

Université Louis Pasteur

Strasbourg

2005

THESE

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

**ETUDE DU POTENTIEL ENDOGENE DE REPARATION DE
LA RETINE ADULTE**

par

Laura Menu dit Huart

**Discipline: Aspects Cellulaires et Moléculaires de la Biologie
Ecole Doctorale des Sciences de la Vie**

**Soutenance le 14 janvier 2005
devant la commission d'examen composée de**

Pr. C. Dambly-Chaudière

Dr. P. Durbec

Dr. P. Dollé

Pr. A. Beretz

Pr. J.A. Sahel

Dr. T. Lévillard

Rapporteur externe

Rapporteur externe

Rapporteur interne

Examineur

Directeur de thèse

Co-directeur de thèse

**ETUDE DU POTENTIEL ENDOGENE DE REPARATION
DE
LA RETINE ADULTE**

INTRODUCTION

Hypothèse de travail:4

**La rétine est capable de neurogénèse en réponse à une
dégénérescence d'origine génétique**

ETUDES BIBLIOGRAPHIQUES6

**A- Evolution des idées quant à la permissivité du système nerveux central (SNC)
adulte vis-à-vis de la neurogénèse: d'un système «non permissif» à «stem cells,
entity or function?»**6

La glie en tant que précurseur neuronal

**Transdifférenciation de cellules hématopoïétiques versus fusion
cellulaire**

B- La rétine, modèle du SNC.....12

Eléments de développement

Organisation et types cellulaires

Affections rétiniennes, approches thérapeutiques et leurs limites

C- Neurogénèse dans la rétine adulte.....20

La zone marginale ciliaire chez les amphibiens et les poissons

**Des cellules souches rétiniennes caractérisées *in vitro* chez les
rongeurs et chez l'Homme**

D- Réparation d'ADN22

Les maladies liées à des défauts de réparation d'ADN

Réparation des cassures double brin de l'ADN

Recombinaison somatique au cours de la différenciation cellulaire

E- Diversité dans les mécanismes de mort neuronale.....27

Nécrose et apoptose

Signalisations intracellulaires impliquées dans l'apoptose

APPROCHES EXPERIMENTALES ET MODELES ANIMAUX.....	31
Approches expérimentales	
Modèles animaux	
RESULTATS	34
<i>Publication</i>	
DNA repair in the degenerating mouse retina.....	36
<i>Résultats complémentaires</i>	
A- Neurogénèse dans le corps ciliaire.....	37
La dégénérescence entraîne un retard de développement	
La plasticité du corps ciliaire chez l'adulte et chez la souris albinos	
Une voie de signalisation candidate, la voie Wnt	
B- Réparation d'ADN dans les photorécepteurs <i>rd1</i>	38
C- La souris TvA GFAP.....	38
DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....	40
A- Plasticité du corps ciliaire.....	40
B- Réparation d'ADN dans les photorécepteurs en dégénérescence.....	42
C- La glie de Müller, précurseur neuronal rétinien ?	44
CONCLUSION.....	46
<i>Annexe</i>	
TRAVAUX SUPPLEMENTAIRES.....	48
<i>Collaboration avec le laboratoire du Pr. Aucouturier</i>	
A- Suivi <i>in vivo</i> de l'infection au prion chez la Souris CX ₃ CR1-KI GFP.....	48
B- Résultats : visualisation <i>in vivo</i> de l'activation de la microglie.....	49
MATERIEL & METHODES.....	50
A- Injections	50
Intrapéritonéale de BrdU	
Intraoculaire de virus concentré ou de cellules productrices	
B- Culture cellulaire et modes d'infection.....	50
Lignée DF-1	

Production de rétrovirus aviaires de type RCAS A	
Infection d'explant rétinien	
Coculture Df1 infectées/explant rétinien	
Infection de cellules gliales de Müller en culture	
Infection d'astrocytes corticaux en culture	
C- Immunohistologie.....	56
Préparation des tissus	
Anticorps et techniques	
D- Etudes d'expression.....	60
Extraction acides nucléiques	
RT-PCR	
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	67
ABREVIATIONS.....	90

ETUDE DU POTENTIEL ENDOGENE DE REPARATION DE LA RETINE ADULTE

INTRODUCTION

Hypothèse de travail:

La rétine est capable de neurogénèse en réponse à une dégénérescence d'origine génétique

Des résultats récents remettent en question le dogme de non permissivité du système nerveux central des mammifères adultes vis-à-vis de la neurogénèse, permettant de considérer les pathologies neurodégénératives comme régies par un équilibre dommage/réparation, où les symptômes n' apparaissent que si le potentiel de réparation est dépassé.

Le potentiel neurogénique latent du cerveau adulte serait susceptible d'être activé dans certaines conditions de stress aigu: les travaux de Magavi et coll. (1999) ont, les premiers, montré une neurogénèse suite à l'induction d'une dégénérescence neuronale. Ces résultats montrent la production de neurones capables de former des connections synaptiques dans le cortex cérébral de la souris adulte, en réponse à l'élimination photochimique d'une population neuronale corticale spécifique. Plus tard, Nakatomi et coll., (2002), rapporteront une régénération de neurones pyramidaux suite à une dégénérescence neuronale induite par une ischémie expérimentale. Les auteurs présentent une neurogénèse massive, susceptible d'être amplifiée par l'infusion intracérébroventriculaire de certains facteurs de croissance. Dans des pathologies plus évolutives, le potentiel neurogénique du cerveau pourrait également être mis à contribution, comme il l'a été montré dans la maladie d'Alzheimer (Jin et coll., 2004) ainsi que chez des patients atteints de Parkinson (Zhao et coll., 2003).

Ces données permettent d'envisager de nouvelles stratégies thérapeutiques dans des affections du système nerveux central adulte où seule la neuroprotection semblait appropriée.

La rétine est un tissu neurosensoriel appartenant au système nerveux central de par leur origine embryonnaire commune; elle en fait un excellent modèle d'étude. Contrairement à certains amphibiens et poissons, la rétine adulte des mammifères est postmitotique et ne possède pas les

remarquables capacités régénératives retrouvées chez ces espèces assurant une croissance de la rétine qui accompagne celle de l'œil tout au long de leur vie ainsi que sa régénération suite à une lésion. Plusieurs équipes ont cependant caractérisé *in vitro* la présence de cellules souches rétiniennes, chez la souris (Tropepe et coll., 2000) et le rat adultes (Ahmad et coll., 2000) et, plus récemment, chez l'Homme adulte (Coles et coll., 2004). Ce potentiel d'autorenouvellement et de différenciation en cellules neuronales et gliales rétiniennes serait restreint à une population cellulaire localisée dans le corps ciliaire, à l'extrême périphérie de la rétine.

Nous avons fait l'hypothèse que la rétine adulte était capable de neurogénèse et que ce potentiel serait activé dans une rétine en dégénérescence afin de maintenir l'intégrité tissulaire.

La spécificité de certains outils couramment utilisés pour visualiser la prolifération cellulaire, l'incorporation d'analogues de bases d'ADN comme la bromodéoxy-Uridine ou encore l'expression de certaines protéines du cycle cellulaire comme PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen), étant fortement controversée, nous avons décidé de vérifier la validité de l'interprétation souvent prévalente; de ce fait, nous nous sommes intéressés aux mécanismes de réparation d'ADN susceptibles d'impliquer une incorporation de bases d'ADN ainsi que certaines protéines dites « du cycle cellulaire » car nécessaires à toute synthèse d'ADN, précédant une cytophagocytose comme suivant des dommages génômiques.

Avant de décrire nos approches expérimentales, nous présenterons l'évolution des connaissances concernant la neurogénèse dans le système nerveux central adulte; nous aborderons également certains mécanismes de réparation d'ADN ainsi que les mécanismes généraux de la mort neuronale nécessaires à la compréhension de nos résultats.

ETUDES BIBLIOGRAPHIQUES

A- Evolution des idées quant à la permissivité du système nerveux central (SNC) adulte vis-à-vis de la neurogénèse: d'un système «non permissif» à «stem cells, entity or function?»

A partir des années 1870, un débat est lancé sur la nature continue ou contiguë des relations entre cellules nerveuses. Selon la théorie réticulaire, énoncée par Gerlach et Golgi, le tissu nerveux est formé d'un vaste réseau filamenteux continu. Au contraire, selon la théorie neuronale ardemment défendue par Ramon Y Cajal, il est composé d'éléments cellulaires indépendants en relation de contiguïté. Le terme de neurone est introduit dès 1891 par Waldeyer, celui de synapse le suit sous la plume de Sherrington. Ramon Y Cajal fournira de nombreuses descriptions histologiques des différents types de neurones et, devant l'absence de figures mitotiques dans le système nerveux central (SNC) adulte, conclura que l'environnement du SNC adulte n'est pas permissif à une neurogénèse (Ramon Y Cajal, 1928).

L'introduction de la méthode autoradiographique permettant de détecter la prolifération cellulaire après injection de ³H-thymidine, confirmera ces dernières observations (Leblond, 1964).

Pourtant, à la même époque, les travaux de Joseph Altman remettent en question le dogme de non permissivité du SNC adulte des mammifères vis à vis de la neurogénèse (Altman, 1963 et 1969; Altman et Das, 1965 et 1966).

Depuis, de nombreux systèmes ont été étudiés. Le centre vocal supérieur du canari a fourni un bon modèle d'étude à Fernando Nottebohm pour montrer que le comportement sexuel cyclique du chant de cour s'accompagne d'une vague de neurogénèse qui sera suivie d'une vague d'apoptose à la fin de la période de reproduction (Goldman et Nottebohm, 1983; Paton et Nottebohm, 1984).

L'équipe de Samuel Weiss a montré chez la souris femelle, l'activation d'une neurogénèse lors de la mise en présence d'un mâle puis lors du développement du comportement maternel (Shingo et coll., 2003).

Il semblerait donc que des activités mettant en jeu un changement dans la vie de l'individu, comme le comportement cyclique du chant de cour chez les oiseaux, la genèse du comportement maternel ne trouvent pas leur support uniquement dans la plasticité synaptique comme on l'a longtemps cru mais également dans la naissance et l'intégration de nouveaux neurones dans des circuits préexistants.

Aujourd'hui il est admis que chez les mammifères, le cerveau produit continuellement des nouveaux neurones, tout au long de la vie, (revu par Doetsch et Scharff, 2001). La neurogénèse a lieu au niveau de deux sites principaux, le gyrus denté de l'hippocampe où sont formés de nouveaux neurones en grain, et la zone située sous les ventricules latéraux où naissent les neuroblastes qui migrent rostralement vers le bulbe olfactif pour donner de nouveaux interneurons olfactifs. Dans les deux systèmes, Carlen et coll. ont montré la fonctionnalité de l'intégration des nouveaux neurones au réseau préexistant, par une approche originale d'infection rétrograde requérant des contacts synaptiques (Carlen et coll., 2002).

L'identité des progéniteurs du système sous ventriculaire a été étudiée en détail par l'équipe d'Arturo Alvarez-Buylla qui a démontré que des astrocytes accolés aux cellules épendymaires prolifèrent, évoluent en neuroblastes, puis migrent "en chaîne" vers le bulbe olfactif où ils terminent leur différenciation en interneurons olfactifs (Doetsch et Alvarez-Buylla, 1996; Doetsch et coll., 1997; Doetsch et coll, 1999a et b).

Dans l'hippocampe, les neurones en grain du gyrus denté naissent localement, dans la zone sousgranulaire, entre la couche des cellules en grain et le hile; là aussi, les principaux progéniteurs seraient des astrocytes (Seri et coll., 2001).

La glie en tant que précurseur neuronal

La glie regroupe tous les types cellulaires non neuronaux du système nerveux, à l'exception des cellules du système vasculaire et endothélial: la microglie est notamment impliquée dans les réactions immunitaires dans le système nerveux central (SNC); les oligodendrocytes sont les cellules myélinisantes du SNC, augmentant ainsi la rapidité de conduction de l'influx nerveux le long des axones, fonction perdue dans les pathologies de type sclérose. Les astrocytes sont des cellules étoilées qui ont des rôles structuraux, métaboliques et trophiques, ils forment la barrière hémato-encéphalique ou hémato-rétinienne et assurent l'homéostasie extracellulaire, la stabilisation synaptique; ils sont réactifs à différents types de lésions et sous-tendent notamment la réaction de « cicatrice gliale », ils seraient la source des tumeurs du SNC: les glioblastomes.

Les astrocytes de la zone sous ventriculaire génèrent des neurones à l'âge adulte.

La présence, dans la zone sous ventriculaire (ZSV), d'un grand nombre de cellules en prolifération est connu depuis près d'un siècle (Allen, 1912) et a été retrouvée dans un grand nombre d'espèces de vertébrés adultes (Lewis, 1968; Blakemore et Jolly, 1972; Huang et coll.,

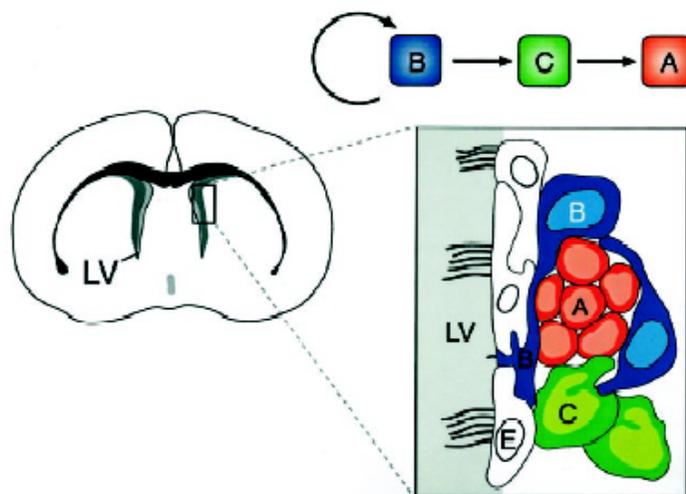
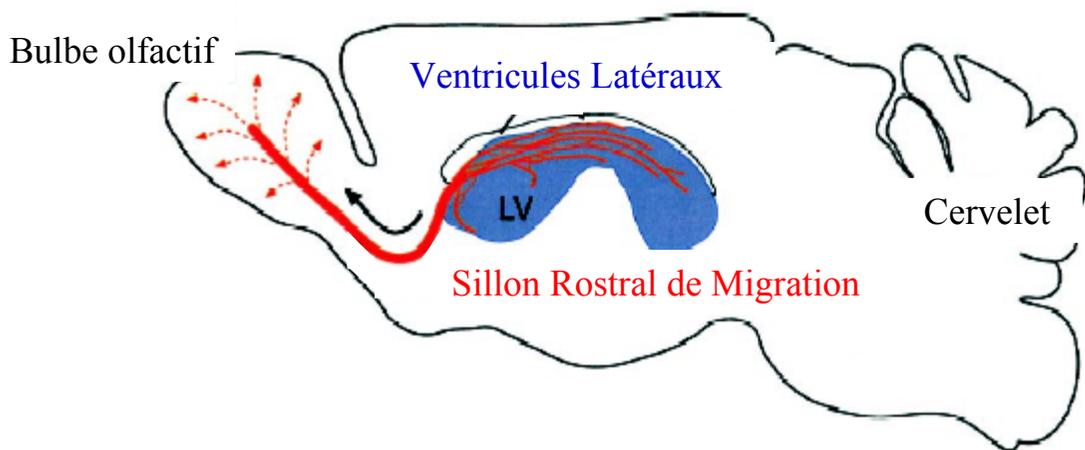


Fig. 1: Les astrocytes de la zone sous ventriculaire sont les précurseurs des interneurons du bulbe olfactif

En haut, schématisation d'une coupe sagittale de cerveau montrant la migration des neuroblastes vers le bulbe olfactif.

En bas, schématisation d'une coupe transversale de cerveau montrant la zone sous ventriculaire d'où sont issus les neuroblastes ainsi que les différents types cellulaires composant cette région, B: astrocytes, E: épendymocytes, les cellules C sont des intermédiaires entre les astrocytes et les neuroblastes A,

Alvarez-Buylla et coll., 2001.

1998; Gould et coll., 1999; Kornack et Rakic, 2001; Eriksson et coll., 1998). Cependant, la nature et le devenir de ces cellules restaient sujets à controverse, la plupart des études suggérant un destin glial (Smart et Leblond, 1961; Privat et Leblond, 1972; Privat, 1977). Certaines études récentes confortent ces résultats (Levison et Goldman, 1993; Goldman, 1995 ; Nait-Oumesmar et coll., 1999), d'autres suggèrent une neurogénèse (Lois et Alvarez-Buylla, 1993).

L'organisation et la composition cellulaire de la zone sous ventriculaire ont été décrites grâce à des études immunohistochimiques et de microscopie électronique (Doetsch et coll., 1997); sur la [Fig.1](#) sont représentés les différents types cellulaires composant la ZSV: les neuroblastes (**cellules de type A**), organisés en chaînes homotypiques (Doetsch et Alvarez-Buylla, 1996; Lois et coll., 1996; Wichterle et coll., 1997), qui coalescent pour former le sillon rostral de migration (Lois et Alvarez-Buylla, 1994), migrent vers le bulbe olfactif pour donner des interneurones; les **cellules de type B**, présentent de nombreuses propriétés propres aux astrocytes, un cytoplasme clair, d'épais faisceaux de filaments intermédiaires de GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein), des gap junctions et des granules de glycogène. Parmi ces cellules, on trouve un troisième type, les **cellules de type C**, qui prolifèrent rapidement.

Ces trois populations cellulaires sont isolées des ventricules latéraux par une couche épithéliale de cellules multiciliées aux quelles avait également été attribué un rôle de progéniteur neuronal (Johansson et coll., 1999); ces résultats n'ont cependant pas été vérifiés (Chiasson et coll., 1999 ; Doetsch et coll., 1999a ; Laywell et coll., 2000).

Dans ce système, il a été possible de reconstituer la généalogie, les astrocytes (**type B**) sont les précurseurs neuronaux: l'ablation des cellules de type C par infusion intracérébroventriculaire d'une drogue antiméiotique conduit à la disparition des neuroblastes. Ce traitement épargne des cellules épendymaires et des astrocytes. Douze heures après l'arrêt du traitement antiméiotique, les astrocytes commencent à proliférer, donnant des cellules de type C, qui, à leur tour, donneront des neuroblastes, régénérant la ZSV en une dizaine de jours (Doetsch et coll., 1999a). L'identité astrocytaire des progéniteurs a été confirmée très élégamment par Doetsch et coll., (1999b), par traçage cellulaire à l'aide d'un rétrovirus aviaire dans le système de la souris TvA-GFAP (Holland et Varmus, 1998). Ce système sera décrit dans [Approches expérimentales et modèles animaux](#), p34.

La glie radiaire, précurseur neuronal pendant le développement

Il existe un dernier type de cellules gliales dans le SNC, la glie radiaire. Dans le cortex en développement, elle joue le rôle de tuteur lors de la migration des neuroblastes puis, périnatalement, lorsque la migration neuronale est terminée, elle se différencie en astrocytes (Rakic, 1971a, b et 1972; Sidman et Rakic, 1973).

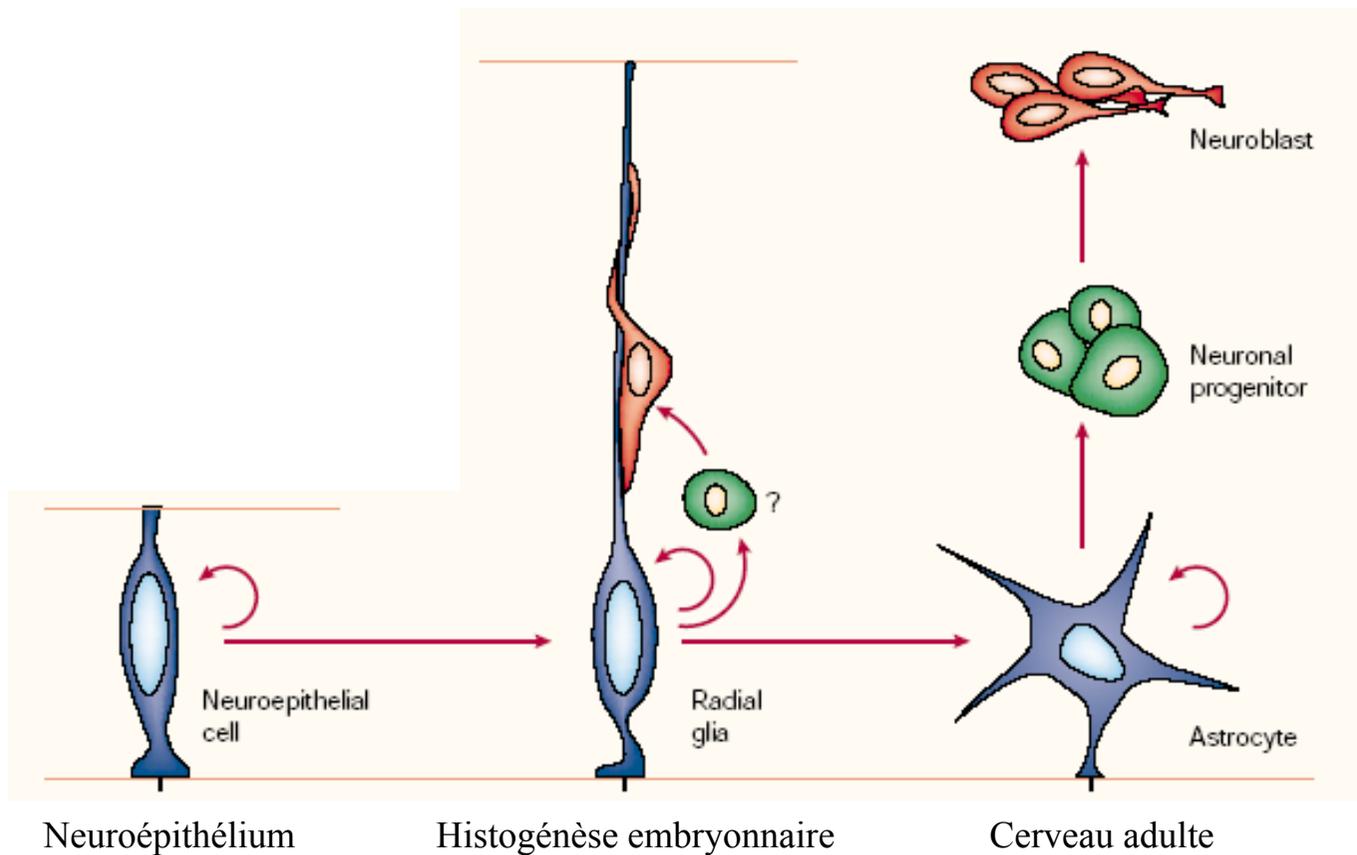


Fig. 2: Hypothèse sur le lignage des cellules souches neurales.

A gauche, les cellules souches neurales peuplent le neuroépithélium, contactant la paroi ventriculaire et la pie mère.

Au centre, la glie radiaire, cellules neuroépithéliales plus différenciées, donnent des neurones et leur servent de tuteur de migration. Leur rôle de progéniteur neuronal assuré, les cellules gliales radiaires se différencient en astrocytes.

A droite, les astrocytes de la zone sous ventriculaire sont capables de donner des neurones dans le cerveau adulte.

Les trois stades précurseurs, neuroépithélial, radiaire et astrocyte, possèdent une extension ciliée dans le liquide céphalo-rachidien.

Alvarez-Buylla et coll., 2001.

A ce rôle structural puis gliogénique, s'ajoute un rôle décrit récemment par plusieurs équipes: pendant le développement du cerveau, la glie radiaire est aussi un progéniteur neuronal (Noctor et coll., 2001 et 2002; Malatesta et coll., 2000 et 2003; Anthony et coll., 2004). Ces travaux sont particulièrement élégants avec notamment des images séquentielles de glie radiaire corticale infectée avec un rétrovirus codant une GFP (Green Fluorescent Protein) donnant un clone constitué de cellules gliales et neuronales (Noctor et coll., 2001) et des résultats de « Cre/loxP fate mapping » avec la souris hGFAP-cre (GFAP glial fibrillary acidic protein) de Zhuo et coll., (2001) pour Malatesta et coll., (2003) et la souris BLBP-Cre (Brain Lipid Binding Protein est une protéine spécifique à la glie radiaire et aux astrocytes pendant le développement du SNC) pour Anthony et coll., (2004): ce système de souris transgénique permet le traçage des cellules exprimant ou ayant exprimé (la limite du système est la demi-vie de la protéine reporteur) la GFAP ou la BLBP. Le principe de la méthode consiste à croiser deux lignées de souris, l'une apportant le système reporteur dont l'expression est conditionnée par un événement de recombinaison qui ne sera rendu possible que par la recombinase Cre apportée par l'autre souris et dont l'expression est conditionnée par le promoteur choisi (ici GFAP).

Chez les oiseaux, et notamment le canari, les zones de forte neurogénèse dans le cerveau adulte sont riches en glie radiaire (Alvarez-Buylla et coll., 1987). Chez les mammifères, rares sont les tissus où subsiste une glie radiaire à l'âge adulte, la glie de Müller rétinienne en est un cas, comme nous le décrirons plus tard ([B- La rétine, modèle du SNC, Organisation et types cellulaires](#), p14).

La glie radiaire est un précurseur d'astrocytes et de neurones au cours du développement, les astrocytes sont des précurseurs neuronaux dans au moins deux régions du SNC adulte; ces observations ont conduit l'équipe d'Alvarez-Buylla à proposer un modèle de lignage des cellules souches neurales, où les précurseurs neuronaux chez l'adulte sont les descendants des précurseurs au cours du développement ([Fig. 2](#), Alvarez-Buylla et coll., 2001).

Tous les travaux montrant la neurogénèse dans la zone sous ventriculaire avec migration des neuroblastes le long du sillon rostral vers le bulbe olfactif, notamment par le laboratoire d'Alvarez-Buylla depuis 20 ans, aboutissent cependant à une dernière publication montrant que l'organisation de ce système produisant des interneurones olfactifs du rongeur au primate diffère chez l'homme; la population d'astrocytes compétents semble présente mais les auteurs ne trouvent pas signe de migration (Sanai et coll, 2004); ces résultats, à première lecture décevants, pourraient s'expliquer par la faible importance de l'olfaction chez l'Homme par rapport à d'autres

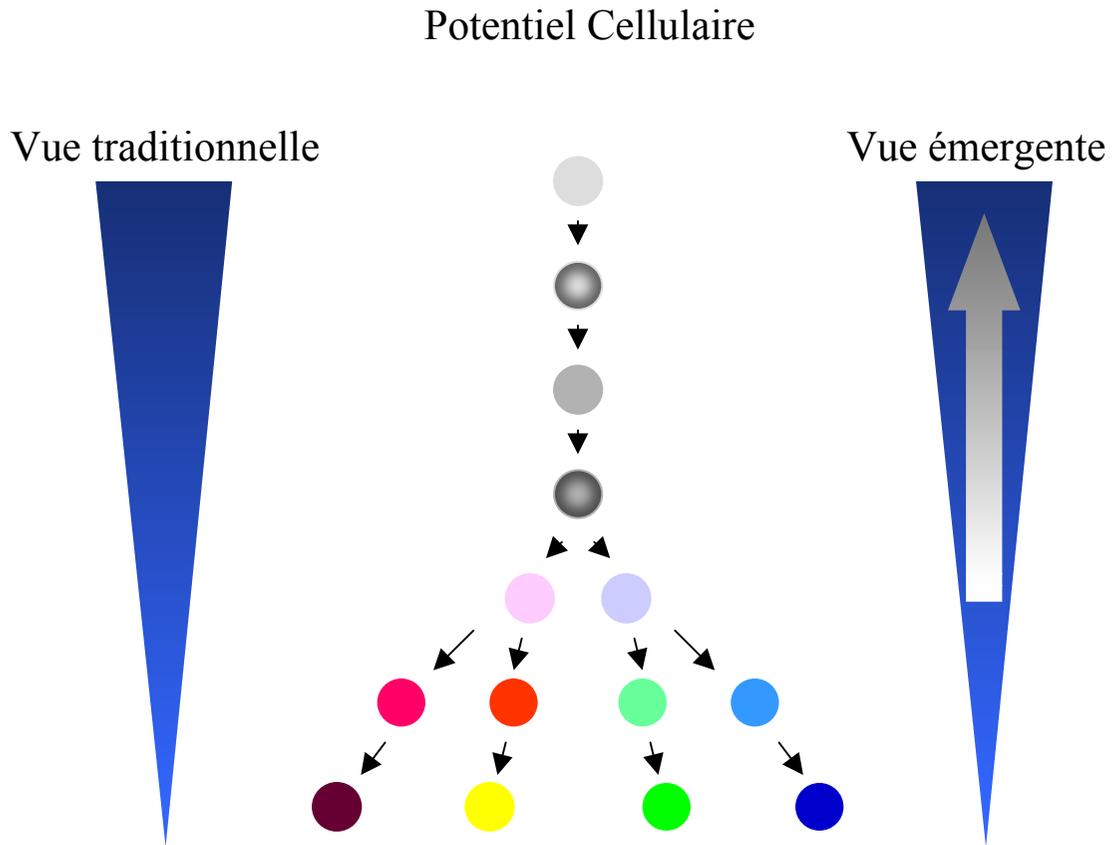


Fig. 3: Deux concepts régissant le potentiel cellulaire:

Le concept traditionnel où la compétence cellulaire est restreinte au cours de la différenciation,

Le concept émergent où la différenciation, phénomène épigénétique, serait réversible (modifié d'après Blau et coll., 2001).

espèces, impliquant une neurogénèse éventuellement plus importante sous-tendant d'autres facultés plus développées chez l'Homme comme la mémorisation.

Les principaux mécanismes moléculaires régissant le lignage neuro-gliale

Les neurones et les cellules gliales sont issus de progéniteurs communs. Chez la Drosophile, le gène *gcm* (*glial cells missing*), détermine le destin glial versus neuronal (Hosoya et coll., 1995; Jones et coll., 1995; Vincent et coll., 1996); chez les mammifères, les homologues de *gcm* sont impliqués dans le développement du placenta (Kim et coll., 1998; Anson-Cartwright et coll., 2000; Schreiber et coll., 2000), suggérant une divergence des mécanismes de gliogénèse au cours de l'évolution. Chez les mammifères, la voie de signalisation Notch représente une des clefs décidant notamment d'un destin glial vis-à-vis d'un destin neuronal (revu par Gaiano et Fishell, 2002): le système Notch est un dialogue intercellulaire ayant des répercussions intracellulaires sur le destin des cellules où Notch, avec ses ligands Delta et Jagged, forment un couple de récepteur/ligand membranaires. L'activation de la voie Notch fait pencher une cellule vers un destin glial notamment en régulant négativement l'expression de gènes proneuraux comme Mash1 ou Neurogenin2, via l'activation de protéines appartenant au complexe Enhancer of Split; réciproquement, l'expression de Delta ou Jagged est induite par des facteurs proneuraux.

$p27^{kip1}$ est un inhibiteur de cyclines; les souris invalidées pour le gène $p27^{kip1}$ présentent un excès de cellules gliales dû à un défaut de sortie du cycle cellulaire des progéniteurs gliaux au cours du développement du cortex et du cervelet (Casaccia-Bonfil et coll., 1999). $p27^{kip1}$ est également impliqué dans la neurogénèse sous ventriculaire; chez la souris invalidée pour ce gène, Doetsch et coll., rapportent un excès de précurseurs C et un défaut de neuroblastes A (Fig1., verso p8 et Doetsch et coll., 2002); $p27^{kip1}$ assure donc le passage de certaines populations cellulaires de la phase proliférative à une phase de différenciation.

Transdifférenciation de cellules hématopoïétiques versus fusion cellulaire

Les études de lignage cellulaire ont amené à la théorie généralement admise selon laquelle la progression des cellules dans une voie différenciation s'accompagnerait d'une restriction de leur potentiel (Fig 3). Ces dernières années, de nombreux travaux ont montré que des cellules différenciées peuvent être reprogrammées permettant même de spéculer que toute cellule, dont le génôme est intact, est potentiellement une cellule souche. Les implications en termes thérapeutiques de ces travaux sont telles, qu'ils ont généré un véritable engouement.

Certains tissus sont connus depuis longtemps pour leurs capacités régénératives, la peau avec les précurseurs de kératinocytes, l'intestin avec les cellules de la crypte, le muscle avec les cellules satellites, le foie également comporte des cellules capables de proliférer après hépatectomie partielle; une souris irradiée léthalement peut être sauvée par injection de cellules de moëlle osseuse, une seule cellule étant capable de reconstituer l'ensemble du système hématopoïétique (Krause et coll., 2001). Tous ces travaux montrent l'existence, dans la plupart des tissus, de cellules capables de donner les différents types cellulaires le constituant et ainsi, de participer à sa régénération.

Des travaux rapportant la contribution de cellules hématopoïétiques greffées, à différents tissus comme le foie (Lagasse et coll., 2000), le muscle squelettique (Ferrari, 1998) et cardiaque (Orlic et coll., 2001a et b), ou encore le système nerveux central (Brazelton et coll., 2000; Mezey et coll., 2000) ainsi que la description de métaplasies dans certaines pathologies humaines (changement de type cellulaire au sein d'un tissu, il a par exemple été retrouvé des cellules de pancréas dans l'intestin, de l'épithélium gastrique au niveau du duodénum ou encore de l'endomètre au niveau des ovaires (Slack et Tosh, 2001)), attestent d'une certaine propension cellulaire à la transdifférenciation.

Un tel potentiel ouvre une thérapeutique applicable à la réparation de virtuellement tous les tissus; cependant, si l'effet bénéfique semble réel dans certains systèmes (Lagasse et coll., 2000; Gussoni et coll., 1999), il ne semble pas dû à une transdifférenciation des cellules hématopoïétiques en neurones ou en hépatocytes mais plutôt à la fusion d'une cellule du donneur avec une cellule différenciée du receveur (Wurmser et Gage, 2002): des résultats de fusion cellulaire *in vitro* (Terada et coll., 2002; Ying et coll., 2002) ainsi que l'analyse caryotypique de « cellules transdifférenciées » (Wang et coll., 2003) ont confirmé le mécanisme de fusion.

L'équipe initiatrice de l'hypothèse de transdifférenciation des cellules hématopoïétiques a récemment publié que la fusion de cellules de moëlle avec des neurones postmitotiques et différenciés, ici des neurones de Purkinje, donne des hétérokaryons stables dont le nouveau noyau acquiert des propriétés de la cellule hôte (Weimann et coll., 2003); l'implication de ces travaux reste potentiellement intéressante, la cellule de moëlle pouvant servir de vecteur.

L'irradiation modifiant les propriétés de perméabilité de la barrière hématoencéphalique (Rubin, 1994), il est vraisemblable qu'elle modifie celle de tous les vaisseaux; cependant des expériences réalisées dans le laboratoire de Snyder, montrent combien, sans procéder à une irradiation, la perméabilité des vaisseaux vis-à-vis de l'extravasation de cellules souches neurales les rend intéressantes en tant que véhicule thérapeutique (Aboody et coll., 2000; Ourednik et coll., 2000).

Dans un modèle de glioblastome induit chez la souris, ces auteurs rapportent une régression de 80% du volume de la tumeur en deux semaines suite à la délivrance locale d'une drogue

antimitotique par des cellules souches neurales modifiées génétiquement injectées localement, dans l'hémisphère contralatéral à la tumeur, ou encore dans la veine de la queue. Les cellules souches neurales injectées sont retrouvées dans et autour de la tumeur.

Il y a quarante ans, étaient conduites les premières expériences montrant la capacité d'un noyau somatique à générer un organisme entier après transfert dans un ovocyte énucléé (Gurdon, 1962). Conduites chez les amphibiens, ces expériences ont ensuite été reproduites chez de nombreuses espèces depuis « Dolly », (Schnieke et coll., 1997).

Le clonage d'animaux adultes par transfert nucléaire à partir d'une cellule somatique vers un ovocyte illustre combien, dans la plupart des cellules d'un organisme, les changements sous tendant la différenciation sont épigénétiques, donc virtuellement réversibles. La revue de Helen Blau "Stem cells, entity or function" (Blau et coll., 2001), écrite pendant la controverse « transdifférenciation/fusion », propose de considérer des états cellulaires plutôt que des types cellulaires, l'état de cellule souche étant susceptible d'être induit dans n'importe quel type cellulaire.

B- La rétine, modèle du SNC

La rétine dérive du neuroectoderme, elle fait un excellent modèle d'étude du SNC par plusieurs avantages qu'elle offre par rapport au cerveau ou à la moëlle épinière:

Elle est particulièrement accessible, une évaluation fonctionnelle est relativement aisée: l'électrorétinogramme permet de mesurer l'activité rétinienne *in vivo*, cette technique permet de visualiser l'activité des différentes classes de neurones qui répondent selon des ondes différentes et ainsi d'évaluer l'efficacité d'un traitement par exemple. Les tests optocinétiques permettent, en faisant varier l'optotype, d'estimer l'acuité visuelle d'un animal.

De nouveaux outils permettant des examens très poussés *in vivo* comme le SLO (scanning laser ophtalmoscope, sera décrit en *Annexe*, p49) continuent à être développés, augmentant le niveau de résolution de l'exploration oculaire. La vascularisation peut ainsi être visualisée très facilement après injection de fluorescéine; certains modèles d'animaux transgéniques permettent de visualiser directement un type cellulaire, comme le montreront les résultats exposés en *Annexe* sur la microglie de la souris CX₃CR1-KI GFP.

