Nous avons choisi de travailler sur des rats, plus faciles à manipuler que les souris, et plus simples à élever que les porcs, chats, lapins ou écureuils classiquement utilisés dans les études conduites sur le DR.

Deux techniques ont été testées en collaboration avec Michel Paques (Inserm U592). La première consiste à réaliser une chirurgie du cristallin de type extra-capsulaire : incision cornéenne sur 120°, injection de visqueux en chambre antérieure, capsulotomie antérieure, mobilisation du noyau cristallinien, extériorisation du noyau par pression / contre-pression, puis traction à la pince de la capsule postérieure jusqu'à ce que la rétine se décolle, fermeture au nylon 10/0 en points auto-enfouis, re-formation de la chambre antérieure par injection de visqueux. La deuxième technique, moins agressive, consiste à injecter en trans-scléral du visco-élastique sous la rétine, sous contrôle visuel du fond d'œil, et à réaliser une incision rétinienne à l'aiguille au sommet du décollement iatrogène de manière à ce que le décollement s'auto-entretienne secondairement ; une ponction de chambre antérieure est ensuite réalisée

pour normaliser le tonus de l'œil injecté. Après plusieurs essais, cette dernière technique est celle qui a été retenue pour nos expériences à venir.

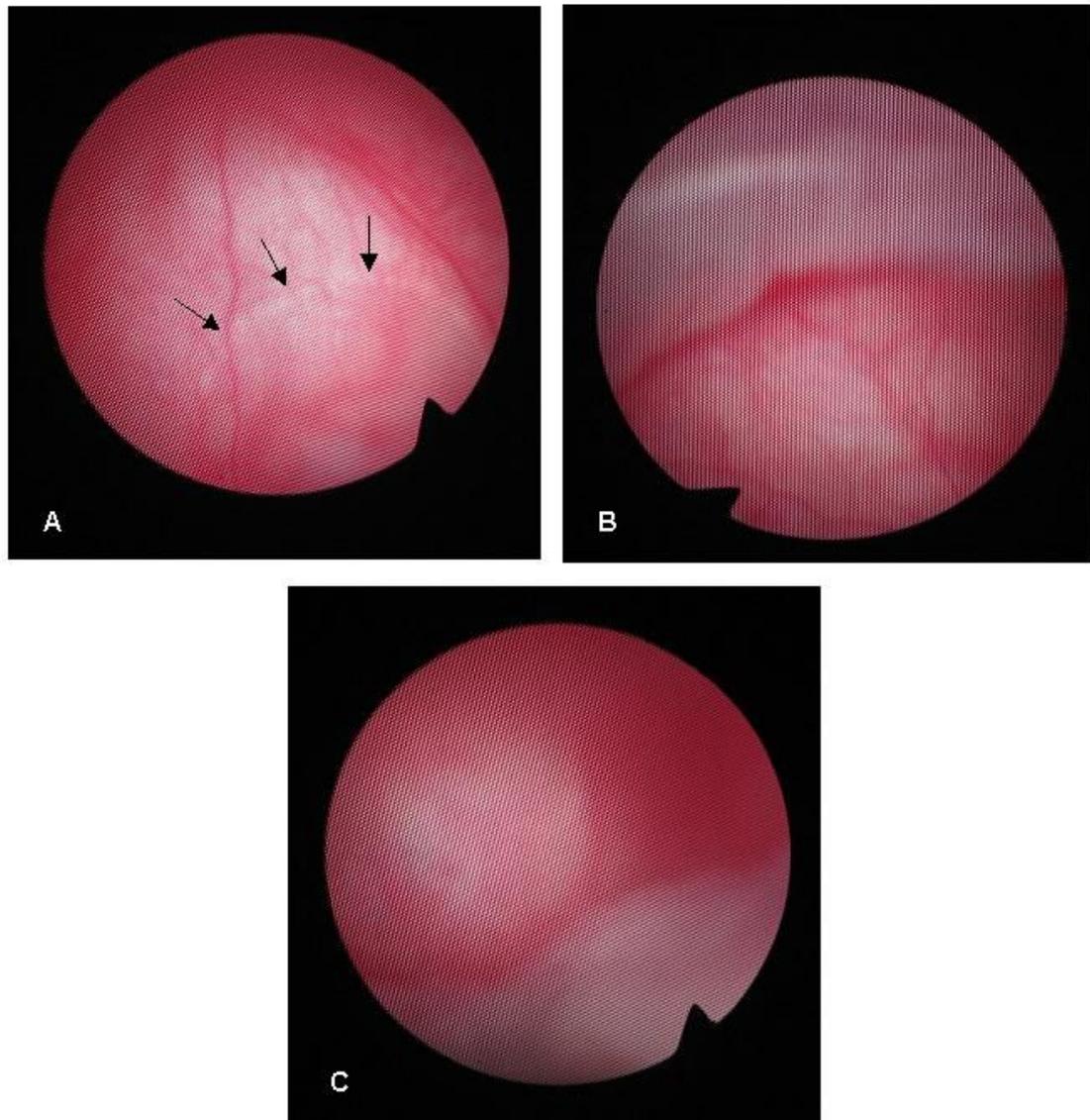


Figure 52. Décollement de rétine chez le rat.

Un modèle de DR a été développé chez le rat. Sous contrôle visuel du fond d'œil, une substance visco-élastique est injectée en trans-scléral sous la rétine, puis une incision rétinienne à l'aiguille est réalisée au sommet du DR de manière à ce que le DR s'auto-entretienne secondairement. Aspects de fond d'œil chez trois rats 8 jours après chirurgie. **A** : DR périphérique localisé, **B et C** : DR bulleux.

V. CONCLUSIONS

Nos premiers résultats de RT-PCR temps réel nous ont permis de valider chez l'homme des résultats connus dans différents modèles animaux de DR, notamment l'effondrement des gènes codant pour des protéines exprimées par les photorécepteurs. Nous avons également mis en évidence une augmentation associée de l'expression des gènes codant pour des marqueurs de cellules gliales (GFAP), pour les macrophages (CD68), pour les lymphocytes (CD4), ainsi que pour des marqueurs du remodelage tissulaire (MMP-2, TIMP-1), de la dédifférenciation et de la prolifération cellulaire (alpha-smooth muscle actin, cycline D1). Par ailleurs, l'augmentation de ASK-1 au cours du DR témoigne de l'activation de mécanismes apoptotiques.

L'analyse à grande échelle des variations transcriptomiques au cours du DR chez l'homme permettra de mieux comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires qui conduisent à la dégénérescence des photorécepteurs et aidera, en outre, à élaborer de nouvelles stratégies thérapeutiques en complément du traitement chirurgical actuel.

Bibliographie

A.

Abler AS, Chang CJ, Ful J, Tso MO, Lam TT. Photic injury triggers apoptosis of photoreceptor cells. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 1996 ; 92:177-189

Acland GM, Aguirre GD, Ray J, Zhang Q, Aleman TS, Cideciyan AV, Pearce-Kelling SE, Anand V, Zeng Y, Maguire AM, Jacobson SG, Hauswirth WW, Bennett J. Gene therapy restores vision in a canine model of childhood blindness. *Nat Genet.* 2001;28:92-5

Ahmad I. Stem cells: new opportunities to treat eye diseases. *Invest Ophthalmol Vis*

Sci.2001;42:2743-8

Ahmad I, Tang L, Pham H. Identification of neural progenitors in the adult mammalian eye. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000;270:517-21

Akimoto M, Miyatake S, Kogishi J, Hangai M, Okazaki K, Takahashi JC, Saiki M, Iwaki M and Honda Y. Adenovirally expressed basic fibroblast growth factor rescues photoreceptor cells in RCS rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999;40, 273-9

Ali RR, Sarra GM, Stephens C, Alwis MD, Bainbridge JW, Munro PM, Fauser S, Reichel MB, Kinnon C, Hunt DM, Bhattacharya SS and Thrasher AJ. Restoration of photoreceptor ultrastructure and function in retinal degeneration slow mice by gene therapy. *Nat Genet* 2000;25, 306-10

Algvere PV, Berglin L, Gouras P, Sheng Y. Transplantation of fetal retinal pigment epithelium in age-related macular degeneration with subfoveal neovascularization. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 1994;232:707-16

Algvere PV, Gouras P, Dafgard Kopp E. Long-term outcome of RPE allografts in non-immunosuppressed patients with AMD. *Eur J Ophthalmol.* 1999;9:217-30

Ammann F, Klein D, Franceschetti A. Genetic and epidemiological investigations on pigmentary degeneration of the retina and allied disorders in Switzerland. *J Neurol Sci.* 1965;2:183-96.

Andréasson S, Ponjavic V, Abrahamson M, Ehinger B, Wu W, Fujita R, Buraczynska M, Swaroop A. Phenotypes in three Swedish families with X-linked retinitis pigmentosa caused by different mutations in the RPGR gene. *Am. J. Ophthalmol.* 1997; 12:95-102.

Aquirre G, Farber D, Lolley R, Fletcher RT, Chader GJ. Rod-cone dysplasia in Irish setters: a defect in cyclic GMP metabolism in visual cells. *Science*. 1978;201:1133-4

Arenas E, Trupp M, Akerud P, Ibanez CF. GDNF prevents degeneration and promotes the phenotype of brain noradrenergic neurons in vivo. *Neuron*. 1995;15:1465-73.

Arriza JL, Eliasof S, Kavanaugh MP, Amara SG. Excitatory amino acid transporter 5, a retinal glutamate transporter coupled to a chloride conductance. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94:4155-60.

Arriza JL, Fairman WA, Wadiche JI, Murdoch GH, Kavanaugh MP, Amara SG. Functional comparisons of three glutamate transporter subtypes cloned from human motor cortex. *J Neurosci*. 1994;14:5559-69.

Arroyo JG, Yang L, Bula D, Chen DF. Photoreceptor apoptosis in human retinal detachment. *Am J Ophthalmol*. 2005;139:605-10.

Arzberger T, Krampfl K, Leimgruber S, Weindl A. Changes in NMDA receptor subunit (NR1, NR2B) and glutamate transporter (GLT1) mRNA expression in Huntington's disease. An in situ hybridization study. *J. Neuropathol. Exp. Neurol*. 1997;56:440-454

Auricchio A, Kobinger G, Anand V, Hildinger M, O'Connor E, Maguire AM, Wilson JM, Bennett J. Exchange of surface proteins impacts on viral vector cellular specificity and transduction characteristics: the retina as a model. *Hum Mol Genet*. 2001;10:3075-81

B.

Baloh RH, Enomoto H, Johnson EM Jr, Milbrandt J. The GDNF family ligands and receptors

- implications for neural development. *Curr Opin Neurobiol* 2000; 10:103-10.

Banerjee P, Kleyn PW, Knowles JA, Lewis CA, Ross BM, Parano E, Kovats SG, Lee JJ, Penchaszadeh GK, Ott J, Jacobson SG, Gilliam TC. TULIP1 mutation in two recessive extended Dominican kindreds with autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Nat. Genet.* 1998;18:177-179.

Banin E, Cideciyan AV, Aleman TS, Petters RM, Wong F, Milam AH, Jacobson SG. Retinal rod photoreceptor-specific gene mutation perturbs cone pathway development. *Neuron.* 1999;23:549-57

Bareil C, Hamel CP, Delague V, Arnaud B, Demaille J, Claustres M. Segregation of a mutation in CNGB1 encoding the beta-subunit of the rod cGMP-gated channel in a family with autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Hum. Genet.* 2001; 108:328-334.

Bascom RA, Liu L, Heckenlively JR, Stone EM, McInnes RR. Mutation analysis of the ROM1 gene in retinitis pigmentosa. *Hum. Mol. Genet.* 1995; 4:1895-1902.

Bennett J, communication orale, Clinical trials for Retinal Degenerative Diseases, Paris, Avril 2002

Bennett J, Tanabe T, Sun D, Zeng Y, Kjeldbye H, Gouras P, Maguire AM. Photoreceptor cell rescue in retinal degeneration (rd) mice by in vivo gene therapy. *Nat Med.* 1996;2:649-54

Bennett J, Zeng Y, Bajwa R, Klatt L, Li Y, Maguire AM. Adenovirus-mediated delivery of rhodopsin-promoted bcl-2 results in a delay in photoreceptor cell death in the rd/rd mouse. *Gene Ther.* 1998;5:1156-64

Berson EL, Rosner B, Sandberg MA, Dryja TP. Ocular findings in patients with autosomal dominant retinitis pigmentosa and a rhodopsin gene defect (Pro-23-His). *Arch Ophthalmol.* 1991;109:92-101

Berson EL, Rosner B, Sandberg MA, Hayes KC, Nicholson BW, Weigel-DiFranco C, Willett W. A randomized trial of vitamin A and vitamin E supplementation for retinitis pigmentosa. *Arch Ophthalmol* 1993a;111, 761-72

Berson EL, Rosner B, Sandberg MA, Hayes KC, Nicholson BW, Weigel-DiFranco C, Willett W. Vitamin A supplementation for retinitis pigmentosa. *Arch Ophthalmol*. 1993b;111:1456-9

Berson EL, Rosner B, Sandberg MA, Weigel-DiFranco C, Moser A, Brockhurst RJ, Hayes KC, Johnson CA, Anderson EJ, Gaudio AR, Willett WC, Schaefer EJ. Clinical trial of docosahexaenoic acid in patients with retinitis pigmentosa receiving vitamin A treatment. *Arch Ophthalmol*. 2004;122:1297-305.

Berson EL, Rosner B, Sandberg MA, Weigel-DiFranco C, Moser A, Brockhurst RJ, Hayes KC, Johnson CA, Anderson EJ, Gaudio AR, Willett WC, Schaefer EJ. Further evaluation of docosahexaenoic acid in patients with retinitis pigmentosa receiving vitamin A treatment: subgroup analyses. *Arch Ophthalmol*. 2004b;122:1306-14.

Bessant DAR, Payne AM, Mitton KP, Wang QL, Swain PK, Plant C, Bird AC, Zack DJ, Swaroop A, Bhattacharya SS. A mutation in NRL is associated with autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Nat. Genet*. 1999; 21:355-356.

Bhattacharya SS, Wright AF, Clayton JF, Price WH, Phillips CI, McKeown CME, Jay M, Bird AC, Pearson PL, Southern EM, Evans HJ. Close genetic linkage between X-linked retinitis pigmentosa and a restriction fragment length polymorphism identified by recombinant DNA probe L1.28. *Nature* 1984; 309:253-255.

Blanks JC, Adinolfi AM, Lolley RN. Photoreceptor degeneration and synaptogenesis in retinal-degenerative (rd) mice. *J Comp Neurol* 1974 a; 156:95-106.

Blanks JC, Adinolfi AM, Lolley RN. Synaptogenesis in the photoreceptor terminal of the mouse retina. *J Comp Neurol*. 1974 b;156:81-93.

Blanks JC, Johnson LV. Vascular atrophy in the retinal degenerative rd mouse. *J Comp Neurol*. 1986;254:543-53.

Blanton SH, Heckenlively JR, Cottingham AW, Friedman J, Sadler LA, Wagner M, Friedman LH, Daiger SP. Linkage mapping of autosomal dominant retinitis pigmentosa (RP1) to the pericentric region of human chromosome 8. *Genomics* 1991; 11:857-869.

Bliss TV, Collingridge GL. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature*. 1993;361:31-9.

Bok D, Yasumura D, Matthes MT, Ruiz A, Duncan JL, Chappelov AV, Zolotukhin S, Hauswirth W, LaVail MM. Effects of adeno-associated virus-vectored ciliary neurotrophic factor on retinal structure and function in mice with a P216L rds/peripherin mutation. *Exp Eye Res* 2002;74:719-35

Bonaventure N, Wioland N, Karli P. Enhanced sensory convergence to the visual cortex in the rodless (rd/rd) mouse. *Doc Ophthalmol*. 1985;61:97-103.

Bonde C, Sarup A, Schousboe A, Gegelashvili G, Noraberg J, Zimmer J. GDNF pre-treatment aggravates neuronal cell loss in oxygen-glucose deprived hippocampal slice cultures: a possible effect of glutamate transporter up-regulation. *Neurochem Int* 2003; 43:381-8.

Boughman JA, Conneally PM, Nance WE. Population genetic studies of retinitis pigmentosa. *Am J Hum Genet*. 1980;32:223-35.

Bowes C, Li T, Danciger M, Applebury ML and Farber DB. Retinal degeneration in the rd mouse is caused by the beta-subunit of rod cGMP- phosphodiesterase. *Nature* 1990;347:677-680

Bowes C, Li T, Frankel WN, Danciger M, Coffin JM, Applebury ML and Farber DB. Localization of a retroviral element within the rd gene coding for the beta subunit of cGMP phosphodiesterase. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 1993;90:2955-2959

Bowne SJ, Sullivan LS, Blanton SH, Cepko CL, Blackshaw S, Birch DG, Hughbanks-Wheaton D, Heckenlively JR, Daiger SP. Mutations in the inosine monophosphate dehydrogenase 1 gene (IMPDH1) cause the RP10 form of autosomal dominant retinitis pigmentosa. Hum. Mol. Genet. 2002; 11:559-568.

Brenner C, Marzo I, Kroemer G. A revolution in apoptosis: from a nucleocentric to a mitochondriocentric perspective. Exp Gerontol. 1998;33:543-53.

Breuer DK, Musarella M, Swaroop A. Verification and fine mapping of the X-linked retinitis pigmentosa locus RP6. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2000; 41:S191.

Brückner R. Spaltlampenmikroskopie und ophthalmoskopie am auge von ratte und maus. Doc Ophthalmol 1951;5-6:452-554.

Budd SL. Mechanisms of neuronal damage in brain hypoxia/ischemia: focus on the role of mitochondrial calcium accumulation. Pharmacol Ther. 1998;80:203-29.

Bush RA, Kononen L, Machida S, Sieving PA. The effect of calcium channel blocker diltiazem on photoreceptor degeneration in the rhodopsin Pro213His rat. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2000;41:2697-701

C.

Caley DW, Johnson C, Liebelt RA. The postnatal development of the retina in the normal and rodless CBA mouse: a light and electron microscopic study. *Am J Anat* 1972; 133:179-212.

Caravaggio LL, Bonting SL. The rhodopsin cycle in the developing vertebrate retina. II. Correlative study in normal mice and in mice with hereditary retinal degeneration. *Exp Eye Res.* 1963;2:12-9.

Carter-Dawson L, Alvarez RA, Fong SL, Liou GI, Sperling HG, Bridges CD. Rhodopsin, 11-cis vitamin A, and interstitial retinol-binding protein (IRBP) during retinal development in normal and rd mutant mice. *Dev Biol.* 1986;116:431-8.

Carter-Dawson LD, LaVail MM, Sidman RL. Differential effect of the rd mutation on rods and cones in the mouse retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1978; 17:489-98.

Cashman SM, Binkley EA, Kumar-Singh R. Towards mutation-independent silencing of genes involved in retinal degeneration by RNA interference. *Gene Ther.* 2005 May 5; [Epub ahead of print]

Cavazzana-Calvo M, Hacein-Bey S, de Saint Basile G, Gross F, Yvon E, Nusbaum P, Selz F, Hue C, Certain S, Casanova JL, Bousso P, Deist FL, Fischer A. Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science.* 2000;288:669–

672.

Cavusoglu N, Thierse D, Mohand-Said S, Chalmel F, Poch O, Van-Dorsselaer A, Sahel JA, Leveillard T. Differential Proteomic Analysis of the Mouse Retina: The Induction of Crystallin Proteins by Retinal Degeneration in the rd1 Mouse. *Mol Cell Proteomics.* 2003;2:494-505.

Cayouette M, Gravel C. Adenovirus-mediated gene transfer of ciliary neurotrophic factor can prevent photoreceptor degeneration in the retinal degeneration (rd) mouse.

Hum Gene Ther 1997;8:423-30

Chakarova CF, Hims MM, Bolz H, Abu-Safieh L, Patel RJ, Papaioannou MG, Inglehearn CF, Rhodopsin, 11-cis vitamin A, and interstitial retinol-binding protein (IRBP) during retinal development in normal and rd mutant mice. Dev Biol. 1986 ;116:431-8.

Chalmel F, Poch O, Lavedan C, Ripp R, Wicker N, Dolemeyer A, Clérin E, Mohand-Saïd S, Lambrou G, Sahel JA, Lèveillard T. The transcriptional network during retinal degeneration in a mouse model of retinitis pigmentosa. Soumis.

Chang B, Hawes NL, Hurd RE, Davisson MT, Nusinowitz S, Heckenlively JR. Retinal degeneration mutants in the mouse. Vision Res. 2002;42:517-25.

Chang GQ, Hao Y, Wong F. Apoptosis: final common pathway of photoreceptor death in rd, rds, and rhodopsin mutant mice. Neuron 1993;11:595-605

Choi DW. Calcium-mediated neurotoxicity: relationship to specific channel types and role in ischemic damage. Trends Neurosci. 1988 ;11:465-9

Check E. Second cancer case halts gene-therapy trials. Nature 2003a;421:305.

Check E. Cancer risk prompts US to curb gene therapy. Nature 2003b;422:7

Chen C, Okayama H. High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. Mol Cell Biol. 1987;7:2745-52.

Choi DW. Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. Neuron 1988;1:623-634

Choi DW. Ionic dependence of glutamate neurotoxicity. *J Neurosci.* 1987;7:369-79.

Clarke G, Collins RA, Leavitt BR, Andrews DF, Hayden MR, Lumsden CJ, McInnes RR. A one-hit model of cell death in inherited neuronal degenerations. *Nature* 2000; 406:195-9.

Coccia C, Ganel R, Rothstein JD. GDNF induces an increase in EAAT2 (GLT-1) expression. Annual Meeting of the Society for Neuroscience; October 1999; Miami Beach, FLA.

Conn PJ, Pin JP. Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1997;37:205–237.

Cook B, Lewis GP, Fisher SK, Adler R. Apoptotic photoreceptor degeneration in experimental retinal detachment. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1995 ; 36:990,996

Cox RA, 1968. The use of guanidium chloride in the isolation of nucleic acids. *Methods in enzymology* 12B, 120-129.

Crafoord S, Geng L, Seregard S, Algvare PV. Photoreceptor survival in transplantation of autologous iris pigment epithelial cells to the subretinal space. *Acta Ophthalmol Scand.* 2002;80:387-94

Cremers FPM, van de Pol DJR, van Driel M, den Hollander AI, van Haren FJJ, Knoers NVAM, Tijmes N, Bergen AAB, Rohrschneider K, Blankenagel A, Pinckers AJLG, Deutman AF, Hoyng CB. Autosomal recessive retinitis pigmentosa and cone-rod dystrophy caused by splice site mutations in the Stargardt's disease gene ABCR. *Hum. Mol. Genet.* 1998; 7:355-362.

Cunningham LA, Su C. Astrocyte delivery of glial cell line-derived neurotrophic factor in a mouse model of Parkinson's disease. *Exp Neurol* 2002; 174:230-42.

Curtis DR, Phillis JW, Watkins JC. Chemical excitation of spinal neurons. *Nature* 1959;183:611

D.

Dalke C, Loster J, Fuchs H, Gailus-Durner V, Soewarto D, Favor J, Neuhauser-Klaus A, Pretsch W, Gekeler F, Shinoda K, Zrenner E, Meitinger T, Hrabe de Angelis M, Graw J. Electroretinography as a screening method for mutations causing retinal dysfunction in mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2004;45:601-9.

Danciger M, Bowes C, Kozak CA, LaVail MM, Farber DB. Fine mapping of a putative rd cDNA and its co-segregation with rd expression. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1990;31:1427-1432

Danciger M, Kozak CA, Li T, Applebury ML, Farber DB. Genetic mapping demonstrates that the alpha-subunit of retinal cGMP-phosphodiesterase is not the site of the rd mutation. *Exp Eye Res.* 1990 ;51:185-9.

Danciger M, Tuteja N, Kozak CA, Farber DB. The gene for the gamma-subunit of retinal cGMP-phosphodiesterase is on mouse chromosome 11. *Exp Eye Res.* 1989;48(2):303-8.

Davidson FF, Steller H. Blocking apoptosis prevents blindness in drosophila retinal de generation. *Nature* 1998;391:587-91

D'Cruz PM, Yasumura D, Weir J, Matthes MT, Abderrahim H, LaVail MM, Vollrath D. Mutation of the receptor tyrosine kinase gene *Mertk* in the retinal dystrophic RCS rat. *Hum. Mol. Genet.* 2000; 9:645-651.

