

THESE

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

ETUDE FONCTIONNELLE DE NR2E3 UN RECEPTEUR NUCLEAIRE ORPHELIN IMPLIQUE DANS LA DIFFERENCIATION DES PHOTORECEPTEURS

**Réalisée dans le Laboratoire de Physiopathologie Cellulaire et
Moléculaire de la Rétine. Directeur : Pr. José-Alain Sahel**

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

**Soutenue publiquement à Paris le 2 Avril 2007
devant la commission d'examen composée de**

Pr. Alain Gaudric

Rapporteur externe

Pr. Daniel Boujard

Rapporteur externe

Pr. Alain Beretz

Rapporteur interne

Dr. Jean-Paul Renaud

Examineur

Dr. Thierry Léveillard

Directeur de thèse

Après ces nombreuses et laborieuses années passées au sein du Laboratoire de Physiopathologie de la Rétine, me voici enfin arrivé au bout de ma peine. Refermant cet ouvrage, je peux maintenant me retourner pour contempler cette période et mon soulagement actuel me révèle aujourd'hui un lourd passif que les angoisses, les difficultés et parfois aussi mon ego, m'ont si souvent fait oublier.

Ainsi, je tiens en premier lieu à remercier le Professeur José-Alain Sahel. Professeur, vous m'avez fait la faveur de m'accepter dans votre laboratoire afin de mener un projet passionnant mais qui n'a malheureusement pas tenu toutes ses promesses, et pour cela je vous saurai gré toute ma vie.

Je remercie aussi très sincèrement mon directeur de thèse, le Docteur Thierry Lèveillard. Malgré la distance séparant mon sujet d'étude de la thématique du laboratoire, vous avez toujours su être à mon écoute, vous m'avez constamment soutenu et fait preuve avec moi de la même patience que celle requise par la recherche scientifique.

Le troisième angle de cette trinité personnelle est mon épouse Valérie. Sans ton soutien et ton réconfort quotidiens, je n'aurai peut-être pas pu aller au bout de cette aventure. Je sais que tu as souvent été la plus angoissée de nous deux et tiens à m'excuser pour tous les cheveux blancs tu t'es faits par ma faute.

Autour de cet ouvrage gravitent bien d'autres personnes sans lesquelles sa rédaction aurait été vaine ou impossible. Ainsi, je fais part de ma gratitude aux Professeurs Alain Beretz, Daniel Boujard et Alain Gaudric et au Docteur Jean-Paul Renaud pour avoir accepté de faire partie de mon jury et de s'être attelés à la lecture et à la correction de ce mémoire. Ensuite, je remercie les membres passés et actuels du laboratoire qui ont pu m'apporter soit une plaisante compagnie, soit une aide technique, ils sont trop nombreux pour être énumérés mais sauront se reconnaître. Je remercie aussi les différentes associations réunissant les malades, leurs proches et d'autres âmes philanthropes pour avoir permis le financement de ma thèse soit directement, soit à travers celui du laboratoire.

Concluons cette page de remerciements par une pensée pour mes parents, sans qui tout cela n'aurait pas été possible. Après m'avoir supporté, dans tous les sens du terme, depuis l'époque où je n'étais qu'un petit morveux, ils ont dû à nouveau partager mes doutes de ces dernières années et méritent pour cela ma reconnaissance tendre et affectueuse.

ABREVIATIONS	4
PREFACE	5
INTRODUCTION GENERALE	7
A. Vision des couleurs	8
B. La drosophile	12
Origine monophylétique de l'œil	
Spécification des photorécepteurs et formation des ommatidies	
Mosaïque des ommatidies	
C. Le poisson zèbre	16
Mosaïque des cônes chez le poisson zèbre	
Génération et régénération de la rétine chez les poissons téléostéens	
Evolution de l'opsine du groupe L chez les cichlides du lac Victoria	
D. Le xénope	20
La rétine du xénope	
La transgenèse comme méthode d'étude de la rétine	
Techniques de micro-injection dans l'étude de la rétine	
E. Les sauropsidés	25
Absence des bâtonnets chez les geckos	
Le poulet	
Deux fovéas dans la même rétine	
F. Les mammifères	30
Evolution des opsines chez les mammifères	
Rétine type des mammifères euthériens	
Rétine dominée par les cônes	
Monochromatisme	
Régionalisation des cônes	
Co-expression des opsines des groupes S et L	
Cônes sensibles aux ultraviolets	
G. La souris commune	35
Chronologie de la différenciation	
Multipotence et compétence des cellules progénitrices	
Modèle de différenciation des cellules progénitrices rétiniennes	
Développement des photorécepteurs et mise en place de leur mosaïque	
Facteurs contrôlant la détermination et la différenciation des photorécepteurs	
Facteurs contrôlant le choix entre bâtonnets et cônes	
H. Le chien	47
I. Le chat	49