L'organisation cellulaire très hiérarchisée de la rétine rend toute perturbation facilement décelable sur simple coloration histologique. De plus il existe de nombreux marqueurs

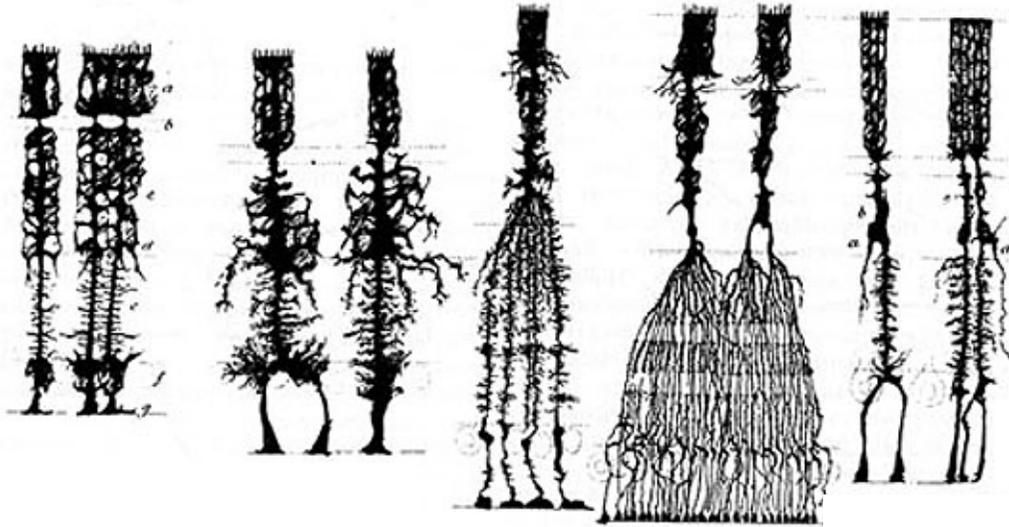
Grenouille

Carpe

Lézard

Poulet

Bovins



Souris

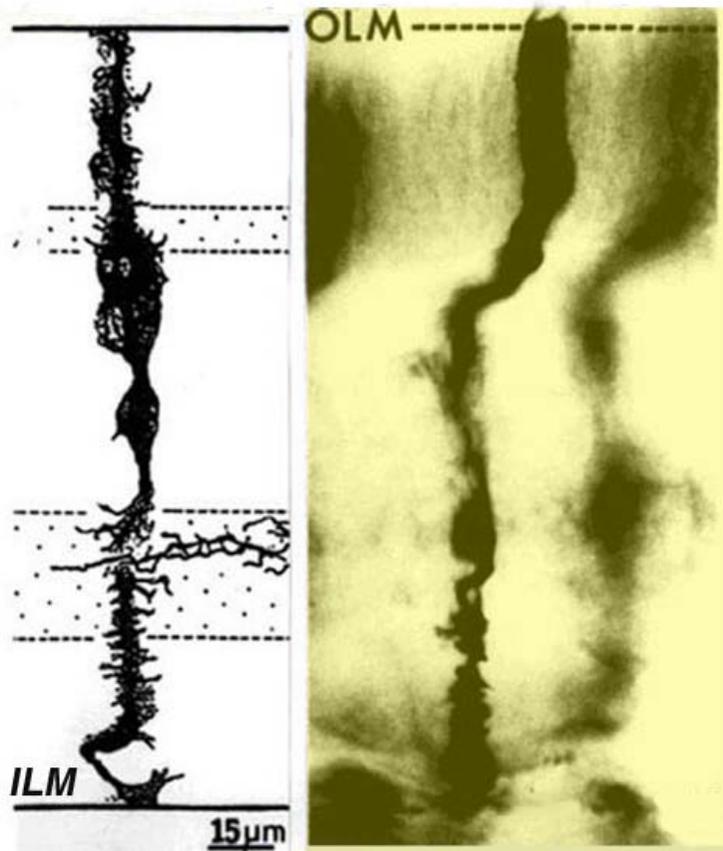


Fig. 6: Les cellules gliales de Müller s'étendent radialement, de la membrane limitante interne (ILM) à la membrane limitante externe (OLM).

Dessins de Ramon y Cajal à partir de colorations par la technique de Golgi,

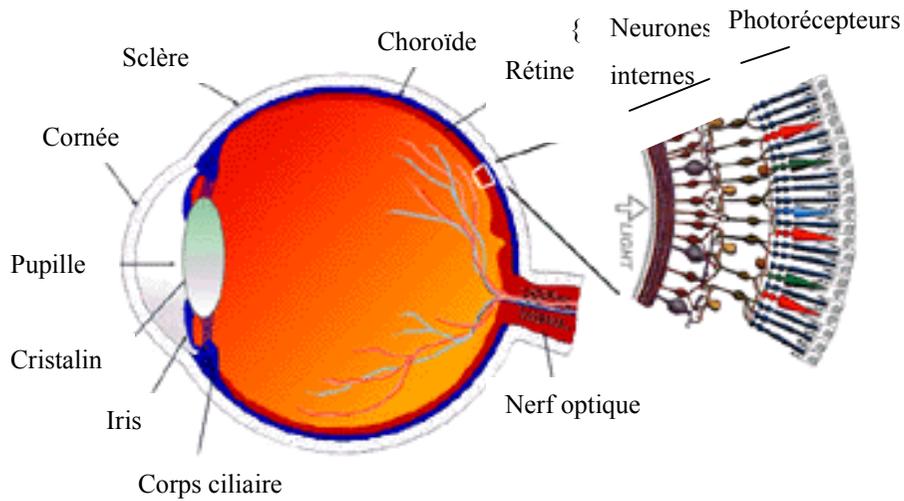


Fig. 4: Schéma de l'œil, détail de la rétine,

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

Epithélium pigmentaire
 Segments externes des photorécepteurs
 Corps cellulaires des photorécepteurs
 Plexiforme externe
 Nucléaire interne
 Plexiforme interne
 Cellules ganglionnaires
 Fibres optiques

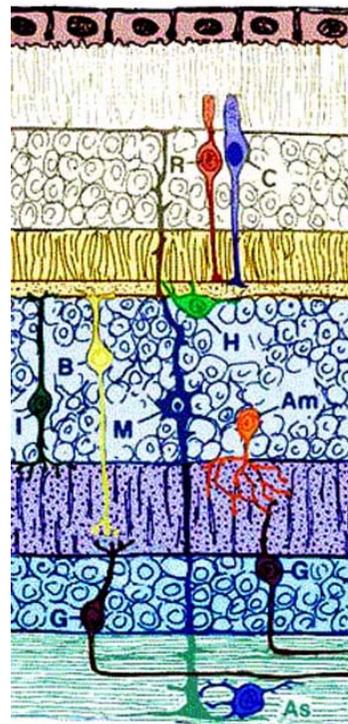


Fig. 5: Organisation de la rétine de vertébré,

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

antigéniques permettant de visualiser les différentes classes de cellules de la rétine (Haverkamp, 2000) ainsi que de nombreux mutants murins fournissant de bons modèles d'étude de pathologies humaines (Chang et coll., 2002).

In vitro, la technique de mise en culture d'explants rétiniens offre un bon modèle d'étude, quoique requérant précision, rigueur et dextérité, afin d'assurer la reproductibilité des résultats.

Organisation et types cellulaires

L'œil des mammifères se compose d'un système optique et de la rétine (Fig. 4). Le système optique comprend deux lentilles, la cornée et le cristallin, et deux milieux liquides, l'humeur aqueuse et l'humeur vitrée. La puissance dioptrique de ce système fait converger les rayons lumineux incidents sur la rétine neuro-sensorielle qui est un système très hiérarchisé et stratifié: les photorécepteurs ont la place la plus éloignée du soleil, contre l'épithélium pigmenté; les rayons lumineux doivent donc traverser toute l'épaisseur de la rétine transparente avant de les atteindre. Les photorécepteurs traduiront les longueurs d'onde auxquelles ils sont sensibles en signaux chimiques qui seront intégrés et transmis par des neurones intermédiaires aux cellules ganglionnaires qui acheminent vers le cerveau le message visuel codé en influx électrique.

Sur une coupe dans l'épaisseur de la rétine, on distingue une alternance de couches nucléaires et plexiformes (Fig. 5): les couches nucléaire puis plexiforme externes contiennent les photorécepteurs, cônes (C) et bâtonnets (R), les couches nucléaire puis plexiforme internes, contiennent les neurones intermédiaires, cellules bipolaires (B), horizontales (H), amacrines (A) et interplexiformes (I), enfin une couche nucléaire plus fine regroupe les noyaux des cellules ganglionnaires (G) dont les axones s'unissent puis traversent la rétine au niveau de la papille pour former le nerf optique qui connecte la rétine au cerveau.

Les cônes sont responsables de la vision en conditions photopiques, colorée, fine, centrale; les bâtonnets sont responsables de la vision en conditions scotopique, en noir et blanc, de la perception des mouvements et plus particulièrement du champ visuel périphérique. Les neurones de la couche nucléaire interne participent au traitement et à l'intégration du signal visuel avec notamment des mécanismes d'inhibition latérale assurant la perception des contrastes.

La rétine possède également des cellules gliales: des cellules microgliales résidentes dans les couches plexiformes, des astrocytes (As) dans la zone des cellules ganglionnaires, et des cellules gliales radiaires, ce qui est assez rare dans le système nerveux central adulte: les cellules gliales de Müller, (M) dont le noyau se situe dans le couche nucléaire interne et dont les prolongements relient la limitante interne et la limitante externe (Fig. 6).

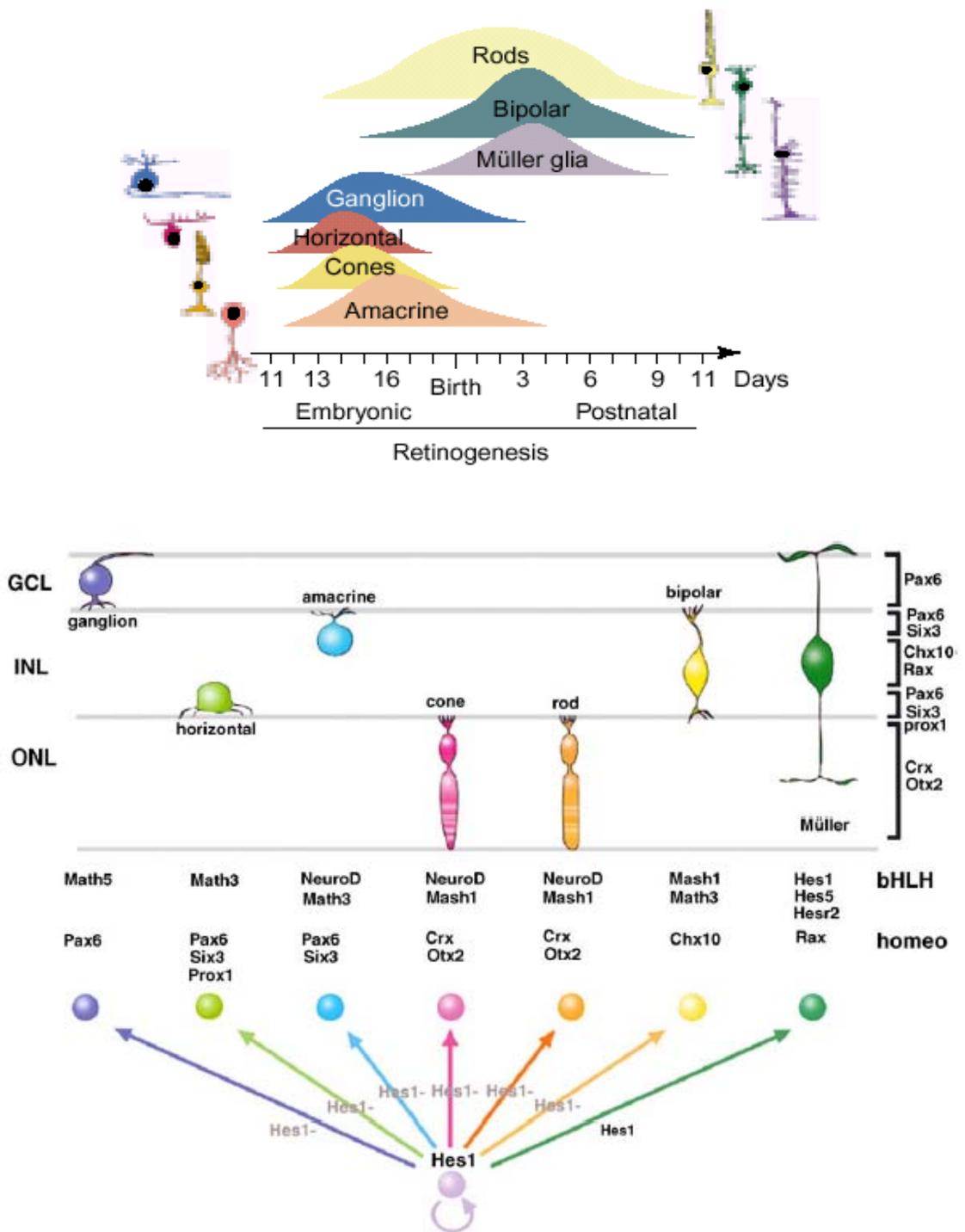


Fig. 9: Différenciation cellulaire rétinienne.

Haut, ordre de naissance des différents types cellulaires rétiniens (les âges concernent la souris), (Marquardt et Gruss, 2002 d'après Young, 1985)

Bas, les facteurs connus pour être impliqués dans le développement des différents types cellulaires rétiniens, (Hatakeyama and Kageyama, 2004).

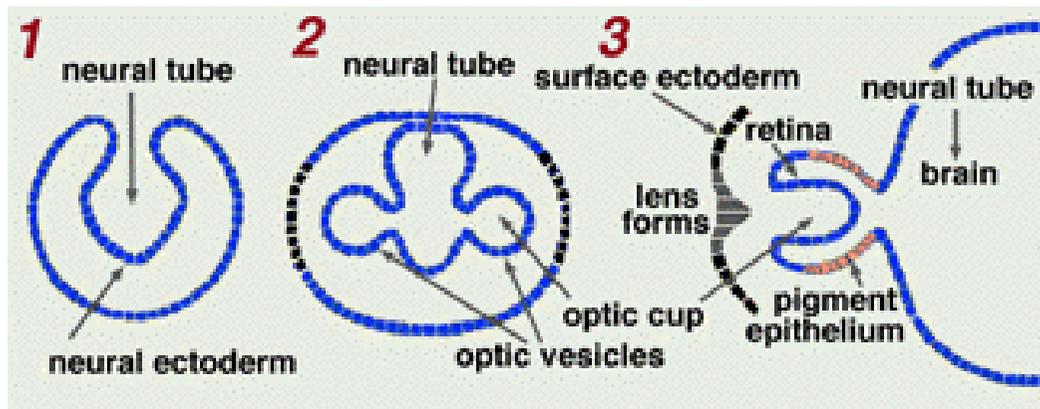


Fig. 8: Embryogénèse de la rétine:

La rétine dérive du neuroectoderme,

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

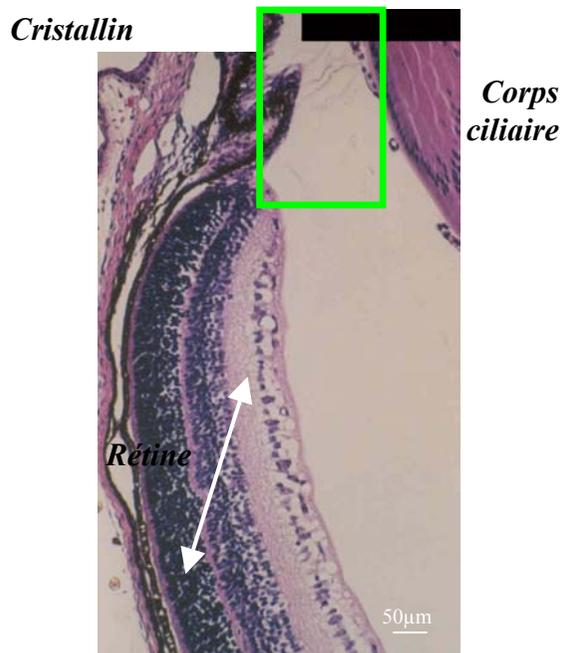
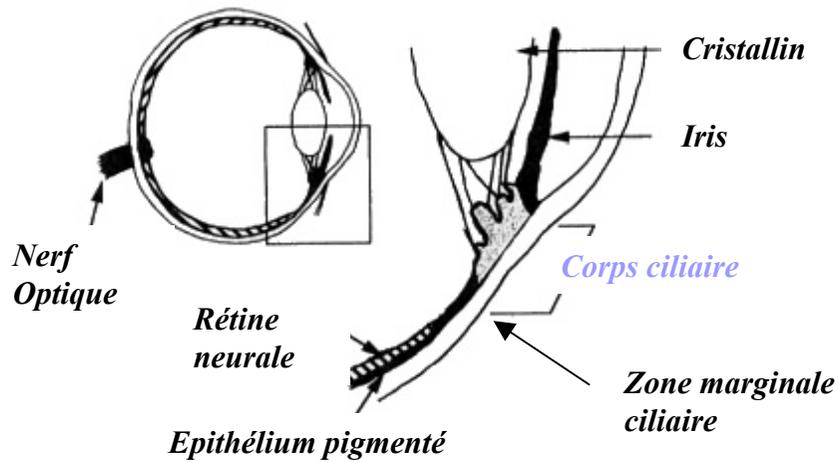


Fig. 7: Le corps ciliaire et la zone marginale ciliaire.

En haut, localisation du corps ciliaire, modifié à partir de Tropepe et coll., 2000,

En bas, coloration histologique d'une coupe de rétine de souris.

En périphérie, la rétine s'affine et se replie en une structure appelée le corps ciliaire (Fig. 7).

La vasculature de la rétine se divise en réseaux dont le plus important se situe au niveau des cellules ganglionnaires; les réseaux secondaires se situant dans les couches plexiformes interne et externe.

Eléments de développement

Au cours du développement de la rétine de vertébrés, la cupule optique est formée par une invagination du neuroépithélium, la partie interne destinée à devenir neurale, la partie externe destinée à devenir épithélium pigmenté (Fig. 8). Des vagues de prolifération cellulaire suivies de vagues de différenciation transforment la monocouche neuroépithéliale en rétine. La différenciation successive et ordonnée des différents types cellulaires (Young, 1985 et Fig. 9 haut), à partir de progéniteurs multipotents (Turner et coll., 1990), fait de la rétine un excellent modèle d'étude sur la question du caractère intrinsèque ou extrinsèque de la destinée cellulaire (Cepko, 1999; Marquardt et Gruss, 2002; Cayouette et coll., 2003). Il a été proposé que l'ordre caractérisant la différenciation rétinienne, reproductible phylogénétiquement, reflète la progression des cellules à travers des stades de compétence (Cepko et coll., 1996).

L'implication de plusieurs gènes dans la différenciation des cellules rétiniennes a été décrite (Fig. 9 bas, revu récemment par Hatakeyama et Kageyama, 2004). On retrouve le rôle central de la voie Notch et de ses effecteurs du complexe Enhancer of Split dans la transition neuronogliale; parmi les gènes impliqués dans la différenciation des différents types de neurones rétiniens, nous ne citerons que *Pax 6*, car nous nous servons de son expression comme preuve du devenir neuronal de certaines cellules. *Pax 6* code pour un facteur de transcription spécifique de l'œil, il est exprimé par différentes populations rétiniennes; son importance est illustrée par sa capacité à induire le développement ectopique d'un œil chez la drosophile (revu par Gehring et Ikeo, 1999).

La différenciation cellulaire procède selon un gradient centrifuge, la rétine périphérique se différenciant après la rétine centrale. La voie de signalisation Wnt a été impliquée dans la biologie de la CMZ, elle serait nécessaire au développement du corps ciliaire (Kubo et coll., 2003).

Les facteurs Wnt sont des glycoprotéines sécrétées qui interagissent avec la famille de récepteurs à sept domaines transmembranaires Frizzled; ces différents facteurs ainsi que les voies de signalisation intracellulaires en aval sont hautement conservés phylogénétiquement.

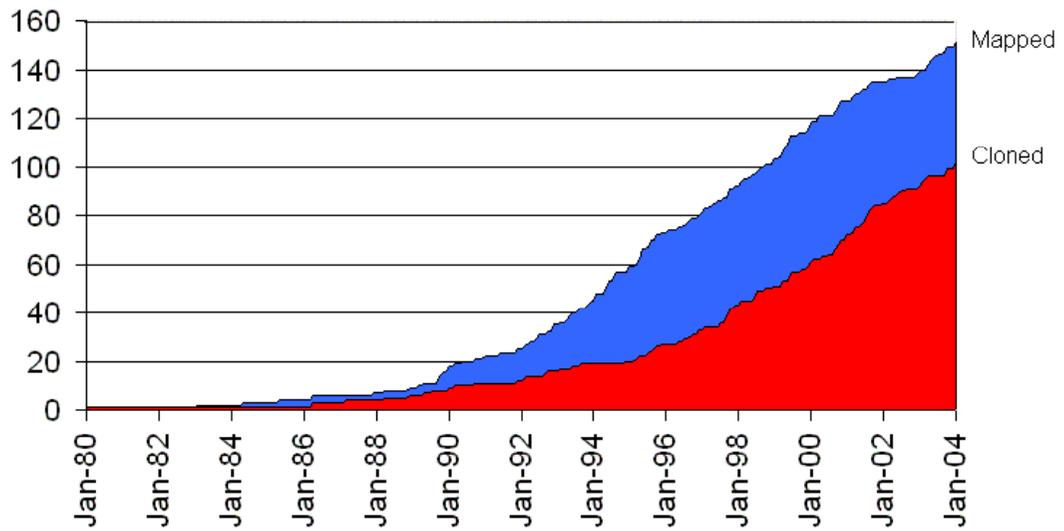


Fig. 11: Gènes impliqués dans des dégénérescences rétiniennes.
 (<http://www.sph.uth.tmc.edu/RetNet/>).

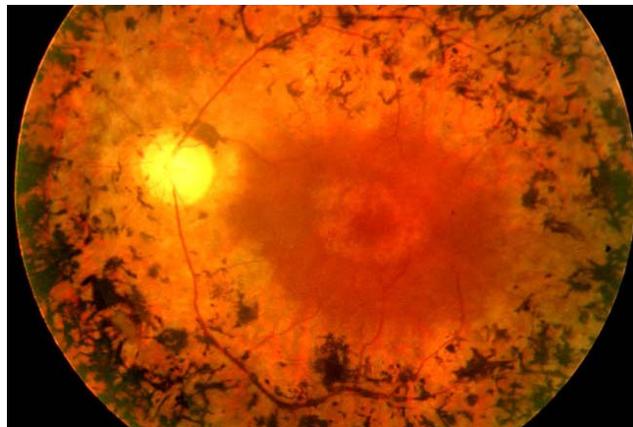


Fig. 12: Fond d'œil d'un patient atteint de *retinitis pigmentosa*,

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

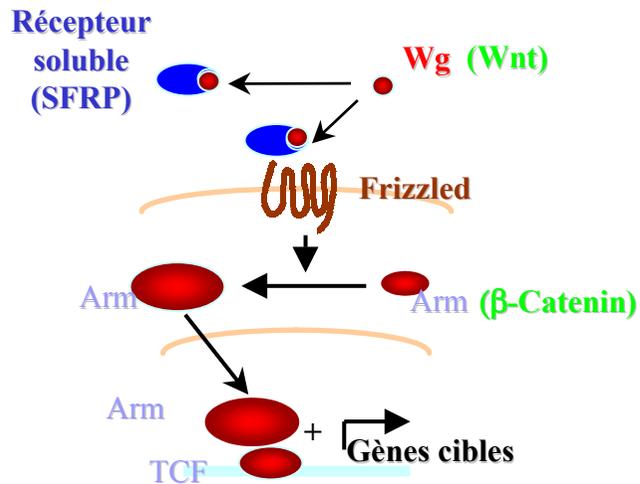
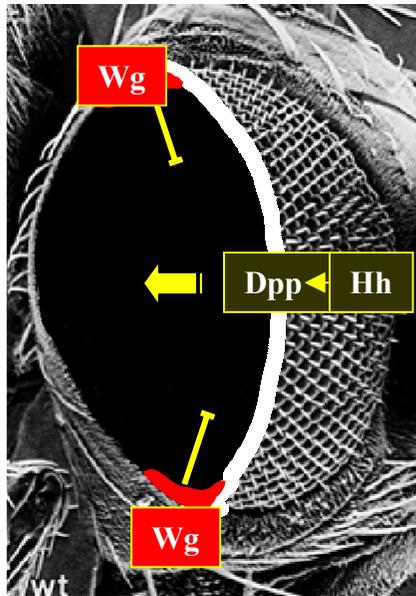


Fig. 10: Rôle de Wingless dans le disque imaginal d' œil chez la drosophile:

En haut, représentation du rôle de Wg qui restreint la différenciation en photorécepteurs à l' intérieur du disque imaginal d' œil.

En bas, signalisation.

Chez les mammifères, la grande complexité de cette voie laisse apparaître son implication dans des transitions prolifération/différenciation à l'origine de la formation de nombreux tissus, ceci étant également illustré par le fait que des mutations affectant cette voie sont retrouvées dans de nombreux cancers humains (revu par Polakis, 2000); son activation bloque la différenciation des précurseurs de certains types cellulaires (Ross et coll., 2000), l'étude de leur homologue *wg* (*wingless*) au cours du développement de l'œil chez la drosophile montre que ce facteur sécrété circonscrit la différenciation en photorécepteurs à la zone centrale du disque imaginal d'œil (Fig. 10 + Hazelett et coll., 1998), cette voie est également impliquée dans le développement de l'œil chez le xénope (Rasmussen et coll., 2001). **Les protéines Sfrp** sont des glycoprotéines sécrétées présentant une grande homologie avec le domaine extracellulaire des récepteurs Frizzled ce qui leur confère un rôle d'inhibition de la voie Wnt par compétition avec les récepteurs membranaires dans la fixation du ligand (Melkonyan et coll., 1997; Rattner et coll., 1997; Hsieh et coll., 1999).

Affections rétinienne, approches thérapeutiques et leurs limites

Les rétinopathies pigmentaires

La rétine est un système extrêmement spécialisé résultant de l'organisation délicate de cellules neuronales, gliales et de vaisseaux sanguins; l'information rétinienne est transmise au cortex visuel par les axones des cellules ganglionnaires qui forment le nerf optique. Une affection, à un des niveaux du système aura des conséquences graves sur la vision.

Les rétinopathies pigmentaires sont un groupe d'affections rétinienne héréditaires présentant une dégénérescence progressive des photorécepteurs conduisant à plus ou moins longue échéance à la cécité.

De nombreuses mutations ont été identifiées dans plus d'une centaine de gènes (Fig. 11) dont la plupart sont exprimés par les bâtonnets, entraînant leur mort par apoptose suivie de celle des cônes. Ont été décrits divers modes de transmission de ces affections. La dégénérescence débute généralement en périphérie, puis évolue vers la cécité en passant par un stade de vision centrale tubulaire. La dégénérescence s'accompagne de dépôts pigmentaires visibles à l'examen du fond d'œil (Fig. 12).

Les différentes approches thérapeutiques (Delyfer et coll., 2004)

De nombreux modèles animaux spontanés ou induits sont disponibles (Chang et coll., 2002) et ont contribué à une grande avancée dans la compréhension des mécanismes physiopathologiques rétinienne ainsi que dans l'élaboration de stratégies thérapeutiques.

Les approches concernent différents niveaux de l'affection: en amont, la thérapie génique consistera à tenter de rétablir l'expression de la protéine initialement mutée; plus en aval, la neuroprotection pharmacologique tendra à ralentir la dégénérescence; la greffe ainsi que toute tentative d'activer un potentiel neurogénique endogène viserait à régénérer le tissu rétinien.

Thérapie génique

La thérapie génique représente la seule approche potentiellement capable de corriger un défaut génétique. Des mutations ayant été identifiées dans virtuellement tous les gènes dont l'expression est restreinte au segment externe des photorécepteurs (Hims et coll., 2003, <http://www.sph.uth.tmc.edu/RetNet>), la thérapie devra comporter un aspect "sur mesure".

Différentes stratégies utilisant des vecteurs viraux ou non viraux ont été développées.

Concernant les mutations conduisant à des pertes de fonction protéiques, le principe de la thérapie est de corriger le défaut génétique en exprimant une version normale du gène dans les cellules où elle est normalement exprimée. Les modèles animaux les plus utilisés, sont la souris *rd1* (retinal degeneration), la souris *rd5* (retinal degeneration slow) et le rat RCS (Royal College of Surgeons); la souris *rd1* porte une mutation récessive dans le gène codant la sous-unité β de la phosphodiesterase cGMP dépendante, une enzyme essentielle de la phototransduction exprimée spécifiquement par les bâtonnets (Bowes et coll., 1990). La dégénérescence chez la souris *rd5* est due à l'absence d'un gène fonctionnel codant pour la périphérine 2, protéine requise pour le développement normal des segments externes des photorécepteurs (Travis et coll., 1991). Le rat RCS présente une mutation dans le gène codant le récepteur tyrosine kinase *Mertk* se traduisant par une incapacité de l'épithélium pigmenté à phagocyter les disques des photorécepteurs (D'Cruz et coll., 2000). Dans ces trois modèles, des essais de thérapie génique ont conduit à ralentir la dégénérescence des photorécepteurs chez la souris *rd1* (Bennett et coll., 1996; Jomary et coll., 1997; Kumar-Singh et Farber, 1998; Takahashi et coll., 1999), la souris *rd5* (Ali et coll., 2000), et le rat RCS (Vollrath et coll., 2001); les résultats les plus convaincants ont été obtenus par l'équipe de Jean Bennett qui a rapporté une rémission définitive chez un modèle canin de dégénérescence rétinienne, le chien RPE65 $-/-$ (Acland et coll., 2001).

Concernant les mutations conduisant à des gains de fonction protéiques, le principe de la thérapie est d'inhiber l'expression de la protéine toxique; ceci a pu être obtenu par différentes techniques dont l'utilisation d'oligonucléotides antisens ou bien de ribozymes (Farrar et coll., 2002). Le laboratoire de Marc LaVail a ainsi obtenu de retarder de plusieurs mois la dégénérescence chez le rat P23H, un modèle transgénique d'une mutation très répandue en Amérique du Nord se traduisant par une dégénérescence rétinienne héréditaire dominante (Lewin et coll., 1998; LaVail et coll., 2000).

Enfin, l'apoptose des photorécepteurs étant la voie commune finale à ces pathologies (Chang et coll., 1993; Portera-Cailliau et coll., 1994), la thérapie génique a également été dirigée vers des cibles situées dans la cascade apoptotique avec pour but, non plus de corriger le défaut initial mais de prolonger la vie des photorécepteurs atteints. Dans un modèle de Drosophile, Davidson et Stellet (1998) ont montré l'efficacité d'un transfert du gène antiapoptotique p35 dans la préservation de la fonction visuelle. Dans des modèles de rongeurs, le transfert du proto-oncogène antiapoptotique bcl-2 retarde la dégénérescence rétinienne (Bennett et coll., 1998; Chen et coll., 1996; Nir et coll., 2000).

Tous ces travaux ont certes contribué à démontrer la puissance de la thérapie génique; cependant un grand nombre d'études rapporte des risques non négligeables mettant en péril la vie du patient (Hacein-Bey-Abina et coll., 2003; Check, 2003 a et b); de nombreux progrès restent donc à faire pour maîtriser l'outil de thérapie génique avant de se risquer à l'utiliser dans des affections non létales comme les dégénérescences rétiniennes.

Neuroprotection pharmacologique

Différentes molécules ont été étudiées, avec plus ou moins de succès, en vue de ralentir la dégénérescence des photorécepteurs et notamment, directement ou indirectement, la dégénérescence secondaire des cônes. Suite aux travaux de Berson et coll., (1993) la supplémentation en Vitamine A est la seule qui soit prescrite à l'heure actuelle dans la plupart des rétinoopathies pigmentaires, le bénéfice réel apporté restant toutefois limité.

La démonstration d'un effet neuroprotecteur du bFGF (basic Fibroblast Growth Factor) dans un modèle de dégénérescence rétinienne héréditaire chez le rat (Faktorovich et coll., 1990) a ouvert la voie aux essais basés sur les facteurs trophiques. Les effets protecteurs aux niveaux histologique et fonctionnel du bFGF reconnus par de nombreuses équipes se doublent d'un effet de néovascularisation rétinienne (Perry et coll., 1995), excluant toute possible utilisation en thérapie humaine.

Depuis, un effet neuroprotecteur a été rapporté pour d'autres facteurs trophiques; le plus étudié, le CNTF (Ciliary Neurotrophic Factor) a été décrit dans de nombreux modèles animaux (Cayouette et Gravel, 1997; LaVail et coll., 1998; Liang et coll., 2001; Bok et coll., 2002); paradoxalement, la neuroprotection morphologique s'accompagne d'une diminution de l'électrorétinogramme (Liang et coll., 2001; Bok et coll., 2002).

Le GDNF (Glial cell line-Derived Neurotrophic Factor) aurait un rôle neuroprotecteur du point de vue morphologique comme fonctionnel (Frasson et coll., 1999).

Selon un autre axe d'étude, certains bloqueurs calciques auraient un effet protecteur mais ces effets restent controversés et pour le moins très variables d'un modèle à un autre.

Greffes

Cette approche peut être divisée en deux voies, l'une visant à remplacer les cellules en dégénérescence, l'autre à protéger les cellules encore présentes grâce à l'effet trophique exercé par le greffon.

La greffe de cellules embryonnaires dissociées ou de couches rétiniennes démontre la survie et ainsi que l'intégration du greffon en terme de connections synaptiques avec la rétine hôte, une amélioration de la fonction visuelle restant toutefois à démontrer (Kwan et coll., 1999; Aramant et Seiler, 1995).

La greffe de cellules d'épithélium pigmenté dans le modèle du rat RCS comme la greffe de bâtonnets dans le modèle de la souris *rd1*, montrent un effet protecteur à distance du greffon qui serait dû à un effet paracrine de facteurs apportés par le greffon (Sahel et coll., 2001; Mohand-Saïd et coll., 1997). Ces observations ont conduit Thierry Lévillard et José Sahel à identifier un premier membre d'une famille de facteurs de survie des cônes sécrétés par les bâtonnets ou RdCVF1 (Rod-derived Cone Viability Factor 1), (Lévillard et coll., 2004). Ces travaux ont un intérêt particulier car toute approche qui permettrait de retarder la dégénérescence des cônes pourrait suffire à maintenir la vision nécessaire à une vie normale chez des patients atteints d'une dégénérescence des photorécepteurs.

Cellules souches

Longtemps, le terme « cellule souche » a été réservé aux stades précoces du développement embryonnaire où, chaque cellule, douée d'autorenouvellement et de totipotence, isolée puis réimplantée est capable de donner un embryon. Chez l'adulte, il a ensuite été utilisé dans le système hématopoïétique, pour définir le stade de progéniteur du lignage; depuis quelques années, le terme « cellule souche » est utilisé chez l'adulte pour définir un progéniteur capable d'autorenouvellement et de différenciation en divers types cellulaires appartenant à un même tissu, on parle des cellules souches de la peau, de la cornée... de tous les tissus décrits comme capables de régénération. La publication de neurogénèse dans le cerveau des mammifères adultes a donc ouvert la voie aux « cellules souches neurales ».

En parallèle de ces études *in vivo*, des travaux de culture cellulaire ont caractérisé *in vitro*, ces cellules souches. Les premières cellules souches neurales de mammifères décrites *in vitro*, sont issues du système nerveux embryonnaire central (Temple, 1989; Cattaneo et Mc Kay, 1990; Reynolds et coll., 1992; Kilpatrick et Bartlett, 1993) et périphérique (Stemple et Anderson, 1992). Ont ensuite été décrits différents systèmes d'isolation et de culture de cellules souches neurales adultes issues notamment des zones connues pour être neurogéniques (Reynolds et

Weiss, 1992; Lois et Alvarez-Buylla, 1993); les travaux les plus significatifs ont été revus (McKay, 1997; Gage, 2000 ; Temple, 2001). Dû à l'absence de marqueurs cellulaires spécifiques, ces populations sont définies rétrospectivement sur la base de leur comportement après dissociation et mise en culture. Différentes recettes de culture adhérente ou en suspension (neurosphères) permettent de maintenir ces cellules dans un état « prolifératif et indifférencié », le retrait des facteurs de croissance permettra leur différenciation en neurones et en cellules gliales.

L'approche régénérative peut être ici aussi être considérée de deux façons: apporter des cellules capables de se différencier en photorécepteurs ou bien activer un potentiel neurogénique endogène; c'est cette dernière approche que nous avons choisi d'étudier.

Concernant la première approche, peuvent être cités certains travaux qui tous montrent le chemin qui reste à parcourir avant que des cellules capables d'autorenouvellement quasi illimité puissent être injectées sans danger dans un œil humain. Différents groupes ont injecté dans le vitré de rats adultes allogéniques des progéniteurs neuronaux cérébraux et rapportent la migration des cellules dans la rétine et leur différenciation en divers types neuronaux, avec une meilleure intégration dans une rétine dystrophique par rapport à une rétine saine; cependant dans aucune des études n'a été rapportée de différenciation en neurones rétiniens (Young et coll., 2000; Nishida et coll., 2000; Pressmar et coll., 2001). Des cellules de rétine embryonnaires (Ahmad et coll., 1999) ont été greffées avec plus de succès par Chacko et coll., (2000) qui rapportent une différenciation en cellules exprimant des marqueurs de photorécepteurs. Une évaluation fonctionnelle est cependant nécessaire avant toute conclusion; de plus l'utilisation de cellules rétiniennes embryonnaires pour la greffe rencontrera selon toute vraisemblance des écueils éthiques et donc législatifs.

Récemment, deux équipes ont tenté une autre approche sous-tendue par les différents travaux montrant la plasticité de cellules dérivées de la moëlle osseuse. Ils auraient démontré la capacité de cellules souches dérivées de la moëlle osseuse à s'intégrer dans la rétine hôte et à exprimer des marqueurs spécifiques des photorécepteurs (Tomita et coll., 2002; Kicic et coll., 2003); de tels travaux ouvrent de nouvelles perspectives, les cellules souches hématopoïétiques pouvant aujourd'hui être purifiées, après enrichissement, à partir du sang périphérique, la greffe de cellules autologues comporterait l'avantage supplémentaire d'éviter tout risque de rejet.

Les dégénérescences rétiniennes s'accompagnent d'une involution de la vasculature supposée être secondaire à la dégénérescence neuronale et refléter la baisse de la demande énergétique; cependant la relation de cause à effet n'a pas été clairement établie. Les travaux réalisés dans le laboratoire de Martin Friedlander rapportent un ralentissement important de la dégénérescence

rétinienne neuronale et vasculaire dans le modèle de la souris *rd1* (cf [Approches expérimentales et modèles animaux](#), p33) suite à l'injection intravitréenne d'une population de précurseurs hématopoïétiques (Otani et coll., 2004). Les mêmes auteurs avaient déjà rapporté l'incorporation de ces précurseurs dans les vaisseaux rétiniens en développement ou lors de phénomènes de néovascularisation suite à une lésion aigüe (Otani et coll., 2002).

Des « cellules souches rétiniennes » ont par ailleurs été décrites, *in vitro*, issues de la rétine adulte de rongeur et, plus précisément, d'une zone particulière: l'épithélium pigmenté du corps ciliaire (Ahmad et coll., 2000; Tropepe et coll., 2000; Coles et coll., 2004, cf [Des cellules souches rétiniennes caractérisées in vitro chez les rongeurs et chez l'Homme](#), p22). La capacité d'autorenouvellement et de différenciation en neurones et glie de ces cellules permet d'envisager d'activer ce potentiel *in situ* en vue de pallier à toute perte cellulaire.

C- Neurogénèse dans la rétine adulte

La zone marginale ciliaire chez les amphibiens et les poissons

La rétine d'un certain nombre de vertébrés est capable de régénération, le poulet embryonnaire, les tritons et salamandres adultes et les poissons téléostéens adultes (revu par Hitchcock et Raymond, 1992 et Hitchcock et coll., 2004).