Dehnes Y, Chaudhry FA, Ullensvang K, Lehre KP, Storm-Mathisen J, Danbolt NC. The glutamate transporter EAAT4 in rat cerebellar Purkinje cells: a glutamate-gated chloride channel concentrated near the synapse in parts of the dendritic membrane facing astroglia. *J Neurosci.* 1998;18:3606-19.

del Cerro M, Notter MF, del Cerro C, Wiegand SJ, Grover DA, Lazar E. Intraretinal

transplantation for rod-cell replacement in light-damaged retinas. *J Neural Transplant.* 1989;1:1-10

den Hollander AI, ten Brink JB, de Kok YJM, van Soest S, van den Born LI, van Driel MA, van De Pol DJR, Payne AM, Bhattacharya SS, Kellner U, Hoyng CB, Westerveld A, Brunner HG, Bleeker-Wagemakers EM, Deutman AF, Heckenlively JR, Cremers FPM, Bergen AAB. Mutations in a human homologue of *Drosophila crumbs* cause retinitis pigmentosa (RP12). *Nat. Genet.* 1999;23:217-221

Derouiche A, Rauen T. Coincidence of L-glutamate/L-aspartate transporter (GLAST) and glutamine synthetase (GS) immunoreactions in retinal glia: evidence for coupling of GLAST and GS in transmitter clearance. *J Neurosci Res* 1995; 42:131-43.

Downes SM, Holder GE, Fitzke FW, Payne AM, Warren MJ, Bhattacharya SS, Bird AC. Autosomal dominant cone and cone-rod dystrophy with mutations in the guanylate cyclase activator 1A gene-encoding guanylate cyclase activating protein-1. *Arch Ophthalmol.* 2001;119:96-105.

Dryja TP, Finn JT, Peng YW, McGee TL, Berson EL, Yau KW. Mutations in the gene encoding the alpha subunit of the rod cGMP-gated channel in autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1995; 92:10177-10181.

Dryja TP, Hahn LB, Kajiwara K, Berson EL. Dominant and digenic mutations in the peripherin/RDS and ROM1 genes in retinitis pigmentosa. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1997; 8:1972-1982.

Dryja TP, Hahn LB, Reboul T, Arnaud B. Missense mutation in the gene encoding the alpha subunit of rod transducin in the Nougaret form of congenital stationary night blindness. *Nat Genet.* 1996;13:358-60.

Dryja TP, McGee TL, Reichel E, Hahn LB, Cowley GS, Yandell DW, Sandberg MA, Berson EL. A point mutation of the rhodopsin gene in one form of retinitis pigmentosa. *Nature.* 1990;343:364-6.

Duan S, Anderson CM, Stein BA, Swanson RA. Glutamate induces rapid upregulation of

astrocyte glutamate transport and cell-surface expression of GLAST. *J Neurosci* 1999; 19:10193-200.

Durbec P, Marcos-Gutierrez CV, Kilkenny C, Grigoriou M, Wartiovaara K, Suvanto P, Smith D, Ponder B, Costantini F, Saarma M, et al. GDNF signaling through the Ret receptor Tyrosine Kinase. *Nature* 1996; 381:789-93.

E.

Ehinger B, Ottersen OP, Storm-Mathisen J, Dowling, JE. Bipolar cells in the turtle retina are strongly immunoreactive for glutamate. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1988;85:8321-8325.

Ellis RE, Yuan JY, Horvitz HR. Mechanisms and functions of cell death. *Annu Rev Cell Biol* 1991;7: 665-98

Erecinska M, Silver IA. Metabolism and role of glutamate in mammalian brain. *Prog Neurobiol* 1990; 35:245-96.

F.

Fain, GL, Lisman, JE (1993) Photoreceptor degeneration in vitamin A deprivation and retinitis pigmentosa: the equivalent light hypothesis *Exp Eye Res* 57,335-340

Fairman WA, Vandenberg RJ, Arriza JL, Kavanaugh MP, Amara SG. An excitatory amino-acid transporter with properties of a ligand-gated chloride channel. *Nature.* 1995 ;375:599-603

Faktorovich EG, Steinberg RH, Yasumura D, Matthes MT, LaVail MM. Photoreceptor degeneration in inherited retinal dystrophy delayed by basic fibroblast growth factor. *Nature.* 1990;347(6288):83-6

Faktorovich EG, Steinberg RH, Yasumura D, Matthes MT, LaVail MM. Basic fibroblast growth factor and local injury protect photoreceptors from light damage in the rat. *J. Neurosci.* 1992;12:3554-67

Farber DB, Lolley RN. Cyclic guanosine monophosphate: elevation in degenerating photoreceptor cells of the C3H mouse retina. *Science*. 1974 ;186:449-51.

Farber DB, Lolley RN. Enzymic basis for cyclic GMP accumulation in degenerative photoreceptor cells of mouse retina. *J Cyclic Nucleotide Res*. 1976;2:139-48.

Farber DB, Lolley RN. Light-induced reduction in cyclic GMP of retinal photoreceptor cells in vivo: abnormalities in the degenerative diseases of RCS rats and rd mice. *J Neurochem* 1977 ;28:1089-95

Farber DB, Flannery JG, Bowes-Rickman C. The rd mouse story: seventy years of research on an animal model of inherited retinal degeneration. *Prog Ret Eye Res*. 1994;13:31-64

Feng B, Shiber SK, Max SR. Glutamine regulates glutamine synthetase expression in skeletal muscle cells in culture. *J Cell Physiol* 1990;145:376-80

Fintz AC, Audo I, Hicks D, Mohand-Said S, Leveillard T, Sahel J. Partial characterization of retina-derived cone neuroprotection in two culture models of photoreceptor degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2003 Feb;44(2):818-25.

Fischer AJ, Reh TA. Identification of a proliferating marginal zone of retinal progenitors in postnatal chickens. *Dev Biol*. 2000;220:197-210

Fischer AJ, Reh TA. Muller glia are a potential source of neural regeneration in the postnatal chicken retina. *Nature Neurosci* 2001;4:247-52

Fletcher EL. Alterations in neurochemistry during retinal degeneration. *Microsc Res Tech* 2000; 50:89-102.

Fletcher EL, Kalloniatis M. Neurochemical architecture of the normal and degenerating rat

retina. *J Comp Neurol* 1996; 376:343-60.

Fonnum F. Glutamate: a neurotransmitter in mammalian brain. *J Neurochem.* 1984;42:1-11.

Fontaine V, Kinkl N, Sahel J, Dreyfus H, Hicks D. Survival of purified rat photoreceptors in vitro is stimulated directly by fibroblast growth factor-2. *J Neurosci.* 1998;18(23):9662-72

Frasson M, Sahel JA, Fabre M, Simonutti M, Dreyfus H, Picaud S. Retinitis pigmentosa: rod photoreceptor rescue by a calcium-channel blocker in the rd mouse. *Nat Med.* 1999a;5:1183-7.

Frasson M, Picaud S, Leveillard T, Simonutti M, Mohand-Said S, Dreyfus H, Hicks D, Sahel J. Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor induces histological and functional protection of rod photoreceptors in the rd/rd mouse. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999b; 40:2724-34.

Fuchs S, Nakazawa M, Maw M, Tamai M, Oguchi Y, Gal A. A homozygous 1-base pair deletion in the arrestin gene is a frequent cause of Oguchi disease in Japanese. *Nat Genet.* 1995;10:360-2.

Furuta A, Rothstein JD, Martin LJ. Glutamate transporter protein subtypes are expressed differentially during rat CNS development. *J Neurosci* 1997; 17:8363-75.

G.

Gage FH. Mammalian neural stem cells. *Science.* 2000;287:1433-8

Gan WB. Glutamate-dependent stabilization of presynaptic terminals. *Neuron* 2003;38(5): 677-8.

Gegelashvili G, Civenni G, Racagni G, Danbolt NC, Schousboe I, Schousboe A. Glutamate receptor agonists up-regulate glutamate transporter GLAST in astrocytes. *Neuroreport* 1996; 8:261-5.

Gerber S, Rozet JM, Takezawa SI, dos Santos LC, Lopes L, Gribouval O, Penet C, Perrault I, Ducroq D, Souied E, Jeanpierre M, Romana S, Frézal J, Ferraz F, Yu-Umesono R, Munnich A, Kaplan J. The photoreceptor cell-specific nuclear receptor gene (PNR) accounts for retinitis pigmentosa in the Crypto-Jews from Portugal (Marranos), survivors from the Spanish Inquisition. *Hum. Genet.* 2000;107:276-284.

GFRalpha Nomenclature Committee. Nomenclature of GPI-linked receptors for the GDNF ligand family. *Neuron* 1997; 19:485.

Gieser L, Fujita R, Göring HHH, Ott J, Hoffman DR, Cideciyan AV, Birch DG, Jacobson SG, Swaroop A. A novel locus (RP24) for X-linked retinitis pigmentosa maps to Xq26-q27. *Am. J. Hum. Genet.* 1998; 63:1439-1447.

Gill SS, Patel NK, Hotton GR, O'Sullivan K, McCarter R, Bunnage M, Brooks DJ, Svendsen CN, Heywood P. Direct brain infusion of glial cell line-derived neurotrophic factor in Parkinson disease. *Nat Med.* 2003;9:589-95.

Glissin V, Crkvenjakov R, Byus C. Ribonucleic acid isolated by cesium chloride centrifugation. *Biochemistry* 1974; 13:2633-7.

Goliath R, Shugart Y, Janssens P, Weissenbach J, Beighton P, Ramasar R, Greenberg J. Fine localization of the locus for autosomal dominant retinitis pigmentosa on chromosome 17p. *Am. J. Hum. Genet.* 1995; 57:962-965.

Gouras P, Du J, Gelanze M, Kwun R, Kjeldbye H, Lopez R. Transplantation of photoreceptors labeled with tritiated thymidine into RCS rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1991;32:1704-7

Gouras P et Lopez R. Transplantation of retinal epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1989;30:1681-3

Goureau O, Jeanny JC, Becquet F, Hartmann MP, Courtois Y. Protection against light-induced retinal degeneration by an inhibitor of NO synthase. *Neuroreport* 1993;5:233.6

Grafstein B, Murray M, Ingoglia NA. Protein synthesis and axonal transport in retinal ganglion cells of mice lacking visual receptors. *Brain Res.* 1972;44:37-48.

H.

Hacein-Bey-Abina S, Von Kalle C, Schmidt M, McCormack MP, Wulffraat N, Leboulch P, Lim A, Osborne CS, Pawliuk R, Morillon E, Sorensen R, Forster A, Fraser P, Cohen JI, de Saint Basile G, Alexander I, Wintergerst U, Frebourg T, Aurias A, Stoppa-Lyonnet D, Romana S, Radford-Weiss I, Gross F, Valensi F, Delabesse E, Macintyre E, Sigaux F, Soulier J, Leiva LE, Wissler M, Prinz C, Rabbitts TH, Le Deist F, Fischer A, Cavazzana-Calvo M. LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science* 2003;302:415–419.

Hackam AS, Strom R, Liu D, Qian J, Wang C, Otteson D, Gunatilaka T, Farkas RH, Chowers I, Kageyama M, Leveillard T, Sahel JA, Campochiaro PA, Parmigiani G, Zack DJ. Identification of gene expression changes associated with the progression of retinal degeneration in the rd1 mouse. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2004;45:2929-42.

Harada T, Harada C, Kohsaka S, Wada E, Yoshida K, Ohno S, Mamada H, Tanaka K, Parada LF, Wada K. Microglia-Muller glia cell interactions control neurotrophic factor production during light-induced retinal degeneration. *J Neurosci* 2002; 22:9228-36.

Harada C, Harada T, Quah HM, Maekawa F, Yoshida K, Ohno S, Wada K, Parada LF, Tanaka K. Potential role of glial cell line-derived neurotrophic factor receptors in Muller glial cells during light-induced retinal degeneration. *Neuroscience* 2003; 122:229-35.

Harada T, Harada C, Watanabe M, Inoue Y, Sakagawa T, Nakayama N, Sasaki S, Okuyama S, Watase K, Wada K, Tanaka K. Functions of the two glutamate transporters GLAST and GLT-1 in the retina. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95:4663-6.

Hardcastle AJ, Thiselton DL, Van Maldergem L, Saha BK, Jay M, Plant C, Taylor R, Bird AC, Bhattacharya S. Mutations in the RP2 gene cause disease in 10% of families with familial X-linked retinitis pigmentosa assessed in this study. *Am. J. Hum. Genet.* 1999; 64:1210-1215.

Hardcastle AJ, Thiselton DL, Zito H, Ebenezer N, Mah TS, Gorin MB, Bhattacharya SS. Evidence for a new locus for X-linked retinitis pigmentosa (RP23). *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2000; 41:2080-2086.

Haugeto O, Ullensvang K, Levy LM, Chaudhry FA, Honore T, Nielsen M, Lehre KP, Danbolt NC. Brain glutamate transporter proteins form homomultimers. *J Biol Chem* 1996; 271:27715-22.

Hayashi T. Effects of sodium glutamate on the nervous system. *Keio J Med.* 1954;3:183-192.

Henderson CE, Phillips HS, Pollock RA, Davies AM, Lemeulle C, Armanini M, Simmons L, Moffet B, Vandlen RA, Simpson LC [corrected to Simmons L, et al. GDNF: a potent survival factor for motoneurons present in peripheral nerve and muscle. *Science.* 1994;266:1062-4.

Hicks D, Courtois Y. The growth and behaviour of rat retinal Muller cells in vitro. 1. An improved method for isolation and culture. *Exp Eye Res.* 1990;51:119-29.

Hicks D, Courtois Y. Fibroblast growth factor stimulates photoreceptor differentiation in vitro. *J Neurosci.* 1992;12:2022-33.

Hims MM, Diager SP, Inglehearn CF. Retinitis pigmentosa: genes, proteins and prospects. *Dev Ophthalmol.* 2003;37:109-25.

Hollmann M, Heinemann S Cloned glutamate receptors. *Annu Rev Neurosci* 1994;17:31-108

Huang PC, Gaitan AE, Hao Y, Petters RM, Wong F. Cellular interactions implicated in the mechanism of photoreceptor degeneration in transgenic mice expressing a mutant rhodopsin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90:8484-8

Huang SH, Pittler SJ, Huang X, Oliveria L, Berson EL, Dryja TP. Autosomal recessive retinitis pigmentosa caused by mutations in the alpha subunit of rod cGMP phosphodiesterase. *Nat. Genet.* 1995; 11:468-4712.

I.

Ingham CA, Morgan IG. Dose-dependent effects of intravitreal kainic acid on specific cell types in chicken retina. *Neuroscience* 1983;9:165-81.

Inglehearn CF, Carter SA, Keen TJ, Lindsey J, Stephenson AM, Bashir R, Al-Maghtheh M, Moore AT, Jay M, Bird AC, Bhattacharya SS. A new locus for autosomal dominant retinitis

pigmentosa (adRP) on chromosome 7p. *Nat. Genet.* 1993; 4:51-53.

Ishii M, Horio Y, Tada Y, Hibino H, Inanobe A, Ito M, Yamada M, Gotow T, Uchiyama Y, Kurachi Y. Expression and clustered distribution of an inwardly rectifying potassium channel, KAB-2/Kir4.1, on mammalian retinal Muller cell membrane: their regulation by insulin and laminin signals. *J Neurosci.* 1997;17:7725-35.

Izumi Y, Shimamoto K, Benz AM, Hammerman SB, Olney JW, Zorumski CF. Glutamate transporters and retinal excitotoxicity. *Glia* 2002; 39:58-68.

J.

Jansen HG, Sanyal S. Development and degeneration of retina in rds mutant mice: electron microscopy. *J Comp Neurol.* 1984;224:71-84

Jay M. On the heredity of retinitis pigmentosa. *Br J Ophthalmol.* 1982 Jul;66(7):405-16.

Jiang LQ, Hamasaki D. Corneal electroretinographic function rescued by normal retinal pigment epithelial grafts in retinal degenerative Royal College of Surgeons rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1994;35:4300-9

Jing S, Wen D, Yu Y, Holst PL, Luo Y, Fang M, Tamir R, Antonio L, Hu Z, Cupples R, Louis JC, Hu S, Altmock BW, Fox GM. GDNF-induced activation of the ret protein tyrosine kinase is mediated by GDNFR-alpha, a novel receptor for GDNF. *Cell.* 1996 Jun 28;85(7):1113-24.

Jing S, Yu Y, Fang M, Hu Z, Holst PL, Boone T, Delaney J, Schultz H, Zhou R, Fox GM. GFRalpha-2 and GFRalpha-3 are two new receptors for ligands of the GDNF family. *J Biol*

Chem 1997; 272:33111-7.

Jojich L, Pourcho RG. Glutamate immunoreactivity in the cat retina: a Quantitative study. *Vis. Neurosci.* 1996;13:117-133.

Jomary C, Thomas M, Grist J, Milbrandt J, Neal MJ, Jones SE. Expression patterns of neurturin and its receptor components in developing and degenerative mouse retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999; 40:568-74.

Jurgensmeier JM, Xie Z, Deveraux Q, Ellerby L, Bredesen D, Reed JC. Bax directly induces release of cytochrome c from isolated mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95:4997-5002.

K.

Kajiwara K, Berson EL, Dryja TP. Digenic retinitis pigmentosa due to mutations at the unlinked peripherin/RDS and ROM1 loci. *Science.* 1994 Jun 10;264(5165):1604-8.

Kajiwara K, Hahn LB, Mukai S, Travis GH, Berson EL, Dryja TP. Mutations in the human retinal degeneration slow gene in autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Nature* 1991; 354:480-483.

Kalloniatis M, Fletcher EL. Immunocytochemical localization of the amino acid neurotransmitters in the chicken retina. *J. Comp. Neurol.* 1993;336:174-193.

Kalloniatis M, Tomisich G. Amino acid neurochemistry of the vertebrate retina. *Prog Retin Eye Res* 1999; 18:811-66.

Kanai Y, Smith CP, Hediger MA. The elusive transporters with a high affinity for glutamate. *Trends Neurosci.* 1993;16:365-70.

Karli P. Rétines sans cellules visuelles. Recherches morphologiques et physiopathologiques chez les rongeurs. *Arch Anat Histol Embryol.* 1952 ;35 :1-76

Katsanis N, Ansley SJ, Badano JL, Eichers ER, Lewis RA, Hoskins BE, Scambler PJ, Davidson WS, Beales PL, Lupski JR. Triallelic inheritance in Bardet-Biedl syndrome, a Mendelian recessive disorder. *Science.* 2001;293(5538):2256-9.

Katsanis N, Beales PL, Woods MO, Lewis RA, Green JS, Parfrey PS, Ansley SJ, Davidson WS, Lupski JR. Mutations in MKKS cause obesity, retinal dystrophy and renal malformations associated with Bardet-Biedl syndrome. *Nat Genet.* 2000 ;26(1):67-70.

Katsanis, N. et al. Triallelic inheritance in Bardet–Biedl syndrome, a Mendelian recessive disorder. *Science* 293, 2256–2259 (2001).

Kedzierski W, Bok D, Travis GH. Non-cell-autonomous photoreceptor degeneration in rds mutant mice mosaic for expression of a rescue transgene. *J Neurosci.* 1998;18:4076-82

Keeler CE. The inheritance of a retinal abnormality in white mice. *Proc Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 1924;10:329-333

Keen TJ, Willis C, Moore AT, Rosenberg T, Webster AR, Bird AC, Gal A, Hunt D, Vithana EN, Bhattacharya SS. Mutations in HPRP3, a third member of pre-mRNA splicing factor genes, implicated in autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Hum. Mol. Genet.* 2002;11:87-92.

Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis : a basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972;26: 239-57

Kluck RM, Bossy-Wetzel E, Green DR, Newmeyer DD. The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science*. 1997;275:1132-6.

Koeberle PD, Ball AK. Neurturin enhances the survival of axotomized retinal ganglion cells in vivo: combined effects with glial cell line-derived neurotrophic factor and brain-derived neurotrophic factor. *Neuroscience* 2002; 110:555-67.

Kommonen B, Kylma T, Cohen RJ, Penn JS, Paulin L, Hurwitz M, Hurwitz RL. Elevation of cGMP with normal expression and activity of rod cGMP-PDE in photoreceptor degenerate labrador retrievers. *Ophthalmic Res*. 1996;28:19-28

Kordower JH, Chen EY, Winkler C, Fricker R, Charles V, Messing A, Mufson EJ, Wong SC, Rosenstein JM, Bjorklund A, Emerich DF, Hammang J, Carpenter MK. Grafts of EGF-responsive neural stem cells derived from GFAP-hNGF transgenic mice: trophic and tropic effects in a rodent model of Huntington's disease. *J Comp Neurol*. 1997;387:96-113

Koulen P, Kuhn R, Wassle H, Brandstatter JH. Modulation of the intracellular calcium concentration in photoreceptor terminals by a presynaptic metabotropic glutamate receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96:9909-14.

Kroemer G. The proto-oncogene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis. *Nat Med*. 1997;3:614-20.

L.

Lasansky A, DeRobertis E. Submicroscopic analysis of the genetic dystrophy of visual cells in C3H mice. *J Biophys Biochem Cytol* 1960; 7:679-694.

Lau D, McGee LH, Zhou S, Rendahl KG, Manning WC, Escobedo JA and Flannery JG. Retinal degeneration is slowed in transgenic rats by AAV-mediated delivery of FGF-2. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41:3622-33

LaVail MM, Li L, Turner JE, Yasumura D. Retinal pigment epithelial cell transplantation in RCS rats: normal metabolism in rescued photoreceptors. *Exp Eye Res.* 1992;55:555-62

LaVail MM, Yasumura D, Matthes MT, Drenser KA, Flannery JG, Lewin AS, Hauswirth WW. Ribozyme rescue of photoreceptor cells in P23H transgenic rats: long-term survival and late-stage therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97:11488-93

LaVail MM, Yasumura D, Matthes MT, Lau-Villacorta C, Unoki K, Sung CH and Steinberg RH. Protection of mouse photoreceptors by survival factors in retinal degenerations. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998;39:592-602

Lawrence JM, Keegan DJ, Muir EM, Coffey PJ, Rogers JH, Wilby MJ, Fawcett JW, Lund RD. Transplantation of Schwann cell line clones secreting GDNF or BDNF into the retinas of dystrophic Royal College of Surgeons rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004; 45:267-74.

Lehrach H, Diamond D, Wozney JM, Boedtker H. RNA molecular weight determinations by gel electrophoresis under denaturing conditions, a critical reexamination. *Biochemistry.* 1977 Oct 18;16(21):4743-51.

Lem J, Flannery JG, Li T, Applebury ML, Farber DB and Simon MI. Retinal degeneration is rescued in transgenic rd mice by expression of the cGMP phosphodiesterase beta subunit. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 1992;89:4422-4426.

Lester DH, Inglehearn CF, Bashir R, Ackford H, Esakowitz L, Jay M, Bird AC, Wright AF, Papiha SS, Bhattacharya SS. Linkage to D3S47 (C17) in one large autosomal dominant retinitis pigmentosa family and exclusion in another: confirmation of genetic heterogeneity. *Am J Hum Genet.* 1990;47:536-41.

Léveillard T, Mohand-Said S, Lorentz O, Hicks D, Fintz AC, Clerin E, Simonutti M, Forster V, Cavusoglu N, Chalmel F, Dolle P, Poch O, Lambrou G, Sahel JA. Identification and characterization of rod-derived cone viability factor. *Nat Genet.* 2004 Jul;36(7):755-9.

Lewin AS, Drenser KA, Hauswirth WW, Nishikawa S, Yasumura D, Flannery JG, LaVail MM. Ribozyme rescue of photoreceptor cells in a transgenic rat model of autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Nat Med.* 1998;4(8):967-71

Li ZY, Jacobson SG, Milam AH. Autosomal dominant retinitis pigmentosa caused by the threonine-17-methionine rhodopsin mutation: retinal histopathology and immunocytochemistry. *Exp Eye Res.* 1994;58:397-408.

Li T, Sandberg MA, Pawlyk BS, Rosner B, Hayes KC, Dryja TP, Berson EL. Effect of vitamin A supplementation on rhodopsin mutants threonine-17 --> methionine and proline-347 --> serine in transgenic mice and in cell cultures. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95:11933-8

Li T, Snyder W, Olsson J, Dryja T. Transgenic mice carrying the dominant rhodopsin mutation P347S: evidence for defective vectorial transport of rhodopsin to the outer segments. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:14176-81

Li LX et Turner JE. Inherited retinal dystrophy in the RCS rat: prevention of photoreceptor degeneration by pigment epithelial cell transplantation. *Exp Eye Res* 1988;47:911-7

Liang FQ, Dejneka NS, Cohen DR, Krasnoperova NV, Lem J, Maguire AM, Dudas L, Fisher KJ, Bennett J. AAV-mediated delivery of ciliary neurotrophic factor prolongs photoreceptor survival in the rhodopsin knockout mouse. *Mol Ther* 2001;3:241-8

Lin LF, Doherty DH, Lile JD, Bektesh S, Collins F. GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons. *Science*. 1993;260:1130-2

Linser PJ, Sorrentino M, Moscona AA. Cellular compartmentalization of carbonic anhydrase-C and glutamine synthetase in developing and mature mouse neural retina. *Brain Res* 1984; 315:65-71.

