

Université Louis Pasteur de Strasbourg

Discipline: Sciences du vivant

Option: Aspects moléculaires et cellulaires de la Biologie

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

Présentée par

Patrice FORT

Rôle de la Dystrophine Dp71 dans l'œil : Impacts phénotypiques

Soutenance le 1^{er} juillet 2005 devant le jury composé de :

Pr. Philippe POINDRON

Rapporteur interne

Pr. Jamel CHELLY

Rapporteur externe

Pr. Alain GAUDRIC

Rapporteur externe

Pr. Andreas REICHENBACH

Examineur

Dr Alvaro RENDON

Directeur de thèse

Liste des abréviations

DMD	dystrophie musculaire de Duchenne	
ADN	acide désoxyribonucléique	
kb	kilobases	
kDa	kilodalton	
Dp	dystrophin protein	
ABS	actin binding site	site de liaison à l'actine
CaMBS	calmodulin binding site	site de liaison à la calmoduline
CC	coiled-coiled	
DRP	dystrophin related protein	
Up	utrophin protein	
DGC	dystrophin glycoprotein complex	complexe glycoprotéique associé aux dystrophines
MEC	matrice extracellulaire	
nNOS	neuronal nitric oxide synthase	monoxyde d'azote synthétase de type neuronale
DAPs	dystrophin associated proteins	protéines associées aux dystrophines
SNC	système nerveux central	
QI	quotient intellectuel	
LTP	long term potentiation	potentialisation à long terme
STP	short term potentiation	potentialisation à court terme
STD	short term depression	dépression à court terme
GABA	γ -aminobutyric acid	
PSD	post synaptic density	densité post synaptique
PH	pleckstrin homology	homologie à la pleckstrine
SU	syntrophin unique	spécifique des syntrophines
PDZ	PSD95/SAP90 DLG ZO1	
MAGUK	membrane associated guanylate kinase	guanylate kinase associées à la membrane
AQP4	aquaporin 4	aquaporine 4
BBB	blood brain barrier	barrière hémato-encéphalique
ZO	zonula occludens	
OAP	orthogonale arrays of particles	
MCT	monocarboxylate transporter	transporteurs de monocarboxylates
ATP	adénosine triphosphate	
ERG	électrorétinogramme	
CGM	cellule gliale de Müller	
DFN4	deafness 4	
EPR	épithélium pigmentaire rétinien	
MLE	membrane limitante externe	
CNE	couche nucléaire externe	
CPE	couche plexiforme externe	
CNI	couche nucléaire interne	
CPI	couche plexiforme interne	
CG	couche des cellules ganglionnaires	
FN	fibres nerveuses	
MLI	membrane limitante interne	
VGAT	transporteurs vésiculaires spécifiques du GABA	
VIAAT	transporteurs vésiculaires spécifiques des acides aminés inhibiteurs	
SG	sarcoglycane	
SSPN	sarcospane	
LGMD	dystrophie musculaire autosomale récessive	
MDS	syndrome myoclonus-dystonia	
PBS	phosphate buffer saline	
AQP0	aquaporine	

I- Préface	4
II- La Dystrophie Musculaire de Duchenne (DMD)	8
1) Historique	8
2) L'origine génétique	8
A) Localisation du gène	8
B) Isolement et clonage du gène	9
3) La superfamille des dystrophines	9
A) La dystrophine ou Dp427	9
1) Structure des dystrophines	10
2) Expression et localisation des dystrophines	12
B) Les produits courts du gène DMD	12
1) La Dp260	13
2) La Dp140	13
3) La Dp116	13
4) La Dp71	14
5) La Dp45	14
C) Les membres de la superfamille des dystrophines	14
1) L'utrophine ou DRP1	15
2) Les produits courts du gène UTRN	15
3) La DRP2	15
4) Les dystrobrevines	16
D) Epissages alternatifs	16
4) Phénotype musculaire	17
A) Description	17
B) Le complexe macromoléculaire lié à la dystrophine Dp427	18
1) Complexe dystroglycane	18
2) Complexe sarcoglycane-sarcospane	19
3) Les protéines cytoplasmiques	19
C) Rôle du complexe dystrophine-DAPs (dystrophin associated proteins)	20
1) Rôle structural	20
2) Rôle fonctionnel	20
3) Rôle métabolique	21
5) Phénotypes du Système Nerveux Central :	21
A) Troubles cognitifs et comportementaux	22
1) Description	22
2) Les complexes dystrophines-DAPs	24
a. Les protéines de la superfamille des dystrophines	24
b. Les DAPs	25
c. Les complexes	26
3) Hypothèses fonctionnelles	27
a. Dans les neurones	27
b. Dans les cellules gliales, astrocytes et oligodendrocytes	31
i) Maintien de la barrière hémato-encéphalique	31
ii) Régulation de l'homéostasie aqueuse et ionique	32
iii) Régulation du métabolisme des acides aminés neurotransmetteurs	33
iv) Soutien nutritionnel et énergétique des neurones	33
B) Troubles de la vision : phénotype ERG	34
1) Description	35
2) Complexe dystrophines-DAPs	35
3) Hypothèses fonctionnelles	36
a. Dans les neurones	36
b. Dans les cellules gliales de Müller	37
C) Troubles de l'audition	38
6) Autres phénotypes :	38
A) Troubles de la reproduction	39

1) Description	39
2) Complexe Dp71-DAPs	39
3) Hypothèse fonctionnelle	40
B) Rôle dans la réponse plaquettaire	41
1) Description	41
2) Complexe Dp71-DAPs	41
3) Hypothèse fonctionnelle	42
7) En résumé	42
III- L'œil	43
1) Présentation générale	43
2) La cornée	43
A) Anatomie (Figure 24)	44
1) L'épithélium	44
2) Le stroma	45
3) L'endothélium	45
B) Pathologies	46
3) L'humeur aqueuse	46
4) Le cristallin	46
A) Anatomie (Figure 26)	47
1) La capsule	47
2) L'épithélium cristallin	47
3) Les fibres cristalliniennes	48
B) Composition	49
C) En résumé	51
5) Le vitré	52
6) La rétine	52
A) Anatomie	53
1) Organisation structurale	53
2) Organisation cellulaire	54
a) Neurones	55
i) Les photorécepteurs	55
α) Les bâtonnets	55
β) Les cônes	55
ii) Les neurones secondaires	56
α) Les cellules bipolaires	56
β) Les cellules horizontales	57
γ) Les cellules amacrines	58
δ) Les cellules interplexiformes	58
iii) Les cellules ganglionnaires	58
b) Les cellules gliales	59
i) Les cellules gliales de Müller (CGM)	59
ii) Les astrocytes	60
iii) La microglie	60
B) Neurotransmission rétinienne et traitement de l'information	60
1) Les différentes composantes	60
a) Transmission verticale	60
b) Transmission horizontale	61
c) Modulations gliales	62
2) Méthodes de mesures : l'électrorétinogramme (ERG)	63
C) En résumé	64
IV- Résultats Personnels	65
1) Présentation générale	65

2) Objectif 1 : Rôle de la Dp71 dans la rétine	66
A) Situation du sujet	66
B) Résultats	67
C) Conclusions	68
Publication n°1 :	70
3) Objectif 2 : Complexe Dp71/DAPs dans la Cellule gliale de Müller	82
I. Caractérisation du complexe sarcoglycane/sarcospane dans la rétine	82
A) Situation du sujet	82
B) Résultats	83
C) Conclusions	83
Publication n°2 :	85
II. Résultats complémentaires : Caractérisation du complexe Dp71/DAPs dans les CGM	109
A) Situation du sujet	109
B) Méthodologie	109
1) Cellules fraîchement dissociées	110
2) Co-immunoprécipitation du complexe à partir des pieds des CGM	110
C) Résultats	111
D) Conclusions	112
4) Objectif 3 : Rôle de la Dp71 dans le cristallin.	113
A) Situation du sujet	113
B) Résultats	114
C) Conclusions	115
Publication n°3 :	116
V- Discussion	141
1) Phénotype ERG et Dp71	141
2) Phénomènes de compensations moléculaires autour de la Dp71	142
3) Interactions Dp71/Kir4.1 et Dp71/AQP4	143
4) Régulation de l'homéostasie rétinienne et Dp71	144
5) Fonctions alternatives de la Dp71 dans la CGM	146
6) Composition du complexe autour de la Dp71	147
a) Indépendance des sarcoglycanes et du sarcospan	147
b) Présentation et rôle des autres DAPs	150
7) Cristallin et Dp71	152
VI Perspectives	156
1) Mécanismes moléculaires de l'agrégation du complexe Dp71/DAPs responsables de la localisation des canaux Kir4.1 et AQP4	156
2) Le complexe utrophine/DAPs dans la CGM	157
3) Fonctions des sarcoglycanes dans la rétine	158
4) Le complexe Dp71/DAPs dans le cristallin	159
5) Fonction de la Dp260 et de la Dp140 dans le cristallin	160
6) Fonctions des dystrophines dans le cristallin chez l'homme	160
VII Bibliographie	<i>Erreur ! Signet non défini.</i>

I- Préface

La dystrophine ou Dp427 (dystrophin protein 427) est le produit long issu du gène DMD (Duchenne Muscular Dystrophy). Ce gène comporte de multiples promoteurs internes conduisant à l'expression de plusieurs produits, nommés en fonction de leur masse moléculaire déduite : Dp260, Dp140, Dp116, Dp71 et Dp45. Toutes ces protéines issues du même gène possèdent un patron d'expression variable en fonction des tissus et du développement.

Dans le muscle strié squelettique, la Dp427 est le seul produit du gène DMD exprimé. Son absence est responsable d'une dégénérescence musculaire progressive correspondant au premier phénotype décrit chez les patients atteints de dystrophie musculaire de Duchenne (DMD). De nombreuses études ont permis d'établir que la dystrophine participe à un complexe glycoprotéique appelé DGC, pour « dystrophin glycoprotein complex », composé des dystroglycanes, des sarcoglycanes, des syntrophines et des dystrobrevines. Ce complexe possède deux fonctions primordiales qui sont le maintien de la structure des fibres musculaires durant les cycles de contraction/relaxation, mais également la localisation et l'agrégation de protéines membranaires tels que les canaux sodiques, ou de protéines de signalisation comme la NO synthase.

La découverte de troubles cognitifs et comportementaux chez les patients DMD a conduit à la mise en évidence de l'expression de tous les produits du gène DMD dans le système nerveux central (SNC). La rétine, partie intégrante du SNC, est l'organe neurosensoriel qui permet la transformation de l'information lumineuse en signal électrique et sa transmission vers le cerveau via le nerf optique. L'enregistrement de l'activité des cellules excitables de la rétine est appelé électrorétinogramme (ERG). En 1995, Cibis et collaborateurs ont montré que 80% des patients souffrant de dystrophie musculaire de Duchenne présentaient une activité anormale des cellules rétiniennes, caractérisée par des perturbations de l'ERG en conditions scotopiques. Ce phénotype est le reflet d'une altération de la transmission de l'information visuelle au sein de la rétine en

l'absence des produits du gène DMD. Parmi les modèles murins déficients pour les dystrophines, seule la souris *mdx^{3cv}*, qui comporte une mutation entraînant une diminution significative de tous les produits du gène DMD, présente un phénotype ERG similaire. L'étude de l'ensemble des modèles murins de la DMD a montré que les produits courts du gène DMD, en particulier la Dp71, étaient particulièrement importants dans la transmission de l'information nerveuse dans la rétine.

La Dp71 est exclusivement exprimée par les principales cellules gliales de la rétine : les cellules gliales de Müller (CGM). Ces cellules traversent la rétine de part en part intervenant à la fois dans le maintien de la structure rétinienne mais également dans la régulation de l'homéostasie rétinienne. Les CGM sont responsables du recyclage des ions et des neurotransmetteurs libérés par les neurones lors de leur activation. Elles vont en particulier réguler la concentration du potassium extracellulaire. Les CGM captent le potassium dans les fentes synaptiques où il est libéré par les neurones, et le redistribuent dans le vitré ou le système vasculaire au cours d'un phénomène portant le nom de « potassium siphoning ». Les CGM sont également primordiales dans la régulation de la concentration du principal neurotransmetteur exciteur libéré par les neurones, le glutamate. Les CGM interviennent en effet dans le recyclage de celui-ci par l'intermédiaire du transporteur de glutamate GLAST qu'elles sont les seules à exprimer. Ce transporteur va leur permettre de récupérer le glutamate libéré par les neurones, avant d'être converti en glutamine par la glutamine synthétase et d'être réorienté vers les neurones. Ces derniers vont alors pouvoir reconvertir la glutamine en glutamate afin de refaire leurs réserves, c'est le cycle de recyclage du glutamate.

La fonction de régulateur de l'homéostasie rétinienne occupé par les CGM est très importante en condition normale. Cette fonction est encore plus importante en condition ischémique où l'arrêt de la circulation sanguine entraîne un stress métabolique majeur perturbant gravement l'homéostasie et pouvant conduire à une dégénérescence neuronale.

Avant d'arriver à la rétine, où elle est traitée, l'information lumineuse, doit traverser les différentes structures composant le segment antérieur. Le cristallin est l'un des

composants essentiels de celui-ci puisqu'il est responsable du processus d'accommodation. La modification de la courbure de la surface du cristallin va être à l'origine de la concentration sur la rétine, des rayons lumineux ayant traversé la cornée et l'humeur aqueuse. Ce rôle important dans la vision est assuré par sa remarquable transparence, basée sur une organisation structurale parfaite ainsi qu'un métabolisme entièrement voué à sa conservation. Le cristallin est constitué d'une couche unique de cellules épithéliales recouvrant un noyau de fibres allongées régulièrement alignées. Ces cellules sont reliées par des jonctions de faible résistance permettant au cristallin de fonctionner comme un syncytium. De petites modifications affectant l'organisation ou les communications intercellulaires entraînent rapidement une opacification du cristallin pouvant mener à la formation d'une cataracte.

Durant ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés aux différents rôles fonctionnels auxquels peut participer la Dp71 dans la rétine. Pour ce faire, nous avons utilisé une souche de souris pour laquelle l'expression de la Dp71 a été invalidée. Nous avons ainsi pu étudier chez cette souris l'intervention de la Dp71 dans la génération de l'onde b de l'électrorétinogramme (ERG). L'implication de la Dp71 dans la régulation de l'homéostasie a été étudiée, i) au niveau intégré en utilisant un modèle d'ischémie-reperfusion, mais aussi ii) au niveau moléculaire lors d'une étude de la composition et du rôle du ou des complexes macromoléculaire(s) au(x)quel(s) elle participe. La Dp71 étant une protéine présentant une expression ubiquitaire, nous avons également étudiée son rôle dans le cristallin, l'un des autres éléments essentiels de l'œil. Toutes ces données permettent de mieux comprendre le rôle du produit court majoritaire du gène DMD, aussi bien dans le système nerveux central que dans des tissus présentant une fonction très différente comme le cristallin.

Avant de présenter les résultats relatifs à ce travail, une synthèse de la bibliographie actuelle nous permettra de placer les objectifs de cette étude. Nous commencerons par décrire la dystrophie musculaire de Duchenne et les différentes protéines de la superfamille des dystrophines avant de nous intéresser aux différents troubles consécutif à

l'absence des produits du gène DMD découvert jusqu'ici. Une deuxième grande partie sera consacrée à la présentation de l'œil et de ces différentes composantes. Par la suite, nous présenterons les résultats obtenus ainsi que leur intégration dans les connaissances actuelles lors d'une partie discussion, avant de terminer par les futurs travaux à mener à la lumière de ces nouvelles données.

II- La Dystrophie Musculaire de Duchenne (DMD)

1) Historique

La dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) a été caractérisée en 1861 par Duchenne de Boulogne (Duchenne, G. B. 1861). Cette maladie porte son nom même si Edward Meyron (1852) et William John Little (1853) l'ont caractérisée auparavant. Duchenne attribua d'abord la cause de la maladie à un désordre cérébral et la nomma « paraplégie hypertrophique de l'enfance » avant de la relier au muscle en 1868. Il découvrit lors de biopsies musculaires que le tissu musculaire était remplacé par un tissu fibreux ou conjonctif. Ses travaux plus poussés lui ont ainsi valu l'attribution de son nom à cette myopathie.

2) L'origine génétique

La mise en évidence de la dystrophine constitue le premier succès de la génétique inverse, démarche qui consiste à localiser, isoler et cloner un gène impliqué dans une maladie génétique puis d'identifier la ou les protéine(s) codée(s) par ce gène.

A) Localisation du gène

La localisation chromosomique du gène impliqué dans la dystrophie musculaire de Duchenne a été suspectée précocement du fait de son mode de transmission caractéristique de l'implication du chromosome X (Gowers, 1886). En effet, la maladie affecte presque uniquement des garçons (dont le chromosome X provient de la mère). De plus, elle se transmet dans deux tiers des cas environ par des mères non atteintes mais « conductrices » ou « porteuses », qui possèdent un chromosome X « normal » et un autre porteur de l'anomalie génétique.

Trois méthodes différentes ont abouti presque simultanément à la localisation du gène sur le bras court du chromosome X, en région Xp21 (Figure 1A). La première est

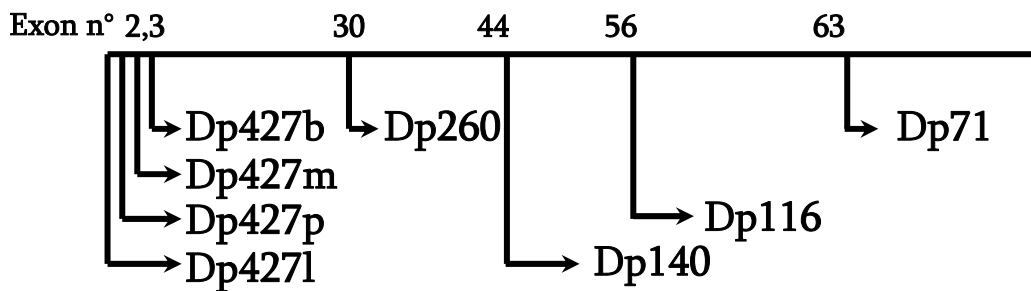


Figure 1 : Organisation du gène DMD. Localisation des promoteurs tissus spécifiques de la Dp427 et des promoteurs internes responsable de l'expression des produits courts du gène DMD (b: brain; m: muscle; p: cellule de Purkinje; l: lymphocyte).

l'étude des translocations chromosomiques impliquant le chromosome X et un autosome dans les rares cas de myopathie de Duchenne chez des filles. La deuxième méthode est le clonage positionnel, reposant sur le polymorphisme de longueur de fragments de restriction. La troisième méthode repose sur l'étude cytogénétique du chromosome X des patients atteints simultanément de diverses affections génétiques liées au chromosome X.

B) Isolement et clonage du gène

L'isolement des premières portions du gène a été effectué par Monaco et coll. en 1986, et le séquençage complet par Koenig et coll. en 1987 {Koenig, 1987 #1; Monaco, 1986 #2}. Le gène de la dystrophine est le plus grand gène connu, contenant 2,4 mégabases d'ADN (acide désoxyribonucléique), ce qui correspond à environ 1% du chromosome X. La partie codante (environ 14 kilobases) contient 79 exons séparés par des introns pouvant atteindre 200 kb {Koenig, 1987 #1} et seul 0,6% du gène code pour la dystrophine.

A ce jour, quatre isoformes longues et cinq produits courts codés à partir du gène DMD ont été mises en évidence.

3) La superfamille des dystrophines

A) La dystrophine ou Dp427

Quatre promoteurs spécifiques de tissus, situés en 5' du gène DMD produisent un ARN messager d'une longueur totale de 14 kb à l'origine de quatre isoformes de 427 kDa (Dp427) ne différant que par leur premier exon (Figure 1B) :

- Isoforme cérébrale ou C-dystrophine ou B-dystrophine (Dp427-B) ; issue du promoteur P_B (« B » pour « brain ») actif dans les neurones du cortex et de l'hippocampe {Chelly, 1988 #340}.
- Isoforme musculaire ou M-dystrophine (Dp427-M) ; issue du promoteur P_M (« M » pour « muscle ») actif principalement dans le muscle, et faiblement dans les cellules gliales.

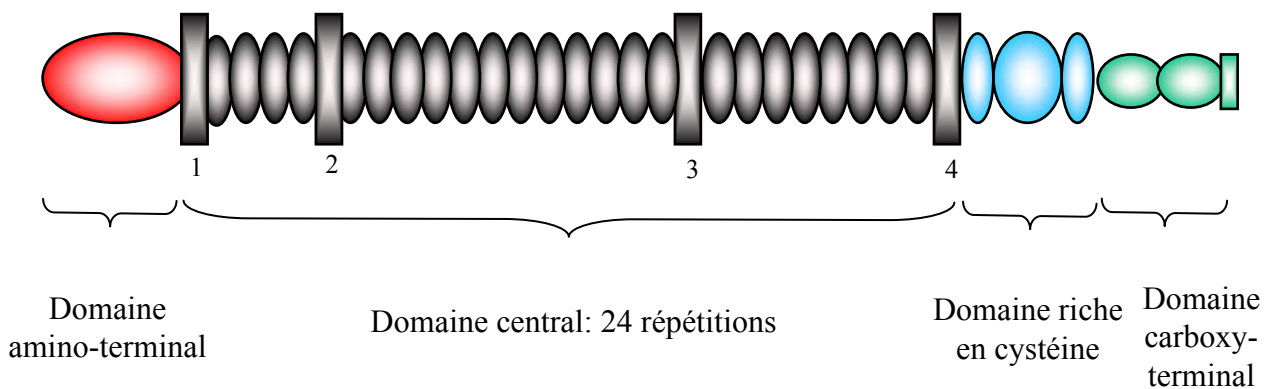


Figure 2 : Schématisation de la structure de la dystrophine Dp427 avec ces quatre domaines: -domaine amino-terminal de liaison à l'actine, -domaine central fait de répétitions et des 4 zones charnières, -domaine riche en cystéine comportant de nombreux motifs de liaison, -domaine carboxy-terminal spécifique des dystrophines et permettant la liaison au protéines cytoplasmiques du complexe.

- Isoforme des cellules de Purkinje cérébelleuses ou P-dystrophine (Dp427-P), issue du promoteur P_P (« P » pour « Purkinje cell »).
- Isoforme lymphocytaire ou L-dystrophine (« L » pour « lymphocyte »).

1) Structure des dystrophines

La séquence de la dystrophine, et tout particulièrement la partie 3' {Lemaire, 1988 #3}, est relativement bien conservée entre les espèces (humain, porc, rongeur, poulet et poisson zèbre). L'analyse des acides aminés suppose une protéine de forme allongée entrant dans la composition du cytosquelette associé à la membrane qui peut être divisée en quatre parties (Figure 2) {Koenig, 1988 #5} :

- Le domaine amino-terminal** varie de quelques acides aminés en fonction de l'isoforme étudiée. Il est composé de plus de 240 acides aminés et possède une homologie de séquence avec la région de l' α -actinine {Hammonds, 1987 #6} et de la β -spectrine liant la F-actine. Il contient au moins trois sous-unités ABS1, 2 et 3 (ABS : Actin binding site), qui sont chacune susceptibles de fixer l'actine du cytosquelette membranaire. Il comprend également deux sites d'interaction avec la calmoduline dénommés CaMBS1 et 2 (CaMBS : Calmodulin binding site) qui recouvrent en partie les sites ABS1 et 2 {Bonet-Kerrache, 1994 #7; Jarrett, 1995 #8}.
- Le domaine central** est composé de 2705 acides aminés, répartis en 24 séquences d'environ 109 acides aminés, similaires aux éléments répétés α -hélicoidaux de la β -spectrine et de l' α -actinine {Davison, 1988 #9}. Il contient également quatre zones charnières non répétées, riches en résidus prolines, qui confèrent sa flexibilité à la dystrophine {Koenig, 1990 #10}. Ce domaine possède des propriétés d'auto-association permettant à deux molécules de dystrophines de s'associer anti-parallèlement, ou bien la formation d'hétérodimères avec un autre membre de la superfamille des dystrophines (dystrophines et protéines homologues, voir § II-3-C). Le domaine central est lui aussi capable de lier l'actine, mais avec une

plus grande affinité que le domaine N-terminal. Un domaine possédant une séquence consensus d'interaction protéique entourée de tryptophanes, appelé domaine WW, est présent au niveau de la quatrième zone charnière, à cheval entre le domaine central et le domaine riche en cystéine {Andre, 1994 #12; Bork, 1994 #11}.

- c. **Le domaine riche en cystéine** comprend 280 acides aminés dont 15 cystéines. Il présente deux sites potentiels de liaison au calcium : EF1 et EF2 (poignée EF), et un site potentiel de fixation du zinc, le domaine ZZ. L'ensemble de ces trois domaines associé au domaine WW de l'extrémité du domaine central constitue une région de la dystrophine se liant au β -dystroglycane, protéine transmembranaire de 43 kDa appartenant au complexe protéique associé à la dystrophine (voir § II-4-B-1). Ce domaine se caractérise également par une série de 142 acides aminés ayant une homologie de 24% avec l'extrémité carboxy-terminale de l' α -actinine {Koenig, 1988 #5}.
- d. **La partie carboxy-terminale** de la dystrophine est formée d'au moins 320 acides aminés. Ce domaine contient le site de liaison aux protéines cytoplasmiques sous-sarcolemmales que sont la dystrobrevine et les syntrophines (v § II-4-B-3). La région riche en cystéines (troisième domaine) et l'extrémité C-terminale sont donc essentielles pour la liaison de la dystrophine à son complexe associé {Bies, 1992 #13; Ervasti, 1993 #15; Jung, 1995 #17; Matsumura, 1993 #16; Suzuki, 1992 #14}. En outre, cette partie de la molécule peut à la fois lier la membrane plasmique via le β -dystroglycane et le cytosquelette d'actine via un site CC de fixation (CC : coiled-coiled). Enfin, ce domaine possède aussi une homologie significative avec l'utrophine, une protéine encodée sur le chromosome 6 et qui est de la même famille que la dystrophine {Love, 1993 #18; Love, 1989 #19} (voir § II-3-C-1).

Produits du gène DMD

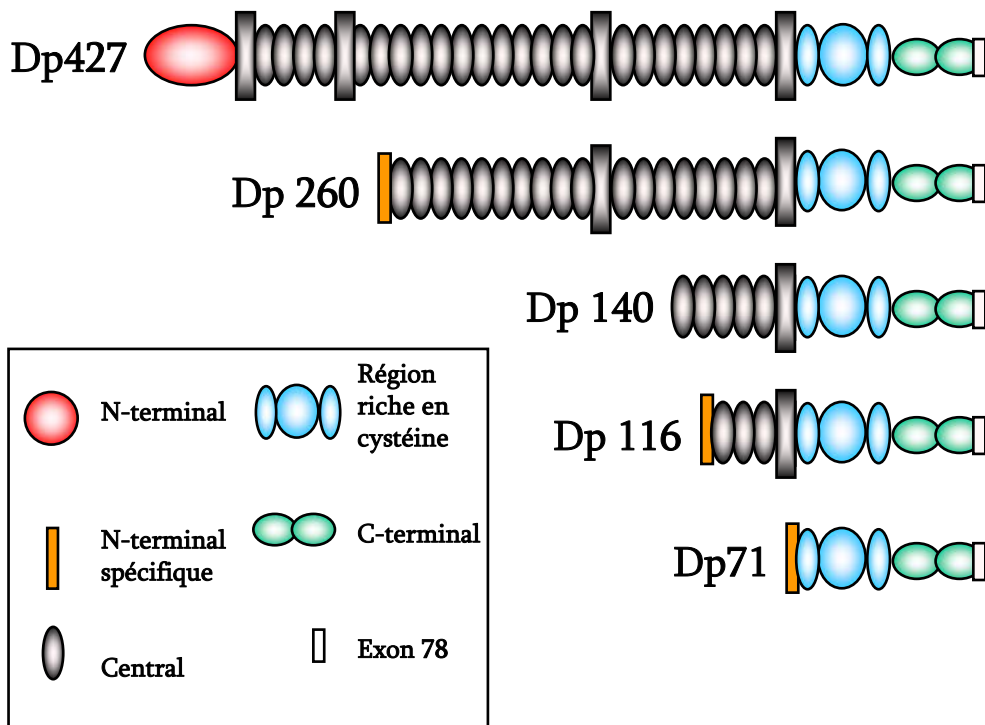


Figure 3 : Schématisation de la structure de la dystrophine et des 4 produits courts issues du gène DMD.

2) Expression et localisation des dystrophines

La dystrophine a été retrouvée dans les muscles, le cortex, la rétine et les cellules de Purkinje {Ahn, 1993 #30}. Elle est localisée sous le sarcolemme des fibres musculaires squelettiques, avec une expression accrue aux jonctions neuromusculaires et aux jonctions myotendineuses {Arahata, 1988 #31; Bonilla, 1988 #32; Byers, 1991 #35; Carpenter, 1990 #34; Zubrzycka-Gaarn, 1988 #33; Zubrzycka-Gaarn, 1991 #74}. Les myoblastes n'expriment pas la dystrophine, mais lors de la différenciation les cellules fusionnent et la dystrophine est alors détectée dans les myotubes {Barnea, 1990 #77; Klamut, 1989 #75; Nudel, 1989 #76}. La dystrophine est exprimée dans tous les tissus musculaires, incluant le cœur et les tissus musculaires lisses {Byers, 1991 #35; Nicholson, 1989 #78; North, 1993 #80; Yarom, 1992 #79}.

B) Les produits courts du gène DMD

La découverte de plusieurs promoteurs internes dans le gène de la dystrophine a conduit à la mise en évidence de différents produits courts nommés en fonction de leur masse moléculaire déduite : Dp260, Dp140, Dp116, Dp71 et Dp45 (Figure 1B et 3). Outre leurs différentes tailles, ces protéines présentent une expression spatio-temporelle variable. Elles peuvent être exprimées dans certaines parties du cortex cérébral {Jung, 1993 #125}{Barnea, 1990 #38; Boyce, 1991 #37; Nudel, 1989 #36}, dans les cellules de Purkinje {Gorecki, 1992 #39}, dans les cellules gliales {Bar, 1990 #40; Gorecki, 1992 #39; Hugnot, 1992 #41; Lederfein, 1992 #42; Rapaport, 1992 #43}, dans les cellules de Schwann {Byers, 1993 #44}, et dans plusieurs organes (rein, rétine, foie, poumon, cœur, pancréas et testicule) {Ahn, 1993 #30; Durbeej, 1997 #46; Muntoni, 2003 #47}. Plusieurs isoformes peuvent être exprimées dans un même type cellulaire ou tissulaire montrant la potentialité fonctionnelle de ces protéines.

1) La Dp260

Elle provient d'un transcrite du gène DMD contenant un premier exon spécifique à l'intérieur de l'intron 29 épissé en phase avec l'exon 30 de la dystrophine {D'Souza, 1995 #48}. Elle ne diffère de cette dernière que par ses 13 acides aminés N-terminaux. Ce produit court du gène DMD a d'abord été identifié dans la rétine où des mutations entraînant son absence induisent d'importantes altérations de la neurotransmission {Fitzgerald, 1999 #22; Pillers, 1999 #50}. Son expression a ensuite été mise en évidence dans le cerveau et les intestins {Tokarz, 1998 #51}.

2) La Dp140

Ce produit est généré par un promoteur situé en amont de l'exon 45 et produisant un transcrite de 7,5 kb {Lidov, 1995 #52}. Il s'agit du seul produit court ne présentant aucune différence de séquence en N-terminal avec la dystrophine. Cette protéine est principalement exprimée dans le cerveau, les yeux, les muscles squelettiques et l'estomac mais a également été localisée dans les reins, le thymus, les testicules et le foie {Tokarz, 1998 #51}.

3) La Dp116

Cette protéine est issue d'un promoteur et d'un premier exon original situé dans l'intron 55 aboutissant à l'expression d'un transcrite de 5,2 kb {Byers, 1993 #44}. Ce produit présente 15 résidus N-terminaux spécifiques. Les premières études ont montré qu'elle était spécifiquement exprimée dans l'encéphale embryonnaire puis dans les cellules de Schwann, c'est pourquoi elle est considérée comme un produit spécifique du système nerveux périphérique {Matsumura, 1993 #16}. Cependant, sa localisation est encore controversée puisque plusieurs études ont également rapporté son expression dans le cerveau humain adulte {Finn, 1997 #55; Schofield, 1994 #54} ainsi que dans divers tissus murins {Tokarz, 1998 #51}.

4) La Dp71

Elle est issue d'un promoteur de type « housekeeping », comme les « gènes de ménage », d'où son expression ubiquitaire, et d'un premier exon spécifique situé dans l'intron 62 et donnant un transcrit de 6,5 kb {Bar, 1990 #40; Lederfein, 1992 #42; Lederfein, 1993 #56}. Cette protéine possède 7 acides aminés spécifiques à son extrémité amino-terminale, fournissant à cette protéine un domaine de liaison à l'actine spécifique {Howard, 1998 #58}. Plusieurs travaux ont montré que la Dp71 était localisée à proximité des filaments d'actine aussi bien dans le muscle que dans les cellules gliales de la rétine {Claudepierre, 2000 #25; Howard, 1998 #57}. Il s'agit du produit du gène DMD majoritairement exprimé dans les tissus non musculaires, y compris le système nerveux central, rétine incluse.

5) La Dp45

Ce produit est assez mal connu. Il aurait pour origine un transcrit de 2,2 kb ,provenant du même promoteur que la Dp71, qui a été identifié dans la plupart des tissus humains incluant le muscle, le cerveau, le foie et les poumons {Tinsley, 1993 #62}. Sa distribution ressemble à celle du transcrit de la Dp71 à la différence qu'il s'exprime très tôt au cours du développement.

C) Les membres de la superfamille des dystrophines

Il existe toute une famille de protéines apparentées aux dystrophines regroupées sous la dénomination « super-famille des dystrophines ». Elle se caractérise par sa partie C-terminale, en particulier, le domaine ZZ de la région riche en cystéine et le domaine CC (α -hélicoïdal) de la région C-terminal. Deux groupes de protéines appartiennent à cette famille, les « dystrophin related proteins » ou « DRP », et les dystrobrevines.

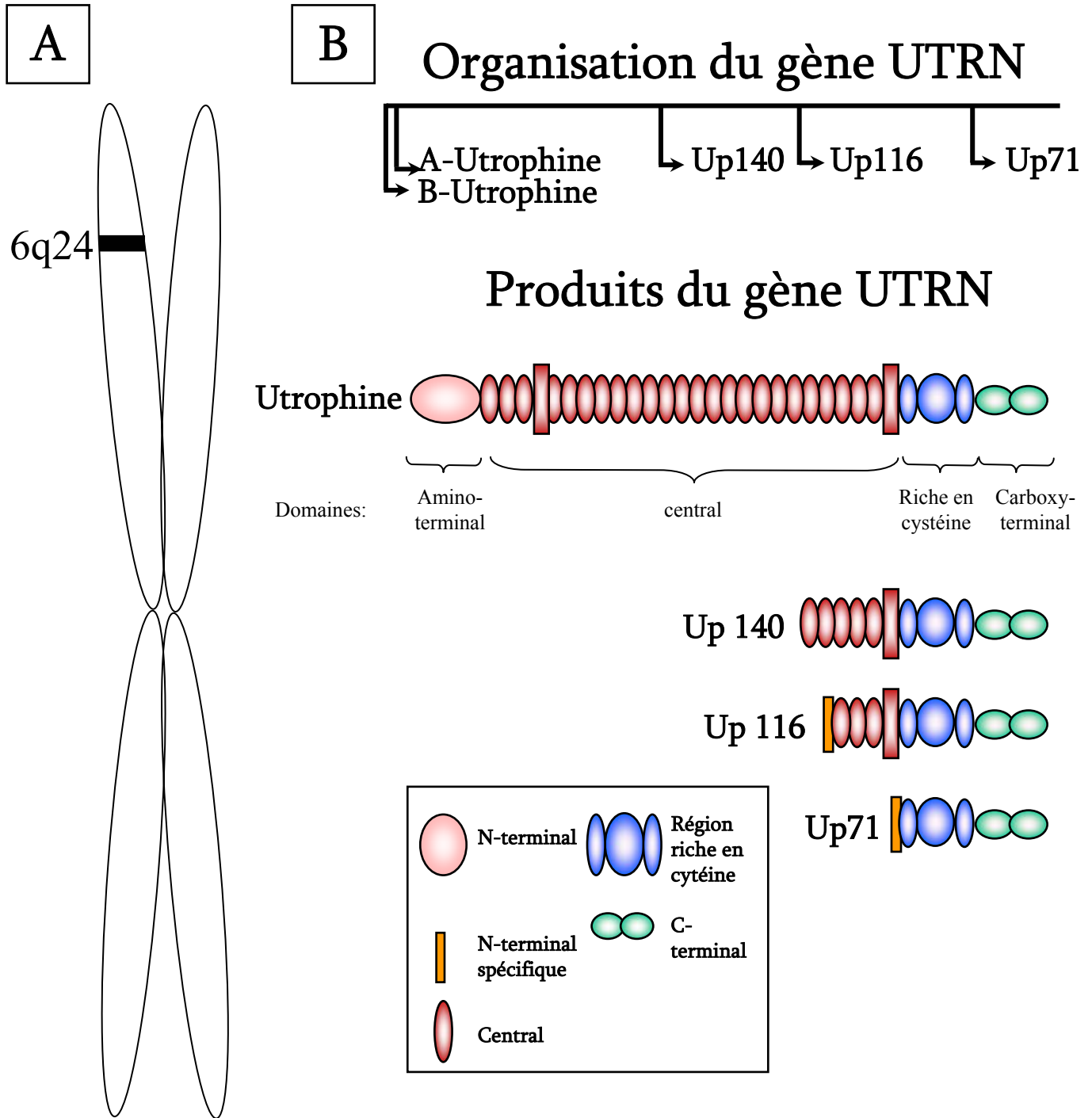


Figure 4 : A) Localisation du gène UTRN sur le chromosome 6 en position 6q24. B) Scématisation de l'organisation du gène UTRN ainsi que des produits issus du gène.

1) L'utrophine ou DRP1

Cette protéine est codée par un gène situé sur le chromosome 6 en position 6q24 appelé UTRN (Figure 4). Ce gène, tout comme le gène DMD, possède deux promoteurs dans sa région C-terminale qui vont conduire à l'expression de deux produits longs, appelés A- et B-utrophine, de 376kDa chacun {Burton, 1999 #63}. La séquence de ces deux protéines ne diffère que par 31 et 26 acides aminés respectivement, à leur extrémité N-terminale. L'utrophine et la M-dystrophine partagent près de 80% d'homologie, en particulier dans les régions N- et C-terminales, cependant leur patron d'expression est très différent {Khurana, 1991 #64; Love, 1991 #65; Tinsley, 1992 #66}. L'utrophine présente une expression ubiquitaire, bien que particulièrement importante dans le muscle lisse {Nguyen, 1991 #67}, les cellules de Schwann {Matsumura, 1993 #16}, les cellules endothéliales {Matsumura, 1993 #16}, et les cellules gliales de Müller de la rétine {Claudepierre, 1999 #26} chez le rat ou la souris adulte. En outre, l'utrophine est remplacée dans le muscle par la dystrophine durant les stades tardifs de la gestation, c'est pourquoi l'utrophine est considérée comme l'homologue embryonnaire de la dystrophine dans le muscle.

2) Les produits courts du gène UTRN

Outre les 2 promoteurs situés en 5', le gène UTRN possède des promoteurs internes situés en aval qui conduisent à l'expression de trois produits courts nommés par homologie avec le gène DMD : l'Up140, l'Up116 et l'Up71 {Blake, 1995 #68; Lumeng, 1999 #69; Wilson, 1999 #70}.

3) La DRP2

Il s'agit d'une petite protéine codée par un gène de 45 kb localisé sur le chromosome X en position Xq22 {Roberts, 1996 #71}. Cette protéine est globalement similaire à la Dp116 et peut se lier via son domaine C-terminal aux dystroglycannes, dystrobrevines et certaines syntrophines {Byers, 1993 #44}. Elle est principalement exprimée dans

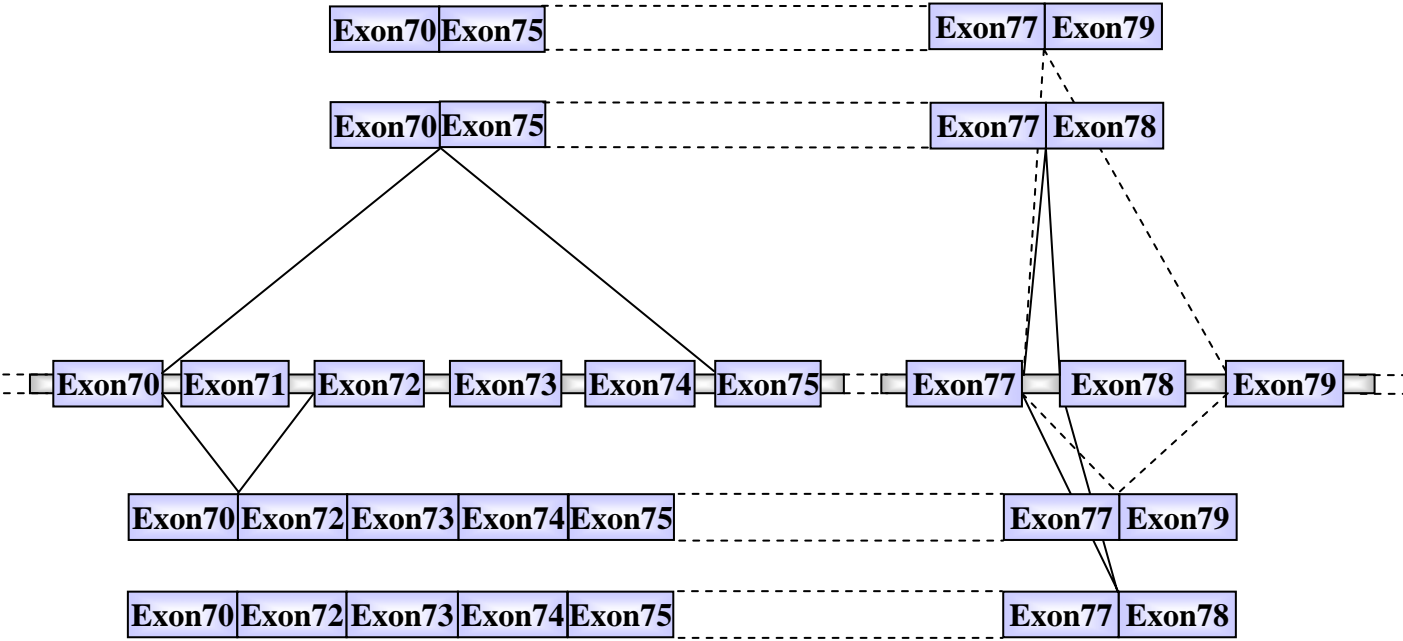


Figure 5 : Schéma des différents épissages alternatifs décrits pour la Dp71.

l'encéphale {Roberts, 2000 #72} et la moelle épinière mais on la retrouve également dans la rétine, les reins et d'autres tissus {Dixon, 1997 #73}.

4) Les dystrobrévines

Elles regroupent les protéines issues de deux gènes différents mais qui possèdent 76% d'homologie entre elles et qui sont appelées α - et β -dystrobrévines. Le gène de l' α -dystrobrévine, à l'image du gène DMD, comporte trois promoteurs différents possédant une activité variable en fonction des tissus {Holzfeind, 1999 #81}. Les protéines provenant de ces deux gènes s'associent simultanément aux dystrophines et aux syntrophines. Il a été récemment montré qu'elles pouvaient également interagir avec le β -dystroglycane mais pas de la même manière que les dystrophines puisqu'elles ne possèdent pas de domaine WW {Chung, 1999 #82}.

D) Epissages alternatifs

La superfamille des dystrophines se compose à la fois de protéines issues de gènes différents mais aussi de protéines provenant de plusieurs promoteurs dans le même gène. Cette diversité protéique est encore accrue par un phénomène biologique appelé l'épissage alternatif. Ce phénomène a surtout été étudié pour la Dp71, et a été mis en évidence dans plusieurs tissus, y compris le système nerveux {Austin, 1995 #83} (Figure 5). Les transcrits de la Dp71 peuvent être notamment épissés pour les exons 71 et/ou 78, seule la perte de l'exon 78 entraînant une modification du cadre de lecture. Ceci induit le remplacement des 13 derniers acides aminés hydrophiles de la dystrophine par 31 acides aminés hydrophobes, ce produit étant appelé Dp71f {Kramarcy, 1994 #84; Lederfein, 1992 #42; Rapaport, 1992 #43}. D'autres exons, en particulier les exons 72-74, semblent être épissés, ceci conduisant à l'élaboration de plusieurs isoformes de Dp71. Il a été montré que l'épissage des isoformes de la Dp71 était responsable d'une modulation de leur localisation subcellulaire dans différentes lignées cellulaires {Gonzalez, 2000 #86; Marquez, 2003 #85}.

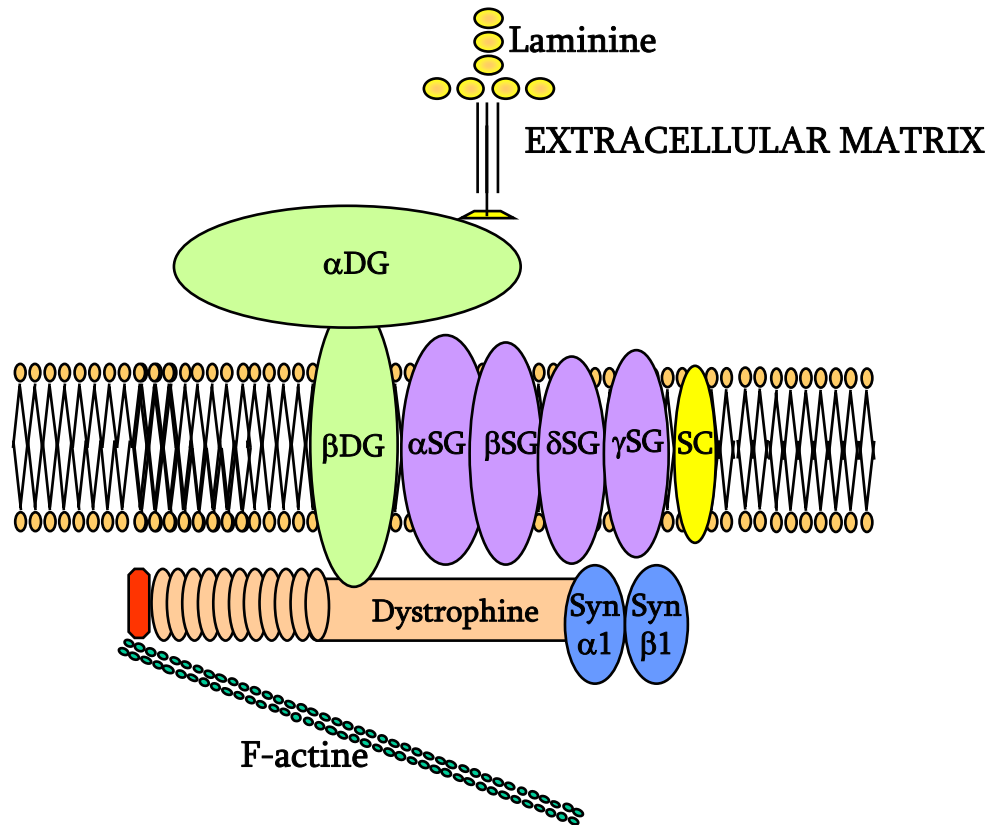


Figure 6 : Schema du complexe dystrophine/DAPs liant le cytosquelette d'actine à la matrice extracellulaire à la membrane sarcolemmale. (DG: dystroglycan; SG: sarcoglycan; SC: sarcospan; Syn: syntrophine)

Toutes ces données soulignent la multiplicité ainsi que l'homologie de séquence des produits de la superfamille des dystrophines, suggérant leur implication dans de nombreuses fonctions. Nous venons en effet de présenter plusieurs gènes phylogénétiquement proches, codant chacun de multiples protéines pouvant être exprimées dans divers tissus ou types cellulaires. Nous allons dorénavant nous intéresser aux différentes fonctions auxquelles peuvent participer les dystrophines.

4) Phénotype musculaire

A) Description

La dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) est une maladie qui touche l'ensemble des muscles de l'organisme (muscles squelettiques, muscle cardiaque et muscles lisses). L'enfant atteint ne présente que rarement des signes de la maladie avant l'âge de 3 ans. Le signe évocateur le plus précocement observé est la pseudo-hypertrophie des muscles des mollets, qui correspond à leur infiltration par des tissus fibro-adipeux. Elle peut toucher d'autres groupes musculaires qui sont le plus souvent les masseters (mâchoires), les deltoïdes (épaules), les grands dentelés (thorax) et les quadriceps (cuisses). Au fil des années, apparaît une faiblesse musculaire progressive des membres et du tronc. Elle est bilatérale et symétrique, et s'étend progressivement. La faiblesse musculaire touche préférentiellement les muscles des membres inférieurs avant d'atteindre ceux des membres supérieurs. La pathologie va continuer à s'étendre au cours du temps, atteignant d'autres groupes musculaires en particulier les muscles thoraciques et les muscles distaux des membres (jambes et pieds, avant-bras et mains). La montée des escaliers, puis la marche vers 10-12 ans, deviennent impossibles et l'utilisation des membres supérieurs se limite progressivement. Une scoliose souvent grave se développe, parfois avant, mais le plus souvent après la perte de la marche. Le décès des patients, causé par l'affaiblissement des muscles respiratoires, survient par rétention du monoxyde de carbone et anoxémie (diminution de la quantité d'oxygène sanguin) accompagnées d'une infection respiratoire.

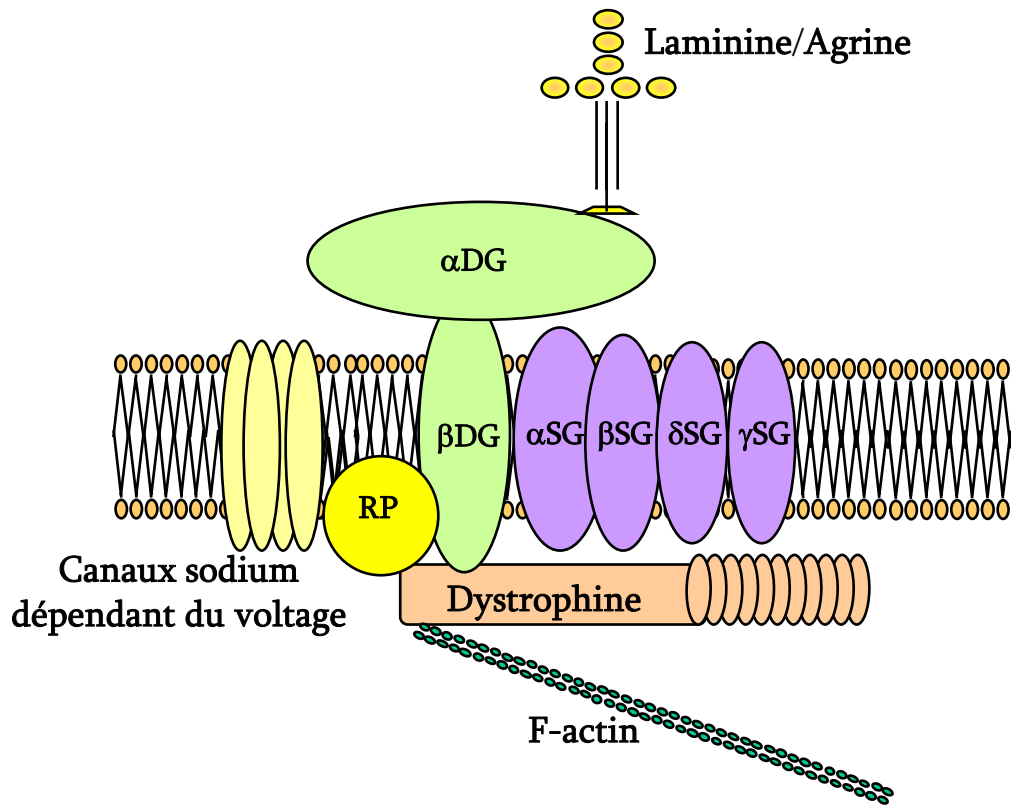


Figure 7 : Complexe dystrophine/DAPs responsable de la localisation des canaux sodium voltage dépendants à la jonction neuromusculaire. (DG: dystroglycan; SG: sarcoglycan; SC: sarcospan; RP: rapsin)

Les décès par défaillance cardiaque surviennent dans 10 à 40% des cas {Mukoyama, 1987 #182}. L'âge du décès varie entre 10 et 29 ans avec une moyenne de $18,3 \pm 3,6$ ans.

B) Le complexe macromoléculaire lié à la dystrophine Dp427

Le seul produit du gène DMD exprimé dans le muscle strié squelettique est la Dp427. Cette protéine a été localisée dans la région sous-sarcolemmale où elle participe doublement à la fonction musculaire :

- Elle lie le cytosquelette d'actine à la matrice extracellulaire permettant le maintien de la structure de la fibre musculaire lors des cycles de contraction/relaxation {Campbell, 1995 #88; Petrof, 1993 #87} (Figure 6).
- Elle permet la localisation de protéines membranaires, comme les canaux sodiques dépendant du voltage, à des endroits bien précis de la membrane (Figure 7).

La dystrophine occupe ces deux fonctions par l'intermédiaire d'un complexe macromoléculaire appelé DGC pour « dystrophin glycoprotein complex » ou complexe glycoprotéique associé à la dystrophine {Ozawa, 1995 #89}, qui peut être subdivisé en trois parties.

1) Complexe dystroglycane

- L' α -dystroglycane est une protéine de la matrice extracellulaire (MEC) qui se lie d'une part au β -dystroglycane et d'autre part à d'autres composants de la MEC tels que les laminines 2 et 4, l'agrine et le perlecan. Cette protéine est requise pour l'assemblage de la lame basale. Elle est également un récepteur de surface pour de nombreux micro-organismes pathogènes.
- Le β -dystroglycane est une protéine transmembranaire qui lie l' α -dystroglycane et la dystrophine.

2) Complexe sarcoglycane-sarcospane

- Il se compose, dans le muscle strié squelettique, de cinq protéines transmembranaires : alpha-, beta-, gamma- et delta-sarcoglycane ainsi que le sarcospane. Ce complexe est joint aux dystroglycanes par association latérale, mais les sites de liaisons exacts restent encore à définir {Ozawa, 1995 #89; Suzuki, 1994 #90}. La fonction de ce complexe serait d'augmenter la force de la liaison entre le dystroglycane et la dystrophine dans le sarcolemme et ainsi de stabiliser le lien entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule {Holt, 1998 #183}.
- Deux autres sarcoglycans ont été identifiés. L'épsilon-sarcoglycane qui possède une forte homologie avec l'alpha-sarcoglycane mais qui est exprimé de manière ubiquitaire et récemment {McNally, 1998 #91} le zeta-sarcoglycane qui lui possède une forte homologie avec les delta- et gamma-sarcoglycans {Wheeler, 2002 #92}.

3) Les protéines cytoplasmiques

- La famille des syntrophines qui comprend cinq protéines intracellulaires interagissant directement avec la dystrophine et les dystrobrevines : α 1-syntrophine, β 1- et β 2-syntrophine et γ 1- et γ 2-syntrophine {Adams, 1993 #93; Ahn, 1996 #95; Ahn, 1994 #94; Piluso, 2000 #96}. Bien que l' α 1-syntrophine soit exprimée tout au long du sarcolemme, les syntrophines sont préférentiellement présentes au niveau des jonctions neuromusculaires où elles permettent l'accumulation locale des canaux sodiques dépendants du voltage, favorisant le fonctionnement de la jonction neuromusculaire.
- L'alpha-dystrobrevine, qui se lie aux syntrophines, semble être particulièrement impliquée dans les voies de signalisation {Grady, 1999 #97}
- L'enzyme monoxyde d'azote synthétase de type neuronale (nNOS), qui se lie à l' α 1-syntrophine, est un élément essentiel dans la modulation de la contraction musculaire {Brenman, 1995 #99; Chang, 1996 #98}.

C) Rôle du complexe dystrophine-DAPs (dystrophin associated proteins)

1) Rôle structural

En plus d'une grande proportion de fibres nécrotiques dans les muscles de patients DMD {Rowland, 1988 #100}, plusieurs autres observations appuient l'hypothèse de la fragilité membranaire liée à l'absence de la dystrophine et de son complexe. En effet, l'examen des fibres musculaires anormales à l'aide de la microscopie électronique démontre la présence de brèches dans la membrane sarcolemmale de fibres non-nécrotiques n'ayant aucune autre anormalité structurale, ce qui représente un signe précoce d'une rupture des fibres musculaires {Mokri, 1975 #184}. De plus, on observe un relargage anormal de créatine kinase et de myoglobine du sarcoplasme dans le sérum lorsque le patient est au repos. Ce relargage est rapidement augmenté lorsque le patient effectue un exercice modeste {Florence, 1985 #185}. Les muscles les plus atteints semblent être les muscles qui doivent déplacer les charges les plus lourdes. Ceci expliquerait pourquoi les muscles oculomoteurs, qui subissent des stress mécaniques plus faibles, sont épargnés {Kaminski, 1992 #186}. Il a également été montré que les muscles oculomoteurs mais aussi ceux des doigts de pieds conservent un taux de β -dystroglycane relativement élevé en absence de dystrophine pouvant expliquer leur plus faible atteinte {Dowling, 2003 #483}. De plus, les fibres musculaires à contraction rapide (Type II), qui sont sujettes à de grands stress mécaniques, sont sélectivement vulnérables chez les patients DMD. Toutes ces données montrent le rôle prépondérant joué par la dystrophine dans le maintien de l'intégrité des fibres musculaires, en particulier lors des cycles de contraction/relaxation {Petrof, 1993 #87} (Figure 6).

2) Rôle fonctionnel

Dans la jonction neuromusculaire, la dystrophine est exprimée au niveau des « cryptes » membranaires, riches en canaux sodiques dépendants du voltage (Figure 7), et absente des « crêtes » où se situent les récepteurs à l'acétylcholine. Le complexe formé par la dystrophine permet, via les syntrophines, la localisation et l'agrégation des canaux

sodiques dépendant du voltage. L'absence de dystrophine ou Dp427 chez les patients DMD ainsi que chez le modèle murin de la DMD, souche *mdx*, entraîne une délocalisation de ces canaux à l'origine d'une perturbation du fonctionnement de la jonction neuromusculaire. En outre, il a été montré, toujours dans la souris *mdx*, que l'absence de la dystrophine entraînait la délocalisation de la nNOS, protéine impliquée dans la signalisation intracellulaire {Brenman, 1995 #99; Chang, 1996 #98}. Enfin, il a été mis en évidence que les syntrophines pouvaient lier d'autres protéines de signalisation comme la protéine kinase 3 activée par le stress et la sérine/thréonine kinase associée aux microtubules {Hasegawa, 1999 #103; Lumeng, 1999 #102}. Ces deux résultats montrent que la dystrophine est aussi cruciale pour l'ancrage de protéines de signalisation ou de canaux ioniques dans le sarcolemme et par conséquent pour la signalisation inter- et intracellulaire.