La persistance de la neurogénèse dans la rétine adulte des poissons est un phénomène connu depuis longtemps (Müller, 1952; Meyer, 1978; Mack et Fernald, 1995). Les nouveaux neurones sont issus de deux populations cellulaires progénitrices différentes: la première région, zone germinative connue sous le nom de Zone Marginale Ciliaire, localisée dans la périphérie circonférentielle de la rétine, consiste en un neuroépithélium situé à la jonction entre la rétine et l'iris assurant une croissance annulaire de la rétine. En parallèle, des nouveaux bâtonnets, issus de progéniteurs localisés dans la rétine interne, sont insinués dans le réseau préexistant (Johns et Fernald, 1981; Johns, 1982; Raymond et Rivlin, 1987; Julian et coll., 1998; Otteson et coll., 2001).

Cette neurogénèse accompagne la croissance de l'œil tout au long de la vie mais assure également la réparation de différents types de lésions (Maier et Wolburg, 1979; Negishi et coll., 1982; Raymond et coll., 1988; Braisted et coll., 1994; Wu et coll., 2001; revu récemment par Hitchcock et coll., 2004).

Il été décrit chez le poulet que la zone anatomiquement équivalente était capable de générer des neurones après l'éclosion (Fischer et Reh, 2000 et 2003).

La croissance annulaire implique une organisation spatiale des cellules proportionnelle à leur niveau de développement, faisant de la CMZ un excellent modèle d'étude des gènes impliqués dans le maintien à un état « indifférencié et prolifératif » versus l'induction d'une différenciation.

Les mécanismes moléculaires sous tendant la neurogénèse dans la Zone Marginale Ciliaire pendant le développement ont été décrits chez le Xénope (Perron et coll., 1998), impliquant notamment le dialogue Notch/Delta ainsi que des voies de signalisation proneurales en aval.

Des cellules souches rétiniennes caractérisées *in vitro* chez les rongeurs et chez l'Homme

L'œil comporte différents types cellulaires pigmentés: les cellules de l'iris, les cellules pigmentées de l'épithélium ciliaire et l'épithélium pigmenté rétinien proprement dit. Anatomiquement, toutes ces cellules appartiennent à un même tissu: l'épithélium pigmenté tapisse le fond de l'œil, doublé sur sa face interne par la rétine; les deux tissus se replient en périphérie pour former le corps ciliaire, aposition de deux couches monocellulaires, dont la couche non pigmentée est la fin de la rétine périphérique (Menu dit Huart et coll., Fig. 1a et 3a, p37); l'épithélium pigmenté quitte ensuite le corps ciliaire pour former l'iris percé au niveau de la pupille. Toutes ces cellules pigmentées semblent bénéficier d'une certaine plasticité morphofonctionnelle:

-l'épithélium pigmenté est capable, après ablation chirurgicale de la rétine, de se dédifférencier, de proliférer et de donner une nouvelle rétine chez l'embryon de poulet, dans un certaine fenêtre de temps (Coulombre et Coulombre, 1965), les amphibiens et les poissons (revu récemment par Hitchcock et coll., 2004). La nouvelle rétine a une polarité inversée, les photorécepteurs sont orientés vers l'intérieur de l'œil et l'on n'observe pas de régénération de l'épithélium pigmenté.

-les cellules de l'iris sont capables, en culture et après infection avec un rétrovirus codant Crx, un facteur de transcription impliqué dans le développement des photorécepteurs (Furukawa et coll., 1997; Chen et coll., 1997), d'exprimer des marqueurs de photorécepteurs (Haruta, 2001).

-l'épithélium pigmenté du corps ciliaire possède des cellules capables, *in vitro*, de proliférer de façon clonale et de se différencier en neurones rétiniens (Ahmad et coll., 1999 et 2000; Tropepe 2000). Les propriétés de cellules souches rétiniennes adultes décrites dans ces travaux concernent exclusivement les cellules pigmentées du corps ciliaire. Récemment, ces travaux ont été suivis par une étude chez l'Homme montrant la présence, en nombre non négligeable, de cellules aux caractéristiques de progéniteurs rétiniens; greffées pendant le développement de l'oeil, ces cellules seraient capables de migrer à travers la rétine et de se différencier en photorécepteurs (Coles et coll., 2004).

D- Réparation d'ADN

Chez l'Homme et le Primate, la neurogénèse adulte est reconnue dans le gyrus denté de l'hippocampe (Eriksson et coll, 1998; Nakatomi et coll, 2002), mais reste encore sujette à controverse dans d'autres régions comme la zone sous ventriculaire, où la "migration en chaîne" des neuroblastes n'a pas été retrouvée (Sanai et coll, 2004), et le cortex cérébral où la prolifération cellulaire elle-même est remise en question (Gould et coll., 1999; Nowakowski et Hayes, 2000; Kornack et Racik, 2001). De nos jours, la technique la plus fréquemment utilisée pour mettre en évidence la prolifération cellulaire est l'injection de bromo-déoxyuridine (BrdU), un analogue bromé de la thymidine, suivie de sa détection par immunomarquage; la BrdU est incorporée par les cellules au cours de la phase S du cycle cellulaire (Nowakowski et coll, 1989). Des précautions sont nécessaires car la grande sensibilité de cette technique permettrait de détecter d'autres phénomènes impliquant une synthèse d'ADN comme certains mécanismes de réparation d'ADN par exemple (Cooper-Kuhn et Kuhn, 2002).

Les maladies liées à des défauts de réparation d'ADN

L'importance des mécanismes de réparation d'ADN est illustrée par l'existence d'au moins quinze maladies génétiques associées dont *xeroderma pigmentosum* (XP), le Syndrome de Cockayne (CS) et la Trichothiodystrophie qui sont des maladies liées à des mutations dans le système de réparation d'ADN par excision de nucléotides ou NER (nucleotide excision repair), (revu par Lehmann, 2003) ou encore le syndrome Ligase IV et certaines immunodéficiences combinées sévères qui sont liées à des mutations dans le système de réparation des cassures double brin par ligation d'extrémités non homologues (NHEJ) .

Nombre de ces affections ont en commun une hypersensibilité à l'exposition solaire, illustrant l'incapacité des cellules de la peau à réparer les lésions induites par les rayons UV. La majorité de ces maladies est associée à une forte prédisposition à développer des cancers.

Les différents systèmes de réparation d'ADN lors d'une cassure simple brin ou double brin, d'un mésappariement de bases, ont été décrits en détail. Dans la complexité de ces systèmes, nous nous focaliserons sur les cassures double brin de l'ADN (DSB double strand breaks).

Réparation des cassures double brin de l'ADN

Des cassures double brin peuvent être générées suite à des processus métaboliques, à l'action d'agents chimiques, de rayonnements, ou bien suite à l'activation de nucléases spécifiques; une cellule de mammifère assurera la réparation par deux mécanismes principaux: la recombinaison homologue (HR) et la ligation d'extrémités non homologues (NHEJ pour non homologous end joining), processus également mis en jeu lors des recombinaisons V(D)J assurant la différenciation des immunoglobulines et récepteurs de lymphocytes T et B (revu par Lees-Miller et Meek, 2003).

Des mutations dans plusieurs gènes dont l'implication est connue dans la réparation de cassures double brin sont responsables d'affections graves: Ku70, Ku80, DNA PKcs, Artemis, XRCC4, et la DNA Ligase IV. Des cellules murines déficientes en l'un de ces facteurs montrent une sénescence prématurée, une sensibilité accrue aux agents chimiques induisant des cassures dans l'ADN et une absence de recombinaison V(D)J.

Ces gènes sont impliqués dans la maintenance de l'intégrité du génôme par le système de réparation de cassures double brin dans l'ADN par NHEJ et dans les recombinaisons V(D)J.

Ku70, est également connu sous le nom de sous unité p70 de l'autoantigène Ku. Certains patients atteints de *lupus erythematosus* (une grave maladie de peau), produisent une grande quantité d'autoanticorps dirigés contre p70 et p80; Reeves and Sthoeger, (1989) ont utilisé du sérum d'un tel patient pour isoler la protéine puis cloner le gène codant Ku70.

Ku80 (Taccioli et coll., 1994; Difilippantonio et coll., 2000) est également connu sous le nom de sous unité p80 de l'autoantigène Ku ou encore XRCC5 (X-ray cross-complementing 5) a été isolé puis cloné par Jeggo et coll., (1992), lors d'un essai fonctionnel visant à restaurer la

capacité à réparer les cassures double brin dans une lignée de cellules CHO déficientes (Chinese hamster ovary);

Après séquençage de la DNA hélicase II, Tuteja et coll., (1994) ont rapporté que l'autoantigène Ku n'est autre que la DNA hélicase II.

Les deux sous-unités 70 et 80, forment un hétérodimère ayant une structure en anneau (Walker et coll., 2001) qui a une forte affinité pour les cassures double brin mais également une affinité avec les extrémités chromosomiques variable en fonction de la phase du cycle cellulaire.

DNA PK, la protéine kinase DNA dépendante est une sérine/thréonine kinase nucléaire présentant une sous unité catalytique (cs) inactive sans la composante Ku 70-80 qui la dirige vers les cassures double brin et active son activité kinase. Le localisation chromosomique du gène codant **DNA PKcs** coïncide avec celle codant XRCC7 (Siple et coll., 1995), le gène dont le produit complémente les défauts de réparation d'ADN et de recombinaison V(D)J chez des cellules de souris scid (severe combined immunodeficient), (Kirchgessner et coll., 1995; Miller et coll., 1995; Araki et coll., 1997).

Shieh et coll., (1997), ont démontré la capacité de DNA PKcs à phosphoryler p53, empêchant ainsi l'inhibition de mdm2 sur la transactivation dépendante de p53; cependant, DNA PKcs ne serait pas indispensable dans la réponse dépendante de p53 aux dommages à l'ADN: l'accumulation, la phosphorylation, la localisation nucléaire et la liaison à l'ADN de p53 sont normales suite à l'irradiation de fibroblastes de souris déficientes en DNA PKcs (Jimenez et coll., 1999).

DNA PK forme un complexe avec Artemis (Ma et coll., 2002).

Artemis possède une activité 5'-3' exonucléase essentielle à la réparation de certaines cassures double brin; par la formation d'un complexe avec DNA PK, elle acquiert une activité endonucléasique essentielle lors des recombinaisons V(D)J.

Différentes mutations dans Artemis sont responsables de syndromes d'immunodéficience combinée sévère chez l'Homme (Moshous et coll., 2001)

XRCC4 (X-ray cross-complementing 4) a été cloné par essai fonctionnel dans des cellules CHO particulièrement sensibles aux rayons gamma, (Giaccia et coll., 1990 puis Otevrel et Stamato, 1995); son rôle dans la réparation de l'ADN et les recombinaisons V(D)J a été décrit par Li et coll., (1995). Afin de caractériser le rôle de XRCC4 *in vivo*, Gao et coll., (1998) ont généré des souris chez qui le gène avait été inactivé: le phénotype de léthalité embryonnaire tardive s'accompagne d'une lymphogénèse incomplète et d'une neurogénèse défectueuse se manifestant

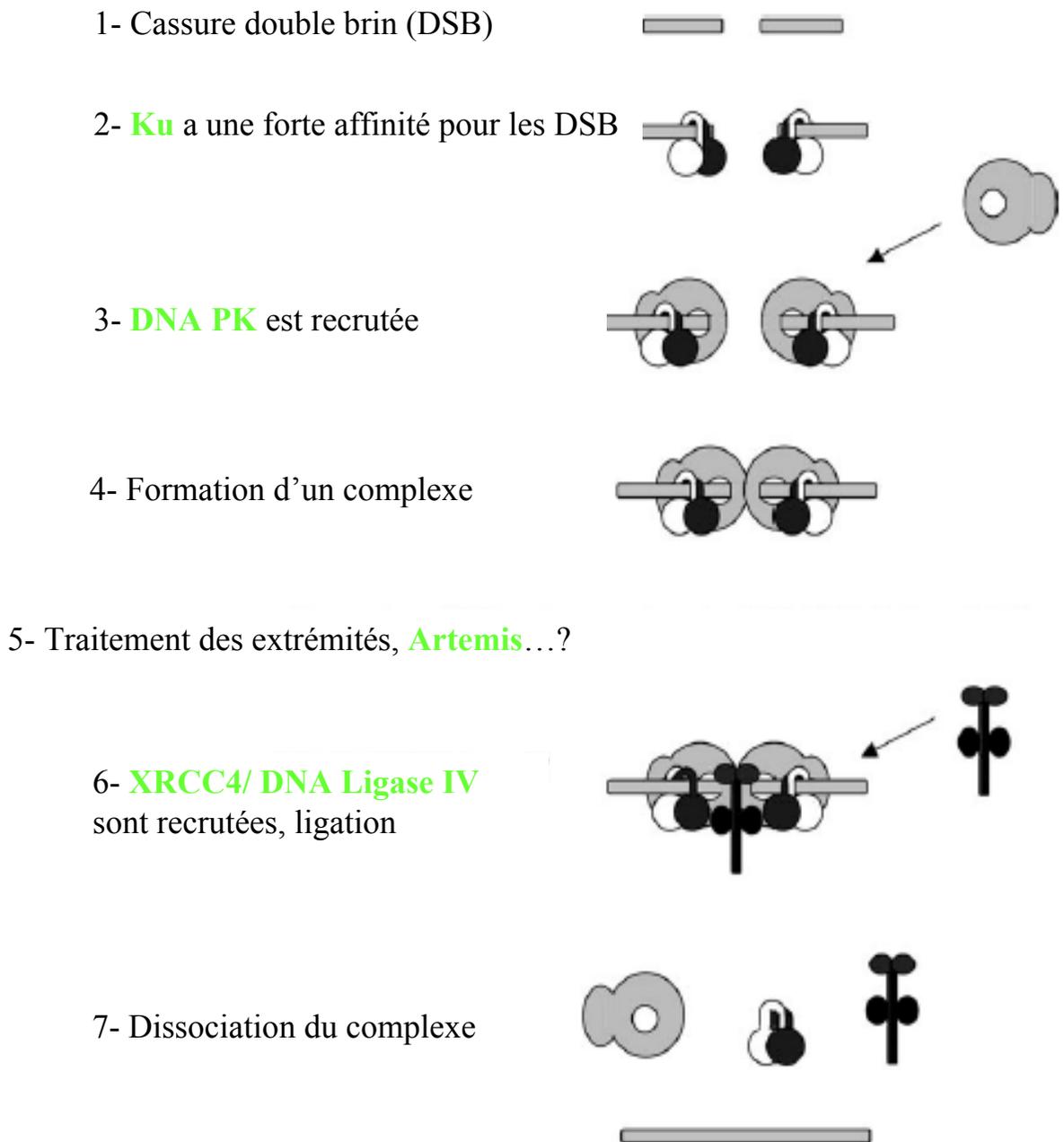


Fig. 13: La réparation de cassures double brin de l'ADN par NHEJ,
 Modifié à partir de Lees-Miller et Meek, 2003.

par la mort massive par apoptose de jeunes neurones; la même équipe a décrit un phénotype similaire chez des souris dont le gène de la Ligase IV a été inactivé.

La **DNA Ligase IV** a été clonée en 1995 dans le laboratoire de Thomas Lindahl par homologie avec d'autres ligases (Wei et coll., 1995), la même équipe l'a retrouvée dans des cellules HeLa en culture (Robins et Lindahl, 1996). Des souris déficientes en DNA Ligase IV présentent une léthalité embryonnaire, une apoptose neuronale massive, une lymphogénèse incomplète ainsi que divers défauts cellulaires (Barnes et coll., 1998; Grawunder et coll., 1998; Frank et coll., 1998 et 2000).

Les différentes réactions mises en jeu lors du NHEJ sont schématisées sur la [Fig. 13](#): Ku70, Ku80 forment un hétérodimère ayant une forte affinité pour les extrémités double brin d'ADN, ils activeront la sous unité catalytique de la protéine kinase DNA dépendante (DNA PKcs) en stabilisant son interaction avec les extrémités d'ADN. Ils seront rejoints par l'hétérodimère Ligase IV/XRCC4 qui permettra la ligation des deux extrémités d'ADN.

Recombinaison somatique au cours de la différenciation cellulaire

Il existe au moins deux systèmes où des recombinaisons de l'ADN accompagnent la différenciation cellulaire: la méiose, pendant la formation des gamètes, où des recombinaisons ont lieu entre régions homologues, sources de diversité génétique (revu récemment par Kauppi et coll., 2004) et la lymphogénèse, où des recombinaisons sont nécessaires à la formation des gènes qui seront transcrits en immunoglobulines et récepteurs antigéniques de lymphocytes B et T, assurant la diversité de notre répertoire immunologique (Dreyer et Bennett, 1965).

La diversité de notre répertoire immunitaire s'accompagne de phénomènes de recombinaisons somatiques connus sous le nom de recombinaisons V(D)J (variable, diversity, joining) (Hozumi et Tonegawa, 1976; Sakano et coll., 1979; Sakano, 1980); la mise en évidence des recombinaisons géniques à l'origine des immunoglobulines a été le premier système de recombinaison somatique décrit (Dreyer et Bennett, 1965), provoquant une grande surprise car défiant le dogme de stabilité du génôme. Ces mécanismes, permettant aux gènes d'être ensuite transcrits, ont lieu dans les cellules lymphoïdes des lignées B et T, à un stade précoce de leur différenciation; ils impliquent notamment un complexe enzymatique (endonucléase + ligase) dans des réarrangements plus ou moins précis des gènes codant les immunoglobulines et les récepteurs antigéniques des lymphocytes B et T.

Le phénotype neuronal des deux mutants XRCC4 et DNA Ligase IV (Gao et coll., 1998), les deux effecteurs de la phase finale de réparation des cassures double brin, a ravivé l'hypothèse, selon laquelle la différenciation neuronale s'accompagnerait de recombinaisons d'ADN (Abeliovitch et coll., 1992; Matsuoka et coll., 1991; Chun et Schatz, 1999; Gilmore et coll., 2000)

Le cerveau, comme le système immunitaire, reconnaît et mémorise de nombreux signaux, permettant d'établir d'intéressants parallèles (Jerne NK, 1967); certains auteurs ont fait l'hypothèse que la diversité neuronale s'accompagnerait de recombinaisons somatiques (Abeliovitch et coll., 1992; Matsuoka et coll., 1991) mais ceci n'a jamais été clairement démontré.

L'élégante approche de Eggan et coll., a consisté, non pas à séquencer puis comparer systématiquement deux types de neurones, mais à cloner une souris par transfert nucléaire d'un neurone à un ovocyte, démontrant ainsi que le noyau d'un neurone olfactif, postmitotique et différencié, possède la même information génétique que la cellule la plus précoce de l'organisme; un neurone olfactif ne possédant qu'un type de récepteur olfactif, il est important de noter que la souris clonée présentait un répertoire de récepteurs olfactifs normal, argument laissant peu de place à la possibilité de recombinaison au cours de la différenciation (Eggan et coll., 2004).

Les différenciations cellulaires s'accompagnant de recombinaisons somatiques restent donc pour l'instant une exception; la différenciation neuronale ne semble donc pas être le résultat de modifications génétiques irréversibles mais plutôt être sous-tendue par des contraintes épigénétiques (Rideout et coll., 2001), dans certaines conditions, réversibles.

Le phénotype neuronal des deux mutants XRCC4 et DNA Ligase IV, révèle donc plutôt l'occurrence de cassures dans l'ADN au cours du développement du système nerveux central (SNC). Le développement du SNC implique l'élimination par apoptose de 15 à 40% du nombre de neurones générés (Finlay et Slattery, 1983; Ferrer, 1992; Spreafico, 1995; Verney, 2000): les neurones dont l'ADN est réparé survivraient, ceux dont l'ADN n'est pas réparé, ou mal, seraient éliminés. Il existe un débat quant à la valeur des données chiffrées avancées concernant l'ampleur de l'apoptose au cours du développement. La critique concerne les deux techniques utilisées couramment: TUNEL (Gavrieli, 1992) et ISEL (Wijmsman et coll., 1993); le principe de ces deux techniques est basé sur la capacité d'une Terminal déoxynucleotidyl Transférase apportée par l'expérimentateur à ajouter des nucléotides marqués au niveau de toutes les extrémités 3'OH de l'ADN. Conceptuellement, l'ajout de nucléotides marqués pourrait se faire dans des cellules qui ne seraient pas en train de mourir, mais dont l'ADN aurait été lésé. Ces

techniques sont développées pour être le plus sensible possible, mais il n'aurait pas été prouvé qu'elles ne détectent que des cellules mourantes (Gilmore et coll., 2000). Des études utilisant la technique TUNEL estiment la mort cellulaire à quelques % du nombre de neurones générés (Thomaidou, 1997) alors que des études utilisant la technique ISEL avancent des chiffres de l'ordre de 50 à 70% (Blaschke et coll., 1996 et 1998).

E- Diversité dans les mécanismes de mort neuronale

La complexité des mécanismes de mort cellulaire est décrite selon deux mécanismes généraux, la nécrose et l'apoptose. Ces deux modes se différencient par des évolutions cellulaires caractéristiques qui reflètent leur rôle différent.

L'apoptose est dite «mort cellulaire programmée», elle n'est pas accompagnée de phénomènes inflammatoires et pourra affecter des cellules isolées, c'est elle qui permet notamment un équilibre avec les mitoses pendant le développement.

Nécrose et apoptose

La nécrose a initialement été décrite par Schweichel et Merker, (1973) qui distinguaient deux types selon qu'elle impliquait le lysosome ou non: la nécrose est une mort cellulaire qui affectera généralement des plages de cellules et qui s'accompagne de phénomènes inflammatoires. Elle a été décrite au cours du développement du système nerveux central et dans certaines pathologies neurodégénératives. Du point de vue ultrastructural, elle se caractérise par la dilatation des organites intracellulaires, suivie de l'apparition de vacuoles dans le cytoplasme, accompagnées de l'autodégradation de la cellule.

Les mécanismes moléculaires sous tendant la nécrose ont essentiellement été étudiés chez la levure (Klionsky et Emr, 2000; Ohsumi et coll., 2001).

L'apoptose (gr. *apo*, loin de et *ptôsis*, chute) a été décrite pour la première fois en 1972 (Kerr, Willie et Curie, 1972 ; revu récemment par Yuan et Yankner, 2000). Cette évolution cellulaire appelée est caractérisée par des changements morphologiques généraux du noyau et du cytoplasme, la chromatine se condense à la périphérie du noyau, puis la membrane nucléaire se désintègre, la membrane cellulaire apparaissant intacte subit cependant des déformations en doigts de gant que lui impose le cytoplasme, l'ADN génomique est dégradé par coupures

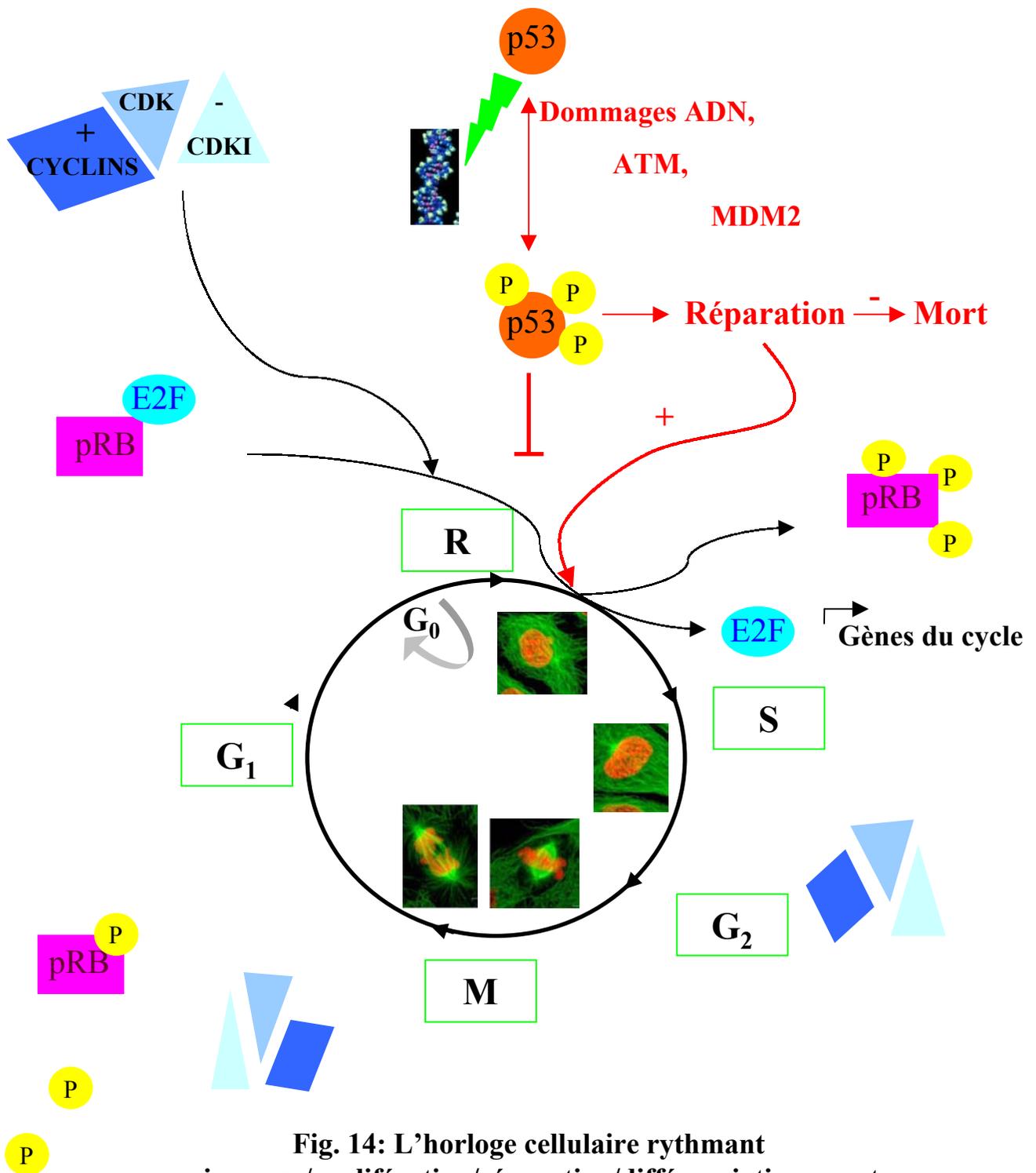


Fig. 14: L'horloge cellulaire rythme quiescence/prolifération/réparation/différenciation, mort.

R, à partir de ce «point de restriction», (Pardee, 1989), la cellule entre dans le cycle de façon autonome, c'est-à-dire indépendamment de la présence de sérum dans le milieu.

endonucleasiques en des sites régulièrement espacés. La cellule en apoptose paraît émettre des signaux stimulant une phagocytose rapide par les macrophages et les cellules adjacentes de sorte que les cellules apoptotiques disparaissent sans laisser de traces décelables.

L'aspect intrinsèquement «programmé» de ce mécanisme de mort a été particulièrement mis en évidence par des études génétiques réalisées chez *Caenorhabditis elegans*, où deux gènes, appelés *ced-3* et *ced-4*, ont été identifiés comme nécessaires pour que survienne la mort des 131 cellules qui disparaissent au cours du développement de chaque vers, finalement composé de 1030 - 131 soient 899 cellules (Metzstein et coll., 1998).

Dans la rétine *rdl*, l'expression par les bâtonnets de la Phosphodiesterase cGMP-dépendante (PDE6B) au cours de leur différenciation, entraîne leur dégénérescence selon une voie apoptotique (Chang et coll., 1993, Portera-Cailliau et coll., 1994). Les auteurs ont montré que les vagues de mort cellulaire accompagnant les vagues de différenciation de chaque type ainsi que la mort des bâtonnets suite à l'expression de la mutation, se faisaient par apoptose avec fragmentation de l'ADN détectée par la figure caractéristique «en échelle» après migration de l'ADN sur un gel de séparation (Wyllie, 1980).

Signalisations intracellulaires impliquées dans l'apoptose

La voie p53

p53 code pour un facteur de transcription (Harlow et coll., 1985) qui a été élu en 1993, "Molécule de l'année" par le magazine Science: le gène *p53* est retrouvé muté dans plus de la moitié des cancers humains. Une banque de données a été créée par Hollstein et coll., (1994); enrichie par les données détenues par l'Agence Internationale de Recherche sur le Cancer (Lyon, France) et mise à jour régulièrement, elle répertoriait, déjà en 1997, plus de 6000 mutations de *p53* impliquées dans des cancers humains.

p53 est au centre de multiples signaux de stress cellulaire et provoquera des réponses comme l'arrêt du cycle cellulaire, la différenciation, l'apoptose ou encore la réparation d'ADN (revu par Levine, 1997 et Vousden et Lu, 2002); son rôle est essentiel au niveau du point de restriction du cycle cellulaire, à la transition G1/S où il aura un rôle permissif ou non sur l'entrée dans le cycle induite par la phosphorylation de pRB en fonction de l'état de l'ADN (Fig.14): *p53* est une protéine "suppresseur de tumeur", elle induit l'apoptose en réponse à un stress potentiellement oncogénique.

En « conditions normales » comme en « situation de stress », *p53* est finement régulé notamment par une boucle de rétrocontrôle impliquant **MDM2** (Wu et coll., 1993). *p53* est capable d'activer

l'expression de MDM2 qui rétroagira à trois niveaux: premièrement, MDM2 est capable de fixer p53 dans son domaine de transactivation, empêchant ainsi ses effets sur l'expression de gènes; MDM2 est également impliqué dans l'exportation de p53 hors du noyau. Des molécules agissant sur la voie p53 ont potentiellement un intérêt thérapeutique: récemment, Vassilev et coll. ont montré qu'un inhibiteur de MDM2, capable de se fixer dans une poche hydrophobe de MDM2, inhibant ainsi la liaison à p53, administré oralement, empêche la croissance de tumeurs dérivant d'un ostéosarcome humain implanté chez des souris nude (Vassilev et coll., 2004).

Les souris invalidées pour le gène *p53* se développent normalement; avec l'âge, avec l'âge elles présentent cependant une plus grande susceptibilité à développer des cancers (Donehower et coll., 1992). Deux équipes ont démontré que la dégénérescence *rd1* ne requérait pas le gène codant p53: les souris *rd1*^{-/-}; *p53*^{-/-} présentent une dégénérescence des photorécepteurs quantitativement inchangée par rapport aux souris *rd1*^{-/-}; *p53*^{+/+} (Hopp et coll., 1998; Wu et coll., 2000).

Ataxia telangiectasia résulte de mutations dans le gène codant **ATM** (*ataxia telangiectasia mutated*); c'est une maladie autosomale récessive caractérisée par une neurodégénérescence progressive associée à une sénescence précoce, une déficience immunitaire, une forte propension à développer des cancers et une hypersensibilité aux UV (Sedgwick & Boder, 1991; Savitsky et coll., 1995; Gatti et coll., 2001; revu récemment par Mc Kinnon, 2004).

ATM est une sérine/thréonine kinase qui a un rôle central dans la réponse aux dommages à l'ADN type cassures double brin (revu par Kastan et Lim, 2000), c'est un senseur qui activera la réponse p53 (Banin et coll., 1998). Il est notamment essentiel à l'apoptose neuronale observée chez une souris dont le gène codant la DNA Ligase IV a été invalidé (Lee et coll., 2000; Sekiguchi et coll., 2001), qui est un mécanisme impliquant p53 (Gao et coll., 2000; Frank et coll., 2000).

Les Caspases

Les Caspases sont une famille de protéases impliquées dans la phase effectrice de certaines voies apoptotiques (revu par Thornberry et Lazebnik, 1998; Green, 1998).

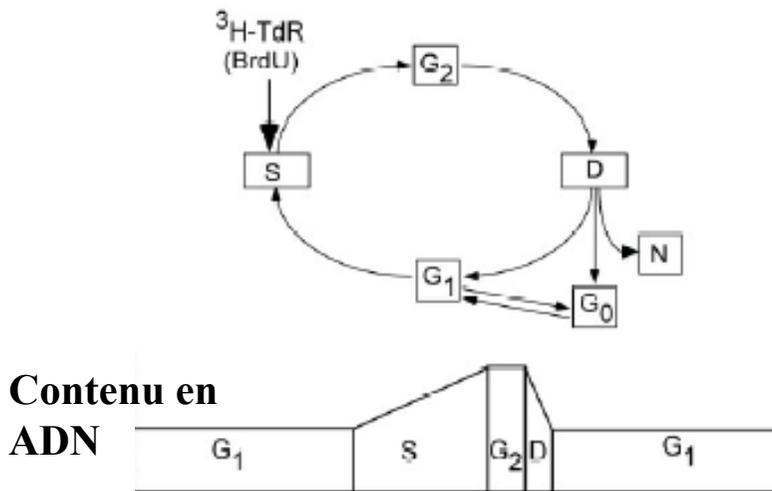
Chez la souris *rd1*, les données sont contradictoires: certains travaux sont en faveur d'un mécanisme de dégénérescence des photorécepteurs impliquant les caspases (Jomary et coll., 2001; Kim et coll., 2002), d'autres, en faveur d'un mécanisme indépendant (Doonan et coll., 2003; Zeiss et coll., 2004).

Les facteurs mitochondriaux

L'intégrité mitochondriale est essentielle à la survie cellulaire. Des facteurs mitochondriaux sont impliqués dans certaines formes d'apoptose où, relargués dans le cytosol, ils vont agir sur l'activation des Caspases; ainsi le **Cytochrome c** et la protéine **BAX** ont un rôle proapoptotique, **BCL-2** est le produit d'un protooncogène, il représente une famille de protéines inhibant certaines forme d'apoptose. *bcl-X* est un membre de la famille *bcl-2*, il peut être épissé différemment pour produire deux isoformes protéiques, *BCL-XL* et *BCL-XS*, *BCL-XL* aurait un rôle antiapoptotique. Chez la souris invalidée pour *bcl-X*, on retrouve un phénotype ressemblant à celui des mutants Ligase IV ou XRCC4: léthalité embryonnaire vers E13, accompagnée d'une vague massive d'apoptose de cellules du système hématopoïétique et de neurones du système nerveux central (Motoyama et coll., 1995), suggérant que *bcl-X* soit un des acteurs participant à l'équilibre entre les facteurs modulant l'apoptose et les facteurs responsable de l'intégrité génomique. La létalité embryonnaire, au stade E13, à l'âge où les cellules du SNC passent du stade prolifératif à une phase postmitotique de différenciation, laisse supposer que les cellules accumulent des cassures double brin au cours de leur phase de prolifération et ont besoin de les réparer pour assurer la différenciation.

AIF (Apoptosis inducing factor) a été identifié par criblage de facteurs proapoptotiques mitochondriaux (Susin et coll., 1999). Dans les cellules vivantes, il est localisé dans l'espace intermembranaire mitochondrial où, par son activité NADH oxidase, il contribue au maintien de l'intégrité mitochondriale; dans certaines conditions de stress cellulaire, il sera transloqué vers le cytoplasme puis le noyau où il est capable d'induire la condensation puis la fragmentation de l'ADN par une voie indépendante des Caspases (Yu et coll., 2002) mais aussi par des voies impliquant les Caspases (Joza et coll., 2001).

La souris Harlequin présente une dégénérescence liée à l'âge de neurones rétiniens et cérébelleux. La dégénérescence rétinienne affecte premièrement la couche des cellules ganglionnaires, puis la rétine interne, et finalement les photorécepteurs. La mutation responsable de ce phénotype a été décrite récemment: il s'agit d'une insertion provirale dans le gène codant AIF (Klein et coll., 2002).



Niveau relatif
d'expression de la
Rhodopsine

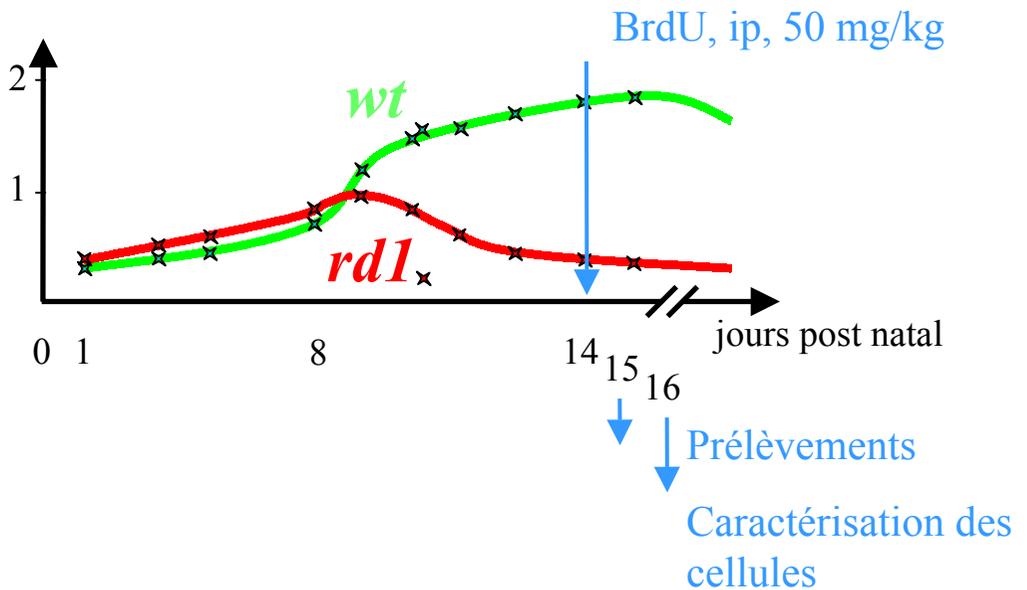


Fig. 15: Incorporation d'analogues de bases au cours de la synthèse d'ADN

En haut, principe, (Rakic, 2002)

En bas, approche expérimentale suivie.

APPROCHES EXPERIMENTALES ET MODELES ANIMAUX

Approches expérimentales

Nous avons donc choisi d'étudier si la dégénérescence induit une tentative de régénération dans un modèle murin de dégénérescence rétinienne d'origine génétique, la souris *rd1* (cf ci-dessous, modèle animal).

Dans une première approche, nous avons injecté de la BrdU au moment où l'apoptose des bâtonnets est la plus importante (PN14) et nous avons caractérisé de façon qualitative et quantitative la réponse de la rétine en terme d'incorporation de BrdU à différents temps après l'injection, 3, 24 et 48 heures (Fig. 15); ceci nous a conduits à décrire, au niveau cellulaire et moléculaire, deux phénomènes distincts, neurogénèse et réparation d'ADN :

Dans la rétine périphérique, l'incorporation de BrdU et l'expression de PCNA ont révélé une prolifération cellulaire; la caractérisation de ces cellules montrera un destin neural, attestant d'une certaine plasticité cellulaire de cette zone cependant incapable de pallier aux pertes cellulaires liées à la dégénérescence rétinienne.