Lisman, JE, Fain, GL (1995) Support for the equivalent light hypothesis for R *Nat Me* 1,1254-1255

Liu XR, Wu TH, Stowe S, Matsushita A, Arikawa K, Naash MI, Williams DS. Defective phototransductive disk membrane morphogenesis in transgenic mice expressing opsin with a mutated N-terminal domain. *J Cell Sci* 1997;110:2589-97

Loewenstein JI, Montezuma SR, Rizzo JF 3rd. Outer retinal degeneration: an electronic retinal prosthesis as a treatment strategy. *Arch Ophthalmol*. 2004;122:587-96.

Lolley RN, Rong H, Craft CM. Linkage of photoreceptor degeneration by apoptosis with inherited defect in phototransduction. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1994 ;35:358-362

Lopez R, Gouras P, Kjeldbye H, Sullivan B, Reppucci V, Brittis M, Wapner F, Goluboff E. Transplanted retinal pigment epithelium modifies the retinal degeneration in the RCS rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1989;30:586-8

Lucas DR, Newhouse JP. The toxic effect of sodium L-glutamate on the inner layers of the retina. *AMA Arch Ophthalmol*. 1957;58:193-201

M.

Madl JE, Burgesser K. Adenosine triphosphate depletion reverses sodium-dependent,

neuronal uptake of glutamate in rat hippocampal slices. *J Neurosci.* 1993;13:4429-44.

Marc RE, Jones BW, Watt CB, Strettoi E. Neural remodeling in retinal degeneration. *Prog Retin Eye Res.* 2003;22:607-55.

Marc RE, Liu WLS, Kalloniatis M, Raiguel SF, Van Haesendonck E. Patterns of glutamate immunoreactivity in the goldfish retina. *J. Neurosci.* 1990;10:4006-4034.

Marco S, Canudas AM, Canals JM, Gavalda N, Perez-Navarro E, Alberch J. Excitatory amino acids differentially regulate the expression of GDNF, neurturin, and their receptors in the adult rat striatum. *Exp Neurol* 2002; 174:243-52

Marlhens, F., Bareil, C., Griffoin, J.-M., Zrenner, E., Amalric, P., Eliaou, C., Liu, S.-Y., Harris, E., Redmond, T.M., Arnaud, B. et al. Mutations in RPE65 cause Leber's congenital amaurosis. *Nat. Genet.*, 1997; 17:139-41

Massey SC. Cell types using glutamate as a neurotransmitter in the vertebrate retina. *Prog. Ret. Res.* 1990;9:399-425.

Masu M, Iwakabe H, Tagawa Y, Miyoshi T, Yamashita M, Fokuda Y, Sasaki H, Hiroi K, Nakamura Y, Shigemoto R, Takada M, Nakamura K, Nakao K, Katsuki M, Nakanishi S. Specific deficit of the ON response in visual transmission by targeted disruption of the mGluR6 gene. *Cell* 1995;80: 757-765.

Matthes MT, Bok D. Blood vascular abnormalities in the degenerative mouse retina (C57BL/6J-rd 1e). *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1984;25:364-9.

Mayer ML, Westbrook GL. The physiology of excitatory amino acids in the vertebrate central

nervous system. *Prog Neurobiol.* 1987;28:197-276.

Maw MA, Kennedy B, Knight A, Bridges R, Roth KE, Mani EJ, Mukkadan JK, Nancarrow D, Crabb JW, Denton MJ. Mutation of the gene encoding cellular retinaldehyde-binding protein in autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Nat. Genet.* 17:198-200 (1997).

McDonald JW, Johnston MV. Physiological and pathophysiological roles of excitatory amino acids during central nervous system development. *Brain Res Brain Res Rev.* 1990;15:41-70.

McGee Sanftner LH, Abel H, Hauswirth WW, Flannery JG. Glial cell line derived neurotrophic factor delays photoreceptor degeneration in a transgenic rat model of retinitis pigmentosa. *Mol Ther* 2001; 4:622-9.

McKay R. Stem cells in the central nervous system. *Science.* 1997;276:66-71

McLaughlin ME, Sandberg MA, Berson EL, Dryja TP. Recessive mutations in the gene encoding the beta-subunit of rod phosphodiesterase in patients with retinitis pigmentosa. *Nat Genet.* 1993;4:130-4.

McWilliam P, Farrar GJ, Kenna P, Bradley DG, Humphries MM, Sharp EM, McConnell DJ, Lawler M, Sheils D, Ryan C. Autosomal dominant retinitis pigmentosa (ADRP): localization of an ADRP gene to the long arm of chromosome 3. *Genomics.* 1989 Oct;5(3):619-22.

Meldrum B, Garthwaite J. Excitatory amino acid neurotoxicity and neurodegenerative disease. *Trends Pharmacol Sci.* 1990;11:379-87.

Menu dit Huart L, Lorentz O, Goureau O, Leveillard T, Sahel JA. DNA repair in the degenerating mouse retina. *Mol Cell Neurosci*. 2004;26:441-9.

Milam AH, Li ZY, Fariss RN. Histopathology of the human retina in retinitis pigmentosa. *Prog Retin Eye Res*. 1998;17(2):175-205

Mohand-Said S, Deudon-Combe A, Hicks D, Simonutti M, Forster V, Fintz AC, Leveillard T, Dreyfus H, Sahel JA. Normal retina releases a diffusible factor stimulating cone survival in the retinal degeneration mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95:8357-62

Mohand-Said S, Hicks D, Dreyfus H, Sahel JA. Selective transplantation of rods delays cone loss in a retinitis pigmentosa model. *Arch Ophthalmol*. 2000;118(6):807-11

Mohand-Said S, Hicks D, Leveillard T, Picaud S, Porto F et Sahel JA. Rod-cone interactions: developmental and clinical significance. *Prog Retin Eye Res* 2001;20:451-67

Mohand-Said S, Hicks D, Simonutti M, Tran-Minh D, Deudon-Combe A, Dreyfus H, Silverman MS, Ogilvie JM, Tenkova T et Sahel J. Photoreceptor transplants increase host cone survival in the retinal degeneration (rd) mouse. *Ophthalmic Res* 1997;29:290-7

Molthagen M, Schachner M, Bartsch U. Apoptotic cell death of photoreceptor cells in mice deficient for the adhesion molecule on glia (AMOG, the beta 2.subunit of the Na, K-ATPase). *J Neurocytol* 1996;25:243,255

Momma S, Johansson CB, Frisen J. Get to know your stem cells. *Curr Opin Neurobiol*. 2000;10:45-9

Monaghan DT, Bridges RJ, Cotman CW. The excitatory amino acid receptors: their classes, pharmacology, and distinct properties in the function of the central nervous system. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1989;29:365-402.

Morigiwa K, Vardi N. Differential expression of ionotropic glutamate receptor subunits in the outer retina. *J Comp Neurol.* 1999;405:173-84.

Morimura H, Fishman GA, Grover SA, Fulton AB, Berson EL, Dryja TP. Mutations in the RPE65 gene in patients with autosomal recessive retinitis pigmentosa or Leber congenital amaurosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998; 95:3088-3093.

N.

Naash MI, Hollyfield JG, al-Ubaidi MR, Baehr W. Simulation of human autosomal dominant retinitis pigmentosa in transgenic mice expressing a mutated murine opsin gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:5499-503

Nakanishi S. Molecular diversity of glutamate receptors and implications for brain function. *Science.* 1992;258:597-603.

Nakazawa M. A molecular biological study on retinitis pigmentosa. *Nippon Ganka Gakkai Zasshi* 1993; 97:1394-405

Naskar R, Vorwerk CK, Dreyer EB. Concurrent downregulation of a glutamate transporter and receptor in glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000; 41:1940-4.

Nestler EJ, Duman ES. G proteins and cyclic nucleotides in the nervous system 1994, pp. 429-448 In *Basic Neurochemistry*, 5th ed. Siegel, G.J., Agranoff, B.W., Albers, R.W., and Molinoff, P.B. (eds). Raven Press, New York.

Nicol GD. A derivative of amiloride blocks both the light-regulated and cyclic GMP-regulated conductances in rod photoreceptors. *J. Gen. Physiol.* 1987;90:651-69

Nicol GD. The calcium channel antagonist, pimozide, blocks the cyclic GMP-activated current in rod photoreceptors. *J. Pharmacol. Exp. Therap.* 1993;265 : 626-32

Nicole O, Ali C, Docagne F, Plawinski L, MacKenzie ET, Vivien D, Buisson A. Neuroprotection mediated by glial cell line-derived neurotrophic factor: involvement of a reduction of NMDA-induced calcium influx by the mitogen-activated protein kinase pathway. *J Neurosci* 2001; 21:3024-33

Nicoletti, A., Wong, D.J., Kawase, K., Gibson, L.H., Yang-Feng, T.L., Richards, J.E. and Thompson, D.A. Molecular characterization of the human gene encoding an abundant 61 kDa protein specific to the retinal pigment epithelium. *Hum. Mol. Genet.*, 1995;4:641-9

Nishida A, Takahashi M, Tanihara H, Nakano I, Takahashi JB, Mizoguchi A, Ide C, Honda Y. Incorporation and differentiation of hippocampus-derived neural stem cells transplanted in injured adult rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci.*2000 ;41:4268-74

Noell WK. Aspects of experimental and hereditary retinal degeneration. In: *Biochemistry of the retina* (C. Graymore, ed.) 1965; pp.51-72. Academic Press, London.

Nomura A, Shigemoto R, Nakamura Y, Okamoto N, Mizuno N, Nakanishi S. Developmentally regulated postsynaptic localization of a metabotropic glutamate receptor in rat rod bipolar cells. *Cell.* 1994;77:361-9.

Noro Y, Ishiguro SI, Tamai M. Accumulation of glutamate-like immunoreactivity in the rds/rds mouse retinas. *Association for Research in Vision and Ophthalmology*; 1994 May 1-5; Fort Lauderdale, FLA. *IOVS* 1994; 35:ARVO Abstract 501.

O.

Ogilvie J.M., Deckwerth T.L., Knudson C.M., Korsmeyer S.J. Suppression of developmental retinal cell death but not of photoreceptor degeneration in Bax-deficient mice. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1998;39:1713-20

Ohguro H, Ogawa K, Maeda T, Maruyama I, Maeda A, Takano Y, Nakazawa M. Retinal dysfunction in cancer-associated retinopathy is improved by Ca(2+) antagonist administration and dark adaptation. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2001;42:2589-95

Okada M, Okuma Y, Osumi Y, Nishihara M, Yokotani K, Ueno H. Neurotransmitter contents in the retina of RCS rat. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2000; 238:998-1001.

Olney JW. Brain lesions, obesity and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. *Science* 1969;164:719-721

Olney JW. The toxic effects of glutamate and related compounds in the retina and the brain. *Retina* 1982;2:341-59.

Olney JW, Ho OC, Rhee V. Cytotoxic effects of acidic and sulphur containing amino acids on the infant mouse central nervous system. *Exp. Brain Res.* 1971;14: 61-76

Orr HT, Cohen AI, Carter JA. The levels of free taurine, glutamate, glycine and gamma-amino butyric acid during the postnatal development of the normal and dystrophic retina of the mouse. *Exp Eye Res* 1976; 23:377-84.

Otani A, Dorrell MI, Kinder K, Moreno SK, Nusinowitz S, Banin E, Heckenlively J, Friedlander M. Rescue of retinal degeneration by intravitreally injected adult bone marrow-derived lineage-negative hematopoietic stem cells. *J Clin Invest.* 2004;114:765-74.

P.

Pasantes-Morales H, Quiroz H, Quesada O. Treatment with taurine, diltiazem, and vitamin E

retards the progressive visual field reduction in retinitis pigmentosa: a 3-year follow-up study. *Metab Brain Dis.* 2002;17:183-97.

Pawlyk BS, Li T, Scimeca MS, Sandberg MA, Berson EL. Absence of photoreceptor rescue with D-cis-diltiazem in the rd mouse. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2002;43:1912-5

Payne AM, Downes SM, Bessant DA, Plant C, Moore T, Bird AC, Bhattacharya SS. Genetic analysis of the guanylate cyclase activator 1B (GUCA1B) gene in patients with autosomal dominant retinal dystrophies. *J Med Genet.* 1999;36:691-3.

Payne AM, Downes SM, Bessant DA, Taylor R, Holder GE, Warren MJ, Bird AC, Bhattacharya SS. A mutation in guanylate cyclase activator 1A (GUCA1A) in an autosomal dominant cone dystrophy pedigree mapping to a new locus on chromosome 6p21.1. *Hum Mol Genet.* 1998;7:273-7.

Pearce-Kelling SE, Aleman TS, Nickle A, Laties AM, Aguirre GD, Jacobson SG, Acland GM. Calcium channel blocker D-cis-diltiazem does not slow retinal degeneration in the PDE6B mutant rcd1 canine model of retinitis pigmentosa. *Mol Vis.* 2001;7:42-7

Perrault I, Rozet JM, Calvas P, Gerber S, Camuzat A, Dollfus H, Chatelin S, Souied E, Ghazi I, Leowski C, Bonnemaïson M, Le Paslier D, Frezal J, Dufier JL, Pittler S, Munnich A, Kaplan J. Retinal-specific guanylate cyclase gene mutations in Leber's congenital amaurosis. *Nat Genet.* 1996;14:461-4.

Perry J, Du J, Kjeldbye H, Gouras P. The effects of bFGF on RCS rat eyes. *Curr Eye Res* 1995;14:585-92

Phelan JK, Bok D. Analysis and quantitation of mRNAs encoding the alpha- and beta-subunits of rod photoreceptor cGMP phosphodiesterase in neonatal retinal degeneration (rd) mouse retinas. *Exp Eye Res.* 2000 Aug;71(2):119-28.

Picaud SA, Larsson HP, Grant GB, Lecar H, Werblin FS. Glutamate-gated chloride channel with glutamate-transporter-like properties in cone photoreceptors of the tiger salamander. *J Neurophysiol* 1995a;74:1760-71

Picaud S, Larsson HP, Wellis DP, Lecar H, Werblin F. Cone photoreceptors respond to their own glutamate release in the tiger salamander. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995b; 92:9417-21.

Pierce EA. Pathways to photoreceptor cell death in inherited retinal degenerations. *Bioessays*. 2001;23:605-18

Pittler SJ et Baehr W. Identification of a nonsense mutation in the rod photoreceptor cGMP phosphodiesterase beta-subunit gene of the rd mouse. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 1991;88:8322-8326.

Politi LE, Rotstein NP, Carri NG. Effect of GDNF on neuroblast proliferation and photoreceptor survival: additive protection with docosahexaenoic acid. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001; 42:3008-15.

Portera-Cailliau C, Sung CH, Nathans J, Adler R. Apoptotic photoreceptor cell death in mouse models of retinitis pigmentosa. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91:974,978

Pourcho RG, Qin P, Goebel DJ. Cellular and subcellular distribution of NMDA receptor subunit NR2B in the retina. *J Comp Neurol* 2001;433:75-85

Pow DV, Barnett NL. Changing patterns of spatial buffering of glutamate in developing rat retinae are mediated by the Muller cell glutamate transporter GLAST. *Cell Tissue Res*. 1999;297:57-66.

Pow DV, Barnett NL. Developmental expression of excitatory amino acid transporter 5: a photoreceptor and bipolar cell glutamate transporter in rat retina. *Neurosci Lett*. 2000;280:21-4.

R.

Rauen T, Kanner BI. Localization of the glutamate transporter GLT-1 in rat and macaque monkey retinae. *Neurosci Lett.* 1994;169:137-40.

Rauen T, Rothstein JD, Wassle H. Differential expression of three glutamate transporter subtypes in the rat retina. *Cell Tissue Res.* 1996;286:325-36.

Rauen T, Taylor WR, Kuhlbrodt K, Wiessner M. High-affinity glutamate transporters in the rat retina: a major role of the glial glutamate transporter GLAST-1 in transmitter clearance. *Cell Tissue Res* 1998; 291:19-31.

Rabinowitz JE, Rolling F, Li C, Conrath H, Xiao W, Xiao X, Samulski RJ. Cross-packaging of a single adeno-associated virus (AAV) type 2 vector genome into multiple AAV serotypes enables transduction with broad specificity. *J Virol.* 2002;76:791-801

Raper SE, Chirmule N, Lee FS, Wivel NA, Bagg A, Gao GP, Wilson JM, Batshaw ML. Fatal systemic inflammatory response syndrome in a ornithine transcarbamylase deficient patient following adenoviral gene transfer. *Mol Genet Metab.* 2003;80:148–158.

Rim J, Oprian DD. Constitutive activation of opsin: interaction of mutants with rhodopsin kinase and arrestin. *Biochemistry.* 1995;34(37):11938-45

Rosenfeld PJ, Cowley GS, McGee TL, Sandberg MA, Berson EL, Dryja TP. A null mutation in the rhodopsin gene causes rod photoreceptor dysfunction and autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Nat. Genet.* 1992; 1:209-213.

Rossi DJ, Oshima T, Attwell D. Glutamate release in severe brain ischaemia is mainly by reversed uptake. *Nature*. 2000;403:316-21.

Rothman S. Synaptic release of excitatory amino acid neurotransmitter mediates anoxic neuronal death. *J Neurosci*. 1984;4:1884-91.

Rothstein JD, Martin LJ, Kuncl RW. Decreased glutamate transport by the brain and spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis. *N Engl J Med*. 1992;326:1464-8.

S.

Saarma M. GDNF - a stranger in the TGF-beta superfamily? *Eur J Biochem*. 2000;267:6968-71.

Sahel JA, Mohand-Said S, Leveillard T, Hicks D, Picaud S et Dreyfus H. Rod-cone interdependence: implications for therapy of photoreceptor cell diseases. *Prog Brain Res* 2001;131:649-61

Sahly I, Bar Nachum S, Suss-Toby E, Rom A, Peretz A, Kleiman J, Byk T, Selinger Z, Minke B. Calcium channel blockers inhibit retinal degeneration in the retinal-degeneration-B mutant of *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1992;89:435-9

Sanyal S. Changes of lysosomal enzymes during hereditary degeneration and histogenesis of retina in mice. II. Localization of N-acetyl-glucosaminidase in macrophages. *Histochemie* 1972; 29:28-36

Sariola H, Saarma M. Novel functions and signalling pathways for GDNF. *J Cell Sci*.

2003;116:3855-62.

Sato M, Nakazawa M, Usui T, Tanimoto N, Abe H, Ohguro H. Mutations in the gene coding for guanylate cyclase-activating protein 2 (GUCA1B gene) in patients with autosomal dominant retinal dystrophies. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2005;243:235-42.

Sattayasai J, Ehrlich D. Morphology of quisqualate-induced neurotoxicity in the chicken retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1987;28:106-17.

Sattayasai J, Zappia J, Ehrlich D. Differential effects of excitatory amino acids on photoreceptors of the chick retina: an electron-microscopical study using the zinc-iodide-osmium technique. *Vis Neurosci* 1989;2:237-45

Savill J, Fadok V, Henson P, Haslett C. Phagocyte recognition of cells undergoing apoptosis. *Immunol Today* 1993;14:131-6

Schmidt SY, Berson EL. Taurine uptake in isolated retinas of normal rats and rats with hereditary retinal degeneration. *Exp Eye Res* 1978; 27:191-8.

Schultz K, Stell WK. Immunocytochemical localization of the high-affinity glutamate transporter, EAAC1, in the retina of representative vertebrate species. *Neurosci Lett*. 1996;211:191-4.

Scott BL, Racz E, Lolley RN, Bazan NG. Developing rod photoreceptors from normal and mutant Rd mouse retinas: altered fatty acid composition early in development of the mutant. *J Neurosci Res*. 1988;20:202-11.

Sheardown MJ, Nielsen EO, Hansen AJ, Jacobsen P, Honore T. 2,3-Dihydroxy-6-nitro-7-sulfamoyl-benzo(F)quinoxaline: a neuroprotectant for cerebral ischemia. *Science*. 1990 Feb 2;247(4942):571-4.

Sheedlo HJ, Li LX et Turner JE. Functional and structural characteristics of photoreceptor cells rescued in RPE-cell grafted retinas of RCS dystrophic rats. *Exp Eye Res* 1989;48: 841-54

Shiose Y, Sonohara O. Studies on retinitis pigmentosa. XXVI. Electron microscopic aspects of early retinal changes in inherited dystrophic mice. *Nippon Ganka Gakkai Zasshi* 1968; 72:1127-41.

Sidman RL, Green MC. Retinal degeneration in the mouse: location of the rd locus in linkage group XVII. *J Hered*. 1965 Jan-Feb;56:23-9.

Silverman MS, Hughes SE. Transplantation of photoreceptors to light-damaged retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1989;30:1684-90

Sonohara O, Shiose Y. Electron microscopic study of the visual cell of inherited retinal dystrophic mice. *Nippon Ganka Kyo*. 1968;19:77-86.

Sorsby A, Koller PC, Attfield M, Davey JB, Lucas DR. Retinal dystrophy in the mice: histological and genetic aspects. *J Exp Zool* 1954; 125:171-197.

Stern J.H., Kaupp U.B., Macleish P.R. Control of the light-regulated current in rod photoreceptor by cyclic GMP, calcium and I-cis-diltiazem. *Proc. Natl. Acad. Sci* 1986;83:1163-7

Streichert LC, Birnbach CD, Reh TA. A diffusible factor from normal retinal cells promotes rod photoreceptor survival in an in vitro model of retinitis pigmentosa. *J Neurobiol.* 1999;39:475-90.

Sugaya K, de Groat WC. Effects of MK-801 and CNQX, glutamate receptor antagonists, on bladder activity in neonatal rats. *Brain Res.* 1994;640:1-10.

Sun XD, Zhang X, Xu X, Yu Z, Chen RJ. Neuroprotection of nerve growth factor in experiment retinal detachment *Zhonghua Yan Ke Za Zhi.* 2003 May;39(5):303-7.

Susin, S. A., Lorenzo, H. K., Zamzami, N., Marzo, I., Snow, B. E., Brothers, G. M., Mangion, J., Jacotot, E., Costantini, P., Loeffler, M., Larochette, N., Goodlett, D. R., Aebersold, R., Siderovski, D. P., Penninger, J. M., and Kroemer, G. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor [see comments]. *Nature* 1999; 397: 441-6.

T.

Takahashi M, Billups B, Rossi D, Sarantis M, Hamann M, Attwell D. The role of glutamate transporters in glutamate homeostasis in the brain. *J Exp Biol.* 1997;200:401-9.

Tansley K. Hereditary degeneration of the mouse retina. *Br J Ophthalmol.* 1951;35:573-82.

Taylor S, Srinivasan B, Wordinger RJ, Roque RS. Glutamate stimulates neurotrophin expression in cultured Muller cells. *Brain Res Mol Brain Res* 2003; 111:189-97.

Tezel TH, Kaplan HJ. Harvest and storage of adult human photoreceptor cells: the vibratome

compared to the excimer laser. *Curr Eye Res.* 1998;17:748-56

Thompson DA, Li Y, McHenry CL, Carlson TJ, Ding X, Sieving PA, Apfelstedt-Sylla E, Gal A. Mutations in the gene encoding lecithin retinol acyltransferase are associated with early-onset severe retinal dystrophy. *Nat. Genet.* 2001; 128:123-124.

Thumann G, Bartz-Schmidt KU, El Bakri H, Schraermeyer U, Spee C, Cui JZ, Hinton DR, Ryan SJ, Heimann K. Transplantation of autologous iris pigment epithelium to the subretinal space in rabbits. *Transplantation.* 1999;68:195-201

Tomac A, Lindqvist E, Lin LF, Ogren SO, Young D, Hoffer BJ, Olson L. Protection and repair of the nigrostriatal dopaminergic system by GDNF in vivo. *Nature.* 1995;373:335-9.

Travis GH. Mechanisms of cell death in the inherited retinal degenerations. *Am. J. Hum. Genet.* 1998; 62:503-508

Travis GH, Brennan MB, Danielson PE, Kozak CA, Sutcliffe JG. Identification of a photoreceptor-specific mRNA encoded by the gene responsible for retinal degeneration slow (rds). *Nature.* 1989;338(6210):70-3

Treanor JJ, Goodman L, de Sauvage F, Stone DM, Poulsen KT, Beck CD, Gray C, Armanini MP, Pollock RA, Hefti F, Phillips HS, Goddard A, Moore MW, Buj-Bello A, Davies AM, Asai N, Takahashi M, Vandlen R, Henderson CE, Rosenthal A. Characterization of a multicomponent receptor for GDNF. *Nature* 1996; 382:80-3.