3) Rôle métabolique

L'homéostasie calcique de la cellule est endommagée chez les patients DMD, cependant il reste à démontrer s'il s'agit d'une cause ou d'une conséquence de la dystrophie musculaire. En effet l'augmentation de la concentration calcique dans les fibres musculaires peut avoir deux origines : -une altération des canaux ioniques qui sont sous la dépendance de la dystrophine et de ces protéines associées {Carlson, 1998 #104} ; -à l'inverse, cette augmentation calcique pourrait être simplement secondaire, et due en fait à la rupture de la membrane cellulaire permettant l'entrée dans la cellule d'ions extracellulaires et notamment calciques.

5) Phénotypes du Système Nerveux Central :

Le phénotype musculaire est, pour des raisons évidentes, le premier phénotype à avoir été découvert chez les patients DMD. Cependant, cette dégénérescence progressive des fibres musculaires s'accompagne très souvent de troubles non progressifs dans le système nerveux central (SNC). L'apparition de ces troubles démontre bien l'importance des dystrophines en dehors du muscle et en particulier dans le SNC.

A) Troubles cognitifs et comportementaux

1) Description

Dès la fin du XIX^e siècle, Duchenne de Boulogne rapporta le cas d'un jeune garçon de 7 ans ayant des troubles de la parole et de la compréhension. Il a été établi depuis que les patients DMD peuvent présenter un déficit cognitif non-progressif. Environ 30% des patients présentent un retard mental, objectivé par un quotient intellectuel (QI) moyen de quatre-vingt {Lidov, 1996 #105}. L'étude statistique des résultats de QI des patients DMD a permis de déterminer que ces déficits cognitifs n'étaient dus ni à une mutation bien précise ni à la délétion d'un second gène présent dans l'un des introns du gène DMD. De plus, l'étude de jumeaux a démontré qu'il y avait une corrélation directe entre les QI inférieurs à la moyenne de frères atteints dans une même famille, alors que des jumeaux non atteints ont un QI « normal » {Ogasawara, 1989 #187}. Afin de prendre en compte les biais pouvant provenir des problèmes physiques, faiblesse des performances dans les tâches nécessitant une coordination motrice aussi bien que les contraintes socio-économiques dues au handicap, des études ont comparé des cohortes de patients et de sujets contrôles avec des handicaps physiques similaires. Des chercheurs ont ainsi comparé les résultats de patients DMD avec ceux de patients atteints d'une autre pathologie neuromusculaire sévère : l'atrophie musculaire spinale (SMA) {Billard, 1992 #106}. Dans ces études, les scores de QI verbal étaient significativement inférieurs dans le groupe DMD par rapport aux groupes SMA. Concernant les tests non-verbaux, les deux populations ont obtenu les mêmes résultats {Billard, 1992 #106}. L'analyse plus détaillée des capacités de lecture et d'intégration des tâches (« processing skills ») a montré que les patients DMD présentaient des troubles similaires à ceux observés chez des enfants atteints de dyslexie dysphonique, une forme fréquente de dyslexie développementale {Billard, 1998 #188}. De ce fait, puisqu'il y a une forte composante verbale dans la majorité des tests de QI, il ne peut être exclu que le faible QI observé chez les individus atteints de DMD soit principalement dû à un déficit du QI verbal. Plus récemment, une étude a rapporté qu'il existait, indépendamment du QI, un profil cognitif spécifique composé d'une diminution

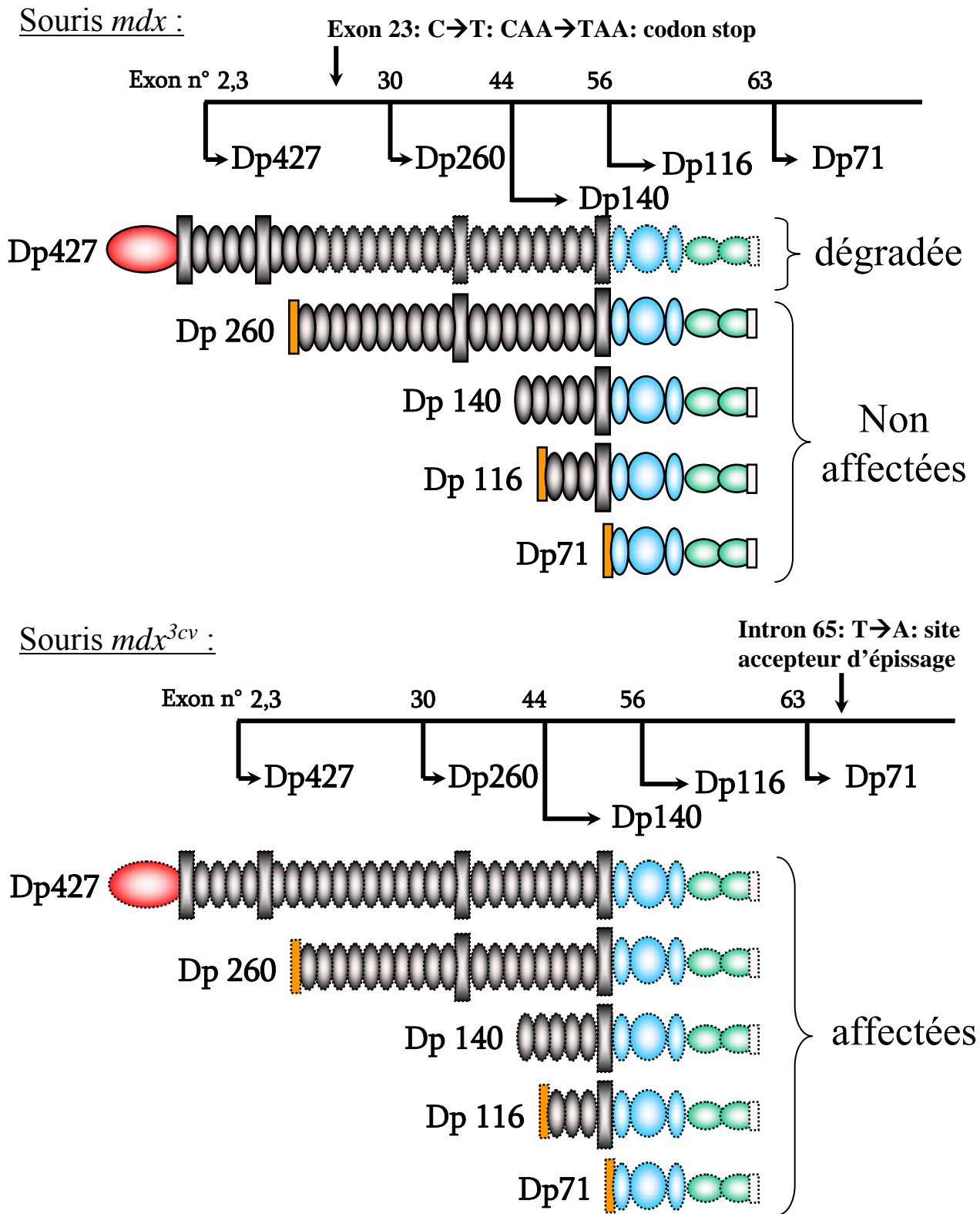


Figure 8 : Mutations chez les souris *mdx* et *mdx*^{3cv}. *Mdx* : une mutation ponctuelle entraîne l'apparition d'un nouveau codon stop. La dystrophine mutante tronquée obtenue est rapidement dégradée mais les autres ne sont pas affectées. *Mdx*^{3cv} : une mutation ponctuelle entraîne l'apparition d'un nouveau site accepteur d'épissage qui entraîne une forte diminution de l'expression de tous les produits du gène DMD.

des performances (« in digit span »), dans le rappel et la compréhension des histoires chez quatre-vingt enfants atteints de DMD {Hinton, 2000 #107}.

Bien que la morphologie globale du cerveau des patients DMD semble normale, des modifications structurales ont pu être détectées chez certains individus. Yoshioka et coll. (1980) ont ainsi observé une légère atrophie cérébrale dont l'étendue était directement corrélée avec l'âge et le QI des individus chez 20 patients sur 30 examinés. Une autre étude a également mis en évidence une augmentation de la perte neuronale accompagnée d'une gliose accrue chez des patients DMD {Jagadha, 1988 #108}. Il a également été observé chez trois des patients de cette étude des anomalies des branchements dendritiques et des arborisations des neurones pyramidaux du cortex. Un hypermétabolisme du cervelet {Bresolin, 1994 #109} ainsi que des modifications de l'homéostasie cérébrale {Tracey, 1995 #110} ont également été rapportées.

Il est maintenant admis que la cause première de ces troubles cognitifs est le manque de dystrophines fonctionnelles et non une conséquence secondaire des problèmes musculaires. L'étude des fonctions cérébrales étant compliquée chez l'homme, le recours à des modèles animaux est un moyen classiquement utilisé. Ainsi, l'utilisation de souches de souris déficientes pour l'un ou plusieurs des produits du gène DMD a permis une étude plus poussée des mécanismes sous-tendant les troubles du SNC observés chez les patients DMD ainsi que chez certaines souris mutantes. L'étude des souris *mdx*, qui n'expriment pas la dystrophine (Figure 8), a permis de montrer qu'elles présentaient des troubles comportementaux tels que des problèmes de rétention à long terme {Vaillend, 1995 #111}. Cependant, les souris *mdx* tout comme les souris de la souche *mdx^{3cv}*, qui présentent une forte diminution de tous les produits du gène DMD (Figure 8), conservent une mémoire spatiale et des LTP (long term potentiation) hippocampales normales {Sesay, 1996 #113; Vaillend, 1998 #112}. Une étude récente a montré que le nombre de cellules du noyau rouge était réduit de moitié chez la souris *mdx* alors qu'il était inchangé dans d'autres structures telles que le noyau vestibulaire ou le noyau raphe. Bien qu'aucun lien n'ait été fait, il est intéressant de noter que le noyau rouge est la seule structure testée dans cette

étude impliquée dans le contrôle des mouvements volontaires. Tout comme chez les patients DMD, l'absence de dystrophine chez la souris *mdx* cause des altérations de l'homéostasie calcique et du fonctionnement des neurones de l'hippocampe. De plus, Vaillend et collaborateurs ont montré que l'absence de dystrophine chez les souris *mdx* facilitait la phase initiale de l'induction de la LTP et augmentait la STP (short term potentiation) ainsi que la STD (short term depression) dans la zone CA1 de l'hippocampe alors qu'elle altère profondément les processus de consolidation des mémoires spatiale et de reconnaissance à long terme {Vaillend, 2002 #114; Vaillend, 2004 #115}. L'absence de dystrophine altère l'agrégation des sous-unités $\alpha 1$ et $\alpha 2$ du récepteur GABA_A (γ -aminobutyric acid) dans la zone CA1 de l'hippocampe {Knuesel, 1999 #116}.

2) Les complexes dystrophines-DAPs

a. Les protéines de la superfamille des dystrophines

Contrairement au muscle strié squelettique, tous les produits du gène DMD ont été retrouvés dans le cerveau avec une expression largement prédominante de la Dp71. Malgré l'absence de corrélation entre la position de la mutation et la variation du QI, plusieurs études suggèrent que l'absence des produits courts du gène DMD est prépondérante dans l'apparition des troubles mentaux {Hoffman, 1991 #117; Lenk, 1993 #119; Lenk, 1996 #120; Rapaport, 1991 #118}. Une association entre l'importance des troubles cognitifs et la présence de la mutation au niveau de la Dp71 a ainsi été rapportée {Moizard, 2000 #121}. Les dystrophines ont toutes été observées dans le cerveau, soit dans les neurones soit dans les cellules gliales. La dystrophine a été localisée dans le soma et les dendrites des neurones du cortex et de l'hippocampe ainsi que dans les cellules de Purkinje {Tian, 1996 #122}. Elle est associée avec la membrane post-synaptique des neurones et est considérée comme un composant des densités post-synaptiques (PSD) {Kim, 1992 #124; Lidov, 1990 #123}. La Dp140 et la Dp71 semblent, quand à elles, principalement associées avec les cellules gliales, notamment à proximité des microvaisseaux {Jung, 1993 #125; Jung, 1991 #126}.

L'utrophine est connue pour être exprimée dans le cerveau et localisée dans les extensions des astrocytes entourant les vaisseaux sanguins tout comme l' α -dystrobrevine-1 qui a de plus été observée dans la glie de Bergmann, principales cellules gliales du cervelet.

b. Les DAPs

Plusieurs composants des complexes associés aux dystrophines ont été retrouvés dans le cerveau. L' α - et le β -dystroglycane, les syntrophines, l' α -dystrobrevine-1 et la chaîne $\alpha 2$ de la laminine sont présents à des taux d'expression importants à l'interface glie-vasseaux {Blake, 1999 #127}. L' α -dystroglycane a également été observée dans les neurones où il partage le même patron d'expression subcellulaire que la dystrophine : dans le soma et les dendrites {Tian, 1996 #122}. Différentes isoformes de la β -dystrobrevine ont été découvertes dans le cerveau, en particulier dans les neurones du cortex, de l'hippocampe et du cervelet {Blake, 1999 #127; Blake, 1998 #129; Peters, 1997 #128}. Cette répartition est très similaire à celle de la dystrophine et des dystroglycanes, cependant des différences ont également été observées au niveau du cervelet. La β -dystrobrevine est principalement dans les cellules granulaires et le soma des cellules de Purkinje alors que la dystrophine et les dystroglycanes sont principalement dans le soma et les dendrites des cellules de Purkinje ainsi qu'autour des vaisseaux.

La forte diminution de tous les produits du gène DMD chez la souris *mdx^{3cv}* entraîne une diminution importante de l'expression du β -dystroglycane suggérant l'existence, comme dans le muscle, d'un lien entre une ou plusieurs des dystrophines et le β -dystroglycane. Un tel changement n'a pas été observé chez la souris *mdx*, déficiente uniquement pour la Dp427. Ceci reflète soit que le β -dystroglycane interagit uniquement avec les produits courts de la dystrophine, soit que la méthode de détection n'était pas suffisante étant donné la faible expression de la dystrophine par rapport à la Dp71 dans le cerveau {Greenberg, 1996 #130}.

Alors que l' $\alpha 1$ -, la $\beta 1$ - et la $\beta 2$ syntrophine ont été décrites dans le muscle {Ahn, 1996 #95}, deux autres syntrophines appelées $\gamma 1$ et $\gamma 2$ ont été observées dans le cerveau {Piluso,

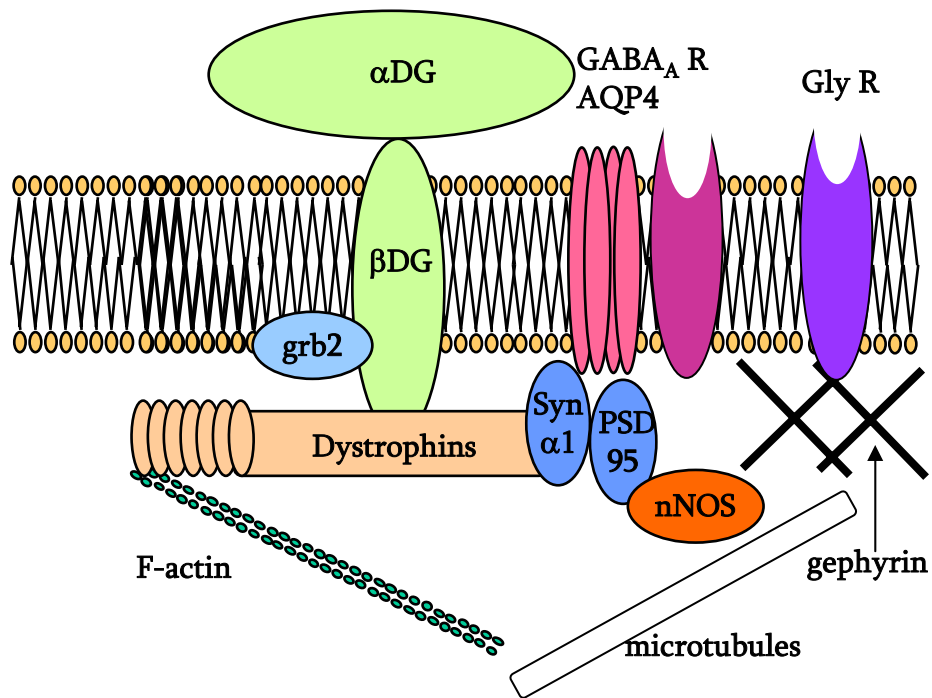


Figure 9 : complexe hypothétique dystrophines/DAPs dans le cerveau responsable de l'agrégation du canal aqueux AQP4, des récepteurs de neurotransmetteurs GABA_A R et Gly R.

2000 #96}. Ces protéines sont capables de lier : i) les membres de la famille des dystrophines {Kachinsky, 1999 #131} par l'un de leurs domaines d'homologie à la pleckstrin (PH2) et leur domaine spécifique (SU : syntrophin unique), ainsi que ii) des canaux sodiques {Gee, 1998 #132}, la nNOS {Brenman, 1996 #133}, des sérines/thréonines kinases {Lumeng, 1999 #102} ou encore la kinase 3 activée par le stress {Hasegawa, 1999 #103} par leurs domaines PDZ (domaine d'interaction protéine-protéine).

c. Les complexes

Dans les neurones, il existerait plusieurs complexes impliquant la dystrophine ou la Dp71 {Gorecki, 1998 #134} avec laquelle pourrait interagir la β -dystrobrevine {Blake, 1999 #127} et les syntrophines. Dans les deux cas, l'absence de dystrophines n'induit pas de modification de la localisation des dystrobrevines ni de leurs interactions avec les syntrophines {Blake, 1999 #127}. En outre, les syntrophines, les deux sous-unités du complexe dystroglycane et les dystrophines Dp427 et Dp71 ont été retrouvées dans les synapses inhibitrices du SNC. Ces protéines sont en particulier présentes dans les terminaisons GABAergiques avec les récepteurs au GABA ainsi qu'une autre protéine liée au cytosquelette, la gephyrine {Brunig, 2002 #135; Levi, 2002 #136} (Figure 9). Cependant, les mécanismes d'agrégation du complexe DGC d'une part, de la gephyrine et des récepteurs au GABA d'autre part semblent indépendants {Brunig, 2002 #135; Levi, 2002 #136}.

Le complexe via les syntrophines pourrait être impliqué dans de nombreuses fonctions parmi lesquelles la régénération musculaire {Hosaka, 2002 #137}, la maturation neuromusculaire {Adams, 2000 #138; Kameya, 1999 #139}, ou encore le transport aqueux {Amiry-Moghaddam, 2003 #140}. Les syntrophines peuvent également directement interagir avec l'actine par leurs domaines PH2 et SU ce qui inhibe la liaison actine-myosine dans le muscle. La réorganisation du cytosquelette régulerait de manière dynamique la localisation subcellulaire des syntrophines. La déphosphorylation des syntrophines induirait leur translocation à la membrane entraînant avec elles des

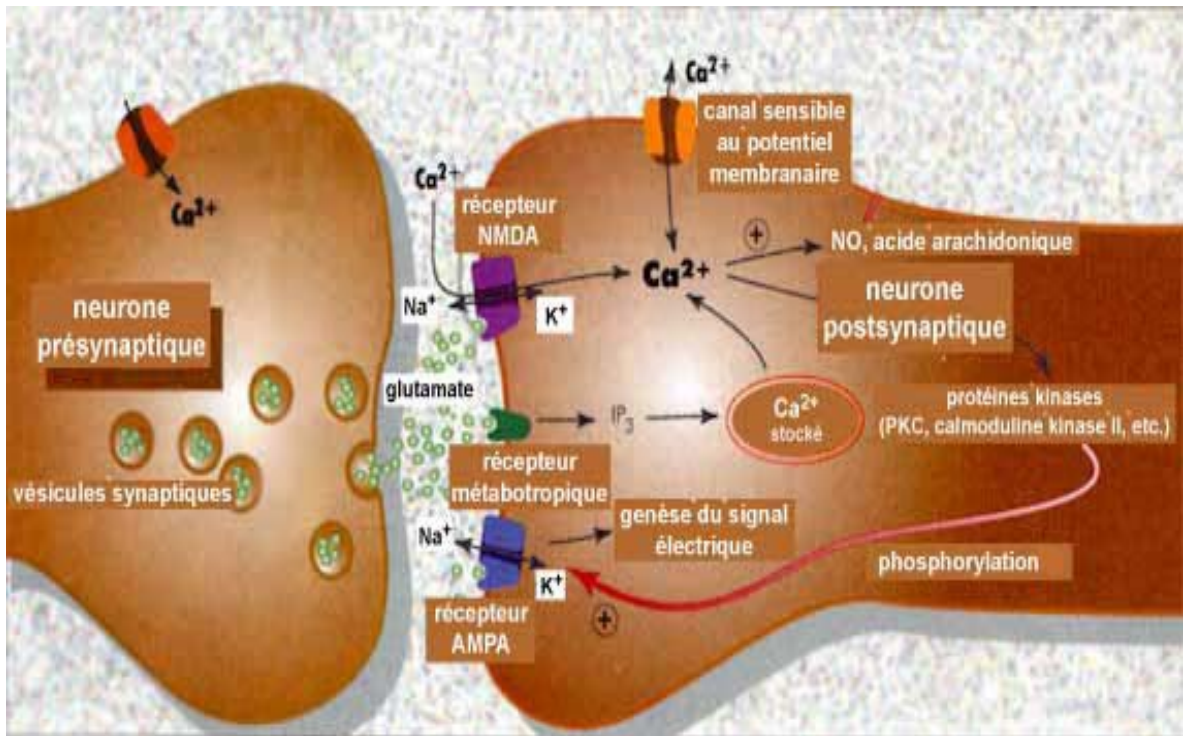


Figure 10 : Schema d'une synapse classique du système nerveux central.

protéines de signalisation qu'elles séquestre raient dans le cytoplasme lorsqu'elles sont phosphorylées telles que les sérine/thréonine kinase ou la calmoduline.

Il a été montré que la dystrophine, la Dp71, certaines syntrophines et les α -dystrobrevines interagissent dans le cerveau avec les canaux potassique Kir2 et Kir4.1. D'autres protéines interagissent avec ce complexe parmi lesquelles des protéines de la famille des guanylate kinases associées à la membrane (MAGUK) telles que la PSD95 (Post synaptic density 95) ou la SAP97 {Leonoudakis, 2004 #141}, les protéines Veli 1 et 3.

L'expression de la Dp71 a été montrée dans les astrocytes {Aleman, 2001 #142; Schofield, 1994 #54}. Une altération du transcrit de la Dp71 a été rapportée chez les patients DMD présentant un dysfonctionnement cérébral sévère {Moizard, 1998 #143} alors qu'une perturbation de l'oligomérisation de la Dp71 a été démontrée dans le cerveau de souris *mdx* {Culligan, 2001 #144}. Il a été montré par co-immunoprécipitation qu'il existait deux complexes impliquant d'un côté la Dp71, l' α -dystrobrevine-1 et les syntrophines, et de l'autre, l'utrophine et l' α -dystrobrevine-1 {Blake, 1999 #127}. Le DGC est associé avec le canal aqueux aquaporin-4 (AQP4) dans le cerveau où l' α 1-syntrophine ancre l'AQP4 de façon polarisée sur la membrane astrocytaire faisant face aux vaisseaux sanguins {Neely, 2001 #145} (Figure 9). La localisation des canaux potassiques et aqueux à la membrane des astrocytes est dépendante de leur interaction avec le complexe Dp71-DAPs et notamment les syntrophines. Plusieurs protéines du DGC ont été localisées dans les cellules endothéliales et les cellules gliales et présentent une baisse de leur niveau d'expression en absence de dystrophine {Ozawa, 1995 #89; Ueda, 2000 #146; Ueda, 2000 #147}. Le canal potassique Kir4.1 s'associe avec le DGC dans les glies via l' α -syntrophine. Il interagit avec un complexe formé notamment de la Dp71, le β -dystroglycane et l' α -syntrophine {Connors, 2004 #148}.

3) Hypothèses fonctionnelles

a. Dans les neurones

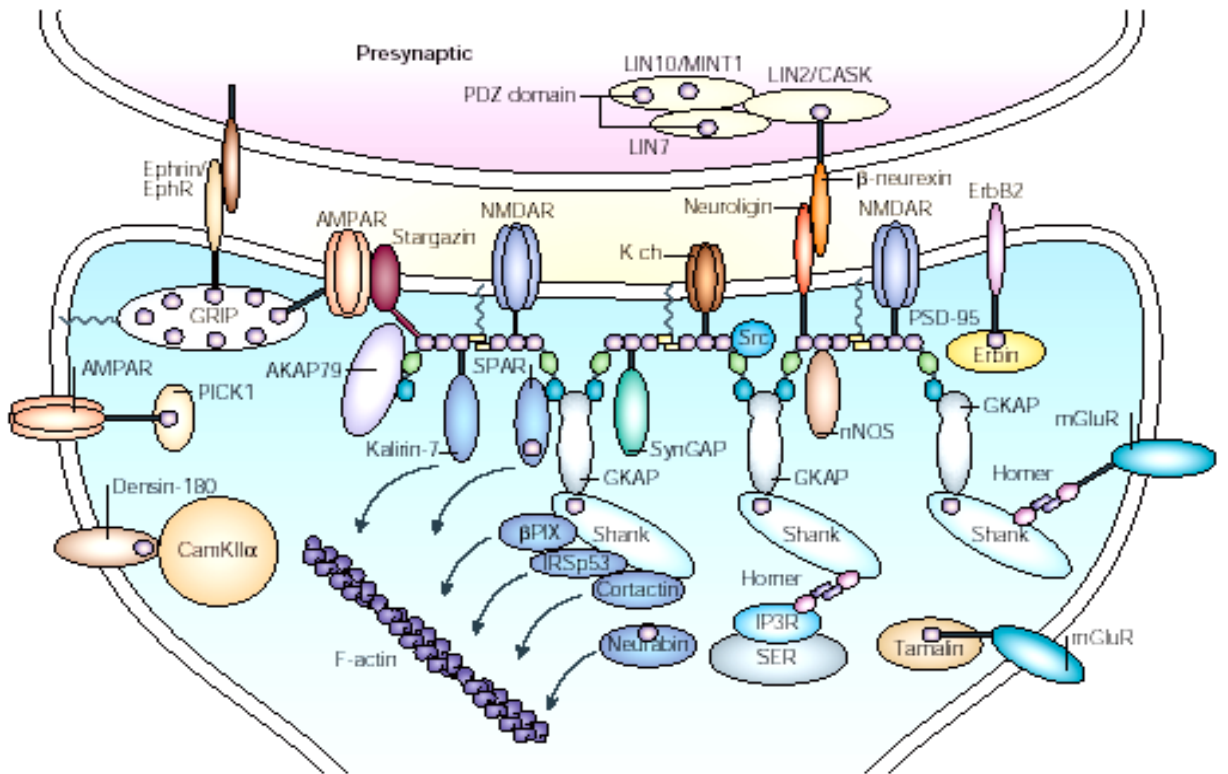


Figure 11 : Schema d'un complexe hypothétique dans les densités post –synaptiques des synapses excitatrices (D'après Kim, 2004).

Ces données suggèrent que la dystrophine pourrait être très importante dans le cerveau où elle serait impliquée dans le fonctionnement de la synapse ainsi que dans son architecture. La synapse est une structure qui nécessite une organisation parfaite pour :

- La synthèse, le stockage, la libération et la récupération des neurotransmetteurs au niveau pré-synaptique.
- La réception et la transduction du signal du côté post-synaptique (Figure 10).

Cette organisation implique une quantité de protéines d'échafaudage pour assurer un assemblage approprié ainsi qu'une localisation et un fonctionnement correct de l'appareil synaptique. On distingue deux sortes de synapses selon le type de neurotransmetteurs utilisés : les synapses inhibitrices et les synapses excitatrices (v. § III-6).

Les différents travaux effectués sur la synapse excitatrice ont permis la mise en évidence de nombreuses protéines à domaine PDZ, en particulier dans les densités post-synaptiques (PSD). Parmi ces protéines, ont été mises en évidence des sous-unités de récepteurs au glutamate, des molécules de signalisation et des protéines d'échafaudage [Husi, 2000 #135]. Plusieurs protéines de la famille des MAGUKs ont été observées dans les PSD, en particulier la PSD95 qui, à l'image du complexe DGC dans le muscle, est capable d'interagir avec la nNOS [Brenman, 1996 #133]. Cependant, aucune étude n'a pu montrer la présence de l'une des dystrophines dans les densités post-synaptiques des synapses excitatrices. L'ensemble de ces travaux a conduit à l'élaboration d'un complexe hypothétique de protéines à domaine PDZ responsable de la mise en place et du maintien de la synapse excitatrice (Figure 11) sans l'intervention d'une protéine de la superfamille des dystrophines.

Bien que les densités post-synaptiques des synapses inhibitrices soient moins bien connues, il est établi que les syntrophines, les dystroglycane et les dystrophines Dp427 et Dp71 sont des éléments majeurs des densités post-synaptiques GABAergiques de l'hippocampe au même titre que la gephyrine. Etant donné que ces protéines sont exprimées dans des structures du cerveau montrant les plus hauts taux de plasticités (le

cortex cérébral, l'hippocampe et le cervelet), le complexe DGC pourrait avoir deux fonctions principales :

- Maintenir la structure du réseau, une fois que les processus d'apprentissage sont terminés, en stabilisant l'appareil synaptique. En effet, il a été montré que l'expression de la dystrophine augmente tardivement au cours du développement, parallèlement à la diminution de la plasticité synaptique {Knuesel, 1999 #116}.
- Fournir un échafaudage moléculaire permettant des modifications des agrégats de récepteurs GABA_A sans perdre l'appareil post-synaptique, comme cela est requis dans des circuits possédant une grande plasticité synaptique.

Une colocalisation a été observée entre la dystrophine et le récepteur GABA_A. Une diminution significative des agrégats de ce récepteur a été constaté dans le cervelet et l'hippocampe de souris *mdx*, mais pas dans le striatum où la dystrophine ne semble pas exprimée. Au niveau de la zone CA1 de l'hippocampe, l'absence de dystrophine et la diminution du nombre d'agrégats de récepteurs GABA_A qui en découle pourrait être à l'origine de la facilitation de la STP et la STD en diminuant la modulation inhibitrice jouée par ceux-ci {Vaillend, 2002 #114}. Par analogie avec le rôle de la dystrophine dans le muscle, l'hypothèse principale est que la dystrophine serait impliquée dans la stabilisation de l'élément post-synaptique pour maintenir une certaine architecture du réseau après la maturation ou suite à des phénomènes de plasticité synaptique {Brunig, 2002 #135}.

Toujours par analogie avec son rôle à la jonction neuromusculaire {Adams, 2000 #138; Grady, 2000 #150; Jacobson, 2001 #151}, le DGC pourrait être impliqué dans la régulation de la stabilité des récepteurs GABA_A ou dans d'autres aspects de la réponse post-synaptique. D'autre part, la localisation de la dystrophine et du β -dystroglycane du côté présynaptique, comme dans les photorécepteurs ou les synapses GABAergique du SNC, pourrait indiquer que le DGC soit impliqué dans la régulation de la libération des neurotransmetteurs {Ueda, 2000 #146; Ueda, 1997 #152}, GABA {Levi, 2002 #136}.

L'expression, la localisation et l'adressage des canaux ioniques sont primordiaux et de ce fait particulièrement régulés. Cette régulation est possible par le biais d'interactions avec des protéines intracellulaires qui vont permettre :

- l'adressage spécifique des canaux à des domaines membranaires bien précis
- le recrutement de molécules de signalisation
- la stabilisation des canaux à la membrane
- des modifications post-traductionnelles des canaux.

Dans le cœur ainsi que dans le cerveau de rat, des canaux potassiques de la famille Kir interagissent avec des protéines de la famille MAGUK (PSD95, SAP97...) mais aussi avec des DAPs comme les syntrophines $\alpha 1$, $\beta 1$ et $\beta 2$, la dystrophine et la Dp71, et l' α -dystrobrevine. Le niveau d'intervention du complexe dystrophine-DAPs dans la régulation de la localisation des canaux potassiques reste à éclaircir mais ils semblent y jouer un rôle très important {Leonoudakis, 2004 #141}.

La nNOS est une protéine essentielle dans la signalisation intracellulaire, la vasodilatation, la neurotransmission et la cytotoxicité. Il a été montré qu'elle pouvait interagir dans le muscle avec le complexe DGC {Brenman, 1996 #133}. Elle a été mise en évidence dans plusieurs structures du cerveau de rat, le bulbe olfactif, le cervelet et certains noyaux hypothalamiques {Hashida-Okumura, 1999 #153}. Des protéines de la famille MAGUK telle que la PSD95 ou la PSD93 ainsi qu'un membre du DGC bien connu l' $\alpha 1$ -syntrophine ont également été localisés dans ces structures. Ces trois protéines possèdent un ou plusieurs domaines PDZ qui leur permettent d'interagir ensemble, la nNOS présentant une affinité plus importante pour l' $\alpha 1$ -syntrophine que pour la PSD95. L' $\alpha 1$ -syntrophine, qui possède un site de liaison différent pour la dystrophine, va jouer le rôle d'une protéine modulaire permettant l'interaction de la nNOS avec le complexe DGC. Ces résultats montrent bien le rôle important que peut jouer le complexe associé aux dystrophines dans la transduction des signaux à la membrane, en intervenant dans la localisation des protéines de signalisation intracellulaire. Les mécanismes qui régulent la

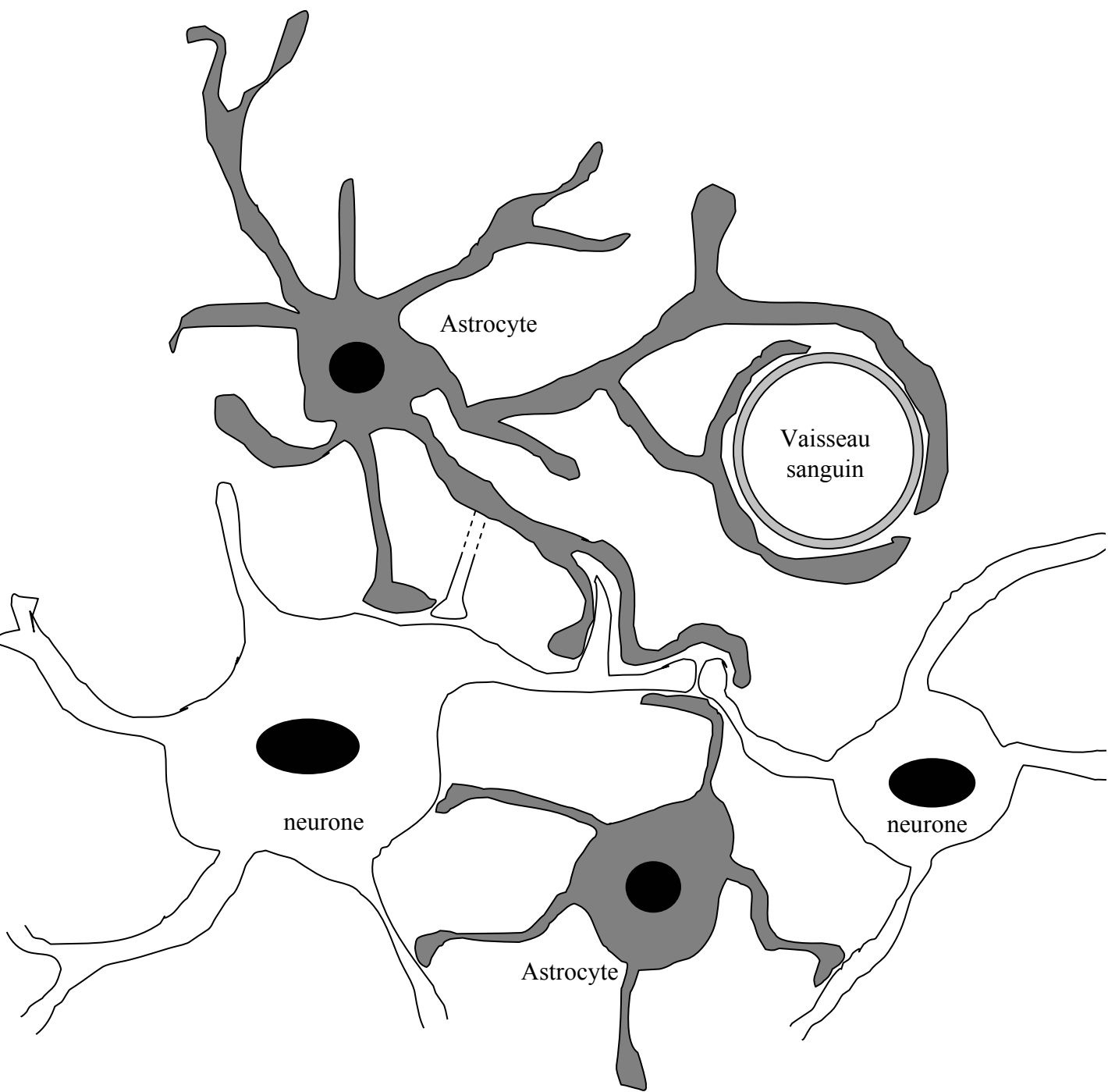


Figure 12 : Localisation des astrocytes autour des vaisseaux sanguins, où ils participent la barrière hémato-encéphalique.

localisation subcellulaire de la nNOS varient selon le type cellulaire et restent mal connus, mais le DGC via l' α 1-syntrophine semble clairement y jouer un rôle crucial.

b. Dans les cellules gliales, astrocytes et oligodendrocytes

Les cellules gliales sont divisées en deux classes majeures : la microglie, composée des phagocytes, et la macroglie composée des oligodendrocytes, des cellules de Schwann et des astrocytes. La macroglie se caractérise par d'abondantes extensions qui vont couvrir la majorité des synapses du SNC. Certaines de ces extensions forment des « pieds » à la surface du cerveau et de la moelle épinière donnant lieu à une membrane gliale, alors que d'autres « pieds » vont entourer les vaisseaux sanguins formant un feuillet périvasculaire (Figure 12). Les astrocytes sont impliqués dans le maintien de la barrière hémato-encéphalique (ou « blood brain barrier » :BBB), la régulation de l'homéostasie aqueuse et ionique, le métabolisme des acides aminés neurotransmetteurs ainsi que l'apport nutritionnel et énergétique des neurones {Simard, 2004 #189}. Le maintien d'un environnement osmotique stable est essentiel pour l'activité normale du SNC.

i) Maintien de la barrière hémato-encéphalique

La BBB est un système glio-vasculaire complexe qui contrôle sélectivement les échanges entre le sang et le tissu nerveux. Les astrocytes sont doublement impliqués dans le maintien de cette barrière. D'une part, ils induisent la formation de jonctions serrées par les cellules endothéliales et d'autre part ils possèdent des systèmes enzymatiques et de nombreux transporteurs permettant le contrôle des échanges {Janzer, 1987 #190; Risau, 1992 #191; Wolburg, 2002 #193; Wolburg, 1994 #192}. Les astrocytes modulent le développement des jonctions serrées mais aussi l'expression des protéines associées à ces jonctions telle que l'une des protéines homologues de la famille MAGUK : la zonula ocludens 1 (ZO-1) {Gardner, 1995 #195; Krause, 1991 #194}. Ils contrôlent également partiellement la perméabilité de la BBB en régulant les flux aqueux par l'intermédiaire d'un canal aqueux spécifique : l'aquaporin-4 (AQP4). Ce canal est exprimé par les cellules ependymogliales et les pieds périvasculaires des astrocytes {Frigeri, 1995 #196; Nielsen, 1997 #197} dans une spécialisation membranaire appelée « orthogonale arrays of

particles » (OAPs) {Rash, 1998 #198}. Les souris dystrophiques *mdx* présentent une BBB structurellement et fonctionnellement altérée, avec une augmentation de la perméabilité vasculaire et de graves perturbations ultrastructurales et moléculaires des cellules gliales et endothéliales {Nico, 2003 #154}. Ceci peut être le reflet de la réduction très importante de l'expression de la protéine ZO-1, induisant une altération du recrutement des protéines des jonctions serrées des cellules endothéliales {Nico, 2004 #155}. Cela peut également provenir d'une diminution importante du niveau d'expression de l'AQP4 qui, dans des conditions normales, régule la production de fluide cérébrospinal ainsi que la perméabilité aqueuse {Frigeri, 1995 #196; Nagelhus, 1998 #199}. Cette augmentation de la perméabilité de la BBB pourrait être particulièrement impliquée dans la pathogénie des dysfonctions neuronales présentées par les patients DMD {Nico, 2003 #154; Nico, 2004 #155}.

ii) Régulation de l'homéostasie aqueuse et ionique

Les cellules gliales sont des éléments essentiels dans la transmission synaptique par leur implication dans la clairance potassique. Lors de leur activation, les neurones libèrent du potassium dans le milieu extracellulaire. Les cellules gliales vont être responsables de l'élimination de cet excès de potassium afin d'éviter les interférences avec la signalisation nerveuse. Le DGC formé notamment de la Dp71 et du β -dystroglycane est responsable de la localisation des canaux potassiques Kir4.1 {Connors, 2004 #148} et aqueux AQP4 {Amiry-Moghaddam, 2003 #140}. Ces deux protéines forment un complexe qui induit un couplage fonctionnel entre le transport de l'eau et l'élimination du potassium par les cellules gliales. La diminution de l'espace extracellulaire qui intervient autour d'une synapse active est due à une augmentation de la « driving force » des transporteurs du bicarbonate suite à la dépolarisation membranaire. Cette augmentation du transport du bicarbonate et la diminution du volume extracellulaire, due au passage de l'eau via l'AQP4, doit permettre l'accélération de l'évacuation du CO₂ et du potassium, assurant le retour à la normale des concentrations ioniques {Nagelhus, 2004 #200}. Les perturbations neurologiques constatées chez les patients et les souris déficientes pour les dystrophines pourraient être une conséquence des anomalies de la régulation de l'homéostasie potassique qui entraîneraient des troubles de la transmission nerveuse.

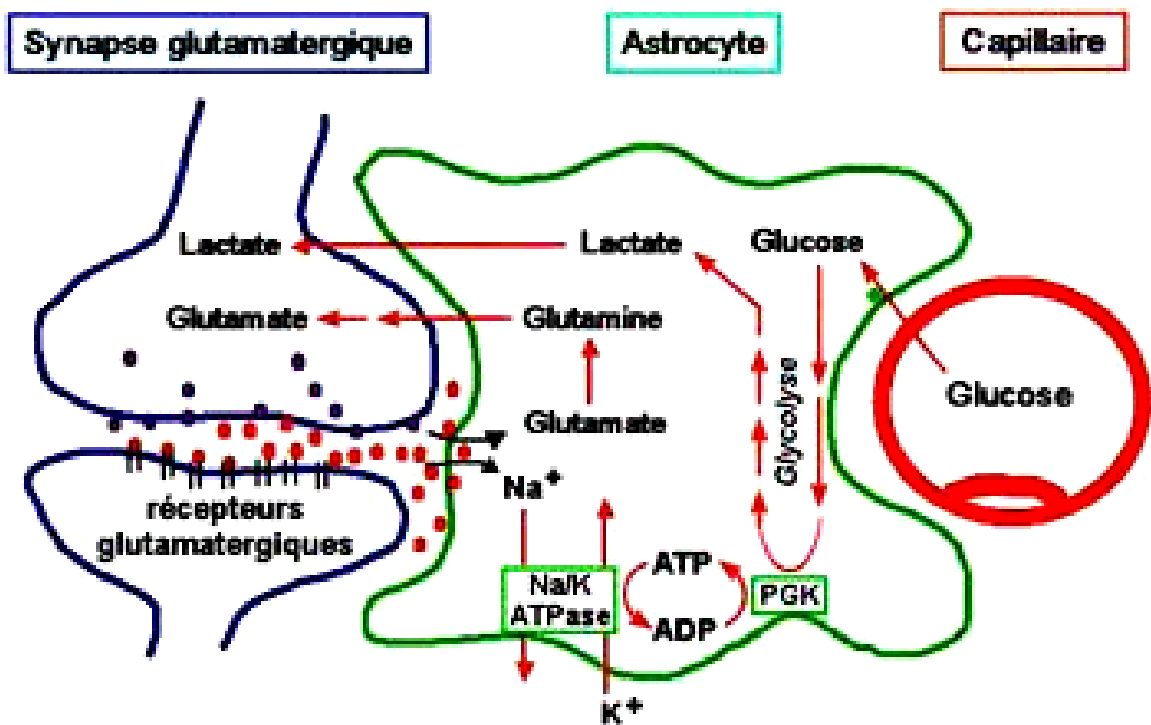


Figure 13 : Schema du rôle nutritionnel joué par les cellules gliales près de la synapse glutamatergique.

iii) Régulation du métabolisme des acides aminés neurotransmetteurs

Le glutamate est le principal acide aminé exciteur dans le SNC. L'une des tâches principales des cellules gliales est de maintenir une concentration faible du glutamate extracellulaire ($<1\mu\text{M}$). La récupération du glutamate par les astrocytes stoppe son effet exciteur et évite que sa concentration n'atteigne un seuil où cette excitation devient toxique (phénomène d'excitotoxicité) {Choi, 1988 #203; Oliet, 2001 #205; Rothman, 1986 #201; Sonnewald, 1997 #204}. Cette fonction astrocytaire est liée à l'expression de transporteurs du glutamate de haute affinité, GLT1 et GLAST {Rauen, 1998 #206; Schmitt, 1996 #207}, et à leur localisation à proximité du lieu de libération du glutamate, la synapse {Rauen, 1998 #206; Rauen, 2000 #208}. A ce jour, aucune interaction entre ces transporteurs et le DGC n'a été mise en évidence, cependant les mécanismes qui permettent leur localisation sont encore mal connus.

iv) Soutien nutritionnel et énergétique des neurones

L'un des nombreux rôles rempli par les cellules gliales dans le SNC est l'apport d'énergie aux neurones en fonction de leurs besoins métaboliques (Figure 13). Ainsi, lors de la libération de glutamate par les neurones, la récupération de celui-ci par les astrocytes via les transporteurs GLAST et GLT1 entraîne l'augmentation de la concentration sodique intracellulaire, induisant l'activation de la pompe Na^+/K^+ ATPase et la métabolisation du glucose en lactate qui sera libéré pour être utilisé par les neurones {Pellerin, 2004 #209}. La navette du lactate entre les astrocytes et les neurones est possible grâce à la colocalisation des transporteurs du glutamate et de la pompe Na^+/K^+ ATPase à la membrane plasmique des astrocytes, ainsi que la localisation des transporteurs de monocarboxylates MCT1 et MCT4 à la membrane des astrocytes et MCT2 à la membrane des neurones {Debernardi, 2003 #212; Hanu, 2000 #210; Rafiki, 2003 #211}. Aucune interaction directe n'a jamais été montrée entre ces différentes protéines et le complexe DGC cependant leur localisation proche pourrait l'indiquer.

La régulation des éléments extracellulaires tels que le glutamate ou les ions, ainsi que les mouvements aqueux et l'apport énergétique sont des points cruciaux dans le bon fonctionnement d'un tissu en condition « normale » mais sont exacerbés lors de troubles pathologiques. L'un des phénomènes physiopathologiques majeurs qui perturbent chacun de ces éléments est l'ischémie. En effet, lors d'un épisode ischémique transitoire ou chronique, la diminution du flux sanguin induit des perturbations des apports nutritionnels et énergétiques qui vont avoir pour conséquence un stress métabolique majeur. La diminution du métabolisme va entraîner un arrêt des transports ioniques dépendant de l'ATP (adénosine triphosphate) ainsi qu'un accroissement de la quantité d'eau intracellulaire, induisant une diminution de l'efficacité des transporteurs de neurotransmetteurs, en particulier de ceux du glutamate, et donc une accumulation des neurotransmetteurs dans la fente synaptique {Kogure, 1980 #214; Levy, 1977 #213}. Il se produit alors, entre autres, un phénomène appelé excitotoxicité qui correspond à une activation continue des récepteurs par leur agoniste pouvant aboutir à la mort neuronale. Les cellules gliales vont alors être particulièrement importantes pendant mais aussi après l'épisode, afin de réguler ou de ramener à la normale l'homéostasie.

B) Troubles de la vision : phénotype ERG

Nous venons de décrire les deux phénotypes, qui ont été observés en premier lieu chez les patients atteints de la myopathie de Duchenne, que sont la dégénérescence musculaire progressive et les troubles cognitifs. Cependant, l'étude de plus en plus poussée de la DMD a mené à la mise en évidence d'autres troubles liés à l'absence d'un ou plusieurs produits du gène DMD, parmi lesquels une perturbation de la neurotransmission rétinienne. La rétine, partie intégrante du SNC, est l'organe neurosensoriel qui permet la transformation de l'information lumineuse en signal électrique et sa transmission vers le cerveau via le nerf optique (v. § III-3). L'activité électrique des neurones de la rétine en réponse à une stimulation lumineuse peut être enregistrée sous la forme de l'électrorétinogramme (ERG). Il s'agit de la variation du potentiel trans-rétinien qui correspond à la sommation algébrique et temporelle de l'activité électrique des neurones

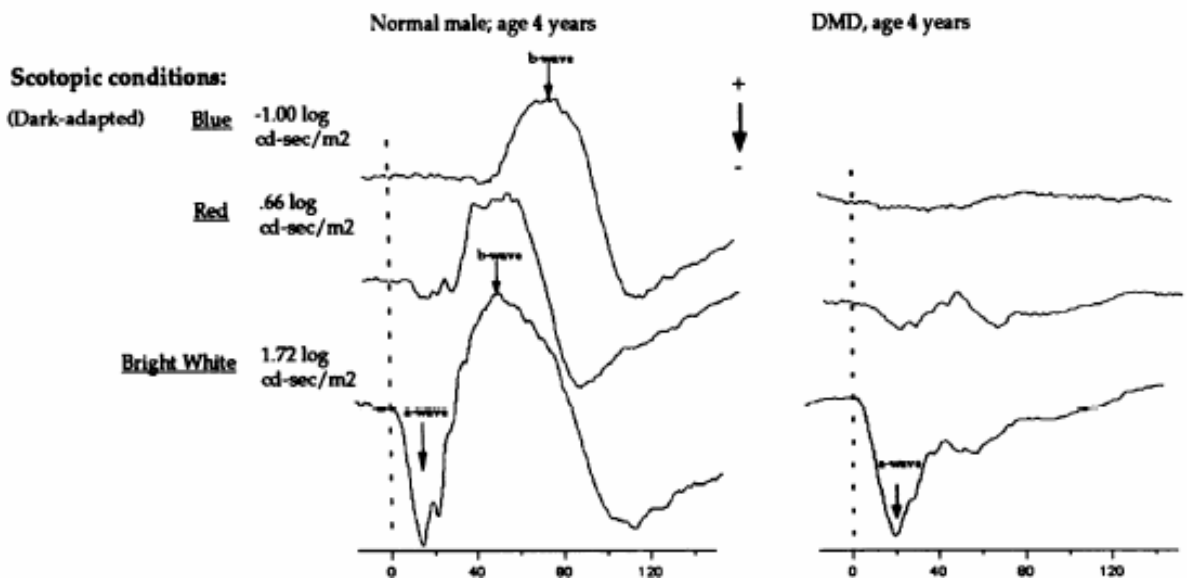


Figure 14 : Exemple d'électrorétinogramme enregistré en conditions scotopiques chez un enfant normal et un patient DMD de 4 ans. (Fitzgerald KM, J Clin Invest 1994)

wild	mdx	KoDp260	KoDp71	mdx ^{3cv}
Dp427 Dp260 Dp140 Dp71	-Dp427 Dp260 Dp140 Dp71	Dp427 -Dp260 Dp140 Dp71	Dp427 Dp260 Dp140 -Dp71	↘ Dp427 ↘ Dp260 ↘ Dp140 ↘ Dp71





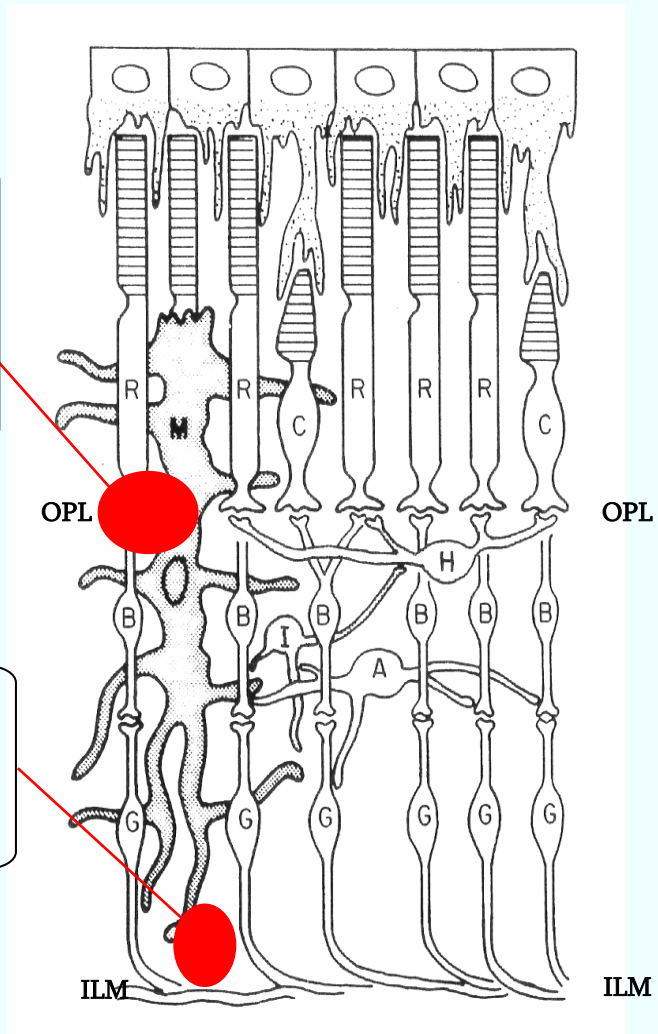
				
ERG phenotype	-	-	-	+

Figure 15 : Tableau du phénotype ERG en fonction des différentes souches de souris mutantes pour les dystrophines connues et testées.

PROTEINS

Dystrophine
Dp260
Dp140
dystrobrevines

Dp71
Utrophine



OPL: outer plexiform layer; ILM: inner limiting membrane

Figure 16 : Localisation des différents produits du gène DMD et de l'utrophine dans la rétine de rat. (OPL: outer plexiform layer; ILM: inner limiting membrane)

de la rétine. Quatre composantes ont été définies dans cet enregistrement : les ondes a, b, c et d (v. § III-6-B-2).

1) Description

Au milieu des années 1990, plusieurs études ont mis en évidence une perturbation de l'ERG en condition scotopique (d'adaptation à l'obscurité) chez plus de 80% des patients DMD {Cibis, 1993 #156; Sigesmund, 1994 #157}. Cette altération de la neurotransmission rétinienne se traduit par l'absence de l'onde b de l'ERG (Figure 14). Par la suite, d'autres travaux ont montré que les patients ayant des mutations dans les parties plus distales du gène présentaient les perturbations de l'ERG les plus sévères, suggérant une implication accrue des produits courts dans la neurotransmission rétinienne {De Becker, 1994 #158; Fitzgerald, 1999 #22; Pillers, 1999 #20; Pillers, 1999 #50}. L'étude des différents modèles murins de la DMD semblait confirmer cette hypothèse. Alors que les souris déficientes pour la Dp427 (*mdx*), Dp427 et Dp260 (*mdx^{2cv}*), ou Dp427, Dp260 et Dp140 (*mdx^{4cv}*) ne présentent pas les perturbations de l'ERG observées chez les patients DMD, la souche de souris *mdx^{3cv}*, qui souffre d'une diminution très importante de l'expression de tous les produits du gène DMD {Daloz, 2001 #159}, possède une altération de l'onde b similaire à celle constatée chez les patients DMD (Figure 15).

2) Complexe dystrophines-DAPs

Il a été montré dans notre laboratoire ainsi que par d'autres groupes que tous les produits du gène DMD, à l'exception de la Dp116, sont exprimés dans la rétine et présentent un patron d'expression différentiel {Claudepierre, 1999 #26; Howard, 1998 #161; Rodius, 1997 #160} (Figure 16). Alors que les Dp427, Dp260 et Dp140 sont exprimées au niveau des neurones de la première synapse de la rétine, la Dp71 est uniquement exprimée par la principale cellule gliale de la rétine : la cellule gliale de Müller (CGM) {Claudepierre, 1999 #26}. La localisation cellulaire exacte des dystrophines Dp427, Dp260 et Dp140 au niveau de la première synapse de la rétine est encore débattue. En effet, des études suggèrent une localisation post-synaptique des dystrophines Dp427, Dp260 et Dp140 chez le lapin et le bovin {Koulen, 1998 #162; Schmitz, 1993 #163}, alors

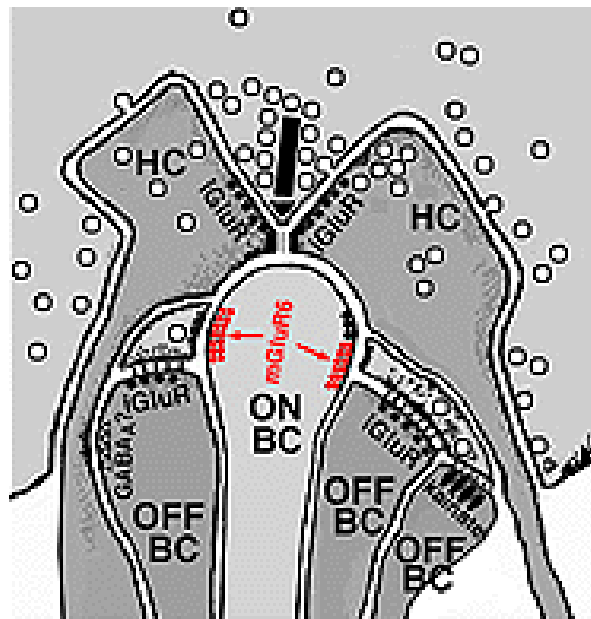


Figure 17 : Schéma de la synapse des cônes. Implication du récepteur métabotrope au glutamate mGluR6

que d'autres les localisent uniquement du côté pré-synaptique {Blank, 1999 #164; Ueda, 1997 #152}. Différents travaux menés au sein de notre laboratoire suggèrent que la Dp260 serait principalement post-synaptique alors que la Dp427 et la Dp140 seraient principalement pré-synaptiques (Bordais, en préparation). Un autre membre de la superfamille des dystrophines, l'utrophine, a été identifiée dans la rétine, et a été localisée comme la Dp71 dans les CGM {Claudepierre, 1999 #26}.

De manière intéressante, diverses études ont aussi mis en évidence l'expression de différents composants du complexe DGC dans la rétine. Ainsi, le β -dystroglycane a été rapidement localisé dans la rétine {Montanaro, 1995 #165; Ueda, 1998 #166} et il a été montré dans notre laboratoire que les CGM de rat exprimaient la Dp71, le β -dystroglycane, l' α 1-syntrophine ainsi que les δ - et γ -sarcoglycane, ces protéines pouvant interagir et former un complexe dans les CGM en culture {Claudepierre, 2000 #24; Claudepierre, 2000 #25}. Ces protéines ont pu être localisées plus précisément au niveau du pied des cellules gliales de la rétine, près du corps vitré, mais aussi à proximité des vaisseaux sanguins. Des doubles marquages sur des CGM en culture ont permis de montrer que la Dp71 était distribuée en agrégats le long du cytosquelette d'actine, suggérant une interaction possible entre le complexe formé par la Dp71 et le cytosquelette d'actine, à l'image de ce qui se passe dans le muscle autour de la dystrophine {Claudepierre, 2000 #24}.