Dans la rétine centrale, dans la couche des photorécepteurs en dégénérescence, l'incorporation de BrdU et l'expression de PCNA ont révélé des mécanismes de réparation d'ADN dont il serait intéressant de déterminer l'impact en terme de ralentissement de la dégénérescence.

Des analyses différentielles du transcriptome de rétines en dégénérescence et de rétines saines, réalisées d'autre part au sein du laboratoire, sont susceptibles d'identifier des signalisations cellulaires sous tendant ces mécanismes.

Dans une seconde approche, afin d'étudier la plasticité gliale, et son éventuelle implication en tant que précurseur neuronal, nous avons voulu appliquer à la rétine un modèle qui a servi à caractériser le rôle de progéniteur neuronal des astrocytes de la zone sous-ventriculaire: le suivi de la glie grâce à son infection par un rétrovirus aviaire de type RCAS chez la souris *rd1* TvAGFAP (cf ci-dessous, Modèles animaux, -TvAGFAP). Comme nous l'avons décrit précédemment, (A- Evolution des idées quant à la permissivité du système nerveux central (SNC) adulte vis-à-vis de la neurogénèse: d'un système «non permissif» à «stem cells, entity or function?», La glie radiaire, précurseur neuronal pendant le développement, p9), la glie radiaire joue un rôle de précurseur neuronal pendant le développement du SNC; il n'existe que de rares exemples de glie radiaire à l'âge adulte, la glie rétinienne de Müller en est un cas: elle traverse toute l'épaisseur de la rétine, le corps cellulaire dans la couche nucléaire interne maintient un prolongement basal au niveau de la limitante

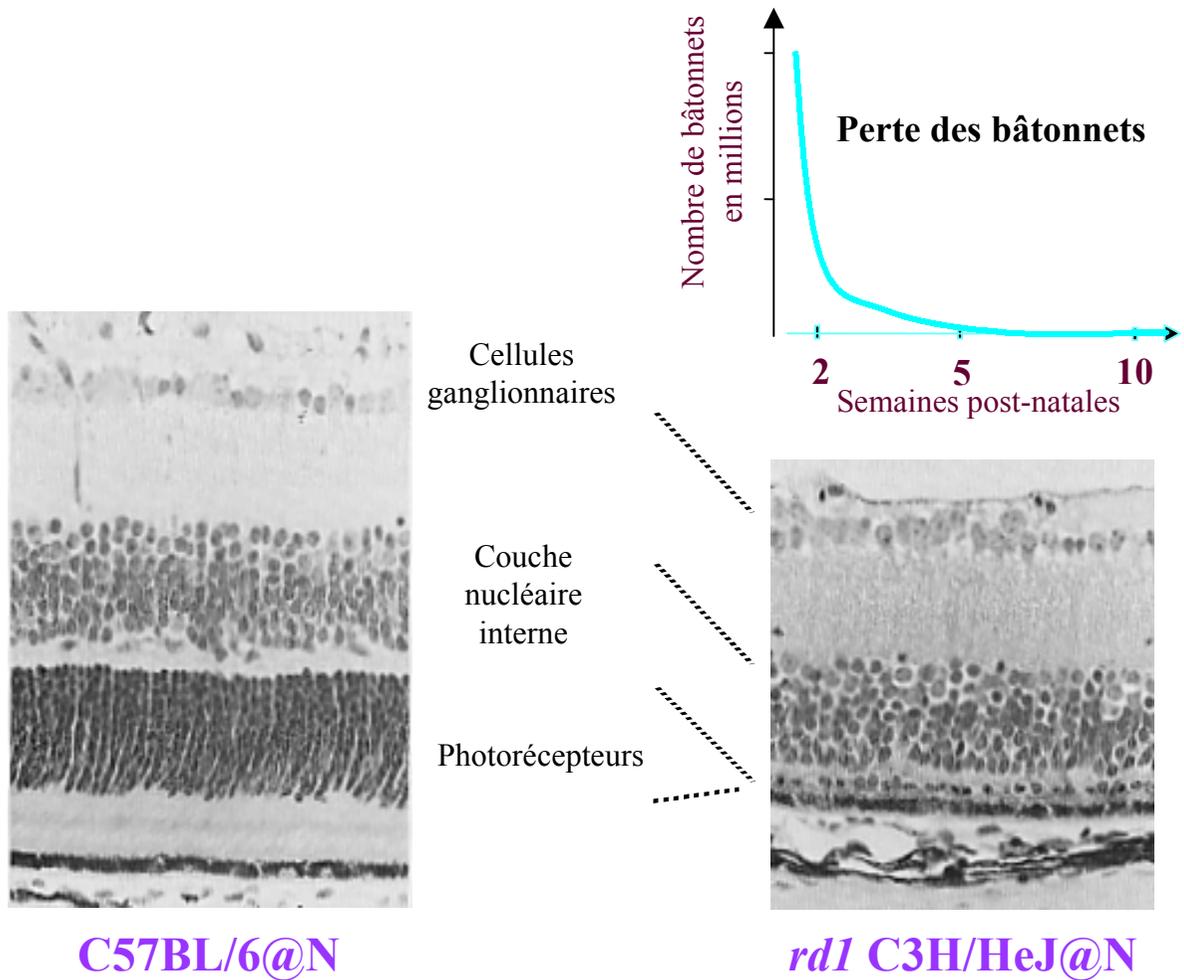


Fig. 16: Modèle animal, la dégénérescence rétinienne chez la souris *rd1*

Histologie comparative à 5 semaines d'âge,

la rétine *rd1* ne présente plus que des photorécepteurs à cônes qui dégénéreront secondairement.

interne, et un prolongement apical au niveau de la limitante externe (cf dessins de Cajal, Fig.7, verso p12). Au cours du développement tardif de la rétine de rat, l'équipe de Cepko a décrit un progéniteur commun neuronogliale générant un clone contenant une cellule gliale de Müller, des neurones de la couche nucléaire interne et des bâtonnets. Ces résultats ont été obtenus par la technique de traçage rétroviral avec un rétrovirus murin: injection intraoculaire d'un rétrovirus murin type MLV (Moloney Leukemia Virus) codant un gène reporteur à PN0 suivie de sa détection une fois le développement de la rétine terminé (Turner et Cepko, 1987); de même, il est probable que les progéniteurs de photorécepteurs localisés dans la rétine interne décrits chez le poisson (Wu et coll., 2001) aient une origine gliale. Il existe ainsi de nombreux arguments pouvant laisser penser que la glie de Müller serait un précurseur de photorécepteurs maintenu quiescent à l'âge adulte notamment par l'inhibiteur de cyclines $p27^{kip1}$. $p27^{kip1}$ est exprimé dans la rétine en vagues cellulaires au moment où les cellules quittent la phase de prolifération pour entrer dans la phase de différenciation; dans la rétine adulte il reste exprimé uniquement dans les noyaux des cellules de Müller (Levine et coll., 2000). Les souris dont le gène $p27^{kip1}$ a été invalidé, présentent notamment une dysplasie rétinienne (Nakayama et coll., 1996) avec une délocalisation du noyau de cellules de Müller vers la couche des photorécepteurs (Levine et coll., 2000).

Il était donc très tentant de regarder dans le système rétinien si la glie radiaire adulte est capable de produire des photorécepteurs, c'est ce que nous avons tenté avec le système de la souris Tva GFAP.

Modèles animaux

-rd1 versus wt

La souris *rd1* (C3H/HeJ@N) est un modèle spontané de dégénérescence rétinienne présentant une mutation retrouvée chez l'Homme et qui récapitule en quelques semaines l'évolution de la maladie humaine (Fig. 16). Cette souris présente une mutation récessive dans le gène codant pour la sous unité β de la phosphodiesterase cGMP dépendante (cyclic Guanosine monophosphate) exprimée spécifiquement par les bâtonnets, entraînant leur mort par apoptose, suivie de la dégénérescence des cônes. Ce modèle a été très intensément étudié (revu par Farber et coll., 1994). Les souris contrôles C3H +/+, ont été redérivées des souris décrites par Viczian et coll., (1992). Pour les premières expériences, ne disposant pas encore des C3H +/+, nous avons utilisé des souris C57BL/6@N, le contrôle utilisé de façon courante: ceci s'est avéré *a posteriori* ne pas avoir entraîné de biais (Résultats complémentaires: A- Neurogénèse dans le corps ciliaire,

La dégénérescence entraîne un retard de développement, p38). Les souris sont issues de l'élevage Charles River (Les Oncins, France), les rats Long Evans, de l'élevage Janvier (Le Genest St Isle, France). Les animaux ont été traités et manipulés dans le respect des Recommandations de l'ARVO (Association for Research in Visual and Ophthalmological science) et ont été soumis à un rythme jour / nuit de 12h/12h.

La souris FVB/N (Taketo et coll., 1991) est une souris albinos présentant une dégénérescence rétinienne due à l'allèle *rdl*.

-TvAGFAP

La souris TvAGFAP est une souris transgénique exprimant le récepteur de type A aux rétrovirus aviaires sous contrôle du promoteur de la GFAP (Glial Acidic Fibrillary Protein). Les rétrovirus aviaires de type RCAS sont incapables d'infecter les cellules de mammifères car elles n'expriment pas leur récepteur membranaire (TvA). La GFAP est une protéine typiquement gliale; l'expression du récepteur soumise au contrôle du promoteur GFAP permet l'infection spécifique des cellules gliales par le rétrovirus aviaire mis en présence.

Cette souris a initialement été construite pour étudier la génèse des gliomes (Holland et Varmus, 1998). Elle a depuis été utilisée par Doetsch et coll. (1999, a), pour suivre les astrocytes de la zone sous ventriculaire, attestant ainsi de leur devenir neuronal. Ces auteurs ont utilisé un gène rapporteur de la β Galactosidase pour suivre le virus qu'ils ont infusé par voie intracérébroventriculaire.

Cette souris présente une dégénérescence rétinienne due à la mutation *rdl* (cf C- La souris TvA GFAP, Résultats complémentaires, p40).

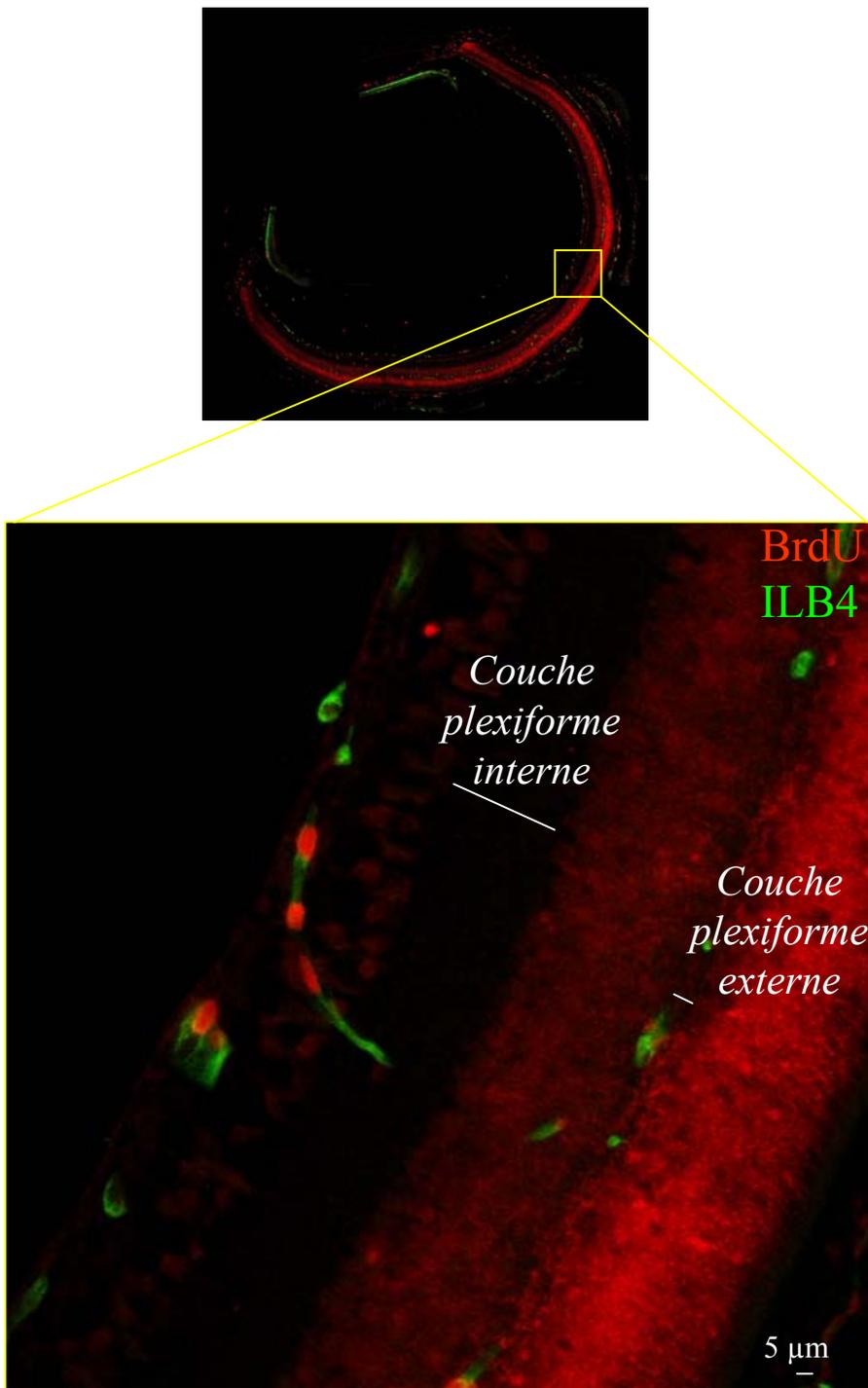


Fig. 17: Les noyaux cellulaires capables d'incorporer du BrdU localisés dans les couches plexiformes sont associés à des vaisseaux sanguins,
Microscopie confocale, haut: reconstitution; bas, détail,

RESULTATS

Publication: DNA repair in the degenerating mouse retina

Menu dit Huart L, Lorentz O, Goureau O, Léveillard T, Sahel JA, (2004)
Molecular and Cellular Neuroscience, 26, 441–449.

But: Le système nerveux central des mammifères adultes a longtemps été décrit comme incapable de neurogénèse; toute perte neuronale dans le système mature était donc considérée comme irréversible; aujourd'hui il est admis que certaines régions cérébrales sont permissives à une neurogénèse. De plus, ce potentiel neurogénique est susceptible d'être activé par la dégénérescence ou par l'ischémie. Nous avons voulu tester si la rétine était capable de régénération en vue de maintenir l'intégrité tissulaire.

Méthodes: L'injection d'un analogue de base d'ADN (BrdU) puis sa détection par immunomarquage est une méthode très sensible permettant de visualiser toute cellule en phase S du cycle cellulaire au moment de l'injection ainsi que sa descendance; par double marquage, il est possible de caractériser l'identité et/ou le devenir de ces cellules. Chez un modèle murin, nous avons comparé le comportement d'une rétine saine et d'une rétine présentant une dégénérescence héréditaire des photorécepteurs.

Résultats: La caractérisation par immunomarquage des cellules ayant incorporé du BrdU ainsi que de leur descendance a permis de mettre en évidence:

- 1) des noyaux fusiformes, localisés dans les couches plexiformes et dans la couche des cellules ganglionnaires, qui appartiennent à des cellules associées à des vaisseaux sanguins, (Fig. 17)
- 2) des noyaux localisés dans l'extrême périphérie de la rétine, au niveau de la zone marginale ciliaire et appartenant à l'épithélium ciliaire proprement dit,
- 3) dans la rétine en dégénérescence seulement, des noyaux localisés dans la couche des photorécepteurs dont une partie exprime des pigments visuels spécifiques aux photorécepteurs.

Nous nous sommes particulièrement intéressés aux cellules localisées dans la zone ciliaire ainsi qu'aux cellules localisées dans la couche des photorécepteurs en dégénérescence.

-Dans la rétine *rd1* et *wt*, l'incorporation de BrdU a lieu préférentiellement dans des cellules localisées à l'extrême périphérie de la rétine et dans le corps ciliaire (Menu dit Huart et coll., Fig 1 et 4b). Nous avons caractérisé ces cellules par immunomarquage: la majorité des cellules ayant incorporé du BrdU dans cette zone expriment Pax 6, un facteur de transcription essentiel au

développement de l'œil (Gehring et Ikeya, 1999) et exprimé dans certaines populations neuronales de la rétine (Menu dit Huart et coll., Fig. 3).

La zone ciliaire semble douée d'une certaine plasticité mais son potentiel n'est pas activé par la dégénérescence (Menu dit Huart et coll., Fig. 1c).

-La couche des photorécepteurs *rd1* présentant une apoptose massive et, des réserves ayant été émises quant à la spécificité de l'incorporation de BrdU en tant que marqueur de prolifération cellulaire, nous avons voulu vérifier la spécificité de nos outils: l'expression de la DNA Ligase IV dans des photorécepteurs *rd1*, protéine spécifiquement impliquée dans la réparation de cassures double brin de l'ADN, semble indiquer que l'incorporation de BrdU et l'expression de PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) dans des photorécepteurs de la rétine en dégénérescence illustrent leur passage par une phase de réparation d'ADN plutôt qu'une neurogénèse *de novo* ou qu'une entrée de ces neurones postmitotiques dans le cycle cellulaire.

Conclusion: Nos travaux ont permis de mettre en évidence des mécanismes de réparation au niveau cellulaire et non pas au niveau tissulaire comme postulé.

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

DNA repair in the degenerating mouse retina

L. Menu dit Huart, O. Lorentz, O. Goureau, T. Lévillard and J. A. Sahel

Molecular and Cellular Neuroscience, 2004, Vol. 26, pages 441–449

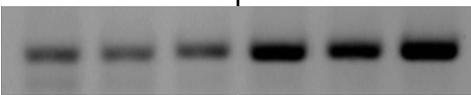
Pages 441–449 :

- 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://dx.doi.org/10.1016/j.mcn.2004.04.002>

- 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

	PN 35 <i>wt</i> C57BL/6@N	PN 35 <i>rd1</i> C3H/He@N	Rapport
<i>sfrp3</i>	51	194,6	3,8
			
<i>sfrp1</i>	15,5	54,5	3,5
			
Glucose-6-P déshydrogénase			

Niveau
d'expression

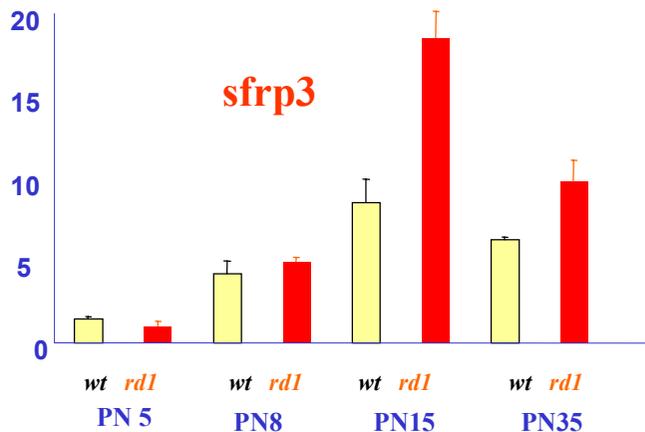


Fig. 20: Le niveau d'expression de *sfrp 1* et *3* varie au cours de la dégénérescence.

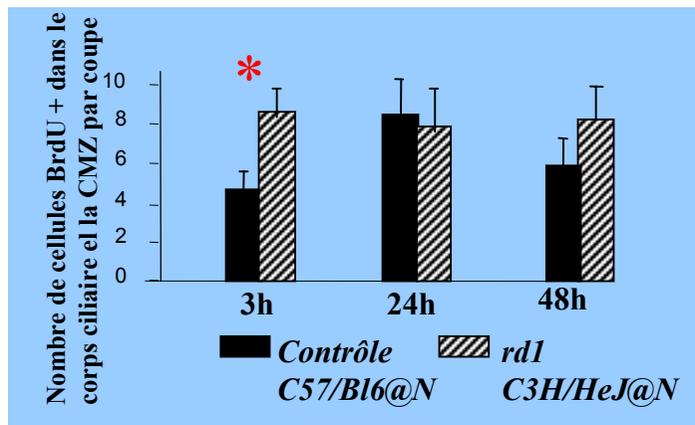
En haut, résultats d'analyse différentielle du transcriptome de rétine de souris obtenus avec les puces à ADN à 5 semaines, confirmés par PCR semi-quantitative.

En bas, cinétique différentielle d'expression de *sfrp3 rd1/wt* au cours de la dégénérescence, résultats de PCR en temps réel.



Fig. 19: Prolifération cellulaire dans le corps ciliaire d'une souris albinos (FVB/N)

Détection de l'incorporation de BrdU après injection à PN19 et sacrifice 24 h après.



PN14

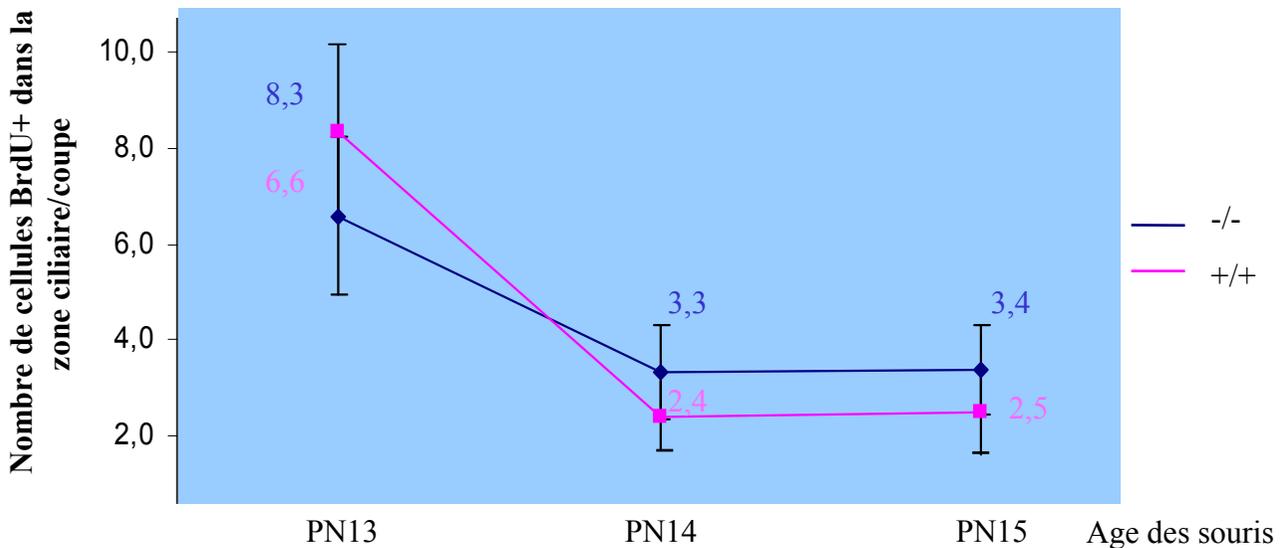


Fig. 18: La dégénérescence semble prolonger le développement de la rétine périphérique:

En haut, la différence significative en faveur de la rétine *rd1* visible 3 heures après injection à PN14 disparaît à 24h et à 48h (épaisseur des coupes = 8µm).

En bas, graphe d'évolution en fonction de l'âge de la différence en cellules BrdU + dans la zone ciliaire *rd1* -/- et +/+, 3 heures après l'injection (épaisseur des coupes = 4µm).

Résultats complémentaires:

A- Neurogénèse dans le corps ciliaire

La dégénérescence entraîne un retard de développement

Nous avons quantifié dans la rétine *rd1* et *wt*, le nombre de cellules ayant incorporé du BrdU dans la zone ciliaire trois heures, 24h et 48h après l'injection du marqueur:

24 h ou 48 h après, il n'existe pas de différence significative (Menu dit Huart et coll., Fig 1c); cependant, 3h après l'injection, l'on retrouve toujours une différence significative en faveur de la rétine en dégénérescence. Au début de ces travaux, ne disposant pas encore de la souris contrôle *rd1* *+/+* congénique, nous utilisons comme contrôle sain la souris C57/Bl6@N. Nous avons ensuite pu vérifier que la différence de fond génétique n'entraîne pas de biais, la différence retrouvée 3h après l'injection existe toujours et dans les mêmes proportions entre les souris *rd1* *-/-* et *+/+*. Nous avons ensuite répété l'expérience avec des animaux à PN13 et 15. Les résultats montrent une cinétique de prolifération différente chez les deux souris, le nombre de cellules en prolifération dans la zone ciliaire de la rétine en dégénérescence étant inférieur à PN13, puis supérieur à PN14 et 15 (Fig 18).

La plasticité du corps ciliaire chez l'adulte et chez la souris albinos

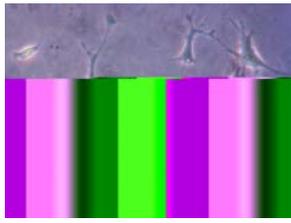
Nous avons retrouvé des cellules en prolifération dans cette zone dans la rétine *rd1* et *wt* jusqu'à PN 18 + 24h et dans la rétine de rat adulte (Menu dit Huart et coll., Fig 2) et chez la souris albinos FVB/N à PN 19 + 24h (Fig. 19).

Une voie de signalisation candidate, la voie Wnt

Les résultats d'analyse différentielle du transcriptome de rétines en dégénérescence d'une part (souris C3H/HeJ@N), et de rétines saines d'autre part (C57/Bl6@N) réalisés par Thierry Léveillard sur puces à ADN (Hackam et coll., 2004), montrent une surexpression des messagers de deux inhibiteurs de la voie de signalisation Wnt dans la rétine en dégénérescence âgée de cinq semaines: *sfrp1*, 3.

Nous avons validé ces résultats pour *sfrp 1* et 3 puis étudié le profil d'expression de *sfrp3* au cours de la dégénérescence par RT PCR en temps réel: l'expression des deux gènes est induite au cours de la dégénérescence (Fig. 20).

*culture
cellules Müller*



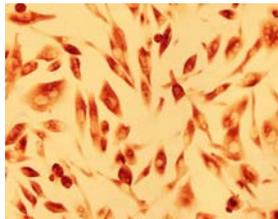
1) Surnageant viral

2) Co-culture

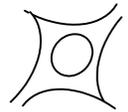
explant



**Cellules
productrices**

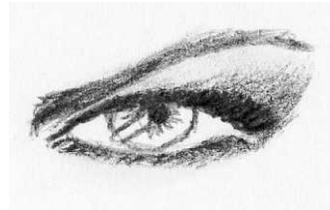


3) Virus concentré



*culture
astrocytes
corticaux*

4) Cellules infectées



oeil

Fig. 26: Différentes approches utilisées pour infecter la glie rétinienne TvAGFAP

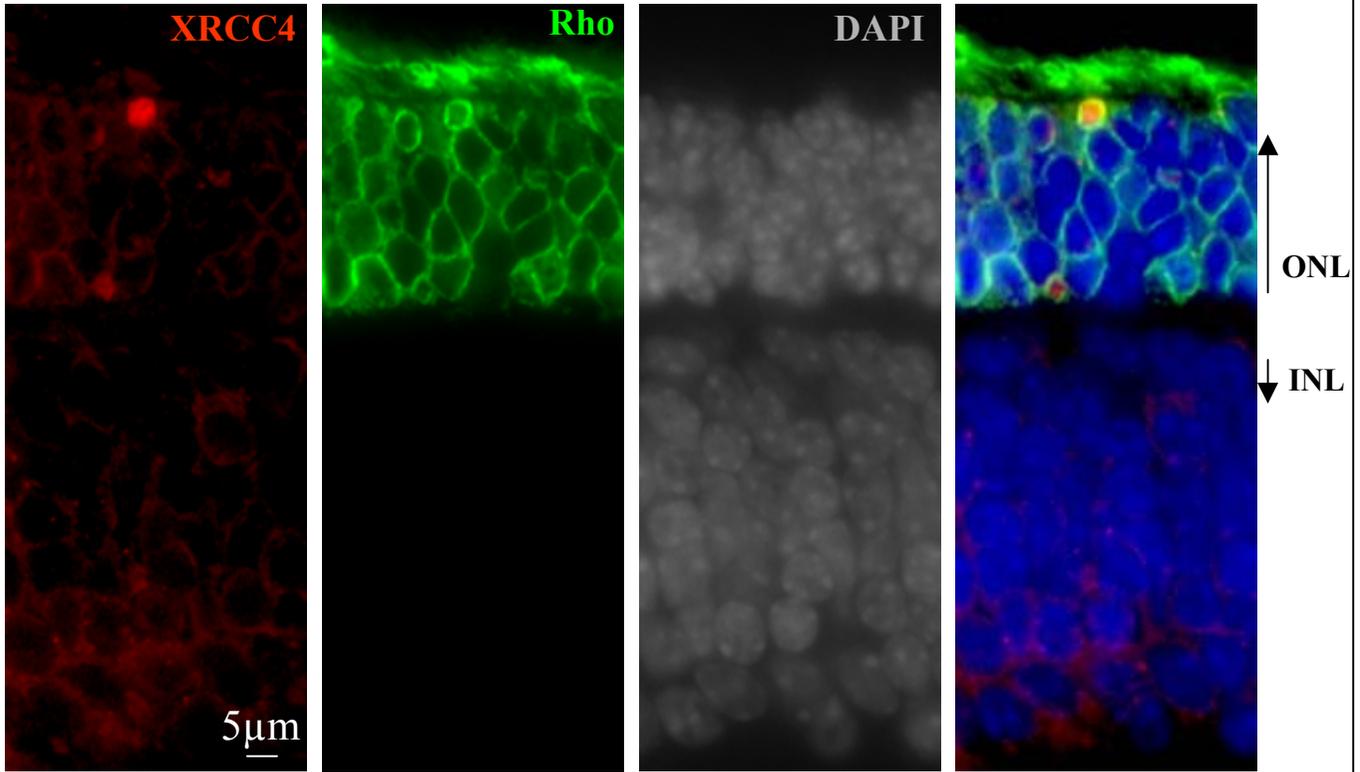


Fig. 25: rétine *rd1* à PN11, certains photorécepteurs expriment XRCC4.

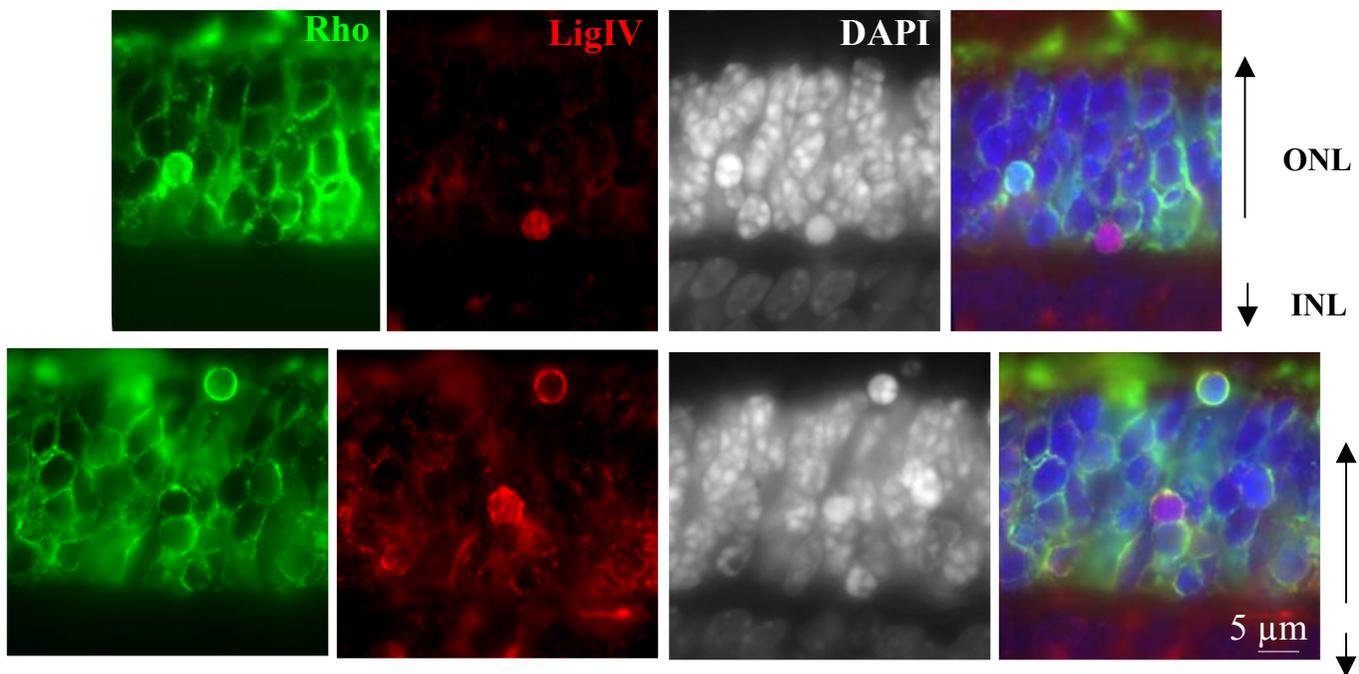


Fig. 23: rétine *rd1* à PN11, tous les noyaux exprimant la Ligase IV dans la couche nucléaire externe (ONL) sont des photorécepteurs.

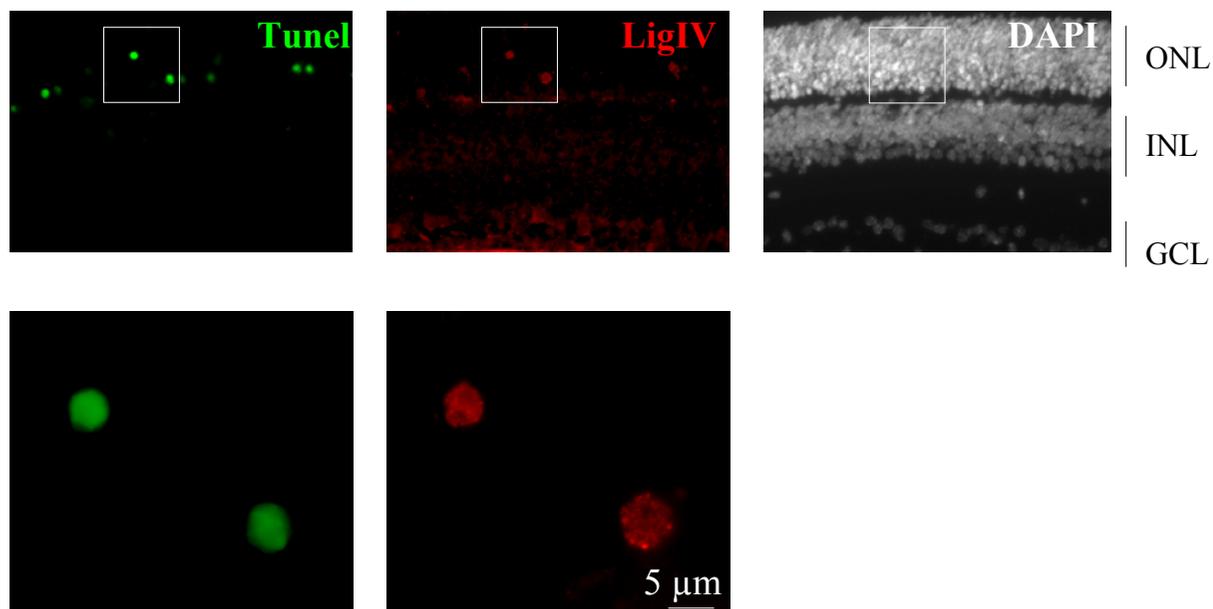


Fig. 24: rétine *rd1* à PN11, tous les noyaux exprimant la Ligase IV dans la couche des photorécepteurs sont tunel positifs.

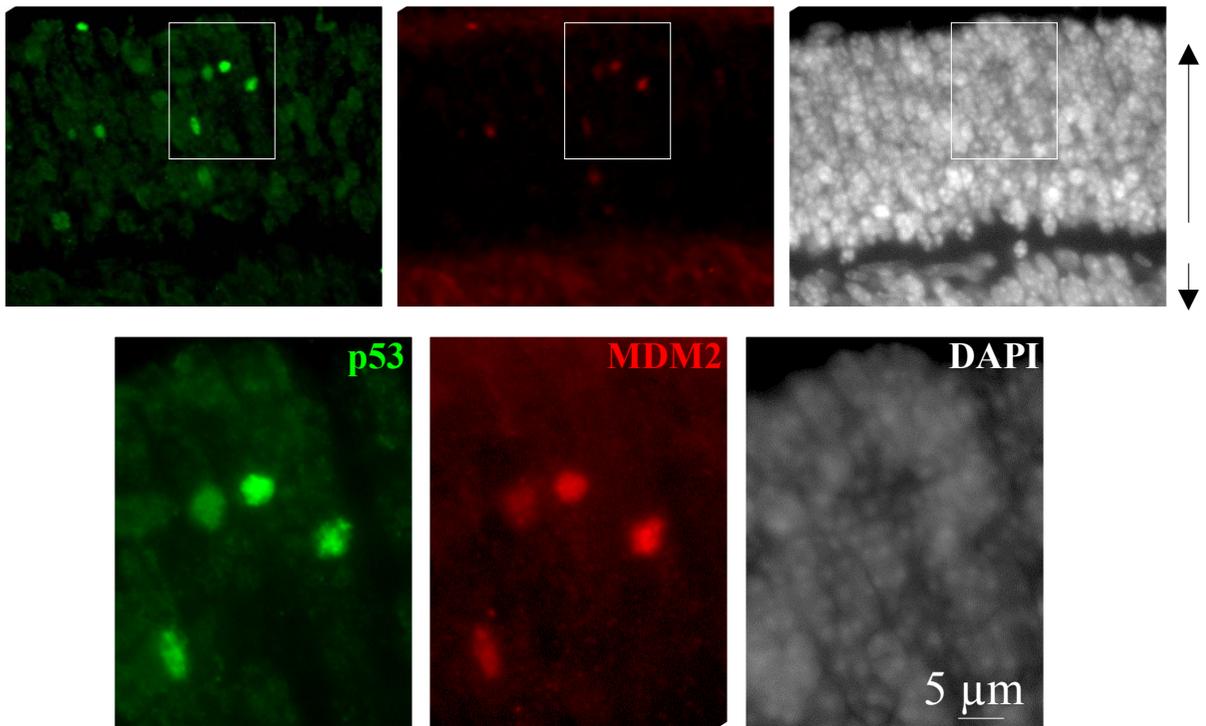
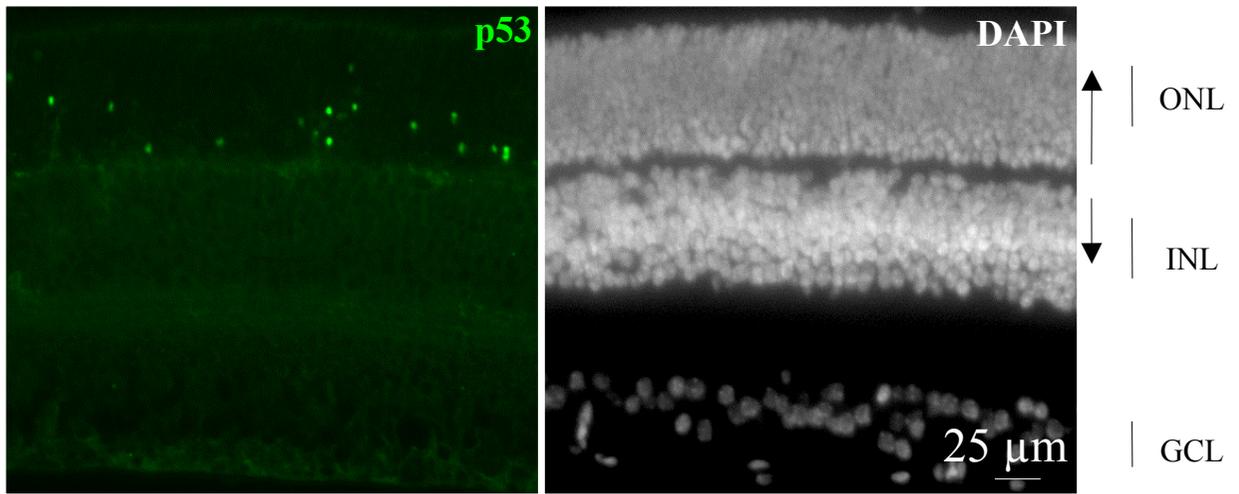


Fig. 22: Des photorécepteurs *rd1* à PN11 expriment **p53**, en haut; ces mêmes photorécepteurs expriment **MDM2**, en bas.