Tropepe V, Coles BL, Chiasson BJ, Horsford DJ, Elia AJ, McInnes RR, van der Kooy D. Retinal stem cells in the adult mammalian eye. *Science.* 2000;287:2032-6

Trupp M, Arenas E, Fainzilber M, Nilsson AS, Sieber BA, Grigoriou M, Kilkenny C, Salazar-Gruoso E, Pachnis V, Arumae U. Functional receptor for GDNF encoded by the c-ret proto-oncogene. *Nature* 1996; 381:785-8.

Tso MOM, Zhang C, Abler AS, Chang CJ, Wong F, Chang GQ, Lam TT. Apoptosis leads to photoreceptor degeneration in inherited retinal dystrophy of RCS rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1994; 35:2693-2699

U.

Ulshafer RJ, Sherry DM, Dawson R Jr, Wallace DR. Excitatory amino acid involvement in retinal degeneration. *Brain Res* 1990; 531:350-4.

Uteza Y, Rouillot JS, Kobetz A, Marchant D, Pecqueur S, Arnaud E, Prats H, Honiger J, Dufier JL, Abitbol M, Neuner-Jehle M. Intravitreal transplantation of encapsulated fibroblasts secreting the human fibroblast growth factor 2 delays photoreceptor cell degeneration in Royal College of Surgeons rats. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96:3126-31

V.

Vandenberg RJ. Molecular pharmacology and physiology of glutamate transporters in the central nervous system. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 1998;25:393-400.

Vander Heiden MG, Thompson CB. Bcl-2 proteins: regulators of apoptosis or of mitochondrial homeostasis? *Nat Cell Biol*. 1999;1:E209-16.

Van Haesendonck E, Missotten L. Glutamate-like immunoreactivity in the retina of a marine teleost, the dragonet. *Neurosci. Lett*. 1990;111: 281-286.

Vardi N, Morigiwa K. ON cone bipolar cells in rat express the metabotropic receptor mGluR6. *Vis Neurosci.* 1997;14:789-94.

Viczian A, Sanyal S, Toffenetti J, Chader GJ, Farber DB. Photoreceptor-specific mRNAs in mice carrying different allelic combinations at the rd and rds loci. *Exp Eye Res.* 1992 Jun;54(6):853-60.

Vithana EN, Abu-Safieh L, Allen MJ, Carey A, Papaioannou M, Chakarova C, Al-Magthteh M, Ebenezer ND, Willis C, Moore AT, Bird AC, Hunt DM, Bhattacharya SS. A human homolog of yeast pre-mRNA splicing gene, PRP31, underlies autosomal dominant retinitis pigmentosa on chromosome 19q13.4 (RP11). *Mol. Cell* 2001; 8:375-381. [\[](#)

Vollrath D, Feng W, Duncan JL, Yasumura D, D'Cruz PM, Chappelow A, Matthes MT, Kay MA, LaVail MM. Correction of the retinal dystrophy phenotype of the RCS rat by viral gene transfer of Mertk. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98:12584-9.

W.

Wada Y, Abe T, Takeshita T, Sato H, Yanashima K, Tamai M. Mutation of human retinal fascin gene (FSCN2) causes autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2001 ; 42:2395-2400.

Wahlin KJ, Adler R, Zack DJ, Campochiaro PA. Neurotrophic signaling in normal and degenerating rodent retinas. *Exp Eye Res.* 2001;73:693-701

Wahlin KJ, Campochiaro PA, Zack DJ, Adler R. Neurotrophic factors cause activation of intracellular signaling pathways in Muller cells and other cells of the inner retina, but not photoreceptors. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000; 41:927-36.

Wang E. Regulation of apoptosis resistance and ontogeny of age-dependent diseases. *Exp Gerontol.* 1997;32:471-84.

Ward R. Quantitative effects of retinal degeneration in mice *Rev Can Biol Exp.* 1982;41:115-9.

Weber M, Simler S, Sahel J, Flament J. Acides aminés excitateurs et décollement de rétine. *Ophthalmologie* 1995;9:158-161

Whiteley SJ, Litchfield TM, Coffey PJ, Lund RD. Improvement of the pupillary light reflex of Royal College of Surgeons rats following RPE cell grafts. *Exp Neurol.* 1996;140:100-4

Woodford BJ, Liu Y, Fletcher RT, Chader GJ, Farber DB, Santos-Anderson R, Tso MO. Cyclic nucleotide metabolism in inherited retinopathy in collies: a biochemical and histochemical study. *Exp Eye Res.* 1982;34:703-14

Wu WC, Lai CC, Chen SL, Xiao X, Chen TL, Tsai RJ, Kuo SW, Tsao YP. Gene therapy for detached retina by adeno-associated virus vector expressing glial cell line-derived neurotrophic factor. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002; 43:3480-8.

Wyllie AH. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* 1980 ; 284 : 555-6

Y.

Yamazaki H, Ohguro H, Maeda T, Maruyama I, Takano Y, Metoki T, Nakazawa M, Sawada

H, Dezawa M. Preservation of retinal morphology and functions in royal college surgeons rat by nilvadipine, a Ca(2+) antagonist. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2002;43:919-26

Yang CY, Yazulla S. Glutamate-, GABA-, and GAD-immunoreactivities co-localize in bipolar cells of tiger salamander retina. *Vis. Neurosci.* 1994;11:1193-1203.

Yang XL. Characterization of receptors for glutamate and GABA in retinal neurons. *Prog Neurobiol.* 2004;73:127-50.

Yazulla S, Kleinschmidt J. The effects of intraocular injection of kainic acid on the synaptic organization of the goldfish retina. *Brain Res.* 1980;182:287-301.

Young MJ, Ray J, Whiteley SJO, Klassen H, Gage FH. Neuronal differentiation and morphological integration of hippocampal progenitor cells transplanted to the retina of immature and mature dystrophic rats. *Mol Cell Neurosci* 2000;16:197-205

Z.

Zack DJ. Neurotrophic rescue of photoreceptors: are Muller cells the mediators of survival? *Neuron* 2000; 26:285-6.

Zamzami N, Susin SA, Marchetti P, Hirsch T, Gomez-Monterrey I, Castedo M, Kroemer G. Mitochondrial control of nuclear apoptosis. *J Exp Med.* 1996;183:1533-44.

Zhao M, Momma S, Delfani K, Carlen M, Cassidy RM, Johansson CB, Brismar H, Shupliakiov O, Frisen J, Janson AM. Evidence for neurogenesis in the adult mammalian substantia nigra. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:7925-30

Zhao K, Wang L, Wang L, Wang L, Zhang Q, Wang Q. Novel deletion of the RPGR gene in a Chinese family with X-linked retinitis pigmentosa. *Ophthalmic Genet.* 2001;22:187-94.

Annexes

Annexe 1

M.N. Delyfer & J.A. Sahel

“ AFFECTIONS NEURODEGENERATIVES HEREDITAIRES : physiopathogénie et pistes thérapeutiques ”

In : Neuro-ophtalmologie – Rapport de la Société Française d’Ophtalmologie (2004),
Ed. Masson, Paris, 305-14

[signalement bibliographique ajouté par : ULP – SCD – Service des thèses électroniques]

M.N. Delyfer & J.A. Sahel

Affections neurodégénératives héréditaires : physiopathogénie et pistes thérapeutiques .

In : Neuro-ophtalmologie – Rapport de la Société Française d’Ophtalmologie (2004)

Ed. Masson, Paris, 305-14

Pages 305-14 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Il est possible de la consulter dans la thèse sous sa forme papier ou d'en faire une demande via le service de prêt entre bibliothèques (PEB), auprès du Service Commun de Documentation de l'ULP: peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr.

Annexe 2

MN Delyfer, T. L veillard, S. Mohand-Saïd, D. Hicks, S. Picaud & J.A. Sahel

“ INHERITED RETINAL DEGENERATIONS : THERAPEUTIC PROSPECTS ”

Biol. Cell. 2004 May ; 96(4) : 261-9

[signalement bibliographique ajouté par : ULP – SCD – Service des thèses électroniques]

MN Delyfer, T. Léveillard, S. Mohand-Saïd, D. Hicks, S. Picaud & J.A. Sahel

Inherited retinal degenerations : therapeutic prospects .

Biol. Cell. 96, 261-9 (2004)

Pages 261-9 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Il est possible de la consulter dans la thèse sous sa forme papier ou d'en faire une demande via le service de prêt entre bibliothèques (PEB), auprès du Service Commun de Documentation de l'ULP: peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr.

Annexe 3

MN Delyfer, V. Forster, N. Neveux, S. Picaud, T. Lèveillard & JA Sahel

“ EVIDENCE FOR GLUTAMATE-MEDIATED EXCITOTOXIC MECHANISMS DURING
PHOTORECEPTOR DEGENERATION IN THE rd1 MOUSE RETINA ”

Soumis à Molecular Vision

En cours de révision

Evidence for glutamate-mediated excitotoxic mechanisms during photoreceptor degeneration in the *rd1* mouse retina

Marie-Noëlle Delyfer^{1,2}, Valérie Forster¹, Nathalie Neveux³, Serge Picaud¹, Thierry Léveillard¹ and José-Alain Sahel^{1,4,5}

¹Laboratoire de Physiopathologie Cellulaire et Moléculaire de la Rétine, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Inserm U592) – Université Pierre et Marie Curie, Paris, France

²Vitreo-Retinal Unit, Department of Ophthalmology, Bordeaux University Hospital, Bordeaux, France

³Laboratoire de Biochimie A, Hôpital Hôtel-Dieu, AP-HP, Paris, France

⁴Centre Hospitalier National d’Ophtalmologie des Quinze-Vingts, 28 rue de Charenton, 75012 Paris, France

⁵Institute of Ophthalmology – University College of London, 11–43 Bath Street, London EC1V 9EV, United Kingdom

Corresponding author: José-Alain Sahel, Laboratoire de Physiopathologie Cellulaire et Moléculaire de la Rétine, INSERM U592 – Université Pierre et Marie Curie – Hôpital Saint-Antoine, 184 rue du Faubourg Saint-Antoine, 75571 Paris Cedex 12, France. Tel. +33 149 284 603. Fax. +33 149 286 663.

E-mail address: j-sahel@quinze-vingts.fr

Authors’ email addresses: Marie-Noëlle Delyfer: marie-noelle.delyfer@libertysurf.fr

Thierry Léveillard: leveilla@st-antoine.inserm.fr

José-Alain Sahel: j-sahel@quinze-vingts.fr

ABSTRACT: (2052 characters)

Purpose: Kinetic study of photoreceptor cell death in the retinal degeneration (*rdl*) mouse model suggests that photoreceptor degeneration could result from cumulative damages (Clarke et al., Nature 2000; 406:195-9). Since alterations in glutamate metabolism have been described in different models of retinitis pigmentosa (Ulshafer et al., Brain Res 1990, 531:350-4; Fletcher and Kalloniatis, J Comp Neurol 1996, 376:343-60), we investigated in the present work whether changes in glutamate turnover occur in the degenerating *rdl* retina and whether glutamate-mediated excitotoxic mechanisms may contribute to rod photoreceptor death in this model.

Methods: Free amino acid levels were quantified in *rdl* and wild-type retinas using an amino acid analyzer (JEOL AminoTac) selecting times corresponding to early, intermediate and terminal phases of rod photoreceptor degeneration. Reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to compare the mRNA expression levels of the glial L-glutamate/L-aspartate transporter GLAST, glutamine synthetase (GS) and vimentin – a marker for retinal glia – between *rdl* and wild-type mouse retinas. 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX), an antagonist of both AMPA and kainate subtypes of ionotropic glutamate receptors, was then daily administered from postnatal day 3 (PN3) to PN21 to *rdl* mice while control *rdl* mice received only physiological saline solution (n = 7 per treatment). At PN22, the respective numbers of surviving rods in CNQX- and saline-treated mice were estimated using an unbiased stereological approach.

Results: Gradual increases in free glutamate and glutamine levels were observed during photoreceptor degeneration in *rdl* retinas and were associated with increases in GLAST and GS expression levels. Administration of CNQX induced a statistically significant morphological rescue of rods (>25%, p<0.05).

Conclusions: Our data demonstrate that, in the *rdl* mouse retina, photoreceptor degeneration is associated with excessive free glutamate levels and with an up-regulation of glutamate turnover (i.e. increases in GLAST, in GS and in free glutamine levels). This may indicate that excessive glutamate levels further contribute to rod cell degeneration, thus implying the occurrence of non-cell autonomous mechanisms in the degenerative process in the *rdl* retina.

INTRODUCTION

Retinitis pigmentosa (RP) is a heterogeneous group of inherited retinal degenerative diseases, characterized by the progressive death of rod and cone photoreceptors leading to an irreversible loss of visual function. The retinal degeneration (*rdl*) mouse is an appropriate model for studying the cellular and molecular events leading to photoreceptor death and for evaluating new treatments as the pattern of photoreceptor loss is similar to that in affected humans and because the mutated gene encodes rod cGMP-phosphodiesterase (Pde6b) [1] as in some affected human families [2]. However, to this day, mechanisms leading to photoreceptor apoptosis still remain unsolved. It has recently been proposed that, in the *rdl* mouse retina, photoreceptor degeneration could result from cumulative damages [3]. It is now well-known that the *rdl* mutation results in cGMP accumulation in rods [4]. We can reasonably postulate that such a cGMP accumulation may also induce a continuous depolarization of rod cells by maintaining their cGMP-gated cationic channels open. The subsequent activation of the voltage-sensitive calcium channels could then trigger a prolonged glutamate transmitter release. Changes in amino acid metabolism, and particularly glutamate turn-over, have been observed in several different models of inherited retinal degeneration [5-10]. Ulshafer et al. were the first to demonstrate an increase in excitatory amino acid levels (glutamate and aspartate) around degenerating photoreceptors in the *rd/rd* chick [5]. In the RCS rat, Fletcher and Kalloniatis observed an increase in aspartate and glutamine levels (both of which are either precursors or metabolites of glutamate), along with alterations in glutamate and GABA manufacturing pathways supposedly linked to abnormal MGC function [6-8]. In the *rd/rd* mouse, an accumulation of glutamate has also been observed in photoreceptor inner segments [9,10].

Glutamate toxicity has been demonstrated both on inner retinal cells and on photoreceptor terminals [11-18]. In the retina, glutamate homeostasis is maintained by the glial L-glutamate/L-aspartate transporter (GLAST) and by glutamine synthetase (GS), both being expressed in Muller glial cells [19-24]. Fine tuning of glutamate uptake and degradation in glial cells is essential to avoid neurotoxicity and to allow normal signal transmission between photoreceptor and bipolar cells [19-21].

In the present work, we investigated whether alterations in glutamate metabolism and glutamate-mediated excitotoxic phenomena occur in the degenerating *rdl* retina. The demonstration of such excitotoxic mechanisms could fit with the cumulative damage hypothesis formulated by Clarke and co-workers [3].

We studied glutamate metabolism in *rdl* and wild-type retinas during the degeneration process by measuring free amino acid levels using an amino acid analyzer. We next analyzed the endogenous response to the observed glutamate increase in *rdl* retina by studying expression levels of GLAST and GS during retinal degeneration. Finally, we investigated whether the observed glutamate increase in the *rdl* retina could contribute to photoreceptor cell death by evaluating the influence of a glutamate receptor antagonist on rod survival.

MATERIALS AND METHODS

Animals

C3H/He mice (*rd1* mice) and C57BL/6 mice (wild-types or controls) were obtained from Iffa Credo (L'Arbresle, France). Animals were cared for and handled according to the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research. They were maintained in clear plastic cages and subjected to light/dark cycles of 12 hours. Day of birth was designated postnatal day 0 (PN0).

Quantification of free amino acids

Retinas were rapidly dissected on ice and deproteinized with 10% (v/v) trichloroacetic acid containing 0.5 mM EDTA. After sonication and centrifugation, supernatants were collected and stored at – 80 °C until amino acid analysis. Amino acids were separated and quantified by ion-exchange chromatography using an amino acid analyzer (AminoTac JLC-500/V; JEOL, Tokyo, Japan). The concentrations of each amino acid are expressed, as a percentage, with respect to the sum of all the concentrations of the amino acids quantified by the analyzer (i.e. taurine, threonine, serine, asparagine, glutamate, glutamine, glycine, alanine, citrulline, valine, isoleucine, leucine, tyrosine, phenylalanine, ornithine, lysine and arginine).

Reverse transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) analysis

10 retinas were pooled for each age (PN1, PN8, PN15, PN35) and each strain (*rd1* and control). Total RNAs were purified from retinas by the cesium chloride centrifugation method [25]. cDNAs were synthesized by reverse transcription using random hexamers (pdN₆) according to standard protocols. The sequence of each primer, the annealing temperatures, the length of the amplified products and the GenBank accession numbers are given in Table 1.

Real-time PCRs were performed on a LightCycler instrument (Roche-Diagnostics, Indianapolis, IN) and with SYBR Green I, according to the manufacturer's recommendations. Cycling conditions were as follows: initial denaturation at 95 °C for 2 min, followed by 40 cycles of denaturation at 95 °C for 0 sec, annealing for 5 sec (see Table 1 for annealing

temperatures used) and elongation at 72 °C for 15 sec. Melting curve analysis was performed as follows: denaturation at 95 °C for 2 min, annealing at 65 °C for 2 min, followed by a gradual increase (0.1 °C/sec) in temperature to 95 °C. Real-time PCR efficiencies were evaluated by calculating the slope of a linear regression graph following recommended protocols. For each experiment, crossing points were calculated by the LightCycler Data Analysis Program (LightCycler-3.5 Software). Target gene expressions were normalized with respect to beta-actin expression. Mean crossing point deviations were calculated between samples and controls as specified in the figures.

The amplification steps were performed in triplicate for each point and were repeated using three independent cDNA preparations. The levels of expression of rhodopsin, rod arrestin and of other markers of retinal degeneration were tested and found to be in accordance with the age and genotype analyzed, thus validating our RNA preparations.

Protein extraction and Western blotting

rd1 and control mice were killed at PN1, PN8, PN15, PN21 and PN35 (n = 3 animals per age and strain). Eyes were immediately enucleated, and retinas dissected within 2 minutes in sterile PBS. Retinas were then homogenized in a lysis buffer containing 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM PMSF, 1 mM EDTA, 1 mM dithiothreitol, 1% Triton X-100, 1x mixture of protease inhibitors, 45 µg/ml TLCK, 1 mM sodium fluoride and 1 mM sodium orthovanadate. Protein concentrations were estimated by Bradford's technique. Proteins were shock-frozen and maintained at – 80 °C until analysis. Proteins were further diluted 1:1 in sample buffer (final concentrations: 10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA, 20 mM dithiothreitol, 3% SDS, 10% glycerol, 0.1% bromophenol blue, 4 M urea) and heated at 50 °C for 45 minutes. Proteins (10 µg/lane) were separated by 10% SDS-PAGE gel electrophoresis containing 4 M urea, and transferred onto nitrocellulose membranes. Membranes were blocked with PBS, 0.1% Tween 20, 3% nonfat dry milk and 5% horse serum overnight at 4 °C and then incubated with anti-GLAST antibody (1:15000) for two hours at room temperature. Membranes were then washed and incubated with the appropriate horseradish peroxidase-labeled secondary antibody (1:15000; Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA) for one hour at room temperature. Antibody binding was visualized by Enhanced Chemiluminescence detection system (ECL+, Amersham, Arlington Heights, IL) as recommended by the manufacturer. To ensure that equal quantities were loaded in each lane,

membranes were stripped and subsequently reprobbed with monoclonal anti-alpha-tubulin antibody (1:500; T5168, Sigma, Saint Louis, MO). Band intensities were quantified by scanning densitometry using Phoretix 1D software.

Intraperitoneal injection of 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX)

CNQX was dissolved in a 0.9% NaCl solution and injected intraperitoneally at a final concentration of 15 mM. From PN3 to PN21, *rdl* mice received intraperitoneal injections of CNQX (30 mg/kg/day), whereas control *rdl* mice were injected with an equivalent volume of physiological saline solution (vehicle).

Electroretinogram Recordings

Electroretinograms (ERGs) were recorded as described previously [26-28]. 22 day-old CNQX- and saline-injected *rdl* mice were dark-adapted for at least 16 hours and anesthetized by intramuscular injection of ketamine (100 mg/kg body weight) and xylazine 2% (10 mg/kg body weight). Pupils were dilated with 0.5% tropicamide and the cornea was locally anesthetized with 0.5% oxybuprocaine application. Body temperature was maintained near 37 °C with a heating pad. Upper and lower lids were retracted to proptose and maintain the eye open. Scotopic rod ERGs were recorded in both eyes simultaneously by using a gold loop electrode placed on the corneal surface maintained with 3% methylcellulose gel (one electrode for each eye) and referenced to a stainless steel reference electrode inserted subcutaneously on the head of the animal. A needle electrode inserted in the tail served as ground. A 150 watt xenon lamp in a Ganzfeld stimulator (Multiliner Vision, Jaeger Toennies, Germany) provided the light stimulus (10 cds/m²). Ten recordings were averaged with an interstimulus interval of 120 seconds.

Rod immunolabeling and cell counting

CNQX-injected mice and saline-injected mice were sacrificed at PN22. Retinas were removed

and fixed in paraformaldehyde (4% in PBS) for two hours. They were rinsed in PBS, permeabilized in PBS containing 0.1% Triton X-100 for 15 minutes, saturated in PBS containing 0.1% bovine serum albumin and 0.1% Tween 20 for 20 minutes and then incubated overnight at 4 °C with a rod photoreceptor-specific monoclonal antibody rho-4D2 (gift from D. Hicks, 10µg/ml). After extensive rinsing, the primary antibody was localized using goat anti-mouse IgG antibody coupled with Alexa Fluor 594 (1:1000; Molecular Probes, Leiden, Netherlands). Retinas were flat-mounted in a 50% PBS-glycerol (1:1) solution with photoreceptors facing up and examined with a Nikon Optophot 2 Epifluorescence microscope. Immunolabeled rods were then quantified using a stereological approach permitting unbiased sampling as previously described [29].

Statistical analysis

All data are presented as the mean \pm the standard error of the mean (SEM). Unpaired Student's t-test was used to compare amino acid levels in *rdl* mice with controls and to compare rod cell numbers in CNQX-treated *rdl* mice with saline-treated ones. Values of $p < 0.05$ were considered to be significant.

RESULTS

Alterations in amino acid metabolism during photoreceptor degeneration in the *rdl* retina

As alterations in amino acid levels have already been described in some other models of RP [5-10,30,31], we measured free amino acid levels in *rdl* and control retinas selecting times corresponding to early, intermediate and terminal stages of degeneration. The existing literature indicates that i) PN8 most likely represents the first time point when the degenerative process becomes detectable in the *rdl* mouse retina [4,32-36], ii) PN35 can be considered as the terminal stage of rod degeneration [37] and iii) PN15 and PN21 represent

intermediate stages between the two. Figure 1 shows that, before the onset of degeneration (from PN4 to PN8), glutamine and glycine levels were lower in *rdl* retinas than in controls, whereas taurine levels were moderately higher in *rdl* retinas than in controls (PN4) and glutamate levels were similar in both strains (PN4). At the onset of degeneration (PN8), glutamate levels were slightly higher in *rdl* retinas, were comparable at PN15 and then steadily increased from PN21 to PN35 with a 1.39- and 1.46-fold difference respectively (Figure 1A). Glutamine levels were significantly higher in *rdl* retinas than in controls at PN15, PN21 and PN35 with a 1.1-, 1.8- and 2.26-fold difference respectively (Figure 1B). Taurine levels in control retinas increased progressively from PN8 to PN35, whereas in *rdl* retinas they remained stable from PN8 to PN15 and then slightly decreased (Figure 1C). Glycine levels increased steadily from PN8 to PN35 in *rdl* retinas, whereas they decreased in controls (Figure 1D). These results indicate that photoreceptor degeneration is associated with increases in free glutamate, glutamine and glycine and with a decrease in free taurine.

Photoreceptor degeneration induces GLAST up-regulation

As glutamate excess has been shown to enhance the expression of GLAST [38-40], a key element in glutamate clearance, we investigated whether the observed increase in free glutamate during rod degeneration in the *rdl* mouse retina (Figure 1A) was associated with a modification in GLAST expression. We measured GLAST mRNA levels in *rdl* and control retinas from PN1 to PN35 by using real-time RT-PCR, selecting times corresponding to early, intermediate and terminal phases of degeneration. Figure 2A shows that at PN1, before the onset of photoreceptor degeneration, no difference in GLAST mRNA expression was observed between *rdl* and control mice. At PN8, GLAST mRNA was 1.24 times higher in *rdl* retinas than in controls. At PN15, GLAST mRNA was 2.15 times more abundant in *rdl* retinas than in controls. It remained at a similar level (2.25-fold difference) at PN35. In contrast, at PN35, photoreceptor degeneration led to a 2.7-fold drop in the glutamate transporter GLT-1 mRNA expression (Figure 2B). This is consistent with GLT-1 being expressed by retinal neuronal cells and more particularly by cones [41]. Western blot analyses (Figure 2C) confirmed that the amount of GLAST protein increased throughout rod degeneration. Though the amount of GLAST protein was the same in the two strains at PN1, at PN8 GLAST was more abundant in the *rdl* mouse and the difference between the two strains increased with time up to PN35. These results demonstrate that GLAST expression

increases right from the beginning (PN8) and gradually during the whole rod degeneration process.