3) Hypothèses fonctionnelles

Deux hypothèses ont été émises quant à l'origine de l'onde b de l'ERG. Toutes deux sont liées à la première synapse de la rétine, entre les photorécepteurs et les neurones secondaires, entourée par les cellules gliales de Müller.

a. Dans les neurones

L'origine de l'onde b de l'ERG a d'abord été attribuée aux neurones secondaires de la rétine, les cellules bipolaires, et en particulier aux cellules bipolaires ON {Hashimoto, 1961 #167}. En effet, ces dernières expriment le récepteur métabotrope au glutamate mGluR6

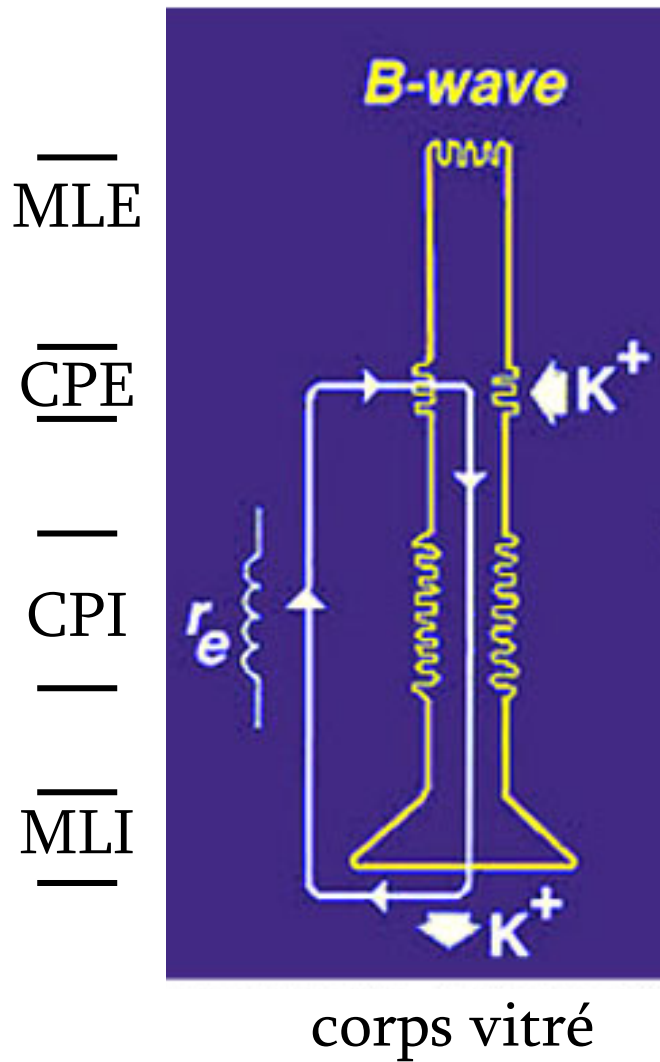


Figure 18 : Schéma du phénomène de potassium siphoning effectué par la cellule gliale de Müller (MLE: membrane limitante externe, CPE: couche plexiforme externe, CPI: couche plexiforme interne, MLI: membrane limitante interne)

(Figure 17) dont l'invalidation entraîne la perte de l'onde b de l'ERG {Masu, 1995 #168; Nomura, 1994 #169}. Comme nous l'avons mentionné précédemment, la fonction et même la localisation cellulaire des trois produits du gène DMD présents dans cette partie de la rétine restent à éclaircir. Selon leur localisation les dystrophines peuvent avoir deux fonctions :

- Du coté pré-synaptique, les dystrophines pourraient être responsables de la localisation de canaux ioniques, en particulier les canaux calciques impliqués dans la libération des neurotransmetteurs lors de l'activation neuronale. Elles pourraient également être impliquées dans la modulation de l'information par les cellules horizontales. Elles pourraient aussi participer à la localisation de récepteurs de neurotransmetteurs inhibiteurs dans les photorécepteurs, à l'image de leur fonction dans les densités post-synaptiques GABAergiques du SNC.
- Du coté post-synaptique, elles pourraient être responsables de la localisation et l'agrégation des canaux ioniques ou des récepteurs de neurotransmetteurs tels que le mGluR6.

Dans les deux cas, leur absence pourrait entraîner une déstabilisation des protéines, qui serait à l'origine des perturbations de la neurotransmission rétinienne observées chez les patients DMD.

b. Dans les cellules gliales de Müller

L'onde b a également été en partie attribuée aux CGM, du fait de leur action dans l'élimination du potassium libéré par les neurones lors de leur activation (Newman, 1984). En effet, les CGM vont récupérer aux abords de la synapse le potassium et les autres produits libérés, pour les diriger vers la circulation sanguine ou le corps vitré. Ceci a pour but de rétablir l'homéostasie rétinienne le plus rapidement possible et ainsi permettre à la rétine de répondre à une stimulation ultérieure. Selon cette hypothèse, le courant potassique généré par les CGM serait responsable d'une amplification de l'onde b (Figure 18). L'une des protéines principales dans ce phénomène appelé « potassium siphoning » est

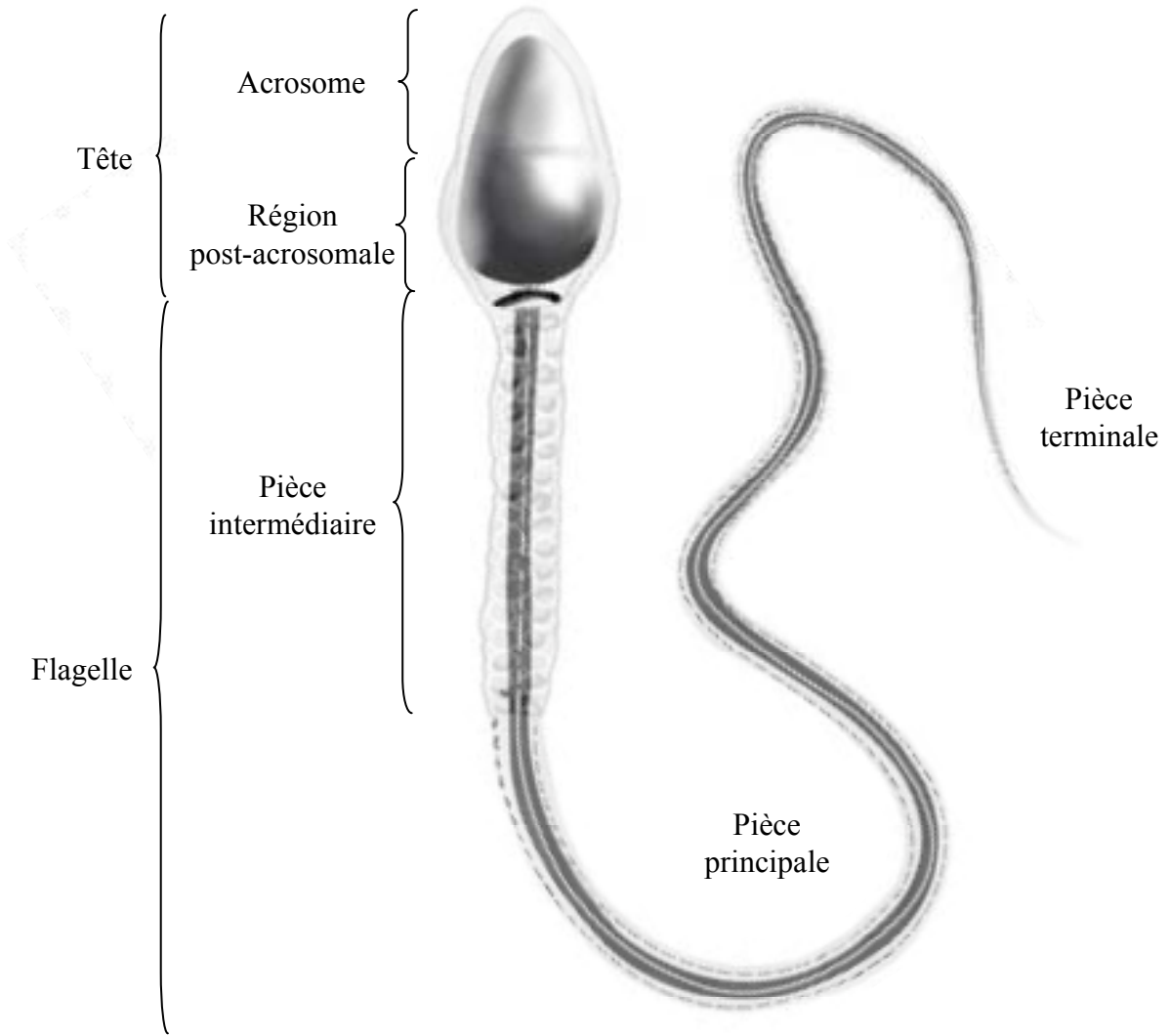


Figure 19 : Morphologie du spermatozoïde

le canal potassique Kir4.1. La Dp71 ainsi que le β -dystroglycane possèdent une localisation similaire à cette protéine. Ces trois protéines ont été localisées au niveau des pieds des CGM et autour des vaisseaux sanguins suggérant une possible interaction entre elles. A l'image de ce qui se passe dans le cerveau, l'absence de Dp71 pourrait ainsi entraîner une perturbation de l'élimination du potassium à l'origine de l'onde b de l'ERG.

Cependant de récentes études ont montré que les souris déficientes pour le canal potassique Kir4.1 ne présentent aucune altération de l'onde b de l'ERG {Kofuji, 2000 #170}. Ce travail ainsi que des études montrant que l'augmentation du potassium extracellulaire n'avait que peu d'effet sur la génération de l'onde b montrent bien que les CGM ont une implication limitée dans la génération de l'onde b.

C) Troubles de l'audition

L'audition, un autre système neurosensoriel semble être affecté par l'absence de dystrophines. Une affection génétique dénommée DFN4 pour « deafness » (surdité) a été mise en évidence récemment {Pfister, 1998 #171}. Cette affection est certainement due à un déficit en dystrophines puisque le locus de la mutation a été localisé au niveau de celui du gène DMD {Pfister, 1998 #171}. Les patients atteints développent également des troubles de la neurotransmission rétinienne identiques à ceux mentionnés précédemment {Pfister, 1999 #172}. Cependant il est à noter que les patients ne présentent pas de dégénérescence musculaire comme les patients DMD.

Dodson et coll. ont rapporté l'expression de Dp427 et Dp116 au niveau de la cochlée {Dodson, 1995 #173}. L'étude des modèles animaux de la DMD n'a jusqu'ici démontré aucun déficit cochléaire {Pillers, 1999 #174}.

6) Autres phénotypes :

Le système musculaire et le système nerveux ne sont pas les seuls organes, tissus ou types cellulaires dont le fonctionnement est altéré par l'absence de dystrophines. De nombreuses études menées actuellement tendent à mettre en évidence une importance

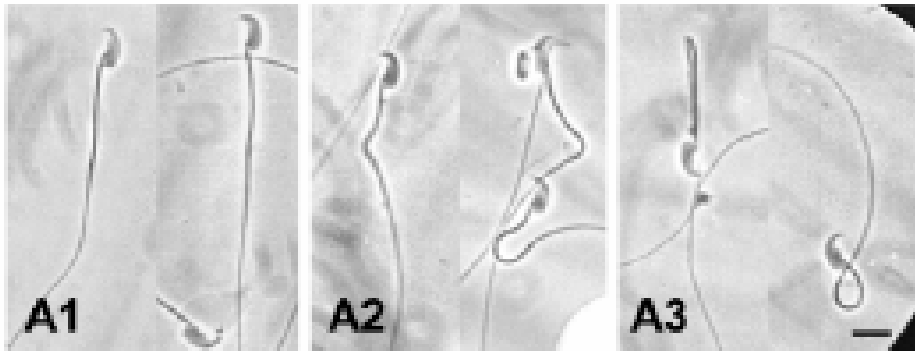


Figure 20 : Morphologie des spermatozoïdes chez les souris *mdx^{3cv}*. Les spermatozoïdes peuvent avoir une morphologie classique (A1), ou une morphologie altérée : flagelle recourbé (A2) ou flagelle « entortillé » (A3).

grandissante des dystrophines dans la quasi-totalité des tissus, organes ou cellules étudiés. A l'image des perturbations mentionnées dans le système nerveux central, la plupart de ces manifestations ne sont pas liées à la dystrophine mais au produit du gène DMD majoritaire en dehors du tissu musculaire : la Dp71. Ainsi il a été récemment découvert des troubles de reproduction ainsi que des troubles d'adhésions plaquettaires.

A) Troubles de la reproduction

1) Description

Bien qu'aucune altération de la reproduction n'ait jamais été rapportée chez les patients DMD, probablement lié à leur faible espérance de vie, la souris *mdx^{3cv}* présente un faible taux de reproduction {Cox, 1993 #175}. Cette observation a été corrélée avec une sévère altération de la morphologie des flagelles des spermatozoïdes (Figure 19-20). Ces derniers présentent un flagelle anormalement recourbé ou « entortillé » se traduisant par une perte de motilité des spermatozoïdes qui effectuent un mouvement vibratoire du flagelle ne générant pas de déplacement {Hernandez-Gonzalez, 2005 #176}.

2) Complexe Dp71-DAPs

Le seul produit du gène DMD à avoir été identifié dans les spermatozoïdes est la Dp71 {Hernandez-Gonzalez, 2001 #177; Hernandez-Gonzalez, 2005 #176}. Cette protéine est localisée dans la pièce moyenne et la région post-acrosomale des spermatozoïdes. L'Up71, un des produits courts de l'utrophine, a également été identifié dans les spermatozoïdes. Dans les spermatozoïdes normaux, l'Up71 se trouve localisée dans la région post-acrosomale, alors qu'en absence de Dp71 elle est surexprimée et redistribuée dans la pièce moyenne ainsi que dans la « tête » des spermatozoïdes.

De façon intéressante les auteurs ont rapporté la présence de plusieurs protéines du DGC parmi lesquelles le β -dystroglycane et l' α 1-syntrophine, mais avec des localisations subcellulaires différentes. Le β -dystroglycane est uniquement localisé dans la membrane plasmique de la pièce moyenne du flagelle ainsi que dans la région post-acrosomale. De son côté, l' α 1-syntrophine est à la fois à la membrane plasmique de ces deux régions mais

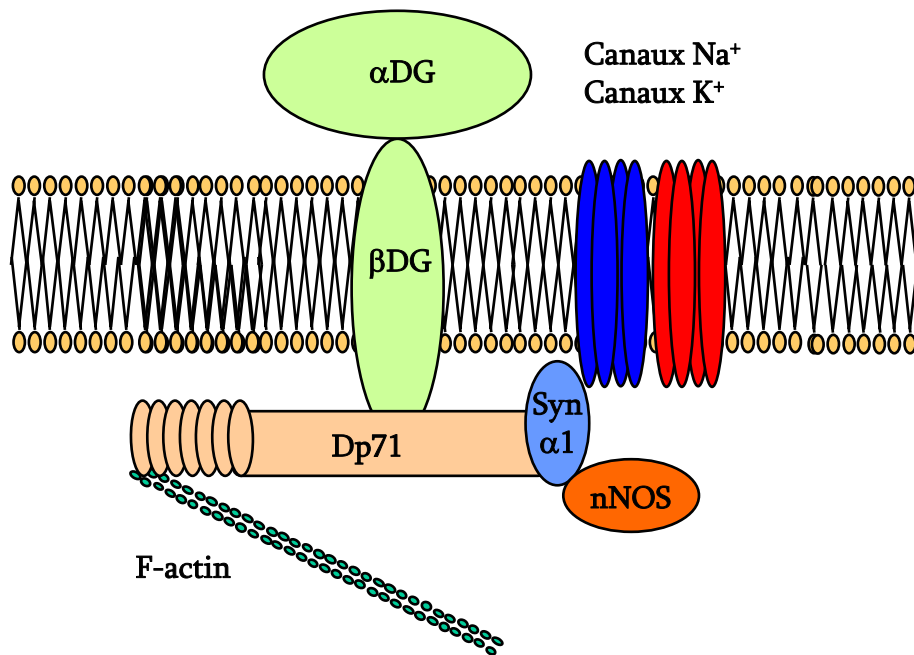


Figure 21 : Complexe hypothétique Dp71/DAPs dans les spermatozoides

aussi non-liée à la membrane dans la pièce moyenne du flagelle {Hernandez-Gonzalez, 2001 #177; Hernandez-Gonzalez, 2005 #176}. L'absence de Dp71 a un effet opposé sur ces deux membres du complexe. Alors que le β -dystroglycane disparaît quasiment, l' α 1-syntrophine est surexprimée et redistribuée le long du flagelle et dans la « tête ». Cette redistribution au niveau de la « tête » est similaire à celle de l'Up71 suggérant une tentative de compensation de l'absence de la Dp71 par l'Up71.

3) Hypothèse fonctionnelle

Les dystrophines jouent un rôle important dans l'organisation du cytosquelette d'actine dans le muscle, or le cytosquelette d'actine associé à la membrane plasmique est crucial pour la morphogenèse et la différenciation des spermatozoïdes {Ozaki-Kuroda, 2002 #215}. L'absence de dystrophines, en l'occurrence ici la Dp71, pourrait modifier l'ancrage du cytosquelette à la membrane plasmique. Cette hypothèse est confortée par la disparition des troubles morphologiques lorsqu'on élimine la membrane plasmique des spermatozoïdes de la souche *mdx^{3cv}*, ce qui confirme l'importance de l'interaction du cytosquelette avec la membrane plasmique pour la morphologie du flagelle et l'intervention de la Dp71 dans ce phénomène.

En interagissant avec les syntrophines, les dystrophines permettent le maintien de protéines à domaines PDZ à la membrane. L'expression de plusieurs protéines de ce type a été rapportée dans les spermatozoïdes : les canaux potassiques {Felix, 2002 #216}, les canaux calciques {Darszon, 1999 #217}, les aquaporines 7 et 8 {Calamita, 2001 #218} et la nNOS {Hernandez-Gonzalez, 2001 #177}. Ces protéines sont impliquées dans les processus fonctionnels primordiaux que sont la capacitation, la réaction de l'acrosome et la motilité. Les auteurs ont montré que l'absence de Dp71 et la perturbation du complexe qui en découlait, entraînent une altération sérieuse de la localisation et de l'expression d'un canal sodique dépendant du voltage (μ 1), d'un canal potassique (Kv1.1) ainsi que de la nNOS (Figure 21). L'étude de ces trois protéines a abouti à la démonstration d'une redistribution de ces protéines très proche de celle de l'Up71 et l' α 1-syntrophine ainsi qu'une

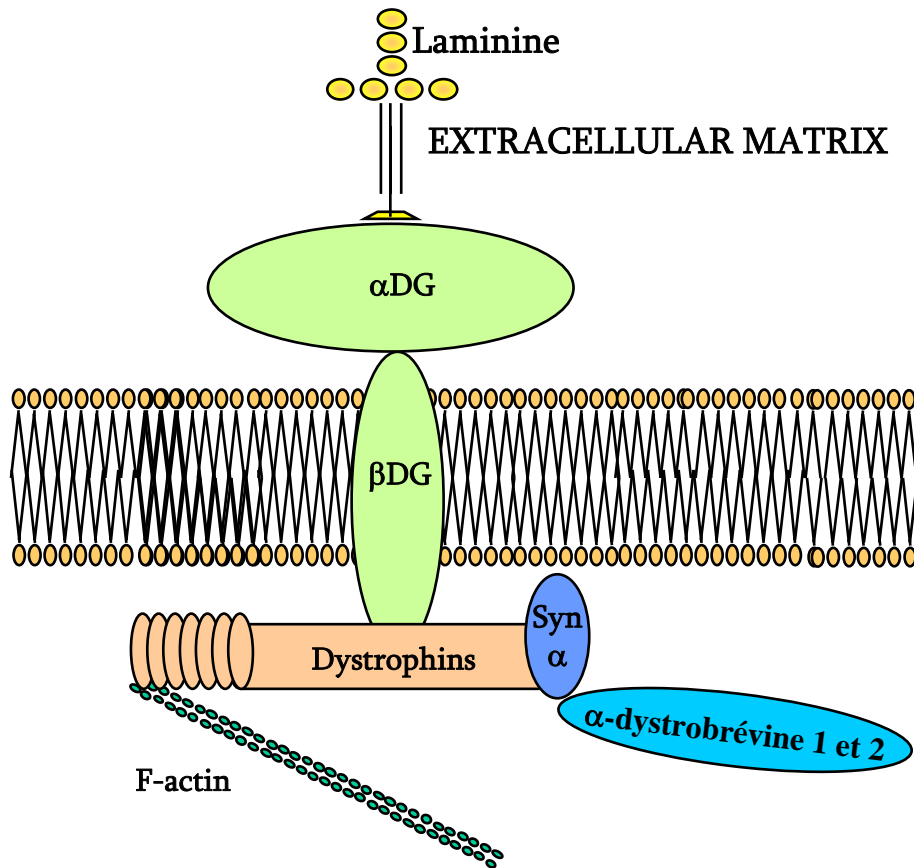


Figure 22 : Complexe hypothétique Dp71/DAPs dans les plaquettes

augmentation de leur expression pouvant indiquer des tentatives de compensations moléculaires.

B) Rôle dans la réponse plaquettaire

1) Description

Il a été rapporté chez certains patients DMD, une réduction de l'adhésion et de l'agrégation des plaquettes {Forst, 1998 #219; Maurin, 1998 #220}. Ceci pourrait expliquer la perte excessive de sang observée chez certains de ces patients lors d'une intervention chirurgicale de la moelle épinière {Noordeen, 1999 #178}. Dans le même temps, l'utilisation de la souche de souris *mdx^{3cv}* a conduit à l'observation d'une forte diminution de l'adhésion des plaquettes lorsqu'il y a une absence presque totale de tous les produits du gène DMD, suggérant l'implication des produits courts du gène.

2) Complexe Dp71-DAPs

Le premier produit de la superfamille des dystrophines à avoir été mis en évidence dans les plaquettes est l'utrophine ou DRP1 {Earnest, 1995 #179}. Ces mêmes auteurs avaient montré que la forme longue de la dystrophine n'était pas exprimée dans les plaquettes humaines. Des travaux plus récents ont établi qu'à l'image de plusieurs autres tissus ou types cellulaires, par exemple dans le système nerveux, d'autres produits du gène DMD pouvaient être exprimés. La Dp71 est fortement exprimée dans les plaquettes et semble être le seul produit du gène DMD présent. Il est intéressant de noter que dans les plaquettes la Dp71 présente plusieurs épissages alternatifs qui concernent spécialement les exons 78 et/ou 71 à 74 {Austin, 2002 #180} similaires à ceux décrits dans d'autres travaux {Austin, 2000 #181; Marquez, 2003 #85}.

Outre des protéines de la superfamille des dystrophines, d'autres membres du DGC ont également été observés dans les plaquettes : β -dystroglycane, α -syntrophine, α -dystrobrevin-1 et -2 (Figure 22). Ces protéines ont été localisées avec l'actine au niveau des filopodes, lamellipodes, de l'anneau contractile et de la membrane plasmique des

plaquettes {Austin, 2002 #180} (Cerecedo, soumis). Les auteurs ont remarqué que la colocalisation des DAPs et de l'actine variait en fonction de l'état d'activation plaquettaire.

3) Hypothèse fonctionnelle

Les différentes isoformes de la Dp71 feraient partie, comme la Dp427 dans le muscle ou la Dp71 dans les spermatozoïdes, des composantes du cytosquelette de la membrane plaquettaire. Elles participent activement à la réorganisation du cytosquelette des plaquettes lorsque celles-ci sont stimulées par la thrombine, en modifiant la liaison et la localisation des glycoprotéines à la surface membranaire.

La Dp71 pourrait également jouer un rôle dans la transduction des signaux i) en localisant correctement à des endroits précis de la membrane des molécules de signalisation telle que la phosphatidylinositol-3-kinase et p21^{ras}, protéine activant les GTPases, ou ii) en participant à la signalisation induite par l'intégrine {Fox, 1993 #221; Fox, 1993 #222}. Il a été établi que Rap1b, qui est une GTPase connue pour promouvoir l'adhésion cellulaire dépendante de l'intégrine, est fortement exprimée dans les plaquettes et rapidement activée par des agonistes du type thrombine. Elle co-précipite alors avec le cytosquelette d'actine et est potentiellement capable d'interagir avec la Dp71, faisant ainsi le lien entre la signalisation induite par la thrombine ou d'autres facteurs et la réorganisation du cytosquelette.

7) *En résumé*

Les dystrophines sont des protéines associées au cytosquelette qui participent à un complexe macromoléculaire possédant deux fonctions principales dans les cellules, qu'elles soient musculaires, nerveuses ou autres : i) le maintien de la structure de la cellule en liant son cytosquelette à la matrice extracellulaire, mais également ii) la localisation et l'agrégation dans des domaines membranaires précis de protéines impliquées dans la communication intercellulaire telles que les canaux ioniques, les récepteurs ou transporteurs de neurotransmetteurs, ou encore des protéines de signalisation.

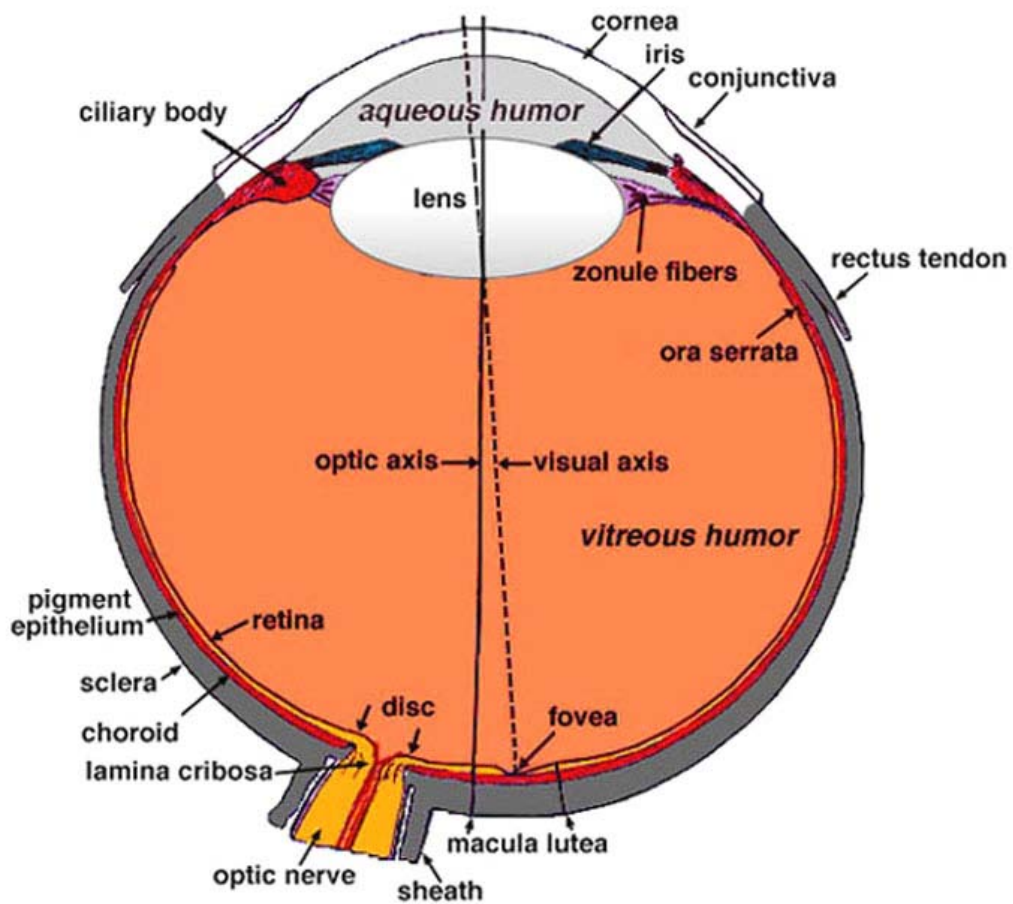


Figure 23 : Coupe sagittale horizontale de l'œil humain adulte.

III- L'œil

1) Présentation générale

La vision est probablement le sens le plus important dans le règne animal, ce qui explique les études très poussées dont elle fait l'objet. La première étape consiste à capter l'information lumineuse et à la traiter avant de la faire parvenir aux aires intégratives supérieures. Cette étape se passe dans la structure dédiée à cet effet : l'œil. On peut diviser cette étape en deux parties : l'acquisition de l'information lumineuse dans le segment antérieur de l'œil puis la transduction de l'information par la rétine qui va ensuite la transmettre vers les aires visuelles du cerveau. L'œil est composé de diverses parties de natures et fonctions très différentes. Le stimulus lumineux va traverser quatre compartiments de l'œil avant d'être « réceptionné » au niveau d'un cinquième (Figure 23) :

- La cornée : une membrane transparente directement en contact avec l'air ambiant
- L'humeur aqueuse et l'humeur vitrée : des liquides transparents, filtrés et renouvelés en permanence
- Le cristallin : tissu épithélial transparent très spécialisé
- la rétine : tissu nerveux tapissant le fond de l'œil

2) La cornée

La lumière pénètre dans l'œil via la cornée qui forme la structure réfractive majeure de l'œil, et va concentrer les rayons lumineux sur la rétine. La cornée a une double fonction passive :

- Laisser passer la lumière en étant la plus transparente possible
- Former une barrière entre l'environnement et l'intérieur de l'œil

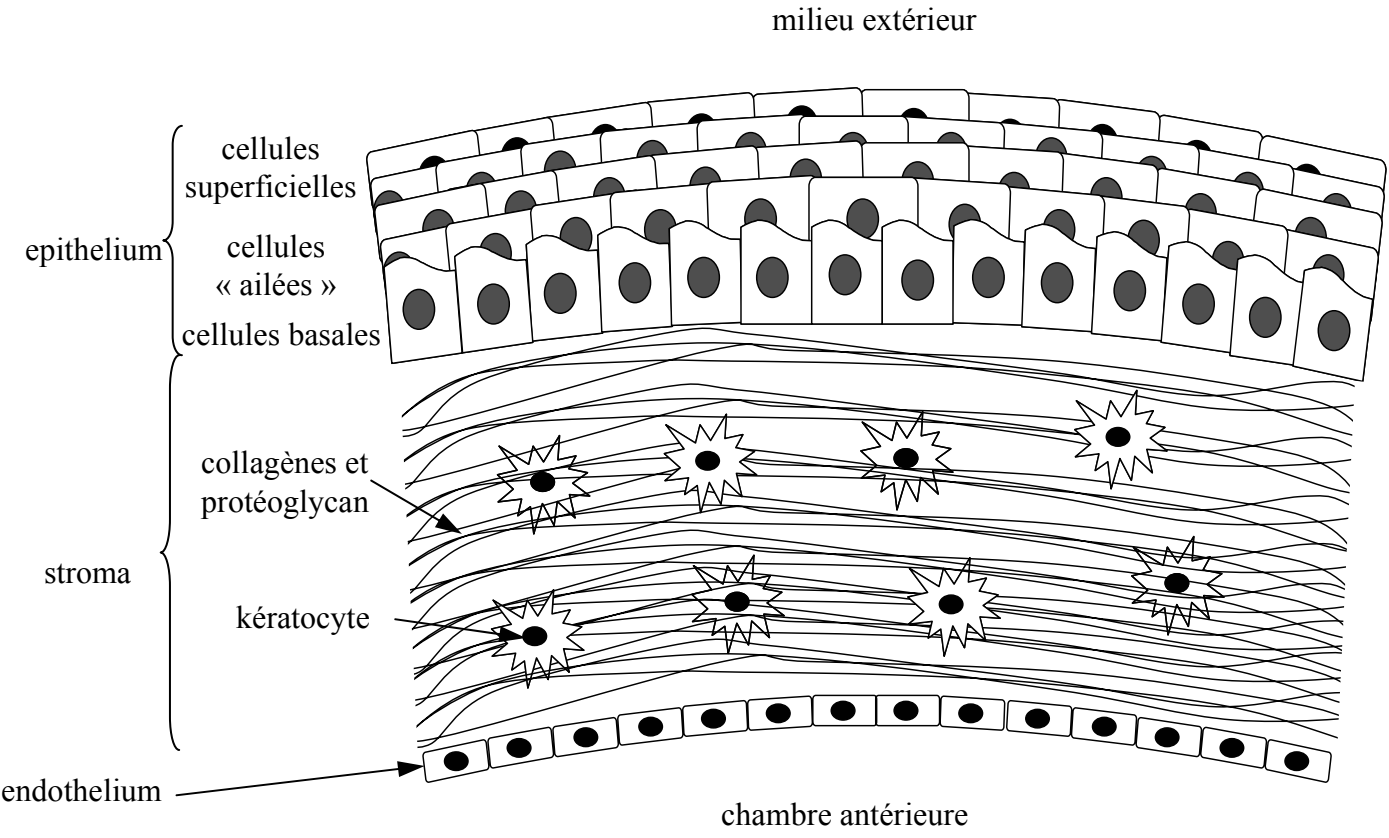


Figure 24 : Schéma de la cornée

A) Anatomie (Figure 24)

La cornée est constituée d'une couche externe de cellules épithéliales continuellement renouvelées, qui se différencient en une couche de cellules superficielles formant une surface optique lisse interagissant avec le liquide lacrymal.

La plus grande partie de la cornée, appelée stroma, est formée de collagène et de proteoglycans qui sont synthétisés par un système de kératocytes dispersés. L'organisation des fibres de collagène et des proteoglycans forme une matrice extracellulaire solide qui laisse passer plus de 99% des radiations lumineuses visibles.

Une couche de cellules endothéliales non répliquatives forme la partie la plus interne de la cornée. Ces cellules établissent une barrière poreuse entre l'humeur aqueuse et le stroma permettant :

- L'entrée de nutriments dans le stroma qui n'est pas vascularisé
- L'évacuation de l'eau afin de maintenir le niveau d'hydratation nécessaire à la transparence de la cornée

1) L'épithélium

Il est constitué de 5 à 7 cellules en épaisseur et se caractérise par une organisation extrêmement régulière et un renouvellement entier de l'épithélium en 7 jours. Il est constitué de 3 types cellulaires :

- Les cellules cubiques basales, qui se divisent et possèdent un haut niveau d'activité métabolique
- Les cellules dites « ailées » à cause de leur forme, qui sont en cours de différenciation et de migration vers la surface
- Les cellules superficielles, qui sont des cellules différenciées entrées dans un processus de dégénérescence se caractérisant par une chromatine compacte et une faible quantité d'organelles

L'organisation de l'épithélium est maintenue par les desmosomes qui lient toutes les cellules entre elles en particulier les cellules superficielles. La fonction de barrière jouée par la cornée est spécifiquement due aux complexes de jonctions serrées établis entre les cellules superficielles. Ces jonctions entourent complètement les cellules aboutissant à l'élaboration d'une membrane semi-perméable très efficace. A l'opposé, les cellules basales ainsi que les cellules « ailées » sont reliées entre elles par des jonctions gaps formant ainsi un syncytium.

2) Le stroma

Il représente 90% de l'épaisseur de la cornée. Il s'agit principalement d'une matrice extracellulaire composée de fibres de collagène parallèles à la surface, séparées par une matrice de proteoglycans {Cogan, 1951 #223}. L'hydratation de la cornée est grandement liée au degré de sulfatation des proteoglycans, celle-ci permettant une plus grande rétention de l'eau et par conséquent une plus grande transparence. Cette matrice est maintenue par des kératocytes situées entre les fibres de collagène qui ne représentent que 10% de l'ensemble du stroma. Ces cellules sont particulièrement actives lorsque le stroma est endommagé et sont responsables du renouvellement de la matrice.

3) L'endothélium

Il est formé d'une couche unique de cellules polygonales liées les unes aux autres par des interdigitations tortueuses multipliant par 10 la longueur des contacts latéraux par rapport à l'épaisseur des cellules. Ces cellules sont métaboliquement très actives pour les fonctions de transport, synthèse et sécrétion. Comme l'épithélium, elles sont interconnectées par des jonctions serrées et des jonctions gaps. Contrairement à l'épithélium, les jonctions n'entourent pas complètement les cellules ce qui conduit à la formation d'une barrière poreuse entre le stroma et l'humeur aqueuse. Les propriétés de l'endothélium sont cruciales pour le contrôle et le renouvellement de l'humeur aqueuse.

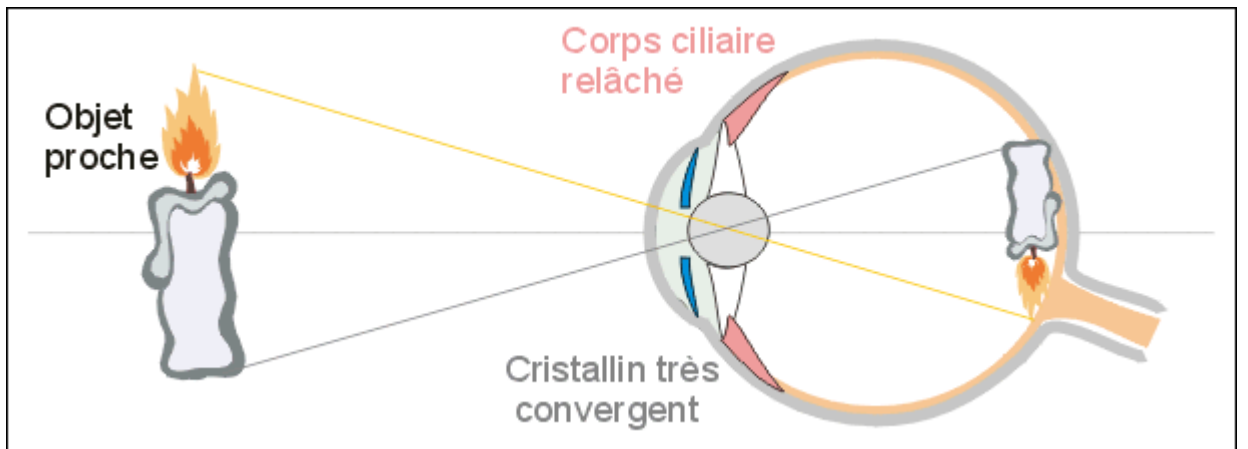
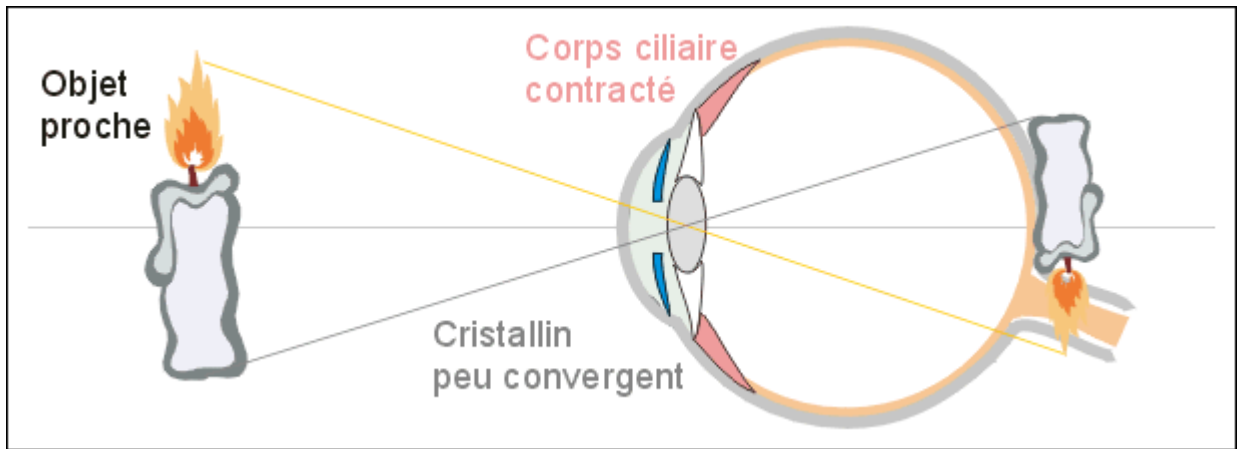
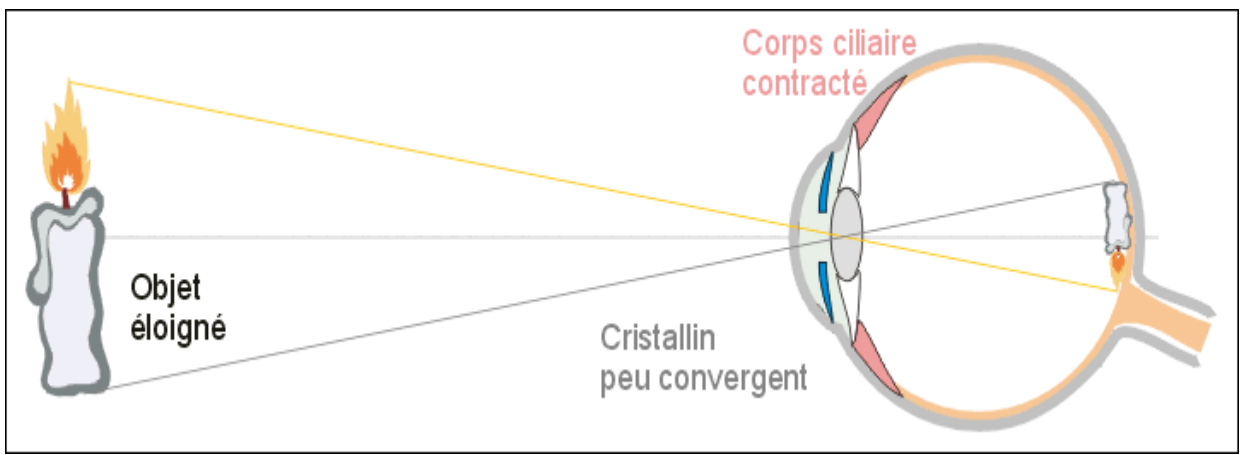


Figure 25 : Représentation du phénomène d'accommodation

B) Pathologies

Bien que la cornée ne soit pas un tissu nerveux, elle a pour origine des cellules ayant migrées à partir de la crête neurale. La migration anormale de ces cellules peut conduire à l'apparition de diverses pathologies parmi lesquelles : la sclerocornea, l'anomalie de Peters, l'anomalie de Axenfeld et le syndrome de Rieger. De même, des anomalies de l'induction terminale des cellules de la crête peuvent provoquer différentes dystrophies parmi lesquelles les dystrophies héréditaires congénitales de l'endothélium ou la dystrophie de l'endothélium de Fuchs. Dans la plupart de ces pathologies, il est question soit d'un problème dans la différenciation finale des cellules dérivées des cellules de la crête soit d'un défaut de leur migration.

3) L'humeur aqueuse

Une fois qu'elle a traversé la cornée, la lumière arrive dans l'humeur aqueuse. Il s'agit d'un liquide sécrété par le corps ciliaire dans la chambre postérieure de l'œil, qui va remplir également la chambre antérieure en passant par la pupille. Le flux de ce liquide contre la résistance membranaire génère une pression intraoculaire de 15 mm de mercure (Hg), nécessaire pour que le globe oculaire ait sa forme et ses propriétés optiques. En outre, ce liquide est responsable de l'apport des nutriments et de l'énergie aux deux structures non vascularisées qu'il « relie » : la cornée et le cristallin. Enfin, l'humeur aqueuse constitue un composant important du système oculaire de par sa transparence qui lui permet de faire transiter la lumière sans perturbations entre la cornée et le cristallin.

4) Le cristallin

Le cristallin est un tissu épithélial remarquablement spécialisé qui est responsable de la régulation fine de l'image qui est projeté sur la rétine. Cette fonction lui est conférée par sa transparence ainsi que par la courbure de ses surfaces réfractives. La variation de la courbure de ses surfaces est nécessaire au phénomène d'accommodation qui consiste à faire la mise au point sur un objet en fonction de son éloignement (Figure 25).

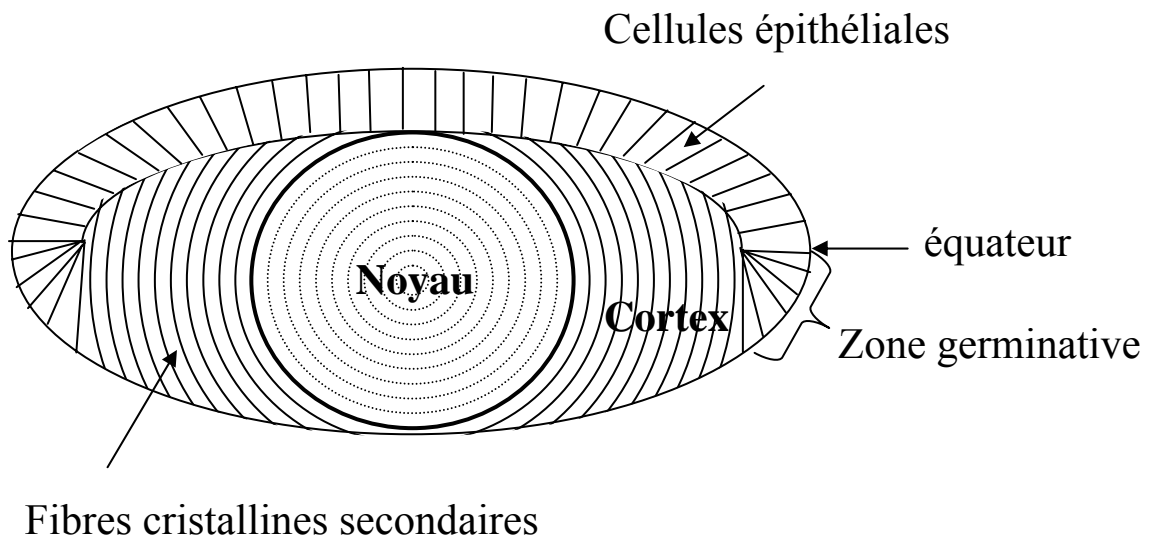


Figure 26 : Représentation schématique de l'anatomie du cristallin humain

A) Anatomie (Figure 26)

Le cristallin constitue une structure cellulaire ovoïde complètement entourée d'une capsule élastique acellulaire possédant une surface externe lisse. Cette capsule est reliée au corps ciliaire par des ligaments appelés zonules de Zinn qui permettent son maintien et qui vont également être fortement impliqués dans le phénomène d'accommodation. Il s'agit d'un organe unique du fait de ces caractéristiques :

- Aucune vascularisation ni innervation
- Totalement transparent
- Synthétise des protéines particulières dès le stade embryonnaire
- Fabrique de nouvelles cellules et fibres cristalliniennes tout au long de la vie sans en éliminer {Suchoff, 1979 #224}

Le cristallin est composé de deux types de cellules épithéliales : les cellules cubiques formant l'épithélium cristallinien et les cellules allongées appelées fibres cristalliniennes formant le « corps » du cristallin.

1) La capsule

Il s'agit d'une matrice extracellulaire élastique qui entoure entièrement le cristallin et qui a pour fonction de maintenir la forme du cristallin au cours de l'accommodation. Cette matrice acellulaire est principalement constituée de collagène IV et de proteoglycans à heparan sulfate {Onodera, 1991 #225}. Elle est sécrétée par les cellules épithéliales ainsi que les cellules fibreuses superficielles {Parmigiani, 1991 #226}.

2) L'épithélium cristallin

Il peut être divisé en deux parties : la zone équatoriale appelée zone germinative où les cellules se divisent activement avant de se différencier en fibres, et la zone apicale où les cellules ne se divisent pas. Ces dernières sont responsables du transport de solutés entre le cristallin et l'humeur aqueuse ainsi que de la sécrétion de la capsule. Ces cellules se caractérisent également par leurs nombreuses interdigitations ainsi que par leur forme

hexagonale, au contraire des cellules en division plus rondes et présentant peu d'interdigitations. Le patron de division partant de l'équateur du cristallin et rentrant légèrement à l'intérieur est appelé arc cristallinien (lens bow) {Rafferty, 1981 #227}.

L'épithélium n'est pas une barrière étanche entre le cristallin et l'humeur aqueuse mais réduit le passage des solutés de haut poids moléculaire. Les cellules épithéliales communiquent entre elles par des jonctions « gap » de faible résistance mais aussi dans une moindre mesure avec les cellules fibreuses {Rae, 1996 #228; White, 1998 #229}.

3) Les fibres cristalliniennes

Ces cellules représentent la plus grande partie du cristallin divisé en deux structures, le noyau au centre et le cortex qui l'entoure.

Lors de l'embryogenèse, les cellules post-mitotiques de la partie postérieure de la vésicule cristallinienne s'allongent pour remplir la cavité avec des fibres primaires formant le cristallin embryonnaire. Cette structure, appelée noyau embryonnaire, est conservée tout au long de la vie au centre du cristallin avec sa membrane plasmique et une intégrité physiologique, même si son métabolisme est minimal. Les cellules du vortex équatorial vont élaborer, par transformation des cellules en protofibres, les premières fibres secondaires qui vont entourer le noyau embryonnaire et former le noyau foetal, l'ensemble constituant le cristallin à la naissance.

Le noyau adulte et enfin les zones corticales antérieures et postérieures vont se constituer autour du noyau foetal par apposition de cellules différenciées issues de la zone germinative de l'épithélium. Ces cellules subissent de nombreux changements moléculaires pour devenir les fibres cristalliniennes. Les extrémités de ces fibres se rejoignent pour former les lignes de suture du cristallin. Alors que les cellules deviennent hexagonales, elles perdent tous leurs organelles et augmentent leur matériel fibrillaire, principalement constitué de protéines appelées « cristallines » {Bassnett, 1992 #231; Bassnett, 1997 #230}. Le cortex se caractérise par le faible espace extracellulaire dû au resserrement des cellules hexagonales et les nombreuses interdigitations entre elles. Ces

interdigitations sont très importantes pour la stabilité des fibres, notamment durant l'accommodation. Il est à noter que ces interdigitations sont de natures et compositions différentes vers le centre du cristallin {Kistler, 1995 #232; Zampighi, 2000 #233; Zampighi, 1989 #234}. Toutes ces modifications, en particulier les jonctions « gap » de faibles résistances, permettent au cristallin de fonctionner comme un syncytium. Ce mode de fonctionnement reflète l'importance de la communication entre les fibres cristalliniennes qui forment la majeure partie du cristallin et le faible nombre de cellules métaboliquement actives de l'épithélium.

B) Composition

Toute l'organisation ainsi que le métabolisme du cristallin sont dédiés à sa transparence et au maintien de celle-ci. Il est constitué au 2/3 d'eau et 1/3 de protéines afin d'avoir et de conserver un indice de réfraction élevé. Ainsi, des changements dans la structure du cytosquelette, une modification de l'hydratation du tissu, une cassure de la membrane cellulaire, l'agrégation ou au contraire la séparation des composants moléculaires sont autant de changements pouvant induire une opacification et l'apparition d'une cataracte.

La structure des cellules du cristallin est composée d'un système complexe de filaments intracellulaires qui vont constituer un cytosquelette tout à fait particulier {Lee, 2000 #235}. De nombreuses protéines du cytosquelette ont été rapportées dans les différentes portions du cristallin :

- des protéines exprimées dans beaucoup de tissus telles que :
 - l'actine, contribuant au maintien de la structure pendant l'accommodation
 - la vimentine, uniquement dans l'épithélium et le cortex externe, également impliquée dans le maintien de la structure mais aussi dans le développement
 - la tubuline, la myosine, la tropomyosine et la spectrine

- une protéine très spécialisée appelée filament « en chaîne de perles », présente uniquement dans le cortex et le noyau, et principalement associée à l'intégrité de la membrane cellulaire {Ireland, 1984 #236}.

Le grand nombre de protéines du cytosquelette exprimées dans le cristallin reflète l'importance de l'organisation de celui-ci pour obtenir et conserver sa transparence. Trokel (1962) a proposé que la distribution des protéines et la régularité de la structure permettent à elles seules la transparence {Trokel, 1962 #237}. Outre l'organisation parfaite des cellules d'origine, l'arrangement dépend également de la capacité des nouvelles fibres à s'allonger selon le patron correspondant aux fibres existantes. De nombreux changements ont lieu au niveau du cytosquelette durant le développement d'une cataracte. Par exemple, il a été observé une quasi-disparition de la vimentine au cours du vieillissement ainsi qu'une altération du cytosquelette suite à un stress oxydatif {Prescott, 1991 #238}.

Le maintien de l'hydratation est primordial pour la conservation de la transparence et se fait via la régulation des électrolytes. Les propriétés membranaires couplées aux transports actifs maintiennent les concentrations ioniques intracellulaires afin de contrebalancer la tendance naturelle de l'eau à entrer dans les cellules épithéliales ainsi que dans les fibres cristalliniennes {Fischbarg, 1999 #239}. Le cristallin contient normalement 65% d'eau contre 80% dans la capsule, avec une quantité inférieure dans le noyau par rapport au cortex. La majeure partie de l'eau présente dans le cristallin y est sous forme non-diffusible, faiblement ou fortement liée aux protéines, en particulier l' α -cristalline {Babizhayev, 2003 #240}. On constate souvent une augmentation de l'hydratation ainsi qu'une diminution de la fraction d'eau liée durant la mise en place d'une cataracte. L'une des protéines particulièrement impliquée dans la communication entre les fibres cristalliniennes est la MIP pour « major intrinsic protein » ou AQP0 qui est une protéine de la famille des aquaporines {Nielsen, 1993 #241}. Ce canal aqueux dépendant du pH et du calcium est responsable d'une part importante du transport de l'eau. Cette protéine responsable des flux aqueux pourrait également être impliquée dans

la formation de contacts spécialisés entre les fibres cristalliniennes, pouvant ainsi faciliter l'adhérence de celles-ci. Lorsque l'expression ou la localisation de cette protéine est altérée, on observe la formation d'une cataracte {Shiels, 2001 #242}.

Les flux aqueux entrent également en jeu dans la balance électrolytique du cristallin. Cependant, celle-ci est principalement gouvernée par des systèmes actifs de transport de cations localisés dans l'épithélium bien que quelques transports actifs aient également lieu dans le cortex. La protéine principalement impliquée dans cette régulation est la pompe Na^+/K^+ ATPase qui permet de créer des gradients ioniques apportant l'énergie nécessaire aux autres transports parmi lesquels l'échange $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, le co-transport $\text{Na}^+/\text{bicarbonate}$ ainsi que le transport d'acides aminés {Okafor, 2001 #244; Wilson, 1983 #243}. Le site majeur de transport actif des cations se situe dans l'épithélium antérieur créant un gradient antéropostérieur dans le cristallin prolongé par les jonctions « gap » entre les fibres cristalliniennes. Une perturbation des transporteurs ou des protéines des jonctions gap va entraîner une opacification du cristallin {Gao, 2004 #246; Wei, 2004 #245}. Une perturbation de la Ca^{2+} ATPase peut induire une augmentation de la concentration calcique, qui est normalement faible dans le cristallin, ayant pour conséquence la mise en place d'une cataracte d'origine cytotoxique {Nabekura, 2001 #249; Nabekura, 2004 #248; Paterson, 1997 #247}.

C) En résumé

Le cristallin est la structure tissulaire responsable du phénomène d'accommodation qui permet de faire le point sur des objets plus ou moins éloignés. Cette fonction lui est permise grâce à sa transparence, qui lui est conférée par une organisation cellulaire et moléculaire parfaite, notamment due à un cytosquelette particulièrement développé. La moindre perturbation d'ordre intra- ou intercellulaire va avoir pour conséquence une opacification du cristallin appelée cataracte.

5) Le vitré

Le corps vitré est la structure majoritaire de l'œil chez l'homme puisqu'il occupe plus de 80% du volume de celui-ci. Il assure la jonction entre le segment antérieur : le corps ciliaire, les zonules et le cristallin ; et le segment postérieur : la rétine. Il s'agit d'un gel transparent de forme presque sphérique, à l'exception du contact avec le cristallin où il est concave. Il est constitué de fibres de collagène et de plus de 99% d'eau. Le corps vitré occupe quatre fonctions principales :

- protection de la rétine en remplissant la cavité du corps vitré. Il absorbe les forces externes réduisant ainsi la déformation mécanique du globe oculaire
- barrière de diffusion entre les segments antérieur et postérieur de l'œil. Il empêche les mouvements de substances entre les deux parties de l'œil
- tampon métabolique voir même réserve pour le métabolisme de la rétine et du corps ciliaire en stockant l'oxygène ou des substances solubles dans l'eau
- établissement d'un passage sans perturbation de la lumière en maintenant sa transparence liée à une faible concentration en macromolécules structurales et protéines solubles {Freeman, 1969 #250}

6) La rétine

Il est admis qu'environ 80% des entrées sensorielles chez l'homme passent par la rétine, mettant en jeu un tiers du cerveau pour leurs traitements. La rétine présente en outre plusieurs caractéristiques qui en font un modèle d'étude des systèmes nerveux central et cardiovasculaire :

- Extension du système nerveux central facilement accessible
- Partie du système nerveux central la plus « simple » et la mieux organisée
- Seule partie du corps où les vaisseaux sanguins du niveau artériolaire sont visibles

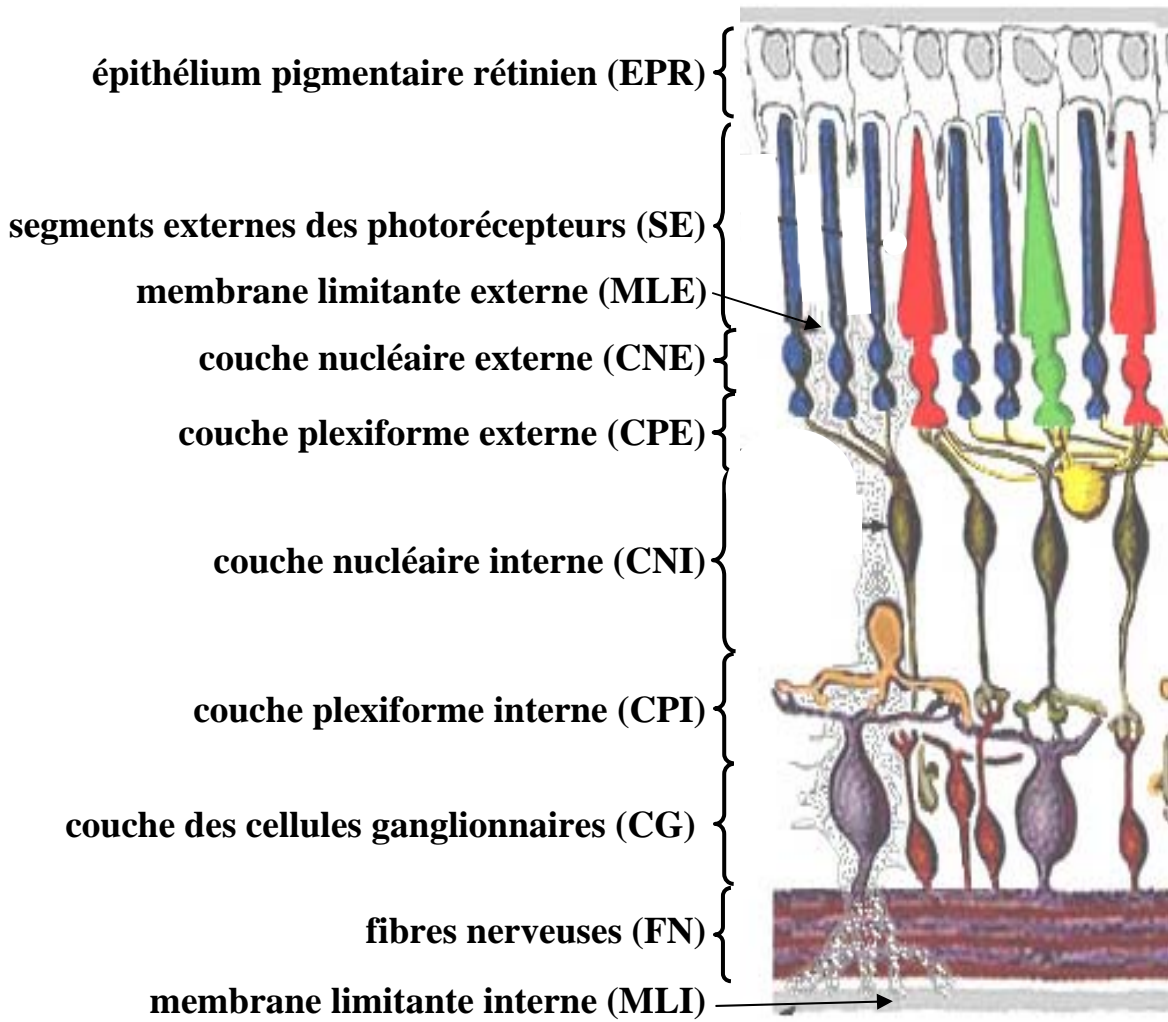


Figure 27 : Organisation stratifiée de la rétine.