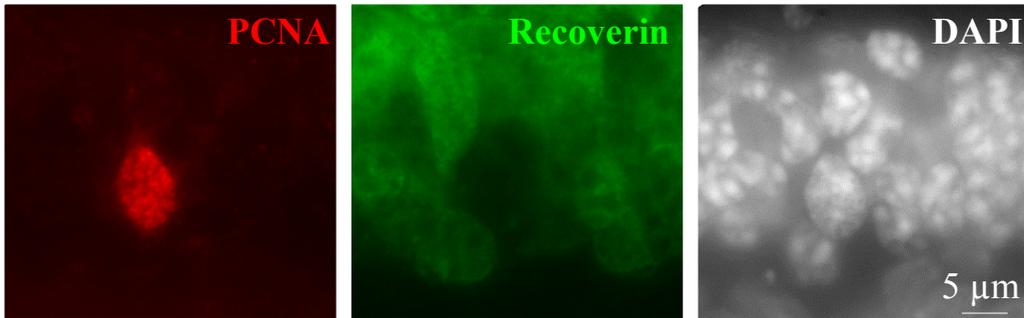


Fig. 21: Les noyaux dans la couche des photorécepteurs *rd1* à PN13 exprimant **PCNA n'expriment pas la **Recoverin**.**

B- Réparation d'ADN dans les pR *rd1*

La principale différence remarquable entre les rétines *rd1* et *wt*, concerne une population de cellules localisées dans la couche des photorécepteurs capable d'incorporer du BrdU et d'exprimer PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) seulement dans la rétine *rd1*, vers PN14, au moment où la dégénérescence est la plus importante, (Menu dit Huart et coll., Fig.4); une partie de ces cellules exprime des pigments visuels (Menu dit Huart et coll., Fig. 5) mais n'exprime pas la Recoverine, une protéine essentielle au retour des photorécepteurs à un état activable dans la cascade de phototransduction (Fig. 21).

La majorité des cellules exprimant PCNA dans la couche des photorécepteurs présente également une réactivité à l'anticorps @p53 (Menu dit Huart et coll., Fig. 6b); les cellules immunoréactives pour p53 expriment MDM2 (Fig. 22).

Parmi les cellules exprimant PCNA dans la couche des photorécepteurs, 75% expriment la DNA Ligase IV (Menu dit Huart et coll., Fig. 6a) et la Ligase IV est bien exprimée par des bâtonnets (Fig. 23) dont la plupart présentent une fragmentation de l'ADN (Fig. 24).

XRCC4 est exprimé par certains bâtonnets (Fig. 25).

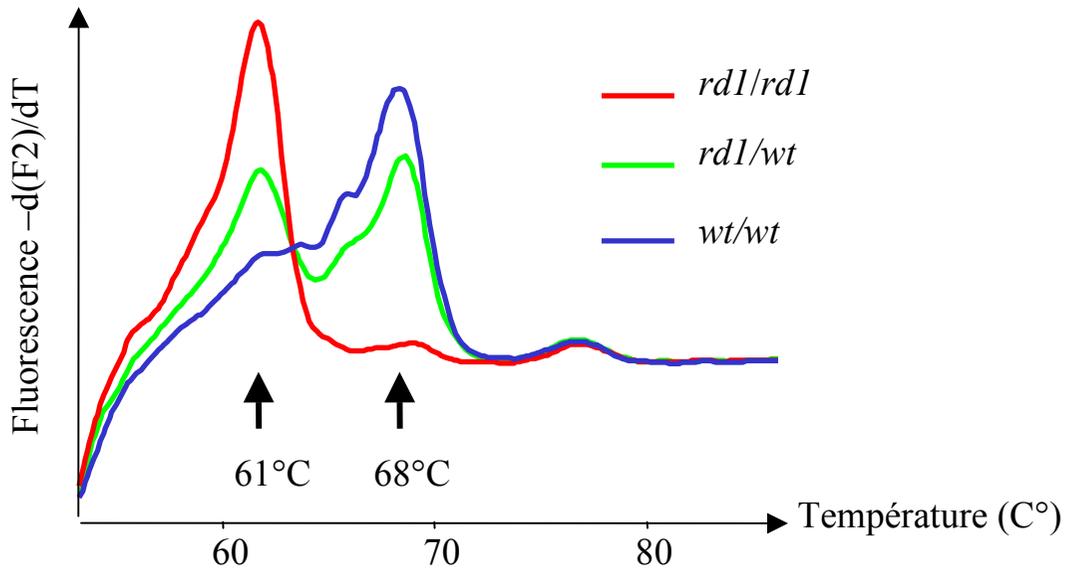
C- La souris TvA GFAP

Concernant le système de traçage cellulaire de la glie avec le système RCAS/TvAGFAP, nous présenterons les différents protocoles d'infection *in vitro* et *in vivo* qui ont été utilisés sans succès et nous discuterons la pertinence du modèle animal pour des études rétinienne.

L'approche consistait à essayer d'infecter la glie TvA-GFAP par un rétrovirus de type RCAS puis de visualiser les cellules infectées par immunomarquage à l'aide d'un anticorps dirigé contre une protéine d'enveloppe du virus, postulant qu'en réponse à la dégénérescence, la glie de Müller se comporterait en précurseur de photorécepteurs.

Les différents protocoles utilisés sont schématisés sur la Fig. 26: surnageant de cellules productrices sur culture de cellules gliales de Müller, coculture cellules productrices/explant de rétine, virus concentré sur explant de rétine, sur culture d'Astrocytes corticaux et injection directe dans l'œil de virus concentré ou de cellules productrices de virus.

Toutes les approches ont été infructueuses: c'est-à-dire que je n'ai jamais réussi à retrouver un virus par immunomarquage @3C2 dans les différents systèmes d'infection de cellules de mammifères.



- TvA 1
- TvA 2
- TvA 3
- TvA 4
- TvA 5
- TvA 6
- Parent1
- Parent2
- Parent3
- C3H *rd1*^{-/-}
- C57 *rd1*^{+/+}

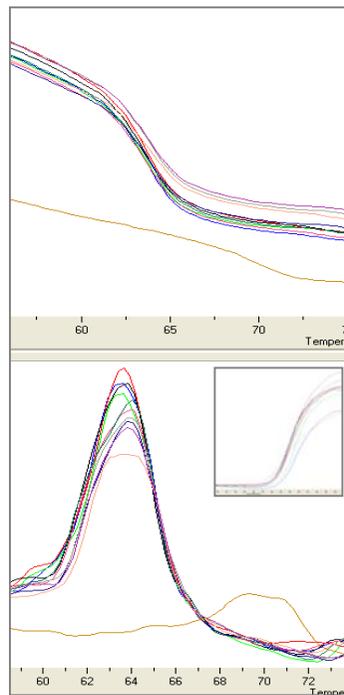
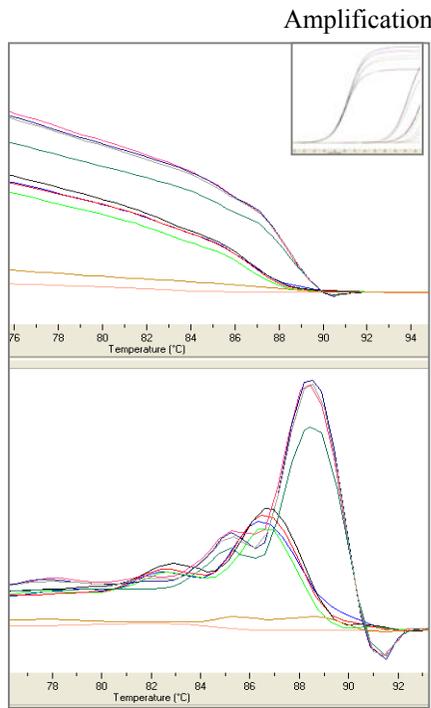
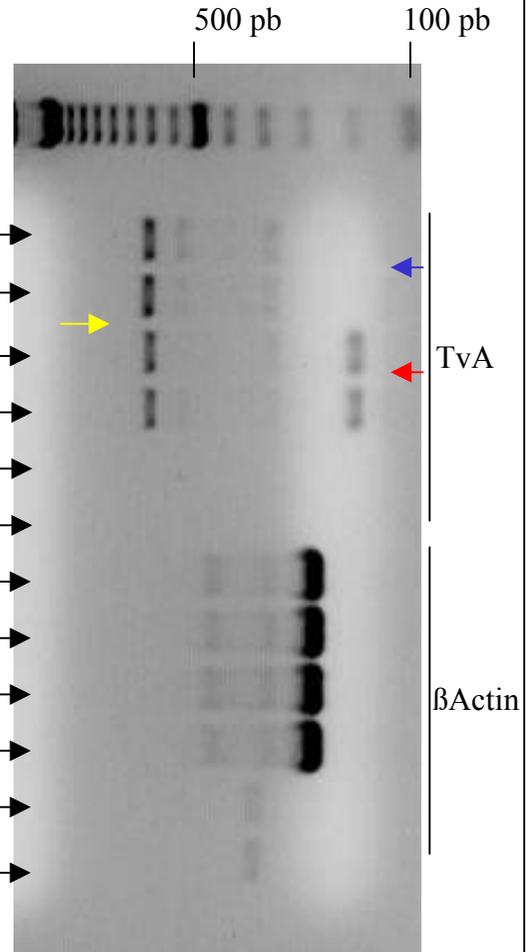


Fig. 29: Génotypage de la souris TvA GFAP selon l'allèle *rd1*

En haut, tracés théoriques,
En bas, tracés obtenus, les souris TvA sont *rd1*^{-/-}.



- | Cortex C3H 2sem →
- | Cortex C3H 3sem →
- | Cortex TvA 2sem →
- | Cortex TvA 3sem →
- | RT- C3H 2sem →
- | RT- TvA 2sem →
- | Cortex C3H 2sem →
- | Cortex C3H 3sem →
- | Cortex TvA 2sem →
- | Cortex TvA 3sem →
- | RT- C3H 2sem →
- | RT- TvA 2sem →



Fusion

Fig. 28: Recherche de l'expression du récepteur TvA dans le cortex cérébral de la souris TvA GFAP

- le récepteur TvA est exprimé dans le cortex cérébral de la souris TvA
- le récepteur TvA n'est pas exprimé dans le cortex cérébral de la souris C3H
- cette bande correspond vraisemblablement aux récepteur aux LDL, cf discussion

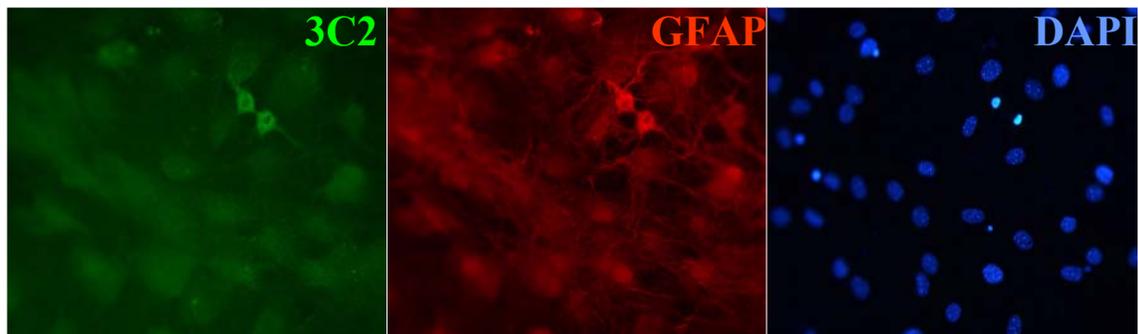
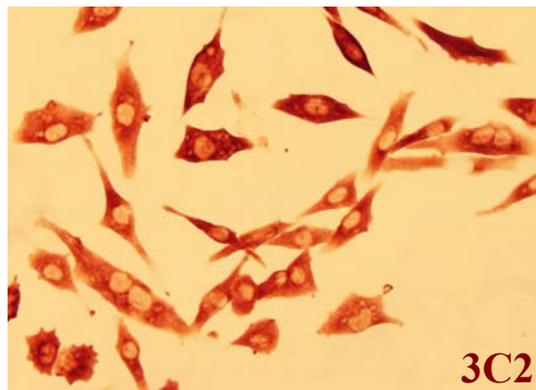


Fig. 27: Révélation de l'infection virale dans différents systèmes,

En haut, immunomarquage avec l'anticorps 3C2 dirigé contre une protéine d'enveloppe du virus montrant à gauche des DF-1 infectées, à droite le contrôle non infecté.

En bas, détection de l'infection de cellules de Müller en culture.

Parfois de rares cellules en culture semblent positives comme montré sur la [Fig. 27](#) dans une culture de cellules gliales de Müller mais le signal reste rare et faible.

Les souris sont bien transgéniques, elles expriment le récepteur de rétrovirus aviaire dans le cerveau, ceci a été testé par PCR sur des ARN issus de tissu cortical TvAGFAP versus C3H/HeJ@N (contrôle non transgénique) ([Fig. 28](#)).

Les souris TvAGFAP présentent l'allèle *rd1* ([Fig. 29](#)).

Je n'ai jamais obtenu de résultat avec les anticorps dirigés contre le récepteur TvA produits par Christina Ochsenbauer, 12D5 et 3B10; ces anticorps n'ont pas été publiés par les auteurs, rendant toute conclusion hasardeuse.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

A- Plasticité du corps ciliaire

Dans la rétine de souris âgée de deux semaines, *in vivo*, la prolifération cellulaire de cellules adoptant une destinée neurale est restreinte au corps ciliaire, et représente vraisemblablement la fin du développement de la rétine; le nombre de cellules en prolifération est transitoirement supérieur dans la rétine *rd1* par rapport à la rétine saine.

Dans ce modèle animal, la dégénérescence rétinienne commençant avant la fin du développement, il est difficile de savoir si la dégénérescence induit une réponse ou retarde le développement, en d'autres termes, de savoir si la dégénérescence pourrait induire ce type de réponse dans une rétine plus âgée. Nous avons répété l'expérience d'injection puis détection 3 heures après de BrdU à PN 13, 14 et 15, chez des animaux *rd1*^{-/-} versus ^{+/+} congéniques, afin de limiter les différences liées au fond génétique. Les résultats montrent une cinétique de prolifération différente, le nombre de cellules en prolifération dans la zone ciliaire de la rétine en dégénérescence étant inférieur à PN13, puis supérieur à PN14 et 15, suggérant que la dégénérescence induise un retard de développement par rapport à la zone ciliaire normale. Cependant, la même méthode nous ayant permis de montrer l'existence de cellules en prolifération dans le corps ciliaire chez le rat adulte, il semble que cette zone présente une certaine plasticité tout au long de la vie de l'animal.

Les propriétés de cellules souches rétiniennes adultes décrites *in vitro* concernent exclusivement les cellules pigmentées du corps ciliaire (Ahmad et coll., 1999 et 2000; Tropepe 2000). Nos résultats montrent que les cellules de l'épithélium ciliaire ayant incorporé du BrdU et exprimant Pax6 sont majoritairement des cellules non pigmentées (Menu dit Huart et coll., 2004) qui pourraient être issues des cellules pigmentées décrites *in vitro*. De plus, afin de tester l'importance de la pigmentation dans ces phénomènes, par la même approche d'injection/détection de BrdU chez une souris albinos, nous avons montré que la prolifération cellulaire existe dans l'épithélium ciliaire en l'absence de pigmentation.

Dans un travail de comparaison de la zone marginale ciliaire chez différentes espèces, Kubota et coll., présentent le potentiel neurogénique de cette zone comme inversement proportionnel au niveau d'évolution de l'espèce et rapportent l'absence de prolifération cellulaire dans le corps ciliaire de la souris à PN15 (Kubota et coll., 2002). Cependant, dans un travail ultérieur, les

auteurs présentent des résultats de prolifération cellulaire basale faible chez la souris sauvage et activée chez la souris *ptc*^{+/-} (*patched* est un récepteur de Sonic Hedgehog, *Shh*), impliquant ainsi la voie *Shh* dans le maintien en quiescence des cellules du corps ciliaire (Moshiri et Reh, 2004); d'autres travaux ont également montré l'importance de cette voie dans la biologie du corps ciliaire ainsi que dans la transdifférenciation épithélium pigmenté/rétine après ablation rétinienne chez le poulet embryonnaire (Spence et coll., 2004).

D'autres signalisations clefs du développement ont également été impliquées: *Noggin* fixe les bone morphogenetic proteins (BMP), empêchant l'activation des récepteurs aux BMP; *Noggin* serait impliquée dans le développement du corps ciliaire (Zhao et coll., 2002). Cette signalisation a également été impliquée dans la neurogénèse adulte dans le cerveau: un environnement riche en *Noggin* libèrerait des progéniteurs de l'inhibition des BMP, permettant la neurogénèse (Lim, 2000).

Des résultats d'analyse différentielle du transcriptome rétinien *rd1* versus *wt* réalisées dans notre laboratoire par Thierry Léveillard ont orienté nos travaux vers la voie de signalisation Wnt dont deux inhibiteurs se trouvent surexprimés dans la rétine *rd1* de 5 semaines par rapport à la rétine saine : *sfrp 1* et *3*.

Les niveaux d'expression sont équivalents dans les rétines C3H et C57 âgées d'une semaine (la dégénérescence de la rétine C3H est encore très limitée à cet âge) puis ils augmentent largement au cours de la dégénérescence alors qu'ils restent relativement stables chez la souris C57 entre 1 et 6 semaines, argument allant à l'encontre d'une responsabilité seule du fond génétique différent. Les expériences ont été réalisées sur Light Cycler qui est un appareil permettant l'étude du niveau d'expression de messagers (cf Matériel et Méthodes p62).

Deplus, *sfrp 2* est surexprimé dans la rétine de patients présentant une dégénérescence des photorécepteurs (Jones et coll., 2000a) et, plus tard, ces mêmes auteurs ont montré que les protéines *Sfrp 1, 3, 5* étaient également surexprimées chez l'Homme dans des cas de Rétinite Pigmentaire (Jones et coll., 2000b); ils tendent plutôt à attribuer aux protéines *Sfrp* un rôle dans l'apoptose mais sans s'appuyer sur des faits concrets. Les gènes codant pour les protéines *Sfrp1, 3, 5* ont été initialement clonés par Rattner et coll. (1997) en screenant une banque d'ADNc d'yeux de souris avec des amorces dessinées à partir de séquences génomiques humaines connues; Melkonyan et coll. (1997) ont cloné les mêmes gènes par un système de clonage par expression où la protéine *Sarp 1* (Secreted apoptosis related protein 1 ou *Sfrp3*) confère un pouvoir de résistance vis-à-vis de l'apoptose à des cellules murines embryonnaires C3H/10T1/2. D'autres travaux attribuent à *Sfrp2* un rôle anti-apoptotique vis-à-vis de la mort programmée de précurseurs neuronaux dans le cerveau de poulet en développement (Ellies et coll., 2000). Une

seule chose semble claire, les protéines Sfrp sont liées à l'apoptose, qu'elles aient un rôle dans la mort ou la survie cellulaire reste à élucider. Aujourd'hui, seul un rôle d'inhibition de la voie Wnt/Frizzled leur est attribué et, de façon intéressante, la surexpression de Fz3 entraîne chez le Xénope le développement d'un œil ectopique (Rasmussen et coll., 2001) en induisant notamment l'expression de Pax6, lui-même connu pour réguler positivement l'expression de Sfrp2 au cours du développement du SNC de la souris (Kim et coll., 2001). Au niveau de l'œil, Sfrp 1 est essentiellement exprimée dans la marge ciliaire et la couche antérieure de l'épithélium cristallinien (Rattner et coll., 1997).

A la même époque, Kubo et coll. ont montré l'implication de la voie Wnt dans le développement du corps ciliaire chez le poulet (Kubo et coll., 2003).

Dans le modèle de la souris *rd1*, la dégénérescence ne semble pas activer le potentiel du corps ciliaire mais plutôt allonger la période de développement de la rétine périphérique. Le modèle animal n'est pas idéal car la dégénérescence débute avant la fin du développement; il serait intéressant de disposer d'un modèle plus tardif d'apoptose massive des photorécepteurs. Chez la souris *ptc*^{+/-}, la dégénérescence serait capable d'activer la prolifération dans le corps ciliaire (Moshiri et Reh, 2004); des souris invalidées pour le gène codant l'inhibiteur de cycline p19Ink4d présentent un retard de développement du corps ciliaire de quelques jours (Cunningham et coll., 2002). Il existerait donc des mécanismes assurant le maintien en quiescence des cellules du corps ciliaire.

L'importance de ce potentiel pour la fonction visuelle reste cependant clairement à établir dans les conditions physiologiques comme pathologiques; les cellules du corps ciliaire présentant un tropisme pour certains vecteurs viraux (Von Seggern et coll., 2003), il est envisageable d'essayer d'activer le potentiel de ces cellules *in vivo*.

B- Réparation d'ADN dans les photorécepteurs en dégénérescence

Travaillant dans un tissu présentant une apoptose massive, nous avons voulu vérifier la spécificité de certains marqueurs utilisés de façon courante pour visualiser la prolifération cellulaire (incorporation de BrdU, expression de PCNA); en effet l'incorporation de BrdU est une technique très sensible qui serait capable de détecter une synthèse d'ADN impliquée dans la réparation et non pas uniquement dans la prolifération cellulaire (Cooper-Kuhn et Kuhn, 2002).

PCNA est une protéine essentielle à la prolifération cellulaire en tant que facteur accessoire de la DNA Polymérase δ (Bravo et coll., 1987). PCNA est également nécessaire à la réparation

d'ADN (Nichols et Sancar, 1992; Shivji et coll., 1992; Smith et coll., 1994) et son expression est directement activable par p53 (Morris et coll., 1996).

Dans les photorécepteurs *rd1* exprimant PCNA, la présence de p53 et de son partenaire MDM2 laisse supposer un mécanisme de réparation; l'expression de la DNA Ligase IV et de son partenaire XRCC4 conforte cette hypothèse. Le couple LigaseIV/XRCC4 a été décrit dans la réparation de cassures double brin d'ADN par NHEJ (cf [Réparation des cassures double brin de l'ADN](#), p8).

p53 intègre de nombreux signaux de stress cellulaire, son rôle le plus connu est celui de suppresseur de tumeur: il induit l'apoptose dans des cellules ayant subi des dommages potentiellement oncogéniques. L'analyse de la souris *p53*^{-/-}; *rd1*^{-/-} a conduit les auteurs à conclure que la dégénérescence rétinienne due à l'allèle *rd1* est p53 indépendante (Hopp et coll., 1998; Wu et coll., 2000); nos résultats montrent que p53 est exprimé ou stabilisé dans les photorécepteurs en dégénérescence et qu'il est régulé par MDM2, suggérant un rôle direct de p53 dans la réparation de l'ADN et indirect dans l'apoptose, si la réparation n'est pas efficace. Il serait intéressant de regarder si la Ligase IV est exprimée dans les photorécepteurs de la souris *p53*^{-/-}, *rd1*^{-/-} cependant aucune des deux équipes n'a conservé les souris.

Nous avons montré l'implication de la DNA Ligase IV et de son partenaire XRCC4 dans une tentative des photorécepteurs à réparer leur ADN; l'implication de PCNA et l'incorporation de BrdU au cours de ce mécanisme sous-entendent l'intervention d'une Polymérase. Les résultats d'analyse différentielle du transcriptome rétinien montrant la surexpression de la Polymérase λ dans la rétine *rd1*, avec une différence maximale à PN8, suggèrent que cette Polymérase pourrait être impliquée; cette polymérase a été décrite par Garcia-Diaz et coll., (2000); elle possède de nombreuses caractéristiques qui la rendent susceptibles d'être impliquées dans la réparation d'ADN comme une activité terminal déoxynucléotidyl transférase, une faible fidélité, (Bebenek et coll., 2003 ; Lee et coll., 2004) et un domaine BRCT (Bork et al., 1997; Callebaut & Mornon, 1997) que l'on retrouve dans de nombreuses protéines impliquées dans la réparation d'ADN et la régulation des protéines de contrôle du cycle cellulaire suite à des dommages cellulaires (Bork et coll., 1997). L'analyse du phénotype rétinien de la souris invalidée pour le gène de la Polymérase λ est en cours d'analyse par l'équipe de Marc Abitbol.

Dans la rétine, le passage par une phase de réparation d'ADN a été décrit dans un modèle de phototoxicité (Gordon et coll., 2002); la quantité de photorécepteurs détectés par un marquage tunnel qui permet de visualiser *in situ* la fragmentation de l'ADN serait supérieure à la perte

effective en photorécepteurs, les auteurs ont étudié la possibilité d'un mécanisme de réparation; les auteurs rapportent un mécanisme impliquant la Polymérase β mais n'impliquant pas PCNA.

Nos résultats sont cohérents avec des mécanismes de réparation d'ADN impliquant la protéine suppresseur de tumeur, p53 ainsi que son partenaire mdm2, un facteur accessoire de DNA Polymérase, PCNA, une ligase, la DNA Ligase IV et XRCC4. La DNA ligase IV est exprimée dans un nombre décroissant de bâtonnets entre PN11, 13 et 15, qui présentent un noyau à l'apparence condensée et dont l'ADN est fragmenté: les photorécepteurs semblent donc bien mettre en place des mécanismes de réparation au niveau cellulaire en réponse à la fragmentation de l'ADN suite à l'expression de la mutation.

C- La glie de Müller, précurseur neuronal rétinien ?

Les résultats négatifs d'infection soulèvent plusieurs questions:

Les résultats de RT PCR sur cerveau montrent que le transgène s'exprime correctement dans le cortex cérébral, excluant que la souris ait perdu le transgène.

Après avoir essayé en vain différentes approches d'infection, m'être interrogée sur l'adéquation virus/récepteur, sur le promoteur, malgré certains résultats en culture pouvant laisser espérer le contraire, (Hatzioannou et Goff, 2001), il apparaît comme impossible d'infecter des cellules qui ne prolifèrent pas avec un rétrovirus aviaire (confirmé par Eric Holland, communication personnelle, juillet 2004); ceci expliquant les échecs d'infection *in vivo* et sur explant où les cellules gliales ne prolifèrent pas. Dans le but de créer des modèles de tumorigénèse dans des cellules postmitotiques, le laboratoire de Varmus a développé un lentivirus avec un tropisme spécifique pour les récepteurs TvA (Lewis et coll., 2001): les lentivirus ne requièrent pas la rupture de la membrane nucléaire pour entrer dans le noyau. Ce virus devrait être capable d'infecter la glie rétinienne de la souris TvAGFAP.

L'absence de résultats positifs en culture, où les cellules cibles prolifèrent, pourrait s'expliquer par la différence dans le système de révélation par rapport aux travaux précédents (Holland et Varmus, 1998; Doetsch et coll., 1999b). Ils suivent le virus par un reporter β Gal, et non pas par immunomarquage contre une protéine virale; les virus RCAS étant replicatifs dans les cellules aviaires mais pas dans les cellules de mammifères, la quantité de virus rentrée ne suffirait peut être pas à donner un signal probant. Le délai, généralement de deux jours, entre l'infection et la fixation des cellules est peut être trop court.

La littérature, cependant, est riche de résultats montrant le « new role for glia, generating neurons ! » (Barres, 1999 et revue plus récemment par Doetsch, 2003). Très récemment, des travaux ont été publiés, décrivant la capacité des cellules gliales de Müller à proliférer et à se différencier en neurones rétiniens (cellules bipolaires et photorécepteurs) en réponse à un stress neurotoxique aigu (Ooto et coll., 2004). Les cellules de Müller proliférant, les auteurs ont pu les suivre, ainsi que leur descendance, grâce à l'infection par un rétrovirus de type MLV; dans le modèle de la souris *rd1* cependant, nous n'avons jamais mis en évidence de prolifération de cellules gliales.

La proportion de cellules gliales par rapport au nombre de cellules nerveuses augmente avec l'évolution pour atteindre 90% dans le SNC des mammifères adultes; si le potentiel neurogénique de la glie existe chez l'adulte dans de nombreux systèmes, l'impact pourrait en être considérable.

CONCLUSION

Nous n'avons pas observé de tentative de réparation rétinienne au niveau tissulaire comme les amphibiens et les poissons en sont capables. La zone marginale ciliaire et le corps ciliaire, zones très plastiques chez les poissons et les amphibiens, semblent avoir perdu certaines de leurs propriétés chez les mammifères. Les propriétés de cellules souches rétiniennes caractérisées *in vitro* concernent une sous population de cellules du corps ciliaire dont l'importance physiopathologique reste clairement à établir.

Alternativement, nous avons pu mettre en évidence un mécanisme de réparation à l'échelle cellulaire: dans un modèle de dégénérescence rétinienne due à l'expression d'une mutation par les bâtonnets, les photorécepteurs tentent de réparer leur ADN avant de s'incliner.

La réparation de cassures double brin dans l'ADN des photorécepteurs représente un « mécanisme d'urgence » par opposition aux « mécanismes constitutifs » de réparation accompagnant le vieillissement normal d'un organisme qui impliquent d'autres gènes assurant notamment la réparation de cassures simple brin et de modifications de bases dues essentiellement au métabolisme cellulaire (Lu et coll., 2004).

L'apoptose cellulaire et l'entrée dans le cycle de réplication possèdent de nombreux points communs (Meikrantz et Schlegel, 1995), conduisant certains auteurs à formuler l'hypothèse qu'une cellule qui va mourir tente une entrée dans le cycle cellulaire: dans de nombreux systèmes d'apoptose neuronale, a été rapportée l'expression de protéines impliquées dans le cycle cellulaire. L'expression de la Cycline D1 a été rapportée pendant l'apoptose neuronale (Freemann et coll., 1994). L'expression de la Cycline D1, de PCNA et l'incorporation de BrdU dans les neurones en grain du cervelet précèdent leur mort chez deux mutants neurologiques (Herrup et Busser, 1995). Bengzon et coll., (1997) rapportent l'apoptose et la prolifération de neurones du gyrus denté après des lésions de type épileptiques.

Le passage par une phase de réparation d'ADN pourrait expliquer pourquoi la cellule, avant de mourir, n'initie pas un cycle de réplication mais exprime des protéines connues pour être impliquées dans le cycle cellulaire, protéines également impliquées dans les mécanismes de réparation d'ADN, comme par exemple des DNA Polymérase et leurs facteurs accessoires.

Dans la rétine de la souris invalidée pour le gène codant AIF, la dégénérescence neuronale dans la rétine et le cervelet s'accompagne d'incorporation de BrdU, d'expression de PCNA et de cdc47 (Klein et coll., 2002); les auteurs interprètent ces résultats comme une entrée abortive dans le cycle cellulaire, alternativement, ils pourraient représenter des mécanismes de réparation d'ADN.

La dégénérescence chez la souris *rdl* est extrêmement rapide, la dégénérescence des photorécepteurs est totale en cinq semaines. Le modèle animal ne représente pas, sur cet aspect, la réalité humaine où ce type de pathologies s'étend sur plusieurs années, et où les mécanismes de réparation d'ADN ont vraisemblablement plus d'impact.



Fig. 30: Scanning Laser Ophthalmoscope,

Cet ophtalmoscope est équipé d'un laser dont la longueur d'onde est modifiable par l'observateur, permettant l'observation de certaines structures oculaires notamment de la vasculature après injection de fluoréscéïne.

TRAVAUX SUPPLEMENTAIRES

*Collaboration avec le laboratoire du Pr. Pierre Aucouturier,
Maladies à prions et système immunitaire, Inserm E-209*

A- Suivi *in vivo* de l'infection au prion chez la Souris CX₃CR1-KI GFP

Les encéphalopathies spongiformes transmissibles forment un groupe d'affections neurodégénératives qui comprend chez l'Homme la maladie de Creutzfeldt-Jakob; ces maladies se manifestent par des troubles neurologiques. La protéine du Prion (PrP) est actuellement retenue comme principal agent infectieux: c'est une glycoprotéine synthétisée dans presque tous les types cellulaires et, plus particulièrement, les neurones du système nerveux central; elle est essentielle à une transmission synaptique normale (Collinge et coll., 1994). La forme pathogène, retrouvée dans le cerveau de personnes ou d'animaux atteints, ne différerait de la forme normale que par sa conformation (Prusiner, 1994).

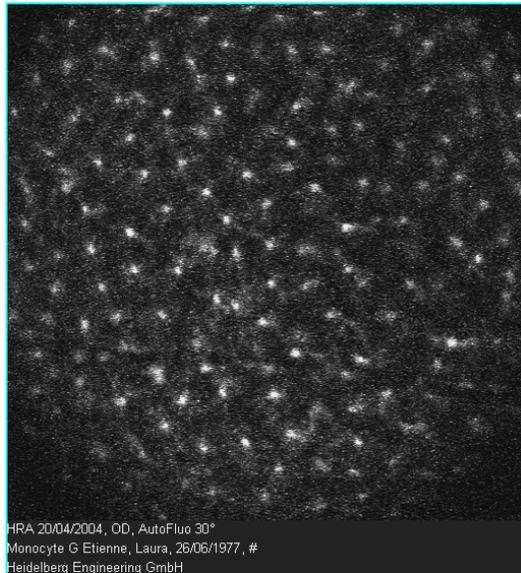
Il est possible de transmettre la maladie aux primates et aux rongeurs par administration orale d'un inoculum de viande contaminée (Maignien et coll., 1999).

CX₃CR1 est un récepteur à sept domaines transmembranaires exprimé à la surface des monocytes et de certaines cellules NK et lymphocytes T (Imai et coll., 1997). Il est spécifique à la chimioquine Fractalkine dont l'expression est surtout localisée à la surface des neurones (Schwaeble et coll, 1998). Dans le Système nerveux central, le couple CX₃CR1/Fractalkine médierait des interactions microglie/neurones (Harrison et coll., 1998). La souris CX₃CR1-KI GFP a initialement été générée par Jung et coll., (2000) et était utilisée par Etienne Levavasseur du Laboratoire de Pierre Aucouturier pour étudier les effets de l'invalidation de CX₃CR1 sur l'infectabilité au prion; cette souris exprimant la GFP à la place du récepteur, et, disposant au laboratoire d'un SLO (Fig. 30), il nous a paru intéressant de regarder dans l'œil de ces souris mutantes.

Avant l'analyse, les pupilles des animaux sont dilatées par instillation d'un collyre contenant de la tropicamide (CibaVision, Duluth, GA),

L'appareil (HRA/C, Heidelberg Engineering, Heidelberg, Allemagne) est utilisé dans deux canaux, $\lambda = 488$ et 534 nm.

Souris non infectée



Souris infectée

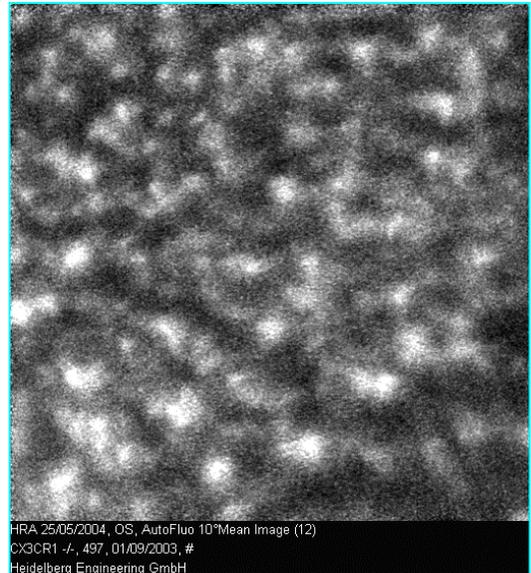
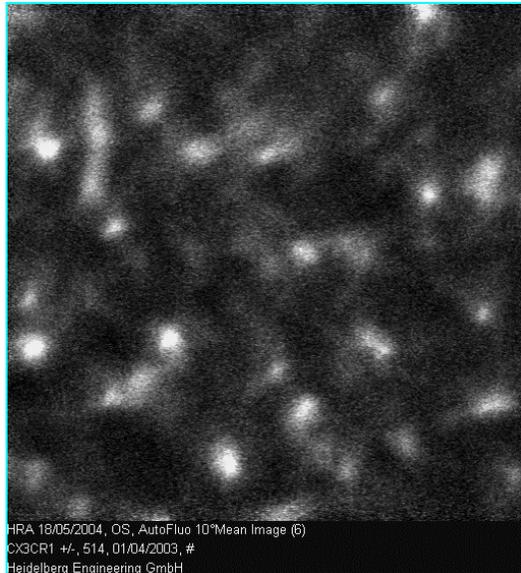
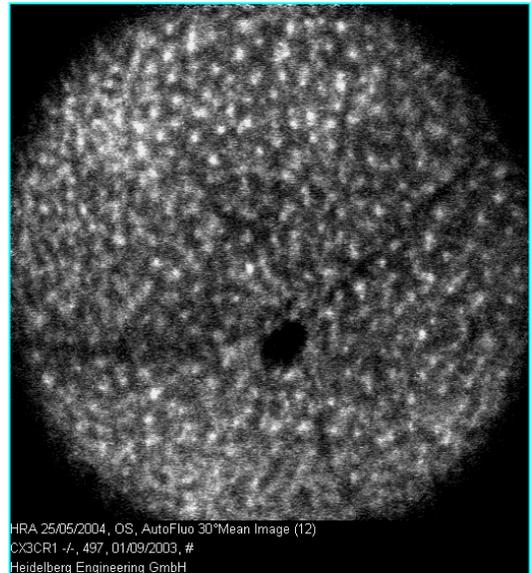


Fig. 32: Activation de la microglie suite à une infection au prion chez la souris CX3CR1 KI-GFP,

En haut, vue de la rétine entière, en bas, détail.