Photoreceptor degeneration induces glutamine synthetase up-regulation

Given that free glutamate and glutamine levels are increased in *rdl* retinas (Figures 1A and 1B) and that glutamine synthetase (GS) catalyzes the amidation of glutamate to glutamine, we studied GS mRNA levels in *rdl* and control retinas using real-time RT-PCR. GS mRNA levels were 1.3-fold and 1.52-fold higher in *rdl* mouse retinas than in controls at PN8 and PN15 respectively (Figure 3A). We also measured mRNA levels of vimentin, a marker for retinal glia, in order to check whether the observed increase of GS (and previously of GLAST) did not reflect an increased number of glial cells. No significant differences were observed in vimentin mRNA levels between the two types of retinas at PN8 and PN15 (Figure 3B).

AMPA/kainate-type glutamate receptor antagonist partially rescues presynaptic rod photoreceptor cells

To determine whether the observed free glutamate increase during retinal degeneration (Figure 1A) participates to rod cell death in the *rdl* retina, we studied the effect of a glutamate receptor antagonist (CNQX) on rod cell survival. CNQX or physiological saline solution was daily injected intraperitoneally to *rdl* mice from PN3 to PN21. At PN22, after a 16-hour dark-adaptation period, scotopic rod ERGs were recorded from saline-treated and CNQX-treated animals just before sacrifice. Retinas were then dissected and immunolabeled with an antibody that specifically recognized rod photoreceptors. ERG recordings from saline-treated mice were all flat. Although some recordings were detectable from CNQX-treated mice, data from the whole number of animals studied were not statistically significant (data not shown). However, as shown in Figure 4A, a greater number of rods survived in CNQX-treated *rdl* mice in comparison with saline-treated mice. Quantification of surviving rods on whole retinas using a stereological technique demonstrated that there were over 25% more rods in

CNQX-treated retinas (2.95 rods per field ± 0.50 SEM, $n = 7$) than in controls (2.35 rods per field ± 0.32 SEM, $n = 7$) ($p < 0.05$, Figure 4B). Hence, these results indicate that blocking AMPA/kainate ionotropic glutamate receptors can promote morphological survival of rod photoreceptors in the *rdl* mouse.

DISCUSSION

Our results can be summarized as follows: (1) in the *rdl* retina, gradual increases in free glutamate and glutamine levels are observed during photoreceptor degeneration and (2) are associated with increases in GLAST and GS expression levels. (3) Furthermore, administration of a glutamate receptor antagonist induces a statistically significant morphological rescue of rods.

Alterations in glutamate metabolism during photoreceptor degeneration

Alterations in amino acid metabolism have been observed in several different models of inherited retinal degeneration [5-10,30,31,42]. Decreases in taurine content and increases in glycine content have previously been reported in the *rdl* mouse and in the RCS rat retinas [30,31,42]. Taurine decrease (Figure 1C) can be explained by the loss of photoreceptor cells that have been shown by immunohistochemistry to exhibit high levels of this amino acid [7,30,42]. As for glycine (Figure 1D), its increase has been correlated in the RCS rat to a high increase of glycine immunoreactivity in bipolar cells [7]. Because bipolar cells obtain their glycine from amacrine cells through gap junctions, the glycine increase in bipolar cells has been proposed to be due to a change in gap junction permeability [7]. Concerning glutamate

levels, an increase in excitatory amino acid levels around degenerating photoreceptors was observed in the *rd/rd* chick [5], in the RCS rat [6-8] and in the *rds/rds* mouse [9,10]. In the *rd1* mouse, a previous work conducted by Orr and colleagues (1976) studied glutamate levels during photoreceptor degeneration (along with glycine, taurine and GABA levels) but did not observe any differences in glutamate concentrations between dystrophic and wild-type retinas [42]. Our results indicate an increase in free glutamate in *rd1* retinas with respect to controls (Figure 1A). Since our findings concerning taurine and glycine levels are similar to those reported by Orr et al. in their study [42], the differences in glutamate measurements cannot be explained by the normalization techniques used (their results were expressed on a dry weight basis, whereas in the present study ours were expressed as a proportion of the sum of all the amino acids quantified by the amino acid analyzer, see Materials and Methods). The differences in the results are more likely due to the lower resolution of the quantification technique formerly used for glutamate analysis (this technique being different from the ones used for taurine and glycine measurements).

Considering that glutamate toxicity has been demonstrated both on inner retinal cells and on photoreceptor terminals [11-18], we next tried to determine whether the observed glutamate increase could contribute to the rod cell degenerative process.

Evidence for glutamate-mediated toxicity on photoreceptors during retinal degeneration in the *rd1* mouse retina

In the central nervous system, fast excitatory neurotransmission is mediated through glutamate acting on ionotropic glutamate receptors [43]. Excessive activation of these receptors leads to neuronal cell death [44]. We therefore studied the effect of an ionotropic glutamate receptor antagonist on rod cell survival in order to know whether the observed glutamate increase may contribute to rod death. As shown in Figure 4, CNQX-treated *rd1* mice displayed morphological evidence of rod photoreceptor rescue when compared to saline-treated mice, especially in the area surrounding the optic nerve head. However, such results may seem quite unexpected since ionotropic glutamate receptors are not expressed by photoreceptors [45,46]. In photoreceptors, glutamate has only been reported to elicit a current generated by a transporter coupled to chloride channels [47,48] and to activate some metabotropic receptors, thereby modulating intracellular calcium concentration [49]. These pharmacological data indicate that the CNQX-induced rod rescue cannot be attributed to a direct effect of CNQX on

photoreceptors. Considering that expression of ionotropic glutamate receptors in the outer nuclear layer is concentrated at the postsynaptic region, just opposite the presumed site of photoreceptor glutamate release [45,46], our results hence suggest that suppressing glutamate postsynaptic excitation may slow down photoreceptor degeneration. The possibility that glutamate excess may retrogradely affect photoreceptors is further supported by acute and chronic changes detected in photoreceptor outer segments and synaptic terminals following intravitreal injections of kainate in the chicken eye [17].

The glutamate-mediated toxicity hypothesis in the *rd1* mouse concurs with our finding that endogenous neuroprotective mechanisms against glutamate toxicity during rod degeneration are up-regulated. Indeed, the two major endogenous mechanisms to protect neurons from glutamate-induced excitotoxicity in the retina and in the CNS are increased glutamate uptake by the glial transporter GLAST [20] along with the subsequent metabolism of glutamate into glutamine by GS selectively expressed in glial cells [23,24]. GLAST expression levels were found to increase throughout photoreceptor degeneration (Figure 2). Comparison of gene expression profiles by microarray analysis in *rd1* and wild-type retinas further confirmed that the gene encoding GLAST is one of the earliest and most highly up-regulated genes in the *rd1* retina (data not shown). We also showed that GS mRNA levels increase at PN8 and PN15 in *rd1* retinas (Figure 3A), whereas vimentin mRNAs, also expressed selectively by MGC in the retina, remain at similar levels in the two strains (Figure 3B). The absence of difference in vimentin mRNA expressions between the two strains from PN8 to PN15 strongly indicates that the increase in GS expression – and GLAST – result neither from MGC proliferation nor from any concentration phenomenon (due to photoreceptor degeneration) in our *rd1* retina RNA preparations. GS increase coincides with the increase in free glutamine we observed in the *rd1* mouse retina from PN15 to PN35 (Figure 1B).

However, a persistent glutamate increase while GLAST is up-regulated may appear contradictory. Two main hypotheses can be proposed to explain our findings.

First, Rossi et al. [50] reported that during severe ischemia, glutamate release occurs mainly by reversed operation of neuronal glutamate transporters. Although we cannot exclude such hypothesis, it seems rather unlikely in the present case since i) GLAST is not expressed by neurons and ii) glutamine levels are drastically elevated (Figure 1B). Such a production of glutamine requires glutamate efficient capture by MGC through the transporter GLAST and

the subsequent metabolism of glutamate into glutamine via GS activity [24].

We tend to favor the following hypothesis. Glutamate has been demonstrated to proportionally increase GLAST expression in brain-derived astroglial cultures, in primary cultures of cortical astrocytes and recently in retinal MGC cultures [38-40]. We thus propose that the early-observed glutamate increase at PN8 induces GLAST up-regulation in the *rdl* retina (Figures 1A and 2). MGC capture glutamate and convert it into glutamine via GS activity, this neuroprotective mechanism being efficient around PN15 (glutamate levels returned to normal and glutamine levels increase, see Figures 1A and 1B). Eventually, later during the degenerative process (i.e. from PN21 up to PN35), MGC capacity to maintain glutamate homeostasis being overwhelmed, glutamate balance is disrupted (Figure 1A).

Data from Fletcher and Kalloniatis [6] in the RCS rat retina are in line with the latter hypothesis and provide a possible explanation to the eventual incompetence of MGC in maintaining glutamate balance. By measuring high affinity uptake of ³[H]-glutamate and the time course of degradation of glutamate within MGC in the RCS retina, Fletcher and Kalloniatis first demonstrated that ³[H]-glutamate uptake into MGC is greater in the RCS rat retinas than in wild-types, in line with the GLAST increase we observed during photoreceptor degeneration in the *rdl* mouse retina (Figure 2). They next showed that glutamate degradation is delayed within MGC in RCS retinas as compared to wild-types. In the RCS rat, as here in the *rdl* mouse, this could be explained by the inhibition of GS activity as an indirect result of glutamine accumulation (Figure 1B) [6,51].

In the CNS, neurotransmitter activity is crucial to regulate synaptic connectivity [52]. The precise role of glutamate in the initial phase of synaptogenesis remains unclear, e.g. it could be involved in the stabilization of presynaptic terminals [52]. Perturbation in glutamate levels during a critical period of development may therefore account for abnormal synaptogenesis in the *rdl* mouse. Blanks et al. demonstrated that the first detectable ultrastructural damage in the *rdl* mouse retina is a defective maturation of the outer synaptic layer where abnormal photoreceptor/bipolar cell synaptic contacts are observed [36]. These abnormalities are due to the failure of rod bipolar cells to develop the central element of the post-synaptic triad, implying that the intercellular signaling events necessary for successful contact, synapse formation and synapse consolidation are impaired in the *rdl* mouse [53]. Thus, we propose that the mutation in the *rdl* mouse resulting in cGMP accumulation in rods [4] may also

induce a continuous depolarization of rod cells by maintaining their cGMP-gated cationic channels open. Rod depolarization would then trigger a sustained glutamate transmitter release resulting from the activation of the voltage-sensitive calcium channels. The imbalance of glutamate levels at the synaptic clefts might eventually compromise synaptic connectivity and thereby alter subsequent maturation steps of photoreceptors [17,36]. This may lead to “retrograde degeneration” of rods.

Therefore, our data pinpoint the occurrence of additive non-cell autonomous mechanisms contributing to rod photoreceptor death in the *rd1* retina. Glutamate-mediated toxicity may, at least partially, account for the “cumulative damage hypothesis” put forward by Clarke and colleagues [3] in the *rd1* mouse. Blockade of retinal glutamate receptors undoubtedly represents – alone or combined with other therapies – a potential therapeutic approach to prolong photoreceptor survival in RP.

ACKNOWLEDGMENTS:

The authors thank Danièle Thiersé, Aurélie Gluck and David Cia, PhD for assistance. They also thank Saddek Mohand-Said and David Hicks for helpful discussions.

M-ND was supported by the Fondation de France and Retina France. This work was also supported by the Institut National pour la Santé et la Recherche Médicale (INSERM), Louis Pasteur University (Strasbourg), Pierre et Marie Curie University (Paris VI), the French Ministère des Sciences et des Technologies, the Fondation Bétancourt, the Fédération des Aveugles de France and the European Commission: PROAGERET (# QLK6-2001-00385) and PRORET (# QLK6-2001-00569).

Commercial interest: M.N. Delyfer, None; V. Forster, None; N. Neveux, None; S. Picaud,

None; **T. Léveillard**, None; **J.A. Sahel**, None.

REFERENCES:

Bowes C, Li T, Dancinger M, Baxter LC, Applebury ML, Farber DB. Retinal degeneration in the *rd* mouse is caused by a defect in the beta subunit of rod cGMP-phosphodiesterase. *Nature* 1990; 347:677-80.

McLaughlin ME, Sandberg MA, Berson EL, Dryja TP. Recessive mutations in the gene encoding the beta-subunit of rod phosphodiesterase in patients with retinitis pigmentosa. *Nat Genet* 1993; 4:130-4.

Clarke G, Collins RA, Leavitt BR, Andrews DF, Hayden MR, Lumsden CJ, McInnes RR. A one-hit model of cell death in inherited neuronal degenerations. *Nature* 2000; 406:195-9.

Farber DB, Flannery JG, Bowes-Rickman C. The *rd* mouse story: Seventy years of research on an animal model of inherited retinal degeneration. *Prog Retin Eye Res* 1994; 13:31-64.

Ulshafer RJ, Sherry DM, Dawson R Jr, Wallace DR. Excitatory amino acid involvement in retinal degeneration. *Brain Res* 1990; 531:350-4.

Fletcher EL, Kalloniatis M. Neurochemical architecture of the normal and degenerating rat retina. *J Comp Neurol* 1996; 376:343-60.

Fletcher EL. Alterations in neurochemistry during retinal degeneration. *Microsc Res Tech* 2000; 50:89-102.

Kalloniatis M, Tomisich G. Amino acid neurochemistry of the vertebrate retina. *Prog Retin Eye Res* 1999; 18:811-66.

Nakazawa M. A molecular biological study on retinitis pigmentosa. *Nippon Ganka Gakkai Zasshi* 1993; 97:1394-405.

Noro Y, Ishiguro SI, Tamai M. Accumulation of glutamate-like immunoreactivity in the rds/rds mouse retinas. *Association for Research in Vision and Ophthalmology*; 1994 May 1-5; Fort Lauderdale, FLA. *IOVS* 1994; 35:ARVO Abstract 501.

Lucas DR, Newhouse JP. The toxic effect of sodium L-glutamate on the inner layers of the retina. *Ama Arch Ophthalmol* 1957; 58:193-201.

Olney JW. Glutamate-induced retinal degeneration in neonatal mice. Electron microscopy of the acutely evolving lesion. *J Neuropathol Exp Neurol* 1969; 28:455-74.

Yazulla S, Kleinschmidt J. The effects of intraocular injection of kainic acid on the synaptic organization of the goldfish retina. *Brain Res* 1980; 182:287-301.

Olney JW. The toxic effects of glutamate and related compounds in the retina and the brain. *Retina* 1982;2:341-59.

Ingham CA, Morgan IG. Dose-dependent effects of intravitreal kainic acid on specific cell types in chicken retina. *Neuroscience* 1983;9:165-81.

Sattayasai J, Ehrlich D. Morphology of quisqualate-induced neurotoxicity in the chicken retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1987;28:106-17.

Sattayasai J, Zappia J, Ehrlich D. Differential effects of excitatory amino acids on photoreceptors of the chick retina: an electron-microscopical study using the zinc-iodide-

osmium technique. *Vis Neurosci* 1989;2:237-45

Sahel JA, Albert DM, Lessell S, Adler H, McGee TL, Konrad-Rastegar J. Mitogenic effects of excitatory amino acids in the adult rat retina. *Exp Eye Res* 1991;53:657-64.

Derouiche A, Rauen T. Coincidence of L-glutamate/L-aspartate transporter (GLAST) and glutamine synthetase (GS) immunoreactions in retinal glia: evidence for coupling of GLAST and GS in transmitter clearance. *J Neurosci Res* 1995; 42:131-43.

Rauen T, Taylor WR, Kuhlbrodt K, Wiessner M. High-affinity glutamate transporters in the rat retina: a major role of the glial glutamate transporter GLAST-1 in transmitter clearance. *Cell Tissue Res* 1998; 291:19-31.

Harada T, Harada C, Watanabe M, Inoue Y, Sakagawa T, Nakayama N, Sasaki S, Okuyama S, Watase K, Wada K, Tanaka K.. Functions of the two glutamate transporters GLAST and GLT-1 in the retina. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95:4663-6.

Izumi Y, Shimamoto K, Benz AM, Hammerman SB, Olney JW, Zorumski CF. Glutamate transporters and retinal excitotoxicity. *Glia* 2002; 39:58-68.

Linser PJ, Sorrentino M, Moscona AA. Cellular compartmentalization of carbonic anhydrase-C and glutamine synthetase in developing and mature mouse neural retina. *Brain Res* 1984; 315:65-71.

Erecinska M, Silver IA. Metabolism and role of glutamate in mammalian brain. *Prog Neurobiol* 1990; 35:245-96.

Glissin V, Crkvenjakov R, Byus C. Ribonucleic acid isolated by cesium chloride centrifugation. *Biochemistry* 1974; 13:2633-7.

Helmlinger D, Yvert G, Picaud S, Merienne K, Sahel J, Mandel JL, Devys D. Progressive retinal degeneration and dysfunction in R6 Huntington's disease mice. *Hum Mol Genet* 2002;11:3351-9.

Duboc A, Hanoteau N, Simonutti M, Rudolf G, Nehlig A, Sahel JA, Picaud S. Vigabatrin, the GABA-transaminase inhibitor, damages cone photoreceptors in rats. *Ann Neurol* 2004;55:695-705.

Mori M, Metzger D, Picaud S, Hindelang C, Simonutti M, Sahel J, Chambon P, Mark M. Retinal dystrophy resulting from ablation of RXR alpha in the mouse retinal pigment epithelium. *Am J Pathol* 2004;164:701-10.

Frasson M, Picaud S, Leveillard T, Simonutti M, Mohand-Said S, Dreyfus H, Hicks D, Sahel J. Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor induces histological and functional protection of rod photoreceptors in the rd/rd mouse. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999; 40:2724-34.

Schmidt SY, Berson EL. Taurine uptake in isolated retinas of normal rats and rats with hereditary retinal degeneration. *Exp Eye Res* 1978; 27:191-8.

Okada M, Okuma Y, Osumi Y, Nishihara M, Yokotani K, Ueno H. Neurotransmitter contents in the retina of RCS rat. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2000; 238:998-1001.

Phelan JK, Bok D. Analysis and quantitation of mRNAs encoding the alpha- and beta-subunits of rod photoreceptor cGMP phosphodiesterase in neonatal retinal degeneration (rd) mouse retinas. *Exp Eye Res* 2000; 71:119-128.

Lasansky A, DeRobertis E. Submicroscopic analysis of the genetic dystrophy of visual cells in C3H mice. *J Biophys Biochem Cytol* 1960; 7:679-694.

Shiose Y, Sonohara O. Studies on retinitis pigmentosa. XXVI. Electron microscopic aspects of early retinal changes in inherited dystrophic mice. *Nippon Ganka Gakkai Zasshi* 1968; 72:1127-41.

Caley DW, Johnson C, Liebelt RA. The postnatal development of the retina in the normal and rodless CBA mouse: a light and electron microscopic study. *Am J Anat* 1972; 133:179-212.

Blanks JC, Adinolfi AM, Lolley RN. Photoreceptor degeneration and synaptogenesis in retinal-degenerative (rd) mice. *J Comp Neurol* 1974; 156:95-106.

Carter-Dawson LD, LaVail MM, Sidman RL. Differential effect of the rd mutation on rods and cones in the mouse retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1978; 17:489-98.

Duan S, Anderson CM, Stein BA, Swanson RA. Glutamate induces rapid upregulation of astrocyte glutamate transport and cell-surface expression of GLAST. *J Neurosci* 1999; 19:10193-200.

Gegelashvili G, Civenni G, Racagni G, Danbolt NC, Schousboe I, Schousboe A. Glutamate receptor agonists up-regulate glutamate transporter GLAST in astrocytes. *Neuroreport* 1996; 8:261-5.

Taylor S, Srinivasan B, Wordinger RJ, Roque RS. Glutamate stimulates neurotrophin expression in cultured Muller cells. *Brain Res Mol Brain Res* 2003; 111:189-97.

Rauen T, Kanner BI. Localization of the glutamate transporter GLT-1 in rat and macaque monkey retinae. *Neurosci Lett* 1994; 169:137-40.

Orr HT, Cohen AI, Carter JA. The levels of free taurine, glutamate, glycine and gamma-amino butyric acid during the postnatal development of the normal and dystrophic retina of the mouse. *Exp Eye Res* 1976; 23:377-84.

Hollmann M, Heinemann S, 1994. Cloned glutamate receptors. *Annu Rev Neurosci* 1994;17:31-108

Olney JW, Sharpe LG, Feigin RD. Glutamate-induced brain damage in infant primate. *J Neuropathol Exp Neurol* 1972;31:464-88

Morigiwa K and Vardi N. Differential expression of glutamate receptor subunits in the outer retina. *J Comp Neurol* 1999;405:173-84

Pourcho RG, Qin P, Goebel DJ. Cellular and subcellular distribution of NMDA receptor subunit NR2B in the retina. *J Comp Neurol* 2001;433:75-85

Picaud S, Larsson HP, Wellis DP, Lecar H, Werblin F. Cone photoreceptors respond to their own glutamate release in the tiger salamander. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92:9417-21.

Picaud SA, Larsson HP, Grant GB, Lecar H, Werblin FS. Glutamate-gated chloride channel with glutamate-transporter-like properties in cone photoreceptors of the tiger salamander. *J Neurophysiol* 1995;74:1760-71

Koulen P, Kuhn R, Wassle H, Brandstatter JH. Modulation of the intracellular calcium concentration in photoreceptor terminals by a presynaptic metabotropic glutamate receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96:9909-14.

Rossi DJ, Oshima T, Attwell D. Glutamate release in severe brain ischaemia is mainly by

reversed uptake. *Nature* 2000 Jan 20;403(6767):316-21

Feng B, Shiber SK, Max SR. Glutamine regulates glutamine synthetase expression in skeletal muscle cells in culture. *J Cell Physiol* 1990;145:376-80

Gan WB. Glutamate-dependent stabilization of presynaptic terminals. *Neuron* 2003;38(5):677-8.

Marc RE, Jones BW, Watt CB, Strettoi E. Neural remodeling in retinal degeneration. *Prog Retin Eye Res* 2003; 22:607-55.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Free glutamate, glutamine, taurine and glycine levels in *rdl* and control retinas during the degeneration process. Free amino acids were measured in *rdl* and control retinas at PN4, PN8, PN15, PN21 and PN35 using an amino acid analyzer. A: glutamate, B: glutamine, C: taurine, D: glycine. The concentrations of each amino acid are expressed, as a percentage, with respect to the sum of all the concentrations of the amino acids quantified by the analyzer. Data are presented as the mean \pm SEM of three independent determinations (n = 3 for each age and strain, * p<0.01, *** p<0.0001, **** p<0.0001, ***** p<0.00001, °p<0.05, °° p<0.005, °°° p<0.0005, °°°° p<0.0005, °°°°° p<0.00005).

Figure 2. GLAST expression during photoreceptor degeneration. In vivo study of GLAST mRNA expression in untreated *rdl* and control retinas during photoreceptor degeneration. Semi-quantitative analyses of GLAST (A) and GLT-1 (B) mRNA expressions were performed using real-time RT-PCR. For A and B, data are presented as the mean \pm SEM of triplicate determinations. C: Western blots of total proteins (10 μ g/lane) prepared from *rdl* and control retinas at PN1, PN8, PN15, P21 and PN35 were probed with anti-GLAST and anti-alpha-tubulin antibodies. The blots demonstrated bands at ~50kDa (alpha-tubulin), at ~76kDa (GLAST monomeric form, 3) and two bands at ~160kDa (GLAST multimeric forms, 1 and 2). Results are representative of three independent experiments.

Figure 3. Glutamine synthetase (GS) and vimentin mRNA expressions. In vivo study of GS (A) and vimentin (B) mRNA expressions in *rdl* and control retinas at PN8 and PN15 was performed using real-time RT-PCR. Data are the mean \pm SEM of triplicate determinations

Figure 4. Effect of CNQX on rod survival in the *rdl* retina. CNQX or physiological saline solution was daily injected intraperitoneally to *rdl* mice from PN3 to PN21. After treatment, retinas were dissected, immunolabeled with Rho-4D2, an antibody that specifically recognized rod photoreceptors, and then flat-mounted. A: Views of CNQX-treated and saline-treated retinas immunolabeled with Rho-4D2 in an area surrounding the optic nerve head (same distance, same parameters). The greater numbers of surviving rod photoreceptors after CNQX-treatment are apparent. Scale bar, 25 μ m. B: Results of quantification of immunolabeled rods on whole retinas using a stereological approach. Data are presented as the mean \pm SEM (n = 7 in each group, ° p<0.05).