J. L'homme et les primates	50
Trichromatisme chez les catarhiniens	
Expression exclusive des opsines rouge et verte	
Déficiences de la vision chromatique chez l'homme	
Mosaïque des cônes chez l'homme	
Développement de la fovéa	
INTRODUCTION : LES RECEPTEURS NUCLEAIRES	58
A. Historique des récepteurs nucléaires	58
B. Structure des récepteurs nucléaires	59
C. Voie de signalisation des récepteurs nucléaires	60
Signalisation endocrine	
Métabolisme lipidique	
Autres voies de signalisation	
D. Mécanisme d'action des récepteurs nucléaires	63
Fixation du ligand au LBD	
Les protéines co-régulatrices	
Mécanisme de recrutement des protéines co-régulatrices	
E. Récepteurs nucléaires orphelins et endocrinologie inverse	65
PROBLEMATIQUE	68
RESULTATS	71
Historique de l'ESCS et de la souris <i>rd7/rd7</i>	71
Analyse des mutations localisées dans le LBD de NR2E3	77
Recherche de ligands endogènes pour NR2E3	83
Résultats complémentaires : Expression des opsines des groupes S et L chez les souris sauvage, <i>rd7/rd7</i> et <i>TRβ</i>^{-/-}	88
DISCUSSION ET PERSPECTIVES	92
Activité transcriptionnelle de NR2E3 et recherche de ses ligands endogènes	
Expression des opsines chez les souris sauvage et mutantes	
Quel rôle pour NR2E3 dans la différenciation des photorécepteurs ?	
MATERIELS ET METHODES	101
A. Modèles animaux	101
B. Techniques de biologie cellulaire	102
C. Techniques de biologie moléculaire	104

D. Techniques de biochimie	109
E. Techniques d'immunohistochimie	111
BIBLIOGRAPHIE	113

AF-2	Activation Function 2
bHLH	basic Helix-Loop-Helix
bHLH-PAS	bHLH-Period-ARNT-Single-minded
BCM	Blue Cone Monochromacy
BrdU	Bromo-deoxyUridine
CAR	Constitutive Androstane Receptor
CNTF	Ciliary Neurotrophic Factor
CRX	Cone-Rod Homeobox
DBD	DNA-Binding Domain
DMLA	Dégénérescence maculaire liée à l'âge
EcR	Ecdysone Receptor
ERG	Electrorétinogramme
ESCS	Enhanced S-cone Syndrome
Ex	x jours après la conception
GDNF	Glial cell line-Derived Neurotrophic Factor
GFP	Green Fluorescent Protein
Hes	Hairy and Enhancer of Split
Hh	Hedgehog
KO	Knock-Out
LBD	Ligand-Binding Domain
LCR	Locus Control Region
LXR	Liver X Receptor
Mash	Mammalian achaete-scute homologous
Math	Mammalian atonal homologous
N-CoR	Nuclear hormone receptor Corepressor
NRL	Neural Retina Leucine zipper
PNR	Photoreceptor cell-specific Nuclear Receptor
PPAR	Peroxisome Proliferator-Activated Receptor
Px	x jours après la naissance
PXR	Pregnane X Receptor
RAR	Retinoic Acid Receptor
RCAS	Replication Competent Avian sarcoma-leukosis virus (ASVL) LTR with Splice acceptor
RdCVF	Rod derived Cone Viability Factor
Ret-CoR	Retina Co-Repressor
ROR	Retinoid-related Orphan Receptor
RP	Rétinite Pigmentaire
RT-PCR	Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction
RXR	Retinoid X Receptor
Shh	Sonic Hedgehog
SMRT	Silencing Mediator of Retinoid and Thyroid hormone receptors
SRC	Steroid Receptor-Coactivator
T3	Tri-iodothyronine
TR	Thyroid hormone Receptor
UAS	Upstream Activation Sequence
UV	Ultraviolet
VDR	Vitamin D Receptor