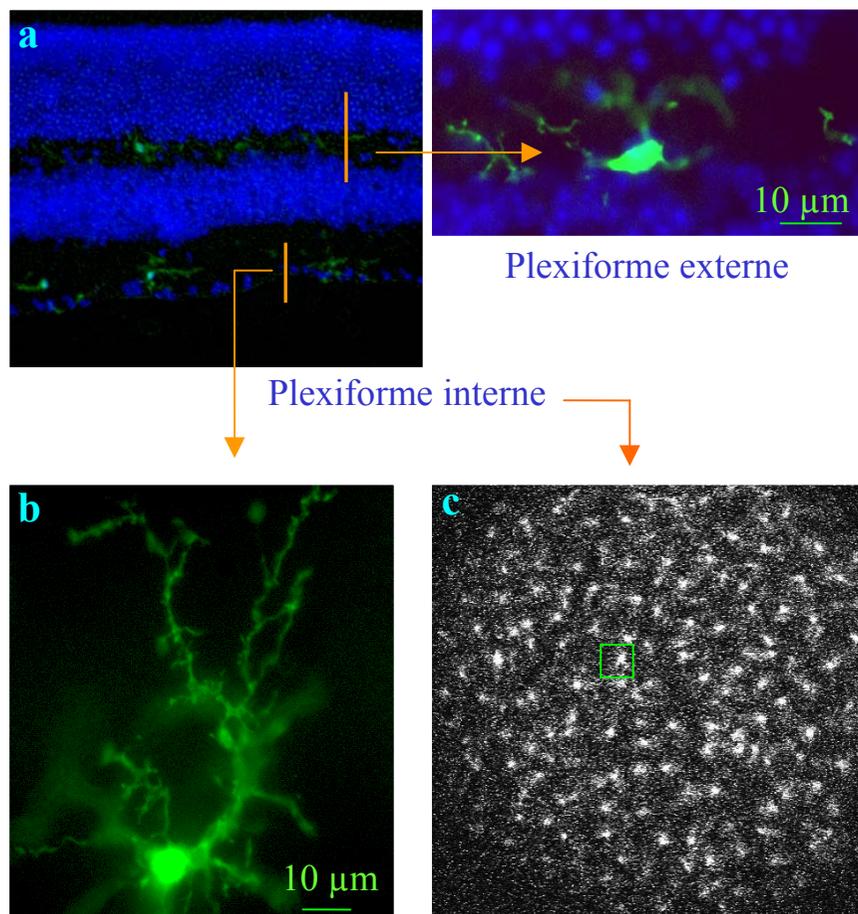


Fig. 31: La microglie chez la souris CX3CR1 KI-GFP

- a** sur coupe de rétine au microscope à épifluorescence
- b** sur rétine à plat au microscope à épifluorescence
- c** *in vivo* au SLO, dans le plan de la plexiforme interne.

B- Résultats : visualisation *in vivo* de l'activation de la microglie

Sur coupe de rétine, il est possible de voir des cellules microgliales dans les deux couches plexiformes (Fig. 31, haut). Au microscope à épifluorescence, sur rétine montée à plat, couche des cellules ganglionnaires vers le haut, il est possible de voir les cellules microgliales de la couche plexiforme interne (Fig. 31, milieu). Au SLO, l'observation nous a permis de visualiser des cellules ramifiées, disposées en réseau régulier, au niveau de la limitante interne (couche des axones des cellules ganglionnaires) ayant toutes les caractéristiques de cellules microgliales (Fig. 31, bas).

Nous avons ensuite pu mettre en évidence, *in vivo*, l'activation microgliale résultant de l'infection au prion (Fig. 32). Le mode d'invasion du système nerveux central par l'agent infectieux n'étant pas connu, il serait intéressant de suivre plus précisément ces phénomènes afin de les corrélérer dans le temps avec l'apparition des symptômes visuels. Les tests optocinétiques se sont avérés peu convénients car la souris débutant des troubles moteurs, il apparaît difficile de dissocier troubles visuels et moteurs dans les performances optocinétiques; l'utilisation de l'ERG est délicate car, une des électrodes étant directement en contact avec la cornée, les problèmes de contamination ne peuvent être négligés pour du matériel non initialement dédié aux maladies à prions.

Cette souris représente donc un excellent modèle pour suivre *in vivo* le stade d'infection par le prion et, la quantification de l'activation microgliale étant aisée, elle pourrait permettre de tester des agents protecteurs. Un suivi des animaux à un stade pré-symptomatique permettra de savoir s'il existe une atteinte précoce des cellules de la lignée monocytes/ macrophage au niveau de la rétine. Une telle donnée est importante afin de comprendre si l'apoptose neuronale dans les maladies à prion est consécutive à ou déclenche l'activation gliale.

MATERIEL & METHODES

A- Injections

Intrapéritonéale de BrdU

Afin de visualiser la prolifération cellulaire, les animaux ont reçu une injection unique de BrdU (B5002, Sigma) par voie intrapéritonéale (50mg/kg dans PBS stérile). Les souris ont reçu l'injection à PN13, 14, 15, 18, et à l'âge adulte; les rats ont reçu l'injection à l'âge adulte (supérieur à 3 mois); l'injection chez la souris FVB/N a eu lieu à PN 19. Les animaux ont été sacrifiés 3 heures, 24 h ou 48 h après l'injection; pour la mise au point du système de révélation de la BrdU incorporée, une portion d'intestin a été prélevée, nettoyée dans du PBS puis traitée comme les yeux.

Intraoculaires de virus concentré ou de cellules productrices

Les souris TvA GFAP âgées de deux semaines ont été injectées en sous rétinien avec une seringue de 30Gauges sur un microinjecteur (WPI: World Precision Instruments, Sarasota, FL, Modèle de la pompe: UMP2-D, Modèle du boîtier de contrôle: UMC 4 Micro 4 Micro Syringe Pump Controller). Le volume injecté est de 1µL de virus concentré ou de suspension cellulaire (trypsinisée puis centrifugée et reprise dans un petit volume de milieu, deux jours après infection). Les souris ont été sacrifiées une semaine après l'injection afin de permettre le prélèvement des yeux.

B- Cultures cellulaires

Lignée DF-1

Matériel

La lignée DF-1 est une lignée de fibroblastes embryonnaires de poulet transformés spontanément, n° ATCC: CRL-12203

DMEM (Invitrogen 41966-029) + 10% Sérum de veau foetal (SVF, Invitrogen 10278) + 1x Penicillin & Streptomycin

Trypsine 0,05% (Invitrogen, 25300)

Boîtes de Pétri de 6 cm

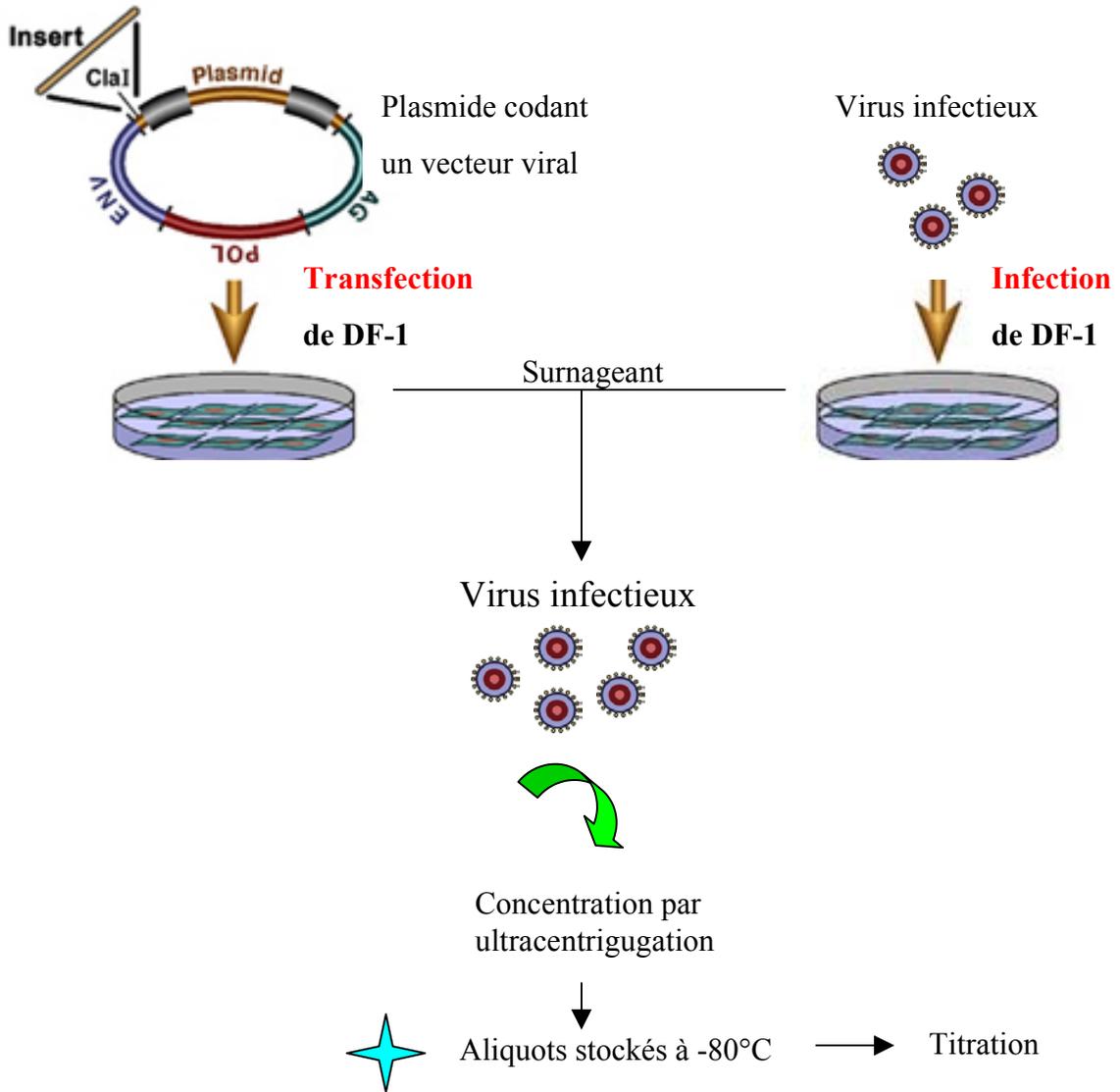


Fig. 33: Production de rétrovirus aviaire de type RCAS,
 par transfection à partir d'un vecteur viral à gauche ou
 par infection à partir de virus à droite.

Cryotubes 1,5 mL

Méthode

Décongélation d'une lignée:

Sortir le tube de l'azote liquide, décongeler les cellules au bain-marie à 37°C. Bien reprendre 1mL de cellules dans 3mL de milieu et ensemercer une boîte de 6cm, puis placer à l'incubateur, 37°C, 5% CO₂. Le lendemain, changer le milieu afin d'éliminer le DMSO (diméthyl sulfoxyde, D2650, Sigma).

Passages:

Lorsque les cellules arrivent à confluence, il faut les passer de 1 boîte dans 3 par exemple. Préchauffer du milieu et du PBS stérile (Phosphate Buffer Solution) à 37°C, de la trypsine à T°A. Retirer le milieu et rincer les cellules au PBS; retirer ensuite le PBS et recouvrir les cellules de Trypsine (utiliser environ 1/10 du volume de milieu, soit 0,5mL pour une boîte de 6cm). Placer la boîte quelques instants à l'incubateur, puis suivre le décollement des cellules au microscope. Bloquer rapidement l'action de la Trypsine en ajoutant 2mL de milieu. Triturer à la P1000 afin d'obtenir une suspension cellulaire sans agrégat, centrifuger 5', 4°C, 800rpm. Retirer le surnageant et reprendre dans le volume de milieu requis, ici 12mL à distribuer dans trois boîtes de 6 et à placer à l'incubateur.

Congélation:

Les cellules peuvent également être congelées: procéder comme pour un passage puis, après avoir retiré le surnageant suite à la centrifugation, reprendre les cellules dans un 1mL de mélange de DMSO/SVF dans les proportions 9/1 dans un cryotube de 1,5mL; placer 30' à 4°C, 2heures à -20°C, la nuit à -80°C puis dans l'azote liquide.

Production de rétrovirus aviaire de type RCAS A

La production peut être faite par transfection à partir d'un vecteur codant pour le virus ou par infection à partir de virus infectieux (Fig. 33); la procédure de transfection est préférable car elle est moins susceptible de générer des mutations dans le génôme des virus. La procédure par infection implique simplement de remplacer l'étape de transfection par une étape d'infection: 1µL de virus concentré dans une boîte de Pétri de 6cm.

Matériel

Hotte à flux laminaire vertical, matériel de culture + sérum de poulet inactivé (SP, Invitrogen, 16110-082)

Fugene (1 814 443, Roche), ultracentrifugeuse + tubes compatibles avec un rotor swing tournant à 20000rpm, cryotubes pour aliquoter le virus à -80°C.

Pour la titration, fibroblastes de caille, n°ATCC: CRL-1708.

Méthode

Malgré que ces virus ne soient pas infectieux pour l'Homme, veiller à ne pas se contaminer, surtout à partir de la concentration virale.

Transfection :

La veille,ensemencer n boîtes de Pétri de 35mm avec des DF-1, de façon à avoir une confluence de 50-80% le jour de l'expérience.

Dans un tube stérile, ajouter n x 100µL de milieu sans sérum puis n x 3µL de réactif Fugene; le réactif ne doit pas entrer en contact avec les parois du tube. Laisser 5' à T°A.

Ajouter n x 1µg d'ADN dans un second tube stérile (le volume total devra être compris entre 0,5 et 10µL).

Ajouter ensuite le réactif Fugene à l'ADN, mélanger en tapotant le tube et laisser 15' à T°A.

Répartir le mélange de façon homogène dans les boîtes contenant les cellules en culture puis les placer à l'incubateur à 37°C.

Lorsque les cellules atteignent la confluence (généralement après 36-48h), passer les cellules au 1/6 dans des boîtes de 10cm.

Attendre 3 jours puis récupérer le milieu de culture (stocker à -80°C) et le remplacer par du DMEM/ 1%SVF/ 0,2%SP (il faut réduire la viscosité pour faciliter la filtration). Attendre 3 jours puis récupérer le milieu de culture (stocker à -80°C).

Concentration :

Pendant la décongélation du surnageant viral sur glace, nettoyer les godets de l'ultracentrifugeuse à l'éthanol 70%. Filtrer le surnageant viral sur glace avec une pompe à vide sur des filtres de 0,45µm. Veiller à équilibrer avec soin le rotor. Tourner à 20000rpm, 4°C pendant 2,5h. Eliminer le surnageant puis, sur glace, resuspendre précautionneusement le culot dans le volume résiduel d'environ 100µL, aliquoter en 10µL et stocker à -80°C.

Titration :

Ensemencer des QT-6; la veille de l'infection, passer les cellules confluentes au 1/6 dans des boîtes à 24 puits. Le lendemain, décongeler du virus sur glace et faire différentes dilutions dans du milieu. Utiliser 0,2mL de dilutions de 10^{-5} à 10^{-9} pour infecter un puits, à 37°C pendant environ 2h. Ajouter ensuite 0,3mL de milieu par puits puis incuber les cellules 48h à 37°C.

Laver les cellules deux fois au PBS puis les fixer au PAF 4%, 15', T°A.

Laver les cellules trois fois au PBS puis procéder à un immunomarquage anti-gag (anticorps 3C2, révélation colorimétrique cf 59). Repérer la dilution à laquelle on ne retrouve qu'un clone dans le puits, une dilution de 10^{-7} signifie un titre de 10^8 virus/mL.

Infection d'explant rétinien

Matériel

Milieu Ame's (Sigma A 1420): rajouter 6,5 g/L de glucose, filtrer avant emploi

Milieu DMEM (Invitrogen 41966-029) + 10% SVF (Invitrogen 10278)

Milieu de culture: Neurobasal-A (Invitrogen 10888-022)

+ B27 supplément, x 50 (Invitrogen 17504-044)

+ L- Glutamine, x 100 (Invitrogen 25030-032)

Enzyme: Papain (Worthington 3124), bien vortexer avant de prélever.

Activateur d'enzyme: L-Cystéine (Sigma C7477): solution 10 X: 3,5 mg /10 ml d'Ame's (tous les produits, sauf le milieu de culture NBA+, sont à garder dans la glace)

Membrane: Transwell, Costar 3412

Ciseaux, Microciseaux, pinces droites, stériles.

Méthode

Après avoir décapité l'animal, désinfecter et rincer la face à l'éthanol, couper la paupière (si souris âgée de moins de 12 jours) puis prélever les 2 yeux et les placer dans une boîte de Pétri de 6 cm contenant du milieu Ame's (+4°C) sur glace. Sous loupe binoculaire, débarrasser les yeux des muscles.

Avec une pipette de transfert coupée, transférer les yeux dans une solution enzymatique: 50 µL L-Cystéine + 450 µL Ame's + 10 µL Papain, Incuber 15 à 30 min (selon l'âge) à 37°C.

Stopper l'action en transférant les yeux dans une boîte contenant du DMEM + 10% FCS, pendant 5 min. (ne pas dépasser ce temps)

Placer l'œil dans une boîte de Pétri (6 cm) + Ame's, 4°C (sur glace).

Faire une incision profonde juste sous l'iris, puis découper tout le pourtour du globe.

Couper entre le cristallin et la rétine, tout autour du globe jusqu'à ce que le cristallin soit complètement détaché, sans jamais tirer. La sclère doit se détacher très facilement, et l'épithélium pigmentaire doit rester collé à la rétine, couper au nerf optique. Faire 4 incisions franches et nettes jusqu'au centre de la rétine.

Déposer la rétine au centre de la membrane (avec la pipette de transfert coupée d'après la taille de la rétine) puis, à l'aide d'une pipette Pasteur à extrémité rôtée, retirer le maximum de milieu afin de mettre la rétine à plat.

«Mouiller» la membrane autour de la rétine avec le milieu de culture (pas trop pour ne pas redécoller la rétine), ajouter 1,5 ml de milieu dans l'insert, puis environ 0,2 ml sur la membrane. Placer à l'incubateur à 5% CO₂, 37°C.

Il est impératif de vérifier le niveau de milieu 1 h après la mise à l'incubateur de la plaque, car à 37°C, la membrane se dilate, et le volume ajouté au départ peut ne pas être correct.

(le niveau de milieu doit être vérifié immédiatement après la sortie de l'incubateur)

Changer tout le milieu 24h après la mise en culture, puis 2/3 du milieu tous les 2 jours (en aspirant toujours dans le puits).

Vérifier le niveau de milieu tous les jours.

Infection

L'infection est faite le jour de la mise en culture par ajout de 1µL de virus concentré directement sur le centre de l'explant.

Fixation

Prélever tout le milieu, rincer délicatement au PBS afin de ne pas décoller l'explant de la membrane puis fixer avec 1,5 ml de PAF 4%, 1h, + 4°C.

Passages dans des bains de PBS/sucrose 10%, 20%, 30%, chacun pendant 20min.

Prélever l'insert et sécher la membrane sur un papier.

Découper avec un scalpel autour de l'explant, puis l'inclure sur sa membrane dans de l'OCT (milieu d'inclusion Tissue-Tek, Sakura Finetec, Netherlands), la congélation doit être lente.

Conservation courte, à -20°C, conservation longue, à -80°C.

Coculture DF-1 infectées/explant rétinien

Matériel

Cf Matériel pour la culture de DF-1 plus matériel pour l'explant.

Méthode

Une culture de DF-1 est réalisée dans le fond des puits des Transwell; à 70% de confluence environ, les cellules sont infectées par ajout de 1µL de virus concentré dans le milieu et l'explant de rétine est mis en présence; l'explant est rincé au PBS puis fixé 48h après.

Infection de cellules gliales de Müller en culture

Matériel

Souris PN6-7: 4 souris pour obtenir une boîte de 6cm de cellules de Müller

Pince courbe fine, pinces droites et microciseaux stériles

Boîtes de Pétri de 6cm

Milieu DMEM (Invitrogen, 41966-029) + 10% SVF (Invitrogen, 10278)

Trypsin 0,05 % (Invitrogen, 25300)

Collagénase (Worthington, NJ, 4196)

Méthode

Selon la technique de Hicks et Courtois, (1990).

Nettoyer la tête des souris à l'éthanol 70%, couper les paupières puis prélever délicatement les yeux; les plonger ensuite dans une solution filtrée (0,22 μ m) de Trypsine à 10mg/mL + Collagénase à 2mg/mL dans du DMEM; le Volume sera de 0,5mL par œil. Incuber 30 à 45' à 37°C, l'extérieur de l'œil devra avoir un aspect légèrement floconneux. Retirer la solution enzymatique avec précautions, les yeux sont mous, puis bloquer en ajoutant 10mL de DMEM+10%SVF.

Dans une boîte de Pétri, procéder à la dissection des rétines comme suit:

A l'aide de deux pinces droites, retirer la cornée en tirant doucement ; la sclère doit se détacher avec ou sans l'épithélium pigmenté, si celui-ci reste attaché, l'éliminer en grattant légèrement autour de l'iris. Faire de même avec tous les yeux. Couper ensuite autour de l'iris et retirer le cristallin.

Après avoir transféré les rétines dans une autre boîte contenant du milieu DMEM+10%SVF propre, les découper en morceaux de 1mm² à la pince courbe; répartir environ 8 rétines par boîte de 6cm.

4 à 6 jours après la mise en culture, retirer les agrégats rétiniens en aspirant le milieu voire les décoller en aspergeant avec du milieu.

L'infection consiste à remplacer le milieu de culture par du surnageant de DF-1 infectées en parallèle (surnageant viral prélevé 24 heures après l'infection) dans une boîte de 6cm à 70% de confluence.

Fixation

48h après infection, prélever tout le milieu, rincer au PBS et ajouter 1,5 ml de PAF 4%, garder 20' à +4°C, puis remplacer par du PBS.

Infection d'astrocytes corticaux en culture

Matériel

Souris PN0, 2 souris pour une boîte de 3cm.

Milieu DMEM F12 (Invitrogen, 31330) + 10% FBS (Invitrogen, 10270)

Trypsin 0,05 % (Invitrogen, 25300)

Boîtes de Pétri de 3cm

Ciseaux, Microciseaux, pinces droite et courbe, stériles.

Méthode

Décapiter la souris, rincer la tête à l'éthanol. En passant les microciseaux dans le tube rachidien, découper le crâne et le retirer, apparaissent les hémisphères cérébraux avec à l'avant le bulbe olfactif et à l'arrière le cervelet. A l'aide d'une pince courbe, écarter bulbe olfactif et cervelet. Placer les hémisphères cérébraux dans une boîte de Pétri dans du milieu, ne conserver que le cortex cérébral et retirer soigneusement les méninges. Transférer dans du milieu propre puis dissocier le tissu à la P1000 puis P200. Centrifuger 4', 800rpm, éliminer le surnageant puis reprendre dans du milieu: 1 cerveau suffit pour ensemercer 2 boîtes de 3cm.

Placer à l'incubateur à 5% CO₂, 37°C.

Changer tout le milieu 3jours après la mise en culture, en décollant les cellules mal adhérentes. Ces cellules se passent une à deux fois (avant le premier passage, présence de neurones) et se congèlent et se décongèlent comme une lignée cellulaire.

L'infection consiste à ajouter 1µL de virus concentré dans une boîte de 6cm à 70% de confluence.

Fixation

48h après infection, prélever tout le milieu, rincer au PBS et ajouter 1,5 ml de PAF 4%, garder 20' à +4°C, puis remplacer par du PBS.

C- Immunohistologie

Préparation des tissus

Avant énucléation, l'œil est marqué par cotérisation légère à 12 heures au niveau du limbe. L'inclusion de l'œil droit ou gauche, selon l'axe nerf optique/cornée et la marque permettront de repérer la zone inférieure, supérieure, temporale ou nasale et ainsi, de comparer des zones comparables. L'œil est ensuite prélevé et placé 6 heures dans du paraformaldéhyde 4% (PAF

4%), à 4°C ; l'idéal étant de retirer avec précaution un bouton de cornée à l'aide d'une pince droite et de microciseaux après quelques minutes dans le fixateur, empêchant tout affaissement de l'oeil.

Milieu à congélation

Les yeux sont cryoprotégés par passages dans des bains de PBS/Sucrose de concentration croissante : 20' dans PBS/Sucrose 10%, 20' dans PBS/Sucrose 20%, 5' PBS/Sucrose 30%.

L'inclusion dans de l'OCT (Tissue-Tek, Sakura Finetec, Netherlands) est suivie d'une étape de congélation lente par conduction (exemple : sur un support de cryostat dont le pied repose dans de l'Azote liquide). Lorsque l'OCT est devenu entièrement blanc, transférer le bloc à -20°C ou il peut être conservé à court terme puis à -80°C pour une conservation plus longue.

La coupe est réalisée sur un cryostat (CM 1900, Leica), l'épaisseur standard est de 8µm. Laisser sécher les coupes 15' à température ambiante (pour une éventuelle conservation, les placer dans une boîte hermétique à -20°C) puis les plonger dans du PBS.

Paraffine

Les yeux sont inclus dans la paraffine chaude après déshydratation dans des bains de concentration croissante en éthanol puis dans des bains de Xylène. Le système est automatisé (Citadel 1000, Shandon). Programme: 1: 30', éthanol 70%, 2: 90', 3: 60', 4: 60', éthanol 95%, 5: 90', 6: 60', 7: 60': éthanol 100%, 8: 90', 9: 60', 10: 60': xylène, 11: 120', 12: 120': paraffine.

Après le cycle, les yeux sont inclus manuellement dans un bloc de paraffine pour être ensuite coupés sur un microtome (HM 340 E, Microm). L'épaisseur standard est de 8µm; pour l'histologie, préférer 4µm. Les lames sont placées quelques heures à l'étuve à 58°C avant de pouvoir être déparaffinées et réhydratées dans des bains de Xylène (3 bains successifs de 10'), d'Ethanol de concentration décroissante (2 bains successifs de 10' dans 100% puis 1 bain de 5' dans 70%), d' H₂O dist puis de PBS.

Anticorps et techniques

Si nécessaire, les coupes subissent une étape de «démassage» antigénique (cf tableau ci-dessous, Traitement préalable du tissu).

Après rinçage dans du PBS, les sites aspécifiques sont saturés par incubation d'au moins une heure dans une solution de PBS, 1% BSA (GAUBSA 01-62, Eurobio, Courtaboeuf, France), 0,1% Tween 20 (400035, Cayman Chemical, Ann Arbor, MI). Les coupes sont ensuite mises en présence des anticorps primaires dilués dans la solution de saturation, une nuit à 4°C ; après rinçage dans du PBS, l'immunomarquage est révélé par un anticorps secondaire anti-espèce fluorescent dilué dans la solution de saturation (ou bien couplé à une enzyme permettant une réaction colorée (Kit ABC, PK- 6100, et DAB, SK-4100, Vector Laboratories, Burlingame, CA)); introduire du DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindole, Sigma) 1/500 (d'une solution aqueuse saturée) dans le mélange de révélation pour visualiser les noyaux cellulaires.

Le marquage TUNEL a été fait selon les recommandations du kit (*In situ* cell death detection kit, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) sur coupes paraffine après perméabilisation au PBS, 0,1% Triton X100, 0,1% Citrate de sodium, 10', T°A.

Anticorps I, nuit, 4° C Dilution	Inclusion	Traitement préalable du tissu	Révélation, 1h, obscurité
m@BrdU/biotin (93-3944, Zymed, San Francisco, CA) Prêt à l'emploi	Paraffine	Digestion à la Trypsine 0,05%, 10', 37°C suivie d'une dénaturation à HCL 4N, 3'	Streptavidin/ Alexa 594 (Molecular Probes, Eugene, OR)), ou Streptavidin/FITC (BD Biosciences), 1/500
m@BrdU (347580, BD BioSciences, San Jose, CA) 1/20		15' dans PBS /1% NaBH4 (Sigma: S-9125) préparé extemporanément	@mouse ou @rabbit 594 ou 488 (Molecular Probes, Eugene, OR), 1/500
rbt@Opsine bleue (J. Nathans) 1/5000			
rbt@Pax6 (PRB-278P, CRP Inc.,) 1/400		5' au microondes à puissance moyenne dans du tampon citrate pH6, puis laisser refroidir 5' dedans <u>Tampon Citrate pH6:</u> Solution A: Acide citrique 0,1 M Solution B: Citrate de sodium 0,1 M Mélanger 18 mL de Solution A à 82 mL de Solution B, qsp 1L H ₂ O dist.	
m@PCNA (sc-56, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) 1/200		Solution A: Acide citrique 0,1 M Solution B: Citrate de sodium 0,1 M Mélanger 18 mL de Solution A à 82 mL de Solution B, qsp 1L H ₂ O dist.	
rbt@PCNA (sc-7907, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) 1/100			
rbt@cleaved caspase 3 (9661, Cell Signaling, Beverly, MA) 1/50			
rbt@XRCC4 (ab 12069, Abcam, Cambridgeshire, UK) 1/20			

rbt@DNA Ligase IV (PC604, Oncogene, Boston, MA) 1/100		Aucun ou 30', dans 0,04% Pepsin Préparée dans PBS/0,01N HCl
rbt@MDM2 (T. Léveillard) 1/100		5' au microondes à puissance moyenne dans du tampon citrate pH6, puis laisser refroidir 5' dedans
m@p53 (421 from Oncogene Science, Cambridge, MA) 1/100		30', dans 0,04% Pepsin préparée dans PBS/0,01N HCl ou 5' au microondes à puissance moyenne dans du tampon citrate pH6, puis laisser refroidir 5' dedans
m@Rhodopsin (D. Hicks) 1/100		N'importe
3C2 (O. Goureau) 1/5	Paraffine, OCT et culture cellulaire	Jamais fonctionné ailleurs que sur culture cellulaire sans traitement
12D5 (C.Ochsenbauer, S. Delos, KJ Dunn) 1/100		Jamais fonctionné
3B1 (C. Ochsenbauer, S. Delos, KJ Dunn) 1/100		Jamais fonctionné
ILB4/FITC (L 3019, Sigma, Saint Louis, MI) 1/50	Paraffine	Aucun

Pour la visualisation de la GFP chez la souris CX₃CR1-KI GFP,

-sur coupes: l'œil entier a été fixé, cryoprotégé puis inclus en OCT.

-sur rétine à plat: la rétine a été fixée puis mise à plat entre lame et lamelle et observée directement.

L'observation en épifluorescence a été faite sur microscope Nikon Optiphot 2, équipé d'une camera couleur CCD CoolSNAPfx (Roper Scientific Inc., MetaView software).

L'observation en microscopie confocale a été faite sur un microscope Zeiss Axiovert 100 (Zeiss LSM 510 v2.5 scanning device).

D- Etudes d'expression

Extraction acides nucléiques

Purification d'ADN pour géotypage selon l'allèle *rd1*

Matériel

Protéinase K (P5056, Sigma)

Tampon de lyse: 0,05M Tris ph 8,0, 5mM EDTA, 1% SDS, 0,2M NaCl

Méthode

Digérer chaque queue de souris dans 500µL de tampon de lyse contenant 0,04mg/mL de Protéinase K, la nuit à 65°C.

Procéder à deux extractions au Phénol-Chloroforme puis à une précipitation à l'éthanol absolu ainsi qu'à un lavage du culot à l'éthanol 70%; le culot est repris dans 100 µL d'H₂O stérile (conservation à -20°C).

Purification d'ARN pour étude d'expression du récepteur TvA

Matériel

Trizol Reagent, (15596-026, Life Technologies)

Méthode

Prélever un hémisphère cérébral TvA et C3H, PN14, dans du PBS stérile, transférer rapidement dans du Trizol (!contient du Phénol) sur glace ; homogénéiser avec seringue et aiguilles de diamètre décroissant (jusqu'à 27G).

Conservation possible à -80°C.

Optionnel mais mieux pour retirer DNA génomique: centrifuger 10', 12000g, 4°C, transférer le surnageant dans un tube propre.

Extraire l'ARN: ajouter 0,2mL de chloroforme par mL de Trizol, secouer vigoureusement à la main, laisser quelques minutes à T°A puis centrifuger à 12000g max , 15', 4°C . Transférer la phase supérieure aqueuse dans un tube propre.

Précipiter l'ARN en ajoutant 0,5mL d'isopropanol par mL de trizol initialement utilisé, laisser 10' à T°A puis centrifuger à 12000g max , 10', 4°C.

Retirer le surnageant avec précautions : laver le culot avec 1mL d'éthanol 75% par mL de trizol initialement utilisé (vortexer puis centrifuger à 7500g max , 5', 4°C).

Après avoir laissé sécher le culot (10', à l'air), redissoudre l'ARN dans 100µL d' H₂O RNase free en pipetant puis en l'incubant 10' à 55-60°C.

L'ARN partiellement dissout a A260/A280 inférieur à 1,6.

[ARN]= DO260 x dilution x 40

Conserver à -80°C.

Purification d'ARN pour étude du niveau d'expression de sfrp1 et 3

Matériel

AcK 2M pH5#

CsCl.

EDTA

Ethanol

guanidine-HCl 6M#

H₂O RNase-free

% N-lauryl sarcosine

Phénol acide

SDS

Tris 100mM pH8

Polytron

ultracentrifugeuse

Matériel à dissection stérile

Méthode

Extraction guanidine-HCl puis purification sur gradient de Chlorure de Césium CsCl :

Dix rétines sont prélevées rapidement et placées dans 2,4 mL de guanidine-HCl 6M avant d'être soigneusement homogénéisés 1'au Polytron. 270 µL de AcK 2M pH5 sont ajoutés avant agitation horizontale 10' à 420 rpm. Après une centrifugation de 10' à 5000 rpm, le surnageant

délicatement prélevé est mis en présence de 5,3 mL de Tris 100mM pH8, 1% N-lauryl sarcosine et 3,2 g de CsCl. Ce mélange est ensuite ajouté délicatement à un tube SW41 autoclavé contenant 1,8mL de CsCl/EDTA. Suite à une centrifugation d'au moins 20h à 32000 rpm (ultracentrifugeuse Beckman) à 20°C, les phases supérieures sont éliminées. A l'aide d'un scalpel passé à la flamme, le fond du tube est découpé puis retourné et rincé sur une compresse de gaze stérile avec 160µL de guanidine-HCl 6M. Après avoir laissé le culot sécher à l'air libre, le reprendre dans 180µL de Tris 10mM pH7,5 / EDTA 1mM. 150µL de Tris 10mM pH7,5 / EDTA 1mM, 30µL d'acétate de sodium 3M pH5, 900µL d'éthanol 90% à -20°C sont ajoutés avant de vortexer et de placer les tubes 30' à 4°C. Les tubes sont ensuite centrifugés 30' à 15000 rpm à 4°C puis le culot est rincé deux fois avec 500µL d'éthanol 70% à -20°C. Le culot est repris dans 50µL d'H₂O RNase-free, d'abord en pipetant puis par un bain de 15' à 45°C avant d'être soumis à une extraction au Phénol acide puis à une précipitation à l'éthanol. Le culot est finalement repris dans 100µL d'H₂O RNase-free (aliquoter et conserver à -80°C).

RT-PCR

RT

Matériel

H₂O RNase free (Quiagen)

RNAsin (Promega)

pdN6 (Life Technology)

dNTPs (Life Technology)

DTT (Life Technology)

5X Buffer (Life Technology)

Superscript II (Life Technology)

Phénol-Chloroforme

TE' (10mM Tris pH 8, 0,1mM EDTA)

Méthode

Les ADNc représentatifs de l'ensemble des ARNs sont synthétisés à l'aide d'amorces hexanucléotidiques de séquence aléatoire.

5 µg d'ARN complétés à 24 µL avec de l'H₂O RNase free sont rétrotranscrits (placés 5' à 65°C puis centrifugés brièvement et incubés à 37°C pendant 2h) en présence de 40u de RNAsin, 5X Buffer dilué 5 fois, 0,5 µM de DTT, 0,025µM de dNTPs, 2,5 µg de pdN6, 1000u de

Superscript II. 50 μ L d' H₂O Rnase free sont ajoutés au milieu réactionnel avant de procéder à une extraction au Phénol-Chloroforme puis à une précipitation à l'éthanol; le culot est repris dans 100 μ L de TE' (conservation à -20°C).

PCR en temps réel sur Light-cycler

Le Light-cycler est un thermocycler commercialisé par Roche:

-La quantité d'ADN double brin est mesurée à chaque cycle ce qui permet d'analyser les données pendant la phase logarithmique de l'amplification et ainsi de comparer deux échantillons entre eux, après normalisation par rapport à un gène exprimé de façon ubiquitaire. Les mesures sont faites grâce à un fluorimètre mesurant la fluorescence émise par le Sybr Green (fluorochrome que l'on introduit dans le mélange réactionnel et qui fluoresce lorsqu'il est intercalé dans l'ADN double brin), la fluorescence est proportionnelle à la concentration en ADN double brin.

-Les réactions se font dans des capillaires de verre, permettant des variations de température rapides (30 cycles en 20 minutes) réduisant ainsi la possibilité de formation de produits non spécifiques et, de plus, le système comporte un programme qui détermine la température de fusion du ou des produits en solution, permettant de savoir si seul le produit désiré a été amplifié.

- L'analyse des résultats : une valeur de fluorescence est choisie dans la phase logarithmique de l'amplification et le logiciel donne la valeur en nombre de cycles d'amplification correspondant au moment où l'ADN est détecté ; plus concrètement, soient deux échantillons A et B dont l'analyse pour une même valeur de fluorescence donne des résultats en nombre de cycles de 20 et 21 respectivement, la quantité en ADN double brin est deux fois plus importante dans l'échantillon A (si l'efficacité de la PCR est de 100 %).

-Les valeurs obtenues sont hautement reproductibles.