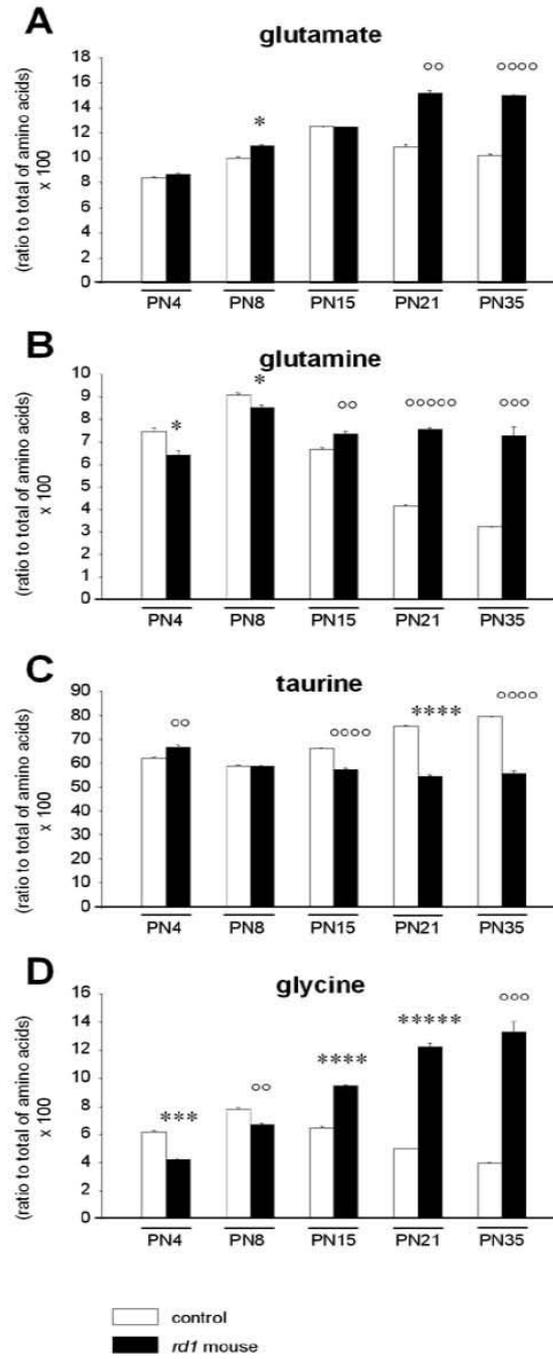


Figure 1.

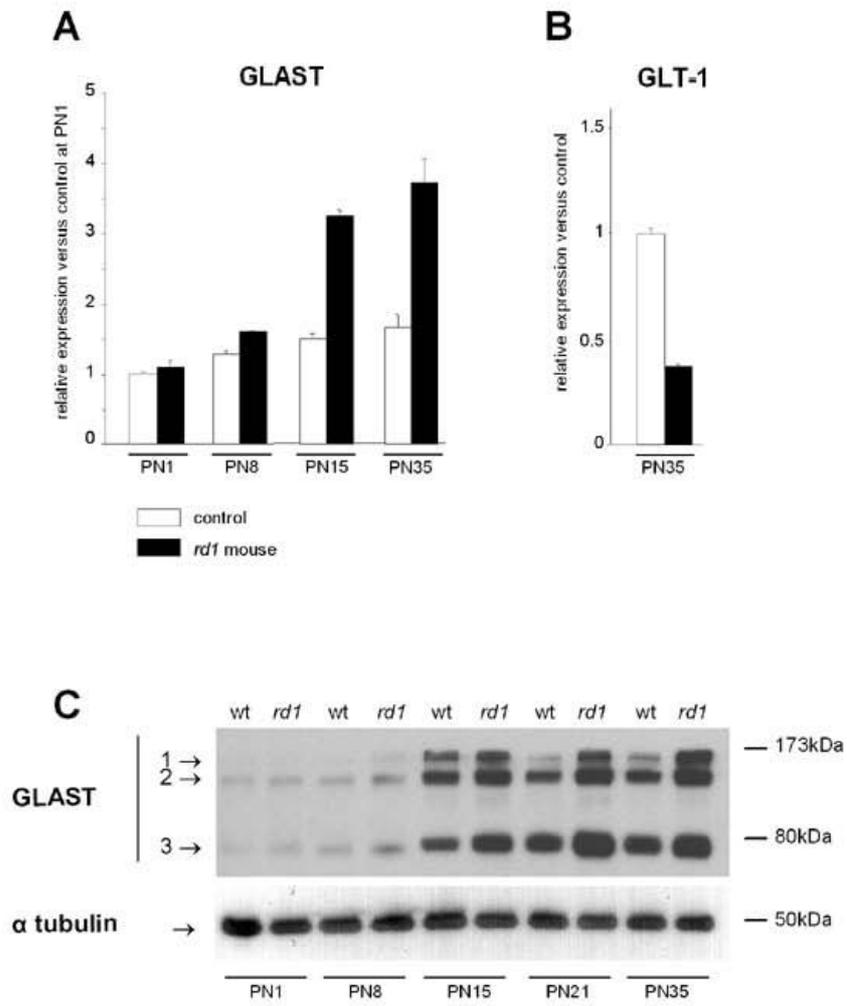


Figure 2.

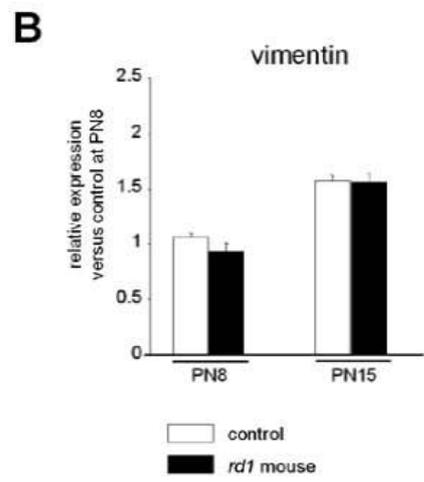
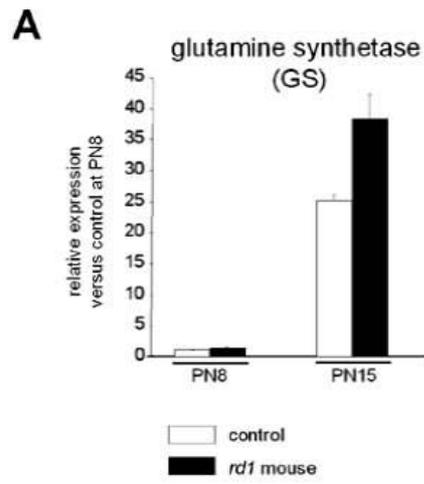
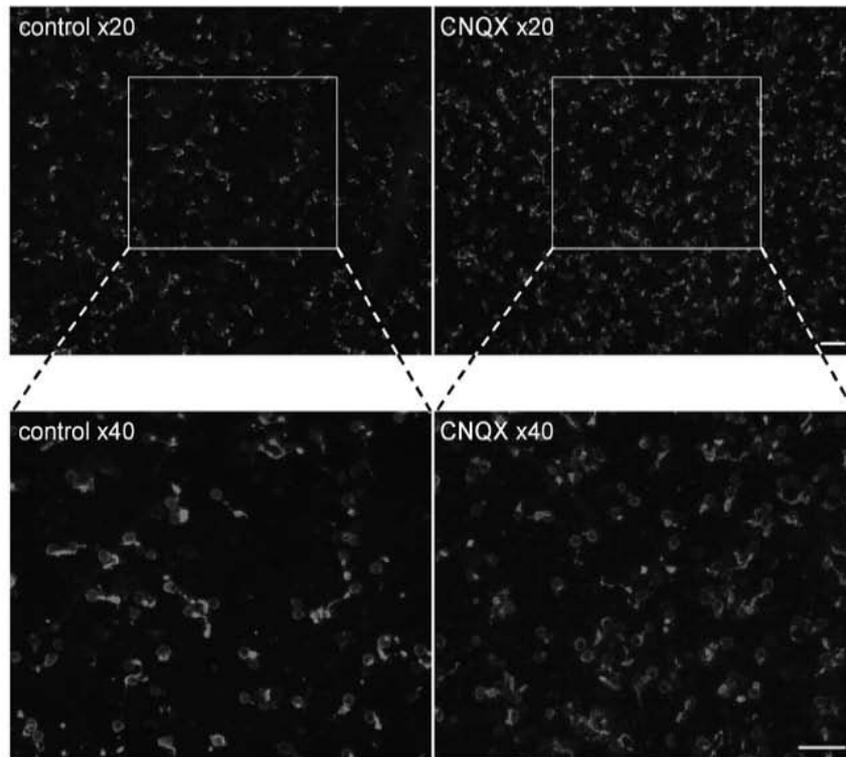


Figure 3.

A.



B.

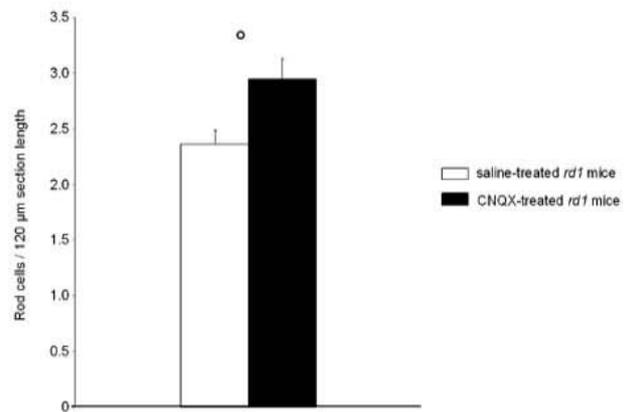


Figure 4.

TABLE 1.

This table lists all the oligonucleotides used for RT-PCR in this study, together with the corresponding annealing temperatures, PCR product lengths and Genbank accession numbers.

Table 1. Oligonucleotides used for RT-PCR

	Forward (1) and reverse (2) primer sequences	Annealing temperature (°C)	Product length (bp)	Accession number (GenBank®)	Application
beta-actin	1: AAAGACCTCTATGCCAACACAG 2: AAAGAAAGGGTGTAACGCAG	57	296	M12481	Real time RT-PCR
GLAST	1: GAAGTCTCCAGACGTTCTAATCC 2: GCTCTGAAACCGCCACTTACTATC	58	303	D63816	Real time RT- PCR (Figure 2A)
GLT-1	1: ATGTCATCCTCCCTCTTATCATC 2: CTTTCTTTGTCACGTCTGAATCTG	56	313	AB007810	Real time RT- PCR (Figure 2B)
GS	1: TGTACCTCCATCCTGTGCC 2: GTCCCCGTAATCTTGACTCC	56	349	U09114	Real time RT- PCR (Figure 3A)
vimentin	1: TTTTGCCCTTGAAGCTGCTAAC 2: TCACCTGTCCATCTCTGGTCTC	56	314	M26251	Real time RT- PCR (Figure 3B)

Annexe 4

MN Delyfer, M. Simonutti, N. Neveux, T. Léveillard & JA Sahel

“ DOES GDNF EXERT ITS NEUROPROTECTIVE EFFECTS ON PHOTORECEPTORS
IN THE rd1 RETINA THROUGH THE GLIAL GLUTAMATE TRANSPORTER GLAST ”

Accepté pour publication dans Molecular Vision

Does GDNF exert its neuroprotective effects on photoreceptors in the *rd1* retina through the glial glutamate transporter GLAST?

Marie-Noëlle Delyfer^{1,2}, Manuel Simonutti¹, Nathalie Neveux³, Thierry Lévillard¹ and José-Alain Sahel^{1,4,5}

¹Laboratoire de Physiopathologie Cellulaire et Moléculaire de la Rétine, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Inserm U592) – Université Pierre et Marie Curie, Paris, France

²Vitreo-Retinal Unit, Department of Ophthalmology, Bordeaux University Hospital, Bordeaux, France

³Laboratoire de Biochimie A, Hôpital Hôtel-Dieu, AP-HP, Paris, France

⁴Centre Hospitalier National d’Ophtalmologie des Quinze-Vingts, 28 rue de Charenton, 75012 Paris, France

⁵Institute of Ophthalmology – University College of London, 11–43 Bath Street, London EC1V 9EV, United Kingdom

Corresponding author: José-Alain Sahel, Laboratoire de Physiopathologie Cellulaire et Moléculaire de la Rétine, INSERM U592 – Université Pierre et Marie Curie – Hôpital Saint-Antoine, 184 rue du Faubourg Saint-Antoine, 75571 Paris Cedex 12, France. Tel. +33 149 284 603. Fax. +33 149 286 663.

E-mail address: j-sahel@quinze-vingts.fr

Authors’ email addresses: Marie-Noëlle Delyfer: marie-noelle.delyfer@libertysurf.fr

Thierry Lévillard: leveilla@st-antoine.inserm.fr

José-Alain Sahel: j-sahel@quinze-vingts.fr

ABSTRACT: (2336 characters)

Purpose: We previously demonstrated that exogenous Glial cell line-Derived Neurotrophic Factor (GDNF) induces histological and functional protection of photoreceptors in the retinal degeneration (*rdl*) mouse model (Frasson et al., Invest Ophthalmol Vis Sci 1999; 40:2724-34). The mechanisms underlying such neuroprotection remain elusive. In parallel to this work, we provided evidence for the occurrence of glutamate-mediated excitotoxic phenomena contributing to rod photoreceptor death in the *rdl* retina (Delyfer et al., submitted). In the present study, we investigated whether, as demonstrated in other models, GDNF could exert its neuroprotective effect on photoreceptors through Müller glial cells (MGC) by promoting the expression of the glial L-glutamate/L-aspartate transporter (GLAST), an endogenous neuroprotective mechanism against glutamate-mediated excitotoxicity.

Methods: Reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to compare the mRNA expression levels of GDNF receptors between *rdl* and wild-type mouse retinas as well as between Müller glial cell (MGC) and mixed retinal cell cultures. Recombinant GDNF was applied to pure MGC cultures, to *rdl* retinal organ cultures and injected subretinally into *rdl* mouse eyes. GLAST expression following GDNF treatment was measured by RT-PCR, immunoblotting and immunohistochemistry. Free glutamate and glutamine levels were quantified in *rdl* retinas after GDNF or control treatment using an amino acid analyzer (JEOL AminoTac).

Results: mRNA expression studies of GDNF receptors – GFRalpha-1 and Ret – demonstrated that GDNF receptors were not exclusively expressed by the degenerating photoreceptor cells but mainly by MGC. Exogenous GDNF application to MGC cultures, *rdl* mouse retinal explants and in vivo *rdl* mouse retinas increased the expression of GLAST [+ 48% in retinal explants ($p < 0.005$) and + 25% in vivo ($p < 0.0005$)]. GLAST protein expression in MGC was particularly increased around degenerative photoreceptors. Free glutamate and glutamine levels in the *rdl* retina were not significantly modified by exogenous GDNF.

Conclusions: Our data are suggesting that, in the *rdl* mouse retina, GDNF neuroprotective effect on photoreceptors can be mediated indirectly through the activation of MGC. We demonstrate that injection of recombinant GDNF enhances the expression of GLAST and more particularly around the degenerating photoreceptors. Since we failed to demonstrate that GDNF decreases free glutamate levels, we could not ascertain whether GDNF promoted photoreceptor-survival via an increase of glutamate uptake and, therefore, a change in glutamate distribution.

INTRODUCTION

Retinitis pigmentosa (RP) is a heterogeneous group of inherited retinal degenerative diseases, characterized by the progressive death of rod and cone photoreceptors leading to an irreversible loss of visual function. The retinal degeneration (*rd1*) mouse is an appropriate model for studying the cellular and molecular events leading to photoreceptor death and for evaluating new treatments as the pattern of photoreceptor loss is similar to that in affected humans and because the mutated gene encodes rod cGMP-phosphodiesterase (Pde6b) [1] as in some affected human families [2].

However, to this day, mechanisms leading to photoreceptor apoptosis are still unclear. Despite the lack of knowledge on these mechanisms, several therapeutic approaches have been proposed and showed some efficacy in such a model. Besides therapies aiming at curing the genetic anomaly per se (corrective gene therapy), many works have demonstrated the benefit of using trophic factors to limit or to postpone the degeneration process [3-6]. This appears as a potential mutation-independent therapeutic approach addressing the challenges linked to the tremendous genetic heterogeneity associated with the RP phenotype [7]. We previously demonstrated that intraocular administration of Glial cell line-Derived Neurotrophic Factor (GDNF) not only significantly slows down photoreceptor degeneration, but also partially preserves visual function in the *rd1* mouse [8]. This result was further confirmed in several different models of photoreceptor degeneration in vivo: the transgenic S334ter rat expressing a mutated rhodopsin gene [9], the retinal detachment-induced photoreceptor degeneration model [10] and the RCS rat [11]. Yet, the mechanisms of such neuroprotection remain elusive. The work presented here stems from an attempt to elucidate one of the mechanisms of GDNF-induced neuroprotection.

It is not formally known whether GDNF acts directly or indirectly on photoreceptors in vivo and what changes are induced by such a treatment in the dystrophic retina. Whereas other trophic factors are highly suspected to promote photoreceptor survival indirectly through an activation of Müller glial cells (MGC) [12-15], GDNF was first reported to promote newborn

photoreceptor survival directly in vitro [16-18]. Harada et al., on their side, demonstrated that GDNF modulates trophic factor release by MGC in vitro and thus proposed that GDNF could exert its neuroprotective effect through both direct and indirect pathways [19,20].

In the central nervous system (CNS), GDNF has been shown to protect from excitotoxic and ischemic damages [21,22], and to modulate the expression of the glutamate transporter GLT-1 [23,24] and/or of the glial L-glutamate/L-aspartate transporter (GLAST) [24,25]. In the retina, GLAST is expressed in MGC and is essential for glutamate clearance to avoid neurotoxicity and to allow normal signal transmission between photoreceptor and bipolar cells [26-29]. Since we demonstrated, in a parallel work, the occurrence of glutamate-mediated excitotoxic mechanisms contributing to rod cell death in the *rd1* retina [Delyfer et al., submitted], we here tried to figure out whether GDNF could exert its neuroprotective effect on photoreceptors through MGC by promoting the expression of GLAST.

We first studied GDNF receptor distribution by analyzing the mRNA expression of its different components – GFRalpha-1 and Ret – in wild-type and *rd1* mouse retinas, as well as in MGC cultures and mixed retinal cell cultures. Since our results demonstrated that GFRalpha-1 and Ret are expressed in MGC, we subsequently compared GLAST expression levels in MGC cultures in the presence and the absence of GDNF, and in GDNF-treated and PBS-treated *rd1* retinas. Finally, we measured free glutamate and glutamine levels in GDNF- and PBS-treated *rd1* retinas

MATERIALS AND METHODS

Animals

C3H/He mice (*rd1* mice) and C57BL/6 mice (wild-types or controls) were obtained from Iffa Credo (L'Arbresle, France). Animals were cared for and handled according to the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research. They were maintained in clear plastic cages and subjected to light/dark cycles of 12 hours. Day of birth was designated postnatal day 0 (PN0).

MGC cultures and GDNF application in vitro

Retinal MGC culture technique was adapted from Hicks and Courtois [30]. Since the mutated *Pde6b* gene has been shown to be specifically expressed in rod photoreceptors from PN8 in the *rdl* retina [31], we assumed that *rdl* and wild-type MGC are similar in both strains before the degeneration starts, and used C57BL/6 retinas to perform the cultures. Mice were killed at PN8. Eyes were immediately enucleated into Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Invitrogen, Carlsbad, CA) containing 10 U/ml penicillin and 10 µg/ml streptomycin, and stored overnight at room temperature in the dark. Eyes were then incubated in DMEM containing 0.1% trypsin and 70 U/ml collagenase (Worthington Biochemical, Freehold, NJ) at 37 °C for 30 minutes. Retinas were dissected free of the retinal pigment epithelium, cut into 1 mm² fragments, placed in a Petri dish containing DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum (Invitrogen, Carlsbad, CA) and maintained at 37 °C in a humidified 5% CO₂ incubator. Two days later, retinal aggregates were removed. At confluence, MGC cultures were resuspended and seeded in two different plates. After two days (just before confluence) the medium was removed and plates were rinsed twice with DMEM. After rinsing, cells were immediately placed in DMEM supplemented with 5 µg/ml insulin, 5 µg/ml transferrin, 5 ng/ml sodium selenite, 1 mM sodium pyruvate, 10 U/ml penicillin and 10 µg/ml streptomycin, with or without 50 ng/ml GDNF (rhGDNF, Promega, Madison, WI). 24 hours later, the medium was removed, cells were rinsed with phosphate buffered saline (PBS) and RNA extracted.

Retinal cell cultures

Mouse retinal cell cultures were prepared from PN8 C57BL/6 mice as previously described [32].

Retinal organ cultures

rdl mice were killed at PN15 (n = 6). Retinas were immediately dissected free of the retinal pigment epithelium and the sclera under a dissecting stereomicroscope. Retinal explants were then grown as organ cultures in a chemically defined medium (CDM, 1.5 ml/retina) in the presence (right eyes) or absence (left eyes) of GDNF (50 ng/ml). CDM was composed of

DMEM, supplemented with 5 µg/ml insulin, 5 µg/ml transferrin, 6.36x10⁻⁵ mM progesterone, 0.1 mM putrescine, 5 ng/ml sodium selenite, 3 mM taurine, 2.7x10⁻³ mM cytidine 5'-diphosphoethanolamine, 5.2x10⁻³ mM cytidine 5'-diphosphocholine, 0.55 M hydrocortisone, 2.9x10⁻³ mM 3-3'-5-triiodo-L-thyronine, 1 mM sodium pyruvate, 3.1x10⁻⁴ mM prostaglandin D₂, 10 U/ml penicillin and 10 µg/ml streptomycin. Cultures were maintained at 37 °C in a humidified 5% CO₂ incubator. After 48 hours of incubation, the medium was removed and proteins extracted from the retinas. The left and right eyes of each animal were compared for the protein expression study.

Subretinal injections of GDNF

GDNF was injected into *rd1* mice at PN15 (n = 6). Mice were anesthetized with an intraperitoneal injection of etomidate (0.5 mg/ml; Janssen-Cilag, Boulogne-Billancourt, France) and midazolam (0.5 mg/ml; Roche, Neuilly-sur-Seine, France). GDNF (1 µl) was injected at a dose of 330 ng/µl in sterile PBS with a 10 µl micro-syringe (Unimetrics, Folsom, CA), a micro injector (UltraMicroPump II-Micro 4, World Precision Instruments, Sarasota, FL) and a 30½ gauge needle. With the aid of a stereomicroscope (Zeiss, Germany), the needle was inserted just posterior to the limbus, through the sclera and directed towards the posterior pole of the eye into the subretinal space. PBS (1 µl) was injected into the contralateral eye as a control. 48 hours after injection, the left and right retinas of each animal were compared for the protein expression study.

Reverse transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) analysis

Total RNAs were purified from cultures by use of a Qiagen Rneasy Kit (Qiagen, Valencia, CA) according to the manufacturer's instructions, and from retinas by the cesium chloride centrifugation method [33]. cDNAs were synthesized by reverse transcription using random hexamers (pdN₆) according to standard protocols. The sequence of each primer, the annealing temperatures, the length of the amplified products and the GenBank accession numbers are given in Table 1.

Standard PCRs were performed at a final concentration of 1x PCR buffer, 260 µM dNTPs, 2

μ M each primer, 2.5 U of Taq polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA) in a total volume of 25 μ l. The mixture was amplified with the RoboCycler-Gradient-96 (Stratagene) for 35 cycles. Cycling conditions were as follows: initial denaturation at 95 °C for 5 min, then 35 cycles of denaturation at 95 °C for 30 sec, annealing for 30 sec (see Table 1 for annealing temperatures used) and elongation at 72 °C for 1 min, followed by a final elongation step at 72 °C for 3 min. PCR products (10 μ l) were separated by 1.2% agarose gel and quantified using the Phoretix 1D image analysis software (Phoretix International, Newcastle-upon-Tyne, UK).