Tous les yeux de vertébrés présentent une rétine organisée en trois couches neuronales et un épithélium pigmentaire. Elles partagent également des mécanismes nutritionnels ainsi que de transduction du signal, très proches voir identiques.

A) Anatomie

1) Organisation structurale

L'organisation de la rétine peut être décrite selon deux axes, l'un allant de la partie postérieure vers la partie antérieure et l'autre du centre vers la périphérie.

- L'organisation antéropostérieure. Les cellules de la rétine et leurs prolongements sont stratifiés en dix couches qui peuvent être identifiées histologiquement (Figure 27).

- L'épithélium pigmentaire rétinien (EPR), formée d'une monocouche de cellules épithéliales séparant les segments externes des photorécepteurs de la choroïde
- La couche des segments externes et internes des photorécepteurs (SE)
- La membrane limitante externe (MLE), formée par de nombreuses zonula adherens entre les CGM et les photorécepteurs
- La couche nucléaire externe (CNE), composée par les corps cellulaires des photorécepteurs
- La couche plexiforme externe (CPE), formée des synapses des photorécepteurs avec les cellules bipolaires, les cellules horizontales et les cellules interplexiformes
- La couche nucléaire interne (CNI), composée des corps cellulaires des cellules bipolaires, horizontales, amacrines et interplexiformes ainsi que les noyaux des cellules gliales de Müller (CGM)
- La couche plexiforme interne (CPI), formée des synapses entre les cellules bipolaires, amacrines et ganglionnaires

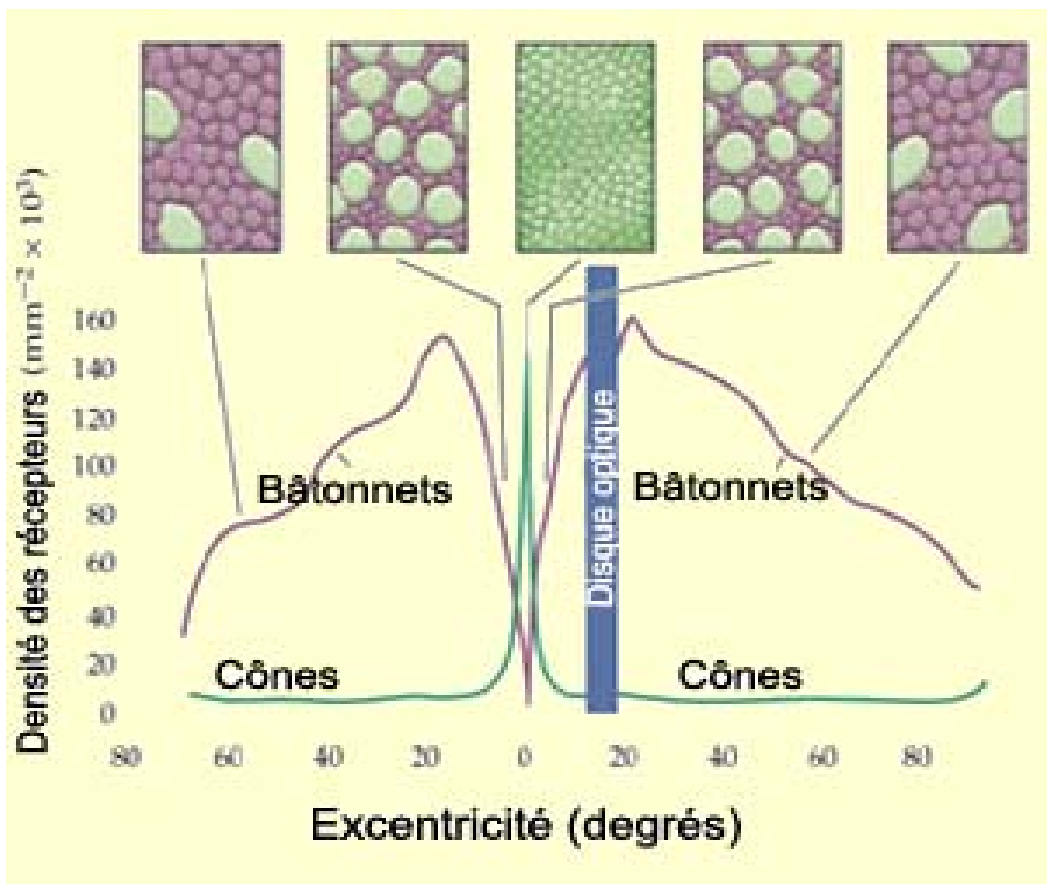
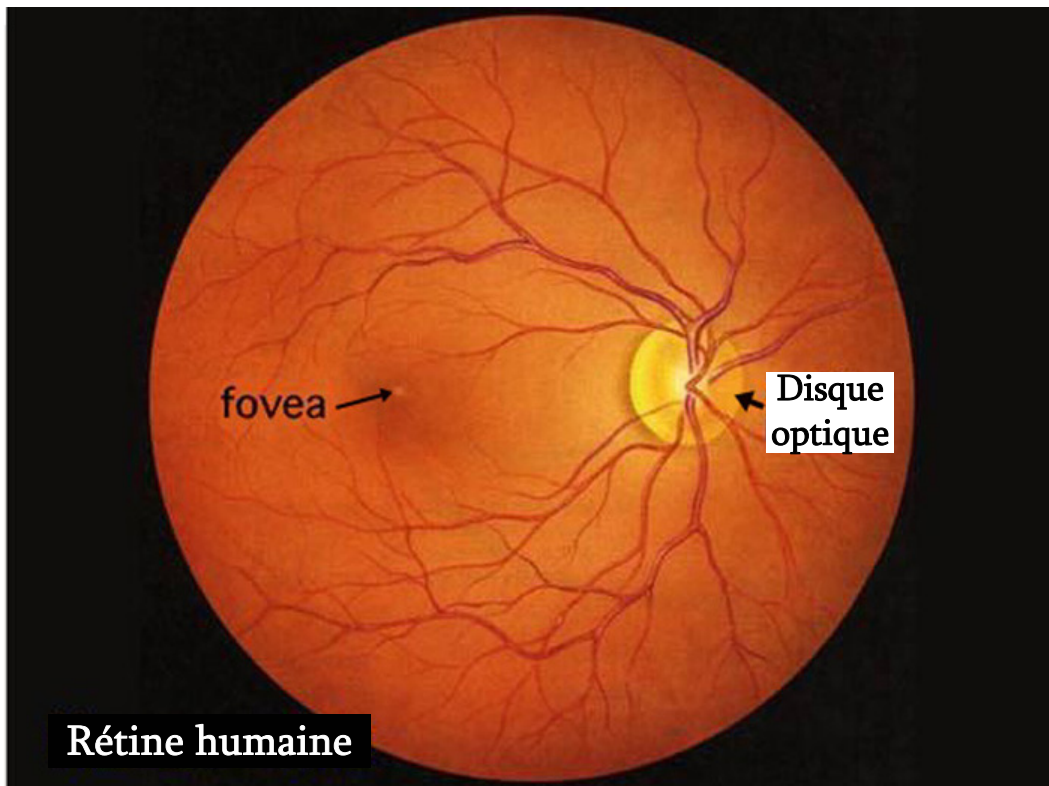


Figure 28 : Organisation centre pourtour de la rétine humaine.

- La couche des cellules ganglionnaires (CG), qui contient aussi les cellules amacrines déplacées
- Les fibres nerveuses (FN), correspondant aux axones des cellules ganglionnaires allant former le nerf optique
- La membrane limitante interne (MLI), constituée des pieds des cellules gliales de Müller

- L'organisation centre/périphérie. Le centre de la rétine est plus important pour les fonctions visuelles et comporte donc des modifications structurales. La fovéa centralis est une petite dépression où se situe le point focal postérieur du système optique. Cette petite dépression est due à un déplacement centrifuge des cellules de la rétine interne et se caractérise par l'absence de photorécepteurs de type bâtonnet ainsi que de vaisseaux sanguins. Comme le montre la figure 28, le nombre de photorécepteurs de type cône diminue alors que celui de type bâtonnet augmente progressivement avant de décroître lui aussi, en allant vers la périphérie de la rétine. Le point aveugle ou disque optique, qui correspond au départ du nerf optique, est lui dépourvu de photorécepteurs. La région parafovéale se caractérise par une grande accumulation de cellules de la rétine interne. La couche des cellules ganglionnaires devient une monocouche à la fin de la région périfovéale marquant la fin de la rétine centrale.

2) Organisation cellulaire

La rétine neurale est constituée de six types principaux de neurones : les photorécepteurs, les cellules horizontales, les cellules bipolaires, les cellules amacrines, les cellules interplexiformes et les cellules ganglionnaires. Les neurones sont en contact étroit avec la glie radiaire qui les supporte appelée cellule gliale de Müller (CGM). D'autres cellules gliales, principalement des astrocytes, sont présentes dans la rétine, en particulier au niveau de l'interface avec le corps vitré appelée membrane limitante interne. Les cellules photoréceptrices captent l'information lumineuse via leur segment externe. La rétine assure alors la conversion du signal lumineux en signal nerveux et participe également au traitement de cette information, particulièrement chez les oiseaux et les

vertébrés à sang froid. Chez les mammifères, la plus grande partie du traitement de l'information se fait dans les aires corticales supérieures vers lesquelles les axones des cellules ganglionnaires dirigent l'information.

a) Neurones

La rétine reste avant tout une extension du système nerveux central composé de différents types de neurones

i) Les photorécepteurs

Il s'agit de cellules hautement spécialisées qui convertissent l'information lumineuse en information nerveuse par le phénomène de phototransduction. Il existe deux types de photorécepteurs possédant une morphologie et des fonctions relativement différentes : les bâtonnets et les cônes. Ils possèdent cependant tous deux une partie distale spécialement dédiée à la capture de la lumière composée des segments externes et internes, ce dernier étant connecté au corps cellulaire. La partie proximale, composée de l'axone et de la terminaison synaptique, permet de transmettre l'information nerveuse. Une autre caractéristique commune des photorécepteurs est qu'ils utilisent tous le glutamate comme neurotransmetteur.

α) Les bâtonnets

Ils représentent, chez les mammifères, l'immense majorité des cellules photoréceptrices (plus de 90% chez l'homme) et sont responsables de la vision « nocturne ». Ces cellules captent la lumière par l'intermédiaire d'un pigment appelé rhodopsine. Elles sont principalement localisées dans la rétine périphérique et se caractérisent morphologiquement par un segment externe long et cylindrique en forme de bâtonnet.

β) Les cônes

Ils ne représentent que 5 à 10% des cellules photoréceptrices chez les mammifères, cependant ce sont les cellules responsables de la « vision diurne » et de la vision des

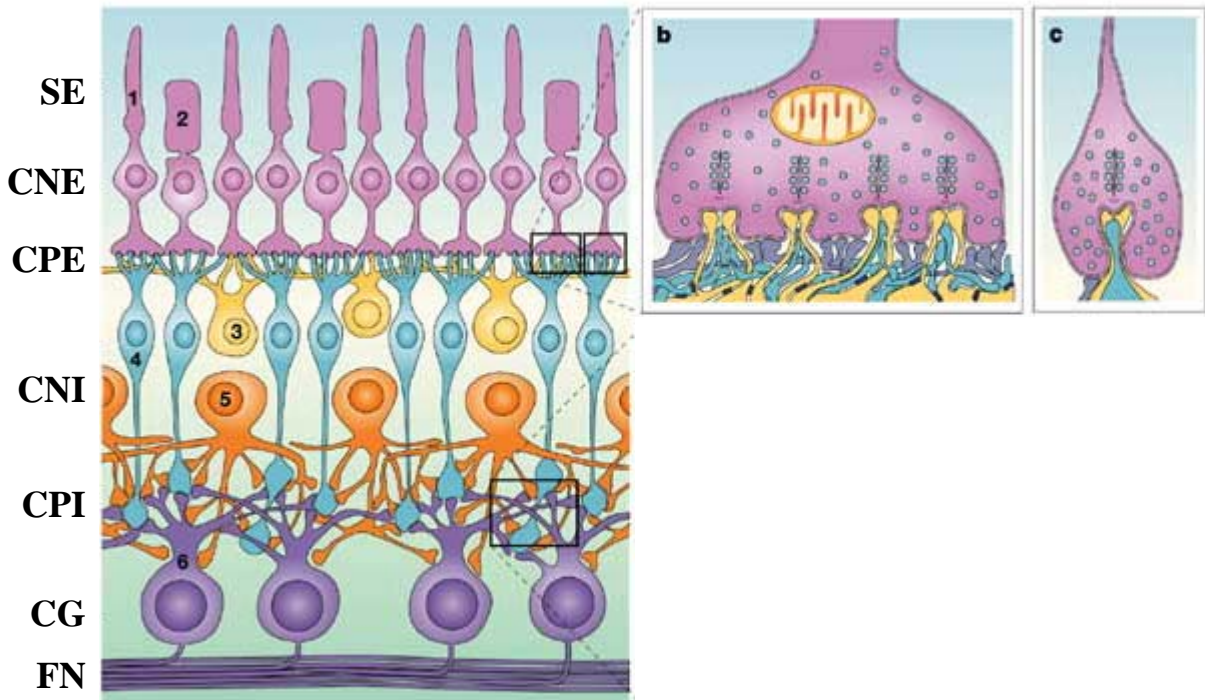


Figure 29 : Représentation schématique de la rétine de mammifère. b) schéma de la synapse entre les cônes, les cellules bipolaires et les cellules horizontales. Deux types de synapses existent: synapse en triade et contacts à plat. c) schéma de la synapse en triade des bâtonnets avec les cellules bipolaires et les cellules horizontales. Les synapses en triade sont également appelées « synapses à ruban » à cause d'une barre perpendiculaire à la zone active où se concentrent les neurotransmetteurs. (1: bâtonnet, 2: cône, 3: cellules horizontales, 4: cellules bipolaires, 5: cellules amacrines, 6: cellule ganglionnaire, SE: segments externes, CNE: couche nucléaire externe, CPE: couche plexiforme externe, CNI: couche nucléaire interne, CPI: couche plexiforme interne, CG; couche des cellules ganglionnaires, FN: fibres nerveuses) D'après Wässle (2004)

couleurs. On peut diviser les cônes en trois catégories proportionnellement inégales : bleu, vert ou rouge, en fonction du type de pigment qu'ils contiennent et qui leur confèrent une sensibilité différente dans le spectre lumineux. Chez l'homme, les cônes de types vert et rouge qui sont les cônes largement majoritaires, se situent principalement dans la fovéa alors que ceux de type bleu sont situés au pourtour de celle-ci. Les cônes se caractérisent par un noyau plus gros que celui des bâtonnets ainsi qu'un segment externe plus court et plus large en forme de cône.

ii) Les neurones secondaires

Il s'agit des cellules neuronales traitant directement (les cellules bipolaires), ou indirectement (les cellules horizontales, amacrines et interplexiformes), l'information transmise par les photorécepteurs. Toutes ces cellules ont leurs corps cellulaires situés au niveau de la couche nucléaire interne.

α) Les cellules bipolaires

Elles sont responsables de la transmission de l'information nerveuse provenant des photorécepteurs vers les cellules ganglionnaires et amacrines. Elles sont classées en fonction du type de photorécepteurs qu'elles contactent.

Les dendrites d'une cellule bipolaire à bâtonnets peuvent pénétrer dans les synapses en triade de soixante-dix bâtonnets. Leurs axones terminent dans la partie la plus interne de la couche plexiforme interne où ils contactent les dendrites d'une cellule ganglionnaire ON ainsi que les prolongements d'une paire de cellules amacrines.

Les dendrites des cellules bipolaires à cônes forment deux types de contacts avec les cônes. Soit elles pénètrent dans la synapse en triade, soit elles forment des contacts à plat. Contrairement aux cellules bipolaires à bâtonnets pour lesquelles un seul type a été décrit, il existe au moins neuf types de cellules bipolaires à cônes dans la rétine de mammifères, définis en fonction de leur schéma d'embranchement dendritique, du nombre de cônes contactés et du niveau de stratification de leurs terminaisons axonales dans la couche plexiforme interne {Boycott, 1991 #252; Euler, 1996 #253; Euler, 1995 #254; Famiglietti,

1981 #255; Ghosh, 2004 #256; McGuire, 1984 #257}. De même, alors que les cellules bipolaires à bâtonnets ne sont impliquées que dans la voie ON, les cellules bipolaires à cônes sont subdivisées en deux catégories en fonction de leurs caractéristiques fonctionnelles et de la voie dans laquelle elles interviennent. En effet, les cellules bipolaires à cônes qui, en réponse à la lumière, présentent une dépolarisation sont appelées cellules bipolaires ON alors que celles qui présentent une hyperpolarisation sont les cellules bipolaires OFF {Boycott, 1969 #258; Euler, 1996 #259; Hartveit, 1997 #260; Nelson, 1983 #261; Ramón y Cajal, 1893 #262; Wassle, 1991 #263}. Etant donné que les photorécepteurs n'utilisent que le glutamate comme neurotransmetteur, cette différence de réponse traduit une différence dans la population de récepteurs au glutamate exprimés par les cellules bipolaires. Alors que les cellules bipolaires ON expriment le récepteur au glutamate métabotrope mGluR6, les cellules bipolaires OFF expriment à leurs terminaisons dendritiques différents récepteurs au glutamate de type ionotropes {Brandstatter, 1997 #265; Masu, 1995 #168; Nomura, 1994 #169; Vardi, 2000 #264}.

β) Les cellules horizontales

On distingue deux types de cellules horizontales dans la rétine de mammifère, les cellules H1 et H2. Les cellules horizontales possèdent une arborisation dendritique très étendue qui ne se dirige que vers la couche plexiforme externe. Elle va alors entrer en contact uniquement avec les cônes pour les cellules H2, ou également avec les axones des bâtonnets pour ce qui est des cellules H1. L'axone des cellules H1 va participer à la triade des bâtonnets alors que des dendrites vont participer à la triade des cônes. Les cellules horizontales participeraient à la modulation de l'information lumineuse transmise par les photorécepteurs, par le phénomène d'inhibition latérale grâce à la libération d'acides aminés inhibiteurs, en particulier le GABA. Il a été proposé que cette libération ne se ferait pas de façon classique à travers des vésicules synaptiques mais via un transport facilité {Attwell, 1993 #266; Schwartz, 1993 #267}. En effet, il a été montré que ces cellules possédaient des transporteurs vésiculaires spécifiques du GABA (VGAT) ou des acides aminés inhibiteurs (VIAAT) au contact des photorécepteurs {Cueva, 2002 #683; Haverkamp, 2000 #326; Jellali, 2002 #684}. Il est à noter que les cellules horizontales

présentent également des jonctions « gaps » dont nous verrons l'importance dans le chapitre où nous parlerons de la transmission horizontale.

γ) Les cellules amacrines

La plupart des cellules amacrines sont situées dans la partie proximale de la couche nucléaire interne. Cependant, certaines cellules appelées cellules amacrines déplacées sont retrouvées dans la couche des cellules ganglionnaires. Bien qu'elles aient toutes la même fonction, moduler les signaux dans la couche plexiforme interne, leurs morphologies et leurs caractéristiques neurochimiques ont conduit à en différencier jusqu'à cinquante types différents {Kolb, 1981 #271; Kolb, 2002 #272}. L'un des points communs de ces cellules est le fait qu'elles ne possèdent pas d'axone. De plus, la plupart des cellules amacrines contiennent des acides aminés inhibiteurs, spécialement la glycine et le GABA {Agardh, 1986 #273; Bruun, 1974 #274; Ehinger, 1971 #275; Kolb, 2002 #272}.

δ) Les cellules interplexiformes

Les corps cellulaires de ces cellules se situent au niveau de la couche nucléaire interne alors que leurs prolongements vont à la fois dans la couche plexiforme externe et la couche plexiforme interne. Ces cellules utilisent le GABA ou la dopamine comme neurotransmetteurs {Nguyen-Legros, 1997 #276}. Elles sont responsables du transport d'un signal rétrograde entre la couche plexiforme interne et la couche plexiforme externe.

iii) Les cellules ganglionnaires

Les cellules ganglionnaires collectent les informations visuelles qui ont traversé toute la rétine, et les transmettent au cerveau. Leurs corps cellulaires projettent leurs dendrites dans la couche plexiforme interne où elles forment des synapses avec les cellules bipolaires et les cellules amacrines. On retrouve à ce niveau, l'ambivalence ON/OFF relevée dans les cellules bipolaires. Les cellules bipolaires ON, dépolarisées à la lumière, libèrent le neuromédiateur qui dépolarise à son tour les cellules ganglionnaires ON. A l'inverse, à l'obscurité, les cellules bipolaires OFF libèrent le même neuromédiateur qui dépolarise les cellules ganglionnaires OFF. Leurs axones qui forment le nerf optique vont ensuite aboutir

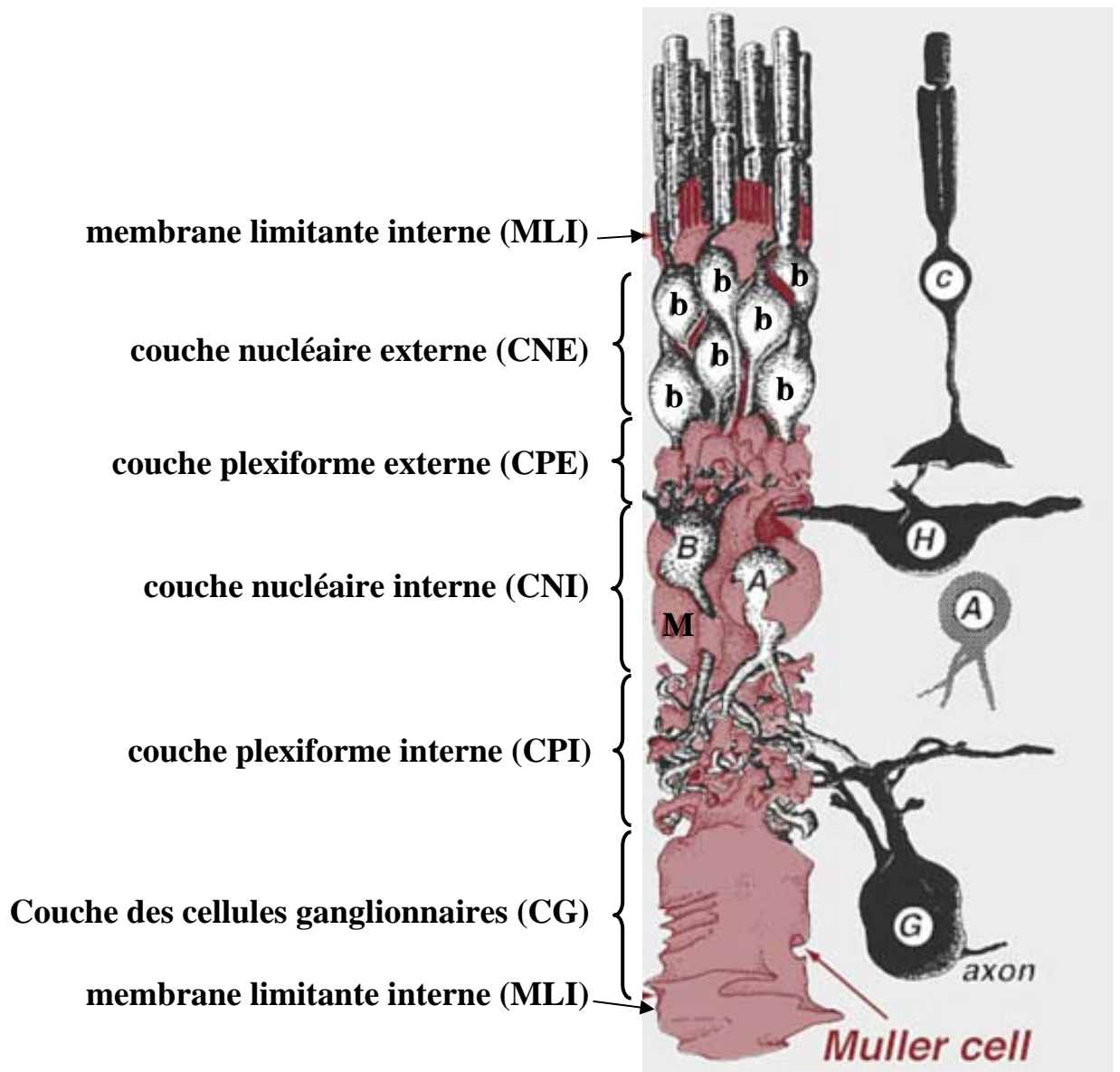


Figure 30 : Représentation de l'intégration de la cellule gliale de Müller autour des neurones. (c: cône, b: bâtonnet, h: cellules horizontales, B: cellules bipolaires, A: cellules amacrine, M: cellule gliale de Müller, G: cellule ganglionnaire) D'après Reichenbach et coll. (1991)

au corps géniculé latéral. Approximativement 10% des cellules ganglionnaires projettent directement dans les structures subthalamiques, intervenant probablement dans l'information non visuelle comme le réflexe pupillaire ou les rythmes circadiens {Schiller, 1977 #277}. Les cellules ganglionnaires, comme la plupart des cellules à longs axones du SNC, utilisent le glutamate comme neurotransmetteur, mais aussi pour certaines la substance P {Brecha, 1984 #278}. Deux types principaux de cellules ganglionnaires ont été définies : celles de type P et celles de type M. Les cellules ganglionnaires de type M, également appelées cellules ganglionnaires naines, sont de petite taille et semblent responsables de la transmission de l'information de couleur et de forme {Kolb, 1991 #279}. Les cellules de type P qui sont beaucoup plus grosses semblent être plutôt responsables de la transmission de l'information de mouvement {Watanabe, 1989 #5048}.

b) Les cellules gliales

Quatre types de cellules gliales ont été décrites dans la rétine : les cellules gliales de Müller (CGM), les astrocytes, la microglie et chez certaines espèces, des cellules myélinisantes qui entourent les cellules ganglionnaires.

i) Les cellules gliales de Müller (CGM)

Ces sont les cellules gliales principales de la rétine. Alors que leurs corps cellulaires se situent dans la couche nucléaire interne, elles traversent la rétine de part en part. Leurs prolongements vont entourer aussi bien les corps cellulaires que les prolongements et les synapses des neurones de la rétine, permettant leur isolement électrique et neurochimique (Figure 29). Ces prolongements vont également entourer les vaisseaux sanguins, participant ainsi à la barrière hémato-rétinienne. La membrane limitante externe est formée par les extrémités distales des CGM autour des photorécepteurs. Sur ce plan, les CGM communiquent entre elles par des jonctions de type zonulae adherens chez les primates et par des jonctions gap chez les vertébrés inférieurs. Des extensions membranaires, microvillis, sont émises par les CGM dans l'espace sous rétinienn permettant une facilitation du passage des ions et des métabolites. L'extrémité proximale des CGM est appelée le « pied » et leur interaction forme la délimitation avec le corps vitré : la

membrane limitante interne. Cette membrane couvre la totalité de la rétine, y compris la fovéa, indiquant l'importance de celle-ci. Nous verrons par la suite, qu'en plus de cette fonction de support des neurones de la rétine les CGM jouent un rôle important dans la transmission de l'information visuelle {Newman, 2004 #280}.

ii) Les astrocytes

Les astrocytes ont une forme en étoile et sont principalement présents dans la couche des cellules ganglionnaires et la couche plexiforme interne. Leurs prolongements entrent en contact avec les cellules ganglionnaires et les vaisseaux sanguins.

iii) La microglie

On retrouve normalement un faible nombre de cellules de la microglie réticuloendothéliale dans la rétine et uniquement dans la couche des axones des cellules ganglionnaires. Dans des conditions pathologiques, ces cellules phagocytaires très mobiles peuvent être retrouvées partout dans la rétine.

B) Neurotransmission rétinienne et traitement de l'information

Après la phototransduction par les photorécepteurs, le réseau rétinien va permettre l'extraction d'informations utiles, telles que le mouvement ou le contraste, qui sont encodées par les cellules ganglionnaires sous forme de potentiels d'actions.

1) Les différentes composantes

Ces informations sont obtenues à partir d'un axe vertical partant des photorécepteurs connectés aux cellules bipolaires, elles-mêmes connectées aux cellules ganglionnaires. Ces informations sont en outre modifiées par des interactions latérales avec les cellules horizontales dans la CPE, et avec les cellules amacrines dans la CPI. Ceci est également influencé par l'environnement cellulaire très largement régulé par les CGM.

a) Transmission verticale

La transmission verticale de l'information nerveuse se déroule en deux étapes : d'abord par la CPE, entre les photorécepteurs et les cellules bipolaires, puis par la CPI, entre ces mêmes cellules bipolaires et les cellules ganglionnaires. A chacun de ces deux niveaux, la transmission se fait via le même neurotransmetteur, le glutamate, qui est libéré par un phénomène d'exocytose vésiculaire dépendant du Ca^{2+} , à des synapses spécialisées appelées « synapses à rubans » {Morgans, 1999 #282; Schmitz, 1997 #281}. Cette synapse présente non seulement une structure particulière, avec une barre perpendiculaire à la zone active contenant de nombreuses vésicules, mais également un fonctionnement spécifique et différent des synapses dites conventionnelles.

Alors que les synapses conventionnelles libèrent en moyenne vingt vésicules par seconde, les synapses à ruban peuvent libérer jusqu'à plus de cent vésicules par seconde. Ceci est lié au fait que plus de cent vésicules peuvent être attachées au ruban contre une dizaine à proximité de la zone active dans les synapses conventionnelles {von Gersdorff, 1996 #283}. Ceci confère aux synapses à ruban une capacité et une vitesse de transmission particulièrement importante par rapport à une synapse classique.

b) Transmission horizontale

Il est considéré que les cellules horizontales et les cellules amacrines sont capables de libérer des neurotransmetteurs inhibiteurs, la glycine et le GABA et par conséquent, de moduler les informations de la transmission verticale par des phénomènes dit d'inhibition latérale {Roska, 2000 #284; Yang, 2004 #285}. Cette libération semble avoir lieu uniquement via des transporteurs chez le poisson, alors qu'elle doit également pouvoir se faire de façon vésiculaire chez les mammifères. Bien qu'il n'y ait pas de transporteurs du GABA, la présence du transporteur vésiculaire VIAAT aux terminaisons des cellules horizontales suggère la présence de vésicules chargées en acides aminés inhibiteurs {Cueva, 2002 #268; Haverkamp, 2000 #269; Jellali, 2002 #270}. Une protéine vésiculaire appelée synaptoporine a, en outre, été retrouvée dans les cellules horizontales de lapin. De plus, des canaux calciques de type L sont responsables de l'entrée de Ca^{2+} dans les cellules

horizontales et amacrines, ceci étant une étape indispensable à la libération vésiculaire {Brandstatter, 1996 #287; Gleason, 1994 #286}.

c) Modulations gliales

La concentration de glutamate dans la fente synaptique qui représente le signal de l'intensité lumineuse est régulée par trois facteurs : la libération, la recapture et la diffusion {Vandenbranden, 1996 #288}. Il s'avère que les cellules gliales, et en particulier les CGM, sont impliquées dans ces trois phénomènes.

Aussi bien la libération que la recapture des neurotransmetteurs sont dépendantes de l'apport énergétique. Bien que la plupart des neurones expriment un transporteur de glucose à leur surface, leur permettant ainsi d'avoir une source d'énergie via la glycolyse, il a été montré que les neurones, et en particulier les photorécepteurs, vont utiliser préférentiellement le lactate libéré par les CGM comme source d'énergie {Poitry-Yamate, 1995 #289}.

Les CGM sont également impliquées dans le recyclage des neurotransmetteurs, glutamate et GABA, libérés par les neurones lors de la transmission synaptique. Les CGM vont récupérer le glutamate libéré via le transporteur spécifique GLAST puis le convertir en glutamine via la glutamine synthétase {Derouiche, 1996 #290}. Les CGM peuvent également synthétiser du glutamate ou récupérer du glutamate ou de la glutamine via la circulation sanguine. La glutamine va pouvoir alors être relarguée dans l'espace extracellulaire afin d'être récupérée par les neurones via un transporteur des acides aminés neutres encore non identifié. De son côté, le GABA peut être récupéré par les cellules gliales via un transporteur dépendant du Cl⁻ et du Na⁺, avant d'être converti via la GABA transaminase {Germer, 1998 #292; Germer, 1998 #291}. Les cellules gliales sont non seulement responsables de la régulation des concentrations en neurotransmetteurs, mais aussi de la régulation de l'homéostasie des ions impliqués dans la transmission synaptique. Comme nous l'avons déjà mentionné (v. § II-5-B-3-b), l'un des rôles principaux des CGM dans la rétine est le « siphoning » du potassium, c'est-à-dire son transport depuis

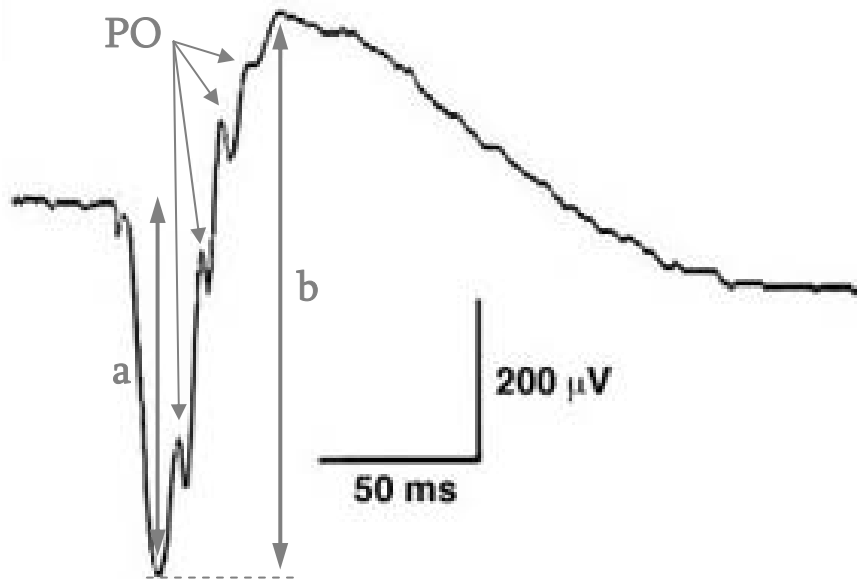


Figure 31 : Electrorétinogramme typiquement obtenu chez l'homme. (a: onde a, b: onde b, PO: potentiels oscillatoires)

l'environnement synaptique, où il est libéré par les neurones lors de leur activation, vers la circulation sanguine ou le vitré {Kofuji, 2004 #294; Newman, 1984 #293}. L'une des protéines essentielles dans ce phénomène est un canal potassique appelé Kir4.1, localisé dans la membrane limitante interne ainsi qu'autour des vaisseaux sanguins, permettant donc la libération du potassium vers le vitré et la circulation sanguine {Kofuji, 2003 #295; Nagelhus, 1999 #296}.

Les CGM sont enfin très impliquées dans la régulation physique de la diffusion, puisqu'elles sont en partie responsables de la géométrie de la synapse. En effet, en occupant l'espace péri-synaptique, elles isolent les synapses les unes des autres à l'intérieur d'une même terminaison ou bien les synapses d'une même terminaison de celles d'une terminaison voisine {Burris, 2002 #297}.

2) Méthodes de mesures : l'électrorétinogramme (ERG)

Nous venons de décrire le trajet de l'information lumineuse qui arrive à la rétine, est transformée en information électrique, puis envoyée depuis les photorécepteurs jusqu'aux cellules ganglionnaires afin d'être transmise aux aires corticales. Il est possible de suivre et d'enregistrer les potentiels d'actions, produits dans la rétine à la suite d'une stimulation lumineuse, sous la forme d'un électrorétinogramme (ERG) {Dowling, 1987 #298}. Il s'agit d'un test non invasif qui est utilisé couramment en recherche fondamentale mais aussi en clinique afin d'étudier l'état fonctionnel de la rétine. Différents types d'ERG peuvent être enregistrés : l'ERG scotopique, après adaptation à l'obscurité, et l'ERG photopique, après adaptation à la lumière.

L'ERG est la somme algébrique et dans le temps, des différents potentiels d'actions qui apparaissent dans les différentes cellules excitables de la rétine. L'ERG se compose de plusieurs ondes dont l'origine est différente :

- L'onde a, qui est la première partie de la réponse, est négative et représente l'activité des photorécepteurs.

- L'onde b est une réponse positive qui semble être directement produite par les cellules bipolaires, probablement sans intervention directe des CGM, contrairement à ce qui a été longtemps suggéré.
- L'onde c, qui est une réponse lente, peut être mesurée dans certaines conditions et provient de l'épithélium pigmentaire.
- Les potentiels oscillatoires sont des oscillations ayant lieu au cours de l'apparition de l'onde b et qui semblent correspondre à l'activité dans la couche plexiforme interne.

L'ERG est donc devenu au fil du temps un outil incontournable dans l'étude des pathologies affectant la rétine, et en particulier la rétine externe, puisque des affections impliquant les cellules ganglionnaires ou le nerf optique n'ont aucune conséquence sur l'ERG.

C) En résumé

La rétine est l'organe neurosensoriel qui permet la réception et la transformation de l'information visuelle puis sa transmission sous la forme d'un message nerveux jusqu' aux structures cérébrales supérieures. Ces différentes étapes sont possibles grâce à une organisation cellulaire et moléculaire stratifiée bien précise. Cette organisation permet à la fois la réception et la transmission de l'information visuelle mais également sa modulation. Il ne s'agit pas simplement d'une structure avec une transmission verticale de l'information d'une cellule à l'autre. Il existe des degrés d'intégration à chaque niveau de transmission, avec l'intégration par une cellule de plusieurs informations présynaptiques à la fois activatrices et inhibitrices. Cette information va également pouvoir être modulée par l'action d'un troisième intervenant, les cellules gliales, et en particulier les cellules gliales de Müller, qui sont primordiales pour le bon fonctionnement des neurones mais également directement impliquées dans la neurotransmission.

IV- Résultats Personnels

1) Présentation générale

La Dp71 est le produit du gène DMD majoritairement exprimé dans la rétine et dans le système nerveux central en général. Bien que Claudepierre et coll. (1999) aient montré que cette protéine est exprimée par les cellules gliales de Müller dans la rétine de rat, sa fonction restait à préciser {Claudepierre, 1999 #26}. Notre étude a eu pour objectif majeur de déterminer la ou les fonction(s) de la Dp71 dans la vision. Pour ce faire, nous disposions d'une souche de souris déficiente pour son expression : la souris Ko-Dp71, produite et mise à notre disposition par le groupe des Pr. David Yaffe et Uri Nudel (Weizman Institute, Rehovot, Israël).

Notre travail a eu tout d'abord pour enjeu d'explorer le rôle potentiel de la Dp71 dans les fonctions de la cellule gliale de Müller et tout particulièrement dans la neurotransmission rétinienne. Dans le muscle, la dystrophine participe à un complexe macromoléculaire de protéines associées, qui est essentiel au maintien de l'intégrité de la fibre musculaire lors des cycles de contraction/relaxation, ainsi qu'à la localisation des canaux sodiques dans les synapses neuromusculaires. Nous avons voulu déterminer si un tel complexe, qui comprendrait la Dp71, serait présent dans la rétine et en étudier la composition, les possibles ligands ainsi que les mécanismes moléculaires permettant la formation de ce complexe.

Lors de l'étude de la souche de souris Ko-Dp71, Sarig et coll. avait montré que le promoteur de la Dp71 était actif dans la rétine mais aussi dans le cristallin embryonnaire {Sarig, 1999 #341}. Afin de déterminer le rôle que pourrait occuper la Dp71 dans ce tissu, nous avons effectué une étude de l'expression et la localisation des produits du gène DMD ainsi que des conséquences de l'absence de la Dp71 dans le cristallin de souris adulte.

2) Objectif I : Rôle de la Dp71 dans la rétine

A) Situation du sujet

Au milieu des années 1990, les groupes de Sigesmund et Cibis ont mis en évidence une perte de l'onde b de l'ERG en conditions scotopiques chez 80% des patients DMD {Cibis, 1993 #156; Sigesmund, 1994 #157} suggérant la participation des dystrophines dans la neurotransmission rétinienne. Par la suite, l'étude comparée des différents modèles murins de la DMD a conduit à l'observation d'un trouble similaire uniquement dans la souche *mdx^{3cv}* présentant une forte diminution de tous les produits du gène DMD {Pillers, 1995 #299}. Ceci semblait indiquer qu'à l'inverse du muscle, où l'absence seule de la dystrophine est responsable de l'apparition de la dégénérescence musculaire, les produits courts du gène DMD seraient également mis en jeu dans la rétine. De plus, l'étude de lignées de souris présentant une altération de tous les produits du gène DMD à l'exception de la Dp71 a montré qu'elles ne présentaient pas de perturbations de l'ERG, semblant indiquer un rôle prépondérant de cette dernière {Pillers, 1999 #20}{Kameya, 1997 #23}.

Dans le but de rechercher l'implication de la Dp71 dans le phénotype ERG, nous avons dans un premier temps effectué des enregistrements électrorétinographiques sur la lignée de souris Ko-Dp71. Comme nous l'avons déjà indiqué, l'une des hypothèses sur la génération de l'onde b de l'ERG concerne le rôle des CGM dans l'élimination du potassium libéré par les neurones. Etant donné que la Dp71 est exclusivement exprimée dans la rétine par les CGM, nous avons analysé l'influence de son absence sur l'expression, la localisation et les capacités fonctionnelles du principal canal potassique, le canal Kir4.1, qui est impliqué dans le phénomène de « Potassium siphoning » {Newman, 1984 #293}. Nous avons également étudié le canal aqueux AQP4 qui est responsable du contrôle du transport aqueux trans-rétinien intimement lié aux courants potassiques {Li, 2002 #300; Nagelhus, 1999 #296}, et qui colocalise avec le Kir4.1.

Par ailleurs, il a été décrit dans l'introduction que les CGM sont fondamentales pour la régulation de l'homéostasie rétinienne (cf. III-6-B-1-c). Outre le contrôle des courants potassiques et des flux aqueux, elles sont également responsables de la régulation de la

concentration d'autres ions ainsi que du recyclage des neurotransmetteurs. En effet, les CGM sont responsables de la récupération du glutamate libéré par les neurones et de sa conversion en glutamine par la glutamine synthétase, afin d'être exporté vers les neurones pour refaire les stocks de glutamate. Cette récupération permet de réguler l'action des neurotransmetteurs et notamment d'éviter une surexcitation des neurones pouvant mener à leur mort, ce phénomène est appelé excitotoxicité. La régulation générale de l'homéostasie, aussi bien ionique que glutamatergique est nécessaire au bon fonctionnement des neurones de la rétine en conditions « normales » mais encore plus lorsqu'elle est soumise à un stress métabolique. L'ischémie est l'un des stress métaboliques majeurs, qui peut se produire lors de diverses pathologies telles que le glaucome ou la rétinopathie diabétique, et qui met particulièrement en jeu la capacité des CGM à réguler l'homéostasie. Afin d'étudier le rôle de la Dp71 dans les fonctions de la CGM, nous avons analysé les conséquences de son absence sur la survie des neurones de la rétine lors d'un épisode ischémique transitoire.

B) Résultats

Lors de l'enregistrement d'ERG en condition scotopique, nous avons observé que l'absence de Dp71 induit une légère diminution de l'amplitude de l'onde a mais pas de celle de l'onde b.

L'étude de la localisation des produits du gène DMD chez la souris Ko-Dp71 nous a permis de confirmer que la Dp71 est exprimée dans les CGM, en particulier autour des vaisseaux sanguins ainsi qu'à la membrane limitante interne formée par le pied de ces cellules. La comparaison des marquages obtenus chez la souris sauvage par rapport à ceux obtenus chez la souris Ko-Dp71, nous a permis de confirmer que les autres produits du gène DMD exprimés dans la rétine sont localisés dans la CPE. Nous avons également constaté une légère augmentation de l'expression de la Dp140 et de l'utrophine en absence de Dp71.

Le β -dystroglycane présente une localisation similaire à celle des dystrophines dans la rétine de souris contrôle. En absence de Dp71, une diminution significative de l'intensité du marquage correspondant au β -dystroglycane a été observée autour des vaisseaux sanguins et à la MLI mais pas dans la CPE.

L'absence de Dp71 entraîne la délocalisation du canal potassique Kir4.1 et du canal aqueux AQP4. Alors que l'expression du canal potassique Kir4.1 n'est pas modifiée en absence de Dp71, celle du canal aqueux AQP4 diminue fortement. L'étude des courants potassiques globaux des CGM isolées a permis de montrer que la délocalisation des canaux Kir4.1 n'induit pas de modification significative de ceux-ci.

La modification de la localisation de ces deux canaux en absence de Dp71 provoque une augmentation de la sensibilité des neurones rétiniens à un épisode ischémique transitoire. La survie des cellules ganglionnaires est divisée par un facteur 2 en absence de Dp71.

C) Conclusions

Contrairement à ce que laissait présager les études antérieures sur les différentes souches de souris déficientes pour les produits du gène DMD, l'absence seule de la Dp71 n'induit pas l'apparition du phénotype ERG. Ceci démontre clairement que la Dp71, et par conséquent la CGM, n'est pas directement impliquée dans la génération de l'onde b. De plus, notre étude met en évidence une surexpression de la Dp140 et de l'utrophine en absence de Dp71, suggérant l'existence de mécanismes de compensations moléculaires entre les membres de la superfamille des dystrophines. Cependant, cette surexpression ne semble pas suffisante d'un point de vue moléculaire et fonctionnel puisqu'elle n'empêche pas la délocalisation des canaux potassiques Kir4.1 et aqueux AQP4. Ce travail montre également que ces deux protéines, qui sont considérées comme appartenant à une même entité fonctionnelle, semblent être régulées différemment puisque l'AQP4 est régulé négativement alors que le Kir4.1 ne semble pas être modifié. Enfin, nous montrons dans

cette étude que la Dp71 est une protéine primordiale dans la régulation de l'homéostasie, en particulier en réponse à un stress de type ischémie transitoire.

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

Targeted inactivation of dystrophin gene product Dp71: phenotypic impact in mouse retina. Cécile Dalloz*, Rachel Sarig*, **Patrice Fort***, David Yaffe, Agnès Bordais, Thomas Pannicke, Jens Grosche, Dominique Mornet, Andreas Reichenbach, José Sahel, Uri Nudel and Alvaro Rendon. *Human Molecular Genetics*, 2003, Vol. 12, No. 13 1543–1554.

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

[signalement bibliographique ajouté par : ULP – SCD – Service des thèses électroniques]

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

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

Human Molecular Genetics 12, 1543-1554 (2003)

Pages 1543-1554 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Pour les utilisateurs ULP, il est possible de consulter cette publication sur le site de l'éditeur

<http://hmg.oxfordjournals.org/cgi/reprint/12/13/1543.pdf>

Il est également possible de consulter 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.

3) Objectif 2 : Complexe Dp71/DAPs dans la Cellule gliale de Müller

I. Caractérisation du complexe sarcoglycane/sarcospane dans la rétine

A) Situation du sujet

Nous avons montré que la Dp71 est une protéine clé dans la fonction de régulateur de l'homéostasie rétinienne des cellules gliales de Müller. Dans le muscle ou à la jonction neuromusculaire, les fonctions occupées par la dystrophine requièrent un complexe macromoléculaire de protéines associées : le DGC.

Les sarcoglycanes (SG) et le sarcospane (SSPN) sont des protéines transmembranaires formant un complexe qui s'est révélé être, dans le muscle, l'un des constituants essentiels de l'échafaudage macromoléculaire auquel participe la Dp427. La fonction exacte de ces protéines reste à préciser, cependant il semble qu'elles participent à la stabilisation générale du DGC. Dans le muscle, l'absence de dystrophine induit une désagrégation du DGC, marquée notamment par une déstabilisation des sarcoglycans et du sarcospan. A ce jour, six sarcoglycans ont été identifiés dans le muscle : α -, β -, δ -, γ -, ζ - et ϵ -SG. Des mutations affectant cinq d'entre eux ont été reliées à des pathologies musculaires : dystrophie musculaire autosomale récessive (LGMD) pour l' α -, β -, δ - et le γ -SG ; syndrome *myoclonus-dystonia* (MDS) pour l' ϵ -SG {Hack, 2000 #301}.

Lors de leur découverte, ces protéines ont été décrites comme des protéines spécifiquement musculaires. Bien que l'expression de l' α -SG semble restreinte aux muscles striés squelettique et cardiaque {Yamamoto, 1994 #302}, celle des autres SGs a parfois été rapportée dans d'autres systèmes incluant le SNC {Jung, 1996 #303; Nigro, 1996 #304} dont la rétine {Claudepierre, 1999 #26}. Ces observations laisseraient supposer que les SGs et le SSPN pourraient également avoir un rôle fonctionnel dans le SNC. Cependant, aucune étude systématique n'avait jusqu'ici été menée afin de déterminer leur expression et leur localisation dans ces tissus. Nous nous sommes donc attachés à établir une cartographie de l'expression et de la localisation de chacun des SGs ainsi que du SSPN dans la rétine.

Nous avons montré précédemment que la Dp71 était responsable de la localisation des canaux potassique Kir4.1 et aqueux AQP4 dans les pieds des CGM. Afin de caractériser

le ou les complexes Dp71/DAPs impliqués dans la CGM, nous nous sommes également intéressés à l'expression et à la localisation de chacun des membres de ce complexe dans la rétine en absence des produits du gène DMD (*mdx^{3cv}*).

B) Résultats

Nous avons détecté dans la rétine le messenger de chacun des membres du complexe SG/SSPN testés à l'exception de l' α -SG. Alors que l' ϵ -SG et le SSPN sont fortement exprimés, le β -, δ - et γ -SG le sont beaucoup plus faiblement. Le niveau d'expression de chacun de ces messagers est identique dans la rétine de souris déficiente en dystrophines.

L'absence d'expression de l' α -SG a été confirmée au niveau protéique. Les autres protéines du complexe SG/SSPN ont été localisées dans la rétine de souris dans la couche des cellules ganglionnaires ainsi qu'à la membrane limitante externe (MLE). La forte diminution de tous les produits du gène DMD n'entraîne pas de modification significative du niveau d'expression ou de la localisation des protéines du complexe SG/SSPN.

Nous avons montré que les marquages obtenus avec les différents anticorps dirigés contre les SGs et le SSPN sont localisés dans les extrémités basales et apicales des CGM, ainsi que de façon plus étonnante, dans les axones des cellules ganglionnaires. Aucun ARN messenger des dystrophines n'a pu être mis en évidence dans des cellules ganglionnaires isolées en culture.

C) Conclusions

Les sarcoglycanes qui ont longtemps été considérés comme des protéines exclusivement exprimé dans le tissu musculaire, ont, à l'exception de l' α -SG, également présentes dans la rétine. Ces protéines présentent toutes une localisation assez similaire. Elles sont en effet localisées comme la Dp71 à la MLI, mais également de façon plus étonnante à la MLE et dans les axones des cellules ganglionnaires où aucune des dystrophines n'a jamais été rapportée. Alors que dans le muscle l'absence de la dystrophine entraîne des perturbations du complexe SG/SSPN, la forte diminution de tous

les produits du gène DMD ne semble pas induire de modifications de leur expression ou de leur localisation dans la rétine. Ceci suggère que, à l'opposé de ce qui se passe dans le muscle, le complexe SG/SSPN est indépendant des dystrophines dans le SNC.

Ce travail fait l'objet de la publication suivante :

The Sarcoglycan-Sarcospan Complex Localization in Mouse Retina is Independent from Dystrophins. Patrice Fort, Francisco-Javier Estrada, Agnès Bordais, Dominique Mornet, José-Alain Sahel, Serge Picaud, Haydeé Rosas Vargas, Ramón M. Coral-Vázquez, and Alvaro Rendon. *Accepté pour publication dans Neurosciences Research.*

Publication n°2 :

***The Sarcoglycan-Sarcospan Complex Localization in Mouse
Retina is Independent from Dystrophins***

Patrice Fort^a, Francisco-Javier Estrada^{b,c}, Agnès Bordais^a, Dominique Mornet^d, José-Alain Sahel^a, Serge Picaud^a, Haydeé Rosas Vargas^b, Ramón M. Coral-Vázquez^b, and Alvaro Rendon^{a*}

^aINSERM U-592 Laboratoire de Physiopathologie Cellulaire et Moléculaire de la Rétine
Hôpital Saint Antoine - Bat Kourilsky 184 rue de Fbg St Antoine
F-75571 Paris CEDEX, France

^b Unidad de Investigación Médica en Genética Humana, Hospital de Pediatría, Centro Médico
Nacional Siglo XXI-IMSS, Av. Cuauhtémoc 330 Col. Doctores, C.P. 06725 México, D.F.

^cMolecular Biology Laboratory; Medical School, Universidad Panamericana, México and Biological
Sciences IPN

^dDepartement de Physiologie des Interactions (EA701), Institut de Biologie, Bvd Henry IV,
34060 Montpellier, France

*Corresponding author.
Fax: 33(0)149284605
E-mail: rendon@st-antoine.inserm.fr

18 text pages
3 figures
2 tables

Abstract

The sarcoglycan-sarcospan complex is part of the dystrophin-glycoprotein complex that has been extensively characterized in muscle. To establish the framework for functional studies of sarcoglycans in retina here we quantified sarcoglycans mRNA levels with real-time RT-PCR and performed immunohistochemistry to determine their cellular and subcellular distribution. We showed that the β -, δ -, γ -, ϵ -sarcoglycans and sarcospan are expressed in mouse retina. They are localized predominantly in the outer and the inner limiting membranes, probably in the Müller cells and also in the ganglion cells axons where the expression of dystrophins have never been reported. We also investigated the status of the sarcoglycans in the retina of *mdx*^{3cv} mutant mice for all Duchene Muscular Dystrophy gene products. The absence of dystrophin did not produce any change in the sarcoglycan-sarcospan components expression and distribution.

Keywords: retina, sarcoglycans, sarcospan, dystrophins, mouse, *mdx*^{3cv}

Introduction

The dystrophin associated protein complex (DAPC), is a complex conformed by the interaction of multiple proteins that associate intimately with dystrophin at the sarcolemma of skeletal, cardiac and smooth muscle (Campbell, 1995, Straub et al., 1999, Yoshida and Ozawa, 1990). The sarcoglycan-sarcospan (SG-SSPN) and the dystroglycan complexes are essential components of the DAPC, along with syntrophins, dystrobrevins and a diverse group of signaling proteins (Blake et al., 2002). Through its attachment to the extracellular matrix, the DAPC provides a mechanosignaling linkage between the outside compartment of muscle cells and the intracellular cytoskeleton (Ervasti and Campbell, 1993).

The absence of dystrophin leads to the disorganization of the DAPC and especially to the decrease of expression of the sarcoglycans (SGs) in muscle (Chamberlain et al., 1997). The SGs are asparagine-linked glycosylated proteins with single transmembrane domains (Ozawa et al., 1998) that form complex mediating muscle membrane stability (Hack et al., 2000). The integrity of the SG-SSPN complex requires the coordinated translation and assembly of its subunits. Perturbations in this complex lead to limb girdle muscular dystrophies and cardiomyopathies in both humans and mice (Bonnemann et al., 1995, Coral-Vazquez et al., 1999, Lim et al., 1995, Nigro et al., 1996, Noguchi et al., 1995, Roberds et al., 1994). Six sarcoglycan genes and gene products have been identified to date. According to their topology, α -sarcoglycan (α -SG) and ε -sarcoglycan (ε -SG) are highly similar type I glycosylated transmembrane proteins, whereas γ -sarcoglycan (γ -SG), δ -sarcoglycan (δ -SG), and ζ -sarcoglycan (ζ -SG) are type II glycosylated transmembrane proteins, highly similar among themselves but weakly similar to β -sarcoglycan, consistent with the idea of multiple gene duplication events (Fanin et al., 1997, Wheeler et al., 2002). Besides, SSPN is a protein with four transmembranal domains, structurally related to the tetraspan family of proteins, a

group of proteins thought to be molecular facilitators (Crosbie et al., 1997). SSPN co-purifies with the DAPC, and its expression is significantly reduced when the SGs expression is altered, which confirms their association as a complex (Coral-Vazquez et al., 1999).

Dystrophin is the product of the Duchenne Muscular Dystrophy (DMD) gene, which is located at Xp21 in human (Koenig et al., 1988). Mutations in the DMD gene are responsible of one of the most common inherited myodegenerative diseases, and affect about one in 3500 male newborn. In addition to the severe muscle phenotype, the majority of DMD patients also present certain developmental, behavioral and cognitive deficits indicating that the DGC also play a crucial role during CNS function (Lidov, 1996, Mehler, 2000). Indeed dystrophins, utrophins, dystroglycans, and components of the cytoplasmic complex (i.e. syntrophins, dystrobrevins) are found in many tissues, among them the central nervous system (CNS) including brain and retina (Blake and Kroger, 2000, Mehler, 2000, Ueda et al., 2000). In addition to the full-length dystrophin isoforms, internal promoters activation in the DMD gene leads to the expression of four different short products called according to their apparent molecular mass, Dp260, Dp140, Dp116 and Dp71. These products present different tissue-specific pattern of expression. Dp71 is the major DMD gene product in the central nervous system, including retina (Rodius et al., 1997). One of the best characterized deficits in the CNS of DMD patients is the altered dark-adapted electroretinogram (ERG). 80% of DMD patients as well as the *mdx*^{3cv} mouse strain which suffer a drastic reduction of all the DMD gene products, show a delayed implicit time and a reduced amplitude of the b-wave selectively in the scotopic ERG (Pillers et al., 1995, Sigismund et al., 1994).