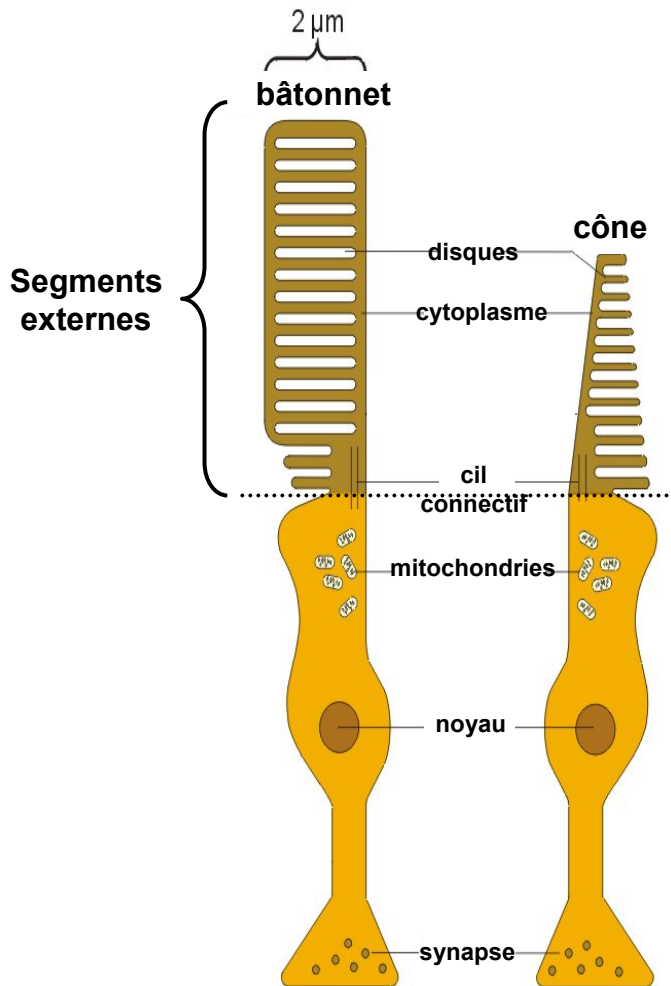


Fig. 1 : Schéma de photorécepteurs à bâtonnet et à cône

PREFACE

Chez la plupart des vertébrés, la vision est basée sur un "dualisme" des photorécepteurs, avec les bâtonnets responsables de la vision scotopique, c'est-à-dire en condition de faible luminosité, et les cônes responsables de la vision photopique, c'est-à-dire en condition de forte luminosité, mais aussi des visions chromatique et de forte acuité ou vision fine (**Figures 1 et 2**).

La plupart des mammifères possède une rétine présentant une large majorité de bâtonnets ; malgré cette nette prédominance des photorécepteurs destinés à la vision nocturne, de nombreux mammifères ont développés un style de vie diurne où la vision dépend essentiellement de l'activité des cônes. Ce paradoxe d'une rétine dominée par les bâtonnets mais adaptée à une activité diurne est notamment observé chez l'homme et les autres grands primates. En particulier, la vision de forte acuité est dépendante de la présence d'une fovéa, une région spécialisée située au centre de la rétine et constituée exclusivement de cônes. Malgré la proportion réduite de cônes chez l'homme, leur seule fonction suffit pour mener une vie normale, d'autant plus que les progrès technologiques ont chassé l'obscurité de notre vie quotidienne.

De nombreux patients atteints de cécité nocturne peuvent ne pas avoir conscience de leur handicap ou bien n'éprouvent pas le besoin de consulter. Un exemple éloquent de cécité nocturne héréditaire est celui de Jean Nougaret, un français vivant au début du XVII^{ème} siècle et atteint d'une forme dominante de cécité nocturne stationnaire transmise à sa descendance sur plus de six générations jusqu'au début du XIX^{ème} siècle. La cécité nocturne des descendants de Jean Nougaret a été la première fois diagnostiquée presque par accident chez un appelé du contingent que l'on suspectait de simuler son handicap, illustrant le fait que même à une époque dépourvue de source de lumière électrique, l'absence de fonction des bâtonnets constituait un handicap mineur et discret (Dryja, 2000).