Real-time PCRs were performed on a LightCycler instrument (Roche-Diagnostics, Indianapolis, IN) and with SYBR Green I, according to the manufacturer's recommendations. Cycling conditions were as follows: initial denaturation at 95 °C for 2 min, followed by 40 cycles of denaturation at 95 °C for 0 sec, annealing for 5 sec (see Table 1 for annealing temperatures used) and elongation at 72 °C for 15 sec. Melting curve analysis was performed as follows: denaturation at 95 °C for 2 min, annealing at 65 °C for 2 min, followed by a gradual increase (0.1 °C/sec) in temperature to 95 °C. Real-time PCR efficiencies were evaluated by calculating the slope of a linear regression graph following recommended protocols. For each experiment, crossing points were calculated by the LightCycler Data Analysis Program (LightCycler-3.5 Software). Target gene expressions were normalized with respect to beta-actin expression. Mean crossing point deviations were calculated between samples and controls as specified in the figures. For comparative studies of in vivo gene expression between *rd1* and control retinas, 10 retinas were pooled for each age (PN1, PN8, PN15, PN35) and each strain. The amplification steps were performed in triplicate for each point and were repeated using three independent cDNA preparations. The levels of expression of rhodopsin, rod arrestin and of other markers of retinal degeneration were tested and found to be in accordance with the age and genotype analyzed, thus validating our RNA preparations (see Figure 1A for in vivo mRNA expression study of rod arrestin).

Immunohistochemistry

rd1 mice were killed 48 hours after being injected (n = 10). GDNF- and PBS-treated eyes were immediately removed, fixed in 4% paraformaldehyde for six hours at 4 °C. Eyes were then embedded in paraffin. Sections (6 μ m) were cut in a transverse plane using a microtome (Microm, HM340E, San Marcos, CA). Sections were saturated in PBS containing 3% BSA and 0.1% Tween 20 for one hour and then incubated overnight at 4 °C with guinea pig anti-

GLAST polyclonal antibody (1:4000; AB1782, Chemicon International, Temecula, CA). The primary antibody was localized using goat anti-guinea pig antibody coupled with Alexa Fluor 594 (1:1000; Molecular Probes, Leiden, Netherlands). No immunoreactivity was observed when anti-GLAST antibody was preabsorbed with GLAST immunizing peptide (Sigma Genosys, The Woodlands, TX). Confocal microscopy was performed using a TCS-SP Leica microscope (Leica Microsystems Inc, Bannockburn, IL), equipped with a x 40 objective (plan apo; NA = 1.25). The same parameters and exposure times were used in all cases. For each optical section, the signal was treated by lines averaging to integrate the signal collected over four lines in order to reduce noise. A focal series was collected for each specimen (11 optical sections per specimen).

Protein extraction and Western blotting

rd1 and control mice were killed at PN1, PN8, PN15, PN21 and PN35 (n = 3 animals per age and strain). Eyes were immediately enucleated, and retinas dissected within 2 minutes in sterile PBS. Retinas were then homogenized in a lysis buffer containing 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM PMSF, 1 mM EDTA, 1 mM dithiothreitol, 1% Triton X-100, 1x mixture of protease inhibitors, 45 µg/ml TLCK, 1 mM sodium fluoride and 1 mM sodium orthovanadate. Protein concentrations were estimated by Bradford's technique. Proteins were shock-frozen and maintained at - 80 °C until analysis. Proteins were further diluted 1:1 in sample buffer (final concentrations: 10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA, 20 mM dithiothreitol, 3% SDS, 10% glycerol, 0.1% bromophenol blue, 4 M urea) and heated at 50 °C for 45 minutes. Proteins (10 µg/lane) were separated by 10% SDS-PAGE gel electrophoresis containing 4 M urea, and transferred onto nitrocellulose membranes. Membranes were blocked with PBS, 0.1% Tween 20, 3% nonfat dry milk and 5% horse serum overnight at 4 °C and then incubated with anti-GLAST antibody (1:15000) for two hours at room temperature. Membranes were then washed and incubated with the appropriate horseradish peroxidase-labeled secondary antibody (1:15000; Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA) for one hour at room temperature. Antibody binding was visualized by Enhanced Chemiluminescence detection system (ECL+, Amersham, Arlington Heights, IL) as recommended by the manufacturer. To ensure that equal quantities were loaded in each lane, membranes were stripped and subsequently reprobbed with monoclonal anti-alpha-tubulin antibody (1:500; T5168, Sigma, Saint Louis, MO). Alternatively, an identical gel was run in

parallel and subjected to Coomassie staining to control equal loading. Band intensities were quantified by scanning densitometry using Phoretix 1D software.

GDNF quantification

GDNF protein levels in untreated *rd1* and control retinas at PN15 were measured by Enzyme-Linked Immunosorbant Assay (ELISA) according to the manufacturer's instructions (GDNF-Emax ImmunoAssay System, Promega, Madison, WI).

Quantification of free amino acids

Retinas were rapidly dissected on ice and deproteinized with 10% (v/v) trichloroacetic acid containing 0.5 mM EDTA. After sonication and centrifugation, supernatants were collected and stored at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ until amino acid analysis. Amino acids were separated and quantified by ion-exchange chromatography using an amino acid analyzer (AminoTac JLC-500/V; JEOL, Tokyo, Japan). The concentrations of each amino acid are expressed, as a percentage, with respect to the sum of all the concentrations of the amino acids quantified by the analyzer (i.e. taurine, threonine, serine, asparagine, glutamate, glutamine, glycine, alanine, citrulline, valine, isoleucine, leucine, tyrosine, phenylalanine, ornithine, lysine and arginine).

Statistical analysis

All data are presented as the mean \pm the standard error of the mean (SEM). Unpaired Student's t-test was used to compare amino acid levels in *rd1* and control mice and to compare GLAST mRNA expression in GDNF- and PBS-treated MGC. Paired Student's t-test was used to compare GLAST protein expression in GDNF- and PBS-treated eyes both in retinal organ cultures and in vivo. Values of $p < 0.05$ were considered to be significant.

RESULTS

GDNF expression during photoreceptor degeneration in the *rdl* mouse retina

A review of the literature enabled us to determine that i) PN8 most likely represents the first time point when the degenerative process becomes detectable in the *rdl* mouse retina [31,34-38], ii) PN35 can be considered as the terminal stage of rod degeneration [39] and iii) PN15 represents an intermediate stage between the two. We confirmed these data by studying rod arrestin mRNA relative expression between *rdl* and control retinas using quantitative RT-PCR (Figure 1A). At PN8 (corresponding to the onset of photoreceptor degeneration), no difference was noticed between *rdl* and control retinas. At PN15 (corresponding to an

intermediate stage of degeneration), *rdl* mouse retinas expressed 2.8-fold less rod arrestin mRNA than did controls and at PN35 (representing the terminal stage of rod degeneration), over 14-fold less.

As GDNF has recently been shown to be up-regulated endogenously in a model of light-induced retinal degeneration [20], we examined GDNF mRNA expression in *rdl* and control mouse retinas during rod photoreceptor degeneration using real-time RT-PCR selecting times corresponding to early, intermediate and terminal phases of degeneration as above (Figure 1B). At PN8, no difference was noticed between *rdl* and control retinas. At PN15, GDNF mRNA expression was 1.35-fold higher in *rdl* mice than in controls. At PN35, no more difference was observed.

We further investigated whether there could be a difference in GDNF protein expression between the two strains at PN15, but the level of GDNF protein expression was non-detectable at PN15 when measured by ELISA. Our results thus suggest that GDNF mRNA is moderately and transiently up-regulated at PN15 in the *rdl* mouse.

GDNF receptor mRNA expression in the *rdl* mouse retina

GDNF acts through a receptor complex composed of the binding receptor GFRalpha-1 and the Ret protein tyrosine kinase [16,40-42]. We used real-time RT-PCR to study GFRalpha-1 and Ret mRNA expressions in the retinas of *rdl* and control mice, selecting times corresponding to early, intermediate and terminal phases of degeneration as above. In both control and *rdl* mouse retinas, GFRalpha-1 mRNA expression increased with age (Figure 1C). However, at each age, the mRNA expression was significantly higher in *rdl* retinas than in controls. At PN8, GFRalpha-1 mRNA expression was 1.3-fold higher in *rdl* retinas than in controls. At PN15, the mRNA expression difference reached a maximum of 2.4-fold. At PN35, GFRalpha-1 mRNA increase returned to a 1.5-fold difference. In both strains, Ret mRNA expression increased with age (Figure 1D). But in contrast to GFRalpha-1, no difference in Ret mRNA expression was observed between *rdl* and control retinas from PN8 to PN35. As GDNF signaling through GFRalpha-2 has also been reported [43-45], we measured GFRalpha-2 mRNA expression from PN8 to PN35, but observed no difference between *rdl* and control retinas (Figure 1E). Hence, our results indicate that Ret and GFRalpha-2 mRNA expression levels remain stable during rod degeneration whereas GFRalpha-1 mRNA is up-regulated.

To obtain some information on the retinal localization of these receptors, Ret and GFRalpha-1 mRNA expressions were then compared in pure MGC cultures and in mixed retinal cell cultures (including all types of retinal cells, glial and neuronal) by using standard RT-PCR (Figure 1F). Figure 1F illustrates that both Ret and GFRalpha-1 mRNAs were expressed at higher levels in pure MGC than in retinal cell cultures. Quantitative measurements of RT-PCR products demonstrated that in vitro, in our RT-PCR conditions, Ret and GFRalpha-1 mRNAs were 1.7 and 5.3 times more abundant in pure MGC than in retinal cells respectively, whereas there was no difference in the amount of housekeeping gene beta-actin mRNA between the two types of cultures. We quantified the glial glutamate transporter GLAST and the photoreceptor-specific gene ABCR to assess the quality of our cultures. GLAST mRNA was 8.7 times more abundant in MGC cultures than in retinal cell cultures. By contrast, ABCR mRNA expression was only detected in retinal cell cultures, thus confirming the purity of our MGC cultures. The comparison of GFRalpha-1 and GLAST mRNA expression ratios between MGC and mixed retinal cells suggests that GFRalpha-1 is not exclusively, like GLAST, but predominantly expressed in MGC whereas Ret is more widely distributed in retinal cells including MGC.

Exogenous administration of GDNF enhances GLAST expression

Since retinal MGC express GDNF receptors (Figure 1) and GDNF up-regulates the expression of the glial glutamate transporter GLAST in the brain [24] and in a model of glaucoma [25], we next investigated whether exogenous GDNF could modulate GLAST expression by MGC in the *rd1* retina. The effect of GDNF on GLAST mRNA expression was first studied in vitro in pure MGC cultures. MGC cultures were treated with or without GDNF for 24 hours. RNAs were then extracted and GLAST mRNA levels were analyzed by real-time RT-PCR. Figure 2 shows that GDNF-treated MGC express 5.5 times more GLAST mRNA than do untreated MGC (± 1.8 SEM, $n = 3$, $p < 0.05$).

To further confirm that GDNF up-regulates GLAST expression, we studied GLAST protein levels in retinal organ cultures and in vivo, in the presence and absence of GDNF. As previously reported [46-48], GLAST immunoblots showed different immunoreactive bands corresponding to monomeric (~76kDa) and multimeric forms (~160kDa) of GLAST. Figure 3A illustrates that GDNF treatment increased GLAST protein expression in *rd1* retinal organ

cultures. Densitometric analysis of band intensities (monomeric + multimeric forms) revealed that GLAST protein levels were 1.48-fold higher in GDNF-treated explants than in paired controls (± 0.1 SEM, $n = 6$, $p < 0.005$, Figure 3C). GLAST expression levels were measured in vivo after subretinal injection of either GDNF or PBS. Immunoblot analyses confirmed the GDNF-induced increase in GLAST (Figure 3B). Figure 3C illustrates that, on average, 1.25 times more GLAST was present in *rd1* GDNF-injected eyes than in controls (± 0.02 SEM, $n = 6$, $p < 0.0005$).

Immunoreactivity experiments have shown that GLAST is present on MGC membranes and processes throughout the whole retina, with more intense labeling in both the outer limiting membrane and the outer plexiform layer [26,27]. Immunohistochemical analyses of *rd1* mice after in vivo subretinal injection of either GDNF or PBS showed a similar immunoreactivity across the whole retina corresponding to MGC (Figures 3E and 3G) [26,27]. However, both in GDNF- and PBS-treated eyes, the staining appeared more intense in the outer nuclear layer around the degenerating photoreceptors (Figures 3E and 3G). In addition, GDNF injection increased GLAST labeling throughout the whole tissue, with more conspicuous labeling around the degenerating photoreceptors. Because of the resolution limit in confocal microscopy, we could not determine whether the observed increase in GLAST labeling was located at the membrane or in the cytoplasm (reticulum).

Our data show that GDNF up-regulates GLAST expression in MGC cultures, in retinal organ cultures and in vivo, particularly around photoreceptors.

GDNF-induced up-regulation of GLAST does not significantly modify free glutamate and glutamine levels in the degenerating *rd1* retina

We demonstrated, in a parallel work, that free glutamate level increases during rod

degeneration in the *rdl* retina and is toxic to rods [Delyfer et al., submitted]. In the present study, we showed that neuroprotective GDNF enhances GLAST expression particularly around photoreceptors (Figures 2 and 3). Hence we next investigated whether GDNF treatment could decrease glutamate level in *rdl* retinas and, at the same time, increase the level of one of its metabolite: glutamine. Subretinal injections of GDNF or PBS were performed on 15-day-old and 21-day-old *rdl* mice. Retinal amino acid levels were measured 48 hours after injection. Figure 4 shows that neither at PN15 nor at PN21 did GDNF treatment significantly modify free glutamate and glutamine levels.

DISCUSSION

Our results can be summarized as follows: (1) in the *rdl* retina, GDNF receptor mRNAs do not decrease during photoreceptor degeneration and are expressed by MGC. (2) GDNF application to MGC cultures, *rdl* mouse retinal explants and in vivo *rdl* mouse retinas enhances the expression of GLAST, GLAST protein expression in MGC being particularly increased around degenerative photoreceptors. (3) Free glutamate and glutamine levels in the *rdl* retina are not significantly modified by exogenous GDNF.

A potential indirect neuroprotective pathway for GDNF

In the retina, we demonstrated that exogenous GDNF induces histological and, more importantly, functional protection of photoreceptors in the *rdl* mouse [8], as documented since then in other models of photoreceptor degeneration [9-11]. The mechanisms underlying GDNF neuroprotection remain unknown. In vitro, a direct survival-promoting effect on newborn rodent photoreceptors was observed [16-17]. Now, several arguments support the hypothesis that GDNF exerts its trophic effect on photoreceptors in the *rdl* mouse also indirectly through activation of intermediate MGC.

First, our results indicate that GDNF receptors – GFRalpha-1 and Ret – are not exclusively expressed by the degenerating photoreceptor cells in the *rdl* retina since both GFRalpha-1 and Ret mRNA expressions in vivo are not reduced by photoreceptor degeneration (Figures 1C and 1D). Ret mRNA expression, on the one hand, is not altered by the degeneration process in accordance with its immunohistochemical localization in the whole retina [49]. GFRalpha-1

localization in the retina, on the other hand, is still a matter of debate. Conflicting data have been reported, GFRalpha-1 has been localized in MGC, in the inner plexiform layer and retinal ganglion layer, with a weak staining also being observed in photoreceptor outer segments by some authors [50] or restricted to the outer nuclear layer by others [19,20]. Such discrepancies in immunohistochemical observations might come from the use of different antibodies. Here our results demonstrate that GFRalpha-1 mRNA expression does not decrease as one could have expected if its expression had been restricted to photoreceptors, but, on the contrary, increases in the *rdl* mouse retina during and after complete rod degeneration (Figure 1C). This implies that GFRalpha-1 mRNA is not exclusively expressed by photoreceptor cells, at least in the degenerative retina.

Secondly, our comparative in vitro experiments further demonstrate that GFRalpha-1 mRNA is predominantly expressed by MGC, whereas Ret mRNA is more widely distributed among cultured retinal cells (Figure 1F).

Therefore, all our observations suggest that GDNF could exert its trophic effect on photoreceptors in the *rdl* mouse retina through an indirect pathway via MGC.

The presence of GDNF receptors in MGC is further supported by the GDNF-induced changes in these cells. For instance, we have previously demonstrated that subretinal injection of GDNF increases glial fibrillar acidic protein (GFAP) immunoreactivity – a MGC marker – in the *rdl* mouse, thus implying that MGC are activated after GDNF treatment [8]. GDNF also stimulates the expression of endogenous trophic factors in MGC cultures [20]. Here we further confirm the glial activation by demonstrating a GDNF-elicited increase in GLAST protein surrounding degenerating photoreceptors in the *rdl* retina (Figures 2 and 3).

Does neuroprotective GDNF promote endogenous anti-excitotoxic mechanisms?

We demonstrated, in a parallel work, that glutamate-mediated excitotoxic mechanisms occur in the degenerating *rdl* retina and contribute to rod cell death [Delyfer et al., submitted]. These results are in line with the data here reported.

First, Marco and collaborators observed that, in the striatum, injection of excitatory amino acids: i) induced an early and transient increase of GDNF mRNA expression; ii) clearly up-regulated intrastriatal GFRalpha-1 mRNA; iii) and did not modify GFRalpha-2 mRNA levels [51]. As shown in Figures 1B, 1C and 1E, we obtained similar profiles of expression during the degenerative process. Hence, although endogenous GDNF was only moderately and transiently increased, our observations suggest that GDNF-activated pathways are up-regulated during photoreceptor degeneration in the *rdl* retina, possibly in relation to the alterations in glutamate metabolism we described [Delyfer et al., submitted].

Secondly, GLAST representing a key element in glutamate clearance, the observed up-regulation of GLAST following GDNF neuroprotective treatment (Figures 2 and 3) strengthened the hypothesis of a toxic glutamate increase during photoreceptor degeneration in the *rdl* mouse.

In the brain, GDNF is neuroprotective in both acute and chronic neurodegenerative disorders [52,53] including an excitotoxic model of Huntington's disease [21]. Therefore, it is worth investigating whether GDNF could exert its neuroprotective effect on photoreceptors in the *rdl* retina, at least partially, by promoting an endogenous anti-glutamate-mediated excitotoxic mechanism, i.e. an up-regulation of GLAST.

In order to determine whether GDNF promoted photoreceptor survival through such a mechanism, we next measured free amino acid levels in *rdl* retinas following GDNF- or PBS-treatment. As shown in Figure 4, we failed to demonstrate a significant modification of glutamate and glutamine levels in GDNF-treated retinas when compared to controls. Two main explanations can be put forward for such results. First, the up-regulation of GLAST may not be sufficient to prevent glutamate levels from raising. Second, our free amino acid measurements reflected both extra- and intra-cellular contents of whole *rdl* retinas, hence displacement of glutamate from one cellular compartment to another (i.e. from the extracellular environment of photoreceptors to the cytoplasm of MGC through GLAST) without metabolism of glutamate into glutamine by glutamine synthetase could not be

demonstrated. Thus, we could not formally establish nor rule out that glutamate levels were effectively modified around photoreceptors.

Our results altogether shed some light on the central role of MGC in the neuroprotective response linked to GDNF in the *rd1* retina. Numerous published studies have dealt with the identification of trophic factors promoting photoreceptor survival, but only few of them focused on the mechanisms underlying their neuroprotective effects. Undoubtedly, understanding of these mechanisms would lead to new pharmacological approaches in RP. Further work is certainly needed to better understand the mode of action of GDNF on glial and rod photoreceptor cells and to design refined pharmacological intervention in the rod degenerative process.

ACKNOWLEDGMENTS:

The authors thank Danièle Thiersé for technical assistance. They also thank Laura Menu-dit-Huart, Serge Picaud, Saddek Mohand-Said, Anne-Claire Fintz and David Hicks for helpful discussions.

M-ND was supported by the Fondation de France and Retina France. This work was also supported by the Institut National pour la Santé et la Recherche Médicale (INSERM), Louis Pasteur University (Strasbourg), Pierre et Marie Curie University (Paris VI), the French

Ministère des Sciences et des Technologies, the Fondation Bétancourt, the Fédération des Aveugles de France and the European Commission: PROAGERET (# QLK6-2001-00385) and PRORET (# QLK6-2001-00569).

Commercial interest: M.N. Delyfer, None; M. Simonutti, None; N. Neveux, None; T. Léveillard, None; J.A. Sahel, None.

REFERENCES:

Bowes C, Li T, Dancinger M, Baxter LC, Applebury ML, Farber DB. Retinal degeneration in the rd mouse is caused by a defect in the beta subunit of rod cGMP-phosphodiesterase. *Nature* 1990; 347:677-80.

McLaughlin ME, Sandberg MA, Berson EL, Dryja TP. Recessive mutations in the gene encoding the beta-subunit of rod phosphodiesterase in patients with retinitis pigmentosa. *Nat Genet.* 1993; 4:130-4.

Faktorovich EG, Steinberg RH, Yasumura D, Matthes MT, LaVail MM. Photoreceptor degeneration in inherited retinal dystrophy delayed by basic fibroblast growth factor. *Nature* 1990; 347:83-6.

Faktorovich EG, Steinberg RH, Yasumura D, Matthes MT, LaVail MM. Basic fibroblast growth factor and local injury protect photoreceptors from light damage in the rat. *J Neurosci* 1992; 12:3554-67.

LaVail MM, Unoki K, Yasumura D, Matthes MT, Yancopoulos GD, Steinberg RH. Multiple growth factors, cytokines, and neurotrophins rescue photoreceptors from the damaging effects of constant light. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89:11249-53.

LaVail MM, Yasumura D, Matthes MT, Lau-Villacorta C, Unoki K, Sung CH, Steinberg RH. Protection of mouse photoreceptors by survival factors in retinal degenerations. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998; 39:592-602.

Hims MM, Diager SP, Inglehearn CF. Retinitis pigmentosa: genes, proteins and prospects. *Dev Ophthalmol* 2003; 37:109-25.

Frasson M, Picaud S, Leveillard T, Simonutti M, Mohand-Said S, Dreyfus H, Hicks D, Sahel J. Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor induces histological and functional protection of rod photoreceptors in the rd/rd mouse. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999; 40:2724-34.

McGee Sanftner LH, Abel H, Hauswirth WW, Flannery JG. Glial cell line derived neurotrophic factor delays photoreceptor degeneration in a transgenic rat model of retinitis pigmentosa. *Mol Ther* 2001; 4:622-9.

Wu WC, Lai CC, Chen SL, Xiao X, Chen TL, Tsai RJ, Kuo SW, Tsao YP. Gene therapy for detached retina by adeno-associated virus vector expressing glial cell line-derived neurotrophic factor. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002; 43:3480-8.

Lawrence JM, Keegan DJ, Muir EM, Coffey PJ, Rogers JH, Wilby MJ, Fawcett JW, Lund RD. Transplantation of Schwann cell line clones secreting GDNF or BDNF into the retinas of dystrophic Royal College of Surgeons rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004; 45:267-74.

Wahlin KJ, Campochiaro PA, Zack DJ, Adler R. Neurotrophic factors cause activation of intracellular signaling pathways in Muller cells and other cells of the inner retina, but not photoreceptors. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000; 41:927-36.

Wahlin KJ, Adler R, Zack DJ, Campochiaro PA. Neurotrophic signaling in normal and degenerating rodent retinas. *Exp Eye Res* 2001; 73:693-701.

Zack DJ. Neurotrophic rescue of photoreceptors: are Muller cells the mediators of survival? *Neuron* 2000; 26:285-6.

Harada T, Harada C, Nakayama N, Okuyama S, Yoshida K, Kohsaka S, Matsuda H, Wada K. Modification of glial-neuronal cell interactions prevents photoreceptors apoptosis during light-induced retinal degeneration. *Neuron* 2000; 26:533-41.

Jing S, Wen D, Yu Y, Holst PL, Luo Y, Fang M, Tamir R, Antonio L, Hu Z, Cupples R, Louis JC, Hu S, Altrock BW, Fox GM. GDNF-induced activation of the Ret protein kinase is mediated by GDNFR- α , a novel receptor for GDNF. *Cell* 1996; 85:1113-24.

Politi LE, Rotstein NP, Carri NG. Effect of GDNF on neuroblast proliferation and photoreceptor survival: additive protection with docosahexaenoic acid. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001; 42:3008-15.

Carwile ME, Culbert RB, Sturdivant RL, Kraft TW. Rod outer segment maintenance is enhanced in the presence of bFGF, CNTF and GDNF. *Exp Eye Res* 1998; 66:791-805.

Harada T, Harada C, Kohsaka S, Wada E, Yoshida K, Ohno S, Mamada H, Tanaka K, Parada LF, Wada K. Microglia-Muller glia cell interactions control neurotrophic factor production during light-induced retinal degeneration. *J Neurosci* 2002; 22:9228-36.

Harada C, Harada T, Quah HM, Maekawa F, Yoshida K, Ohno S, Wada K, Parada LF, Tanaka K. Potential role of glial cell line-derived neurotrophic factor receptors in Muller glial cells during light-induced retinal degeneration. *Neuroscience* 2003; 122:229-35.

Alberch J, Perez-Navarro E, Canals JM. Neuroprotection by neurotrophins and GDNF family members in the excitotoxic model of Huntington's disease. *Brain Res Bull* 2002; 57:817-22.