Expression du récepteur TvA :

Matériel

Light Cycler FastStart

DNA Master Plus

SYBR GreenI

03 515 869, Roche

Méthode

Préparer Master Mix (1b+1a à 9 pour 1)

Diluer cDNA au 1/10

	1 réaction	1 réaction
cDNA dilué au 1/10	5 µL	5 µL
H ² O	10,5 µL	10,5 µL
Master Mix 5X	4 µL	4 µL
TvA Amorces s + Amorces as mélangés 1/1	0,5 µL	
βActin Amorces s + Amorces as mélangés 1/1		0,5 µL

Séquence des amorces:

AMORCE	T°m
TvA Sens (21-mer) TGC TCT GCC AGC CAG GAA TCA	73
TvA Antisens (20-mer) TGC CAC CAT CCA GAC CCA TT	70
βActin Sens (22) AAA GAA AGG GTG TAA AAC GCA G	68
βActin Antisens (22) AAA GAC CTC TAT GCC AAC ACA G	69

PCR de géotypage *rdI*

Matériel

Lightcycler (Roche)

LCDNA master Hybr

Méthode

Chaque échantillon contient 50µg d'ADN dans un volume de 2µL qui seront amplifiés dans un volume de 18µL de mélange réactionnel, volume final = 20µL.

MIX (x10) :

H₂O 104,5 µL
25 mM MgCl₂ 24 µL (3 mM)

10 pmole/ μ L amorce rd 1	10 μ L	(0,5 μ M)
10 pmole/ μ L amorce rd 2	10 μ L	(0,5 μ M)
1/10 0,45 μ g/ μ L rdca	6,8 μ L	(0,2 μ M)
1/10 1,38 μ g/ μ L rdcd	4,6 μ L	(0,4 μ M)
10x LCDNA master Hybr	20 μ L	(X1)

Centrifuger 5''à 1000 rpm

Programme LC hybridation:

GAIN X5

DENATURATION : 95°C 30 sec.

AMPLIFICATION : 95°C 0 sec.

58°C 5 sec.

Analysis mode : Quantification

72°C 10 sec. 40 cycles

Analysis mode : None

FUSION : 95°C 0 sec.

65°C 30 sec.

95°C 0 sec. Rate 0,1°C/sec.

COOL 40°C 30 h

Séquence des amorces:

rd1 (25-mer) Tm 57,54°C

1CACACCCCCGGCTGATCACTGGGCCCTGGCCAGTGGCCTTCCAACCTACGTAGCAGAA
AGTGGCTTT67

rd2 (26-mer) Tm 57,48°C

1CACACCCCCGGCTGATCACTGGGCCCTGGCCAGTGGCCTTCCAACCTAAGTAGCAG
AAAGTGGCTTT 67

SEQUENCE rdca	Tm
CCCGGCTGATCACTGGGCCCTGGCCAG	76.95
CCCGGCTGATCACTGGGCCCTGGCC	75.12
SEQUENCE rdcd	Tm
CTTCCAACCTACGTAGCAGAAAGTGGCTT	62.86

CTTCCAACCTAAGTAGCAGAAAGTGGCTT	60.66
-------------------------------	-------

PCR sfrp1 et 3

Matériel

Light Cyclor

Kit LCDNA Master SYBR

Méthode

2µg d'ADNc matrice dilués au 1/10 sont amplifiés en présence de LCDNA Master SYBR 10X dilué dix fois, 1,25µM d'amorce 3', 1,25µM d'amorce 5', 3mM d' MgCl₂, qsp 20 µL avec de l'H₂O stérile.

Amorces utilisées :

Les séquences oligonucléotidiques ont été déterminées grâce au serveur informatique Infobiogen (www.infobiogen.fr). Les séquences sont données de 5' en 3', fournisseur : Life Technologies.

Nom	Séquence et position	Numéro d'accès
sfrp3.1	371 AGCCCATTCATCAAGTACC 391	u68058
sfrp3.2	686 GCCTTTAGAATTCCTTCACTTCC 663	u68058
sfrp1.1	823 CGACAACGAGTTGAAGTCAGAG 844	u88566
sfrp1.2	1076 TGCGGCCCATGATGAGAAAG 1057	u88566
mg6pdh1	497 GCAGTCACCAAGAACATTCAAG 518	z11911
mg6pdh2	814 CCCAAATTCATCAAAATAGCCC 793	z11911

Programme :

Dénaturation : 30'' à 95°C, Amplification : 1'' à 95°C, 5'' (temps d'élongation en ''= taille du produit en pb/25) à 58°C (T° optimale Robocycler - 2°C), 12'' à 72°C, 40 cycles, Analysis mode : Quantification, Fusion : 0'' à 95°C, 30'' à 65°C, 0'' à 95°C (0,1°C/'').

Electrophorèse en gel d'Agarose

La séparation d'échantillons d'ADN est faite par électrophorèse sur gel d'agarose : 1 à 2 % d'agarose selon la taille du produit dans du TAE 1X, tampon de migration: TAE 1X, la visualisation a lieu sous UV grâce à 10µL de BET / 100mL de gel, un marqueur de poids moléculaire migre en parallèle. Le logiciel VisioLab est utilisé pour l'acquisition de l'image.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abeliovich A, Gerber D, Tanaka O, Katsuki M, Graybiel AM, Tonegawa S, (1992). On somatic recombination in the central nervous system of transgenic mice. *Science*, 257(5068):404-10.
- Aboody KS, Brown A, Rainov NG, Bower KA, Liu S, Yang W, Small JE, Herrlinger U, Ourednik V, Black PM, Breakefield XO, Snyder EY, (2000). Neural stem cells display extensive tropism for pathology in adult brain: evidence from intracranial gliomas. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 97, 12846-12851.
- Acland GM, Aguirre GD, Ray J, Zhang Q, Aleman TS, Cideciyan AV, Pearce-Kelling SE, Anand V, Zeng Y, Maguire AM, Jacobson SG, Hauswirth WW, Bennett J, (2001). Gene therapy restores vision in a canine model of childhood blindness. *Nat. Genet.*, 28, 92-95.
- Ahmad I, Dooley CM, Thoreson WB, Rogers JA, Afiat S, (1999). *In vitro* analysis of a mammalian retinal progenitor that gives rise to neurons and glia. *Brain Res.*, 831, 1-10.
- Ahmad I, Tang L, Pham H, (2000). Identification of neural progenitors in the adult mammalian eye. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 270, 517-21.
- Ali RR, Sarra GM, Stephens C, Alwis MD, Bainbridge JW, Munro PM, Fauser S, Reichel MB, Kinnon C, Hunt DM, Bhattacharya SS, Thrasher AJ, (2000). Restoration of photoreceptor ultrastructure and function in retinal degeneration slow mice by gene therapy. *Nat. Genet.*, 25, 306-310.
- Allen E, (1912). The cessation of mitosis in the central nervous system of the albino rat. *J. Comp. Neurol.*, 22, 547-568.
- Altman J, (1963). Autoradiographic investigation of cell proliferation in the brains of rats and cats. *Anat Rec.*, 145, 573-591.
- Altman J, (1969). Autoradiographic and histological studies of of postnatal neurogenesis. IV. Cell proliferation and migration in the anterior forebrain, with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb. *J Comp Neurol.*, 137, 433-458.
- Altman J, Das GD, (1966). Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. I. A longitudinal investigation of the kinetics, migration and transformation of cells

incorporating tritiated thymidine in neonate rats, with special reference to postnatal neurogenesis in some brain regions. *J. Comp. Neurol.*, 126(3):337-89.

-Altman J, Das GD, (1965). Post-natal origin of microneurons in the rat brain. *Nature*, 207, 953-6.

-Altman J, Das GD, (1965). Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol.* 124(3):319-35.

-Alvarez-Buylla A, García-Verdugo JM, Tramontin AD, (2001). A unified hypothesis on the lineage of neural stem cells. *Nat. Rev. Neurosci.*, 2, 287-293

-Anson-Cartwright L, Dawson K, Holmyard D, Fisher SJ, Lazzarini RA, Cross JC, (2000). The glial cells missing-1 protein is essential for branching morphogenesis in the chorioallantoic placenta. *Nat. Genet.*, 25, 311-314.

-Anthony TE, Klein C, Fishell G, Heintz N, (2004). Radial Glia Serve as Neuronal Progenitors in All Regions of the Central Nervous System. *Neuron*, 41, 881-890.

-Araki R, Fujimori A, Hamatani K, Mita K, Saito T, Mori M, Fukumura R, Morimyo M, Muto M, Itoh M, Tatsumi K, Abe M, (1997). Nonsense mutation at tyr-4046 in the DNA-dependent protein kinase catalytic subunit of severe combined immune deficiency mice. *Proc. Natl Acad. Sci.*, 94, 2438-2443.

-Aramant RB, Seiler MJ, (1995). Fiber and synaptic connections between embryonic retinal transplants and host retina. *Exp. Neurol.*, 133, 244-255.

-Banin S, Moyal L, Shieh S, Taya Y, Anderson CW, Chessa L, Smorodinsky NI, Prives C, Reiss Y, Shiloh Y, Ziv Y, (1998). Enhanced phosphorylation of p53 by ATM in response to DNA damage. *Science*, 281, 1674-1677.

-Barnes DE, Stamp G, Rosewell I, Denzel A, Lindahl T, (1998). Targeted disruption of the gene encoding DNA ligase IV leads to lethality in embryonic mice. *Curr. Biol.*, 8, 1395-8.

-Belliveau MJ, Young TL, Cepko CL (2000). Late retinal progenitor cells show intrinsic limitations in the production of cell types and the kinetics of opsin synthesis. *J. Neurosci.*, 20, 2247-54.

-Barres BA, (1999). A new role for glia, generation of neurons! *Cell*, 97, 667-670.

-Bebenek K, Garcia-Diaz M, Blanco L, Kunkel TA, (2003). The Frameshift Infidelity of Human DNA Polymerase. *The Journal of biological Chemistry*, 278, 34685-34690.

-Bengzon J, Kokaia Z, Elmer E, Nanobashvili A, Kokaia M, Lindvall O, (1997). Apoptosis and proliferation of dentate gyrus neurons after single and intermittent limbic seizures. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 94, 10432-10437.

- Bennett J, Tanabe T, Sun D, Zeng Y, Kjeldbye H, Gouras P, Maguire AM, (1996). Photoreceptor cell rescue in retinal degeneration (*rd*) mice by in vivo gene therapy. *Nat Med* 2, 649–654.
- Bennett J, Zeng Y, Bajwa R, Klatt L, Li Y, Maguire AM, (1998). Adenovirus-mediated delivery of rhodopsin-promoted bcl-2 results in a delay in photoreceptor cell death in the *rd/rd* mouse. *Gene Ther* 5,1156–1164.
- Berson EL, Rosner B, Sandberg MA, Hayes KC, Nicholson BW, Weigel-DiFranco C, Willett W, (1993). Vitamin A supplementation for *retinitis pigmentosa*. *Arch. Ophthalmol.*, 111, 1456-1459.
- Blakemore WF, Jolly RD, (1972). The subependymal plate and associated ependyma in the dog. An ultrastructural study. *J. Neurocytol.*, 1, 69-84.
- Blaschke AJ, Staley K, Chun J, (1996). Widespread programmed cell death in proliferative and postmitotic regions of the fetal cerebral cortex. *Development*, 122, 1165-1174.
- Blaschke AJ, Weiner JA, Chun J, (1998). Programmed cell death is a universal feature of embryonic and postnatal neuroproliferative regions throughout the central nervous system. *J. Comp. Neurol.*, 396, 39-50.
- Blau HM, Brazelton TR, Weimann JM (2001).The evolving concept of a stem cell: entity or function? *Cell*, 105: 829-41.
- Bok D, Yasumura D, Matthes MT, Ruiz A, Duncan JL, Chappelov AV, Zolotukhin S, Hauswirth W, LaVail MM, (2002). Effects of adeno-associated virus-vectored ciliary neurotrophic factor on retinal structure and function in mice with a P216L rds/peripherin mutation. *Exp. Eye Res.*, 74, 719-735.
- Bork P, Hofmann K, Bucher P, Neuwald AF, Altschul SF, Koonin EV, (1997). A superfamily of conserved domains in DNA damage responsive cell cycle checkpoint proteins. *FASEB J.*,11, 68-76.
- Bowes C, Li T, Dancinger M, Baxter LC, Applebury ML, Farber DB (1990). Retinal degeneration in the *rd* mouse is caused by a defect in the beta subunit of rod cGMP-phosphodiesterase. *Nature* 347, 677–680.
- Braisted JE, Essman TF, Raymond PA, (1994). Selective regeneration of photoreceptors in goldfish retina. *Development*, 120, 2409-19.
- Bravo R, Frank R, Blundell P, MacDonald-Bravo H, (1987). PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase-delta. *Nature*, 326, 515-520.
- Brazelton TR, Rossi FM, Keshet GI, Blau HM (2000). From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice. *Science*, 290(5497):1775-9.

- Callebaut I & Mornon JP, (1997). From BRCA1 to RAP1: a widespread BRCT module closely associated with DNA repair. *FEBS Letters*, 400, 25-30.
- Carlen M, Cassidy RM, Brismar H, Smith GA, Enquist LW, Frisen J, (2002). Functional integration of Adult-Born Neurons. *Current Biology*, 12, 606-608.
- Casaccia-Bonnel P, Hardy RJ, Teng KK, Levine JM, Koff A, Chao MV, (1999). Loss of p27Kip1 function results in increased proliferative capacity of oligodendrocyte progenitors but unaltered timing of differentiation. *Development*, 126, 4027-4037.
- Cattaneo E, & McKay R, (1990). Proliferation and differentiation of neuronal stem cells regulated by nerve growth factor. *Nature*, 347, 762-765.
- Cayouette M, Gravel C, (1997). Adenovirus-mediated gene transfer of ciliary neurotrophic factor can prevent photoreceptor degeneration in the retinal degeneration (*rd*) mouse. *Hum Gene Ther* 8, 423-430.
- Cayouette M, Barres BA, Raff M, (2003). Importance of intrinsic mechanisms in cell fate decisions in the developing rat retina. *Neuron*, 40, 897-904.
- Cepko CL, Austin CP, Yang X, Alexiades M, Ezzeddine D, (1996). Cell fate determination in the vertebrate retina. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 93, 589-595.
- Cepko CL, (1999). The roles of intrinsic and extrinsic cues and bHLH genes in the determination of retinal cell fates. *Curr. Opin. Neurobiol.*, 9, 37-46.
- Chacko DM, Rogers JA, Turner JE, Ahmad I, (2000). Survival and differentiation of cultured retinal progenitors transplanted in the subretinal space of the rat. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 268, 842-846.
- Chang B, Hawes NL, Hurd RE, Davisson MT, Nusinowitz S, Heckenlively JR, (2002). Retinal degeneration mutants in the mouse. *Vision Research*, 42, 517-525.
- Chang GQ, Hao Y, Wong F, (1993). Apoptosis: final common pathway of photoreceptor death in *rd*, *rds*, and rhodopsin mutant mice. *Neuron*, 11, 595-605.
- Check E, (2003a). Second cancer case halts gene-therapy trials. *Nature*, 421, 305.
- Check E, (2003b). Cancer risk prompts US to curb gene therapy. *Nature*, 422, 7.
- Chen J, Flannery JG, LaVail MM, Steinberg RH, Xu J, Simon MI, (1996). *bcl-2* overexpression reduces apoptotic photoreceptor cell death in three different retinal degenerations. *Proc. Natl Acad. Sci.*, 93, 7042-7047.
- Chen S, Wang QL, Nie Z, Sun H, Lennon G, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Zack DJ, (1997). *Crx*, a novel Otx-like paired-homeodomain protein, binds to and transactivates photoreceptor cell-specific genes. *Neuron*, 19, 1017-1030.

- Chiasson BJ, Tropepe V, Morshead CM, van der Kooy D, (1999). Adult mammalian forebrain ependymal and subependymal cells demonstrate proliferative potential, but only subependymal cells have neural stem cell characteristics. *J. Neurosci.*, 19, 4462-4471.
- Chun J, Schatz DG, (1999). Rearranging views on neurogenesis: neuronal death in the absence of DNA end-joining proteins. *Neuron*, 22, 7-10.
- Coles BL, Angenieux B, Inoue T, Rio-Tsonis KD, Spence JR, McInnes RR, Arsenijevic Y, van der Kooy D, (2004). Facile isolation and the characterization of human retinal stem cells. *Proc. Natl Acad. Sci.*, Oct 25 [Epub ahead of print].
- Collinge J, Whittington MA, Sidle KC, Smith CJ, Palmer MS, Clarke AR, Jefferys JG, (1994). Prion protein is necessary for normal synaptic function. *Nature*, 370, 295-297.
- Cooper-Kuhn CM, Kuhn HG, (2002). Is it all DNA repair? Methodological considerations for detecting neurogenesis in the adult brain. *Brain Res Dev Brain Res.* 134, 13-21.
- Coulombre JL, Coulombre AJ, (1965). Regeneration of neural retina from the pigmented epithelium in the chick embryo. *Dev. Biol.*, 12, 79-92.
- Cunningham JJ, Levine EM, Zindy F, Goloubeva O, Roussel MF, Smeyne RJ, (2002). The cyclin-dependent kinase inhibitors $p^{19}Ink4d$ and $p27^{Kip1}$ are coexpressed in select retinal cells and act cooperatively to control cell cycle exit. *Mol. Cell. Neuro.*, 19, 359-374
- Davidson FF, Steller H, (1998). Blocking apoptosis prevents blindness in *Drosophila* retinal degeneration mutants. *Nature*, 391, 587-591.
- D'Cruz PM, Yasumura D, Weir J, Matthes MT, Abderrahim H, LaVail MM, Vollrath D, (2000). Mutation of the receptor tyrosine kinase gene *Mertk* in the retinal dystrophic RCS rat. *Hum. Mol. Genet.*, 9, 645-651.
- Delyfer MN, Léveillard T, Mohand-Said S, Hicks D, Picaud S, Sahel JA, (2004). Inherited retinal degenerations: therapeutic prospects. *Biol. Cell*, 96, 261-269.
- Difilippantonio MJ, Zhu J, Chen HT, Meffre E, Nussenzweig MC, Max EE, Ried T, Nussenzweig A, (2000). DNA repair protein Ku80 suppresses chromosomal aberrations and malignant transformation. *Nature*, 404, 510-514.
- Doetsch F, Alvarez-Buylla A, (1996). Network of tangential pathways for neuronal migration in adult mammalian brain. *Proc. Natl Acad. Sci.*, 93, 14895-14900.
- Doetsch F, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A, (1997). Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. *J. Neurosci.*, 17, 5046-5061.
- Doetsch F, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A, (1999a). Regeneration of a germinal layer in the adult mammalian brain. *Proc. Natl Acad. Sci.*, 96, 11619-11624.

- Doetsch F, Caille I, Lim DA, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A, (1999b). Subventricular Zone Astrocytes Are Neural Stem Cells in the Adult mammalian Brain. *Cell* 97, 1-20.
- Doetsch F, Scharff C, (2001). Challenges for brain repair: insights from adult neurogenesis in birds and mammals. *Brain Behav. Evol.* 58, 306-322.
- Doetsch F, Verdugo JM, Caille I, Alvarez-Buylla A, Chao MV, Casaccia-Bonofil P, (2002). Lack of the cell-cycle inhibitor p27^{Kip1} results in selective increase of transit-amplifying cells for adult neurogenesis. *J. Neurosci.*, 22, 2255-2264.
- Doetsch F, (2003). The glial identity of neural stem cells. *Nat. Neurosci.*, 6, 1127-1134.
- Donehower LA, Harvey M, Slagle BL, McArthur MJ, Montgomery CA Jr, Butel JS, Bradley A, (1992). Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature*, 356, 215-221.
- Doonan F, Donovan M, Cotter TG, (2003). Caspase-Independent Photoreceptor Apoptosis in Mouse Models of Retinal Degeneration. *J. Neurosci.*, 23, 5723-5731.
- Dreyer WJ, Bennett JC, (1965). The molecular basis of antibody formation: a paradox. *Proc. Natl Acad. Sci.*, 54, 864-869.
- Eggan K, Baldwin K, Tackett M, Osborne J, Gogos J, Chess A, Axel R, Jaenisch R, (2004). Mice cloned from olfactory sensory neurons. *Nature*, 428, 44-49.
- Ellies DL, Church V, Francis-West P, Lumsden A, (2000). The WNT antagonist cSFRP2 modulates programmed cell death in the developing hindbrain. *Development*, 127, 5285-5295.
- Eriksson PS, Perfilieva E, Bjork-Eriksson T, Alborn AM, Nordborg C, Peterson DA, Gage FH (1998). Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med.* 4, 1313-7.
- Faktorovich EG, Steinberg RH, Yasumura D, Matthes MT, LaVail MM, (1990). Photoreceptor degeneration in inherited retinal dystrophy delayed by basic fibroblast growth factor. *Nature*, 347, 83-86.
- Farber DB, Flannery JG, Bowes-Rickmann C, (1994). The *rd* mouse story: seventy years of research on an animal model of inherited retinal degeneration. *Progress in Retinal and Eye Research.* 13, 31-64.
- Farrar GJ, Kenna PF, Humphries P, (2002). On the genetics of *retinitis pigmentosa* and on mutation-independent approaches to therapeutic intervention. *EMBO J.*, 21, 857-864.
- Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M, Paolucci E, Stornaiuolo A, Cossu G, Mavilio F, (1998). Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science*, 279, 1528-1530.
- Ferrer I, Soriano E, del Rio JA, Alcantara S, Auladell C, (1992). Cell death and removal in the cerebral cortex during development. *Prog. Neurobiol.*, 39, 1-43.

- Finlay BL, Slattery M, (1983). Local differences in the amount of early cell death in neocortex predict adult local specializations. *Science*, 219, 1349-1351.
- Fischer AJ, Reh TA, (2000). Identification of a proliferating marginal zone of retinal progenitors in postnatal chickens. *Dev. Biol.*, 220, 197-210.
- Fischer AJ et Reh TA, (2003). Growth factors induce neurogenesis in the ciliary body. *Dev. Biol.*, 259, 225-240.
- Frank KM, Sekiguchi JM, Seidl KJ, Swat W, Rathbun GA, Cheng HL, Davidson L, Kangaloo L, Alt FW, (1998). Late embryonic lethality and impaired V(D)J recombination in mice lacking DNA ligase IV. *Nature*, 396, 173-7.
- Frank KM, Sharpless NE, Gao Y, Sekiguchi JM, Ferguson DO, Zhu C, Manis JP, Horner J, DePinho RA, Alt FW, (2000). DNA ligase IV deficiency in mice leads to defective neurogenesis and embryonic lethality via the p53 pathway. *Mol Cell*, 5, 993-1002.
- Frasson M, Picaud S, Leveillard T, Simonutti M, Mohand-Said S, Dreyfus H, Hicks D, Sahel J, (1999). Glial cell line-derived neurotrophic factor induces histologic and functional protection of rod photoreceptors in the *rd/rd* mouse. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 40 2724-2734.
- Freeman RS, Estus S, Johnson EM, (1994). Analysis of cell cycle-related gene expression in postmitotic neurons: selective induction of Cyclin D1 during programmed cell death. *Neuron*, 12, 343-355.
- Furukawa T, Morrow EM, Cepko CL, (1997). *Crx*, a novel *otx*-like homeobox gene, shows photoreceptor-specific expression and regulates photoreceptor differentiation. *Cell*, 91, 531-541.
- Gage FH, (2000). Mammalian neural stem cells. *Science*, 287, 1433-1438.
- Gaiano N, Fishell G, (2002). The role of notch in promoting glial and neural stem cell fates. *Annu. Rev. Neurosci.*, 25, 471-490.
- Gao Y, Sun Y, Frank KM, Dikkes P, Fujiwara Y, Seidl KJ, Sekiguchi JM, Rathbun GA, Swat W, Wang J, Bronson RT, Malynn BA, Bryans M, Zhu C, Chaudhuri J, Davidson L, Ferrini R, Stamato T, Orkin SH, Greenberg ME, Alt FW, (1998). A critical role for DNA end-joining proteins in both lymphogenesis and neurogenesis. *Cell*, 95, 891-902.
- Gao Y, Ferguson DO, Xie W, Manis JP, Sekiguchi J, Frank KM, Chaudhuri J, Horner J, DePinho RA, Alt FW, (2000). Interplay of p53 and DNA-repair protein XRCC4 in tumorigenesis, genomic stability and development. *Nature*, 404, 897-900.
- Garcia-Diaz M, Dominguez O, Lopez-Fernandez LA, de Lera LT, Saniger ML, Ruiz JF, Parraga M, Garcia-Ortiz MJ, Kirchhoff T, del Mazo J, Bernad A, Blanco L, (2000). DNA Polymerase Lambda (Pol I), a Novel Eukaryotic DNA Polymerase with a Potential Role in Meiosis. *J. Mol. Biol.*, 301, 851-867.

- Gatti RA, Becker-Catania S, Chun HH, Sun X, Mitui M, Lai CH, Khanlou N, Babaei M, Cheng R, Clark C, Huo Y, Udar NC, Iyer RK et coll., (2001). The pathogenesis of ataxia-telangiectasia. Learning from a Rosetta stone. *Clin. Rev. Allergy Immunol.*, 20, 87-108.
- Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA, (1992). Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J. Cell Biol.*, 119, 493-501.
- Gehring WJ, Ikeo K, (1999). Pax 6: mastering eye morphogenesis and eye evolution. *Trends Genet.* 15, 371-377.
- Giaccia AJ, Denko N, MacLaren R, Mirman D, Waldren C, Hart I, Stamato TD, (1990). Human chromosome 5 complements the DNA double-strand break-repair deficiency and gamma-ray sensitivity of the XR-1 hamster variant. *Am. J. Hum. Genet.*, 47, 459-469.
- Gilmore EC, Nowakowski RS, Caviness VS Jr, Herrup K, (2000). Cell birth, cell death, cell diversity and DNA breaks: how do they all fit together? *Trends Neurosci.*, 23, 100-105.
- Goldman SA et Nottebohm F, 1983. Neuronal production, migration, and differentiation in a vocal control nucleus of the adult female canary brain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 80, 2390-2394.
- Goldman JE, (1995). Lineage, migration, and fate determination of postnatal subventricular zone cells in the mammalian CNS. *J. Neurooncol.*, 24, 61-64.
- Gordon WC, Casey DM, Lukiw WJ, Bazan NG, (2002). DNA damage and repair in light-induced photoreceptor degeneration. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 43, 3511-21.
- Gould E, Reeves AJ, Graziano MS, Gross CG, (1999). Neurogenesis in the neocortex of adult primates. *Science*, 286, 548-552.
- Grawunder U, Zimmer D, Fugmann S, Schwarz K, Lieber MR, (1998). DNA ligase IV is essential for V(D)J recombination and DNA double-strand break repair in human precursor lymphocytes. *Mol Cell.* 2(4):477-84.
- Green DR, (1998). Apoptotic pathways: the roads to ruin. *Cell*, 94, 695-8.
- Gurdon JB, (1962). Adult frogs derived from the nuclei of single somatic cells. *Dev. Biol.*, 4, 256-273.
- Gussoni E, Soneoka Y, Strickland CD, Buzney EA, Khan MK, Flint AF, Kunkel LM, Mulligan RC, (1999). Dystrophin expression in the *mdx* mouse restored by stem cell transplantation. *Nature*, 401, 390-394.
- Hacein-Bey-Abina S, Von Kalle C, Schmidt M, McCormack MP, Wulffraat N, Leboulch P, Lim A, Osborne CS, Pawliuk R, Morillon E, Sorensen R, Forster A, Fraser P, Cohen JI, de Saint Basile G, Alexander I, Wintergerst U, Frebourg T, Aurias A, Stoppa-Lyonnet D, Romana S, Radford-Weiss I, Gross F, Valensi F, Delabesse E, Macintyre E, Sigaux F, Soulier J, Leiva LE, Wissler M, Prinz C, Rabbitts TH, Le Deist F, Fischer A, Cavazzana-Calvo M, (2003). LMO2-

- associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science*, 302, 415–419.
- Hackam AS, Strom R, Liu D, Qian J, Wang C, Otteson D, Gunatilaka T, Farkas RH, Chowers I, Kageyama M, Leveillard T, Sahel JA, Campochiaro PA, Parmigiani G, Zack DJ, (2004). Identification of Gene Expression Changes Associated with the Progression of Retinal Degeneration in the *rd1* Mouse. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 45, 2929-2942.
- Harlow E, Williamson NM, Ralston R, Helfman DM, Adams TE, (1985). Molecular cloning and *in vitro* expression of a cDNA clone for human cellular tumor antigen p53. *Molec. Cell. Biol.*, 5, 1601-1610.
- Harrison, JK, Jiang Y, Chen S, Xia Y, Maciejewski D, McNamara RK, Streit WJ, Salafranca MN, Adhikari S, Thompson DA, Botti P, Bacon KB, Feng L, (1998). Role for neuronally derived fractalkine in mediating interactions between neurons and CX3CR1-expressing microglia. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 95, 10896-10901.
- Haruta M, Kosaka M, Kanegae Y, Saito I, Inoue T, Kageyama R, Nishida A, Honda Y, Takahashi M, (2001). Induction of photoreceptor-specific phenotypes in adult mammalian iris tissue. *Nat. Neurosci.*, 4, 1163-1164.
- Hatakeyama J, Kageyama R, (2004). Retinal cell fate determination and bHLH factors. *Semin. Cell. Dev. Biol.*, 15, 83-89.
- Hatzioannou T, Goff SP, (2001). Infection of nondividing cells by Rous sarcoma virus. *J. Virol.*, 75, 9526-9531.
- Haverkamp S, Wassle H, (2000). Immunocytochemical analysis of the mouse retina. *J. Comp. Neurol.*, 424, 1-23.
- Hazelett DJ, Bourouis M, Walldorf U, Treisman JE, (1998). *decapentaplegic* and *wingless* are regulated by *eyes absent* and *eyegone* and interact to direct the pattern of retinal differentiation in the eye disc. *Development*, 125, 3741-3751.
- Herrup K et Busser JC, (1995). The induction of multiple cell cycle events precedes target-related neuronal death. *Development*, 121, 2385-2395
- Hicks D, Courtois Y, (1990). The growth and behaviour of rat retinal Müller cells *in vitro*. An improved method for isolation and culture. *Exp. Eye Res.*, 51, 119-129.
- Hicks D, Molday RS, (1986). Differential immunogold-dextran labeling of bovine and frog rod and cone cells using monoclonal antibodies against bovine rhodopsin. *Exp. Eye Res.*, 42, 55-71.
- Hims MM, Diager SP, Inglehearn CF, (2003). *Retinitis pigmentosa*: genes, proteins and prospects. *Dev Ophthalmol* 37, 109–125.
- Hitchcock PF et Raymond PA, (1992). Retinal regeneration. *Trends Neurosci.*, 15, 103-108.

- Hitchcock PF, Ochocinska MJ, Sieh A, Otteson DC, (2004). Persistent and injury-induced neurogenesis in the vertebrate retina. *Prog. Retin. Eye Res.* 23, 183-194.
- Holland EC et Varmus HE, (1998). Basic fibroblast growth factor induces cell migration and proliferation after glia-specific gene transfer in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 95, 1218-1223.
- Hollstein M, Rice K, Greenblatt MS, Soussi T, Fuchs R, Sorlie T, Hovig E, Smith-Sorensen B, Montesano R, Harris CC, (1994). Database of p53 gene somatic mutations in human tumors and cell lines. *Nucleic Acids Res.*, 22, 3551-3555.
- Hopp RM, Ransom N, Hilsenbeck SG, Papermaster DS, Windle JJ, (1998). Apoptosis in the murine *rd1* retinal degeneration is predominantly p53-independent. *Mol Vis.* 4: 5.
- Hosoya T, Takizawa K, Nitta K, Hotta Y, (1995). *glial cells missing*: a binary switch between neuronal and glial determination in *Drosophila*. *Cell*, 82, 1025-1036.
- Hozumi N & Tonegawa S, (1976). Evidence for somatic rearrangement of immunoglobulin genes coding for variable and constant regions. *Proc. Natl Acad. Sci.*, 73, 3628-3632.
- Hsieh JC, Kodjabachian L, Rebbert ML, Rattner A, Smallwood PM, Samos CH, Nusse R, Dawid IB, Nathans J, (1999). A new secreted protein that binds to Wnt proteins and inhibits their activities. *Nature*, 398, 431-436.
- Huang L, DeVries GJ, Bittman EL, (1998). Photoperiod regulates neuronal bromodeoxyuridine labeling in the brain of a seasonally breeding mammal. *J. Neurobiol.*, 36, 410-420.
- Imai T, Hieshima K, Haskell C, Baba M, Nagira M, Nishimura M, Kakizaki M, Takagi S, Nomiyama H, Schall TJ, Yoshie O, (1997). Identification and molecular characterization of fractalkine receptor CX3CR1, which mediates both leukocyte migration and adhesion. *Cell*, 91, 521-530.
- Jeggo PA, Hafezparast M, Thompson AF, Broughton BC, Kaur GP, Zdzienicka MZ, Athwal RS, (1992). Localization of a DNA repair gene (XRCC5) involved in double-strand-break rejoining to human chromosome 2. *Proc. Natl Acad. Sci.*, 89, 6423-6427.
- Jerne NK, (1967). Various basic problems of current immunology. *Landarzt*, 43, 1526-1530.
- Jimenez GS, Bryntesson F, Torres-Arzayus MI, Priestley A, Beeche M, Saito S, Sakaguchi K, Appella E, Jeggo PA, Taccioli GE, Wahl GM, Hubank M, (1999). DNA-dependent protein kinase is not required for the p53-dependent response to DNA damage. *Nature*, 400, 81-83.
- Jin K, Peel AL, Mao XO, Xie L, Cottrell BA, Henshall DC, Greenberg DA, (2004). Increased hippocampal neurogenesis in Alzheimer's disease. *Proc. Natl Acad. Sci.*, 101, 343-347.
- Johansson CB, Momma S, Clarke DL, Risling M, Lendahl U, Frisen J, (1999). Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system. *Cell*, 96, 25-34.

- Jomary C, Vincent KA, Grist J, Neal MJ, Jones SE, (1997). Rescue of photoreceptor function by AAV-mediated gene transfer in a mouse model of inherited retinal degeneration. *Gene Ther.*, 4, 683-690.
- Jomary C, Neal MJ, Jones SE, (2001). Characterization of cell death pathways in murine retinal neurodegeneration implicates cytochrome c release, caspase activation, and bid cleavage. *Mol. Cell. Neurosci.*, 18, 335–346.
- Jones BW, Fetter RD, Tear G, Goodman CS, (1995). *glial cells missing*: a genetic switch that controls glial versus neuronal fate. *Cell*, 82, 1013-1023.
- Jones SE, Jomary C, Grist J, Stewart HJ, Neal MJ, (2000a). Altered expression of secreted frizzled-related protein-2 in retinitis pigmentosa retinas. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 41, 1297-1301.
- Jones SE, Jomary C, Grist J, Stewart HJ, Neal MJ, (2000b). Modulated expression of secreted frizzled-related proteins in human retinal degeneration. *Neuroreport*, 11, 3963-3967.
- Johns PR, Fernald RD, (1981). Genesis of rods in teleost fish retina. *Nature*, 293, 141-142.
- Johns PR, (1982). Formation of photoreceptors in larval and adult goldfish. *J. Neurosci.*, 2, 178-198.
- Joza N, Susin SA, Daugas E, Stanford WL, Cho SK, Li CY, Sasaki T, Elia AJ, Cheng HY, Ravagnan L, Ferri KF, Zamzami N, Wakeham A, Hakem R, Yoshida H, Kong YY, Mak TW, Zuniga-Pflucker JC, Kroemer G, Penninger JM, (2001). Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature*, 410, 549-554.
- Julian D, Ennis K, Korenbrot JI, (1998). Birth and fate of proliferative cells in the inner nuclear layer of the mature fish retina. *J. Comp. Neurol.*, 394, 271-282.
- Jung S, Aliberti J, Graemmel P, Sunshine MJ, Kreutzberg GW, Sher A, Littman DR, (2000). Analysis of Fractalkine Receptor CX3 CR1 Function by Targeted Deletion and Green Fluorescent Protein Reporter Gene Insertion. *Mol Cell Biol*, 20, 4106-4114.
- Kastan MB, Lim DS, (2000). The many substrates and functions of ATM. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, 1, 179-186.
- Kauppi L, Jeffreys AJ, Keeney S, (2004). Where the crossovers are: recombination distributions in mammals. *Nat. Rev. Genet.*, 5, 413-424.
- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR, (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, 26, 239-57.
- Kicic A, Shen WY, Wilson AS, Constable IJ, Robertson T, Rakoczy PE, (2003). Differentiation of marrow stromal cells into photoreceptors in the rat eye. *J. Neurosci.*, 23, 7742-7749.
- Kilpatrick TJ & Bartlett PF, (1993). Cloning and growth of multipotential neural precursors: requirements for proliferation and differentiation. *Neuron*, 10, 255-265.

- Kim J, Jones BW, Zock C, Chen Z, Wang H, Goodman CS, Anderson DJ, (1998). Isolation and characterization of mammalian homologs of the *Drosophila* gene *glial cells missing*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 95, 12364-12369.
- Kim AS, Anderson SA, Rubenstein JL, Lowenstein DH, Pleasure SJ, (2001). Pax-6 regulates expression of SFRP-2 and Wnt-7b in the developing CNS. *J. Neurosci.*, 21(5):RC132.
- Kim DH, Kim JA, Choi JS, Joo CK, (2002). Activation of caspase-3 during degeneration of the outer nuclear layer in the *rd* mouse retina. *Ophthalmic Res.*, 34, 150-157.
- Kirchgessner CU, Patil CK, Evans JW, Cuomo CA, Fried LM, Carter T, Oettinger MA, Brown JM, 1995. DNA-dependent kinase (p350) as a candidate gene for the murine SCID defect. *Science*, 267, 1178-1183.
- Klein JA, Longo-Guess CM, Rossmann MP, Seburn KL, Hurd RE, Frankel WN, Bronson RT, Ackerman SL, (2002). The harlequin mouse mutation downregulates apoptosis-inducing factor. *Nature*, 419, 367-374.
- Klionsky DJ, Emr SD, (2000). Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science*, 290, 1717-1721.
- Kornack DR, Rakic P, (2001). Cell proliferation without neurogenesis in adult primate neocortex. *Science*, 294, 2127-2130.
- Krause DS, Theise ND, Collector MI, Henegariu O, Hwang S, Gardner R, Neutzel S, Sharkis SJ, (2001). Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell*, 105, 369-377.
- Kubo F, Takeichi M, Nakagawa S, (2003). Wnt2b controls retinal cell differentiation at the ciliary marginal zone. *Development*, 130, 587-598.
- Kubota R, Hokoc JN, Moshiri A, McGuire C, Reh TA, (2002). A comparative study of neurogenesis in the retinal ciliary marginal zone of homeothermic vertebrates. *Brain Res. Dev. Brain Res.*, 134, 31-41.
- Kumar-Singh R, Farber DB, (1998). Encapsidated adenovirus mini-chromosome-mediated delivery of genes to the retina: application to the rescue of photoreceptor degeneration. *Hum. Mol. Genet.*, 7, 1893-1900.
- Kwan AS, Wang S, Lund RD, (1999). Photoreceptor layer reconstruction in a rodent model of retinal degeneration. *Exp. Neurol.*, 159, 21-33.
- Lagasse E, Connors H, Al-Dhalimy M, Reitsma M, Dohse M, Osborne L, Wang X, Finegold M, Weissman IL, Grompe M, 2000. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes *in vivo*. *Nat. Med.* 6, 1229-1234.