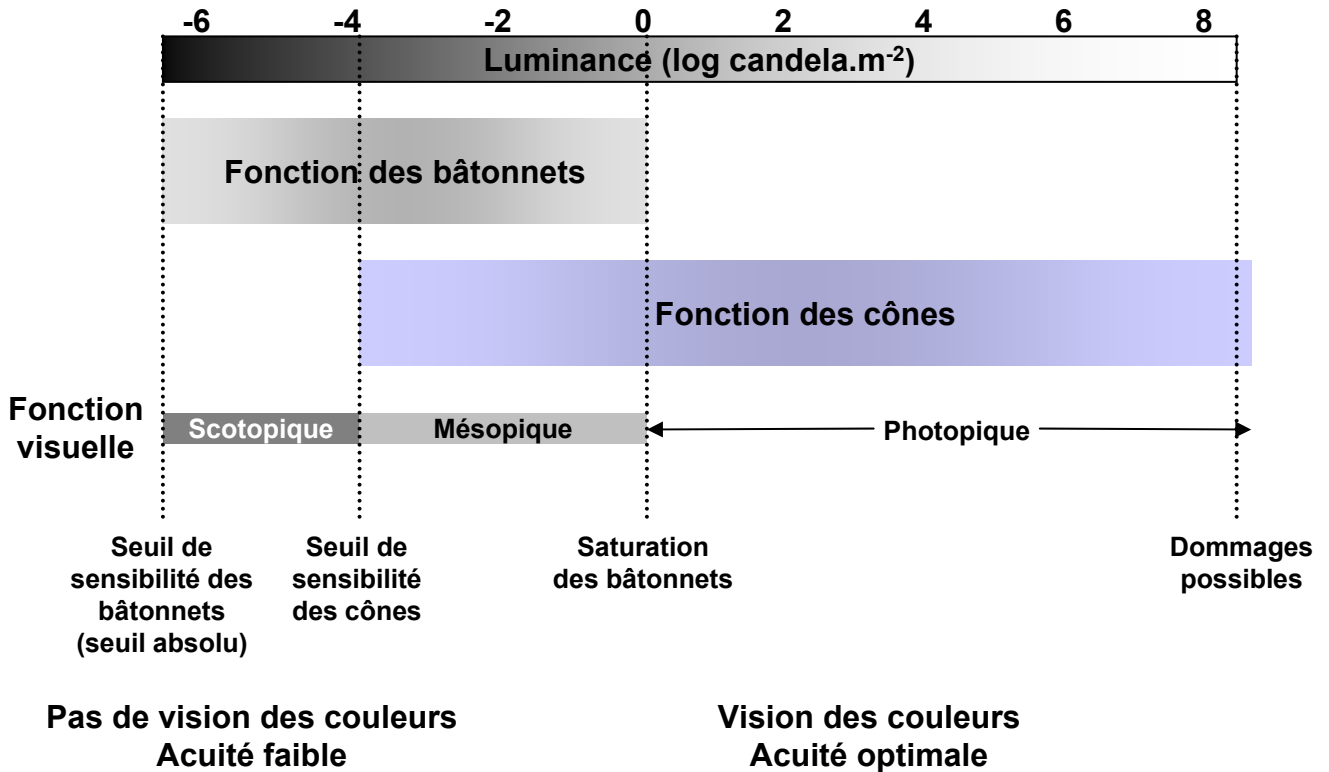


Fig. 2 : Photosensibilités respectives des bâtonnets et cônes

La luminance correspond au quotient de l'intensité lumineuse émise par une source dans une direction donnée et s'exprime en candela par mètre carré. Un candela correspond à l'intensité lumineuse dans une direction donnée d'une source émettant un rayonnement monochromatique de fréquence 540.10^{12} Hertz et d'une intensité énergétique de $1/683$ Watt par stéradian, ce qui est équivalent à l'énergie émise par une bougie standard.

L'étude d'autres pathologies a conduit à mesurer l'importance fonctionnelle relative des cônes et des bâtonnets. Les rétinopathies pigmentaires (RP) constituent un groupe hétérogène de maladies cécitantes héréditaires caractérisées par une perte séquentielle des bâtonnets et des cônes. La perte primaire des bâtonnets conduit à une cécité nocturne et à une réduction du champ visuel passant parfois inaperçues pour le patient. La dégénérescence secondaire des cônes provoque la perte de la vision photopique et conduit à une cécité complète.

La dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) est une maladie multifactorielle, fréquente à partir de 65 ans et caractérisée par une dégénérescence progressive de la macula, région centrale de la rétine où est localisée la fovéa. Elle conduit à une perte de la vision centrale particulièrement handicapante avec une nette diminution de l'acuité visuelle et de la capacité à distinguer les couleurs, tandis que la vision périphérique n'est pas affectée. Bien que la DMLA affecte indifféremment bâtonnets et cônes, c'est la perte de fonction de ces derniers qui génère le principal handicap.

Ces différentes pathologies illustrent la prépondérance fonctionnelle des cônes chez l'homme. Pourtant les mécanismes contrôlant la différenciation des cônes et la mise en place de leur mosaïque, c'est-à-dire de leur organisation bidimensionnelle dans la rétine, demeurent mal connus chez les mammifères, notamment en raison de leur faible effectif. Récemment, un facteur de transcription de la famille des récepteurs nucléaires, NR2E3, aussi référencé PNR (Photoreceptor cell-specific Nuclear Receptor), a été impliqué dans la régulation de la population d'un des sous-types de photorécepteurs à cône. En particulier, des mutations de *NR2E3* sont responsables d'une forme particulière de dégénérescence rétinienne : l'ESCS (Enhanced S-Cone Syndrome), ou syndrome d'hypersensibilité à la lumière bleue, caractérisée par un excès de cônes bleus.

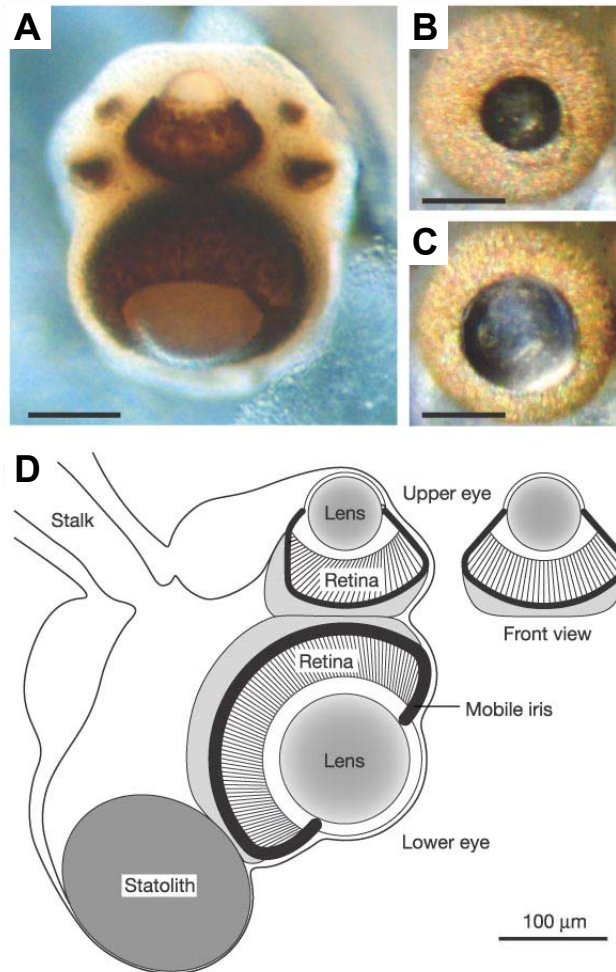


Fig. 3 : Rhopalium de la méduse *Tripedalia cystophora* (d'après Nilsson et coll., 2005)