Wu WC, Lai CC, Chen SL, Sun MH, Xiao X, Chen TL, Tsai RJ, Kuo SW, Tsao YP. GDNF gene therapy attenuates retinal ischemic injuries in rats. *Mol Vis* 2004; 10:93-102.

Coccia C, Ganel R, Rothstein JD. GDNF induces an increase in EAAT2 (GLT-1) expression. Annual Meeting of the Society for Neuroscience; October 1999; Miami Beach, FLA.

Bonde C, Sarup A, Schousboe A, Gegelashvili G, Noraberg J, Zimmer J. GDNF pre-treatment aggravates neuronal cell loss in oxygen-glucose deprived hippocampal slice cultures: a possible effect of glutamate transporter up-regulation. *Neurochem Int* 2003; 43:381-8.

Naskar R, Vorwerk CK, Dreyer EB. Concurrent downregulation of a glutamate transporter and receptor in glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000; 41:1940-4.

Derouiche A, Rauen T. Coincidence of L-glutamate/L-aspartate transporter (GLAST) and glutamine synthetase (GS) immunoreactions in retinal glia: evidence for coupling of GLAST and GS in transmitter clearance. *J Neurosci Res* 1995; 42:131-43.

Rauen T, Taylor WR, Kuhlbrodt K, Wiessner M. High-affinity glutamate transporters in the rat retina: a major role of the glial glutamate transporter GLAST-1 in transmitter clearance. *Cell Tissue Res* 1998; 291:19-31.

Harada T, Harada C, Watanabe M, Inoue Y, Sakagawa T, Nakayama N, Sasaki S, Okuyama S, Watase K, Wada K, Tanaka K. Functions of the two glutamate transporters GLAST and GLT-1 in the retina. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95:4663-6.

Izumi Y, Shimamoto K, Benz AM, Hammerman SB, Olney JW, Zorumski CF. Glutamate transporters and retinal excitotoxicity. *Glia* 2002; 39:58-68.

Hicks D, Courtois Y. The growth and behaviour of rat retinal Muller cells in vitro: an improved method for isolation and culture. *Exp Eye Res* 1990; 51:119-29.

Phelan JK, Bok D. Analysis and quantitation of mRNAs encoding the alpha- and beta-subunits of rod photoreceptor cGMP phosphodiesterase in neonatal retinal degeneration (rd) mouse retinas. *Exp Eye Res* 2000; 71:119-128.

Fintz AC, Audo I, Hicks D, Mohand-Said S, Leveillard T, Sahel J. Partial characterization of retina-derived cone neuroprotection in two culture models of photoreceptor degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003; 44:818-25.

Glissin V, Crkvenjakov R, Byus C. Ribonucleic acid isolated by cesium chloride centrifugation. *Biochemistry* 1974; 13:2633-7.

Farber DB, Flannery JG, Bowes-Rickman C. The *rd* mouse story: Seventy years of research on an animal model of inherited retinal degeneration. *Prog Retin Eye Res* 1994; 13:31-64.

Lasansky A, DeRobertis E. Submicroscopic analysis of the genetic dystrophy of visual cells in C3H mice. *J Biophys Biochem Cytol* 1960; 7:679-694.

Shiose Y, Sonohara O. Studies on retinitis pigmentosa. XXVI. Electron microscopic aspects of early retinal changes in inherited dystrophic mice. *Nippon Ganka Gakkai Zasshi* 1968; 72:1127-41.

Caley DW, Johnson C, Liebelt RA. The postnatal development of the retina in the normal and rodless CBA mouse: a light and electron microscopic study. *Am J Anat* 1972; 133:179-212.

Blanks JC, Adinolfi AM, Lolley RN. Photoreceptor degeneration and synaptogenesis in retinal-degenerative (rd) mice. *J Comp Neurol* 1974; 156:95-106.

Carter-Dawson LD, LaVail MM, Sidman RL. Differential effect of the rd mutation on rods and cones in the mouse retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1978; 17:489-98.

Treanor JJ, Goodman L, de Sauvage F, Stone DM, Poulsen KT, Beck CD, Gray C, Armanini MP, Pollock RA, Hefti F, Phillips HS, Goddard A, Moore MW, Buj-Bello A, Davies AM, Asai N, Takahashi M, Vandlen R, Henderson CE, Rosenthal A. Characterization of a multicomponent receptor for GDNF. *Nature* 1996; 382:80-3.

Durbec P, Marcos-Gutierrez CV, Kilkenny C, Grigoriou M, Wartiovaara K, Suvanto P, Smith D, Ponder B, Costantini F, Saarma M, et al. GDNF signaling through the Ret receptor Tyrosine Kinase. *Nature* 1996; 381:789-93.

Trupp M, Arenas E, Fainzilber M, Nilsson AS, Sieber BA, Grigoriou M, Kilkenny C, Salazar-Gruoso E, Pachnis V, Arumae U. Functional receptor for GDNF encoded by the c-ret proto-oncogene. *Nature* 1996; 381:785-8.

Jing S, Yu Y, Fang M, Hu Z, Holst PL, Boone T, Delaney J, Schultz H, Zhou R, Fox GM. GFRalpha-2 and GFRalpha-3 are two new receptors for ligands of the GDNF family. *J Biol Chem* 1997; 272:33111-7.

GFRalpha Nomenclature Committee. Nomenclature of GPI-linked receptors for the GDNF ligand family. *Neuron* 1997; 19:485.

Baloh RH, Enomoto H, Johnson EM Jr, Milbrandt J. The GDNF family ligands and receptors - implications for neural development. *Curr Opin Neurobiol* 2000; 10:103-10.

Haugeto O, Ullensvang K, Levy LM, Chaudhry FA, Honore T, Nielsen M, Lehre KP, Danbolt NC. Brain glutamate transporter proteins form homomultimers. *J Biol Chem* 1996; 271:27715-22.

Furuta A, Rothstein JD, Martin LJ. Glutamate transporter protein subtypes are expressed differentially during rat CNS development. *J Neurosci* 1997; 17:8363-75.

Duan S, Anderson CM, Stein BA, Swanson RA. Glutamate induces rapid upregulation of astrocyte glutamate transport and cell-surface expression of GLAST. *J Neurosci* 1999; 19:10193-200.

Jomary C, Thomas M, Grist J, Milbrandt J, Neal MJ, Jones SE. Expression patterns of neurturin and its receptor components in developing and degenerative mouse retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999; 40:568-74.

Koeberle PD, Ball AK. Neurturin enhances the survival of axotomized retinal ganglion cells in vivo: combined effects with glial cell line-derived neurotrophic factor and brain-derived neurotrophic factor. *Neuroscience* 2002; 110:555-67.

Marco S, Canudas AM, Canals JM, Gavalda N, Perez-Navarro E, Alberch J. Excitatory amino acids differentially regulate the expression of GDNF, neurturin, and their receptors in the adult rat striatum. *Exp Neurol* 2002; 174:243-52.

Cunningham LA, Su C. Astrocyte delivery of glial cell line-derived neurotrophic factor in a mouse model of Parkinson's disease. *Exp Neurol* 2002; 174:230-42.

Nicole O, Ali C, Docagne F, Plawinski L, MacKenzie ET, Vivien D, Buisson A. Neuroprotection mediated by glial cell line-derived neurotrophic factor: involvement of a reduction of NMDA-induced calcium influx by the mitogen-activated protein kinase pathway. *J Neurosci* 2001; 21:3024-33.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Rod arrestin, GDNF, GFRalpha-1, Ret and GFRalpha-2 mRNA expressions in the *rdl* retina. In vivo study of rod arrestin (**A**), GDNF (**B**), GFRalpha-1 (**C**), Ret (**D**) and GFRalpha-2 (**E**) mRNA expressions in *rdl* and wild-type retinas during rod degeneration (PN8, PN15 and PN35). Semi-quantitative analyses of rod arrestin (**A**), GDNF (**B**),

GFRalpha-1 (C), Ret (D) and GFRalpha-2 (E) mRNA expressions were performed using real-time RT-PCR. Data are presented as the mean \pm SEM of triplicate determinations

. F: Gel electrophoresis of PCR products after amplification of first-strand cDNA from pure Müller glial cell (MGC) cultures and mixed retinal cell cultures: beta-actin (296bp), GLAST (287bp), ABCR (355bp), Ret (403bp) and GFRalpha-1 (535bp). Results are representative of three experiments.

Figure 2. GLAST mRNA expression in Müller glial cell (MGC) cultures treated with GDNF. GLAST mRNA levels were studied in MGC cultures in the presence and absence of GDNF using real-time RT-PCR. Data are presented as the mean \pm SEM of three independent experiments ($^{\circ}$ $p < 0.05$, $n = 3$

).

Figure 3. Immunoblot and immunohistochemical analyses of GLAST protein expression in *rd1* mouse retinas in the presence and absence of GDNF. A-B: GLAST protein levels were studied in retinal organ cultures (A) and in vivo (B) in the presence and absence of GDNF. Western blots of total proteins (10 μ g/lane) prepared from retinas 48 hours after treatment with either GDNF or PBS, were probed with anti-GLAST. The blots demonstrated one band at \sim 76kDa (GLAST monomeric form, 3) and two bands at \sim 160kDa (GLAST multimeric forms, 1 and 2). C: GLAST protein was 1.48 times more abundant in GDNF-treated retinal organ cultures than in controls ($n = 6$). In vivo, GLAST protein was 1.25 times more abundant in GDNF-injected retinas than in controls ($n = 6$). Data are presented as the mean \pm SEM of the values obtained in three independent experiments ($^{\circ\circ}$ $p < 0.005$, $^{\circ\circ\circ}$ $p < 0.0005$). D-G: Transverse sections of a PBS-injected eye (D: Nomarski; E: immunostaining with anti-GLAST antibody) and a GDNF-injected eye (F: Nomarski; G: immunostaining with anti-GLAST antibody) of the same *rd1* mouse were examined with a confocal microscope. Sections were analyzed using the same parameters and exposure times. Pictures were always

taken at the same distance from the optic nerve. Due to photoreceptor degeneration, the ONL is no longer composed of one or two layers of photoreceptors. Pictures are representative of four independent experiments with similar results. ONL, outer nuclear layer; OPL, outer plexiform layer; INL, inner nuclear layer; IPL, inner plexiform layer and GCL, ganglion cell layer. Scale bar, 20 μ m.

Figure 4. Free glutamate and glutamine levels in *rd1* and control retinas after subretinal injection of GDNF or PBS. Free glutamate (**A**) and glutamine (**B**) levels were measured in *rd1* and control retinas at PN15 and PN21, 48 hours after subretinal injection of either GDNF or PBS. Concentrations of each amino acid are expressed, as a percentage, with respect to the sum of all the concentrations of the amino acids quantified by the analyzer. Data are presented as the mean \pm SEM (n = 11 for each age and strain).

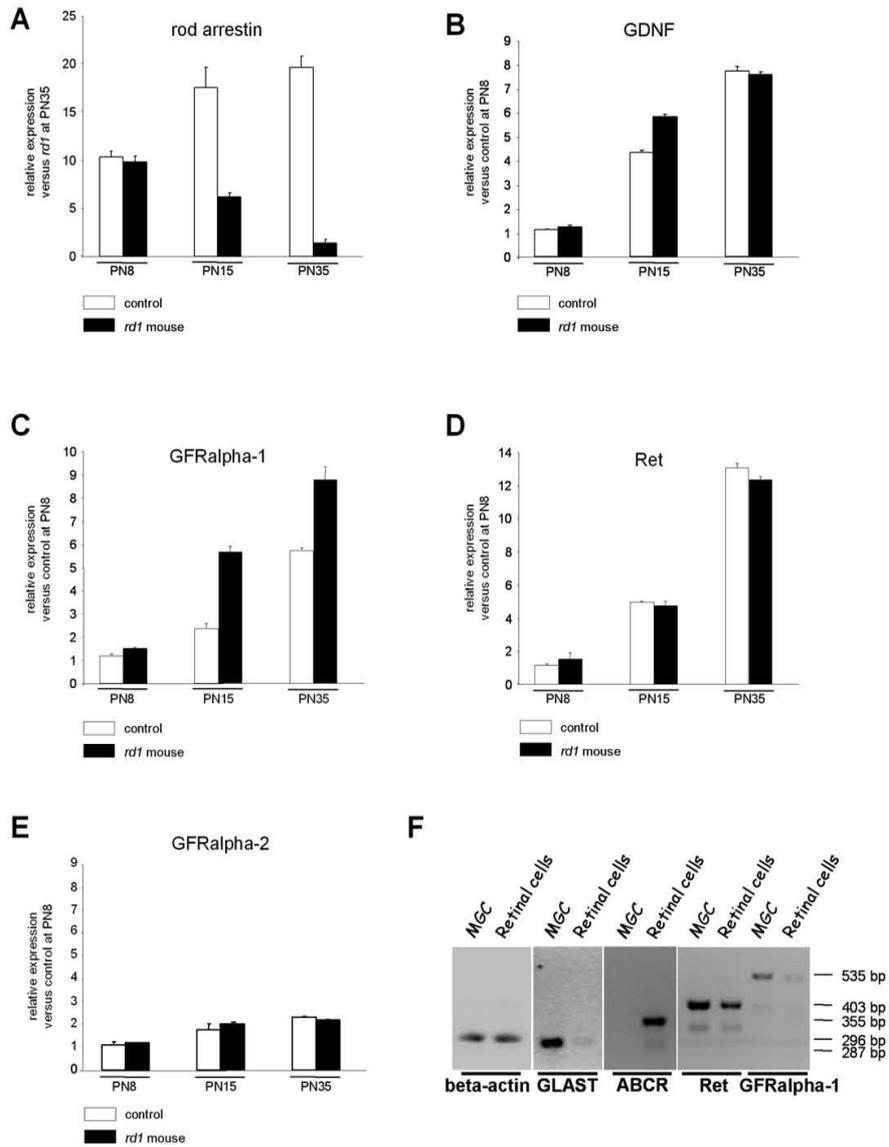


Figure 1.

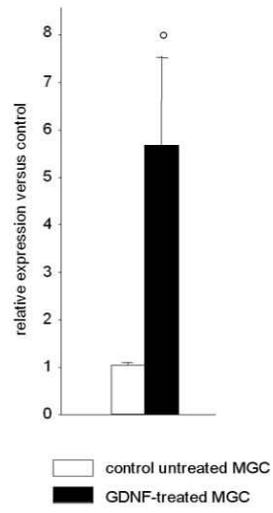


Figure 2.

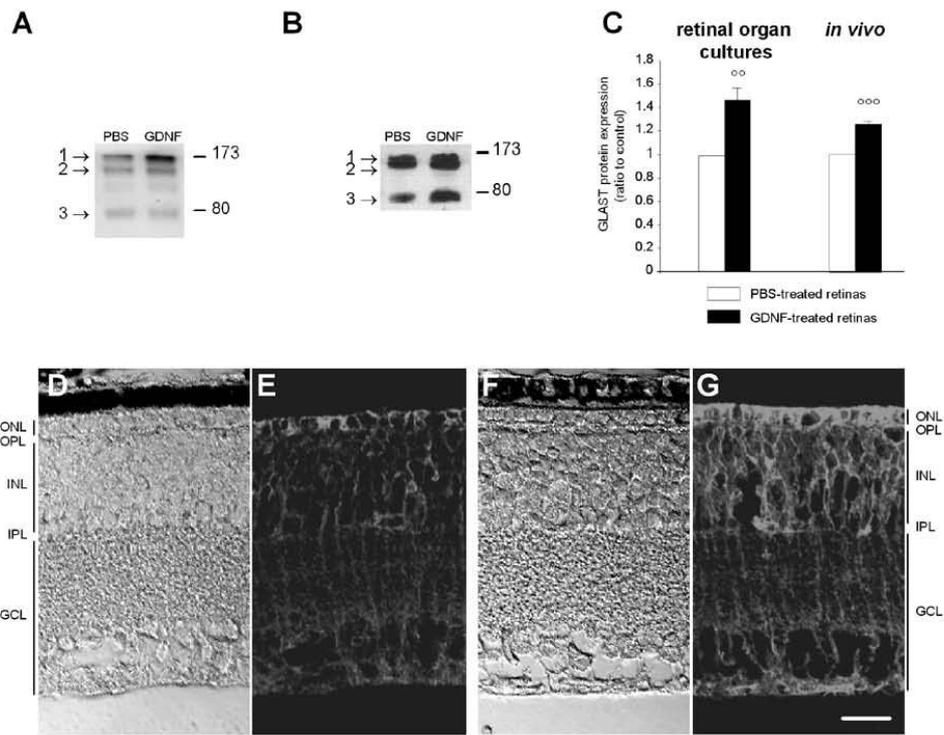


Figure 3.

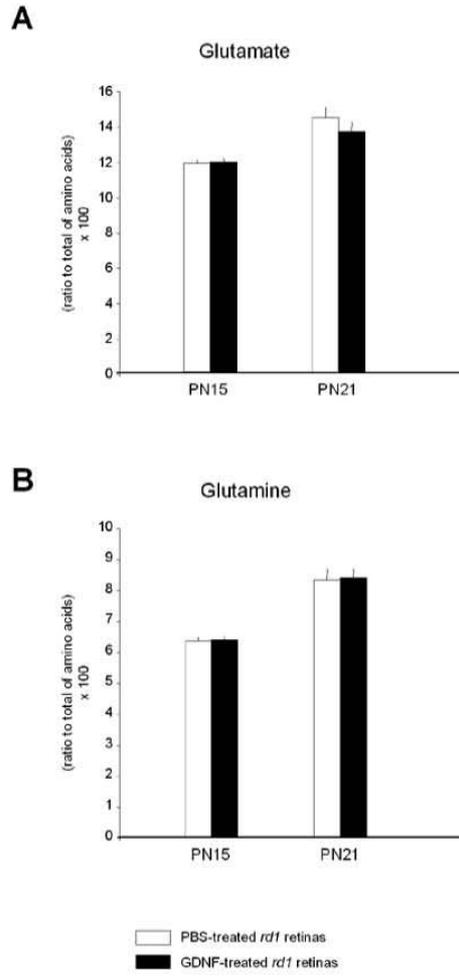


Figure 4.

TABLE 1.

This table lists all the oligonucleotides used for RT-PCR in this study, together with the corresponding annealing temperatures, PCR product lengths and Genbank accession numbers.

Table 1. Oligonucleotides used for RT-PCR

	Forward (1) and reverse (2) primer sequences	Annealing temperature (°C)	Product length (bp)	Accession number (GenBank®)	Application
ABCR	1: ACTTCACCTCTACCTACCACAC 2: GAACAACCTTCACCACCAAGCC	57	355	AF000149	Standard RT-PCR (Figure 1F)
beta-actin	1: AAAGACCTCTATGCCAACACAG 2: AAAGAAAGGGTGTAACGCGAG	57	296	M12481	Standard et real time RT-PCR (Figure 1F)
GDNF	1: ACCAGATAAACAAGCGGCAG 2: TCAGATACATCCACACCGTTTAG	60	402	XM122804	Real time RT-PCR (Figure 1A)
GFRalpha-1	1: GCAAGGAAACCAACTTCAGC 2: TCGTATGGGGAATCTTCCAG	54	202	AF014117	Real time RT-PCR (Figure 1C)
GFRalpha-1	1: GAAGATTCCCACATACGAGCC 2: TGCCAATCAGTCCCAGTAG	60	535	AF014117	Standard RT-PCR (Figure 1F)

GFRalpha-2	1: CCTGAACGACAACCTGCAAGA 2: CAGTTGGGCTTCTCCTTGTC	50	246	AF002701	Real time RT-PCR (Figure 1E)
GLAST	1: GAAGGGGAGGCAACCTGAAATGAG 2: AAGGGGGAGTGGGAAAATGAAAA	56	287	D63816	Standard RT-PCR (Figure 1F)
GLAST	1: GAAGTCTCCCAGACGTTCTAATCC 2: GCTCTGAAACCGCCACTTACTATC	58	303	D63816	Real time RT-PCR (Figure 2)
Ret	1: ATCCACACCTTCGGACTCAC 2: AACCCAGTGCTAGTGCCATC	54	201	AF209436	Real time RT-PCR (Figure 1D)
Ret	1: AGTATGCCAAGTATGGCTCTCTG 2: ACTCCAAAGGACCACACATCAC	60	403	AF209436	Standard RT-PCR (Figure 1F)
Rod arrestin	1: CTATTACGTCAAGCCTGTAGCC 2: CATCCTCATCTTTCTTCCCTTC	56	434	M24086	Real time RT-PCR (Figure 1B)

Résumé

Les rétinopathies pigmentaires (RP) regroupent un ensemble hétérogène d'affections rétiniennes dégénératives héréditaires, caractérisées par la mort progressive des photorécepteurs, les bâtonnets et les cônes. Cette dégénérescence conduit à une perte irréversible de la fonction visuelle. Les RP représentent la principale cause de cécité d'origine héréditaire dans les pays industrialisés affectant environ 1 personne sur 3 500.

La souris *rd1* est un modèle de RP adapté pour l'étude des phénomènes cellulaires et moléculaires qui concourent à la mort des photorécepteurs ainsi que pour évaluer de nouvelles pistes thérapeutiques car elle présente une mutation sur le gène codant pour la sous-unité beta de la phosphodiesterase GMPc-dépendante (Pde6b) comme certains patients et ses photorécepteurs ont une cinétique de dégénérescence proche de celle observée en pathologie humaine. Notre travail a consisté à explorer une hypothèse physiopathogénique : « *le glutamate participe-t-il au processus de dégénérescence des bâtonnets ?* », puis, comme il a été démontré que GDNF exerce un effet neuroprotecteur vis-à-vis des photorécepteurs, nous avons étudié une hypothèse concernant le mécanisme de l'action de GDNF : « *GDNF module-t-il les mécanismes endogènes de défense contre la toxicité médiée par le glutamate ?* ».

Nos résultats démontrent que, chez la souris *rd1*, il existe au cours de la dégénérescence une augmentation des niveaux intra-rétiniens de glutamate stimulant les mécanismes de défense endogènes contre l'excito-toxicité : le transporteur glial du glutamate GLAST et la glutamine synthétase. En dépit de ces mécanismes de défense, les niveaux de glutamate restent élevés et accélèrent la perte des bâtonnets. L'administration d'antagonistes glutamatergiques de type AMPA/kainate permet de ralentir significativement cette dégénérescence.

Par ailleurs, nous montrons que les messagers codant pour les récepteurs de GDNF sont exprimés par les cellules gliales de Müller (CGM), suggérant qu'un mécanisme neuroprotecteur indirect est possible. Au niveau des CGM, GDNF induit la régulation positive de GLAST *in vitro*, *ex vivo* et *in vivo*, particulièrement autour des photorécepteurs en dégénérescence.

L'existence de phénomènes excito-toxiques concourant à la mort des bâtonnets d'une part, et la stimulation par GDNF de l'expression de GLAST d'autre part, suggèrent que GDNF pourrait exercer indirectement son action neuroprotectrice vis-à-vis des photorécepteurs via la régulation positive de GLAST.

Abstract

Retinitis pigmentosa (RP) is a heterogeneous group of inherited retinal degenerative diseases, characterized by the progressive death of rod and cone photoreceptors leading to an irreversible loss of visual function. RP is the main cause of inherited blindness in the developed world and occurs approximately in 1 in 3,500 individuals.

The retinal degeneration (*rd1*) mouse is an appropriate model for studying the cellular and molecular events leading to photoreceptor death and for evaluating new treatments as the pattern of photoreceptor loss is similar to that in affected humans and because the mutated gene encodes rod cGMP-phosphodiesterase (Pde6b) as in some affected human families. The aim of our work was to test two main hypotheses on this model: i) "*Does glutamate take part to the degenerative process of rods?*" and, since GDNF has previously been demonstrated to promote photoreceptor survival, ii) "*Does GDNF exert its neuroprotective effect on photoreceptors by modulating anti-excitotoxic mechanisms?*"

Our data demonstrate that, in the *rd1* mouse, gradual increases in glutamate levels are observed during photoreceptor degeneration and strengthen endogenous mechanisms against excitotoxicity, i.e. the expression of the glial glutamate transporter GLAST and of glutamine synthetase (GS). Despite the upregulation of GLAST and GS, glutamate levels remain high, thereby accelerating rod cell degeneration. Administration of an AMPA/kainate-type glutamate receptor antagonist induces a statistically significant morphological rescue of rods.

We further show that mRNA expression levels of GDNF receptors are expressed by Muller glial cells (MGC), suggesting that GDNF neuroprotective effect on photoreceptors can be mediated through these cells. At MGC level, GDNF application enhances the expression of GLAST *in vitro*, *ex vivo* and *in vivo*, and more particularly around the degenerating photoreceptors.

The occurrence of excitotoxic phenomena contributing to rod loss together with GDNF-induced upregulation of GLAST suggest that GDNF could exert its neuroprotective effect on photoreceptors indirectly via GLAST.