We and others have previously shown that except Dp116, dystrophins and some of the DAPs are expressed in rat, mouse and rabbit retinae (Claudepierre et al., 1999, D'Souza et al., 1995, Koulen et al., 1998, Montanaro et al., 1995, Ueda et al., 1995). In the main glial cell of the retina - the Müller glial cells (MGC) - we have demonstrated the existence of a γ -SG

containing complex that includes Dp71, β -dystroglycan and α 1-syntrophin (Claudepierre et al., 2000), and suggested that the subcellular distribution of the inwardly rectifying potassium channel Kir4.1 and the water pore aquaporin 4 (AQP4) might depend on the activity of this complex (Daloz et al., 2003). However, thus far only the expression of δ - and γ -sarcoglycans in retina (Claudepierre et al., 2000) and ϵ -sarcoglycan in brain (Xiao and LeDoux, 2003) has been demonstrated in the CNS. Studying the expression and the cellular localization of the SG-SSPN complex in mouse retina would help us to identify the possible functional correlations between sarcoglycans and the dystrophins/dystroglycan complex, as well as to elucidate the molecular basis of the retinal phenotypes of the DMD. In this study we employed real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR), and immunohistochemistry to determine the SGs-SSPN distribution in mouse retina, and by using the *mdx*^{3cv} mice strain as model, we determined that the sarcoglycans distribution seems to be dystrophins-independent.

Materials and Methods

Animals. C57Bl/6 control and *mdx*^{3cv} mutant mice strains were bred in our laboratory. *mdx*^{3cv} originated from mice generously provided by the late Dr. Verne M. Chapman (Roswell Park Memorial Institute, Buffalo, NY). Mice were identified by PCR analysis as described by Cox et al. (Cox et al., 1993). Immunoblot analysis with Dys2 antibody (Novocastra Laboratories) was performed with brain total protein extracts to verify the *mdx*^{3cv} phenotype. All experiments were in compliance with the European Communities Council Directives (86/609/EEC) for animal care and experimentation.

Real-time RT-PCR. Total RNA from mice retina was extracted using Trizol reagent (Invitrogen-Life Technologies) according to the manufacturer's instructions. One microgram of total RNA was reverse transcribed using random hexamers and SuperScript II (Invitrogen-Life Technologies). Real-time PCR was done using the LightCycler system (Roche Diagnostics, USA) with SYBR Green detection and T_m analysis. LightCycler FastStart DNA Master-^{PLUS} SYBR Green I kit was purchased from Roche Diagnostics (Roche Diagnostics GmbH). Amplification was performed in a total volume of 20 µl containing the Master mix (including Taq DNA polymerase, reaction buffer, MgCl₂, dNTP mix, and SYBR Green dye), 0.5 µM of each primer (table 1) and 1/100 of the cDNA previously obtained. Amplification conditions consisted of 40 cycles (95°C for 0 sec, 60°C for 5 sec, and 72°C for 20 sec).

Semi-quantification of the real-time RT-PCR products. To identify PCR products generated in the presence of SYBR Green, a T_m analysis was performed by increasing the temperature from 60°C to 90°C at a linear transition rate of 0.1°C/sec. Fluorescence of the samples was monitored continuously while the temperature was increased. SYBR Green was released upon denaturation, which resulted in a decreasing fluorescence of the signal. The LC software calculated the T_m, i.e. the rate of change in fluorescence (-dF/dT) was displayed as a function of temperature. The LC software also calculated the crossing point that indicated the

relative expression of each product observed. β -actin messenger expression was used to normalize the values and the results were calculated as relative expression with respect to actin as 100 %.

Antibodies. Antibodies against the SG-SSPN complex used in this study have been previously described (Rivier et al., 1999) and are summarized in the table 2. The antibodies used against protein cell markers were the anti-glutamine synthetase monoclonal antibody from Chemicon (CA, USA) for Müller glial cells, and the anti-NF68 monoclonal antibody from Sigma (Saint-Quentin Fallavier, France) for ganglion cells.

Tissue Preparation and Immunohistochemistry After enucleation and removal of cornea and lens, mice eyes were fixed 3 min in 4 % paraformaldehyde. Eyes were cryoprotected before embedding in freezing medium (cryoblock, Labonord) and frozen in liquid nitrogen. They were vertically sliced at 7 μ m thickness in a cryostat and placed on gelatin-coated slide glasses. Immunocytochemical labeling was carried out using the indirect immunofluorescence method as previously reported (Daloz et al., 2003). After mounting in Gel/Mount (Biomedex, Foster City, CA) double labeling were examined and photographed using a confocal laser scanning equipped with an argon-krypton laser (TCS SP1 Leica, Lasertechnik GmbH). Controls were prepared by omitting the primary antibody during the incubation; in these controls, no specific staining could be detected.

Müller cell culture. Primary retinal glial cell cultures were prepared from 2 weeks-old C57Bl/6 mice as described by Hicks and Courtois (Hicks and Courtois, 1990).

Ganglion cell culture. Primary cultures of retinal ganglion cells (RGC) were derived from 2 months-old C57Bl/6 mice retinae and purified by sequential immunopanning as described for young rat retinae (Barres et al., 1988).

Results and Discussion

In order to investigate the status of the members of the SG-SSPN complex in the retina and to examine the molecular and cellular consequences of the absence of dystrophins for individual SGs expression, here we evaluated the relative sarcoglycan mRNAs and proteins expression in wild-type (wt) C57Bl/6 and *mdx*^{3cv} mice retinae.

Real-time RT-PCR was performed on whole retinal preparation from both strains. Positive controls were performed by classical RT-PCR with mice muscle extracts. All the amplification products had the expected size (data not shown). Figure 1 revealed that the mRNAs of β -, δ -, γ -, ϵ -SGs and SSPN were expressed in wt mice retinae at various levels. The β - and ϵ -SGs transcripts were the most abundantly expressed. Comparative analysis of the transcript levels between the wt and the *mdx*^{3cv} strains showed that there was not a significant difference in levels of expression of neither the SGs nor the SSPN mRNAs. The analysis of protein expression by western-blot show similar results to those found for transcripts (data not shown). It should be noted that no α -SG transcript or protein was detected in mice retinae from wt and *mdx*^{3cv} strains. On the other hand, as previously reported, we noted a great reduction of the Dp71 mRNA in *mdx*^{3cv} with respect to the wt (Fig.1), whereas smaller perturbations were observed for the other DMD gene products expressed in retina (data not shown).

To assess the retinal distribution of SGs in presence or absence of dystrophins we performed immunostaining assays with polyclonal antisera specific for single SGs and SSPN in serial retinal sections of wt and *mdx*^{3cv} mice strains. Figure 2 shows that the pan-specific dystrophins antibody H4, revealed in retinae of wt mice a punctuate signal in the outer plexiform layer (OPL, arrows), a staining around the blood vessels and at the inner limiting membrane (ILM, arrow heads). This labeling disappears in the *mdx*^{3cv} mice strain, which

confirmed that in spite of the fact that the dystrophins mRNAs are detected at different levels in the *mdx*^{3cv} strain, this mutation resulted in a dramatic reduction of protein expression.

It has been shown that from the SG-family members, which are largely restricted to muscle, the ϵ -SG is highly expressed in many tissues, including brain (McNally et al., 1998). In mice retinae, the anti ϵ -SG antibody, LG7, clearly revealed that ϵ -SG is highly expressed at the vitreal surface in the ganglion cell layer (GCL) and ILM. This localization could correspond to a distribution at the soma of ganglion cells, the nerve fiber layer (NFL) and/or at the MGC end feet in both wt and *mdx*^{3cv} mice strains. It was also observed a diffuse labeling at the inner nuclear layer (INL), at the OPL and at radial processes terminating at the outer limiting membrane (OLM, small arrows). As shown in figures 2 and 3, the overall distribution pattern of β -, δ -, γ -SGs and SSPN immunoreactivity did not differ from the one observed for ϵ -SG, with the particularity that ϵ -SG is the most highly expressed at both edges of the retina. In addition, as expected from the results obtained by real-time RT-PCR (Fig.1) no positive staining was detected for the α -SG neither in wt nor in *mdx*^{3cv} mice (data not shown).

It has been established that in the mouse retina, the Dp427, Dp260 and Dp140 are concentrated within the OPL (Howard et al., 1998), in two morphological shapes, bars and puncta most likely corresponding to the labeling of photoreceptors terminals and/or dendritic processes of bipolar neurons. In this study, we were unable to neither detect this kind of specific immunoreactivity with antibodies against SGs and SSPN, in the wt nor in the *mdx*^{3cv} mice (compare immunostaining in Fig.2 and Fig.3B for dystrophins and SSPN). Although under the basis of this result we can not completely exclude the participation of SGs and SSPN at the formation of functional complex with dystrophins at the OPL, this observation is not in favor of the constitution of such a complex.

Thus our results suggest that opposite to what is known for skeletal muscle (Chamberlain et al., 1997), the expression and localization of SGs and SSPN in retina are if not totally, at least partially independent of the dystrophins-expression. In order to explore in more detail this hypothesis, we performed double labeling experiments in which the immunostaining of dystrophins, SGs and SSPN was combined with the labeling of glutamine synthetase or the neurofilament subunit of 68 kDa (NF68), specific markers of MGC and axons of ganglion cells respectively. In wt retina, double immunolabeling with the pan-specific dystrophins antibody H4 and the anti-glutamine synthetase shows strongly stained glutamine synthetase positive MGC spanning the whole thickness of the retina from the OLM to the ILM. A considerable overlap was observed at the ILM (Fig.3 arrows) confirming our previous observation of the localization of the Dp71 at the end-feet of the MGC (Daloz et al., 2003). It should be noted that no staining of dystrophins was evident at the OLM or in the MGC fibers stained by the glutamine synthetase antibody in the outer retina. We therefore investigated if the dystrophins may be colocalized with the NF68 at ganglion cell fibers. In wt retina double immunolabeling with the pan-specific dystrophins antibody H4 and the anti-NF68 shows strongly stained NF68 positive nerve fibers without overlapping with the dystrophins staining. To ascertain whether or not the dystrophins were expressed by the MGC and the ganglion cells, we performed a comparative study by RT-PCR of their mRNA expression in whole retina, cultured MGC and cultured ganglion cells. We failed to detect the expression of Dp427, Dp260 and Dp140 in both cultured cell types, whereas the transcript of Dp71 was not expressed in the cultured ganglion cells, but was detected in the cultured MGC (data not shown).

We further compared in wt retinae the double immunolabeling of each one of the SGs and SSPN with either the labeling of the glutamine synthetase or the NF68. Similarly to what was found with dystrophins, a considerable overlapping was observed at the ILM between the

ϵ -SG and the glutamine synthetase (Fig.3 arrows). However, in this case, ϵ -SG expression was also noted within the external retina, where an overlap of the staining was also observed at the MGC fibers and the OLM (Fig.3 arrowheads). A similar localization pattern was observed in the case of β -, δ -, γ - SGs and SSPN (Fig. 3). These results show that whereas Dp71 and all the SGs and SSPN are localized together at the endfeet of the MGC, only the SGs and SSPN are present in the outer retina. It is tempting to speculate that as reported in skeletal and cardiac muscles situation (Straub et al., 1999, Wheeler et al., 2002), it would be possible that two distinct sarcoglycans complexes coexist in MGC, one composed of Dp71 and the well-characterized tetrameric unit of ϵ -, β -, γ -, and δ -SGs, and a second one that would not be associated with Dp71, composed of SGs, and yet unidentified proteins.

We thereafter investigated whether the ϵ -SG immunostaining overlaps or not with NF68. On the contrary to what was observed in the case of dystrophins, both immunoreactivities were detected at the NFL, thus suggesting that ϵ -SG is expressed by the ganglion cells (Fig.3 stars). As expected, the comparison of the double immunolabeling of β - δ -, γ - SGs or SSPN and NF68 revealed a similar localization to that of ϵ -SG for all these proteins (Fig.3). However, it should be remarked that the high immunofluorescence observed for ϵ -SG at the nerve fibers could mask the ganglion cells soma immunolabelling that is more evident for the other SGs and the SSPN. Thus, in retina, the dystrophins and the SGs–SSPN complex not only differ in their intracellular localization but they are also differentially expressed between glial and neuron cells. Since the dystrophins are not expressed by the ganglion cells, the SG–SSPN complex should be associated to yet unidentified partners.

It is known that at the sarcolemma, the SGs associate with the dystroglycan complex (Ibraghimov-Beskrovnaya et al., 1992). Because dystrophin and dystroglycan complex interact with actin and laminin, respectively, the absence of dystrophin from this molecular linkage has direct molecular consequences for the assembly of the DGC. Thereafter, these

molecular differences are associated with progressive muscle degeneration that leads to skeletal and cardiac muscle weakness. The lack of an apparent molecular association between dystrophins and SGs and SSPN in retina may help to explain why the absence of dystrophins in retina produces a relatively mild phenotype, compared with the devastating muscle pathology. On the basis of these observations, it could be possible to propose that a similar phenomenon could occur in other structures of the CNS. Moreover, the absence of perturbations in the expression and localization of the SG-Sspn complex in retina observed here suggests that SGs and Sspn are not implicated in the ERG phenotype observed in *mdx*^{3cv} mice strain.

Although the precise function of the SG-SSPN complex is not known, it is thought to have mechanical and non-mechanical roles that mediate interactions between the extracellular matrix, the membrane and the cytoskeleton (Hack et al., 1999). Interestingly, in retina, the expression of all the subunits is mostly restricted to the ganglion cell layer, including ganglion cells soma, optic nerve fibers and MGC end feet, but also the apical end of MGC forming the OLM. This localization could reflect a role of the SG-SSPN complex in the membrane of ganglion cells to form the optic nerve fiber and in the MGC to stabilize the limiting membranes of the retina with the retinal endothelium on one hand and the vitreous body on the other hand in order to stabilize the global structure of the retina, functional roles that still to be determined.

Conclusion

This study reveals the pattern of expression and localization of sarcoglycans and sarcospan mRNAs and proteins in the adult mouse retina. We showed here that β -, δ -, γ -, ϵ -SGs and SSPN are expressed in mouse retina. Moreover we determined that the sarcoglycans are localized predominantly at the outer and the inner edges of the retina, probably in the

Müller glial cells and also in the ganglion cells soma and axons where the expression of dystrophins has never been reported. The use of the *mdx*^{3cv} strain allowed us to conclude that the SG-SSPN complex expression and localization could be at least partially dystrophins independent. Clarification of the role of sarcoglycans and sarcospan in nervous system and particularly in retina awaits further investigation.

Acknowledgements

This work was supported by INSERM (Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale) and by grants from the AFM (Association Française contre les Myopathies) to A.R. and D.M.; P.F. received financial support from FAF (Fédération des Aveugles et handicapés visuels de France). P.F. and F.J.E from the AFM. A.B. received financial support from Retina France.

References

- Barres, B. A., Silverstein, B. E., Corey, D. P. and Chun, L. L. (1988) *Neuron*, **1**, 791-803.
- Blake, D. J. and Kroger, S. (2000) *Trends Neurosci*, **23**, 92-9.
- Blake, D. J., Weir, A., Newey, S. E. and Davies, K. E. (2002) *Physiol Rev*, **82**, 291-329.
- Bonnemann, C. G., Modi, R., Noguchi, S., Mizuno, Y., Yoshida, M., Gussoni, E., McNally, E. M., Duggan, D. J., Angelini, C. and Hoffman, E. P. (1995) *Nat Genet*, **11**, 266-73.
- Campbell, K. P. (1995) *Cell*, **80**, 675-9.
- Chamberlain, J. S., Corrado, K., Rafael, J. A., Cox, G. A., Hauser, M. and Lumeng, C. (1997) *Soc Gen Physiol Ser*, **52**, 19-29.
- Claudepierre, T., Dalloz, C., Mornet, D., Matsumura, K., Sahel, J. and Rendon, A. (2000) *J Cell Sci*, **113 Pt 19**, 3409-17.
- Claudepierre, T., Rodius, F., Frasson, M., Fontaine, V., Picaud, S., Dreyfus, H., Mornet, D. and Rendon, A. (1999) *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **40**, 1520-9.
- Coral-Vazquez, R., Cohn, R. D., Moore, S. A., Hill, J. A., Weiss, R. M., Davisson, R. L., Straub, V., Barresi, R., Bansal, D., Hrstka, R. F., Williamson, R. and Campbell, K. P. (1999) *Cell*, **98**, 465-74.
- Cox, G. A., Phelps, S. F., Chapman, V. M. and Chamberlain, J. S. (1993) *Nat Genet*, **4**, 87-93.
- Crosbie, R. H., Heighway, J., Venzke, D. P., Lee, J. C. and Campbell, K. P. (1997) *J Biol Chem*, **272**, 31221-4.
- D'Souza, V. N., Nguyen, T. M., Morris, G. E., Karges, W., Pillers, D. A. and Ray, P. N. (1995) *Hum Mol Genet*, **4**, 837-42.
- Dalloz, C., Sarig, R., Fort, P., Yaffe, D., Bordais, A., Pannicke, T., Grosche, J., Mornet, D., Reichenbach, A., Sahel, J., Nudel, U. and Rendon, A. (2003) *Hum Mol Genet*, **12**, 1543-54.
- Ervasti, J. M. and Campbell, K. P. (1993) *Mol Cell Biol Hum Dis Ser*, **3**, 139-66.
- Fanin, M., Duggan, D. J., Mostacciolo, M. L., Martinello, F., Freda, M. P., Soraru, G., Trevisan, C. P., Hoffman, E. P. and Angelini, C. (1997) *J Med Genet*, **34**, 973-7.
- Hack, A. A., Cordier, L., Shoturma, D. I., Lam, M. Y., Sweeney, H. L. and McNally, E. M. (1999) *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 10723-8.
- Hack, A. A., Groh, M. E. and McNally, E. M. (2000) *Microsc Res Tech*, **48**, 167-80.
- Hicks, D. and Courtois, Y. (1990) *Exp Eye Res*, **51**, 119-29.
- Howard, P. L., Dally, G. Y., Wong, M. H., Ho, A., Weleber, R. G., Pillers, D. A. and Ray, P. N. (1998) *Hum Mol Genet*, **7**, 1385-91.
- Ibraghimov-Beskrovnaya, O., Ervasti, J. M., Leveille, C. J., Slaughter, C. A., Sernett, S. W. and Campbell, K. P. (1992) *Nature*, **355**, 696-702.
- Koenig, M., Monaco, A. P. and Kunkel, L. M. (1988) *Cell*, **53**, 219-26.
- Koulen, P., Blank, M. and Kroger, S. (1998) *J Neurosci Res*, **51**, 735-47.
- Lidov, H. G. (1996) *Brain Pathol*, **6**, 63-77.
- Lim, Y. C., Doblar, D. D., Frenette, L., Fan, P. H., Poplawski, S. and Nanda, N. C. (1995) *J Clin Anesth*, **7**, 245-9.
- McNally, E. M., Ly, C. T. and Kunkel, L. M. (1998) *FEBS Lett*, **422**, 27-32.
- Mehler, M. F. (2000) *Brain Res Brain Res Rev*, **32**, 277-307.
- Montanaro, F., Carbonetto, S., Campbell, K. P. and Lindenbaum, M. (1995) *J Neurosci Res*, **42**, 528-38.
- Nigro, V., Piluso, G., Belsito, A., Politano, L., Puca, A. A., Papparella, S., Rossi, E., Viglietto, G., Esposito, M. G., Abbondanza, C., Medici, N., Molinari, A. M., Nigro, G. and Puca, G. A. (1996) *Hum Mol Genet*, **5**, 1179-86.

- Noguchi, S., McNally, E. M., Ben Othmane, K., Hagiwara, Y., Mizuno, Y., Yoshida, M., Yamamoto, H., Bonnemann, C. G., Gussoni, E., Denton, P. H. and et al. (1995) *Science*, **270**, 819-22.
- Ozawa, E., Noguchi, S., Mizuno, Y., Hagiwara, Y. and Yoshida, M. (1998) *Muscle Nerve*, **21**, 421-38.
- Pillers, D. M., Weleber, R. G., Woodward, W. R., Green, D. G., Chapman, V. M. and Ray, P. N. (1995) *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **36**, 462-6.
- Rivier, F., Robert, A., Royuela, M., Hugon, G., Bonet-Kerrache, A. and Mornet, D. (1999) *J Muscle Res Cell Motil*, **20**, 305-14.
- Roberds, S. L., Leturcq, F., Allamand, V., Piccolo, F., Jeanpierre, M., Anderson, R. D., Lim, L. E., Lee, J. C., Tome, F. M., Romero, N. B. and et al. (1994) *Cell*, **78**, 625-33.
- Rodius, F., Claudepierre, T., Rosas-Vargas, H., Cisneros, B., Montanez, C., Dreyfus, H., Mornet, D. and Rendon, A. (1997) *Neuroreport*, **8**, 2383-7.
- Sigesmund, D. A., Weleber, R. G., Pillers, D. A., Westall, C. A., Pantou, C. M., Powell, B. R., Heon, E., Murphey, W. H., Musarella, M. A. and Ray, P. N. (1994) *Ophthalmology*, **101**, 856-65.
- Straub, V., Ettinger, A. J., Durbeej, M., Venzke, D. P., Cutshall, S., Sanes, J. R. and Campbell, K. P. (1999) *J Biol Chem*, **274**, 27989-96.
- Ueda, H., Baba, T. and Ohno, S. (2000) *Histol Histopathol*, **15**, 753-60.
- Ueda, H., Tsukahara, S., Kobayashi, T. and Ohno, S. (1995) *Ophthalmic Res*, **27**, 219-26.
- Wheeler, M. T., Allikian, M. J., Heydemann, A. and McNally, E. M. (2002) *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, **67**, 389-97.
- Xiao, J. and LeDoux, M. S. (2003) *Brain Res Mol Brain Res*, **119**, 132-43.
- Yoshida, M. and Ozawa, E. (1990) *J Biochem (Tokyo)*, **108**, 748-52.

Table 1: Primers used for RT-PCR.

Name	Sequence (5'→3')	mRNA detected
AlphaSG-F AlphaSG-R	GCCGAGTCCCTCTTCCTATT CCAGAGACACATTGCACCAG	α -SG
BetaSG-F BetaSG-R	AGCATGGAGTTCCACGAGAG GCTGGTGATGGAGGTCTTGT	β -SG
DeltaSG-F DeltaSG-R	GTCAGAGCAGACCCCTTCAA GATCCACGAGGCAGTCTAGC	δ -SG
GamaSG-F GamaSG-R	GAGACACCCCTTGTCAGAGC TGGTCAAACCCACAGTTCA	γ -SG
EpsilonSG-F EpsilonSG-R	TCCATCACAGCTCGATTGAG TCTGAGTCTGGTGTGGCAAG	ϵ -SG
Sspn-F Sspn-R	AGAGGACTTGCTGCTCTTGC CCTTTCGGTGTTCAACCAAGT	SSPN
Dp71-F1 Dp71-R1	ACCATGAGGGAACACCTCAAAGG TGCAGCTGACAGGCTCAAGCGGAT	Dp71
Vimentin-F Vimentin-R	TTGAGATCGCCACCTACAGGA TCCGTCTCTGGTTTCAACCGT	Vimentin
Thy1-F Thy1-R	CAGGACGGAGCTATTGGCACCAT ACGGCAGTCCAGTCGAAGGTTCT	Thy1
Actin-F Actin-R	CTGGGACGACATGGAGAAGATCTG CGTACTCCTCTGGTGATCCAC	Actin

Table 2. Sarcoglycans/Sarcospan antibodies used for immunohistochemistry assays.

Antibody	Nature	Peptide Position	Specificity
Sarco3	Polyclonal	C-terminal 7aa	α -sarcoglycan
G4	Polyclonal	Peptide 42-52	β -sarcoglycan
Nini	Polyclonal	C-terminal 84-290	δ -sarcoglycan
Peptide1	Polyclonal	Peptide 2-13	γ -sarcoglycan
LG7	Polyclonal	C-terminal 11aa	ϵ -sarcoglycan
C5	Polyclonal	C-terminal 13aa	SSPN

Legends

Figure 1: Real-time PCR analysis of the sarcoglycan/Sarcospan complex components α -, δ -, γ -, β -, ϵ -SG, SSPN and dystrophin protein Dp71 mRNAs in *C57Bl/6* (black) and *mdx^{3cv}* (white) mice strains. β -actin mRNA amplification was used to normalize values and considered as 100%. Due to the large difference in levels of expression, two different scales were used. Results are means \pm SE (n=6). Experiments were performed by triplicate independent assays.

Figure 2: Immunohistochemical analysis of the dystrophins and Sarcoglycan-Sarcospan (SG-SSPN) complex components in wild-type (*C57Bl/6*) and *mdx^{3cv}* mice retinae. Fluorescence photomicrographs of vertical sections through mouse retinae immunostained with antibodies directed against dystrophins, ϵ -SG, β -SG, δ -SG, γ -SG and SSPN, respectively. OLM, outer limiting membrane; ONL, outer nuclear layer; OPL, outer plexiform layer; INL, inner nuclear layer; IPL, inner plexiform layer; GCL, ganglion cell layer; ILM, inner limiting membrane. Scale bar: 20 μ m. Arrows indicate punctuate dystrophins staining in the OPL while arrowheads indicate staining around blood vessels and at the ILM. Small arrows indicate SGs-SSPN staining at radial processes terminating at the OLM.

Figure 3: Immunohistochemical analysis of the cellular localization of dystrophins, Sarcoglycans (SGs) and Sarcospan (SSPN) in wild-type (*C57Bl/6*) mouse retina. (A) Fluorescence photomicrographs of vertical sections through mouse retina double immunolabeled for dystrophins, ϵ -SG, β -SG, δ -SG, γ -SG and SSPN in red and a cell marker of Müller glial cells, glutamine synthetase; or of ganglion cells axons, neuro-filament 68 (NF68) in green. OLM, outer limiting membrane; OPL, outer plexiform layer; INL, inner

nuclear layer; IPL, inner plexiform layer; GCL, ganglion cell layer; NFL, nerve fiber layer; ILM, inner limiting membrane. Scale bar: 20 μ m. Arrows indicate the considerable overlap between dystrophins or ϵ -SG and the glutamine synthetase staining at the ILM while arrowheads indicate the overlap between ϵ -SG and the glutamine synthetase staining observed at the MGC fibers and at the OLM. Stars indicate the overlap of ϵ -SG and NF68 staining at the NFL. (B) Dystrophins and SSPN immunolocalizations in the OPL are shown at higher magnification. The bars and puncta staining of dystrophins observed in wt mice retinae clearly disappear in *mdx*^{3cv} mice retinae. On the contrary, no differences could be established between the SSPN staining from wt and *mdx*3cv mice retinae. Scale bar: 6 μ m

Figure1

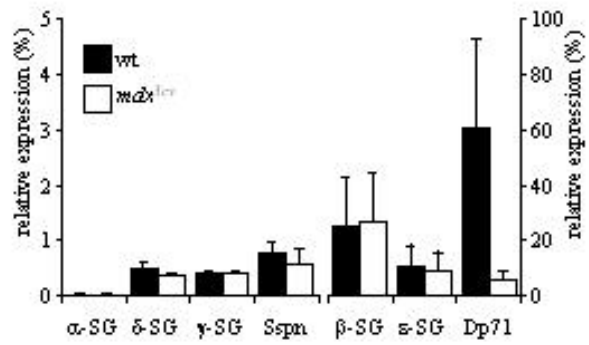


Figure 2

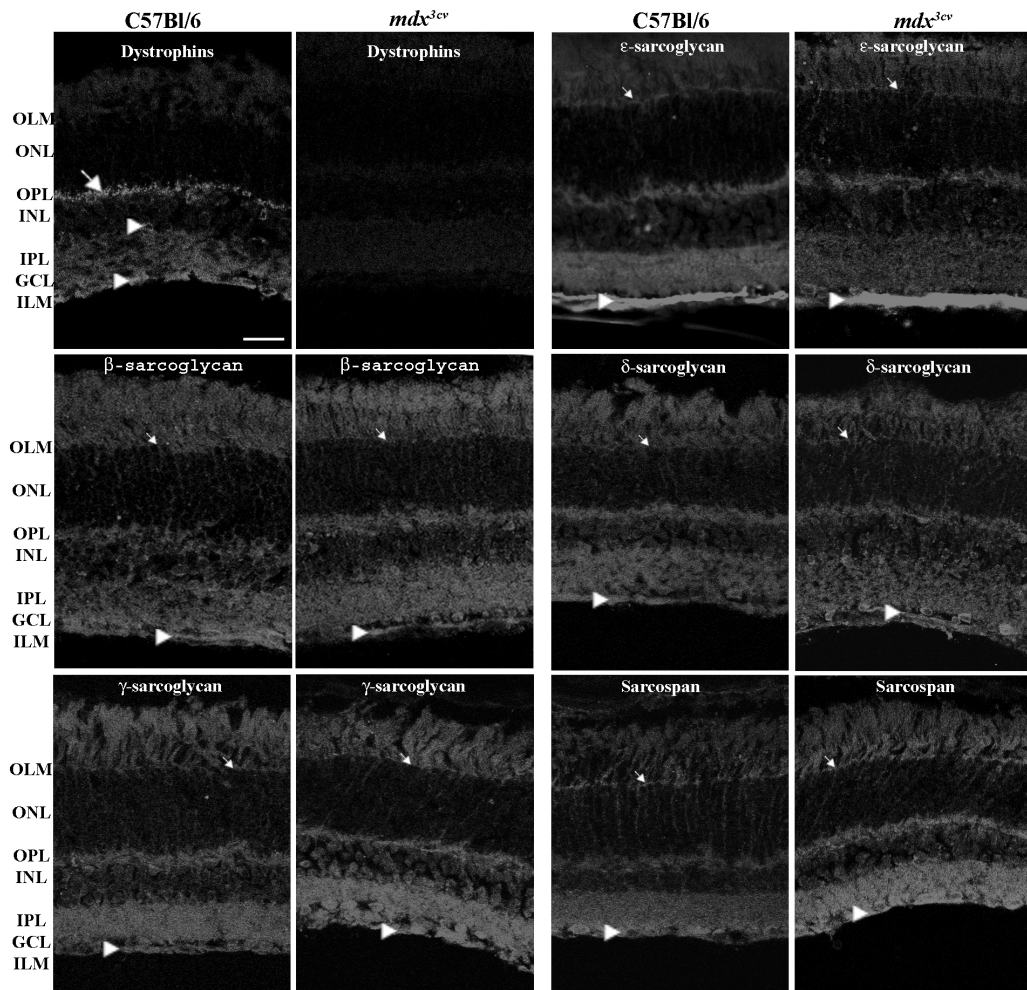


Figure3

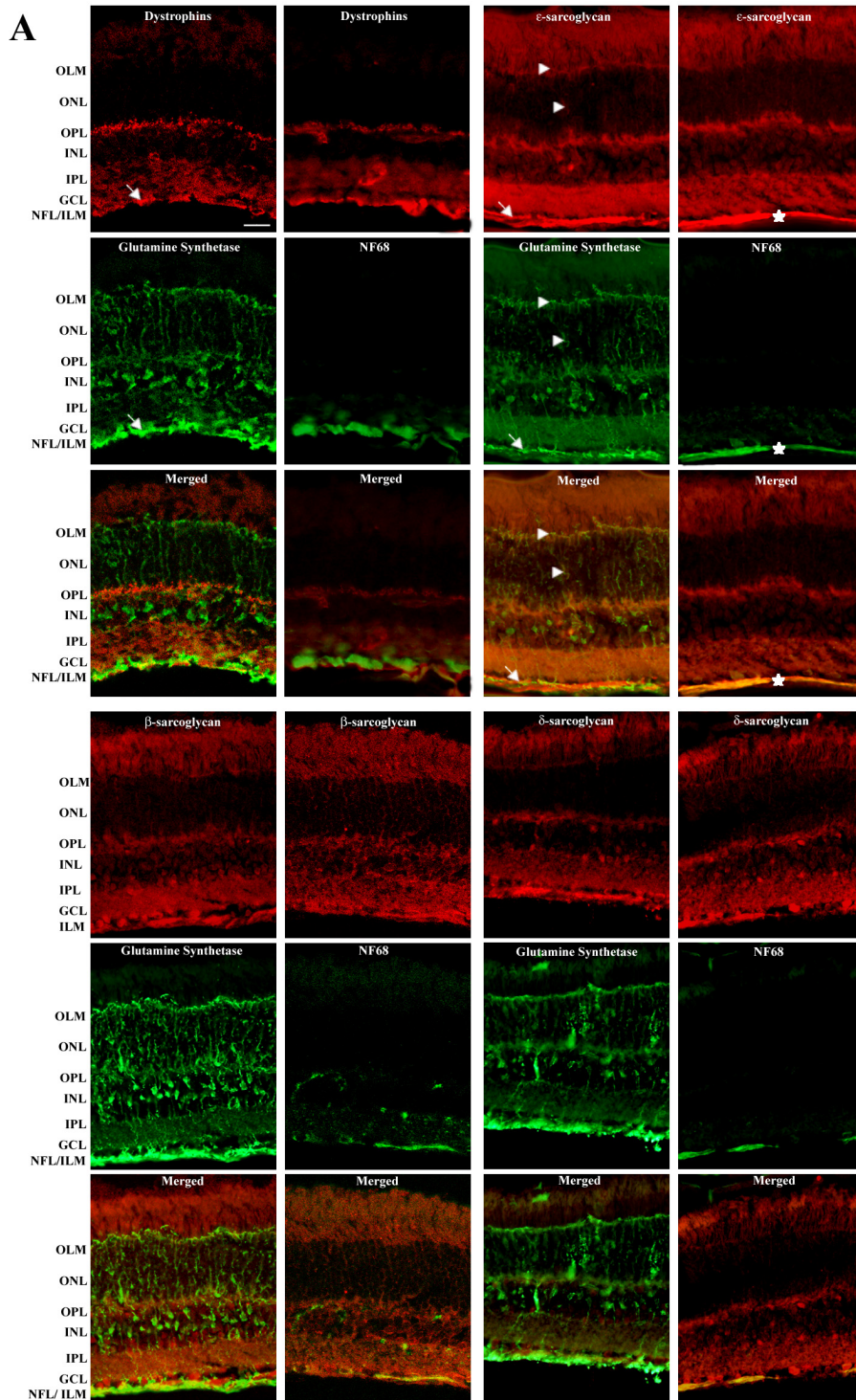
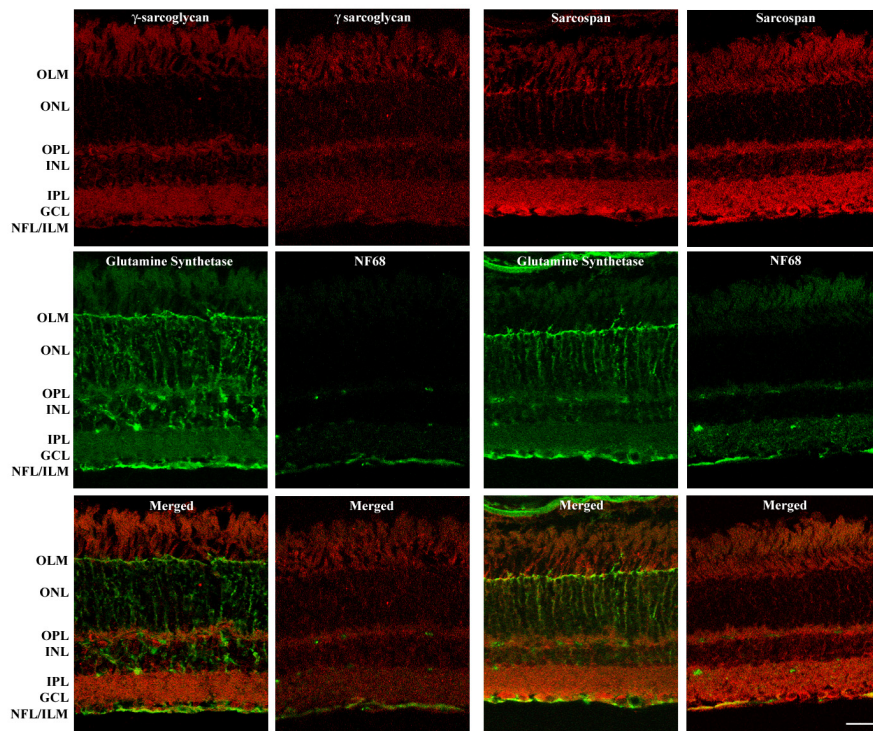
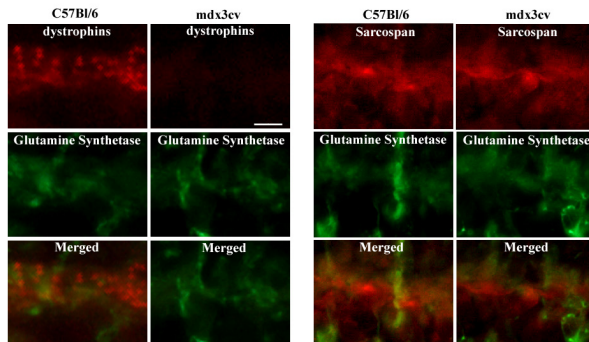


Figure3bis



B



II. Résultats complémentaires : Caractérisation du complexe Dp71/DAPs dans les CGM

A) Situation du sujet

Comme nous l'avons décrit dans l'introduction, les complexes dystrophines/DAPs peuvent être subdivisés en 3 : i) le complexe sarcoglycane, qui stabiliserait le DGC à la membrane ; ii) le complexe dystroglycane, qui permet l'interaction avec la matrice extracellulaire et enfin, iii) les protéines cytoplasmiques qui vont être responsables de l'interaction du complexe avec des protéines de signalisation ou d'autres ligands. Nous avons montré que, contrairement à ce qui a été décrit dans le muscle, le complexe SG/SSPN dans la rétine semble être indépendant des dystrophines. Nous avons également montré dans la première partie de notre travail que le β -dystroglycane était partiellement déstabilisé par l'absence de Dp71. Ces résultats ont laissé penser qu'il serait important de caractériser les complexes associés aux dystrophines dans chaque tissu ou type cellulaire, afin d'en comprendre le fonctionnement. L'objectif de cette partie de nos travaux était de déterminer la composition ainsi que les mécanismes moléculaires qui sont responsables de la formation du complexe Dp71/DAPs aboutissant à la localisation des canaux Kir4.1 et AQP4 dans les pieds des CGM et autour des vaisseaux.

B) Méthodologie

Il a été montré que toutes les dystrophines sont exprimées dans la rétine. Etant donné que nous ne possédons pas d'anticorps spécifique de la Dp71, nous avons dû trouver une approche permettant d'isoler le complexe lié à la Dp71 de ceux associés aux autres dystrophines. Claudepierre et coll. avaient utilisé précédemment les CGM de rat en culture pour caractériser le complexe DGC autour de l'isoforme de la Dp71 épissé pour l'exon 78 : la Dp71f [Claudepierre, 2000 #24]. Nous avons alors songé utiliser le même modèle pour caractériser le complexe liant les canaux Kir4.1 et AQP4. Cependant, il a été montré que le canal Kir4.1 n'était plus exprimé par les CGM en culture [Ishii, 1997 #305], il nous a donc fallu trouver d'autres approches expérimentales.

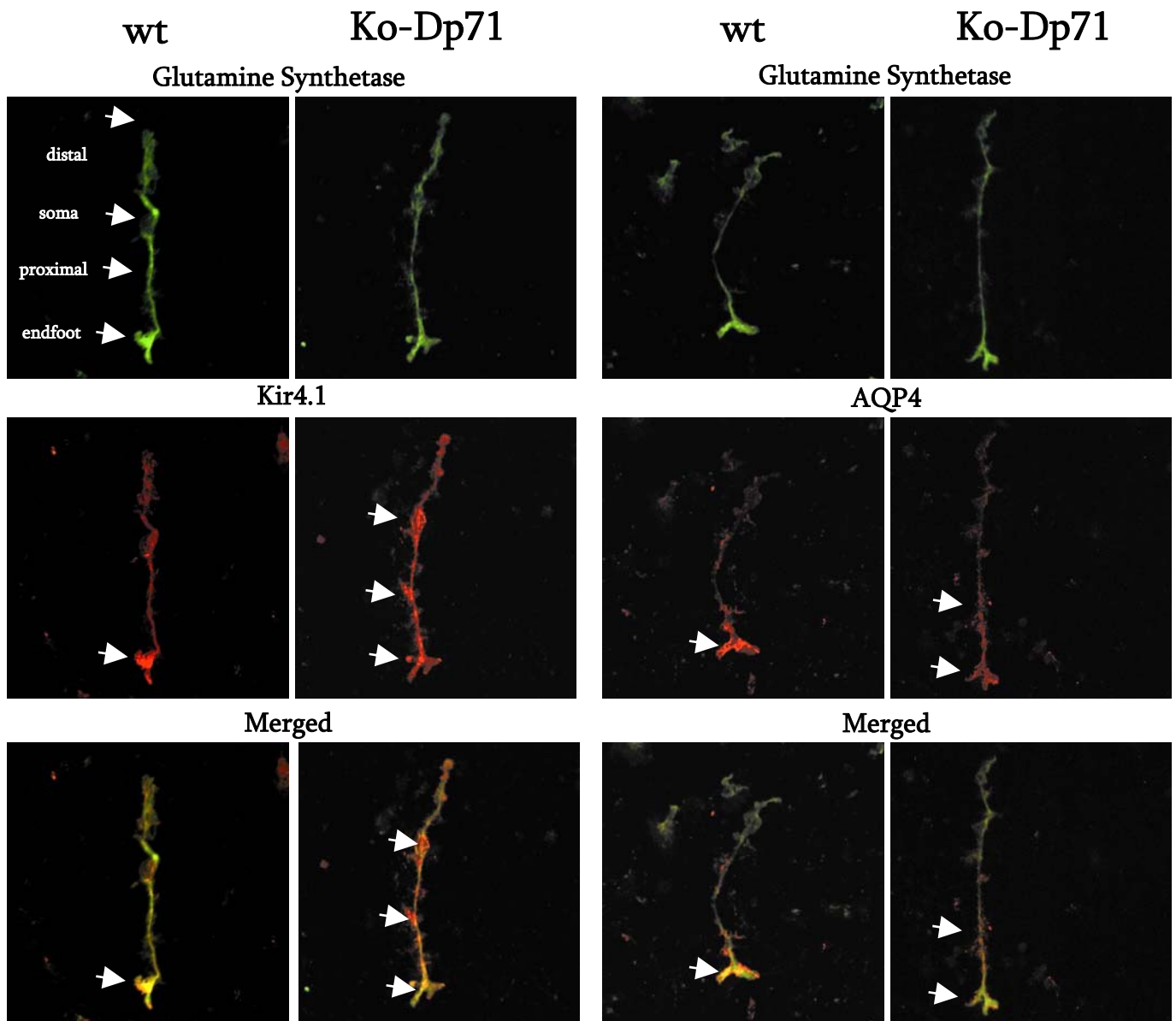


Figure 32 : Immunolocalisation du canal potassique Kir4.1 et du canal aqueux AQP4 dans des cellules gliales de Müller (CGM) de souris contrôle et Ko-Dp71 fraîchement dissociées. Les CGM sont identifiées par immunomarquage à l'aide d'un anticorps dirigé contre la glutamine synthétase. Les flèches indiquent la localisation dans les pieds des CGM chez la souris contrôle et la redistribution dans toute la cellule chez la souris Ko-Dp71.

Nous avons donc, en collaboration avec le groupe d'Andreas Reichenbach à Leipzig (Allemagne) mis au point une technique de dissociation cellulaire permettant d'obtenir des CGM fraîchement isolées. Ceci devait nous permettre, dans un premier temps d'établir, à l'aide de techniques d'immunohistochimie, la localisation subcellulaire de chacune des DAPs présentes dans les CGM et pouvant participer au complexe Dp71/DAPs. L'utilisation de cette technique devait nous permettre, dans un second temps, de caractériser le complexe par co-immunoprécipitation après purification de ces CGM dissociées. L'absence d'efficacité des anticorps dirigés contre des marqueurs extracellulaires spécifiques des CGM, nécessaire à leur purification, nous a contraint à envisager une autre approche. Il est possible d'isoler, à l'aide d'un vibratome, une fraction de la rétine correspondant à la couche des cellules ganglionnaires contenant les pieds des CGM, et par conséquent d'éliminer tous les complexes impliquant les produits longs du gène DMD situés dans la CPE. Une fois cette fraction isolée, elle a pu être utilisée pour co-immunoprécipiter le(s) complexe(s) associé(s) à la Dp71.

1) Cellules fraîchement dissociées

Les souris sont sacrifiées par injection d'une dose létale de pentobarbital. Les yeux sont prélevés entiers, puis les rétines sont disséquées dans du PBS avant d'être digérées par de la papaine pendant 30 minutes. Les rétines sont rincées à l'aide de PBS avant d'être fixées dans du paraformaldéhyde 4% pendant 5 minutes, puis à nouveau rincées avec du PBS. On effectue ensuite une dissociation mécanique à l'aide d'une pipette pasteur afin d'obtenir les cellules bien individualisées. Ces cellules sont alors appliquées sur une lame porte-objet et séchées sur une plaque chauffante à 37°C. Les cellules sont ensuite utilisées lors d'un marquage immunocytochimique classique (v. methods publication n°1).

2) Co-immunoprécipitation du complexe à partir des pieds des CGM

Les souris sont sacrifiées par injection d'une dose létale de pentobarbital. Les yeux sont prélevés entiers, puis les rétines sont disséquées dans du PBS et mises à plat. Les rétines montées à plat sont placées sur le bloc de gélatine du vibratome avant d'être coupées dans l'épaisseur permettant l'obtention de la couche des cellules ganglionnaires

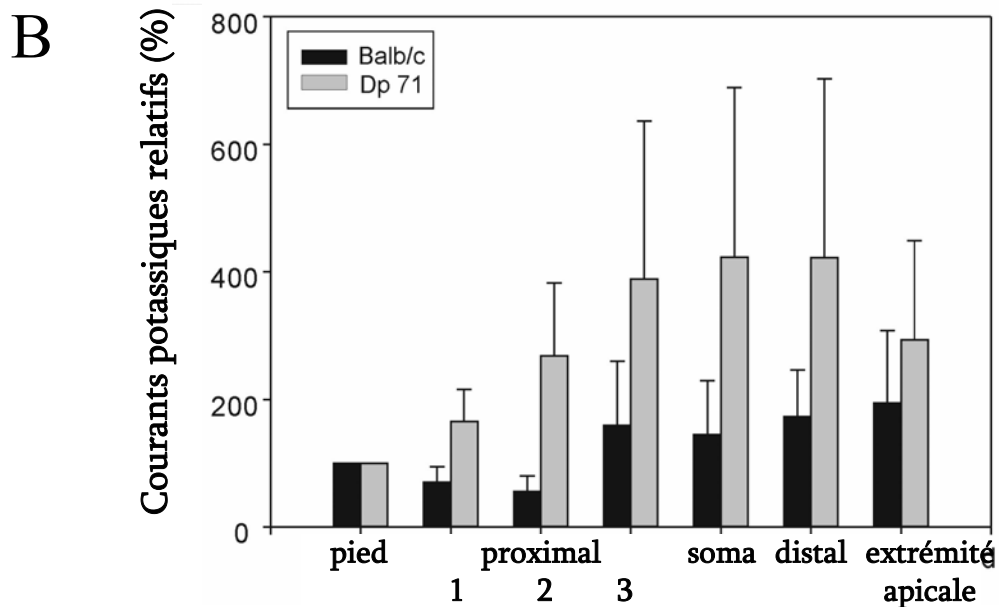
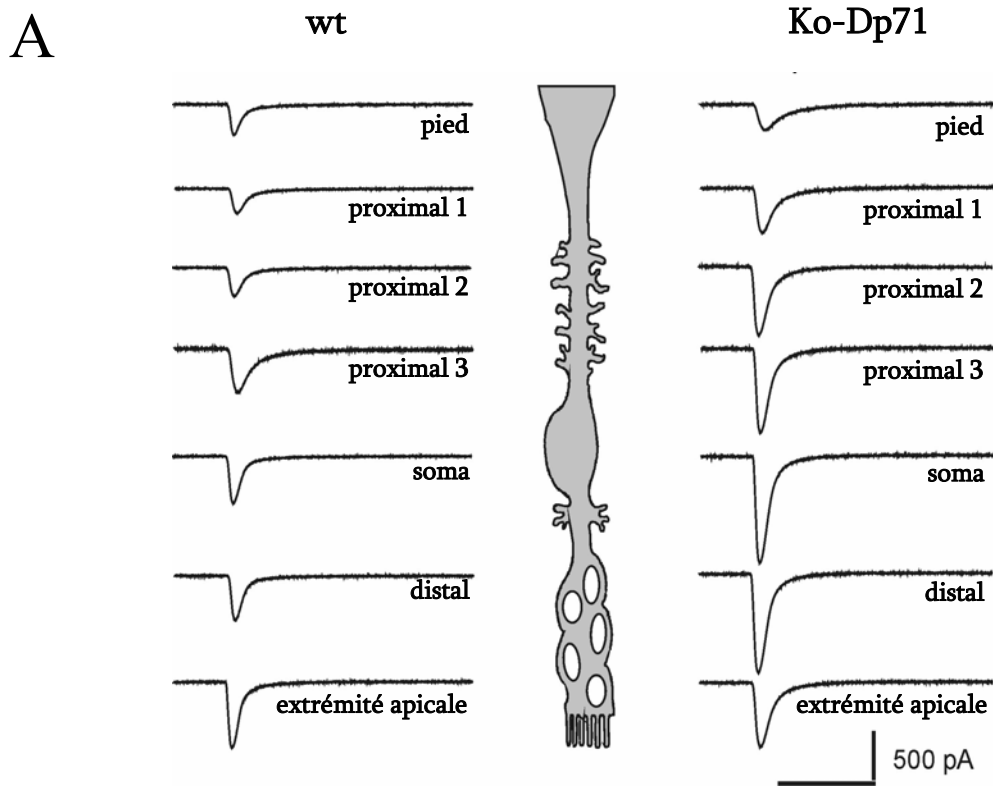


Figure 33 : Enregistrement des courants potassiques locaux à différents points de la CGM. (A) Exemple de courants observé le long d'une cellule. (B) graphique représentant les courants potassiques en différents points de la CGM normalisé par rapport au courant dans le pied (100%).

isolées. Ces fractions sont alors reprises dans du tampon de lyse et homogénéisées à l'aide d'un polytron. Une centrifugation à 1000 g pendant 10 minutes permet d'éliminer les gros débris cellulaires. Les fractions sont alors soumises à un agent pontant (DSP), afin de consolider les interactions, avant d'être centrifugées à 26000 g. Le culot est alors repris dans du tampon de lyse additionné de protéines G pendant 1 heure. Après élimination de ces protéines G par centrifugation, le lysat est mis en contact avec les anticorps spécifiques dirigés contre les membres du complexe pendant toute la nuit. Des protéines G sont alors ajoutées et laissées à incuber toute la nuit. Plusieurs rinçages sont alors effectués afin d'éliminer les liaisons aspécifiques des protéines G. Les protéines G sont finalement reprises dans du tampon Laemli afin de décrocher les protéines liées et de les utiliser pour une détection par immunoempreinte classique (v. methods publication n°1).

C) Résultats

Le rôle de la Dp71 dans la localisation des canaux Kir4.1 et AQP4 a été confirmé par une approche immunocytochimique sur des CGM fraîchement dissociées. En effet la figure 30 montre que ces deux protéines sont concentrées dans les pieds des CGM de rétine de souris contrôle, alors qu'elles se retrouvent réparties tout au long de la membrane lorsque la Dp71 est absente. A l'image de ce que nous avons découvert dans la rétine entière, l'intensité du marquage obtenu pour l'AQP4 dans les CGM isolées est plus faible en absence de Dp71.

L'enregistrement des courants potassiques, à différents niveaux de la CGM, a permis de mettre en évidence qu'en absence de Dp71, ceux-ci sont moins importants au niveau des pieds des CGM alors qu'ils sont au contraire augmentés dans les prolongements proximaux et distaux ainsi que dans le soma (Figure 31). Ceci confirme que les canaux potassiques, qui sont normalement concentrés dans les pieds des CGM, sont, en absence de Dp71, redistribués tout le long de la cellule.

L'utilisation des CGM fraîchement dissociées nous a permis de montrer que la Dp71 était principalement localisée au niveau des pieds des CGM. Nous avons également montré

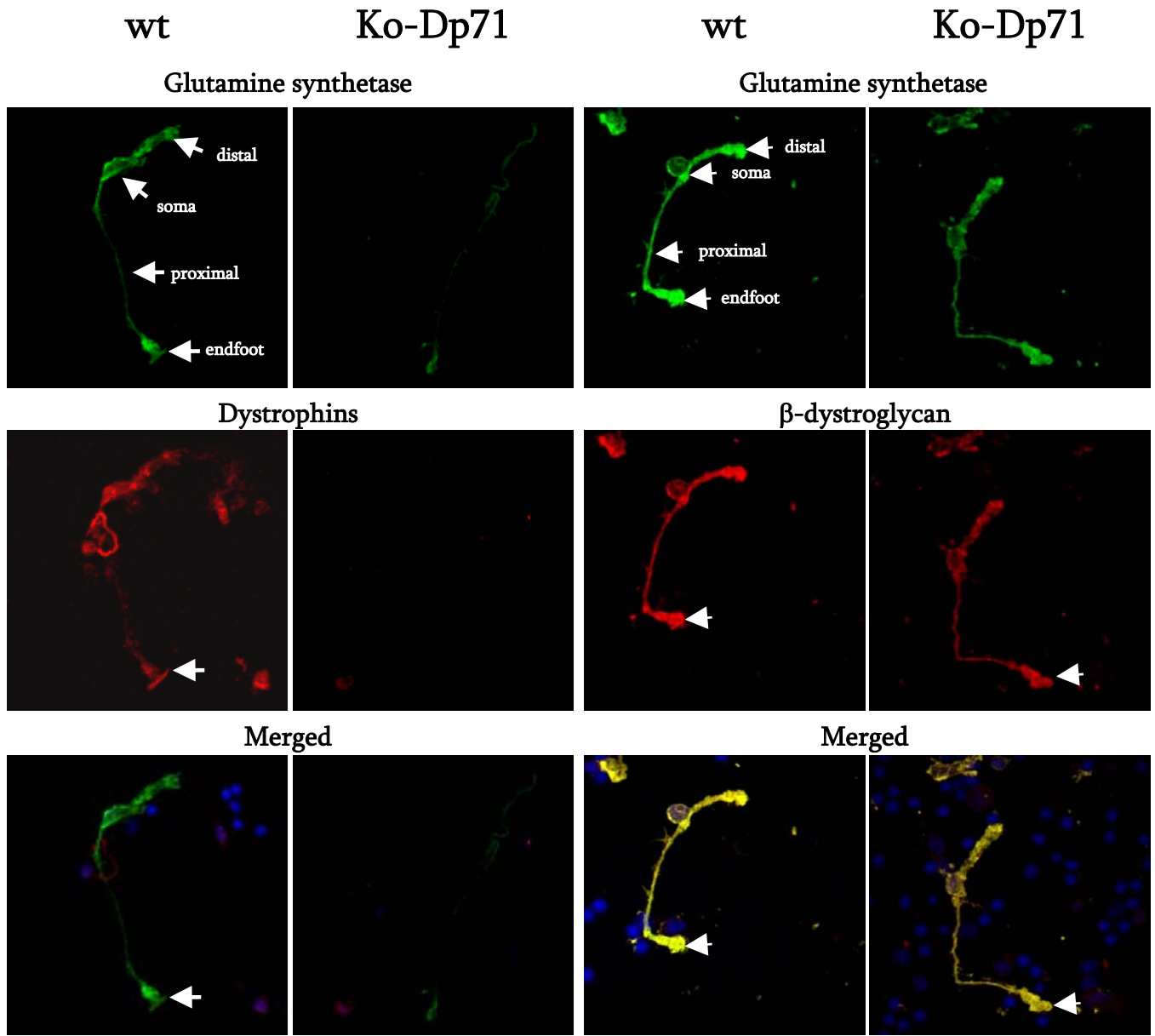


Figure 34 : Immunolocalisation Des dystrophines et du β -dystroglycane dans des cellules gliales de Müller (CGM) de souris contrôle et Ko-Dp71 fraîchement dissociées. Les CGM sont identifiées par immunomarquage à l'aide d'un anticorps dirigé contre la glutamine synthétase. Les flèches indiquent la localisation dans les pieds des CGM chez la souris contrôle et la disparition du marquage dystrophines, et donc Dp71, ainsi que la diminution du marquage du β -dystroglycane, chez la souris Ko-Dp71.

que le β -dystroglycane a une localisation similaire. Comme précédemment observé sur la rétine entière, l'absence de Dp71 entraîne une diminution de l'intensité du marquage du β -dystroglycane mais pas sa disparition (Figure 32).

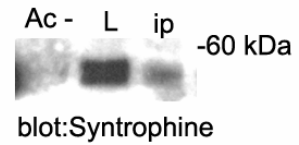
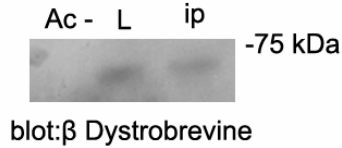
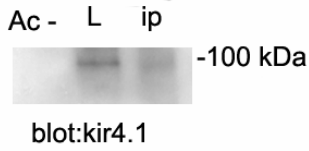
Afin de définir les interactions entre ces divers composants, nous avons effectué des immunoprécipitations sur la fraction protéique des pieds des CGM obtenue au vibratome. Nous avons d'abord confirmé que le seul produit du gène DMD présent dans cette fraction est la Dp71. Nous avons ensuite pu co-immunoprécipiter la Dp71 avec plusieurs membres du complexe, le β -dystroglycane, les syntrophines et les dystrobrevines, mais également avec le canal potassique Kir4.1. A l'inverse nous avons co-immunoprécipité les dystrobrevines, les syntrophines, le β -dystroglycane et la Dp71 à partir du canal potassique Kir4.1 (Figure 33).

D) Conclusions

Cette étude a permis de mettre en évidence et de caractériser, au moins partiellement, le complexe associé à la Dp71 responsable de la localisation des canaux Kir4.1 et AQP4 à la membrane des pieds des CGM. Nous avons montré que ce complexe était notamment constitué du β -dystroglycane, de syntrophines ainsi que de dystrobrevines. Nous avons également montré que cette délocalisation induisait une modification de la répartition des courants potassiques des CGM. Ce complexe doit être responsable de la localisation de Kir4.1 et AQP4, l'absence de la Dp71 entraînant une désagrégation de certains des membres de ce complexe, ce qui induit la délocalisation de ces deux protéines.

Ce travail donnera lieu à une publication qui est en cours de rédaction.

A IP Dystrophine



B IP Kir 4.1

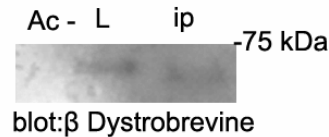
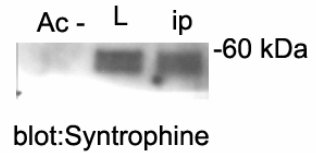
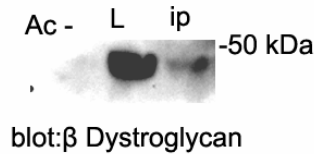
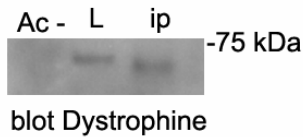


Figure 35 : Immunoprécipitation du complexe lié à la Dp71 et au canal Kir4.1 dans des fractions protéiques provenant du pied des CGM. (A) La co-immunoprécipitation avec l'anticorps dirigé contre les dystrophines permet de précipiter le β -dystroglycane, les syntrophines, les dystrobrevines et le canal Kir4.1. (B) La co-immunoprécipitation avec l'anticorps dirigé contre le canal Kir4.1 permet de précipiter la Dp71, le β -dystroglycane, les syntrophines, les dystrobrevines.