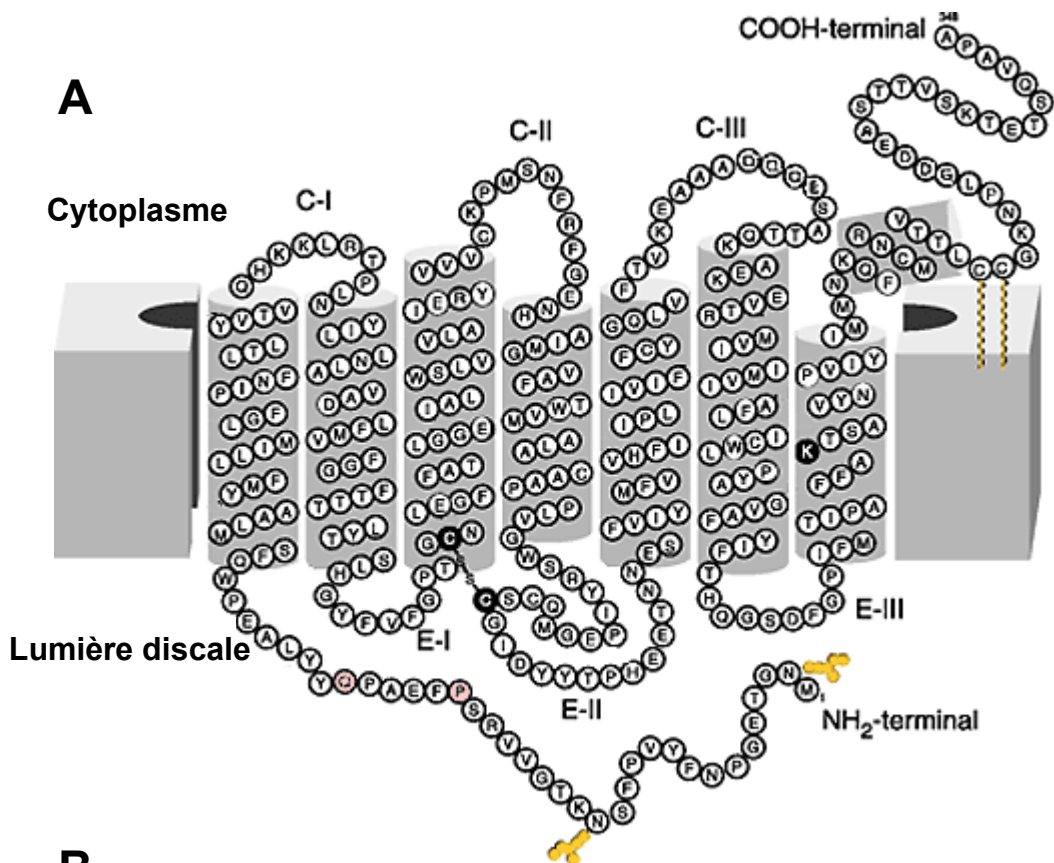
A : Le rhopalium (pseudopode visuel) de la méduse *Tripedalia cystophora* présente deux yeux lenticulés, un supérieur et un inférieur, et deux paires d'yeux simples. **B, C :** La pupille mobile de l'œil inférieur sous forme contractée (**B**) et dilatée (**C**). **D :** Représentation transversale schématique du rhopalium. Le statolithe est un organe sensoriel permettant d'orienter le rhopalium.

INTRODUCTION GENERALE

La plupart des métazoaires présentent des organes photosensibles leur permettant d'extraire différentes informations de la lumière ambiante. A l'origine, cet organe ne devait avoir qu'une seule fonction, vraisemblablement la perception de la direction de la lumière. Selon Darwin, cet œil primitif devait être composé de deux types cellulaires : un photorécepteur et une cellule pigmentée permettant un phototactisme. A l'appui de cette hypothèse, un "œil" composé de seulement un photorécepteur et une cellule pigmentée est retrouvé chez certains organismes comme la planaire *Polycelis auricularia* (Gehring, 2005).

Au cours de l'évolution, différents phylums ont développé, de manière indépendante, une grande variété de systèmes optiques, générant des exemples spectaculaires de convergence évolutive comme le système d'œil caméra commun aux céphalopodes et aux vertébrés. Cette diversité des systèmes optiques a longtemps fait croire à une origine polyphylétique de l'œil dans les différents embranchements. L'évolution des systèmes optiques s'est accompagnée de l'acquisition de nouvelles fonctions permettant l'extraction de différents types d'informations à partir d'un stimulus visuel.

Certaines méduses, comme *Tripedalia cystophora*, présentent différents yeux dont certains de type caméra extrêmement sophistiqués (Nilsson et coll., 2005), indiquant que la complexité d'un système visuel n'est pas corrélée à celle de l'organisme (**Figure 3**). L'existence, chez ces méduses, de différents yeux exerçant différentes fonctions illustre le fait que la vision sert à percevoir plusieurs types d'informations et qu'il y a en fait plusieurs visions. Contrairement à *Tripedalia*, de nombreux bilatériens (arthropodes et mammifères surtout) possèdent un seul type d'œil rassemblant les informations nécessaires aux différentes fonctions visuelles. Ces fonctions peuvent être classées selon la luminosité à laquelle elles opèrent : vision scotopique et vision photopique. La vision photopique est dépendante des photorécepteurs à cône qui permettent aussi une vision des couleurs (vision chromatique).