- LaVail MM, Yasumura D, Matthes MT, Lau-Villacorta C, Unoki K, Sung CH, Steinberg RH, (1998). Protection of mouse photoreceptors by survival factors in retinal degenerations. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 39, 592-602.
- LaVail MM, Yasumura D, Matthes MT, Drenser KA, Flannery JG, Lewin AS, Hauswirth WW, (2000). Ribozyme rescue of photoreceptor cells in P23H transgenic rats: long-term survival and late-stage therapy. *Proc. Natl Acad. Sci.*, 97, 11488-11493.
- Laywell ED, Rakic P, Kukekov VG, Holland EC, Steindler DA, (2000). Identification of a multipotent astrocytic stem cell in the immature and adult mouse brain. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 97, 13883-13888.
- Leblond CP, (1964). Classification of cell populations on the basis of their proliferative behaviour. *Natl Cancer Inst Monogr.* 14:119-50.
- Lee JW, Blanco L, Zhou T, Garcia-Diaz M, Bebenek K, Kunkel TA, Wang Z, Povirk LF, (2004). Implication of DNA Polymerase in Alignment-based Gap Filling for Nonhomologous DNA End Joining in Human Nuclear Extracts. *The Journal of biological Chemistry*, 279, 805-811.
- Lee Y, Barnes DE, Lindahl T, McKinnon PJ, (2000). Defective neurogenesis resulting from DNA ligase IV deficiency requires ATM. *Genes Dev.* 14, 2576-2550.
- Lees-Miller SP, Meek K, (2003). Repair of DNA double strand breaks by non-homologous end joining. *Biochimie*, 85, 1161-1173.
- Lehmann AR, (2003). DNA repair-deficient diseases, xeroderma pigmentosum, Cockayne syndrome and trichothiodystrophy, *Biochimie* 85: 1101–1111.
- Léveillard T, Mohand-Said S, Lorentz O, Hicks D, Fintz AC, Clerin E, Simonutti M, Forster V, Cavusoglu N, Chalmel F, Dolle P, Poch O, Lambrou G, Sahel JA, (2004). Identification and characterization of rod-derived cone viability factor. *Nat. Genet.*, 36, 755-759.
- Levine AJ, (1997). p53, the Cellular Gatekeeper. *Cell*, 88, 323-331.
- Levine EM, Close J, Fero M, Ostrovsky A, Reh TA, (2000). p27(Kip1) regulates cell cycle withdrawal of late multipotent progenitor cells in the mammalian retina. *Dev. Biol.*, 219, 299-314.
- Levison SW, Goldman JE, (1993). Both oligodendrocytes and astrocytes develop from progenitors in the subventricular zone of postnatal rat forebrain. *Neuron*, 10, 201-212.
- Lewin AS, Drenser KA, Hauswirth WW, Nishikawa S, Yasumura D, Flannery JG, LaVail MM, (1998). Ribozyme rescue of photoreceptor cells in a transgenic rat model of autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Nat. Med.*, 4, 967-971.
- Lewis BC, Chinnasamy N, Morgan RA, Varmus HE, (2001). Development of an avian leukosis-sarcoma virus subgroup A pseudotyped lentiviral vector. *J. Virol.*, 75, 9339-9344.

- Lewis PD, (1968). Mitotic activity in the primate subependymal layer and the genesis of gliomas. *Nature*, 217, 974-975.
- Li Z, Otevrel T, Gao Y, Cheng HL, Seed B, Stamato TD, Taccioli GE, Alt FW, (1995). The XRCC4 gene encodes a novel protein involved in DNA double-strand break repair and V(D)J recombination. *Cell*, 83, 1079-1089.
- Liang FQ, Dejneka NS, Cohen DR, Krasnoperova NV, Lem J, Maguire AM, Dudus L, Fisher KJ, Bennett J, (2001a). AAV-mediated delivery of ciliary neurotrophic factor prolongs photoreceptor survival in the rhodopsin knockout mouse. *Mol. Ther.*, 3, 241-248.
- Liang FQ, Aleman TS, Dejneka NS, Dudus L, Fisher KJ, Maguire AM, Jacobson SG, Bennett J, (2001b). Long-term protection of retinal structure but not function using RAAV-CNTF in animal models of *retinitis pigmentosa*. *Mol. Ther.*, 4, 461-472.
- Lim DA, Tramontin AD, Trevejo JM, Herrera DG, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A, (2000). Noggin antagonizes BMP signaling to create a niche for adult neurogenesis. *Neuron*, 28, 713-726.
- Lois C, Alvarez-Buylla A, (1993). Proliferating subventricular zone cells in the adult mammalian forebrain can differentiate into neurons and glia. *Proc. Natl Acad. Sci.*, 90, 2074-2077.
- Lois C, Alvarez-Buylla A, (1994). Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. *Science*, 264, 1145-1148.
- Lois C, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A, (1996). Chain migration of neuronal precursors. *Science*, 271, 978-981.
- Lu T, Pan Y, Kao SY, Li C, Kohane I, Chan J, Yankner BA, (2004). Gene regulation and DNA damage in the ageing human brain. *Nature*, 429, 883-891.
- Ma Y, Pannicke U, Schwarz K, Lieber MR, (2002). Hairpin opening and overhang processing by an Artemis/DNA-dependent protein kinase complex in nonhomologous end joining and V(D)J recombination. *Cell*, 108, 781-794.
- Mack AF, Fernald RD, (1995). New rods move before differentiating in adult teleost retina. *Dev. Biol.*, 170, 136-141.
- Magavi SS, Leavitt BR, Macklis JD (2000). Induction of neurogenesis in the neocortex of adult mice. *Nature*. 405, 951-5.
- Maier W et Wolburg H, (1979). Regeneration of the goldfish retina after exposure to different doses of ouabain. *Cell Tiss. Res.*, 202, 99-118.

- Maignien T, Lasmézas CI, Beringue V, Dormont D, Deslys JP, (1999). Pathogenesis of the oral route of infection of mice with scrapie and bovine spongiform encephalopathy agents. *Journal of General Virology*, 80, 3035-3042.
- Malatesta P, Hartfuss E, Götz M, (2000). Isolation of radial glial cells by fluorescent-activated cell sorting reveals a neuronal lineage. *Development*, 127, 5253-5263.
- Malatesta P, Hack MA., Hartfuss E, Kettenmann H, Klinkert W, Kirchhoff F, Götz M, (2003). Neuronal or glial progeny: regional differences in radial glia fate. *Neuron*, 37, 751-764.
- Marquardt T and Gruss P (2002). Generating neuronal diversity in the retina: one for nearly all. *Trends in Neurosciences*, 25, 32-38.
- Matsuoka M, Nagawa F, Okazaki K, Kingsbury L, Yoshida K, Muller U, Larue DT, Winer JA, Sakano H (1991). Detection of somatic DNA recombination in the transgenic mouse brain. *Science*, 254(5028):81-6.
- McKay R, (1997). Stem cells in the central nervous system. *Science*, 276, 66-71
- McKinnon PJ, (2004). ATM and *ataxia telangiectasia*. *EMBO Rep.*, 5, 772-776.
- Meikrantz W, Schlegel R, (1995). Apoptosis and the cell cycle. *J. Cell Biol.*, 58, 160-174.
- Melkonyan HS, Chang WC, Shapiro JP, Mahadevappa M, Fitzpatrick PA, Kiefer MC, Tomei LD, Umansky SR, (1997). SARPs: a family of secreted apoptosis-related proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 94, 13636-13641.
- Metzstein MM, Stanfield GM, Horvitz HR, (1998). Genetics of programmed cell death in *C. elegans*: past, present and future. *Trends Genet.*, 14, 410-416.
- Meyer RL, (1978). Evidence from thymidine labeling for continuing growth of retina and tectum in juvenile goldfish. *Exp. Neurol.*, 59, 99-111.
- Mezey E, Chandross KJ, Harta G, Maki RA, and McKercher SR, 2000. Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated *in vivo* from bone marrow. *Science*, 290, 1779-1782.
- Miller RD, Hogg J, Ozaki JH, Gell D, Jackson SP, Riblet R, (1995). Gene for catalytic subunit of mouse DNA-dependent protein kinase maps to the *scid* locus. *Proc. Natl Acad. Sci.*, 92, 10792-10795.
- Mohand-Said S, Hicks D, Simonutti M, Tran-Minh D, Deudon-Combe A, Dreyfus H, Silverman MS, Ogilvie JM, Tenkova T, Sahel J, (1997). Photoreceptor transplants increase host cone survival in the retinal degeneration (*rd*) mouse. *Ophthalmic Res.*, 29, 290-297.
- Morris GF, Bischoff JR, Mathews MB, (1996). Transcriptional activation of the human proliferating-cell nuclear antigen promoter by p53. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 895-899.
- Moshiri A & Reh TA, (2004). Persistent Progenitors at the Retinal Margin of *ptc*^{-/-} Mice. *J Neurosci*. 24, 229-237.

- Moshous D, Callebaut I, de Chasseval R, Corneo B, Cavazzana-Calvo M, Le Deist F, Tezcan I, Sanal O, Bertrand Y, Philippe N, Fischer A, de Villartay JP, (2001). Artemis, a novel DNA double-strand break repair/V(D)J recombination protein, is mutated in human severe combined immune deficiency. *Cell*, 105, 177-186.
- Morris GF, Bischoff JR, Mathews MB (1996). Transcriptional activation of the human proliferating cell nuclear antigen promoter by p53. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93, 895-9.
- Motoyama N, Wang F, Roth KA, Sawa H, Nakayama K, Nakayama K, Negishi I, Senju S, Zhang Q, Fujii S, et coll., (1995). Massive cell death of immature hematopoietic cells and neurons in Bcl-x-deficient mice. *Science*, 267, 1506-1510.
- Müller H, (1952). Bau und Wachstum der Netzhaut des Guppy (*Lebistes reticulatus*). *Zool. Jahrb.* 63, 275-324.
- Nait-Oumesmar B, Decker L, Lachapelle F, Avellana-Adalid V, Bachelin C, Van Evercooren AB, (1999). Progenitor cells of the adult mouse subventricular zone proliferate, migrate and differentiate into oligodendrocytes after demyelination. *Eur. J. Neurosci.*, 11, 4357-4366.
- Nakatomi H, Kuriu T, Okabe S, Yamamoto S, Hatano O, Kawahara N, Tamura A, Kirino T, Nakafuku M (2002). Regeneration of Hippocampal Pyramidal Neurons after Ischemic Brain Injury by Recruitment of Endogenous Neural Progenitors. *Cell*, 110, 429–441.
- Nakayama K, Ishida N, Shirane M, Inomata A, Inoue T, Shishido N, Horii I, Loh DY, Nakayama K, (1996). Mice lacking p27(Kip1) display increased body size, multiple organ hyperplasia, retinal dysplasia, and pituitary tumors. *Cell*, 85, 707-720.
- Negishi K, Teranishi T, Kato S, (1982). New dopaminergic and indoleamine-accumulating cells in the growth zone of goldfish retinas after neurotoxic destruction. *Science*, 216, 747-749.
- Nichols AF, Sancar A, (1992). Purification of PCNA as a nucleotide excision repair protein. *Nucleic Acids Res.*, 20, 2441-2446.
- Nir I, Kedzierski W, Chen J, Travis GH, (2000). Expression of Bcl-2 protects against photoreceptor degeneration in retinal degeneration slow (*rds*) mice. *J. Neurosci.*, 20, 2150-2154.
- Nishida A, Takahashi M, Tanihara H, Nakano I, Takahashi JB, Mizoguchi A, Ide C, Honda Y, (2000). Incorporation and differentiation of hippocampus-derived neural stem cells transplanted in injured adult rat retina. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 41, 4268-4274.
- Noctor SC, Flint AC, Weissman TA, Dammerman RS, Kriegstein AR, (2001). Neurons derived from radial glial cells establish radial units in neocortex. *Nature*, 409, 714-720.
- Noctor SC, Flint AC, Weissman TA, Wong WS, Clinton BK, Kriegstein, AR, (2002). Dividing precursor cells of the embryonic cortical ventricular zone have morphological and molecular characteristics of radial glia. *J. Neurosci.*, 22, 3161-3173.

- Nowakowski RS, Lewin SB, Miller MW, (1989). Bromodeoxyuridine immunohistochemical determination of the lengths of the cell cycle and the DNA-synthetic phase for an anatomically defined population. *J. Neurocytol.*, 18, 311-318.
- Nowakowski RS, Hayes NL, (2000). New neurons: extraordinary evidence or extraordinary conclusion? *Science*, 288, 771.
- Ohsumi Y, (2001). Molecular dissection of autophagy: two ubiquitin-like systems. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, 2, 211-216.
- Ooto S, Akagi T, Kageyama R, Akita J, Mandai M, Honda Y, Takahashi M, (2004). Potential for neural regeneration after neurotoxic injury in the adult mammalian retina. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 101, 13654-13659.
- Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B, Pickel J, McKay R, Nadal-Ginard B, Bodine DM, Leri A, Anversa P, (2001a). Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature*, 410, 701-705.
- Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Limana F, Jakoniuk I, Quaini F, Nadal-Ginard B, Bodine DM, Leri A, Anversa P, (2001b). Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 98, 10344-10349.
- Otani A, Kinder K, Ewalt K, Otero FJ, Schimmel P, Friedlander M, (2002). Bone marrow-derived stem cells target retinal astrocytes and can promote or inhibit retinal angiogenesis. *Nat. Med.*, 8, 1004-1010.
- Otani A, Dorrell MI, Kinder K, Moreno SK, Nusinowitz S, Banin E, Heckenlively J, Friedlander M, (2004). Rescue of retinal degeneration by intravitreally injected adult bone marrow-derived lineage-negative hematopoietic stem cells. *J. Clin. Invest.*, 114, 765-774.
- Otevrel T et Stamato TD, (1995). Regional localization of the XRCC4 human radiation repair gene. *Genomics*, 27, 211-214.
- Otteson DC, D'Costa AR, Hitchcock PF, (2001). Putative stem cells and the lineage of rod photoreceptors in the mature retina of the goldfish. *Dev. Biol.*, 232, 62-76.
- Ourednik V, Ourednik J, Park KI, Teng YD, Aboody KA, Auguste KI, Taylor RM, Tate BA, Snyder EY, (2000). Neural stem cells are uniquely suited for cell replacement and gene therapy in the CNS. *Novartis Found. Symp.*, 231, 242-262; discussion 262-269, 302-306.
- Pardee AB, (1989). G1 events and regulation of cell proliferation. *Science*, 246, 603-608.
- Paton JA, Nottebohm FN, (1984). Neurons generated in the adult brain are recruited into functional circuits. *Science*, 225, 1046-1048.
- Perron M, Kanekar S, Vetter ML, Harris WA, (1998). The genetic sequence of retinal development in the ciliary margin of the *Xenopus* eye. *Dev. Biol.*, 199, 185-200.

- Perry J, Du J, Kjeldbye H, Gouras P, (1995). The effects of bFGF on RCS rat eyes. *Curr. Eye Res.*, 14, 585-592.
- Polakis P, (2000). Wnt signaling and cancer, *Genes Dev.*, 14, 1837-1851.
- Portera-Cailliau C, Sung CH, Nathans J, Adler R, (1994). Apoptotic photoreceptor cell death in mouse models of retinitis pigmentosa. *Proc. Natl Acad. Sci.*, 91, 974-8.
- Pressmar S, Ader M, Richard G, Schachner M, Bartsch U, (2001). The fate of heterotopically grafted neural precursor cells in the normal and dystrophic adult mouse retina. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 42, 3311-3319.
- Privat A, (1977). The ependyma and subependymal layer of the young rat: a new contribution with freeze-fracture. *Neuroscience*, 2, 447-457.
- Privat A, Leblond CP, (1972). The subependymal layer and neighboring region in the brain of the young rat. *J. Comp. Neurol.*, 146, 277-302.
- Prusiner SB, (1994). Biology and genetics of prion diseases. *Annu. Rev. Microbiol.*, 48, 655-686.
- Rakic P, (1971a). Guidance of neurons migrating to the fetal monkey neocortex. *Brain Res.*, 33, 471-476.
- Rakic P (1971b). Neuron-glia relationship during granule cell migration in developing cerebellar cortex. A Golgi and electronmicroscopic study in *Macacus Rhesus*. *J. Comp. Neurol.*, 141, 283-312.
- Rakic P (1972). Mode of cell migration to the superficial layers of fetal monkey neocortex. *J. Comp. Neurol.*, 145, 61-83.
- Ramon y Cajal S (1928). Degeneration and regeneration of the nervous system (Day RM, translator, from the 1913 Spanish edition). London: Oxford UP.
- Rasmussen JT, Deardorff MA, Tan C, Rao MS, Klein PS, Vetter ML, (2001). Regulation of eye development by frizzled signaling in *Xenopus*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 98, 3861-3866.
- Polakis P, (2000). Wnt signaling and cancer. *Genes Dev.*, 14, 1837-1851.
- Rattner A, Hsieh JC, Smallwood PM, Gilbert DJ, Copeland NG, Jenkins NA, Nathans J, (1997). A family of secreted proteins contains homology to the cysteine-rich ligand-binding domain of frizzled receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 94, 2859-2863.
- Raymond PA, Rivlin PK, (1987). Germinal cells in the goldfish retina that produce rod photoreceptors. *Dev. Biol.*, 122, 120-138.
- Raymond PA, Reifler MJ, Rivlin PK, (1988). Regeneration of goldfish retina: rod precursors are a likely source of regenerated cells. *J. Neurobiol.*, 19, 431-463.
- Reeves WH, Sthoeger ZM, (1989). Molecular cloning of cDNA encoding the p70 (Ku) lupus autoantigen. *J. Biol. Chem.*, 264, 5047-5052.

- Reynolds BA, Tetzlaff W, Weiss S, (1992). A multipotent EGF-responsive striatal embryonic progenitor cell produces neurons and astrocytes. *J. Neurosci.*, 12, 4565-4574.
- Reynolds BA & Weiss S, (1992). Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science*, 255, 1707-1710.
- Rideout WM, Eggan K, Jaenisch R, (2001). Nuclear cloning and epigenetic reprogramming of the genome. *Science*, 293, 1093-1098.
- Robins P, Lindahl T, (1996). DNA ligase IV from HeLa cell nuclei, *J Biol Chem*, 271:24257-61.
- Ross SE, Hemati N, Longo KA, Bennett CN, Lucas PC, Erickson RL, MacDougald OA, (2000). Inhibition of adipogenesis by Wnt signaling. *Science*, 289, 950-953.
- Rubin P, Gash DM, Hansen JT, Nelson DF, Williams JP, (1994). Disruption of the blood-brain barrier as the primary effect of CNS irradiation. *Radiother. Oncol.*, 31, 51-60.
- Sahel JA, Mohand-Said S, Leveillard T, Hicks D, Picaud S, Dreyfus H, (2001). Rod-cone interdependence: implications for therapy of photoreceptor cell diseases. *Prog. Brain Res.*, 131, 649-661.
- Sakano H, Huppi K, Heinrich G, Tonegawa S, (1979). Sequences at the somatic recombination sites of immunoglobulin light-chain genes. *Nature*, 280, 288-294.
- Sakano H, Maki R, Kurosawa Y, Roeder W, Tonegawa S, (1980). Two types of somatic recombination are necessary for the generation of complete immunoglobulin heavy-chain genes. *Nature*, 286, 676-683.
- Sanai N, Tramontin AD, Quiñones-Hinojosa A., Barbaro NM, Gupta N, Kunwar S, Lawton MT, McDermott MW, Parsa AT, Garcia Verdugo JM, Berger MS, Alvarez-Buylla A, (2004). Unique astrocyte ribbon in adult human brain contains neural stem cells but lacks chain migration. *Nature*, 427, 740-744
- Savitsky K, Bar-Shira A, Gilad S, Rotman G, Ziv Y, Vanagaite L, Tagle DA, Smith S, Uziel T, Sfez S, et coll., (1995). A single *ataxia telangiectasia* gene with a product similar to PI-3 kinase. *Science*, 268, 1749-1753.
- Schnieke AE, Kind AJ, Richie WA, Mycock K, Scott AR, Ritchie m, Wilmut I, Colman A, Campbell KH, (1997). Human Factor IX transgenic sheep produced by transfer of nuclei from transfected fetal fibroblasts, 278, 2130-2133.
- Schreiber J, Riethmacher-Sonnenberg E, Riethmacher D, Tuerk EE, Enderich J, Bösl MR, Wegner M, (2000). Placental failure in mice lacking the mammalian homolog of glial cells missing, GCMa. *Mol. Cell. Biol.*, 7, 2466-2474.

- Schwaeble WJ, Stover CM, Schall TJ, Dairaghi DJ, Trinder PK, Linington C, Iglesias A, Schubart A, Lynch NJ, Weihe E, Schafer MK, (1998). Neuronal expression of fractalkine in the presence and absence of inflammation. *FEBS Lett.*, 439, 203-207.
- Schweichel JU, Merker HJ, (1973). The morphology of various types of cell death in prenatal tissues. *Teratology*, Jun, 7, 253-266.
- Sedgwick RP, Boder E, (1991). Ataxia-telangiectasia. In *Handbook of Clinical Neurology*, 60, 347-423.
- Sekiguchi J, Ferguson DO, Chen HT, Yang EM, Earle J, Frank K, Whitlow S, Gu Y, Xu Y, Nussenzweig A, Alt FW, (2001). Genetic interactions between ATM and the nonhomologous end-joining factors in genomic stability and development. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 98, 3243-3248.
- Seri B, Garcia-Verdugo JM, McEwen BS, Alvarez-Buylla A, (2001). Astrocytes give rise to new neurons in the adult mammalian hippocampus. *J. Neurosci.*, 21, 7153-60.
- Shieh SY, Ikeda M, Taya Y, Prives C, (1997). DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2. *Cell*, 91, 325-334.
- Shingo T, Gregg C, Enwere E, Fujikawa H, Hassam R, Geary C, Cross JC, Weiss S, (2003). Pregnancy-stimulated neurogenesis in the adult female forebrain mediated by prolactin. *Science*, 299, 117-120.
- Shivji KK, Kenny MK, Wood RD, (1992). Proliferating cell nuclear antigen is required for DNA excision repair. *Cell*, 69, 367-374.
- Sidman RL, Rakic P, (1973). Neuronal migration, with special reference to developing human brain: a review. *Brain Res.*, 62, 1-35.
- Sipley JD, Menninger JC, Hartley KO, Ward DC, Jackson SP, Anderson CW, (1995). Gene for the catalytic subunit of the human DNA-activated protein kinase maps to the site of the XRCC7 gene on chromosome 8. *Proc. Natl Acad. Sci.*, 92, 7515-7519.
- Slack JM, Tosh D, (2001). Transdifferentiation and metaplasia-switching cell types. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 11, 581-586.
- Smart I et Leblond CP, (1961). Evidence for division and transformations of neuroglia cells in the mouse brain, as derived from autoradiography after injection of thymidine³. *J. Comp. Neurol.*, 116, 349-367.
- Smith ML, Chen IT, Zhan Q, Bae I, Chen CY, Gilmer TM, Kastan MB, O'Connor PM, Fornace AJ Jr, (1994). Interaction of the p53-regulated protein Gadd45 with proliferating cell nuclear antigen. *Science*, 266, 1376-1380.
- Spence JR, Madhavan M, Ewing JD, Jones DK, Lehman BM, Del Rio-Tsonis K, (2004). The hedgehog pathway is a modulator of retina regeneration. *Development*, 131, 4607-4621.

- Spreafico R, Frassoni C, Arcelli P, Selvaggio M, De Biasi S, (1995). In situ labeling of apoptotic cell death in the cerebral cortex and thalamus of rats during development. *J. Comp. Neurol.*, 363, 281-295.
- Stemple DL & Anderson DJ, (1992). Isolation of a stem cell for neurons and glia from the mammalian neural crest. *Cell*, 71, 973-985.
- Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, Mangion J, Jacotot E, Costantini P, Loeffler M, Larochette N, Goodlett DR, Aebersold R, Siderovski DP, Penninger JM, Kroemer G, (1999). Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature*, 397, 441-446.
- Takahashi M, Miyoshi H, Verma IM, Gage FH, (1999). Rescue from photoreceptor degeneration in the *rd* mouse by human immunodeficiency virus vector-mediated gene transfer. *J. Virol.*, 73, 7812-7816.
- Taketo M, Schroeder AC, Mobraaten LE, Gunning KB, Hanten G, Fox RR, Roderick TH, Stewart CL, Lilly F, Hansen CT, et coll., (1991). FVB/N: an inbred mouse strain preferable for transgenic analyses. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 88, 2065-2069.
- Taccioli GE, Gottlieb TM, Blunt T, Priestley A, Demengeot J, Mizuta R, Lehmann AR, Alt FW, Jackson SP, Jeggo PA, (1994). Ku80: product of the XRCC5 gene and its role in DNA repair and V(D)J recombination. *Science*, 265, 1442-1445.
- Temple S, (1989). Division and differentiation of isolated CNS blast cells in microculture. *Nature*, 340, 471-473.
- Temple S, (2001). The development of neural stem cells. *Nature*, 414, 112-117.
- Terada N, Hamazaki T, Oka M, Hoki M, Mastalerz DM, Nakano Y, Meyer EM, Morel L, Petersen BE, Scott EW, (2002). Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature*, 416, 542-545.
- Thomaidou D, Mione MC, Cavanagh JF, Parnavelas JG, (1997). Apoptosis and its relation to the cell cycle in the developing cerebral cortex. *J. Neurosci.*, 17, 1075-1085.
- Vousden KH, Lu X, (2002). Live or let die: the cell's response to p53. *Nat. Rev. Cancer*, 2, 594-604.
- Thornberry NA & Lazebnik Y, (1998). Caspases: enemies within. *Science*. 281, 1312-6.
- Tomita M, Adachi Y, Yamada H, Takahashi K, Kiuchi K, Oyaizu H, Ikebukuro K, Kaneda H, Matsumura M, Ikehara S, (2002). Bone marrow-derived stem cells can differentiate into retinal cells in injured rat retina. *Stem Cells*, 20, 279-283.
- Travis GH, Sutcliffe JG, Bok D, (1991). The retinal degeneration slow (*rds*) gene product is a photoreceptor disc membrane-associated glycoprotein. *Neuron*, 6, 61-70.

- Tropepe V, Coles BL, Chiasson BJ, Horsford DJ, Elia AJ, McInnes RR, van der Kooy D (2000). Retinal stem cells in the adult mammalian eye. *Science*, 287, 2032-2036.
- Turner DL et Cepko CL, (1987). A common progenitor for neurons and glia persists in rat retina late in development. *Nature*, 328, 131-136.
- Turner DL, Snyder EY, Cepko CL, (1990). Lineage-independent determination of cell type in the embryonic mouse retina. *Neuron*, 4, 833-845.
- Tuteja N, Tuteja R, Ochem A, Taneja P, Huang NW, Simoncsits A, Susic S, Rahman K, Marusic L, Chen J, Zhang J, Wang S, Pongor S, Falaschi A, (1994). Human DNA helicase II: a novel DNA unwinding enzyme identified as the Ku autoantigen. *EMBO J.*, 13, 4991-5001.
- Vassilev LT, Vu BT, Graves B, Carvajal D, Podlaski F, Filipovic Z, Kong N, Kammlott U, Lukacs C, Klein C, Fotouhi N, Liu EA, (2004). *In vivo* activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2. *Science*, 303, 844-8.
- Verney C, Takahashi T, Bhide PG, Nowakowski RS, Caviness VS Jr, (2000). Independent controls for neocortical neuron production and histogenetic cell death. *Dev. Neurosci.*, 22, 125-138.
- Vicizian A, Sanyal S, Toffenetti J, Chader GJ, Farber DB, (1992). *Exp. Eye Res.*, 54: 853-60. Photoreceptor-specific mRNAs in mice carrying different allelic combinations at the *rd* and *rd5* loci.
- Vincent S, Vonesch J-L, Giangrande A, (1996). *glide* directs glial fate commitment and cell fate switch between neurones and glia. *Development*, 122, 131-139.
- Vollrath D, Feng W, Duncan JL, Yasumura D, D'Cruz PM, Chappelow A, Matthes MT, Kay MA, LaVail MM, (2001). Correction of the retinal dystrophy phenotype of the RCS rat by viral gene transfer of *Mertk*. *Proc. Natl Acad. Sci.*, 98, 12584-12589.
- Von Seggern DJ, Aguilar E, Kinder K, Fleck SK, Gonzalez Armas JC, Stevenson SC, Ghazal P, Nemerow GR, Friedlander M, (2003). In vivo transduction of photoreceptors or ciliary body by intravitreal injection of pseudotyped adenoviral vectors. *Mol. Ther.*, 7, 27-34.
- Vousden KH, Lu X, (2002). Live or let die: the cell's response to p53. *Nat. Rev. Cancer*, 2, 594-604.
- Walker JR, Corpina RA, Goldberg J, (2001). Structure of the Ku heterodimer bound to DNA and its implications for double-strand break repair. *Nature*, 412, 607-614.
- Wang X, Willenbring H, Akkari Y, Torimaru Y, Foster M, Al-Dhalimy M, Lagasse E, Finegold M, Olson S, Grompe M, (2003). Cell fusion is the principal source of bone-marrow-derived hepatocytes. *Nature*, 422, 897-901.
- Wei YF, Robins P, Carter K, Caldecott K, Pappin DJ, Yu GL, Wang RP, Shell BK, Nash RA, Schar P (1995). Molecular cloning and expression of human cDNAs encoding a novel DNA

- ligase IV and DNA ligase III, an enzyme active in DNA repair and recombination. *Mol Cell Biol.* 15, 3206-3216.
- Weimann JM, Charlton CA, Brazelton TR, Hackman RC, Blau HM, (2003). Contribution of transplanted bone marrow cells to Purkinje neurons in human adult brains. *Proc. Natl Acad. Sci.*, 100, 2088-2093.
- Wijsman JH, Jonker RR, Keijzer R, van de Velde CJ, Cornelisse CJ, van Dierendonck JH, (1993). A new method to detect apoptosis in paraffin sections: in situ end-labeling of fragmented DNA. *J. Histochem. Cytochem.*, 41, 7-12.
- Wichterle H, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A, (1997). Direct evidence for homotypic, glia-independent neuronal migration. *Neuron*, 18, 779-791.
- Wu X, Bayle JH, Olson D, Levine AJ, (1993). The p53-mdm-2 autoregulatory feedback loop *Genes Dev.*, 7, 1126-32.
- Wu J, Trogadis J, Bremner R, (2000). Rod and cone degeneration in the *rd* mouse is p53 independent. *Molecular Vision*, 7, 101-106.
- Wu DM, Schneiderman T, Burgett J, Gokhale P, Barthel L, Raymond PA, (2001). Cones regenerate from retinal stem cells sequestered in the inner nuclear layer of adult goldfish retina. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 42, 2115-2124.
- Wurmser AE et Gage FH, (2002). Stem cells: cell fusion causes confusion. *Nature*, 416, 485-487.
- Wyllie AH, (1980). Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature*, 284, 555-6.
- Ying QL, Nichols J, Evans EP, Smith AG, (2002). Changing potency by spontaneous fusion. *Nature*, 416, 545-548.
- Young RW, (1985). Cell differentiation in the retina of the mouse. *Anat Rec.* 212, 199-205.
- Young MJ, Ray J, Whiteley SJO, Klassen H, Gage FH, (2000). Neuronal differentiation and morphological integration of hippocampal progenitor cells transplanted to the retina of immature and mature dystrophic rats. *Mol. Cell. Neurosci.*, 16, 197-205.
- Yu SW, Wang H, Poitras MF, Coombs C, Bowers WJ, Federoff HJ, Poirier GG, Dawson TM, Dawson VL, (2002). Mediation of poly(ADP-ribose) polymerase-1-dependent cell death by apoptosis-inducing factor. *Science*, 297, 259-263.
- Yuan J, Yankner BA, (2000). Apoptosis in the nervous system. *Nature*, 407, 802-809.
- Zeiss CJ, Neal J, Johnson EA, (2004). Caspase-3 in postnatal retinal development and degeneration. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 45, 964-970.
- Zhao S, Chen Q, Hung FC, Overbeek PA, (2002). BMP signaling is required for development of the ciliary body. *Development*, 129, 4435- 4442.

-Zhao M, Momma S, Delfani K, Carlen M, Cassidy RM, Johansson CB, Brismar H, Shupliakov O, Frisen J, Janson AM, (2003). Evidence for neurogenesis in the adult mammalian substantia nigra. Proc. Natl Acad. Sci., 100: 7925-7930.

-Zhuo L, Theis M, Alvarez-Maya I, Brenner M, Willecke K, Messing A, (2001). hGFAP-cre transgenic mice for manipulation of glial and neuronal function in vivo. Genesis, 31, 85–94.

<http://www.retrovirus.info/RCAS/index.html>

<http://rex.nci.nih.gov/RESEARCH/basic/varmus/tva-web/tva2.html>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=PubMed>

ABREVIATIONS

BrdU : bromo-déoxyuridine = analogue de thymidine bromé, incorporé lors de synthèses d'ADN

BRCT: BRCA1 C-Terminal = domaine fonctionnel protéique décrit initialement dans la partie Carboxy terminale du gène BRCA1 de prédisposition au cancer du sein

βGal: βGalactosidase = enzyme capable de générer une réaction colorée en présence du substrat adéquat, sert de marqueur sur tissu fixé

DNA DSB: DNA double strand breaks = cassures double brin de l'ADN

DNA PKcs: sous unité catalytique de la protéine kinase DNA dépendante

DMSO: diméthyl sulfoxyde

E: embryonnaire

ERG: électrorétinogramme

GFAP: Glial Acidic Fibrillary Protein, protéine gliale composant certains filaments intermédiaires

GFP: Green Fluorescent Protein, protéine fluorescente pouvant servir de marqueur *in vivo* ou sur tissu fixé

ISEL: in situ end labelling, technique utilisée pour visualiser l'apoptose

MLV: Moloney leukemia virus, rétrovirus murin duquel dérivent la plupart des rétrovirus murins utilisés.

NER: nucleotide excision repair, réparation par excision nucléotidique

NHEJ: non homologous end joining, ligation d'extrémités non homologues.

PBS: phosphate buffer solution, tampon phosphate

PCNA: Proliferating Cell Nuclear Antigen

PN: post natal

rpm: rotation par minute

scid: severe combined immunodeficient, syndrome d'immunodéficience combinée sévère

SNC: Système nerveux central

10': 10 minutes

T°A: Température Ambiante

T_m : Température de fusion, Température pour laquelle la moitié des molécules d'ADN sont réhybridées lors d'une descente progressive de température, caractéristique d'une séquence.

XRCC: X-ray cross-complementing, capable de compléter en trans la réparation de cassures dans l'ADN dûes à l'exposition aux rayons X.

ZSV: Zone Sous Ventriculaire

Résumé

Il est admis que certaines régions du système nerveux central des mammifères adultes sont permissives à une neurogénèse, potentiel susceptible d'être activé par la dégénérescence. Afin de tester si la rétine est capable de régénération en vue de maintenir l'intégrité tissulaire, nous avons comparé le niveau de prolifération cellulaire dans une rétine saine par rapport à une rétine en dégénérescence, la rétine *rdl*. L'injection puis la détection d'un analogue de base d'ADN (BrdU) a notamment permis de détecter deux populations cellulaires, des noyaux localisés dans l'extrême périphérie de la rétine, ainsi que, dans la rétine en dégénérescence seulement, des noyaux localisés dans la couche des photorécepteurs dont une partie exprime des pigments visuels de photorécepteurs.

La quantification du nombre de cellules ayant incorporé de la BrdU dans la zone ciliaire suggère un retard de développement dans la rétine *rdl* par rapport à la rétine normale sans montrer de réelle induction d'un potentiel régénératif. Cependant, d'autres résultats attestent d'une certaine plasticité de la zone ciliaire adulte.

La couche des photorécepteurs présentant une apoptose massive, nous avons voulu vérifier la spécificité de certains marqueurs couramment utilisés pour visualiser la prolifération cellulaire; nos résultats sont cohérents avec des mécanismes de réparation d'ADN dans les photorécepteurs *rdl* impliquant la protéine suppresseur de tumeur, p53 ainsi que son partenaire mdm2, un facteur accessoire de DNA Polymérase, PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen), une ligase, la DNA Ligase IV et son partenaire dans la réparation de cassures double brin de l'ADN, XRCC4.

Selon une seconde approche, nous développons un modèle d'étude du potentiel neurogénique de la glie rétinienne: nous cherchons à appliquer à la rétine un système ayant permis, dans le cerveau en développement et adulte, d'attribuer aux cellules gliales un rôle de précurseur neuronal susceptible d'être exploité lors d'une dégénérescence neuronale. Cette hypothèse, testée chez une souris transgénique exprimant le récepteur d'un rétrovirus aviaire sous contrôle d'un promoteur glial permettant théoriquement l'infection donc le suivi des cellules gliales, n'a pu être vérifiée.

Summary

In light of different recent results suggesting that the adult mammalian central nervous system can produce new neurons, possibly as an endogenous repair mechanism, we investigated whether neurogenesis occurs in response to photoreceptor degeneration in the *rdl* mouse, a model of human-inherited retinal dystrophy. Bromodeoxy-Uridine (BrdU) incorporation and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) expression experiments detected cell proliferation in the extreme peripheral retina, in both *wt* and *rdl* retina, independent of degeneration. BrdU incorporation and PCNA expression also occurred in *rdl* photoreceptors. Our results strongly suggest that these photoreceptors are undergoing DNA repair rather than coming from a proliferative event: p53, MDM2, PCNA, DNA ligase IV and XRCC4 are expressed before photoreceptor death, consistent with a model where photoreceptors expressing the *rdl* mutation activate a process of DNA repair but which is overwhelmed by the disease mutation leading to apoptotic death. The existence of such a balance offers potential new targets for neuroprotective approaches.

On the other hand, we hypothesised retinal glial cells could be neuronal progenitors, as shown for radial glia during cerebral development and for astrocytes in the subventricular zone of the forebrain. To test if glial cells are able to transform into photoreceptors in response to their degeneration, we used a transgenic mouse enabling to follow glial cells through their specific infection with an avian retrovirus. In the mouse model of retinal degeneration due to *rdl* expression, the absence of glial proliferation does not allow to infect glial cells with a retrovirus.