4) Objectif 3 : Rôle de la Dp71 dans le cristallin.

A) Situation du sujet

Le cristallin est caractérisé par une organisation structurale bien établie qui lui permet d'être et de demeurer transparent tout au long de la vie de l'individu. De nombreuses protéines sont impliquées dans le maintien de cette organisation, parmi lesquelles des protéines du cytosquelette telle que l'actine ou des filaments intermédiaires telle que la vimentine. Le cristallin se caractérise également par son degré d'hydratation, sa forte concentration protéique et par le fait qu'il fonctionne comme un syncytium. Toutes ces caractéristiques dénotent d'une organisation toute particulière et primordiale pour son bon fonctionnement. La moindre perturbation de cette organisation intra- et intercellulaire entraîne une opacification de la structure.

C'est sa transparence qui permet au cristallin de jouer son rôle dans la mise au point des rayons lumineux qui traversent l'œil en direction de la rétine. Ce phénomène appelé accommodation est dû à une modification de la courbure du cristallin qui permet de faire parvenir une image nette quel que soit l'éloignement de l'objet visualisé.

A ce jour, aucune étude n'avait envisagé de rechercher, d'une part si les dystrophines étaient ou non exprimées dans le cristallin, et d'autre part si elles intervenaient dans l'organisation structurale de celui-ci. En effet, on peut supposer que les dystrophines pourraient participer à l'organisation du cytosquelette d'actine ou de l'architecture fibrillaire des cellules que ce soit au repos ou bien au cours du phénomène d'accommodation. Les dystrophines pourraient également être impliquées dans la localisation en des lieux précis de la membrane de protéines intervenant dans le transport des éléments nécessaires au fonctionnement du « syncytium », tels que les éléments énergétiques, l'eau ou les ions.

Lors d'une étude clinique effectuée dans notre laboratoire, nous avons découvert une cataracte chez les animaux déficients pour la Dp71. Nous nous sommes alors penchés sur la ou les possible(s) fonction(s) que pourrait jouer la Dp71 dans le cristallin. Nous avons

donc débuté nos travaux par une étude épidémiologique concernant le vieillissement du cristallin en présence ou en absence de Dp71. Afin d'étudier l'impact de l'absence de la Dp71 sur la morphologie globale du cristallin, cette étude a été corrélée avec une analyse histologique en fonction du développement. Nous avons ensuite déterminé l'expression et la localisation des produits du gène DMD ainsi que du β -dystroglycane dans le cristallin. Nous avons enfin cherché à déterminer si l'absence de Dp71 pouvait influencer l'expression et la localisation d'une protéine membranaire essentielle du cristallin : le canal aqueux AQP0.

B) Résultats

Une cataracte congénitale progressive a été mise en évidence chez la souris Ko-Dp71. Une opacification corticale peut être visible dès l'âge de deux mois pour certains animaux avant d'être clairement observée chez tous les animaux à l'âge de 7 mois.

L'étude histologique montre l'apparition de vacuoles et de débris cellulaires dans le cortex dès l'âge de 2 mois. Cette dégénérescence des fibres cristalliniennes augmente progressivement au cours du temps. En outre, la taille du cristallin des animaux déficients pour la Dp71 est nettement inférieure à celle des souris contrôles.

Alors que tous les produits du gène DMD, à l'exception de la Dp116, sont exprimés dans la rétine, seules la Dp260, la Dp140 et la Dp71 sont exprimées dans le cristallin avec une prévalence très importante de cette dernière. De plus, aucune augmentation du niveau d'expression de la Dp260 ou de la Dp140 n'a été constatée en absence de Dp71. La Dp71 est principalement exprimée par les fibres cristalliniennes secondaires alors que les autres produits du gène DMD présents semble être majoritairement exprimée par les cellules épithéliales. Nous avons également montré une expression, bien que plus faible, de la Dp71 dans le noyau du cristallin.

D'autres produits des complexes dystrophines/DAPs ont été mis en évidence dans le cristallin, en particulier le β -dystroglycane dans le noyau. A l'image de ce qui se passe dans la rétine, l'absence de la Dp71 entraîne une diminution de l'expression de cette DAPs.

L'absence de Dp71 se traduit par une désorganisation des fibres cristalliniennes, particulièrement marquée dans les couches corticales plus profondes. Cette désorganisation a été mise en évidence grâce aux immunomarquages effectués contre l'une des protéines majoritaires de la membrane des fibres secondaires, l'AQP0. Elle semble encore plus importante à proximité de la zone équatoriale du cristallin où les cellules se multiplient. Notre étude n'a pas révélé de variation significative du niveau d'expression de l'AQP0 ni de délocalisation particulière, celle-ci restant associée à la membrane des fibres cristalliniennes en absence de Dp71.

C) Conclusions

La Dp71 participe à l'organisation des fibres secondaires du cristallin et son absence entraîne une désorganisation de celles-ci qui conduit au développement d'une cataracte congénitale progressive. Nous avons montré que la Dp71 est également dans le cristallin le produit majoritaire du gène DMD et qu'elle semble participer à un complexe incluant le β -dystroglycane impliqué dans l'organisation cellulaire du cortex et du noyau du cristallin. Ce travail montre pour la première fois un trouble progressif en dehors du système musculaire, celui-ci ne résultant pas de l'absence de la Dp427 mais d'un autre produit du gène DMD : la Dp71.

Ce travail fait l'objet de la publication suivante :

A new phenotype related to dystrophin proteins : Absence of Dp71 in the crystalline lens lead to a congenital cataract. Patrice Fort, Ramin Tadayoni, David Yaffe, Uri Nudel, José-Alain Sahel, Serge Picaud, Michel Paques, and Alvaro Rendon. *Soumis à Investigative Ophthalmology and Visual Science (IOVS).*

Publication n°3 :

***Congenital Progressive Cataract Caused by the Lack of the
Dystrophin- Protein Dp71***

Patrice Fort^a, Ramin Tadayoni^b, David Yaffe^c, Uri Nudel^c, José-Alain Sahel^a, Serge Picaud^a,
Michel Paques^{a, d}, and Alvaro Rendon^{a*}

^a INSERM U-592 Laboratoire de Physiopathologie Cellulaire et Moléculaire de la Rétine
Hôpital Saint Antoine - Bat Kourilsky 184 rue de Fbg St Antoine
F-75571 Paris CEDEX, France

^b Department of Ophthalmology, Hopital Lariboisiere, Assistance Publique-Hopitaux de
Paris, Université, Paris, France

^c Dept of Molecular Cell Biology, Weizmann Institute, Rehovot, Israel

^d Department of Ophthalmology, Fondation Ophtalmologique Rothschild, Paris, France

*Corresponding author.

Fax: 33(0)149284605

E-mail: rendon@st-antoine.inserm.fr

Abstract

Purpose. The purpose of this study was the characterization of a congenital progressive cataract observed in a mice strain lacking the short product of the Duchenne Muscular Dystrophy (DMD) gene Dp71.

Methods. Lenses of KoDp71 mice were described morphologically and histologically as a function of aging. Expression of the DMD gene products and β -dystroglycan were monitored by Western blot and immunohistochemical techniques. The impact of the lack of Dp71 was evaluated at the light microscopy level by the observation of the aquaporin 0 immunostaining.

Results. Morphologically 40% of tested KoDp71 mice present principally a nuclear cataract at different stages of opacity at 2 months of age. At 7 months the totally of mice tested were affected. Results of histological analysis correlate well with the severity of the lens opacity. Immunotechnics with a pan-specific antibody against dystrophins revealed that Dp71 was the major DMD gene product expressed in lens, mainly localized at the cell fibers. We also observed that the β -dystroglycan staining disappeared in mice lacking Dp71. Moreover, staining of AQP0 revealed a dramatic disorganization of lens fibers in absence of Dp71.

Conclusions. These data provide, for the first time evidences of the existence of a progressive phenotype out of muscle of a DMD gene product deficient mouse. We showed that this cytoskeletal associated protein plays a crucial role in the maintenance the lens structure and function.

Introduction

The crystalline lens is an ocular component of high transparency and refractive index that is responsible for variable focusing of light rays onto the photosensitive retina. The mammalian lens consists of two populations of specialized epithelial cells organized in distinct spatial patterns. Differentiated cells called fiber cells, due to their morphology and composition, make up the bulk of the lens, while a monolayer of epithelial cells covers the anterior surface of the fibers. Development and growth of the lens which take place throughout life depends on proliferation of the epithelial cells and their differentiation into lens fiber cells. During these processes, major structural changes but also extensive changes in gene expression occurs. Such changes in the lens might include aggregation, changes in tissue hydration, phase separation in molecular components, and changes in the structure of the cytoskeleton. Most, if not all of these changes can and take place during aging and cataract development.

Duchenne muscular dystrophy (DMD) is an X-linked genetic disorder causing progressive muscle degeneration and death. The product of the huge and complex DMD gene in the muscle is dystrophin, which was first described as a large protein of 427 kDa with partial amino acid sequence homology to the spectrin family of membrane cytoskeletal proteins¹. Dystrophin is normally present under the sarcolemma of the skeletal muscle as a part of a large protein complex which forms a linkage between the cytoskeleton, the sarcolemma, and the extracellular matrix². It was suggested that it is also involved in the clustering of the voltage-gated sodium channels, NO synthase and Aquaporin 4³⁻⁵. The DMD gene also encodes a number of smaller products controlled by internal promoters . Dp71, which consists of a unique seven-residue N-terminus fused to the cysteine-rich the C-terminal domains of dystrophin, is the most abundant product of the gene in non muscle tissues⁶. It has been shown to be expressed in liver, kidney, spermatozoa, blood cells and the central nervous

system, including retina^{6,7}. Recent reports showed that Dp71 is involved in protein complexes including β -dystroglycan, α -dystrobrevin and α 1-syntrophin⁸. These Dp71-DAPs complexes are required for the proper localization of Kir4.1 and AQP4 channels in the Müller cells of mouse retina and of the voltage dependent Na^+ (μI), K^+ (Kv1.1) channels and nNOS of mouse spermatozoa^{9,10}. Consistent with this complex tissue distribution of Dp71 the first reports of Dp71 defective mouse has displayed diverse phenotypes. Lack of Dp71 has been directly associated with a higher sensitivity of retina to damage resulting from transient ischemia and to a reduced motility of spermatozoa^{9,10}.

To study the expression of Dp71 during development and its possible functions Sarig et al. (1999) specifically inactivated the expression of Dp71 by replacing its first and unique exon and a part of the concomitant intron with a β -galactosidase reporter gene¹¹. They observed by the X-Gal staining of Dp71-null mouse embryos and tissues a strong activity of the Dp71 promoter in the developing lens fiber cells whereas the adjacent anterior epithelial cells at the lens margin did not.

Based in the above body of evidences we hypothesized that Dp71 is crucial for optimal focusing of crystalline lens. We used Dp71-null mice to show that the absence of Dp71 induced the apparition of a progressive congenital cataract. We found that Dp71 was the main DMD gene product expressed in lens of wild type mouse. We substantiated the localization of Dp71 and β -dystroglycan at the cell surface of secondary fiber lens. We found that the absence of Dp71 resulted in reduced levels of β -dystroglycan. Finally we noticed a strong change in the lens fiber organization. This finding provides direct evidence that the loss of Dp71 is sufficient to trigger cataractogenesis in mice.

Methods

Animals

The Ko-Dp71 mice and their littermates were bred in our laboratory. Ko-Dp71 was obtained as described previously. Shortly, the first and unique exon of Dp71 and of a small part of the Dp71 first intron were replaced by a sequence encoding a β -gal-neomycine-resistance chimeric protein (b-geo) only abolishing the expression of Dp71. Mice were identified by analysis of PCR products using the following oligonucleotide primers (Dp71F, ATGAGGGAACAGCTCAAAGG; Dp71R, TGCAGCTGACAGGCTCAAGA). Control immunoblot experiments were also performed on brain extracts to verify the Dp71-null phenotype. All experiments were done in compliance with the European Communities Council Directives (86/609/EEC) for animal care and experimentation (HMG). *Mice were handled in accordance with the ARVO statement for the use of animals in ophthalmic and vision research (IOVS).*

Clinical evaluation of mice eyes

Mice eyes were examined for lens opacity using a slit lamp and an ophthalmoscope. Mice were physically restrained during the analysis and their eyes were dilated with 1% tropicamide at least 15 min before evaluation. Both nontransgenic (20 mice) and transgenic mice (31 mice) were analysed without the observers' prior knowledge of genotype.

Electrophoresis, Western blotting, and immunodetection.

Retina and lens from 2 months old mice were homogenized at 4°C in 10 vol (wt/vol) extraction buffer (50mM Tris-HCl pH 7.2, 150 mM NaCl, 1 % Triton X-100, 0.01 % sodium deoxycholate, 0.1 % SDS) containing a mixture of protease inhibitors from Sigma (Saint-Quentin Fallavier, F) and centrifuged at 1000g for 5 min. Protein concentrations were determined using bovine serum albumin (BSA) as standard (Bradford, 1970). Proteins were separated using either NuPAGE Tris-Acetate 3-8% or Tris-Glycine 4-12% gradient gels (Invitrogen, Cergy Pontoise, F) and electrotransferred to either polyvinylidene difluoride membranes Millipore, Saint-Quentin-en-Yvelines, F) or nitrocellulose (Schleicher & Schuell, Dassel, G) according to the manufacturer's instructions. Blots were blocked with 5% dry milk (Bio-Rad, Hertfordshire, UK) in PBS for 1h, then incubated 2h with primary antibody at room temperature. After washing, they were probed with an HRP-labeled goat anti-mouse or anti-rabbit secondary antibody (Interchim, France). Chemiluminescence was performed using ECL+ plus western blotting detection system (Amersham Biosciences, UK) and documented on film (Kodak).

Lens histology and Immunohistochemistry

After enucleation, the eyes of 2 months old mice were fixed in PBS 4% paraformaldehyde, transferred to PBS, dehydrated in increasing concentrations of ethanol, and embedded in paraffin. Sections (8µm) were cut and stained with hematoxylin eosin and viewed by light microscopy or prepared for immunohistochemical analysis.

Immunocytochemical labeling was carried out using the indirect immunofluorescence method on previously deparaffinized and rehydrated sections. After blocking in PBS, containing 10% normal goat serum (NGS), 1% bovine serum albumin (BSA) and 0.05% Triton X-100, sections were incubated with primary antibody in PBS supplemented with 3% NGS, 1% BSA and 0.1% Tween20. Primary antibodies were detected using secondary goat

anti-rabbit or anti-mouse IgG antibody coupled to Alexa (Molecular Probes, Eugene, OR) diluted 1:500 in PBS containing 3% NGS, 1% BSA, and 0.1% Tween20. Cell nuclei were stained using DAPI, 1:500 in PBS (Molecular Probes, Eugene, OR). Controls were prepared by omitting the primary antibody during the incubation; in these controls, no specific staining could be detected.

Antibodies.

The mouse monoclonal Dys2 antibody used to detect dystrophins was from Tebu (Novocastra, Newcastle-on-Tyne, UK). Jaf antibody directed against β -dystroglycan has been previously characterized by Rivier *et al.* (1999). AQP0 and vimentin antibody are mouse monoclonal antibody from Abcys (Paris, F) and Abcam (Cambridge, UK) respectively.

Results

Congenital cataract formation in lens from Ko-Dp71 mice.

To determine if dystrophins play a role in the crystalline lens we examined lens opacity using a slit lamp and an ophthalmoscope in wt and Ko-Dp71 littermates at 2, 5 and 7 months of age. Spontaneous cataracts were observed in 10% of the 2 months wt mice that slightly increased with age until 20% at 7 months. Cataracts were observed in 40 % of the 2 months old Ko-Dp71 mice and in all the 7 months mice tested (Fig. 1A), indicating the development of a progressive congenital cataract in absence of the dystrophin protein Dp71 (Fig. 1B). This result is consistent with the slower congenital onset of cataracts in the dystrophin mutant mice *mdx^{3cv}* which suffer a drastic reduction but not disappearance of all the DMD gene products (data not shown). During the clinical investigations we didn't observed any evident troubles concerning the cornea of Ko-Dp71 mice.

Histological analysis of cataract development in Dp71-deficient mice.

To begin to understand the role of Dp71 in the development and maintenance of a functional translucent lens, we investigated lenses histology of wt and Ko-Dp71 mice at different ages. We performed histological sections of mouse lens and stained them with haematoxylin and eosin. Our first observation consist in a reduction of the lens size in Ko-Dp71 when compared with wt animals whatever the age observed as indicated here at 2 and 7 months (Fig 1B). Sections of wt lenses of both ages revealed normal lens development without cellular damage in epithelial or fiber cells. In lenses from 2 months Ko-Dp71 mice, we already observe a disruption of the normally uniform staining in the lens core. We also detected some zones of cellular debris especially at the periphery of the lens core which

probably correspond to cells that lost their integrity. The cataract was found to be progressive so we observed the lens histology at 7 months when the cataract was installed in all the Ko-Dp71 mice. Whereas in wt mice the lens development presents no particularities, we observed a dramatic degradation in the organization of Ko-Dp71 lenses. An abrupt transition is visible between the primary and secondary lens fibers with more severe disruption in the secondary lens fibers confirming the progressive cataract observed. Whereas the epithelial cells layer appeared quite normal, the secondary lens fibers were totally disorganized with disoriented cells and a large amount of liquefied cellular debris that may develop due to metabolic imbalances.

Pattern of expression of the DMD gene products in lens.

DMD gene products expression was assessed by western-blot analysis on whole lens extracts from wt and Ko-Dp71 mice and compared with whole retinae extracts as control. As previously reported, all the DMD gene products except Dp116 were expressed in retina and only the Dp71 disappeared in Ko-Dp71 mice strain. In lens from wt mice, we observed a very strong band corresponding to Dp71 and at a lesser extent one that corresponds to Dp140 and a very faint band at 260 kDa (Fig 2). As expected in the Ko-Dp71 mice lens we failed to detect Dp71 expression whereas the expression of Dp140 and Dp260 were unchanged.

Localization of dystrophins and β -dystroglycan in lens.

In order to characterize the cellular pattern of expression of dystrophins in lens, serial lens sections from Ko-Dp71 mice and their littermates were used. The pan-specific antibody directed against all the DMD gene products, Dys2 revealed a weak but clear staining in the deepest part of the lens, corresponding to the primary fibers (Fig 4A). However, the strongest staining was observed at the cell surface of secondary fibers, at the anterior pole and at the germative zone (Fig 5 and 6). Epithelial cells of the anterior pole were also stained by the dystrophins antibodies (Fig 5). In order to reveal the precise localization of Dp71 we also performed immunostaining in Ko-Dp71 mice. In this case only the epithelial cells staining at the anterior pole remained evident (Fig 5). Thus, indicating that Dp71 was mainly localized in lens fibers whereas the largest products of the DMD gene (Dp260 and Dp140) were localized at the lens epithelial cells. Previous studies in various tissues have shown that Dp71 participates in a macromolecular complex always implicating β -dystroglycan. Immunostaining with the Jaf antibody in wt mice is shown in Fig; this antibody that exclusively recognizes β -dystroglycan revealed a similar localization to the one observed for the dystrophins staining of lens fibers (Fig 4C). In the Ko-Dp71 mice we observed that β -dystroglycan staining totally disappeared, thus suggesting that, Dp71 and β -dystroglycan are associated together in lens.

Expression and localization of the aquaporin channel AQP0 in lens of Ko-Dp71 mice

We have previously shown that in retina, Dp71 is responsible of the localization and aggregation of the potassium channel Kir4.1 and the aqueous channel AQP4. We hypothesized that in lens a complex implicating the Dp71 could be responsible of the correct localization of the major protein of fiber cell membranes, the aquaporin channel 0 (AQP0).

Fig 5 and 6 clearly showed a similar localization of Dp71 and AQP0 in lens. Higher magnification images clearly revealed a colocalization of both proteins in the secondary fiber membranes, especially in the deeper part of the anterior pole of the lens. We have shown that lens fibers were particularly disorganized in absence of Dp71. Immunostaining of the AQP0 protein revealed the strong disorganization of the lens secondary fiber cells in absence of Dp71 in the deeper part of both the anterior pole (Fig 5) and the germative zone (Fig 6).

RT-PCR analysis didn't indicate any modification of the expression of the transcript of AQP0 in absence of Dp71 (data not shown). By western-blot analysis, we only observed a slight decrease of the level of AQP0 expression in absence of Dp71 (Fig 3).

Discussion

Crystalline lens plays a passive but crucial role in the transmission of the visual information by focusing light rays on retina. To successfully fulfill this function, lens must be totally transparent implying a perfect organization of the cells and proteins constituting the crystalline lens. Proteins accounts for about 35% of the wet weight of the lens. This represents twice as much as other tissues. They can be divided in two classes, regarding their solubility in water: i) the water-soluble lens cristallins, structural proteins which represent 90% of the lens proteins, ii) the water insoluble proteins consisting of membrane proteins, cytoskeletal proteins and aggregated cristallins. Many proteins of the cytoskeleton have been described in the lens, reflecting the importance of the cytoskeletal organization, but to our knowledge it is the first study upon the expression and localization of dystrophins and particularly of Dp71. The slightest perturbation in the cellular or even protein organization can induce an opacification leading to the development of a cataract. Here we have shown that Dp71 was mainly expressed in the secondary fiber cells of the lens and that its absence induces the formation of a progressive congenital cataract in mice.

Dystrophins are responsible in muscle cells of maintaining the membrane integrity during the contraction/relaxation cycle. Here we have shown that Dp71 was localized at the cell surface of the secondary lens fibers. Between lens fibers, membranes form a lot of interdigitations that are very important during the accommodation phenomenon that consists in the modification of the curvature of the lens to focus light rays on the retina. In the basis of our observations we can easily hypothesize that in lens, Dp71 would be crucial for the stability of the lens fibers cell shape during the movements that take place during accommodation. Indeed we have shown in this study that the absence of Dp71 induced a progressive disorganization of the lens fibers. Moreover this disorganization is followed by the apparition of cellular debris that suggests a degenerative process of these fibers (Fig 2).

Actine, myosin, tropomyosin, and other proteins of the cytoskeleton have been described in the lens. As Dp427 in muscle, Dp71 probably establish in lens fibers a complex with β -dystroglycan, and other DAPs that remain to be determined which would be responsible of the linkage of the cytoskeleton to the extracellular matrix.

Intermediate filaments are very important in lens, especially in fiber cells where they are mainly located at the cell surface¹². In adult lens, two proteins of this family are highly expressed: vimentin and beaded chain filaments, a lens specific filament¹³. Till now no direct interactions have been reported between these two proteins and Dp71; however their localization are similar and the known interactions between dystrophins and other cytoskeletal proteins, like actin could indicate the possible association between Dp71 and intermediate filament proteins. However against this hypothesis, it has been reported that disruption of the beaded chain filament proteins CP49 destabilize the lens fiber cell cytoskeleton inducing perturbations of the lens optical quality without the formation of a cataract¹⁴. Similarly, no cataract formation was observed in absence of vimentin whereas the overexpression induces a cataract.

The transparency of the lens also depends on the ability of the newly formed lens fibers to elongate in a pattern that corresponds with the underlying cells. Dp71 localization could also reflect a function for this protein in allowing the right arrangement of the new cells during lens growth explaining the progressive onset of the cataract (Fig 1-2).

Our results indicate that the cataract observed in Ko-Dp71 mice would partially be the consequence of the perturbation of the disorganization of lens secondary fibers. The absence of Dp71 would induce the destabilization of the interaction between cells and extracellular matrix and/or between the cells themselves. Since the cytoskeletal disorganisation doesn't seem to be sufficient to induce a cataract, we cannot rule out the possibility that the absence of Dp71 would also induce the delocalization of proteins implicated in the intercellular

communication like the aquaporin channel AQP0. AQP0 is the main protein of the secondary lens fiber membranes and is particularly implicated in the water transport in these cells^{15,16}. We reported here an important modification of the pattern of localization of this protein; however we were not able to demonstrate if this is only the reflect of a total cell disorganization.

Cataract had been described in a DMD patient who presents a giant dystrophin deletion¹⁷. The author showed the expression in muscle of a product of about 200 kDa and the presence of a congenital cataract. This cataract can be due to the absence of Dp260 and Dp140 in the epithelium or to the absence of the Dp71 in the fiber cells. It has been reported a nuclear opacity present since the first day of life which evolved into anterior subcapsular opacity and later on into complete anterior subcapsular cataract. It has been postulated that congenital factors and an altered active transport of the membrane of the epithelial cells of the lens related to dystrophin abnormalities may play a role in its constitution which is coherent with our observation of the remain staining in the epithelial cells of dystrophins in Ko-Dp71 mice.

To the best of our knowledge, the finding reported here represents the first progressive phenotype described in a dystrophin deficient mice outside the muscle. This work clearly reveals that Dp71 plays a crucial role in the lens. We have shown here that the absence of Dp71 induce a disorganization of the cell fibers leading to the degeneration of some of them. Further investigation will help to establish if the precise function of Dp71 in lens is only to link the cellular cytoskeleton to the extracellular matrix in order to maintain the fibers cell shape during the accomodation or if it's also implicated in other function as the localization and aggregation of membrane proteins like AQP0.

Acknowledgements

This work was supported by INSERM (Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale) and by grants from the AFM (Association Française contre les Myopathies) to A.R. ; P.F. received financial support from FAF (Fédération des Aveugles et handicapés visuels de France) and from the AFM.

References

1. Davison MD, Critchley DR. alpha-Actinins and the DMD protein contain spectrin-like repeats. *Cell*. 1988;52:159-60.
2. Holt KH, Campbell KP. Assembly of the sarcoglycan complex. Insights for muscular dystrophy. *J Biol Chem*. 1998;273:34667-70.
3. Brenman JE, Chao DS, Xia H, Aldape K, Brecht DS. Nitric oxide synthase complexed with dystrophin and absent from skeletal muscle sarcolemma in Duchenne muscular dystrophy. *Cell*. 1995;82:743-52.
4. Gee SH, Madhavan R, Levinson SR, Caldwell JH, Sealock R, Froehner SC. Interaction of muscle and brain sodium channels with multiple members of the syntrophin family of dystrophin-associated proteins. *J Neurosci*. 1998;18:128-37.
5. Neely JD, Amiry-Moghaddam M, Ottersen OP, Froehner SC, Agre P, Adams ME. Syntrophin-dependent expression and localization of Aquaporin-4 water channel protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98:14108-13.
6. Bar S, Barnea E, Levy Z, Neuman S, Yaffe D, Nudel U. A novel product of the Duchenne muscular dystrophy gene which greatly differs from the known isoforms in its structure and tissue distribution. *Biochem J*. 1990;272:557-60.
7. Rodius F, Claudepierre T, Rosas-Vargas H, Cisneros B, Montanez C, Dreyfus H, Mornet D, Rendon A. Dystrophins in developing retina: Dp260 expression correlates with synaptic maturation. *Neuroreport*. 1997;8:2383-7.
8. Claudepierre T, Dalloz C, Mornet D, Matsumura K, Sahel J, Rendon A. Characterization of the intermolecular associations of the dystrophin-associated glycoprotein complex in retinal Muller glial cells. *J Cell Sci*. 2000;113 Pt 19:3409-17.
9. Dalloz C, Sarig R, Fort P, Yaffe D, Bordais A, Pannicke T, Grosche J, Mornet D, Reichenbach A, Sahel J, Nudel U, Rendon A. Targeted inactivation of dystrophin gene product Dp71: phenotypic impact in mouse retina. *Hum Mol Genet*. 2003;12:1543-54.
10. Hernandez-Gonzalez EO, Mornet D, Rendon A, Martinez-Rojas D. Absence of Dp71 in mdx3cv mouse spermatozoa alters flagellar morphology and the distribution of ion channels and nNOS. *J Cell Sci*. 2005;118:137-45.
11. Sarig R, Mezger-Lallemand V, Gitelman I, Davis C, Fuchs O, Yaffe D, Nudel U. Targeted inactivation of Dp71, the major non-muscle product of the DMD gene: differential activity of the Dp71 promoter during development. *Hum Mol Genet*. 1999;8:1-10.
12. Blankenship TN, Hess JF, FitzGerald PG. Development- and differentiation-dependent reorganization of intermediate filaments in fiber cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2001;42:735-42.
13. Kamachi Y, Uchikawa M, Tanouchi A, Sekido R, Kondoh H. Pax6 and SOX2 form a co-DNA-binding partner complex that regulates initiation of lens development. *Genes Dev*. 2001;15:1272-86.
14. Sandilands A, Prescott AR, Wegener A, Zoltoski RK, Hutcheson AM, Masaki S, Kuszak JR, Quinlan RA. Knockout of the intermediate filament protein CP49 destabilises the lens fibre cell cytoskeleton and decreases lens optical quality, but does not induce cataract. *Exp Eye Res*. 2003;76:385-91.
15. Gorin MB, Yancey SB, Cline J, Revel JP, Horwitz J. The major intrinsic protein (MIP) of the bovine lens fiber membrane: characterization and structure based on cDNA cloning. *Cell*. 1984;39:49-59.
16. Varadaraj K, Kushmerick C, Baldo GJ, Bassnett S, Shiels A, Mathias RT. The role of MIP in lens fiber cell membrane transport. *J Membr Biol*. 1999;170:191-203.

17. Mirabella M, Galluzzi G, Manfredi G, Bertini E, Ricci E, De Leo R, Tonali P, Servidei S. Giant dystrophin deletion associated with congenital cataract and mild muscular dystrophy. *Neurology*. 1998;51:592-5.

Legends

Figure 1: (A) Comparative analysis of the congenital cataract formation in the Ko-Dp71 mice lens. Observations have been done at 2-5 and 7 months in wild-type (wt, black) and Ko-Dp71 mice (white). The development of cataracts was observed in 10 to 20 % of the wt mice whereas this number increases dramatically with the age in Ko-Dp71 mice until the development of a cataract in all 7 months aged animals. (B) Photographs of the eyes of living wt and Ko-Dp71 mice of 7 months through a slit lamp. The eyes were dilated with 1% tropicamide at least 15 min before the observation. Whereas the lens of wt-mice is totally transparent, absence of Dp71 induces an opacification of the lens of 7 months Ko-Dp71 mice.

Figure 2: Histological analysis of wt and Ko-Dp71 mice lens. Histological sections of lens from wt (A and C) and Ko-Dp71 (B and D) mice stained with hematoxylin and eosin at 2 (A and B) and 7 (C and D) months. Whereas the ageing is normal in wt mice lens, we observed a progressive disorganization in lens from Ko-Dp71 mice with an increased number of cellular debris between 2 and 7 months of age. Moreover the secondary fiber cells of the lens seem to be totally disorganized at 7 months whereas only smaller perturbations are observed at 2 months.

Figure 3: Immunoblot analysis of DMD gene products and AQP0 in lens (1-2) and retina (3-4) from wt (1, 3) and Ko-Dp71 mice (2, 4). Actin was used as a control of the protein quantity. As in the retina, Dp71 is the main DMD gene product expressed in lens. We also detected Dp427, Dp260 and Dp140 in retina and Dp260 and Dp140 in lens from both strains.

Figure 4: Immunolocalization of dystrophins and β -dystroglycan in primary lens fibers from wt and Ko-Dp71 mice. Immunostaining of dystrophins proteins (A, B), β -dystroglycan (C, D) and dapi in wt (E, G) and Ko-Dp71 (F, H) mice lens. We observed a weak but clear staining for both proteins in wt lens that disappear in Ko-Dp71 mice lens.

Figure 5: (A) Immunolocalization of dystrophins and AQP0 in the anterior pole of the lens from wt and Ko-Dp71 mice. Dystrophins are localized at the secondary fiber membranes together with the aquaporin channel AQP0. As expected, dystrophins staining in Ko-Dp71 mice lens was strongly decreased, confirming that Dp71 is the main product of the DMD gene in lens. We observed that a weak staining of the epithelium remain in the Ko-Dp71 mice indicating that the other products of the DMD gene are expressed here. No staining of the capsule has been observed neither in wt nor in Ko-Dp71 mice lens. (B) Higher magnification images clearly reveal a colocalization of both proteins in the membranes of secondary fibers at the anterior pole.

Figure 6: Immunolocalization of dystrophins and AQP0 in the germative zone of the lens from wt and Ko-Dp71 mice. Dystrophins are localized at the secondary fiber membranes together with the aquaporin channel AQP0. As expected, dystrophins staining in Ko-Dp71 mice lens was strongly decreased, confirming that Dp71 is the main product of the DMD gene in lens. No staining of the capsule and epithelium have been observed neither in wt nor in Ko-Dp71 mice lens.

Figure 1:

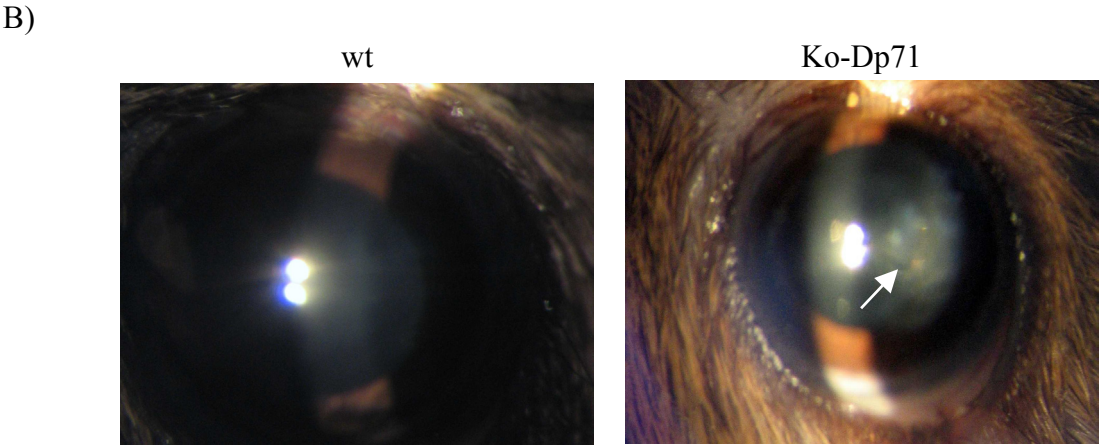
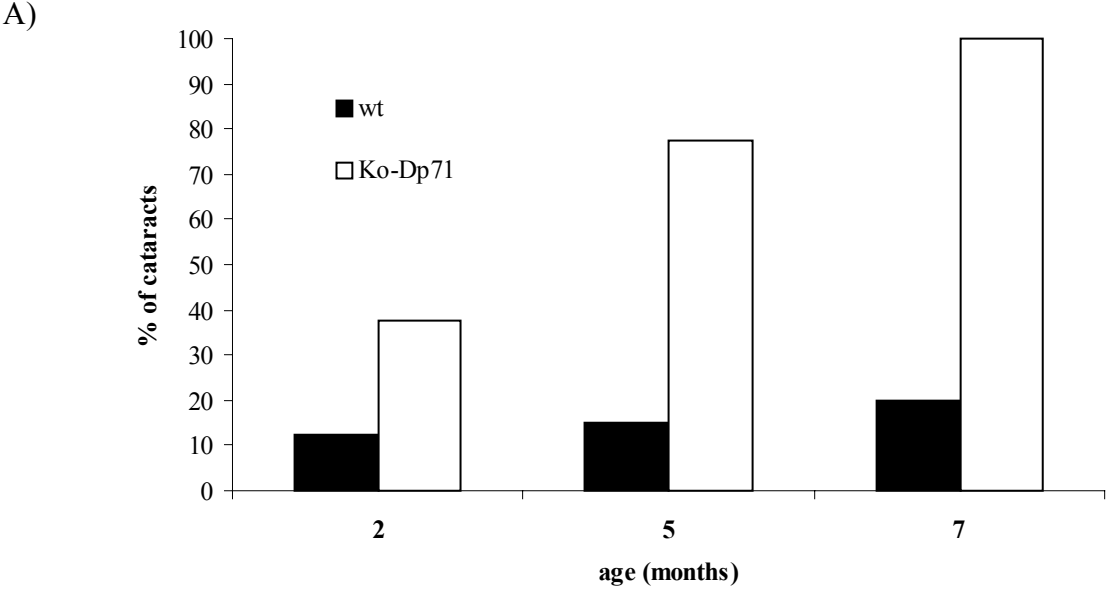


Figure 2:

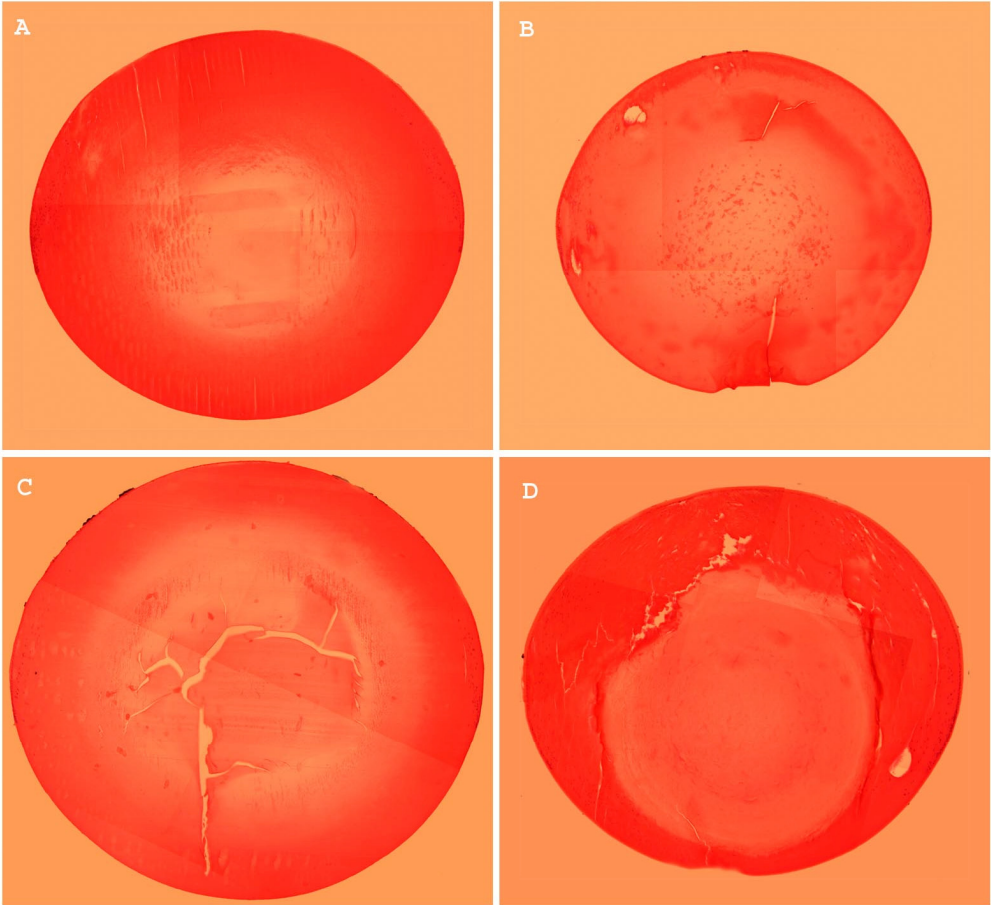


Figure 3

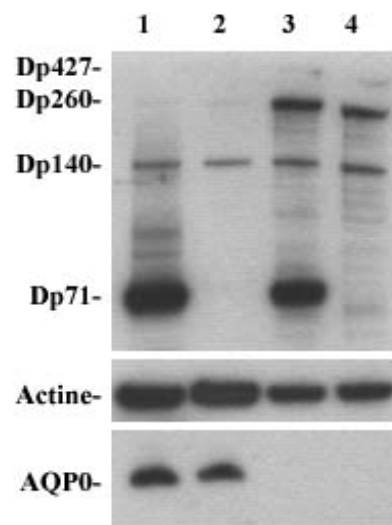


Figure 4

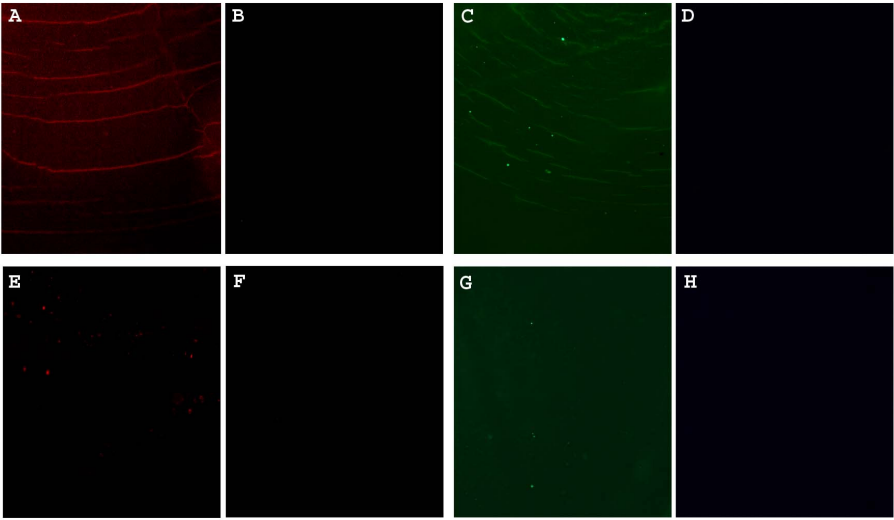


Figure 5

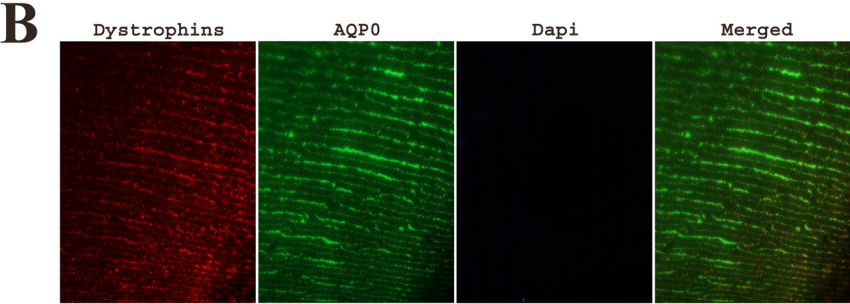
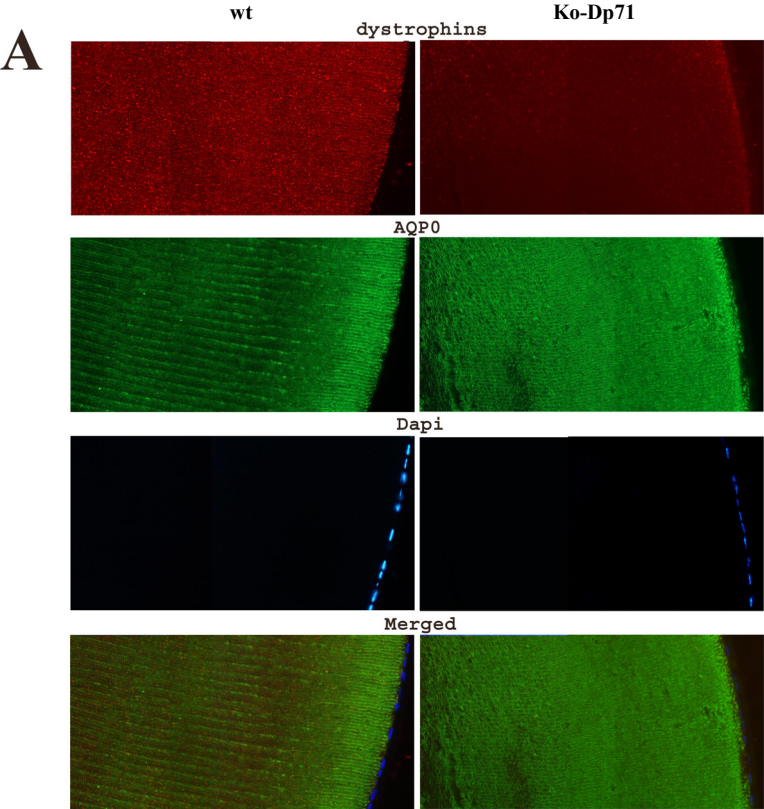
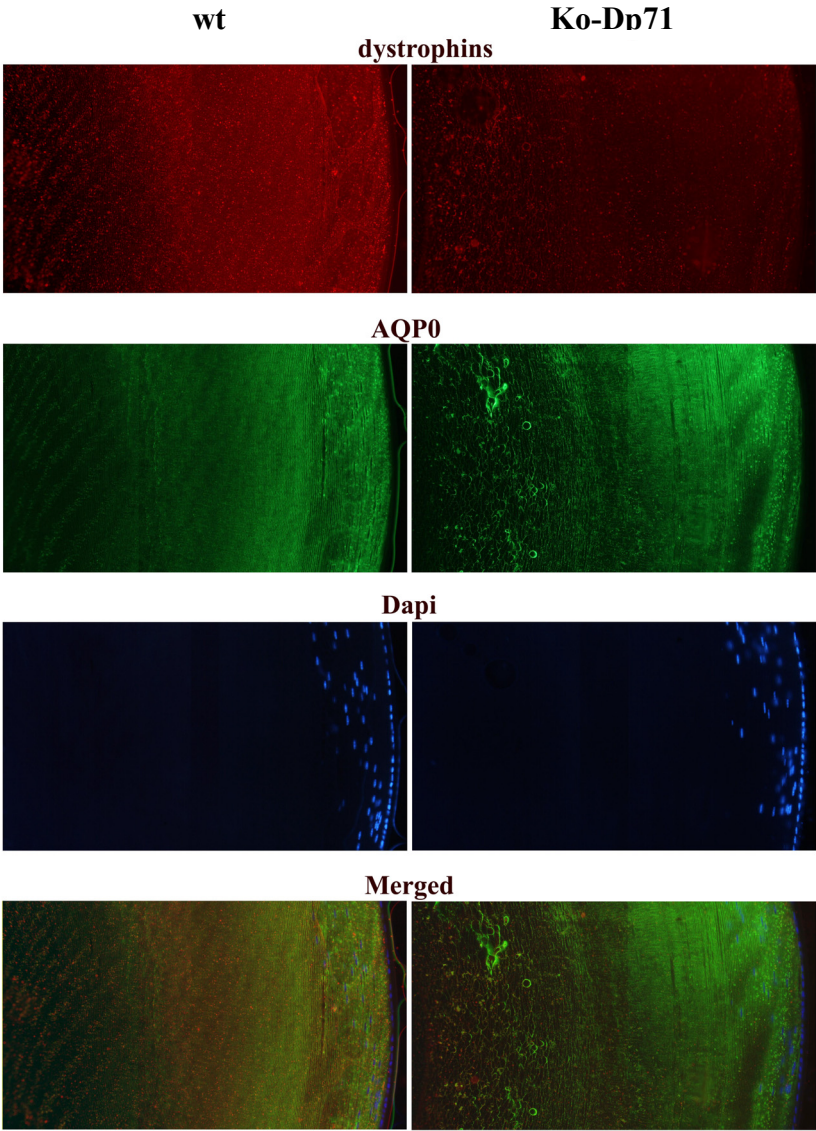


Figure 6



V- Discussion

1) *Phénotype ERG et Dp71*

Mon travail de thèse avait pour objectif premier de déterminer la ou les fonctions de la Dp71 dans la rétine, afin de découvrir les bases du phénotype ERG observé chez les patients DMD. Lorsque nous avons débuté cette étude, les ERG de plusieurs souches de souris mutantes pour les dystrophines avaient été enregistrés. Ces travaux montraient que la forte diminution de tous les produits du gène DMD chez la souche de souris *mdx^{3cv}* induisait une perte de l'onde b de l'ERG scotopique {Pillers, 1995 #299}, alors que l'absence de tous les produits du gène à l'exception de la Dp71 (souris Exon 52 knock-out) n'induisait pas de diminution de l'amplitude de l'onde b {Kameya, 1997 #23}. Ces données suggéraient que la Dp71 pouvait être responsable, à elle seule, du phénotype ERG observé chez les modèles murins de la myopathie de Duchenne, similaire à celui mis en évidence chez les patients DMD {Pillers, 1999 #21}. Afin de tester cette hypothèse nous avons utilisé une souris déficiente pour la Dp71 et nous avons montré que sa seule absence n'était pas responsable de la perte de l'onde b de l'ERG en condition scotopique. La perte concomitante de tous les produits du gène semble donc nécessaire afin de retrouver un phénotype similaire à celui observé chez les patients DMD {Daloz, 2003 #342}. Dans le même temps, plusieurs études ont montré des divergences entre les résultats obtenus chez les modèles murins et les patients DMD {Fitzgerald, 1999 #22; Kameya, 1997 #23}. En effet, l'étude de différentes familles de patients DMD a permis de corréler l'apparition du phénotype ERG avec une localisation de la mutation entre les exons 30 et 62 montrant un rôle important de la Dp260 chez l'homme {Pillers, 1999 #50}. Nos résultats, confortés par les données récentes de la littérature, indiquent clairement que la Dp71 n'est pas directement responsable de l'absence de l'onde b chez les patients DMD ou les modèles murins de la DMD.

2) Phénomènes de compensations moléculaires autour de la Dp71

Afin de déterminer les fonctions de la Dp71 dans la rétine, nous avons démarré nos travaux par caractériser sa localisation dans ce tissu, en comparant les résultats d'immunohistochimie obtenus chez la souris sauvage avec ceux obtenus chez la souris Ko-Dp71. Nous avons ainsi pu montrer que la Dp71 était avec l'utrophine, exclusivement exprimée par les CGM. L'étude de l'expression des différents produits de la superfamille des dystrophines nous a permis de mettre en évidence une surexpression de la Dp140 et de l'utrophine en absence de Dp71, suggérant l'existence de phénomènes de compensation moléculaire. Etant donné la redondance du « système dystrophine », il a été plusieurs fois envisagé que l'absence de l'un des produits pourrait être compensé par la surexpression d'un autre, à l'image de ce qui se passe au cours du développement. En effet, on considère l'utrophine comme l'homologue fœtal de la dystrophine, puisque la première est exprimée très tôt dans certaines structures ou types cellulaires, en particulier dans le système nerveux central, avant d'y être remplacée par la seconde chez l'adulte {Khurana, 1991 #64; Ohlendieck, 1991 #306}. Ces phénomènes de compensation doivent donc être gardés à l'esprit lorsque l'on émet des conclusions sur un système aussi complexe que celui des dystrophines. Ce type de mécanismes pourrait également être à l'origine de l'absence de phénotype ERG observé chez la souris Ko-Dp71. En effet, on peut imaginer que l'absence de phénotype observée chez les souris Ko-Dp71 pourrait être due à une compensation par l'utrophine ou la Dp140.

L'analyse détaillée de nos résultats semble indiquer cependant que la surexpression de l'utrophine ne serait qu'une tentative de remplacement de la Dp71 dans les CGM. Cette surexpression n'empêchant pas la délocalisation des canaux potassiques Kir4.1 et aqueux AQP4, indique que cette compensation est soit infructueuse, soit insuffisante, soit destinée à d'autres éléments, pouvant être impliqué dans d'autres fonctions de la CGM. N'ayant détecté jusqu'ici dans les CGM que l'expression de la Dp71 et de l'utrophine, nous avons émis deux hypothèses concernant la surexpression de la Dp140 : -il pourrait s'agir soit d'une compensation induite dans un autre type cellulaire de la rétine, en dehors de la

CGM, soit d'une augmentation très importante d'une protéine peu ou pas exprimée en temps normal par les CGM. En effet, il a été décrit que certaines protéines normalement exprimées, par exemple le canal Kir4.1, pouvait être inhibées lors du passage en culture des CGM {Ishii, 1997 #305}. Il est possible d'envisager que la Dp140 fasse partie de ces protéines, ce qui expliquerait que celle-ci n'ai jamais été détectée dans les CGM jusqu'ici. De plus, la Dp140 a été retrouvée, par analyse protéomique, dans des lignées immortalisées ainsi que dans des cultures primaires de cellules gliales de Müller humaine (Lupien, ARVO 2005). On peut cependant penser que l'expression de la Dp140 par les CGM humaines reflèterait une différence interspécifique liée à l'évolution, qui a conduit à son expression en plus de celles de la Dp71 et de l'utrophine. En effet, bien que les CGM soient des cellules gliales au même titre que les astrocytes du cerveau, les CGM n'expriment que la Dp71 et l'utrophine, alors que les astrocytes expriment également la Dp140 dans la neurohypophyse, autour du nerf olfactif et à la surface des leptoméniges {Lidov, 1997 #307; Lidov, 1995 #52}.

3) Interactions Dp71/Kir4.1 et Dp71/AQP4

Quel que soit l'explication concernant l'origine et la fonction de la surexpression de l'utrophine et de la Dp140 en absence de la Dp71, nous avons montré que cela n'empêchait pas la délocalisation de deux protéines, le canal potassique Kir4.1 et le canal aqueux AQP4, qui sont essentielles pour la régulation de l'homéostasie rétinienne. En effet, il est clairement établi que ces deux protéines sont normalement localisées, comme la Dp71, autour des vaisseaux sanguins et dans les pieds des CGM formant la membrane limitante interne (MLI). Nos travaux révèlent que lorsque la Dp71 est absente, ces deux canaux se retrouvent complètement redistribués tout le long de la membrane des CGM. Ceci montre bien que la Dp71, comme la dystrophine à la jonction neuromusculaire, est responsable de la localisation de canaux ioniques et aqueux. Il est intéressant de noter que l'absence de la Dp71 n'a pas le même effet sur ces deux canaux, puisque le Kir4.1 est uniquement délocalisé, alors que l'AQP4 montre également une diminution importante de

son expression. Ceci suggère une régulation différentielle de ces deux protéines, qui ont longtemps été considérées comme appartenant à un même couple fonctionnel. En outre, il a été montré dans le cerveau que dans certaines conditions pathologiques, le transport aqueux pouvait être découplé du repompage du potassium, confirmant une indépendance possible des deux éléments {Saadoun, 2003 #308}. La diminution de l'expression de l'AQP4 dans la rétine peut avoir deux origines, soit une diminution en amont de son expression, soit une augmentation de sa dégradation pouvant être dû à une perturbation de son adressage à la membrane. Il est important d'envisager de faire des expériences de demi-vie de l'AQP4 afin de préciser s'il s'agit ou non d'une augmentation de sa dégradation.

4) Régulation de l'homéostasie rétinienne et Dp71

Nous avons montré que la délocalisation du canal Kir4.1 ne perturbe pas les courants potassiques globaux de la CGM mais entraîne en fait une redistribution des courants potassiques locaux dans toute la cellule. Cette redistribution ne semble pas être particulièrement néfaste en conditions normales, mais s'avère beaucoup plus négative pendant et après un phénomène ischémique, lorsque l'homéostasie est fortement perturbée et que sa régulation rapide et précise est nécessaire. En effet, nous avons montré que l'absence de Dp71 et par conséquent la redistribution de ces deux canaux induisait une sensibilité accrue de la rétine à un trouble ischémique. Bien que toutes les couches de la rétine soient sensibles, les cellules ganglionnaires sont plus significativement affectées lors de tels troubles. Lorsque ces troubles ont lieu en absence de Dp71, ce sont également des cellules les plus atteintes avec un accroissement de 50% de leur mortalité. Il est établi que les cellules ganglionnaires sont particulièrement sensibles aux phénomènes ischémiques, et tout particulièrement à ceux liés à une augmentation de la pression intraoculaire. La délocalisation des canaux Kir4.1 et AQP4 a pour conséquence une baisse du potentiel de membrane des CGM qui peut entraîner une diminution de l'efficacité du transporteur GLAST du glutamate. Ce transporteur est spécifiquement exprimé par les CGM dans la rétine leur permettant de pomper le glutamate libéré par les neurones dans l'espace extracellulaire et ainsi de contrôler la neurotransmission excitatrice. Il a été montré que

l'un des mécanismes prépondérant dans la mort neuronale liée à l'ischémie est le phénomène d'excitotoxicité du glutamate. Lors d'un épisode ischémique, il y a à la fois une libération excessive de glutamate par les neurones mais également divers processus qui vont perturber le pompage de ce dernier. Il a été montré que l'absence des transporteurs du glutamate GLAST ou GLT1 était à l'origine d'une augmentation importante de la mort neuronale suite à un épisode ischémique transitoire {Harada, 1998 #309; Vorwerk, 2000 #310}. Nous avons émis l'hypothèse que l'absence de Dp71 pourrait avoir pour conséquence une diminution de l'efficacité du GLAST durant l'ischémie mais surtout durant la période de reperfusion. Le glutamate n'étant pas éliminé aussi rapidement que chez une souris contrôle, il induirait alors une augmentation de la mort neuronale par excitotoxicité. Cependant, l'étude de la localisation et de l'expression du GLAST dans la rétine en présence et en absence de Dp71 n'a révélé aucune modification (résultats non présentés).

Des travaux récents ont mis en exergue le rôle des canaux Kir4.1 et AQP4 dans les troubles ischémiques. De façon intéressante, Pannicke et coll. ont montré que lors d'un épisode ischémique transitoire, il y avait une délocalisation du canal Kir4.1 similaire à celle constatée chez les Ko-Dp71 {Pannicke, 2004 #311}. Les auteurs ont noté que cette perturbation s'accompagnait également d'une redistribution partielle de la Dp71, mais que l'AQP4, de manière surprenante, ne semblait pas être modifiée. D'un autre côté, et contrairement à ce que laisse penser nos résultats, Da et coll. ont montré que l'inactivation du canal aqueux AQP4 pouvait préserver les cellules ganglionnaires de la mort cellulaire suite à une ischémie transitoire {Da, 2004 #312}. Ces résultats suggèrent que lors d'un phénomène ischémique, les courants potassiques de la CGM sont diminués du fait de la délocalisation et de la diminution d'expression du canal Kir4.1. Dans le même temps, le canal aqueux AQP4 ne faisant l'objet d'aucune modification, l'influx aqueux n'est pas modifié, alors que l'efflux est lui diminué puisqu'il ne peut se faire contre le gradient potassique. Ceci a pour conséquence un œdème des CGM qui va lui même induire par la suite des dommages rétinien. En absence d'AQP4, la rétine serait moins endommagée, du fait de la perturbation des flux aqueux induisant une diminution du « gonflement » des

CGM et par conséquent une diminution de la neurodégénérescence. Lorsque la Dp71 est absente, on peut supposer que la délocalisation des deux canaux étant déjà effective, le « gonflement » des CGM est plus précoce, voir chronique, expliquant l'accroissement de la mort neuronale.