B

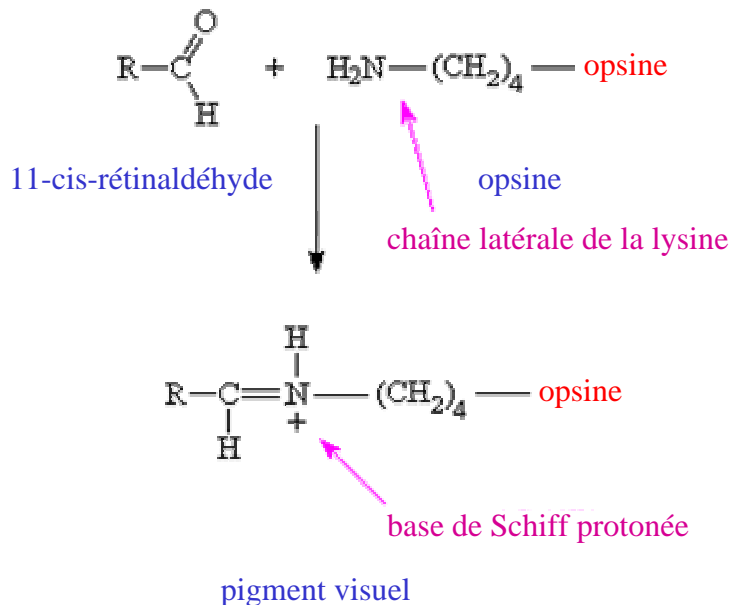


Fig. 4 : Modèle structural de la rhodopsine et illustration d'une base de Schiff

A : Le résidu lysine (K) noirci situé sur la 7^{ème} hélice transmembranaire correspond au site de fixation du chromophore. En jaune sont représentés les sites de phosphorylation (N-terminaux) et de glycosylation (C-terminaux). **B** : Illustration schématique d'une liaison de type base de Schiff reliant le chromophore (11-cis-rétinaldéhyde) à la molécule d'opsine.

A. Vision des couleurs

La vision chromatique est le processus permettant d'extraire de l'information à partir de la composition en longueur d'onde d'un stimulus visuel. Ceci est réalisé grâce à l'existence de pigments visuels ayant des sensibilités spectrales différentes. En général, ces pigments sont exprimés spécifiquement par un type de photorécepteur selon la règle "un récepteur - un neurone" caractéristique de la majorité des neurones sensoriels.

La structure de ces pigments visuels est similaire à celle d'autres pigments photosensibles retrouvés dans les taxons des procaryotes et des archéobactéries et semble être universelle : il s'agit de récepteurs à sept domaines transmembranaires (**Figure 4.A**) liés à un chromophore dérivé de la vitamine A. Ce chromophore est relié via une liaison de type "base de Schiff" à un résidu lysine situé dans la 7^{ème} hélice transmembranaire (**Figure 4.B**). L'absorption d'un photon par un pigment visuel entraîne la photo-isomérisation du chromophore modifiant la conformation du récepteur et initiant une cascade biochimique. Les similitudes existantes entre les photopigments des différents règnes, associées à d'autres données, comme le fait que l'organite photosensible de certains protistes est localisé dans leur chloroplaste, ont conduit Walter Gehring à proposer une hypothèse symbiotique pour l'origine des photorécepteurs de métazoaires : ceux-ci seraient en fait le résultat de l'endosymbiose d'une cyanobactérie (**Figure 5** ; Gehring, 2002 et 2005).