5) Fonctions alternatives de la Dp71 dans la CGM

Gonzalez et coll. ont rapporté que la Dp71 pouvait également avoir une localisation nucléaire en fonction des épissages alternatifs dont elle fait l'objet {Gonzalez, 2000 #86}. Les auteurs ont montré que la localisation cytoplasmique ou nucléaire de la Dp71 dans les cellules PC12 était régulée par la présence ou l'absence de l'exon 78. De leur côté, Claudepierre et coll. ont montré que dans la CGM, plusieurs isoformes de la Dp71 sont présentes, telle que la Dp71f pour laquelle l'exon 78 a été remplacé par l'exon 79, suggérant la possibilité d'une localisation nucléaire de la Dp71 dans la CGM {Claudepierre, 2000 #24}. Bien qu'à l'heure actuelle, il soit admis que la Dp71 puisse avoir une localisation nucléaire, sa fonction et ses mécanismes d'actions restent à préciser. Par ailleurs, il a été montré que le complexe associé à la dystrophine pouvait être responsable de la localisation dans le muscle, mais aussi dans le système nerveux central, de protéines de signalisation telle que la nNOS, montrant clairement un rôle des dystrophines dans la signalisation {Blottner, 2001 #313; Sogos, 2003 #314}. On peut imaginer que la Dp71 pourrait former des complexes avec : i) des protéines de signalisations nucléaires, ii) des protéines de structure nucléaire, telle que les yotiao qui interagissent avec le cytosquelette nucléaire {Kurokawa, 2004 #316; Schmidt, 1999 #315} ou encore iii) des facteurs de transcription...

Les CGM jouent également un rôle essentiel dans l'apport d'énergie aux neurones. Il a été montré dans la rétine que la majorité du glucose était utilisé par les CGM, qui relâchent ensuite du lactate pouvant alors être utilisé par les neurones, en particulier les photorécepteurs {Poitry-Yamate, 1995 #289}. D'autres études ont montré que les

astrocytes semblent capables de détecter l'activité neuronale et, en réponse, de métaboliser du glucose en lactate afin de fournir les neurones en énergie {Pellerin, 1994 #317}. Différents travaux ont montré que lors d'une hypoglycémie, comme lors d'un épisode ischémique, le lactate fourni par les cellules gliales augmente la survie neuronale {Cater, 2001 #318; Choi, 2003 #319}. Il est possible que l'hypersensibilité rétinienne à l'ischémie, constatée en absence de Dp71 soit en partie liée à une intervention de cette protéine dans l'acheminement du lactate. En effet, les CGM doivent non seulement posséder les enzymes glycolytiques pour métaboliser le glucose en lactate, mais également posséder à leur membrane d'une part des transporteurs permettant l'entrée du glucose dans la cellule et d'autre part des transporteurs permettant la libération du lactate : les transporteurs de monocarboxylate (MCT). L'un des rôles du complexe associé à la Dp71 pourrait être d'assurer la localisation de ces différents transporteurs en des lieux précis de la membrane : la région périvasculaire et les couches synaptiques.

6) Composition du complexe autour de la Dp71

Il est connu que les protéines de la superfamille des dystrophines participent à des complexes macromoléculaires dont les composants ont été exhaustivement étudiés dans le muscle. Parmi ces composants, certains ont été retrouvés dans la rétine, voir même dans la CGM en culture. Ici, nous avons montré chez la souris que le β -dystroglycane ainsi que les syntrophines et dystrobrevines sont exprimées dans le même domaine membranaire de la CGM, le pied. Ceci confirme les résultats déjà obtenus dans notre laboratoire par Claudepierre et coll. sur la rétine de rat {Claudepierre, 2000 #24}.

a) Indépendance des sarcoglycanes et du sarcospan

Parmi les composants connus du complexe dans le muscle, les sarcoglycanes et le sarcospan sont certainement ceux dont le rôle est le moins bien défini. Bien qu'ils aient longtemps été considérés comme des protéines purement musculaires, différents éléments du complexe SG/SSPN ont été détectés dans d'autres tissus. Par exemple, il a été montré

que l' ϵ -SG est exprimé de façon quasi-ubiquitaire et notamment dans le cerveau {Xiao, 2003 #320}. Au cours de ce travail, nous avons montré qu'à l'exception de l' α -SG, tous les membres du complexe répertoriés dans le muscle sont également présents dans la rétine. De plus, l' ϵ -SG qui est considéré comme un homologue de l' α -SG, est exprimé dans la rétine à un taux très important {Ettinger, 1997 #321; McNally, 1998 #91}. Ces données indiqueraient que comme dans le muscle lisse, l' ϵ -SG pourrait remplacer l' α -SG afin de former un complexe avec les autres SGs et le SSPN {Straub, 1999 #322}.

De manière intéressante nous avons montré que ces différentes protéines présentent une localisation très similaire entre elles mais qui se démarque clairement de celle des dystrophines. En effet alors que les dystrophines sont uniquement localisées dans l'OPL, autour des vaisseaux sanguins et à la MLI, les SGs sont eux détectés dans les deux membranes limitantes (interne et externe) ainsi que dans les fibres nerveuses qui correspondent aux axones des cellules ganglionnaires. Bien que la Dp71 et les SGs soient tous deux exprimés dans la MLI, nous avons montré que la très forte diminution de Dp71 chez la souris *mdx^{3cv}* n'avait pas de conséquence apparente sur le niveau d'expression ou la localisation des membres du complexe SG/SSPN. Ceci est contraire à ce qui a été montré dans le muscle strié squelettique où l'absence de dystrophine induit une désorganisation du complexe DGC, y compris les SGs, la forte diminution de tous les produits du gène dans la rétine ne semble donc avoir aucune conséquence sur les SGs et le SSPN {Matsumura, 1999 #323; Metzinger, 1997 #324}. Ceci, conjugué à la localisation différentielle dans la MLE et dans les axones des cellules ganglionnaires, suggère une indépendance des SGs vis à vis des dystrophines. En effet, nous n'avons jamais pu mettre en évidence l'expression de dystrophines dans les cellules ganglionnaires, que ce soit *in situ* ou dans des cellules ganglionnaires en culture.

Outre les dystrophines, les SGs seraient également indépendants du β -dystroglycane. En effet, nous avons montré que le β -dystroglycane avait la même distribution dans la rétine que les dystrophines et que l'absence de ces dernières induisait une très forte diminution de son expression {Daloz, 2001 #159}. Ces résultats laissent supposer que le

complexe SG/SSPN joue, dans la rétine, un rôle différent de celui qu'il possède dans le muscle. En effet, l'hypothèse principale de stabilisation du complexe dystrophine/DAPs par le complexe SG/SSPN paraît ne pas pouvoir s'appliquer au sein de la rétine, et on peut le suspecter au niveau du SNC en général {Holt, 1998 #183}. La localisation du complexe SG/SSPN aux deux extrémités de la rétine, suggère son intervention dans le maintien des barrières de diffusions formées par les CGM. En effet, il pourrait participer à la stabilisation des interactions intercellulaires, ou entre les cellules et la matrice extracellulaire, comme par exemple avec les fibres de collagène du corps vitré. Alors que les pieds des CGM forment une pseudo-membrane responsable des phénomènes de diffusion entre la rétine et le corps vitré, leurs extrémités apicales entourent les segments externes des photorécepteurs en établissant des jonctions de type *zonulae adherens*, limitant ainsi les phénomènes de diffusion entre la rétine et l'épithélium pigmentaire {Rasmussen, 1974 #325}.

Nous avons montré que les composants du complexe SG/SSPN étaient également fortement exprimés dans les cellules ganglionnaires et plus précisément dans les axones de ces cellules qui forment les fibres nerveuses du nerf optique. Les axones des cellules ganglionnaires possèdent une disposition bien précise pour rejoindre le disque optique où se forme le nerf optique. En effet, les fibres provenant de la partie temporale de la rétine doivent éviter la fovéa, et vont ensuite entrer dans le disque optique par sa partie supérieure ou inférieure. Les SGs pourraient avoir un rôle dans les interactions entre les fibres ainsi qu'avec la matrice qui les entoure.

Comme nous l'avons mentionné plus haut, il a été émis l'hypothèse que le complexe SG/SSPN pourrait interagir avec le β -dystroglycane dans le muscle et que cette interaction pourrait stabiliser le complexe dystrophine/DAPs. Nous avons montré dans la rétine que le complexe SG/SSPN ne paraît pas interagir avec le β -dystroglycane. Ceci suggère que les SGs et le SSPN interagissent avec un autre complexe macromoléculaire de composition inconnue, et/ou qu'ils interagissent directement avec la matrice extracellulaire. Selon cette dernière hypothèse, le SSPN, qui est une protéine à quatre domaines transmembranaires,

pourrait être le lien entre le complexe SG/SSPN et la matrice. En effet, il a été montré que les mécanismes mettant en jeu la laminine et l'intégrine, comme la croissance neuritique ou l'organisation spatiale de la membrane impliquent souvent des protéines à quatre domaines transmembranaires telle que les protéines de surface cellulaires CD9 et CD151 {Banerjee, 1997 #28; Jones, 1996 #29; Sterk, 2000 #27}.

b) Présentation et rôle des autres DAPs

Les SGs et le SSPN ne participent apparemment pas au complexe associé à la Dp71 dans les CGM responsable de la localisation des canaux potassiques Kir4.1 et aqueux AQP4. Cependant, d'autres DAPs ont été retrouvées dans les CGM et pourraient être susceptible de participer à la formation de ce complexe. En effet, nous avons montré que la Dp71 formait dans les pieds des CGM un complexe incluant le β -dystroglycane, les dystrobrevines et les syntrophines, interagissant avec le canal Kir4.1. Dans ce complexe, les syntrophines pourraient interagir directement avec les deux canaux comme cela a été montré dans les astrocytes du cerveau. En effet, Connors et coll. ont montré que le canal Kir4.1 interagit avec le complexe associé aux dystrophines via l' α 1-syntrophine {Connors, 2004 #148}. De même l'utilisation de souris déficiente pour l' α -syntrophine a conduit à la mise en évidence dans le cerveau d'une délocalisation du canal aqueux AQP4, suggérant une interaction de ces deux protéines {Amiry-Moghaddam, 2003 #140}. Les syntrophines sont des protéines contenant plusieurs motifs et domaines d'interaction, c'est pourquoi il a été proposé qu'elles agissent comme des adaptateurs modulaires établissant le relais entre le complexe DGC et les ligands {Peters, 1997 #326}. Il est connu que les syntrophines lient les dystrophines soit via leurs domaines d'homologie à la pleckstrine (PH), soit via un domaine spécifique des syntrophines (SU) {Kachinsky, 1999 #131}. Elles sont d'autre part capables de lier des protéines de signalisation type nNOS {Brenman, 1996 #133}, des canaux sodiques {Gee, 1998 #132} ou encore des protéines kinases {Hasegawa, 1999 #103; Lumeng, 1999 #102} par leur domaine PDZ. Il est donc probable que dans la rétine, les deux canaux Kir4.1 et AQP4 interagissent avec les syntrophines via leurs domaines PDZ respectifs, comme c'est le cas dans les astrocytes du cerveau {Connors, 2004 #148}.

A l'image de son rôle dans le muscle, le β -dystroglycane serait responsable de l'agrégation du complexe à la membrane et probablement de son interaction via l' α -dystroglycane avec la matrice extracellulaire. En effet, nous avons montré que le β -dystroglycane participe directement au complexe lié à la Dp71 et que l'absence de cette dernière entraîne une diminution significative de l'expression du β -dystroglycane dans le pied des CGM, ainsi qu'une redistribution des deux canaux Kir4.1 et AQP4. Ces résultats suggèrent que le complexe associé à la Dp71 induirait la localisation de ces deux canaux via une interaction du complexe dystroglycane avec la matrice extracellulaire du corps vitré. Etayant cette hypothèse, il a été montré que l'agrégation de ces deux canaux pouvait être induite dans les astrocytes du cerveau par la laminine via un complexe contenant le dystroglycane {Guadagno, 2004 #327}.

Les dystrobrévines sont des protéines de la superfamille des dystrophines. Alors que l' α -dystrobrévine participe au complexe associé à la dystrophine dans le muscle, la β -dystrobrévine a été retrouvée dans le cerveau ainsi que dans les reins. Récemment, Ueda et coll. ont montré que ces deux protéines sont également exprimées dans la rétine {Ueda, 2000 #147}. Ici, nous avons mis en évidence qu'au moins l'une d'entre elle, l' α -dystrobrévine, participe au complexe associé à la Dp71 dans les pieds des CGM. Il a été proposé que l' α -dystrobrévine interviendrait dans la synaptogénèse de la fibre musculaire squelettique en stabilisant les agrégats de récepteurs à l'acétylcholine à la jonction neuromusculaire {Grady, 1999 #97; Grady, 2000 #150}. Selon le même modèle, l' α -dystrobrévine pourrait intervenir dans la mise en place et la stabilisation des agrégats de Kir4.1 et AQP4 dans les pieds des CGM. L' α -dystrobrévine ainsi que la β -dystrobrévine semblent jouer, via le complexe DGC et une interaction directe, ou indirecte passant par les syntrophines, un rôle dans la localisation de molécules de signalisation comme la nNOS, {Grady, 2000 #150; Loh, 2001 #328}. Elles pourraient également intervenir à d'autres niveaux dans la transduction des signaux par l'intermédiaire des nombreux sites de phosphorylation qu'elles présentent {Blake, 2002 #329}. D'après nos travaux, il est donc également possible d'imaginer que l' α -dystrobrévine soit impliquée dans la signalisation intracellulaire dans les CGM, lié ou non aux courants potassiques et aqueux.

7) Cristallin et Dp71

Lorsque nous avons mené une étude clinique sur les souris invalidées pour l'expression de la Dp71, nous avons constaté l'apparition et le développement d'une cataracte congénitale progressive. En effet, lorsque nous avons observé les fonds d'œil, nous avons remarqué chez ces souris des opacifications hétérogènes du cristallin qui étaient plus importantes chez les animaux âgés. Une étude épidémiologique du cristallin de ces souris a permis de confirmer le développement progressif d'une cataracte, déjà visible chez 40% des souris Ko-Dp71 âgées de 2 mois, et atteignant tous les animaux testés à 7 mois. De plus, l'analyse histologique a montré de nombreuses perturbations de l'anatomie, avec notamment l'apparition de vacuoles et d'agrégats liés à la dégénérescence de certaines fibres du cristallin, de plus en plus nombreux au cours du vieillissement. Ces résultats indiquent que la Dp71 aurait un rôle prépondérant à jouer dans l'organisation et les interactions entre les cellules du cristallin.

Le caractère progressif de ces troubles pathologiques pourrait être le reflet de l'intervention de la Dp71 dans la mise en place des fibres cristalliniennes nouvellement synthétisées. En effet, le cristallin possède la particularité de s'accroître tout au long de la vie, par multiplication des cellules épithéliales dans la zone germinative, qui se différencient par la suite en fibres cristalliniennes {Rafferty, 1981 #227}. Lorsque les cellules épithéliales se divisent dans la zone germinative et commencent à se différencier en fibres cristalliniennes, des cascades de réactions sont mises en jeu afin d'éliminer le noyau et les organelles qui vont être remplacés par un contenu fibrillaire. Walker et coll. ont montré que l'un des signaux de différenciation est la formation d'un complexe IGF1R/intégrine permettant l'activation de la voie SRC {Walker, 2002 #330; Walker, 2002 #331}. Par ailleurs, il est connu que la dystrophine effectue dans le muscle le lien entre le cytosquelette d'actine et la laminine, dont l'intégrine est l'un des récepteurs. Basé sur ces observations, il est possible d'envisager que le complexe auquel participe la Dp71 intervienne dans la différenciation en interagissant avec le complexe IGF1R/intégrine.

Cependant, nous avons montré que la Dp71 était particulièrement exprimée dans les fibres cristalliniennes secondaires mais pas plus dans celles à l'équateur que dans le reste du cortex, ne suggérant pas un rôle particulier dans les cellules en divisions ou fraîchement différenciées.

Cette opacification progressive pourrait également provenir d'un accroissement de la désorganisation générale du cristallin en fonction du temps lié aux processus d'accommodation. En effet, la fonction principale du cristallin est de permettre le passage des rayons lumineux et les faire converger sur la rétine : c'est le phénomène d'accommodation. La Dp71 pourrait jouer un rôle dans le cristallin au cours de l'accommodation similaire à celui joué par la dystrophine dans les fibres musculaires lors des cycles de contractions/relaxations {Campbell, 1995 #88; Petrof, 1993 #87}. Son absence induirait alors une déstabilisation des fibres lors des changements de courbures du cristallin pouvant mener à la dégénérescence de certaines d'entre elles et, avec l'accumulation, à l'apparition d'une cataracte. Ceci est également suggéré par le fait que le cristallin est particulièrement riche en éléments du cytosquelette tel que l'actine. Comme nous l'avons déjà décrit, la dystrophine dans le muscle va faire la liaison entre le cytosquelette d'actine et la matrice extracellulaire et ainsi maintenir l'intégrité cellulaire durant les mouvements. Si la Dp71 occupait une telle fonction dans le cristallin, son absence pourrait être à l'origine d'une perte de l'intégrité de la membrane des fibres cristalliniennes durant les mouvements liés à l'accommodation, induisant par conséquent la dégénérescence progressive de ces fibres.

Comme nous l'avons décrit précédemment, les dystrophines interagissent directement avec les protéines du cytosquelette de la cellule. Sandilands et coll. ont montré que la perturbation des filaments intermédiaires spécifiques du cristallin, les filaments en chaîne de perles (ou CP49), a pour conséquence une déstabilisation du cytosquelette d'actine des fibres cristalliniennes et une diminution des qualités optiques du cristallin, mais pas l'apparition d'une cataracte {Sandilands, 2003 #332}. Ceci suggère que la cataracte observée chez les souris Ko-Dp71 ne proviendrait que partiellement d'une

déstabilisation du cytosquelette, ou bien que la déstabilisation induite par la Dp71 serait plus importante que celle liée à l'absence de CP49. Par exemple, il a été montré que l'inactivation de la molécule d'adhésion NrCAM entraîne l'apparition d'une cataracte liée à des irrégularités des filaments d'actine et notamment la formation d'agrégats {More, 2001 #333}. Dans le cas de la Dp71, on peut envisager que son absence aurait plusieurs conséquences parmi lesquelles une perturbation du cytosquelette, notamment l'actine, mais surtout une déstabilisation de la liaison de ce dernier avec la matrice extracellulaire qui mènerait à la dégénérescence des fibres cristalliniennes et l'apparition progressive d'une cataracte.

Comme nous l'avons déjà dit, le rôle majeur du cristallin est un rôle passif : laisser passer la lumière. Pour ce faire, il possède des caractéristiques particulières qui lui procurent un indice de réfraction élevé et donc une très grande transparence. En effet, il est composé presque uniquement d'eau (70%) et de protéines (30%). De plus ces cellules communiquent entre elles par des jonctions de faible résistance, leur conférant un fonctionnement de type syncytium. Ce fonctionnement nécessite une organisation cellulaire mais également intracellulaire rigoureuse dans laquelle la Dp71 pourrait également intervenir. En effet, comme nous l'avons vu dans la rétine et dans le muscle, les dystrophines, et notamment la Dp71, interviennent dans la localisation et l'agrégation de nombreuses protéines, qu'elles soient membranaires comme les canaux ioniques ou aqueux, ou cytoplasmiques comme les protéines de signalisation. Pour ce faire, les dystrophines, dans tous les tissus où elles ont été retrouvées, participent à des échafaudages macromoléculaires. Nous avons montré que l'un des composants de ce complexe, le β -dystroglycane est également présent dans le cristallin, et possède une localisation similaire à la Dp71. Un autre composant du complexe a également été rapporté dans le cristallin : les dystrobrévines {Ueda, 2000 #334}. Il est donc probable que la Dp71 participe également à un complexe macromoléculaire dans le cristallin dont le rôle exact reste encore à définir. L'une des protéines majeures dans les interactions cellulaires du cristallin est la protéine MIP (Major Intrinsic Protein) ou AQP0. Cette protéine, qui est la protéine majoritaire de la membrane des fibres secondaires du

cristallin, est notamment responsable des transports aqueux qui semblent couplés à la circulation de divers électrolytes {Mathias, 1997 #336; Varadaraj, 1999 #335}. Nous avons montré que la Dp71 est responsable de la localisation d'un autre canal aqueux dans la rétine, l'AQP4. Dans le cas du cristallin, nous avons mis en évidence que l'AQP0 colocalise avec la Dp71. Enfin, il a été montré par le groupe de Shiels et coll. que l'absence de l'AQP0 entraîne l'apparition d'une cataracte {Shiels, 2001 #242}. L'ensemble de ces résultats suggère fortement que la Dp71 pourrait interagir avec cette protéine dans la membrane des fibres secondaires du cristallin.

VI Perspectives

La conclusion principale qui ressort de nos travaux est que, malgré que la Dp71 ne soit pas directement responsable du phénotype ERG, elle occupe un rôle prépondérant dans la vision. Elle est non seulement importante dans la rétine, mais également dans le cristallin où les dystrophines n'avaient jamais été rapportées. En plus d'être présente dans plusieurs structures de l'œil, elle pourrait intervenir à la fois dans le maintien de l'intégrité de la membrane des cellules dans lesquelles elle est exprimée, mais également dans la localisation et l'agrégation de canaux ioniques ou aqueux. Enfin, comme la dystrophine dans le muscle, la Dp71 occupe ces fonctions par l'intermédiaire d'un échafaudage moléculaire dont la composition est maintenant suffisamment bien définie dans la rétine mais dont les mécanismes moléculaires responsables de l'agrégations restent encore inconnus.

1) Mécanismes moléculaires de l'agrégation du complexe Dp71/DAPs responsables de la localisation des canaux Kir4.1 et AQP4

Une fois la composition du complexe bien établie, à l'aide des différentes techniques de co-immunoprécipitation, il serait important de déterminer quels sont les mécanismes et cascades moléculaires qui permettent la mise en place de ce complexe. En effet si l'on veut avoir un moyen d'agir sur leur restauration quand ils sont déstabilisés comme chez les patients DMD ou les modèles animaux, il est nécessaire de connaître la séquence d'événements qui conduit normalement à leur mise en place. L'étude de ces mécanismes pourrait se faire à l'aide de CGM en culture, de souris sauvage et Ko-Dp71, en présence de différentes matrices et facteurs trophiques. Le suivi de l'expression des différents composants du complexe, en particulier les canaux Kir4.1 et AQP4, pourrait nous fournir des informations sur les effets de ces facteurs environnementaux. En effet, il a été montré que le canal Kir4.1, qui n'est plus exprimé par les CGM en culture, peut voir son

expression et son agrégation restaurées en fonction des conditions de culture : présence de laminine et d'insuline {Ishii, 1997 #305}. Il serait alors intéressant de rechercher les voies intracellulaires mises en jeu dans ces mécanismes, en étudiant l'activation de celles-ci en fonction des facteurs environnementaux. Il serait surtout nécessaire de déterminer à quel niveau intervient la Dp71 dans ce processus. Il a notamment été montré que l'une des protéines participant à la transduction des signaux liés aux récepteurs à l'insuline, la Grb2, est exprimé par les CGM. Cependant aucune interaction n'a jusqu'ici été montrée entre cette protéine et le complexe Dp71/DAPs {Claudepierre, 2000 #24; Skolnik, 1993 #337}. Si cette hypothèse était vérifiée, il serait alors intéressant d'approfondir les recherches concernant les différents composants de la voie de signalisation de l'insuline, et de vérifier si l'absence de Dp71 pourrait avoir des conséquences sur leur expression.

Il est aussi important de mieux comprendre les mécanismes qui sous-tendent l'hypersensibilité des neurones rétiniens à l'ischémie en absence de Dp71. Pour ceci, l'étude des courants aqueux dans les CGM exprimant ou non la Dp71 serait également essentiel. Il existe des techniques utilisant des sondes fluorescentes sensibles aux changements de concentrations à proximité de la membrane, permettant de déterminer la perméabilité membranaire des cellules, qui donneraient des indications sur leur degré d'intervention possible.

2) Le complexe utrophine/DAPs dans la CGM

Nous avons confirmé dans la rétine de souris, ce qui avait été précédemment décrit dans la rétine de rat {Claudepierre, 2000 #25}, à savoir que l'utrophine est exprimée par les CGM. Contrairement à la Dp71, aucun travaux n'a jamais été mené afin de déterminer la composition et la fonction du complexe lié à l'utrophine. L'utilisation de techniques similaires à celles utilisées pour caractériser le complexe lié à la Dp71, pourrait, dans un premier temps, permettre de définir la composition du complexe utrophine/DAPs. De plus cette approche pourrait nous permettre de mettre en évidence des ligands potentiels de ce complexe utrophine/DAPs ce qui nous donnerait des indications sur sa fonction. Contrairement à celle de la Dp71, la localisation de l'utrophine semble plus diffuse dans la

CGM. Il serait donc intéressant d'étudier des protéines présentant une localisation relativement similaire, tel que le transporteur du glutamate GLAST. Cette protéine est en effet présente dans les prolongements internes des CGM entre le pied et le soma, mais pas dans les pieds eux-mêmes. L'utilisation des souches de souris Ko-utrophine permettrait d'étudier le devenir de ces protéines candidates lorsque l'utrophine est absente, mais aussi d'en découvrir d'autres.

Lorsque nous avons étudié la rétine de souris Ko-Dp71, nous avons mis en évidence une augmentation de l'expression de la Dp140 mais surtout de l'utrophine. Il serait intéressant de comparer la composition des complexes associés à l'utrophine en présence et en absence de Dp71. Il serait notamment important d'étudier si ce complexe est capable d'interagir ou non avec les deux canaux Kir4.1 et AQP4 dans les deux conditions. En effet, il est possible que le canal Kir4.1, et pas l'AQP4, soit maintenu à la membrane par l'utrophine en absence de Dp71, ce qui expliquerait que seule l'expression de l'AQP4 soit réduite. Dans le cas contraire, il serait important d'effectuer un travail portant sur la demi-vie de ces deux protéines afin de découvrir si cette variation de l'expression de l'AQP4 est due à une déstabilisation de la protéine ou à une régulation négative de sa synthèse.

En outre, l'étude comparative par protéomique des protéines liées à l'utrophine en présence et en absence de Dp71 pourrait nous permettre de déterminer le rôle des mécanismes de compensation moléculaire mis en jeu dans les CGM en nous donnant des informations sur leurs cibles. Il serait également intéressant d'étudier les conséquences de l'absence concomitante de la Dp71 et de l'utrophine, en particulier dans les CGM, en croisant les deux souches de souris transgéniques.

3) Fonctions des sarcoglycanes dans la rétine

Pour la première fois, nous avons mis en évidence une indépendance du complexe SG/SSPN par rapport aux dystrophines. Il est maintenant nécessaire de déterminer si ces protéines agissent « seules » ou si elles participent à un complexe mettant en jeu une ou

plusieurs autre(s) protéine(s) de la superfamille des dystrophines. Quoiqu'il en soit, des expériences concernant leur mode d'action sont nécessaires afin d'appréhender leur fonction aussi bien dans les membranes limitantes formées par les CGM que dans les fibres nerveuses formées par les axones des cellules ganglionnaires. Le sarcospan étant une protéine à quatre domaines transmembranaires, il serait intéressant de déterminer s'il est capable d'interagir avec la matrice extracellulaire, et en particulier la laminine. Il faudrait alors étudier quel pourrait être le rôle exact de l'interaction du complexe SG/SSPN avec la laminine dans la mise en place des membranes limitantes et dans l'organisation des fibres nerveuses.

4) Le complexe Dp71/DAPs dans le cristallin

Bien que nous ayons montré que la Dp71 est essentielle au maintien de la transparence du cristallin, la nature de son intervention reste à définir. Pour ce faire, nous devons tout d'abord définir la composition du complexe auquel elle participe afin d'en déterminer les ligands. L'AQP0 est une protéine transmembranaire de la famille des aquaporines, comme l'AQP4, exprimée par les fibres secondaires du cristallin {Froger, 1998 #338}. De plus, il a été montré que l'absence de l'AQP0 induit l'apparition d'une cataracte {Shiels, 2001 #242}. L'ensemble de ces données en font un ligand potentiel. Une approche biochimique par co-immunoprécipitation nous permettrait de vérifier si cette protéine participe ou non au complexe associé à la Dp71.

L'étude de la composition protéique du cristallin, en particulier le cortex, en présence ou absence de Dp71, pourrait nous apporter des informations essentielles sur les perturbations induites par l'absence de cette dernière, et qui conduisent à l'apparition de la cataracte. Ceci pourrait être fait par analyse protéomique après séparation des protéines sur gels bidimensionnels.

Si la Dp71 est impliquée dans la multiplication et la mise en place des nouvelles fibres cristalliniennes, il serait intéressant d'étudier si son absence a un impact sur la vitesse de divisions mais surtout de différenciation des cellules du cristallin.

5) Fonction de la Dp260 et de la Dp140 dans le cristallin

Nous avons montré que comme la Dp71, la Dp260 et la Dp140 sont également exprimées dans le cristallin. Il serait important d'établir une cartographie de l'expression de ces protéines dans le cristallin afin d'en étudier leur rôle dans ce tissu. La cartographie respective de ces deux protéines sera plus difficile étant donné leur plus faible expression et l'absence d'anticorps spécifique de chacun des produits. Cependant, le même type d'approches biochimiques que celles précédemment citées nous donneraient des informations importantes sur les protéines avec lesquelles elles interagissent.

Certaines données semblent suggérer que ces deux produits du gène DMD pourraient être principalement exprimées par les cellules épithéliales, notamment dans la zone germinative. L'étude de leur vitesse de division chez la souris *mdx3cv* pourrait donner des indications sur l'influence de la Dp260 et la Dp140 dans ce domaine.

6) Fonctions des dystrophines dans le cristallin chez l'homme

A l'heure actuelle, un seul rapport a été fait concernant la présence d'une cataracte chez les patients DMD [Mirabella, 1998 #339]. Il serait très intéressant de pouvoir mener une étude épidémiologique sur la présence et le type de cataracte chez les patients DMD et de la corrélérer à la localisation de la mutation. Ceci nous permettrait de déterminer le niveau d'action ainsi que l'importance de chacun des produits du gène DMD dans le cristallin.

VII Bibliographie

-A-

Adams, M. E., Butler, M. H., Dwyer, T. M., Peters, M. F., Murnane, A. A., and Froehner, S. C. (1993). Two forms of mouse syntrophin, a 58 kd dystrophin-associated protein, differ in primary structure and tissue distribution. *Neuron* *11*, 531-540.

Adams, M. E., Kramarcy, N., Krall, S. P., Rossi, S. G., Rotundo, R. L., Sealock, R., and Froehner, S. C. (2000). Absence of alpha-syntrophin leads to structurally aberrant neuromuscular synapses deficient in utrophin. *J Cell Biol* *150*, 1385-1398.

Agardh, E., Bruun, A., Ehinger, B., and Storm-Mathisen, J. (1986). GABA immunoreactivity in the retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* *27*, 674-678.

Ahn, A. H., Freener, C. A., Gussoni, E., Yoshida, M., Ozawa, E., and Kunkel, L. M. (1996). The three human syntrophin genes are expressed in diverse tissues, have distinct chromosomal locations, and each bind to dystrophin and its relatives. *J Biol Chem* *271*, 2724-2730.

Ahn, A. H., and Kunkel, L. M. (1993). The structural and functional diversity of dystrophin. *Nat Genet* *3*, 283-291.

Ahn, A. H., Yoshida, M., Anderson, M. S., Feener, C. A., Selig, S., Hagiwara, Y., Ozawa, E., and Kunkel, L. M. (1994). Cloning of human basic A1, a distinct 59-kDa dystrophin-associated protein encoded on chromosome 8q23-24. *Proc Natl Acad Sci U S A* *91*, 4446-4450.

Aleman, V., Osorio, B., Chavez, O., Rendon, A., Mornet, D., and Martinez, D. (2001). Subcellular localization of Dp71 dystrophin isoforms in cultured hippocampal neurons and forebrain astrocytes. *Histochem Cell Biol* *115*, 243-254.

Amiry-Moghaddam, M., Williamson, A., Palomba, M., Eid, T., de Lanerolle, N. C., Nagelhus, E. A., Adams, M. E., Froehner, S. C., Agre, P., and Ottersen, O. P. (2003). Delayed K⁺ clearance associated with aquaporin-4 mislocalization: phenotypic defects in brains of alpha-syntrophin-null mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* *100*, 13615-13620.

Andre, B., and Springael, J. Y. (1994). WWP, a new amino acid motif present in single or multiple copies in various proteins including dystrophin and the SH3-binding Yes-associated protein YAP65. *Biochem Biophys Res Commun* *205*, 1201-1205.

Arahata, K., Ishiura, S., Ishiguro, T., Tsukahara, T., Suhara, Y., Eguchi, C., Ishihara, T., Nonaka, I., Ozawa, E., and Sugita, H. (1988). Immunostaining of skeletal and cardiac muscle surface membrane with antibody against Duchenne muscular dystrophy peptide. *Nature* *333*, 861-863.

Attwell, D., Barbour, B., and Szatkowski, M. (1993). Nonvesicular release of neurotransmitter. *Neuron* *11*, 401-407.

Austin, R. C., Fox, J. E., Werstuck, G. H., Stafford, A. R., Bulman, D. E., Dally, G. Y., Ackerley, C. A., Weitz, J. I., and Ray, P. N. (2002). Identification of Dp71 isoforms in the platelet membrane cytoskeleton. Potential role in thrombin-mediated platelet adhesion. *J Biol Chem* 277, 47106-47113.

Austin, R. C., Howard, P. L., D'Souza, V. N., Klamut, H. J., and Ray, P. N. (1995). Cloning and characterization of alternatively spliced isoforms of Dp71. *Hum Mol Genet* 4, 1475-1483.

Austin, R. C., Morris, G. E., Howard, P. L., Klamut, H. J., and Ray, P. N. (2000). Expression and synthesis of alternatively spliced variants of Dp71 in adult human brain. *Neuromuscul Disord* 10, 187-193.

-B-

Babizhayev, M. A., Nikolayev, G. M., Goryachev, S. N., Bours, J., and Martin, R. (2003). Hydration properties of the molecular chaperone alpha-crystallin in the bovine lens. *Biochemistry (Mosc)* 68, 1145-1155.

Banerjee, S. A., Hadjiargyrou, M., and Patterson, P. H. (1997). An antibody to the tetraspan membrane protein CD9 promotes neurite formation in a partially alpha3beta1 integrin-dependent manner. *J Neurosci* 17, 2756-2765.

Bar, S., Barnea, E., Levy, Z., Neuman, S., Yaffe, D., and Nudel, U. (1990). A novel product of the Duchenne muscular dystrophy gene which greatly differs from the known isoforms in its structure and tissue distribution. *Biochem J* 272, 557-560.

Barnea, E., Zuk, D., Simantov, R., Nudel, U., and Yaffe, D. (1990). Specificity of expression of the muscle and brain dystrophin gene promoters in muscle and brain cells. *Neuron* 5, 881-888.

Bassnett, S., and Beebe, D. C. (1992). Coincident loss of mitochondria and nuclei during lens fiber cell differentiation. *Dev Dyn* 194, 85-93.

Bassnett, S., and Mataic, D. (1997). Chromatin degradation in differentiating fiber cells of the eye lens. *J Cell Biol* 137, 37-49.

Bies, R. D., Caskey, C. T., and Fenwick, R. (1992). An intact cysteine-rich domain is required for dystrophin function. *J Clin Invest* 90, 666-672.

Billard, C., Gillet, P., Barthez, M., Hommet, C., and Bertrand, P. (1998). Reading ability and processing in Duchenne muscular dystrophy and spinal muscular atrophy. *Dev Med Child Neurol* 40, 12-20.

Billard, C., Gillet, P., Signoret, J. L., Uicaut, E., Bertrand, P., Fardeau, M., Barthez-Carpentier, M. A., and Santini, J. J. (1992). Cognitive functions in Duchenne muscular dystrophy: a reappraisal and comparison with spinal muscular atrophy. *Neuromuscul Disord* 2, 371-378.

Blake, D. J., Hawkes, R., Benson, M. A., and Beesley, P. W. (1999). Different dystrophin-like complexes are expressed in neurons and glia. *J Cell Biol* 147, 645-658.

- Blake, D. J., Nawrotzki, R., Loh, N. Y., Gorecki, D. C., and Davies, K. E. (1998). beta-dystrobrevin, a member of the dystrophin-related protein family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 241-246.
- Blake, D. J., Schofield, J. N., Zuellig, R. A., Gorecki, D. C., Phelps, S. R., Barnard, E. A., Edwards, Y. H., and Davies, K. E. (1995). G-utrophin, the autosomal homologue of dystrophin Dp116, is expressed in sensory ganglia and brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 3697-3701.
- Blake, D. J., Weir, A., Newey, S. E., and Davies, K. E. (2002). Function and genetics of dystrophin and dystrophin-related proteins in muscle. *Physiol Rev* 82, 291-329.
- Blank, M., Koulen, P., Blake, D. J., and Kroger, S. (1999). Dystrophin and beta-dystroglycan in photoreceptor terminals from normal and mdx3Cv mouse retinae. *Eur J Neurosci* 11, 2121-2133.
- Blottner, D., and Luck, G. (2001). Just in time and place: NOS/NO system assembly in neuromuscular junction formation. *Microsc Res Tech* 55, 171-180.
- Bonet-Kerrache, A., Fabbriozio, E., and Mornet, D. (1994). N-terminal domain of dystrophin. *FEBS Lett* 355, 49-53.
- Bonilla, E., Samitt, C. E., Miranda, A. F., Hays, A. P., Salviati, G., DiMauro, S., Kunkel, L. M., Hoffman, E. P., and Rowland, L. P. (1988). Duchenne muscular dystrophy: deficiency of dystrophin at the muscle cell surface. *Cell* 54, 447-452.
- Bork, P., and Sudol, M. (1994). The WW domain: a signalling site in dystrophin? *Trends Biochem Sci* 19, 531-533.
- Boyce, F. M., Beggs, A. H., Feener, C., and Kunkel, L. M. (1991). Dystrophin is transcribed in brain from a distant upstream promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 1276-1280.
- Boycott, B. B., and Dowling, J. E. (1969). Organization of the primate retina: light microscopy. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 255, 109-184.
- Boycott, B. B., and Wassle, H. (1991). Morphological Classification of Bipolar Cells of the Primate Retina. *Eur J Neurosci* 3, 1069-1088.
- Brandstatter, J. H., Koulen, P., and Wassle, H. (1997). Selective synaptic distribution of kainate receptor subunits in the two plexiform layers of the rat retina. *J Neurosci* 17, 9298-9307.
- Brandstatter, R., and Hermann, A. (1996). gamma-Aminobutyric acid enhances the light response of ganglion cells in the trout pineal organ. *Neurosci Lett* 210, 173-176.
- Brecha, N. C., Oyster, C. W., and Takahashi, E. S. (1984). Identification and characterization of tyrosine hydroxylase immunoreactive amacrine cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 25, 66-70.
- Brenman, J. E., Chao, D. S., Gee, S. H., McGee, A. W., Craven, S. E., Santillano, D. R., Wu, Z., Huang, F., Xia, H., Peters, M. F., *et al.* (1996). Interaction of nitric oxide synthase with the

postsynaptic density protein PSD-95 and alpha1-syntrophin mediated by PDZ domains. *Cell* 84, 757-767.

Brenman, J. E., Chao, D. S., Xia, H., Aldape, K., and Bredt, D. S. (1995). Nitric oxide synthase complexed with dystrophin and absent from skeletal muscle sarcolemma in Duchenne muscular dystrophy. *Cell* 82, 743-752.

Bresolin, N., Castelli, E., Comi, G. P., Felisari, G., Bardoni, A., Perani, D., Grassi, F., Turconi, A., Mazzucchelli, F., Gallotti, D., and et al. (1994). Cognitive impairment in Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord* 4, 359-369.

Brunig, I., Suter, A., Knuesel, I., Luscher, B., and Fritschy, J. M. (2002). GABAergic terminals are required for postsynaptic clustering of dystrophin but not of GABA(A) receptors and gephyrin. *J Neurosci* 22, 4805-4813.

Bruun, A., and Ehinger, B. (1974). Uptake of certain possible neurotransmitters into retinal neurons of some mammals. *Exp Eye Res* 19, 435-447.

Burris, C., Klug, K., Ngo, I. T., Sterling, P., and Schein, S. (2002). How Muller glial cells in macaque fovea coat and isolate the synaptic terminals of cone photoreceptors. *J Comp Neurol* 453, 100-111.

Burton, E. A., Tinsley, J. M., Holzfeind, P. J., Rodrigues, N. R., and Davies, K. E. (1999). A second promoter provides an alternative target for therapeutic up-regulation of utrophin in Duchenne muscular dystrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 14025-14030.

Byers, T. J., Kunkel, L. M., and Watkins, S. C. (1991). The subcellular distribution of dystrophin in mouse skeletal, cardiac, and smooth muscle. *J Cell Biol* 115, 411-421.

Byers, T. J., Lidov, H. G., and Kunkel, L. M. (1993). An alternative dystrophin transcript specific to peripheral nerve. *Nat Genet* 4, 77-81.

-C-

Calamita, G., Mazzone, A., Bizzoca, A., and Svelto, M. (2001). Possible involvement of aquaporin-7 and -8 in rat testis development and spermatogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 288, 619-625.

Campbell, K. P. (1995). Three muscular dystrophies: loss of cytoskeleton-extracellular matrix linkage. *Cell* 80, 675-679.

Carlson, C. G. (1998). The dystrophinopathies: an alternative to the structural hypothesis. *Neurobiol Dis* 5, 3-15.

Carpenter, S., Karpati, G., Zubrzycka-Gaarn, E., Bulman, D. E., Ray, P. N., and Worton, R. G. (1990). Dystrophin is localized to the plasma membrane of human skeletal muscle fibers by electron-microscopic cytochemical study. *Muscle Nerve* 13, 376-380.

Cater, H. L., Benham, C. D., and Sundstrom, L. E. (2001). Neuroprotective role of monocarboxylate transport during glucose deprivation in slice cultures of rat hippocampus. *J Physiol* 531, 459-466.

Chang, W. J., Iannaccone, S. T., Lau, K. S., Masters, B. S., McCabe, T. J., McMillan, K., Padre, R. C., Spencer, M. J., Tidball, J. G., and Stull, J. T. (1996). Neuronal nitric oxide synthase and dystrophin-deficient muscular dystrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 9142-9147.

Chelly, J., Kaplan, J. C., Maire, P., Gautron, S., and Kahn, A. (1988). Transcription of the dystrophin gene in human muscle and non-muscle tissue. *Nature* 333, 858-860.

Choi, D. W. (1988). Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron* 1, 623-634.

Choi, I. Y., Seaquist, E. R., and Gruetter, R. (2003). Effect of hypoglycemia on brain glycogen metabolism in vivo. *J Neurosci Res* 72, 25-32.

Chung, W., and Campanelli, J. T. (1999). WW and EF hand domains of dystrophin-family proteins mediate dystroglycan binding. *Mol Cell Biol Res Commun* 2, 162-171.

Cibis, G. W., Fitzgerald, K. M., Harris, D. J., Rothberg, P. G., and Rupani, M. (1993). The effects of dystrophin gene mutations on the ERG in mice and humans. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 34, 3646-3652.

Claudepierre, T., Dalloz, C., Mornet, D., Matsumura, K., Sahel, J., and Rendon, A. (2000). Characterization of the intermolecular associations of the dystrophin-associated glycoprotein complex in retinal Muller glial cells. *J Cell Sci* 113 Pt 19, 3409-3417.

Claudepierre, T., Mornet, D., Pannicke, T., Forster, V., Dalloz, C., Bolanos, F., Sahel, J., Reichenbach, A., and Rendon, A. (2000). Expression of Dp71 in Muller glial cells: a comparison with utrophin- and dystrophin-associated proteins. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41, 294-304.

Claudepierre, T., Rodius, F., Frasson, M., Fontaine, V., Picaud, S., Dreyfus, H., Mornet, D., and Rendon, A. (1999). Differential distribution of dystrophins in rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40, 1520-1529.

Cogan, D. G. (1951). Applied anatomy and physiology of the cornea. *Trans Am Acad Ophthalmol Otolaryngol* 52, 329-359.

Connors, N. C., Adams, M. E., Froehner, S. C., and Kofuji, P. (2004). The potassium channel Kir4.1 associates with the dystrophin-glycoprotein complex via alpha-syntrophin in glia. *J Biol Chem* 279, 28387-28392.

Cox, G. A., Phelps, S. F., Chapman, V. M., and Chamberlain, J. S. (1993). New mdx mutation disrupts expression of muscle and nonmuscle isoforms of dystrophin. *Nat Genet* 4, 87-93.

Cueva, J. G., Haverkamp, S., Reimer, R. J., Edwards, R., Wassle, H., and Brecha, N. C. (2002). Vesicular gamma-aminobutyric acid transporter expression in amacrine and horizontal cells. *J Comp Neurol* 445, 227-237.

Culligan, K., Glover, L., Dowling, P., and Ohlendieck, K. (2001). Brain dystrophin-glycoprotein complex: persistent expression of beta-dystroglycan, impaired oligomerization of Dp71 and up-regulation of utrophins in animal models of muscular dystrophy. *BMC Cell Biol* 2, 2.

-D-

D'Souza, V. N., Nguyen, T. M., Morris, G. E., Karges, W., Pillers, D. A., and Ray, P. N. (1995). A novel dystrophin isoform is required for normal retinal electrophysiology. *Hum Mol Genet* 4, 837-842.

Da, T., and Verkman, A. S. (2004). Aquaporin-4 gene disruption in mice protects against impaired retinal function and cell death after ischemia. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45, 4477-4483.

Dalloz, C., Claudepierre, T., Rodius, F., Mornet, D., Sahel, J., and Rendon, A. (2001). Differential distribution of the members of the dystrophin glycoprotein complex in mouse retina: effect of the mdx(3Cv) mutation. *Mol Cell Neurosci* 17, 908-920.

Dalloz, C., Sarig, R., Fort, P., Yaffe, D., Bordais, A., Pannicke, T., Grosche, J., Mornet, D., Reichenbach, A., Sahel, J., *et al.* (2003). Targeted inactivation of dystrophin gene product Dp71: phenotypic impact in mouse retina. *Hum Mol Genet* 12, 1543-1554.

Darszon, A., Labarca, P., Nishigaki, T., and Espinosa, F. (1999). Ion channels in sperm physiology. *Physiol Rev* 79, 481-510.

Davison, M. D., and Critchley, D. R. (1988). alpha-Actinins and the DMD protein contain spectrin-like repeats. *Cell* 52, 159-160.

De Becker, I., Riddell, D. C., Dooley, J. M., and Tremblay, F. (1994). Correlation between electroretinogram findings and molecular analysis in the Duchenne muscular dystrophy phenotype. *Br J Ophthalmol* 78, 719-722.

Debernardi, R., Pierre, K., Lengacher, S., Magistretti, P. J., and Pellerin, L. (2003). Cell-specific expression pattern of monocarboxylate transporters in astrocytes and neurons observed in different mouse brain cortical cell cultures. *J Neurosci Res* 73, 141-155.

Derouiche, A. (1996). Possible role of the Muller cell in uptake and metabolism of glutamate in the mammalian outer retina. *Vision Res* 36, 3875-3878.

Dixon, A. K., Tait, T. M., Campbell, E. A., Bobrow, M., Roberts, R. G., and Freeman, T. C. (1997). Expression of the dystrophin-related protein 2 (Drp2) transcript in the mouse. *J Mol Biol* 270, 551-558.

Dodson, H. C., Piper, T. A., Clarke, J. D., Quinlivan, R. M., and Dickson, G. (1995). Dystrophin expression in the hair cells of the cochlea. *J Neurocytol* 24, 625-632.

Dowling, J. E. (1987). *The Retina: an Approachable Part of the Brain*. Cambridge: Belknap.

Dowling, P., Lohan, J., and Ohlendieck, K. (2003). Comparative analysis of Dp427-deficient mdx tissues shows that the milder dystrophic phenotype of extraocular and toe muscle fibres is associated with a persistent expression of beta-dystroglycan. *Eur J Cell Biol* 82, 222-230.

Durbeej, M., Jung, D., Hjalt, T., Campbell, K. P., and Ekblom, P. (1997). Transient expression of Dp140, a product of the Duchenne muscular dystrophy locus, during kidney tubulogenesis. *Dev Biol* 181, 156-167.

-E-

Earnest, J. P., Santos, G. F., Zuerbig, S., and Fox, J. E. (1995). Dystrophin-related protein in the platelet membrane skeleton. Integrin-induced change in detergent-insolubility and cleavage by calpain in aggregating platelets. *J Biol Chem* 270, 27259-27265.

Ehinger, B., and Falck, B. (1971). Autoradiography of some suspected neurotransmitter substances: GABA glycine, glutamic acid, histamine, dopamine, and L-dopa. *Brain Res* 33, 157-172.

Ervasti, J. M., and Campbell, K. P. (1993). A role for the dystrophin-glycoprotein complex as a transmembrane linker between laminin and actin. *J Cell Biol* 122, 809-823.

Ettinger, A. J., Feng, G., and Sanes, J. R. (1997). epsilon-Sarcoglycan, a broadly expressed homologue of the gene mutated in limb-girdle muscular dystrophy 2D. *J Biol Chem* 272, 32534-32538.

Euler, T., Schneider, H., and Wassle, H. (1996). Glutamate responses of bipolar cells in a slice preparation of the rat retina. *J Neurosci* 16, 2934-2944.

Euler, T., and Wassle, H. (1995). Immunocytochemical identification of cone bipolar cells in the rat retina. *J Comp Neurol* 361, 461-478.

-F-

Famiglietti, E. V., Jr. (1981). Functional architecture of cone bipolar cells in mammalian retina. *Vision Res* 21, 1559-1563.

Felix, R., Serrano, C. J., Trevino, C. L., Munoz-Garay, C., Bravo, A., Navarro, A., Pacheco, J., Tsutsumi, V., and Darszon, A. (2002). Identification of distinct K⁺ channels in mouse spermatogenic cells and sperm. *Zygote* 10, 183-188.

Finn, D. M., and Ohlendieck, K. (1997). Rabbit brain and muscle isoforms containing the carboxy-terminal domain of 427 kDa skeletal muscle dystrophin exhibit similar biochemical properties. *Neurosci Lett* 222, 25-28.

Fischbarg, J., Diecke, F. P., Kuang, K., Yu, B., Kang, F., Iserovich, P., Li, Y., Rosskothan, H., and Koniarek, J. P. (1999). Transport of fluid by lens epithelium. *Am J Physiol* 276, C548-557.

Fitzgerald, K. M., Cibis, G. W., Gettel, A. H., Rinaldi, R., Harris, D. J., and White, R. A. (1999). ERG phenotype of a dystrophin mutation in heterozygous female carriers of Duchenne muscular dystrophy. *J Med Genet* 36, 316-322.

Florence, J. M., Fox, P. T., Planer, G. J., and Brooke, M. H. (1985). Activity, creatine kinase, and myoglobin in Duchenne muscular dystrophy: a clue to etiology? *Neurology* 35, 758-761.

Forst, J., Forst, R., Leithe, H., and Maurin, N. (1998). Platelet function deficiency in Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord* 8, 46-49.

Fox, J. E., Lipfert, L., Clark, E. A., Reynolds, C. C., Austin, C. D., and Brugge, J. S. (1993). On the role of the platelet membrane skeleton in mediating signal transduction. Association of GP IIb-IIIa, pp60c-src, pp62c-yes, and the p21ras GTPase-activating protein with the membrane skeleton. *J Biol Chem* 268, 25973-25984.

Fox, J. E., Taylor, R. G., Taffarel, M., Boyles, J. K., and Goll, D. E. (1993). Evidence that activation of platelet calpain is induced as a consequence of binding of adhesive ligand to the integrin, glycoprotein IIb-IIIa. *J Cell Biol* 120, 1501-1507.

Freeman, H. M. (1969). The lens and vitreous. *Arch Ophthalmol* 82, 551-566.

Frigeri, A., Gropper, M. A., Turck, C. W., and Verkman, A. S. (1995). Immunolocalization of the mercurial-insensitive water channel and glycerol intrinsic protein in epithelial cell plasma membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 4328-4331.

Froger, A., Tallur, B., Thomas, D., and Delamarche, C. (1998). Prediction of functional residues in water channels and related proteins. *Protein Sci* 7, 1458-1468.

-G-

Gao, J., Sun, X., Martinez-Wittinghan, F. J., Gong, X., White, T. W., and Mathias, R. T. (2004). Connections between connexins, calcium, and cataracts in the lens. *J Gen Physiol* 124, 289-300.

Gardner, T. W. (1995). Histamine, ZO-1 and increased blood-retinal barrier permeability in diabetic retinopathy. *Trans Am Ophthalmol Soc* 93, 583-621.

Gee, S. H., Madhavan, R., Levinson, S. R., Caldwell, J. H., Sealock, R., and Froehner, S. C. (1998). Interaction of muscle and brain sodium channels with multiple members of the syntrophin family of dystrophin-associated proteins. *J Neurosci* 18, 128-137.

Germer, A., Biedermann, B., Wolburg, H., Schuck, J., Grosche, J., Kuhrt, H., Reichelt, W., Schousboe, A., Paasche, G., Mack, A. F., and Reichenbach, A. (1998). Distribution of mitochondria within Muller cells--I. Correlation with retinal vascularization in different mammalian species. *J Neurocytol* 27, 329-345.

Germer, A., Schuck, J., Wolburg, H., Kuhrt, H., Mack, A. F., and Reichenbach, A. (1998). Distribution of mitochondria within Muller cells--II. Post-natal development of the rabbit retinal periphery in vivo and in vitro: dependence on oxygen supply. *J Neurocytol* 27, 347-359.

Ghosh, K. K., Bujan, S., Haverkamp, S., Feigenspan, A., and Wassle, H. (2004). Types of bipolar cells in the mouse retina. *J Comp Neurol* 469, 70-82.

Gleason, E., Borges, S., and Wilson, M. (1994). Control of transmitter release from retinal amacrine cells by Ca²⁺ influx and efflux. *Neuron* 13, 1109-1117.

Gonzalez, E., Montanez, C., Ray, P. N., Howard, P. L., Garcia-Sierra, F., Mornet, D., and Cisneros, B. (2000). Alternative splicing regulates the nuclear or cytoplasmic localization of dystrophin Dp71. *FEBS Lett* 482, 209-214.

Gorecki, D. C., Lukasiuk, K., Szklarczyk, A., and Kaczmarek, L. (1998). Kainate-evoked changes in dystrophin messenger RNA levels in the rat hippocampus. *Neuroscience* 84, 467-477.

Gorecki, D. C., Monaco, A. P., Derry, J. M., Walker, A. P., Barnard, E. A., and Barnard, P. J. (1992). Expression of four alternative dystrophin transcripts in brain regions regulated by different promoters. *Hum Mol Genet* 1, 505-510.

Grady, R. M., Grange, R. W., Lau, K. S., Maimone, M. M., Nichol, M. C., Stull, J. T., and Sanes, J. R. (1999). Role for alpha-dystrobrevin in the pathogenesis of dystrophin-dependent muscular dystrophies. *Nat Cell Biol* 1, 215-220.

Grady, R. M., Zhou, H., Cunningham, J. M., Henry, M. D., Campbell, K. P., and Sanes, J. R. (2000). Maturation and maintenance of the neuromuscular synapse: genetic evidence for roles of the dystrophin--glycoprotein complex. *Neuron* 25, 279-293.

Greenberg, D. S., Schatz, Y., Levy, Z., Pizzo, P., Yaffe, D., and Nudel, U. (1996). Reduced levels of dystrophin associated proteins in the brains of mice deficient for Dp71. *Hum Mol Genet* 5, 1299-1303.

Guadagno, E., and Moukhles, H. (2004). Laminin-induced aggregation of the inwardly rectifying potassium channel, Kir4.1, and the water-permeable channel, AQP4, via a dystroglycan-containing complex in astrocytes. *Glia* 47, 138-149.

-H-

Hack, A. A., Groh, M. E., and McNally, E. M. (2000). Sarcoglycans in muscular dystrophy. *Microsc Res Tech* 48, 167-180.

Hammonds, R. G., Jr. (1987). Protein sequence of DMD gene is related to actin-binding domain of alpha-actinin. *Cell* 51, 1.

Hanu, R., McKenna, M., O'Neill, A., Resneck, W. G., and Bloch, R. J. (2000). Monocarboxylic acid transporters, MCT1 and MCT2, in cortical astrocytes in vitro and in vivo. *Am J Physiol Cell Physiol* 278, C921-930.

Harada, T., Harada, C., Watanabe, M., Inoue, Y., Sakagawa, T., Nakayama, N., Sasaki, S., Okuyama, S., Watase, K., Wada, K., and Tanaka, K. (1998). Functions of the two glutamate transporters GLAST and GLT-1 in the retina. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 4663-4666.

- Hartveit, E. (1997). Functional organization of cone bipolar cells in the rat retina. *J Neurophysiol* 77, 1716-1730.
- Hasegawa, M., Cuenda, A., Spillantini, M. G., Thomas, G. M., Buee-Scherrer, V., Cohen, P., and Goedert, M. (1999). Stress-activated protein kinase-3 interacts with the PDZ domain of alpha1-syntrophin. A mechanism for specific substrate recognition. *J Biol Chem* 274, 12626-12631.
- Hashida-Okumura, A., Okumura, N., Iwamatsu, A., Buijs, R. M., Romijn, H. J., and Nagai, K. (1999). Interaction of neuronal nitric-oxide synthase with alpha1-syntrophin in rat brain. *J Biol Chem* 274, 11736-11741.
- Hashimoto, Y., Murakami, M., and Tomita, T. (1961). Localization of the ERG by aid of histological method. *Jpn J Physiol* 11, 62-70.
- Haverkamp, S., Grunert, U., and Wassle, H. (2000). The cone pedicle, a complex synapse in the retina. *Neuron* 27, 85-95.
- Hernandez-Gonzalez, E. O., Martinez-Rojas, D., Mornet, D., Rendon, A., and Mujica, A. (2001). Comparative distribution of short dystrophin superfamily products in various guinea pig spermatozoa domains. *Eur J Cell Biol* 80, 792-798.
- Hernandez-Gonzalez, E. O., Mornet, D., Rendon, A., and Martinez-Rojas, D. (2005). Absence of Dp71 in mdx3cv mouse spermatozoa alters flagellar morphology and the distribution of ion channels and nNOS. *J Cell Sci* 118, 137-145.
- Hinton, V. J., De Vivo, D. C., Nereo, N. E., Goldstein, E., and Stern, Y. (2000). Poor verbal working memory across intellectual level in boys with Duchenne dystrophy. *Neurology* 54, 2127-2132.
- Hoffman, E. P., Garcia, C. A., Chamberlain, J. S., Angelini, C., Lupski, J. R., and Fenwick, R. (1991). Is the carboxyl-terminus of dystrophin required for membrane association? A novel, severe case of Duchenne muscular dystrophy. *Ann Neurol* 30, 605-610.
- Holt, K. H., and Campbell, K. P. (1998). Assembly of the sarcoglycan complex. Insights for muscular dystrophy. *J Biol Chem* 273, 34667-34670.
- Holzfeind, P. J., Ambrose, H. J., Newey, S. E., Nawrotzki, R. A., Blake, D. J., and Davies, K. E. (1999). Tissue-selective expression of alpha-dystrobrevin is determined by multiple promoters. *J Biol Chem* 274, 6250-6258.
- Hosaka, Y., Yokota, T., Miyagoe-Suzuki, Y., Yuasa, K., Imamura, M., Matsuda, R., Ikemoto, T., Kameya, S., and Takeda, S. (2002). Alpha1-syntrophin-deficient skeletal muscle exhibits hypertrophy and aberrant formation of neuromuscular junctions during regeneration. *J Cell Biol* 158, 1097-1107.
- Howard, P. L., Dally, G. Y., Wong, M. H., Ho, A., Weleber, R. G., Pillers, D. A., and Ray, P. N. (1998). Localization of dystrophin isoform Dp71 to the inner limiting membrane of the retina suggests a unique functional contribution of Dp71 in the retina. *Hum Mol Genet* 7, 1385-1391.

Howard, P. L., Dally, G. Y., Wong, M. H., Ho, A., Weleber, R. G., Pillers, D. A., and Ray, P. N. (1998). Localization of dystrophin isoform Dp71 to the inner limiting membrane of the retina suggests a unique functional contribution of Dp71 in the retina. *Hum Mol Genet* 7, 1385-1391.

Howard, P. L., Klamut, H. J., and Ray, P. N. (1998). Identification of a novel actin binding site within the Dp71 dystrophin isoform. *FEBS Lett* 441, 337-341.

Hugnot, J. P., Gilgenkrantz, H., Vincent, N., Chafey, P., Morris, G. E., Monaco, A. P., Berwald-Netter, Y., Koulakoff, A., Kaplan, J. C., Kahn, A., and et al. (1992). Distal transcript of the dystrophin gene initiated from an alternative first exon and encoding a 75-kDa protein widely distributed in nonmuscle tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 7506-7510.

Husi, H., Ward, M. A., Choudhary, J. S., Blackstock, W. P., and Grant, S. G. (2000). Proteomic analysis of NMDA receptor-adhesion protein signaling complexes. *Nat Neurosci* 3, 661-669.

-I-

Ireland, M., and Maisel, H. (1984). A cytoskeletal protein unique to lens fiber cell differentiation. *Exp Eye Res* 38, 637-645.

Ishii, M., Horio, Y., Tada, Y., Hibino, H., Inanobe, A., Ito, M., Yamada, M., Gotow, T., Uchiyama, Y., and Kurachi, Y. (1997). 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* 17, 7725-7735.

-J-

Jacobson, C., Cote, P. D., Rossi, S. G., Rotundo, R. L., and Carbonetto, S. (2001). The dystroglycan complex is necessary for stabilization of acetylcholine receptor clusters at neuromuscular junctions and formation of the synaptic basement membrane. *J Cell Biol* 152, 435-450.

Jagadha, V., and Becker, L. E. (1988). Brain morphology in Duchenne muscular dystrophy: a Golgi study. *Pediatr Neurol* 4, 87-92.

Janzer, R. C., and Raff, M. C. (1987). Astrocytes induce blood-brain barrier properties in endothelial cells. *Nature* 325, 253-257.

Jarrett, H. W., and Foster, J. L. (1995). Alternate binding of actin and calmodulin to multiple sites on dystrophin. *J Biol Chem* 270, 5578-5586.

Jellali, A., Stussi-Garaud, C., Gasnier, B., Rendon, A., Sahel, J. A., Dreyfus, H., and Picaud, S. (2002). Cellular localization of the vesicular inhibitory amino acid transporter in the mouse and human retina. *J Comp Neurol* 449, 76-87.

Jones, P. H., Bishop, L. A., and Watt, F. M. (1996). Functional significance of CD9 association with beta 1 integrins in human epidermal keratinocytes. *Cell Adhes Commun* 4, 297-305.

Jung, D., Duclos, F., Apostol, B., Straub, V., Lee, J. C., Allamand, V., Venzke, D. P., Sunada, Y., Moomaw, C. R., Leveille, C. J., *et al.* (1996). Characterization of delta-sarcoglycan, a novel component of the oligomeric sarcoglycan complex involved in limb-girdle muscular dystrophy. *J Biol Chem* 271, 32321-32329.

Jung, D., Filliol, D., Metz-Boutigue, M. H., and Rendon, A. (1993). Characterization and subcellular localization of the dystrophin-protein 71 (Dp71) from brain. *Neuromuscul Disord* 3, 515-518.

Jung, D., Pons, F., Leger, J. J., Aunis, D., and Rendon, A. (1991). Dystrophin in central nervous system: a developmental, regional distribution and subcellular localization study. *Neurosci Lett* 124, 87-91.

Jung, D., Yang, B., Meyer, J., Chamberlain, J. S., and Campbell, K. P. (1995). Identification and characterization of the dystrophin anchoring site on beta-dystroglycan. *J Biol Chem* 270, 27305-27310.

-K-

Kachinsky, A. M., Froehner, S. C., and Milgram, S. L. (1999). A PDZ-containing scaffold related to the dystrophin complex at the basolateral membrane of epithelial cells. *J Cell Biol* 145, 391-402.

Kameya, S., Araki, E., Katsuki, M., Mizota, A., Adachi, E., Nakahara, K., Nonaka, I., Sakuragi, S., Takeda, S., and Nabeshima, Y. (1997). Dp260 disrupted mice revealed prolonged implicit time of the b-wave in ERG and loss of accumulation of beta-dystroglycan in the outer plexiform layer of the retina. *Hum Mol Genet* 6, 2195-2203.

Kameya, S., Miyagoe, Y., Nonaka, I., Ikemoto, T., Endo, M., Hanaoka, K., Nabeshima, Y., and Takeda, S. (1999). alpha1-syntrophin gene disruption results in the absence of neuronal-type nitric-oxide synthase at the sarcolemma but does not induce muscle degeneration. *J Biol Chem* 274, 2193-2200.

Kaminski, H. J., al-Hakim, M., Leigh, R. J., Katirji, M. B., and Ruff, R. L. (1992). Extraocular muscles are spared in advanced Duchenne dystrophy. *Ann Neurol* 32, 586-588.

Khurana, T. S., Watkins, S. C., Chafey, P., Chelly, J., Tome, F. M., Fardeau, M., Kaplan, J. C., and Kunkel, L. M. (1991). Immunolocalization and developmental expression of dystrophin related protein in skeletal muscle. *Neuromuscul Disord* 1, 185-194.

Kim, T. W., Wu, K., Xu, J. L., and Black, I. B. (1992). Detection of dystrophin in the postsynaptic density of rat brain and deficiency in a mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 11642-11644.

Kistler, J., Evans, C., Donaldson, P., Bullivant, S., Bond, J., Eastwood, S., Roos, M., Dong, Y., Gruijters, T., and Engel, A. (1995). Ocular lens gap junctions: protein expression, assembly, and structure-function analysis. *Microsc Res Tech* 31, 347-356.

- Klamut, H. J., Zubrzycka-Gaarn, E. E., Bulman, D. E., Malhotra, S. B., Bodrug, S. E., Worton, R. G., and Ray, P. N. (1989). Myogenic regulation of dystrophin gene expression. *Br Med Bull* 45, 681-702.
- Knuesel, I., Mastrocola, M., Zuellig, R. A., Bornhauser, B., Schaub, M. C., and Fritschy, J. M. (1999). Short communication: altered synaptic clustering of GABAA receptors in mice lacking dystrophin (mdx mice). *Eur J Neurosci* 11, 4457-4462.
- Koenig, M., Hoffman, E. P., Bertelson, C. J., Monaco, A. P., Feener, C., and Kunkel, L. M. (1987). Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals. *Cell* 50, 509-517.
- Koenig, M., and Kunkel, L. M. (1990). Detailed analysis of the repeat domain of dystrophin reveals four potential hinge segments that may confer flexibility. *J Biol Chem* 265, 4560-4566.
- Koenig, M., Monaco, A. P., and Kunkel, L. M. (1988). The complete sequence of dystrophin predicts a rod-shaped cytoskeletal protein. *Cell* 53, 219-226.
- Kofuji, P., Ceelen, P., Zahs, K. R., Surbeck, L. W., Lester, H. A., and Newman, E. A. (2000). Genetic inactivation of an inwardly rectifying potassium channel (Kir4.1 subunit) in mice: phenotypic impact in retina. *J Neurosci* 20, 5733-5740.
- Kofuji, P., and Connors, N. C. (2003). Molecular substrates of potassium spatial buffering in glial cells. *Mol Neurobiol* 28, 195-208.
- Kofuji, P., and Newman, E. A. (2004). Potassium buffering in the central nervous system. *Neuroscience* 129, 1045-1056.
- Kogure, K., Busto, R., Schwartzman, R. J., and Scheinberg, P. (1980). The dissociation of cerebral blood flow, metabolism, and function in the early stages of developing cerebral infarction. *Ann Neurol* 8, 278-290.
- Kolb, H., and Dekorver, L. (1991). Midget ganglion cells of the parafovea of the human retina: a study by electron microscopy and serial section reconstructions. *J Comp Neurol* 303, 617-636.
- Kolb, H., and Nelson, R. (1981). Amacrine cells of the cat retina. *Vision Res* 21, 1625-1633.
- Kolb, H., Zhang, L., Dekorver, L., and Cuenca, N. (2002). A new look at calretinin-immunoreactive amacrine cell types in the monkey retina. *J Comp Neurol* 453, 168-184.
- Koulen, P., Blank, M., and Kroger, S. (1998). Differential distribution of beta-dystroglycan in rabbit and rat retina. *J Neurosci Res* 51, 735-747.
- Kramarcy, N. R., Vidal, A., Froehner, S. C., and Sealock, R. (1994). Association of utrophin and multiple dystrophin short forms with the mammalian M(r) 58,000 dystrophin-associated protein (syntrophin). *J Biol Chem* 269, 2870-2876.

Krause, D., Mischeck, U., Galla, H. J., and Dermietzel, R. (1991). Correlation of zonula occludens ZO-1 antigen expression and transendothelial resistance in porcine and rat cultured cerebral endothelial cells. *Neurosci Lett* 128, 301-304.

Kurokawa, J., Motoike, H. K., Rao, J., and Kass, R. S. (2004). Regulatory actions of the A-kinase anchoring protein Yotiao on a heart potassium channel downstream of PKA phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 16374-16378.

-L-

Lederfein, D., Levy, Z., Augier, N., Mornet, D., Morris, G., Fuchs, O., Yaffe, D., and Nudel, U. (1992). A 71-kilodalton protein is a major product of the Duchenne muscular dystrophy gene in brain and other nonmuscle tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 5346-5350.

Lederfein, D., Yaffe, D., and Nudel, U. (1993). A housekeeping type promoter, located in the 3' region of the Duchenne muscular dystrophy gene, controls the expression of Dp71, a major product of the gene. *Hum Mol Genet* 2, 1883-1888.

Lee, A., Fischer, R. S., and Fowler, V. M. (2000). Stabilization and remodeling of the membrane skeleton during lens fiber cell differentiation and maturation. *Dev Dyn* 217, 257-270.

Lemaire, C., Heilig, R., and Mandel, J. L. (1988). The chicken dystrophin cDNA: striking conservation of the C-terminal coding and 3' untranslated regions between man and chicken. *Embo J* 7, 4157-4162.

Lenk, U., Hanke, R., Thiele, H., and Speer, A. (1993). Point mutations at the carboxy terminus of the human dystrophin gene: implications for an association with mental retardation in DMD patients. *Hum Mol Genet* 2, 1877-1881.

Lenk, U., Oexle, K., Voit, T., Ancker, U., Hellner, K. A., Speer, A., and Hubner, C. (1996). A cysteine 3340 substitution in the dystroglycan-binding domain of dystrophin associated with Duchenne muscular dystrophy, mental retardation and absence of the ERG b-wave. *Hum Mol Genet* 5, 973-975.

Leonoudakis, D., Conti, L. R., Anderson, S., Radeke, C. M., McGuire, L. M., Adams, M. E., Froehner, S. C., Yates, J. R., 3rd, and Vandenberg, C. A. (2004). Protein trafficking and anchoring complexes revealed by proteomic analysis of inward rectifier potassium channel (Kir2.x)-associated proteins. *J Biol Chem* 279, 22331-22346.

Levi, S., Grady, R. M., Henry, M. D., Campbell, K. P., Sanes, J. R., and Craig, A. M. (2002). Dystroglycan is selectively associated with inhibitory GABAergic synapses but is dispensable for their differentiation. *J Neurosci* 22, 4274-4285.

Levy, D. E., and Duffy, T. E. (1977). Cerebral energy metabolism during transient ischemia and recovery in the gerbil. *J Neurochem* 28, 63-70.

Li, J., Patil, R. V., and Verkman, A. S. (2002). Mildly abnormal retinal function in transgenic mice without Muller cell aquaporin-4 water channels. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43, 573-579.

Lidov, H. G. (1996). Dystrophin in the nervous system. *Brain Pathol* 6, 63-77.

Lidov, H. G., Byers, T. J., Watkins, S. C., and Kunkel, L. M. (1990). Localization of dystrophin to postsynaptic regions of central nervous system cortical neurons. *Nature* 348, 725-728.

Lidov, H. G., and Kunkel, L. M. (1997). Dp140: alternatively spliced isoforms in brain and kidney. *Genomics* 45, 132-139.

Lidov, H. G., Selig, S., and Kunkel, L. M. (1995). Dp140: a novel 140 kDa CNS transcript from the dystrophin locus. *Hum Mol Genet* 4, 329-335.

Loh, N. Y., Nebenius-Oosthuizen, D., Blake, D. J., Smith, A. J., and Davies, K. E. (2001). Role of beta-dystrobrevin in nonmuscle dystrophin-associated protein complex-like complexes in kidney and liver. *Mol Cell Biol* 21, 7442-7448.

Love, D. R., Byth, B. C., Tinsley, J. M., Blake, D. J., and Davies, K. E. (1993). Dystrophin and dystrophin-related proteins: a review of protein and RNA studies. *Neuromuscul Disord* 3, 5-21.

Love, D. R., Hill, D. F., Dickson, G., Spurr, N. K., Byth, B. C., Marsden, R. F., Walsh, F. S., Edwards, Y. H., and Davies, K. E. (1989). An autosomal transcript in skeletal muscle with homology to dystrophin. *Nature* 339, 55-58.

Love, D. R., Morris, G. E., Ellis, J. M., Fairbrother, U., Marsden, R. F., Bloomfield, J. F., Edwards, Y. H., Slater, C. P., Parry, D. J., and Davies, K. E. (1991). Tissue distribution of the dystrophin-related gene product and expression in the mdx and dy mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 3243-3247.

Lumeng, C., Phelps, S., Crawford, G. E., Walden, P. D., Barald, K., and Chamberlain, J. S. (1999). Interactions between beta 2-syntrophin and a family of microtubule-associated serine/threonine kinases. *Nat Neurosci* 2, 611-617.

Lumeng, C. N., Phelps, S. F., Rafael, J. A., Cox, G. A., Hutchinson, T. L., Begy, C. R., Adkins, E., Wiltshire, R., and Chamberlain, J. S. (1999). Characterization of dystrophin and utrophin diversity in the mouse. *Hum Mol Genet* 8, 593-599.

-M-

Marquez, F. G., Cisneros, B., Garcia, F., Ceja, V., Velazquez, F., Depardon, F., Cervantes, L., Rendon, A., Mornet, D., Rosas-vargas, H., *et al.* (2003). Differential expression and subcellular distribution of dystrophin Dp71 isoforms during differentiation process. *Neuroscience* 118, 957-966.

Masu, M., Iwakabe, H., Tagawa, Y., Miyoshi, T., Yamashita, M., Fukuda, Y., Sasaki, H., Hiroi, K., Nakamura, Y., Shigemoto, R., and *et al.* (1995). Specific deficit of the ON response in visual transmission by targeted disruption of the mGluR6 gene. *Cell* 80, 757-765.

Mathias, R. T., Rae, J. L., and Baldo, G. J. (1997). Physiological properties of the normal lens. *Physiol Rev* 77, 21-50.

- Matsumura, K., Saito, F., Yamada, H., Hase, A., Sunada, Y., and Shimizu, T. (1999). Sarcoglycan complex: a muscular supporter of dystroglycan-dystrophin interplay? *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* *45*, 751-762.
- Matsumura, K., Yamada, H., Shimizu, T., and Campbell, K. P. (1993). Differential expression of dystrophin, utrophin and dystrophin-associated proteins in peripheral nerve. *FEBS Lett* *334*, 281-285.
- Maurin, N., Forst, J., Leithe, H., and Forst, R. (1998). Deficiency of platelet glass bead adhesion and platelet membrane glycoprotein IV (CD36) in Duchenne muscular dystrophy. *Thromb Haemost* *79*, 1067.
- McGuire, B. A., Stevens, J. K., and Sterling, P. (1984). Microcircuitry of bipolar cells in cat retina. *J Neurosci* *4*, 2920-2938.
- McNally, E. M., Ly, C. T., and Kunkel, L. M. (1998). Human epsilon-sarcoglycan is highly related to alpha-sarcoglycan (adhalin), the limb girdle muscular dystrophy 2D gene. *FEBS Lett* *422*, 27-32.
- Metzinger, L., Blake, D. J., Squier, M. V., Anderson, L. V., Deconinck, A. E., Nawrotzki, R., Hilton-Jones, D., and Davies, K. E. (1997). Dystrobrevin deficiency at the sarcolemma of patients with muscular dystrophy. *Hum Mol Genet* *6*, 1185-1191.
- Mirabella, M., Galluzzi, G., Manfredi, G., Bertini, E., Ricci, E., De Leo, R., Tonali, P., and Servidei, S. (1998). Giant dystrophin deletion associated with congenital cataract and mild muscular dystrophy. *Neurology* *51*, 592-595.
- Moizard, M. P., Billard, C., Toutain, A., Berret, F., Marmin, N., and Moraine, C. (1998). Are Dp71 and Dp140 brain dystrophin isoforms related to cognitive impairment in Duchenne muscular dystrophy? *Am J Med Genet* *80*, 32-41.
- Moizard, M. P., Toutain, A., Fournier, D., Berret, F., Raynaud, M., Billard, C., Andres, C., and Moraine, C. (2000). Severe cognitive impairment in DMD: obvious clinical indication for Dp71 isoform point mutation screening. *Eur J Hum Genet* *8*, 552-556.
- Mokri, B., and Engel, A. G. (1975). Duchenne dystrophy: electron microscopic findings pointing to a basic or early abnormality in the plasma membrane of the muscle fiber. *Neurology* *25*, 1111-1120.
- Monaco, A. P., Neve, R. L., Colletti-Feener, C., Bertelson, C. J., Kurnit, D. M., and Kunkel, L. M. (1986). Isolation of candidate cDNAs for portions of the Duchenne muscular dystrophy gene. *Nature* *323*, 646-650.
- Montanaro, F., Carbonetto, S., Campbell, K. P., and Lindenbaum, M. (1995). Dystroglycan expression in the wild type and mdx mouse neural retina: synaptic colocalization with dystrophin, dystrophin-related protein but not laminin. *J Neurosci Res* *42*, 528-538.
- More, M. I., Kirsch, F. P., and Rathjen, F. G. (2001). Targeted ablation of NrCAM or ankyrin-B results in disorganized lens fibers leading to cataract formation. *J Cell Biol* *154*, 187-196.

Morgans, C. W. (1999). Calcium channel heterogeneity among cone photoreceptors in the tree shrew retina. *Eur J Neurosci* 11, 2989-2993.

Mukoyama, M., Kondo, K., Hizawa, K., and Nishitani, H. (1987). Life spans of Duchenne muscular dystrophy patients in the hospital care program in Japan. *J Neurol Sci* 81, 155-158.

Muntoni, F., Torelli, S., and Ferlini, A. (2003). Dystrophin and mutations: one gene, several proteins, multiple phenotypes. *Lancet Neurol* 2, 731-740.

-N-

Nabekura, T., Takeda, M., Hori, R., Tomohiro, M., and Ito, Y. (2001). Expression of plasma membrane Ca(2+)-ATPase in lenses from normal and hereditary cataract UPL rats. *Curr Eye Res* 22, 446-450.

Nabekura, T., Tomohiro, M., Ito, Y., and Kitagawa, S. (2004). Changes in plasma membrane Ca²⁺-ATPase expression and ATP content in lenses of hereditary cataract UPL rats. *Toxicology* 197, 177-183.

Nagelhus, E. A., Horio, Y., Inanobe, A., Fujita, A., Haug, F. M., Nielsen, S., Kurachi, Y., and Ottersen, O. P. (1999). Immunogold evidence suggests that coupling of K⁺ siphoning and water transport in rat retinal Muller cells is mediated by a coenrichment of Kir4.1 and AQP4 in specific membrane domains. *Glia* 26, 47-54.

Nagelhus, E. A., Mathiisen, T. M., and Ottersen, O. P. (2004). Aquaporin-4 in the central nervous system: cellular and subcellular distribution and coexpression with KIR4.1. *Neuroscience* 129, 905-913.

Nagelhus, E. A., Veruki, M. L., Torp, R., Haug, F. M., Laake, J. H., Nielsen, S., Agre, P., and Ottersen, O. P. (1998). Aquaporin-4 water channel protein in the rat retina and optic nerve: polarized expression in Muller cells and fibrous astrocytes. *J Neurosci* 18, 2506-2519.

Neely, J. D., Amiry-Moghaddam, M., Ottersen, O. P., Froehner, S. C., Agre, P., and Adams, M. E. (2001). Syntrophin-dependent expression and localization of Aquaporin-4 water channel protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 14108-14113.

Nelson, R., and Kolb, H. (1983). Synaptic patterns and response properties of bipolar and ganglion cells in the cat retina. *Vision Res* 23, 1183-1195.

Newman, E. A. (2004). Glial modulation of synaptic transmission in the retina. *Glia* 47, 268-274.

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

Nguyen-Legros, J., Versaux-Botteri, C., and Savy, C. (1997). Dopaminergic and GABAergic retinal cell populations in mammals. *Microsc Res Tech* 36, 26-42.

Nguyen, T. M., Ellis, J. M., Love, D. R., Davies, K. E., Gatter, K. C., Dickson, G., and Morris, G. E. (1991). Localization of the DMDL gene-encoded dystrophin-related protein

using a panel of nineteen monoclonal antibodies: presence at neuromuscular junctions, in the sarcolemma of dystrophic skeletal muscle, in vascular and other smooth muscles, and in proliferating brain cell lines. *J Cell Biol* 115, 1695-1700.

Nicholson, L. V., Davison, K., Johnson, M. A., Slater, C. R., Young, C., Bhattacharya, S., Gardner-Medwin, D., and Harris, J. B. (1989). Dystrophin in skeletal muscle. II. Immunoreactivity in patients with Xp21 muscular dystrophy. *J Neurol Sci* 94, 137-146.

Nico, B., Frigeri, A., Nicchia, G. P., Corsi, P., Ribatti, D., Quondamatteo, F., Herken, R., Girolamo, F., Marzullo, A., Svelto, M., and Roncali, L. (2003). Severe alterations of endothelial and glial cells in the blood-brain barrier of dystrophic mdx mice. *Glia* 42, 235-251.

Nico, B., Paola Nicchia, G., Frigeri, A., Corsi, P., Mangieri, D., Ribatti, D., Svelto, M., and Roncali, L. (2004). Altered blood-brain barrier development in dystrophic MDX mice. *Neuroscience* 125, 921-935.

Nielsen, S., Nagelhus, E. A., Amiry-Moghaddam, M., Bourque, C., Agre, P., and Ottersen, O. P. (1997). Specialized membrane domains for water transport in glial cells: high-resolution immunogold cytochemistry of aquaporin-4 in rat brain. *J Neurosci* 17, 171-180.

Nielsen, S., Smith, B. L., Christensen, E. I., and Agre, P. (1993). Distribution of the aquaporin CHIP in secretory and resorptive epithelia and capillary endothelia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 7275-7279.

Nigro, V., Piluso, G., Belsito, A., Politano, L., Puca, A. A., Papparella, S., Rossi, E., Viglietto, G., Esposito, M. G., Abbondanza, C., *et al.* (1996). Identification of a novel sarcoglycan gene at 5q33 encoding a sarcolemmal 35 kDa glycoprotein. *Hum Mol Genet* 5, 1179-1186.

Nomura, A., Shigemoto, R., Nakamura, Y., Okamoto, N., Mizuno, N., and Nakanishi, S. (1994). Developmentally regulated postsynaptic localization of a metabotropic glutamate receptor in rat rod bipolar cells. *Cell* 77, 361-369.

Noordeen, M. H., Haddad, F. S., Muntoni, F., Gobbi, P., Hollyer, J. S., and Bentley, G. (1999). Blood loss in Duchenne muscular dystrophy: vascular smooth muscle dysfunction? *J Pediatr Orthop B* 8, 212-215.

North, A. J., Galazkiewicz, B., Byers, T. J., Glenney, J. R., Jr., and Small, J. V. (1993). Complementary distributions of vinculin and dystrophin define two distinct sarcolemma domains in smooth muscle. *J Cell Biol* 120, 1159-1167.

Nudel, U., Zuk, D., Einat, P., Zeelon, E., Levy, Z., Neuman, S., and Yaffe, D. (1989). Duchenne muscular dystrophy gene product is not identical in muscle and brain. *Nature* 337, 76-78.

-O-

Ogasawara, A. (1989). Similarity of IQs of siblings with Duchenne progressive muscular dystrophy. *Am J Ment Retard* 93, 548-550.

Ohlendieck, K., Ervasti, J. M., Matsumura, K., Kahl, S. D., Leveille, C. J., and Campbell, K. P. (1991). Dystrophin-related protein is localized to neuromuscular junctions of adult skeletal muscle. *Neuron* 7, 499-508.

Okafor, M. C., and Delamere, N. A. (2001). The inhibitory influence of endothelin on active sodium-potassium transport in porcine lens. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42, 1018-1023.

Oliet, S. H., Piet, R., and Poulain, D. A. (2001). Control of glutamate clearance and synaptic efficacy by glial coverage of neurons. *Science* 292, 923-926.

Onodera, S. (1991). Presence of the basement membrane component--heparan sulfate proteoglycan--in bovine lens capsules. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 39, 1059-1061.

Ozaki-Kuroda, K., Nakanishi, H., Ohta, H., Tanaka, H., Kurihara, H., Mueller, S., Irie, K., Ikeda, W., Sakai, T., Wimmer, E., *et al.* (2002). Nectin couples cell-cell adhesion and the actin scaffold at heterotypic testicular junctions. *Curr Biol* 12, 1145-1150.

Ozawa, E., Yoshida, M., Suzuki, A., Mizuno, Y., Hagiwara, Y., and Noguchi, S. (1995). Dystrophin-associated proteins in muscular dystrophy. *Hum Mol Genet* 4 *Spec No*, 1711-1716.

-P-

Pannicke, T., Iandiev, I., Uckermann, O., Biedermann, B., Kutzera, F., Wiedemann, P., Wolburg, H., Reichenbach, A., and Bringmann, A. (2004). A potassium channel-linked mechanism of glial cell swelling in the postischemic retina. *Mol Cell Neurosci* 26, 493-502.

Parmigiani, C. M., and McAvoy, J. W. (1991). The roles of laminin and fibronectin in the development of the lens capsule. *Curr Eye Res* 10, 501-511.

Paterson, C. A., Zeng, J., Hussein, Z., Borchman, D., Delamere, N. A., Garland, D., and Jimenez-Asensio, J. (1997). Calcium ATPase activity and membrane structure in clear and cataractous human lenses. *Curr Eye Res* 16, 333-338.

Pellerin, L., and Magistretti, P. J. (1994). Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: a mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 10625-10629.

Pellerin, L., and Magistretti, P. J. (2004). Neuroenergetics: calling upon astrocytes to satisfy hungry neurons. *Neuroscientist* 10, 53-62.

Peters, M. F., Adams, M. E., and Froehner, S. C. (1997). Differential association of syntrophin pairs with the dystrophin complex. *J Cell Biol* 138, 81-93.

Peters, M. F., O'Brien, K. F., Sadoulet-Puccio, H. M., Kunkel, L. M., Adams, M. E., and Froehner, S. C. (1997). beta-dystrobrevin, a new member of the dystrophin family. Identification, cloning, and protein associations. *J Biol Chem* 272, 31561-31569.

Petrof, B. J., Shrager, J. B., Stedman, H. H., Kelly, A. M., and Sweeney, H. L. (1993). Dystrophin protects the sarcolemma from stresses developed during muscle contraction. *Proc Natl Acad Sci U S A* *90*, 3710-3714.

Pfister, M. H., Apaydin, F., Turan, O., Bereketoglu, M., Bilgen, V., Braendle, U., Kose, S., Zenner, H. P., and Lalwani, A. K. (1999). Clinical evidence for dystrophin dysfunction as a cause of hearing loss in locus DFN4. *Laryngoscope* *109*, 730-735.

Pfister, M. H., Apaydin, F., Turan, O., Bereketoglu, M., Bylgen, V., Braendle, U., Zenner, H. P., and Lalwani, A. K. (1998). A second family with nonsyndromic sensorineural hearing loss linked to Xp21.2: refinement of the DFN4 locus within DMD. *Genomics* *53*, 377-382.

Pillers, D. A., Duncan, N. M., Dwinnell, S. J., Rash, S. M., Kempton, J. B., and Trune, D. R. (1999). Normal cochlear function in mdx and mdx(Cv3) Duchenne muscular dystrophy mouse models. *Laryngoscope* *109*, 1310-1312.

Pillers, D. A., Weleber, R. G., Green, D. G., Rash, S. M., Dally, G. Y., Howard, P. L., Powers, M. R., Hood, D. C., Chapman, V. M., Ray, P. N., and Woodward, W. R. (1999). Effects of dystrophin isoforms on signal transduction through neural retina: genotype-phenotype analysis of duchenne muscular dystrophy mouse mutants. *Mol Genet Metab* *66*, 100-110.

Pillers, D. M., Fitzgerald, K. M., Duncan, N. M., Rash, S. M., White, R. A., Dwinnell, S. J., Powell, B. R., Schnur, R. E., Ray, P. N., Cibis, G. W., and Weleber, R. G. (1999). Duchenne/Becker muscular dystrophy: correlation of phenotype by electroretinography with sites of dystrophin mutations. *Hum Genet* *105*, 2-9.

Pillers, D. M., Weleber, R. G., Woodward, W. R., Green, D. G., Chapman, V. M., and Ray, P. N. (1995). mdxCv3 mouse is a model for electroretinography of Duchenne/Becker muscular dystrophy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* *36*, 462-466.

Piluso, G., Mirabella, M., Ricci, E., Belsito, A., Abbondanza, C., Servidei, S., Puca, A. A., Tonalì, P., Puca, G. A., and Nigro, V. (2000). Gamma1- and gamma2-syntrophins, two novel dystrophin-binding proteins localized in neuronal cells. *J Biol Chem* *275*, 15851-15860.

Poitry-Yamate, C. L., Poitry, S., and Tsacopoulos, M. (1995). Lactate released by Muller glial cells is metabolized by photoreceptors from mammalian retina. *J Neurosci* *15*, 5179-5191.

Prescott, A. R., Stewart, S., Duncan, G., Gowing, R., and Warn, R. M. (1991). Diamide induces reversible changes in morphology, cytoskeleton and cell-cell coupling in lens epithelial cells. *Exp Eye Res* *52*, 83-92.

-R-

Rae, J. L., Bartling, C., Rae, J., and Mathias, R. T. (1996). Dye transfer between cells of the lens. *J Membr Biol* *150*, 89-103.

Rafferty, N. S., and Rafferty, K. A., Jr. (1981). Cell population kinetics of the mouse lens epithelium. *J Cell Physiol* *107*, 309-315.

- Rafiki, A., Boulland, J. L., Halestrap, A. P., Ottersen, O. P., and Bergersen, L. (2003). Highly differential expression of the monocarboxylate transporters MCT2 and MCT4 in the developing rat brain. *Neuroscience* *122*, 677-688.
- Ramón y Cajal, S. (1893). La rétines des vertébrés. *La Cellule* *9*, 119-225.
- Rapaport, D., Lederfein, D., den Dunnen, J. T., Grootsholten, P. M., Van Ommen, G. J., Fuchs, O., Nudel, U., and Yaffe, D. (1992). Characterization and cell type distribution of a novel, major transcript of the Duchenne muscular dystrophy gene. *Differentiation* *49*, 187-193.
- Rapaport, D., Passos-Bueno, M. R., Brandao, L., Love, D., Vainzof, M., and Zatz, M. (1991). Apparent association of mental retardation and specific patterns of deletions screened with probes cf56a and cf23a in Duchenne muscular dystrophy. *Am J Med Genet* *39*, 437-441.
- Rash, J. E., Yasumura, T., Hudson, C. S., Agre, P., and Nielsen, S. (1998). Direct immunogold labeling of aquaporin-4 in square arrays of astrocyte and ependymocyte plasma membranes in rat brain and spinal cord. *Proc Natl Acad Sci U S A* *95*, 11981-11986.
- Rasmussen, K. E. (1974). The Muller cell: a comparative study of rod and cone retinas with and without retinal vessels. *Exp Eye Res* *19*, 243-257.
- Rauen, T., Taylor, W. R., Kuhlbrodt, K., and Wiessner, M. (1998). High-affinity glutamate transporters in the rat retina: a major role of the glial glutamate transporter GLAST-1 in transmitter clearance. *Cell Tissue Res* *291*, 19-31.
- Rauen, T., and Wiessner, M. (2000). Fine tuning of glutamate uptake and degradation in glial cells: common transcriptional regulation of GLAST1 and GS. *Neurochem Int* *37*, 179-189.
- Risau, W., Dingler, A., Albrecht, U., Dehouck, M. P., and Cecchelli, R. (1992). Blood-brain barrier pericytes are the main source of gamma-glutamyltranspeptidase activity in brain capillaries. *J Neurochem* *58*, 667-672.
- Roberts, R. G., Freeman, T. C., Kendall, E., Vetrie, D. L., Dixon, A. K., Shaw-Smith, C., Bone, Q., and Bobrow, M. (1996). Characterization of DRP2, a novel human dystrophin homologue. *Nat Genet* *13*, 223-226.
- Roberts, R. G., and Sheng, M. (2000). Association of dystrophin-related protein 2 (DRP2) with postsynaptic densities in rat brain. *Mol Cell Neurosci* *16*, 674-685.
- Rodius, F., Claudepierre, T., Rosas-Vargas, H., Cisneros, B., Montanez, C., Dreyfus, H., Mornet, D., and Rendon, A. (1997). Dystrophins in developing retina: Dp260 expression correlates with synaptic maturation. *Neuroreport* *8*, 2383-2387.
- Roska, B., Nemeth, E., Orzo, L., and Werblin, F. S. (2000). Three levels of lateral inhibition: A space-time study of the retina of the tiger salamander. *J Neurosci* *20*, 1941-1951.
- Rothman, S. M., and Olney, J. W. (1986). Glutamate and the pathophysiology of hypoxic-ischemic brain damage. *Ann Neurol* *19*, 105-111.

Rowland, L. P. (1988). Clinical concepts of Duchenne muscular dystrophy. The impact of molecular genetics. *Brain 111 (Pt 3)*, 479-495.

-S-

Saadoun, S., Papadopoulos, M. C., and Krishna, S. (2003). Water transport becomes uncoupled from K⁺ siphoning in brain contusion, bacterial meningitis, and brain tumours: immunohistochemical case review. *J Clin Pathol 56*, 972-975.

Sandilands, A., Prescott, A. R., Wegener, A., Zoltoski, R. K., Hutcheson, A. M., Masaki, S., Kuszak, J. R., and Quinlan, R. A. (2003). Knockout of the intermediate filament protein CP49 destabilises the lens fibre cell cytoskeleton and decreases lens optical quality, but does not induce cataract. *Exp Eye Res 76*, 385-391.

Sarig, R., Mezger-Lallemand, V., Gitelman, I., Davis, C., Fuchs, O., Yaffe, D., and Nudel, U. (1999). Targeted inactivation of Dp71, the major non-muscle product of the DMD gene: differential activity of the Dp71 promoter during development. *Hum Mol Genet 8*, 1-10.

Schiller, P. H., and Malpeli, J. G. (1977). Properties and tectal projections of monkey retinal ganglion cells. *J Neurophysiol 40*, 428-445.

Schmidt, P. H., Dransfield, D. T., Claudio, J. O., Hawley, R. G., Trotter, K. W., Milgram, S. L., and Goldenring, J. R. (1999). AKAP350, a multiply spliced protein kinase A-anchoring protein associated with centrosomes. *J Biol Chem 274*, 3055-3066.

Schmitt, A., Asan, E., Puschel, B., Jons, T., and Kugler, P. (1996). Expression of the glutamate transporter GLT1 in neural cells of the rat central nervous system: non-radioactive in situ hybridization and comparative immunocytochemistry. *Neuroscience 71*, 989-1004.

Schmitz, F., Holbach, M., and Drenckhahn, D. (1993). Colocalization of retinal dystrophin and actin in postsynaptic dendrites of rod and cone photoreceptor synapses. *Histochemistry 100*, 473-479.

Schmitz, Y., and Witkovsky, P. (1997). Dependence of photoreceptor glutamate release on a dihydropyridine-sensitive calcium channel. *Neuroscience 78*, 1209-1216.

Schofield, J. N., Blake, D. J., Simmons, C., Morris, G. E., Tinsley, J. M., Davies, K. E., and Edwards, Y. H. (1994). Apo-dystrophin-1 and apo-dystrophin-2, products of the Duchenne muscular dystrophy locus: expression during mouse embryogenesis and in cultured cell lines. *Hum Mol Genet 3*, 1309-1316.

Schwartz, E. A. (1993). L-glutamate conditionally modulates the K⁺ current of Muller glial cells. *Neuron 10*, 1141-1149.

Sesay, A. K., Errington, M. L., Levita, L., and Bliss, T. V. (1996). Spatial learning and hippocampal long-term potentiation are not impaired in mdx mice. *Neurosci Lett 211*, 207-210.

Shiels, A., Bassnett, S., Varadaraj, K., Mathias, R., Al-Ghoul, K., Kuszak, J., Donoviel, D., Lilleberg, S., Friedrich, G., and Zambrowicz, B. (2001). Optical dysfunction of the crystalline lens in aquaporin-0-deficient mice. *Physiol Genomics* 7, 179-186.

Sigesmund, D. A., Weleber, R. G., Pillers, D. A., Westall, C. A., Panton, C. M., Powell, B. R., Heon, E., Murphey, W. H., Musarella, M. A., and Ray, P. N. (1994). Characterization of the ocular phenotype of Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Ophthalmology* 101, 856-865.

Simard, M., and Nedergaard, M. (2004). The neurobiology of glia in the context of water and ion homeostasis. *Neuroscience* 129, 877-896.

Skolnik, E. Y., Batzer, A., Li, N., Lee, C. H., Lowenstein, E., Mohammadi, M., Margolis, B., and Schlessinger, J. (1993). The function of GRB2 in linking the insulin receptor to Ras signaling pathways. *Science* 260, 1953-1955.

Sogos, V., Reali, C., Fanni, V., Curto, M., and Gremo, F. (2003). Dystrophin antisense oligonucleotides decrease expression of nNOS in human neurons. *Brain Res Mol Brain Res* 118, 52-59.

Sonnenwald, U., Westergaard, N., and Schousboe, A. (1997). Glutamate transport and metabolism in astrocytes. *Glia* 21, 56-63.

Sterk, L. M., Geuijen, C. A., Oomen, L. C., Calafat, J., Janssen, H., and Sonnenberg, A. (2000). The tetraspan molecule CD151, a novel constituent of hemidesmosomes, associates with the integrin alpha6beta4 and may regulate the spatial organization of hemidesmosomes. *J Cell Biol* 149, 969-982.

Straub, V., Ettinger, A. J., Durbeej, M., Venzke, D. P., Cutshall, S., Sanes, J. R., and Campbell, K. P. (1999). epsilon-sarcoglycan replaces alpha-sarcoglycan in smooth muscle to form a unique dystrophin-glycoprotein complex. *J Biol Chem* 274, 27989-27996.

Suchoff, I. B. (1979). Visual development. *J Am Optom Assoc* 50, 1129-1135.

Suzuki, A., Yoshida, M., Hayashi, K., Mizuno, Y., Hagiwara, Y., and Ozawa, E. (1994). Molecular organization at the glycoprotein-complex-binding site of dystrophin. Three dystrophin-associated proteins bind directly to the carboxy-terminal portion of dystrophin. *Eur J Biochem* 220, 283-292.

Suzuki, A., Yoshida, M., Yamamoto, H., and Ozawa, E. (1992). Glycoprotein-binding site of dystrophin is confined to the cysteine-rich domain and the first half of the carboxy-terminal domain. *FEBS Lett* 308, 154-160.

-T-

Tian, M., Jacobson, C., Gee, S. H., Campbell, K. P., Carbonetto, S., and Jucker, M. (1996). Dystroglycan in the cerebellum is a laminin alpha 2-chain binding protein at the glial-vascular interface and is expressed in Purkinje cells. *Eur J Neurosci* 8, 2739-2747.

Tinsley, J. M., Blake, D. J., and Davies, K. E. (1993). Apo-dystrophin-3: a 2.2kb transcript from the DMD locus encoding the dystrophin glycoprotein binding site. *Hum Mol Genet* 2, 521-524.

Tinsley, J. M., Blake, D. J., Roche, A., Fairbrother, U., Riss, J., Byth, B. C., Knight, A. E., Kendrick-Jones, J., Suthers, G. K., Love, D. R., and et al. (1992). Primary structure of dystrophin-related protein. *Nature* 360, 591-593.

Tokarz, S. A., Duncan, N. M., Rash, S. M., Sadeghi, A., Dewan, A. K., and Pillers, D. A. (1998). Redefinition of dystrophin isoform distribution in mouse tissue by RT-PCR implies role in nonmuscle manifestations of duchenne muscular dystrophy. *Mol Genet Metab* 65, 272-281.

Tracey, I., Scott, R. B., Thompson, C. H., Dunn, J. F., Barnes, P. R., Styles, P., Kemp, G. J., Rae, C. D., Pike, M., and Radda, G. K. (1995). Brain abnormalities in Duchenne muscular dystrophy: phosphorus-31 magnetic resonance spectroscopy and neuropsychological study. *Lancet* 345, 1260-1264.

Trokel, S. (1962). The physical basis for transparency of the crystalline lens. *Invest Ophthalmol* 1, 493-501.

-U-

Ueda, H., Baba, T., Kashiwagi, K., Iijima, H., and Ohno, S. (2000). Dystrobrevin localization in photoreceptor axon terminals and at blood-ocular barrier sites. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41, 3908-3914.

Ueda, H., Baba, T., and Ohno, S. (2000). Current knowledge of dystrophin and dystrophin-associated proteins in the retina. *Histol Histopathol* 15, 753-760.

Ueda, H., Baba, T., Terada, N., Kato, Y., Fujii, Y., Takayama, I., Mei, X., and Ohno, S. (2000). Immunolocalization of dystrobrevin in the astrocytic endfeet and endothelial cells in the rat cerebellum. *Neurosci Lett* 283, 121-124.

Ueda, H., Baba, T., Terada, N., Kato, Y., Tsukahara, S., and Ohno, S. (1997). Dystrophin in rod spherules; submembranous dense regions facing bipolar cell processes. *Histochem Cell Biol* 108, 243-248.

Ueda, H., Gohdo, T., and Ohno, S. (1998). Beta-dystroglycan localization in the photoreceptor and Muller cells in the rat retina revealed by immunoelectron microscopy. *J Histochem Cytochem* 46, 185-191.

-V-

Vaillend, C., and Billard, J. M. (2002). Facilitated CA1 hippocampal synaptic plasticity in dystrophin-deficient mice: role for GABAA receptors? *Hippocampus* 12, 713-717.

Vaillend, C., Billard, J. M., Claudepierre, T., Rendon, A., Dutar, P., and Ungerer, A. (1998). Spatial discrimination learning and CA1 hippocampal synaptic plasticity in mdx and mdx3cv mice lacking dystrophin gene products. *Neuroscience* 86, 53-66.

Vaillend, C., Billard, J. M., and Laroche, S. (2004). Impaired long-term spatial and recognition memory and enhanced CA1 hippocampal LTP in the dystrophin-deficient Dmd(mdx) mouse. *Neurobiol Dis* 17, 10-20.

Vaillend, C., Rendon, A., Misslin, R., and Ungerer, A. (1995). Influence of dystrophin-gene mutation on mdx mouse behavior. I. Retention deficits at long delays in spontaneous alternation and bar-pressing tasks. *Behav Genet* 25, 569-579.

Vandenbranden, C. A., Verweij, J., Kamermans, M., Muller, L. J., Ruijter, J. M., Vrensen, G. F., and Spekrijse, H. (1996). Clearance of neurotransmitter from the cone synaptic cleft in goldfish retina. *Vision Res* 36, 3859-3874.

Varadaraj, K., Kushmerick, C., Baldo, G. J., Bassnett, S., Shiels, A., and Mathias, R. T. (1999). The role of MIP in lens fiber cell membrane transport. *J Membr Biol* 170, 191-203.

Vardi, N., Duvoisin, R., Wu, G., and Sterling, P. (2000). Localization of mGluR6 to dendrites of ON bipolar cells in primate retina. *J Comp Neurol* 423, 402-412.

von Gersdorff, H., Vardi, E., Matthews, G., and Sterling, P. (1996). Evidence that vesicles on the synaptic ribbon of retinal bipolar neurons can be rapidly released. *Neuron* 16, 1221-1227.

Vorwerk, C. K., Naskar, R., Schuettauf, F., Quinto, K., Zurakowski, D., Gochenauer, G., Robinson, M. B., Mackler, S. A., and Dreyer, E. B. (2000). Depression of retinal glutamate transporter function leads to elevated intravitreal glutamate levels and ganglion cell death. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41, 3615-3621.

-W-

Walker, J. L., Zhang, L., and Menko, A. S. (2002). A signaling role for the uncleaved form of alpha 6 integrin in differentiating lens fiber cells. *Dev Biol* 251, 195-205.

Walker, J. L., Zhang, L., and Menko, A. S. (2002). Transition between proliferation and differentiation for lens epithelial cells is regulated by Src family kinases. *Dev Dyn* 224, 361-372.

Wassle, H., Yamashita, M., Greferath, U., Grunert, U., and Muller, F. (1991). The rod bipolar cell of the mammalian retina. *Vis Neurosci* 7, 99-112.

Watanabe, M., and Rodieck, R. W. (1989). Parasol and midget ganglion cells of the primate retina. *J Comp Neurol* 289, 434-454.

Wei, Q., Zhang, Y., Li, Y., and Shen, L. (2004). [The effect of vitreous surgery combined with intraocular lens implantation in proliferative diabetic retinopathy]. *Yan Ke Xue Bao* 20, 88-89, 92.

Wheeler, M. T., Zarnegar, S., and McNally, E. M. (2002). Zeta-sarcoglycan, a novel component of the sarcoglycan complex, is reduced in muscular dystrophy. *Hum Mol Genet* 11, 2147-2154.

White, T. W., Goodenough, D. A., and Paul, D. L. (1998). Targeted ablation of connexin50 in mice results in microphthalmia and zonular pulverulent cataracts. *J Cell Biol* 143, 815-825.

Wilson, C. C., Delamere, N. A., and Paterson, C. A. (1983). Chlorpromazine effects upon rabbit lens water and electrolyte balance. *Exp Eye Res* 36, 559-565.

Wilson, J., Putt, W., Jimenez, C., and Edwards, Y. H. (1999). Up71 and up140, two novel transcripts of utrophin that are homologues of short forms of dystrophin. *Hum Mol Genet* 8, 1271-1278.

Wolburg, H., and Lippoldt, A. (2002). Tight junctions of the blood-brain barrier: development, composition and regulation. *Vascul Pharmacol* 38, 323-337.

Wolburg, H., Neuhaus, J., Kniesel, U., Krauss, B., Schmid, E. M., Ocalan, M., Farrell, C., and Risau, W. (1994). Modulation of tight junction structure in blood-brain barrier endothelial cells. Effects of tissue culture, second messengers and cocultured astrocytes. *J Cell Sci* 107 (Pt 5), 1347-1357.

-X-

Xiao, J., and LeDoux, M. S. (2003). Cloning, developmental regulation and neural localization of rat epsilon-sarcoglycan. *Brain Res Mol Brain Res* 119, 132-143.

-Y-

Yamamoto, H., Mizuno, Y., Hayashi, K., Nonaka, I., Yoshida, M., and Ozawa, E. (1994). Expression of dystrophin-associated protein 35DAG (A4) and 50DAG (A2) is confined to striated muscles. *J Biochem (Tokyo)* 115, 162-167.

Yang, X. L. (2004). Characterization of receptors for glutamate and GABA in retinal neurons. *Prog Neurobiol* 73, 127-150.

Yarom, R., Morris, G. E., Froede, R., and Schaper, J. (1992). Myocardial dystrophin immunolocalization at sarcolemma and transverse tubules. *Experientia* 48, 614-616.

-Z-

Zampighi, G. A., Eskandari, S., and Kreman, M. (2000). Epithelial organization of the mammalian lens. *Exp Eye Res* 71, 415-435.

Zampighi, G. A., Hall, J. E., Ehring, G. R., and Simon, S. A. (1989). The structural organization and protein composition of lens fiber junctions. *J Cell Biol* 108, 2255-2275.

Zubrzycka-Gaarn, E. E., Bulman, D. E., Karpati, G., Burghes, A. H., Belfall, B., Klamut, H. J., Talbot, J., Hodges, R. S., Ray, P. N., and Worton, R. G. (1988). The Duchenne muscular dystrophy gene product is localized in sarcolemma of human skeletal muscle. *Nature* 333, 466-469.

Zubrzycka-Gaarn, E. E., Hutter, O. F., Karpati, G., Klamut, H. J., Bulman, D. E., Hodges, R. S., Worton, R. G., and Ray, P. N. (1991). Dystrophin is tightly associated with the sarcolemma of mammalian skeletal muscle fibers. *Exp Cell Res* 192, 278-288.

PUBLICATIONS

Targeted inactivation of dystrophin gene product Dp71: phenotypic impact in mouse retina. Dalloz C.*, Sarig R.*, Fort P.*, Yaffe D., Bordais A., Pannicke T., Grosche J., Mornet D., Reichenbach A., Sahel J., Nudel U. and Rendon A. *Human Molecular Genetics*, vol 12. n°13, pages 1543-1554, 2003. *The authors wish it to be known that, in their opinion, the first three authors should be regarded as joint First Authors

Molecular cloning and protein expression of Duchenne Muscular Dystrophy gene products in porcine retina. Agnès Bordais, Francisco Bolaños-Jimenez, Patrice Fort, Carolina Varela, José-Alain Sahel, Serge Picaud and Alvaro Rendon. *Neuromuscular disorders* (accepted for publication at neuromuscular disorders)

The Sarcoglycan-Sarcospan Complex Localization in Mouse Retina is Independent from Dystrophins. Patrice Fort, Francisco-Javier Estrada, Agnès Bordais, Dominique Mornet, José-Alain Sahel, Serge Picaud, Haydeé Rosas Vargas, Ramón M. Coral-Vázquez, and Alvaro Rendon. (accepted for publication at Neuroscience Research)

Detailed Localization of Dystrophins Dp427, Dp260 and Dp140 at the Outer Plexiform Layer of Mouse Retina. Agnès Bordais, Yannick Schwab, Patrice Fort, Carolina Varela-Rodriguez, Colette Hindelang, Valerie Messent, Serge Picaud, José-Alain Sahel, Michel Roux and Alvaro Rendon. *J. Comp. Neurol.*(In preparation)

Congenital progressive cataract caused by the lack of the Dystrophin-protein Dp71. Patrice Fort, Ramin Tadayoni, David Yaffe, Uri Nudel, José-Alain Sahel, Serge Picaud, Michel Paques, and Alvaro Rendon (In preparation)

SCIENTIFIC COMMUNICATIONS

Visual phenotypic impact of the absence of the dystrophin protein Dp71 in mice. P. Fort¹. (oral communication) « *Short isoforms of dystrophin proteins and associated complexes: update and future directions* » satellite symposium of the « *Congrès de myologie 2005* » (Nantes, France, 2005.)

Visual phenotypic impact of the absence of the dystrophin protein Dp71 in mice. P. Fort, R. Tadayoni, D. Yaffe, U. Nudel, T. Pannicke, A. Reichenbach, J.-A. Sahel, M. Paques and A. Rendon. *Congrès de myologie 2005* (Nantes, France, 2005.)

Identification and localization of the constituents of the sarcoglycan complex in retinæ from wild-type and dystrophins deficient mice (*mdx^{3cr}*). A. Rendon¹, J. Estrada-Mena², A. Bordais¹, J.-A. Sahel¹, RM Coral-Vazquez², H. Rosas-Vargas² and P. Fort¹. « *The Association for Research in Vision and Ophthalmology* » (Fort Lauderdale, Floride, 2005.)

Müller glial cell function in retina : Localization of Kir4.1 and AQP4 channels by the dystrophins-dystrophin associated protein complex. P. Fort, A. Bordais, F. J. Estrada-Mena, D. Yaffe, U. Nudel, J. Sahel and A. Rendon. « *The Association for Research in Vision and Ophthalmology* » (Fort Lauderdale, Floride, 2004.)

Dystrophin-associated glycoprotein complex in Müller glial cells. P. Fort. (oral communication) *6ème Colloque de la Société des Neurosciences, reunion du club des cellules gliales* (Rouen, 2003).

Expression et agrégation du canal potassique Kir4.1 et de l'aquaporine 4 dans la cellule gliale de Müller de souris Ko-Dp71. P. Fort, C. Dalloz, R. Sarig, D. Yaffe, U. Nudel, J. Sahel and A. Rendon. *6ème Colloque de la Société des Neurosciences (Rouen, 2003).*

Expression and Clustered Distribution of the Potassium channel Kir4.1 and Aquaporin 4 in the Retina of Dystrophin protein Dp71 null-mice. C. Dalloz, P. Fort, R. Sarig, D. Yaffe, U. Nudel, T. Pannicke, A. Reichenbach, J. Sahel and A. Rendon. « *The Association for Research in Vision and Ophthalmology* » (Fort Lauderdale, Floride, 2003.)

The role of dystrophin protein Dp71, specifically express by Müller cells, in the vulnerability of the inner retina to transient ischemia. P. Fort, R. Sarig, D. Yaffe, U. Nudel, J. Sahel and A. Rendon. *FENS (Paris, 2002)*

Dystrophin and retina : a new phenotype. P. Fort, R. Sarig, D. Yaffe, U. Nudel, J. Sahel and A. Rendon. « *The Association for Research in Vision and Ophthalmology* » (Fort Lauderdale, Floride, 2002.)

The inactivation of Dystrophin-protein Dp71 in mouse retina induces higher sensitivity of ganglion cells death following transient ischemia P. Fort, R. Sarig, D. Yaffe, U. Nudel, J. Sahel and A. Rendon. Pre-« *The Association for Research in Vision and Ophthalmology* » (Fort Lauderdale, Floride, 2002.)

Inactivation of the only Duchenne muscular dystrophy gene expressed in retinal Müller cells, Dp71: a functional study. P. Fort, C. Dalloz, R. Sarig, D. Yaffe, U. Nudel, J. Sahel and A. Rendon. Müller cell meeting (*Leipzig, Germany, 2001*)

Résumé

Le premier phénotype à avoir été décrit chez les patients souffrant de la dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) est la dégénérescence musculaire progressive liée à l'absence du produit long issu du gène DMD : la dystrophine. Les différents travaux menés par la suite ont conduit à la mise en évidence d'autres troubles chez ces patients, affectant notamment leurs performances cognitives de façon non progressive. Ces travaux ont également permis de montrer que ces affections étaient liées aux produits courts du gène DMD et tout particulièrement à la Dp71.

La Dp71 est le produit du gène majoritairement exprimé dans de nombreux tissus parmi lesquels le système nerveux central y compris la rétine. La découverte au milieu des années 1990, que 80% des patients DMD présentent une perturbation de la neurotransmission rétinienne, nous a conduit à étudier le rôle des dystrophines, et en particulier la Dp71 dans la rétine, à l'aide d'une souris transgénique pour laquelle l'expression de cette protéine a été invalidée. Cette étude nous a permis de montrer que la Dp71 est uniquement exprimé par les principales cellules gliales de la rétine, les cellules gliales de Müller, où elle est seulement accompagnée par l'utrophine, le produit d'un gène homologue du gène DMD. Nous avons ensuite montré que la Dp71 est responsable de la localisation de deux protéines, le canal potassique Kir4.1 et le canal aqueux AQP4 qui sont essentielles à la régulation de l'homéostasie dans la rétine. De plus, l'absence de Dp71 entraîne une augmentation importante de la mort neuronale suite à un épisode ischémique, mettant en exergue l'intervention de la Dp71 dans la régulation de l'homéostasie rétinienne.

Lors de l'étude clinique de la souris déficiente pour la Dp71, nous avons découvert un autre phénomène pathologique lié à l'absence de cette protéine : une cataracte congénitale progressive. Les dystrophines n'ayant jamais été étudiées dans le cristallin, nous avons caractérisé leur expression dans cette structure et montré que la Dp71 est également le produit du gène DMD majoritaire présent. Elle est principalement exprimée à la membrane des fibres secondaires du cristallin où elle colocalise avec le β -dystroglycane et le canal aqueux AQP0. Bien que des études complémentaires soient nécessaires, ces résultats indiquent qu'elle participe à un complexe macromoléculaire responsable de la conservation de l'intégrité de la membrane des fibres secondaires du cristallin.

L'ensemble de ces travaux met en évidence le rôle de la Dp71 dans la vision, aussi bien dans un tissu nerveux, la rétine, que dans un tissu épithélial très spécifique : le cristallin.

Summary

The first phenotype to be described among patients suffering from the Duchenne muscular dystrophy (DMD) is the progressive muscular degeneration related to the absence of the whole DMD gene product: the dystrophin. Various work undertaken thereafter led to the description of others troubles among these patients, affecting in particular their cognitive performances in a nonprogressive way. These works also made it possible to show that these affections were particularly related to the DMD gene short products and particularly Dp71.

Dp71 is the mainly expressed product of this gene in many tissues among which the central nervous system including the retina. The discovery, in the middle of the 1990's, that 80% of the DMD patients present a disturbance of the retinal neurotransmission led us to study the role of the dystrophins and in particular Dp71 in the retina using a transgenic mouse in which the expression of this protein was inactivated. This study enabled us to show that this DMD gene product is only expressed by the main glial cells of the retina, the Müller glial cells, where it is only accompanied by the utrophin, the product of an homologous gene of the dystrophin. We have also shown that Dp71 was responsible for the localization of two proteins essential for the homeostasis regulation of the retina: the potassium channel Kir4.1 and the aqueous channel AQP4. Moreover the absence of Dp71 induce a significant increase in neuronal death following an ischaemic event putting forward the intervention of Dp71 in the regulation of retinal homeostasis.

At the time of the clinical study of the defective mouse for the Dp71, we discovered another pathological phenomenon dependent on the absence of this protein: the development of a progressive congenital cataract. Since dystrophins had never been studied in the crystalline lens, we first characterized their expression in this structure and showed that Dp71 is also there the main DMD gene product and that it is mainly expressed in the membrane of the crystalline lens secondary fibers where it colocalize with the β -dystroglycane and the aquaporin channel AQP0. Although complementary studies are necessary, this seems to indicate that it takes part in a macromolecular complex responsible for the conservation of the integrity of the membrane of secondary fibres of the crystalline lens.

The whole of this work puts forward the role of Dp71 in the vision, as well in one part of the central nervous system, the retina, as in a very specific epithelial tissue, the crystalline lens.