Chez les vertébrés, l'analyse des séquences des pigments visuels a démontré que ceux-ci pouvaient être répartis en cinq groupes, dont quatre sont responsables de la vision chromatique : les opsines des cônes ; le 5^{ème} groupe (groupe Rh), celui de la rhodopsine ou opsine des bâtonnets, ne permettant qu'une vision achromatique (**Tableau 1**). La distinction entre cône et bâtonnet est parfois ambiguë. Si généralement la classe de son pigment visuel est suffisante pour définir l'identité d'un photorécepteur, l'utilisation d'autres critères tels que

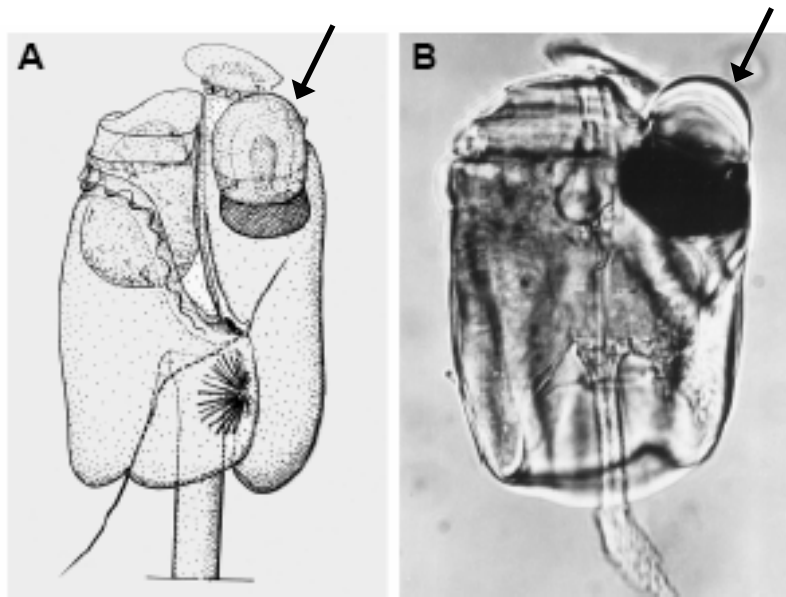


Fig. 5 : Représentation schématique (A) et photographie (B) du dinoflagellé *Erythroopsis pavillardi* et de son organite visuel (d'après Gehring, 2002)

L'organite visuel est indiqué par les flèches.

Nom standard dans la littérature (mammifères)	Okano et coll., 1995	Yokoyama, 1994	Chang et coll., 1995
S	S	SWS-I	Violet opsins
Absent	M1	SWS-II	Blue opsins
Absent	M2	Rh2	Rod-like opsins
L/M	L	LWS/MWS	Red/green opsins
Rhodopsine	Rh	Rh1	Rod opsins

Tab. 1 : Différentes nomenclatures des cinq classes d'opsine (d'après Ebray et Koutalos, 2001)

La nomenclature utilisée dans le texte correspond à celle de Okano et coll., 1995.

sa morphologie, sa fonction ou d'autres caractéristiques moléculaires est parfois nécessaire pour permettre sa classification définitive. Les descriptions des rétines de xénope ou de gecko fourniront quelques exemples des difficultés de classification.

Les différents groupes d'opsines de cône sont désignés selon la sensibilité spectrale de leurs membres (Okano et coll., 1992 et 1995) :

- groupe S, sensibles aux longueurs d'onde courtes (bleu, voire ultraviolet, <440 nm)
- groupes M1 et M2, sensibles à des longueurs d'onde moyennes (de bleu à orange, entre 440 et 510 nm)
- groupe L, sensibles aux longueurs d'onde élevées (rouge, >500 nm)

Deux autres caractéristiques participent à la définition de la sensibilité spectrale des cônes : il s'agit de la présence d'une gouttelette lipidique au sein du cône et de la nature du chromophore dérivé de la vitamine A.

Chez de nombreux sauropsidés (reptiles et oiseaux), une gouttelette lipidique située à la base du segment externe et de couleur distincte selon le type de cône, va permettre de filtrer la lumière, ne laissant passer que les rayons de longueur d'onde élevée. Ce filtrage a pour conséquence le décalage des maxima d'absorption des cônes vers une longueur d'onde plus élevée et la réduction des zones de recouvrement existant entre les spectres d'absorption des différentes opsines, conduisant à une amélioration des contrastes dans la vision chromatique (**Figure 6** ; Okano et coll., 1995).

Alors que la plupart des vertébrés terrestres ne présente qu'un seul type de chromophore dérivé de la vitamine A, le rétinaldéhyde (ou chromophore A1), les lamproies et de nombreux poissons et amphibiens possèdent un second chromophore dérivé de la vitamine A, le 3,4-déhydrorétinaldéhyde (ou chromophore A2 ; Beatty, 1984). Le remplacement du chromophore A1 par le chromophore A2 peut concerner des opsines de différents groupes et a

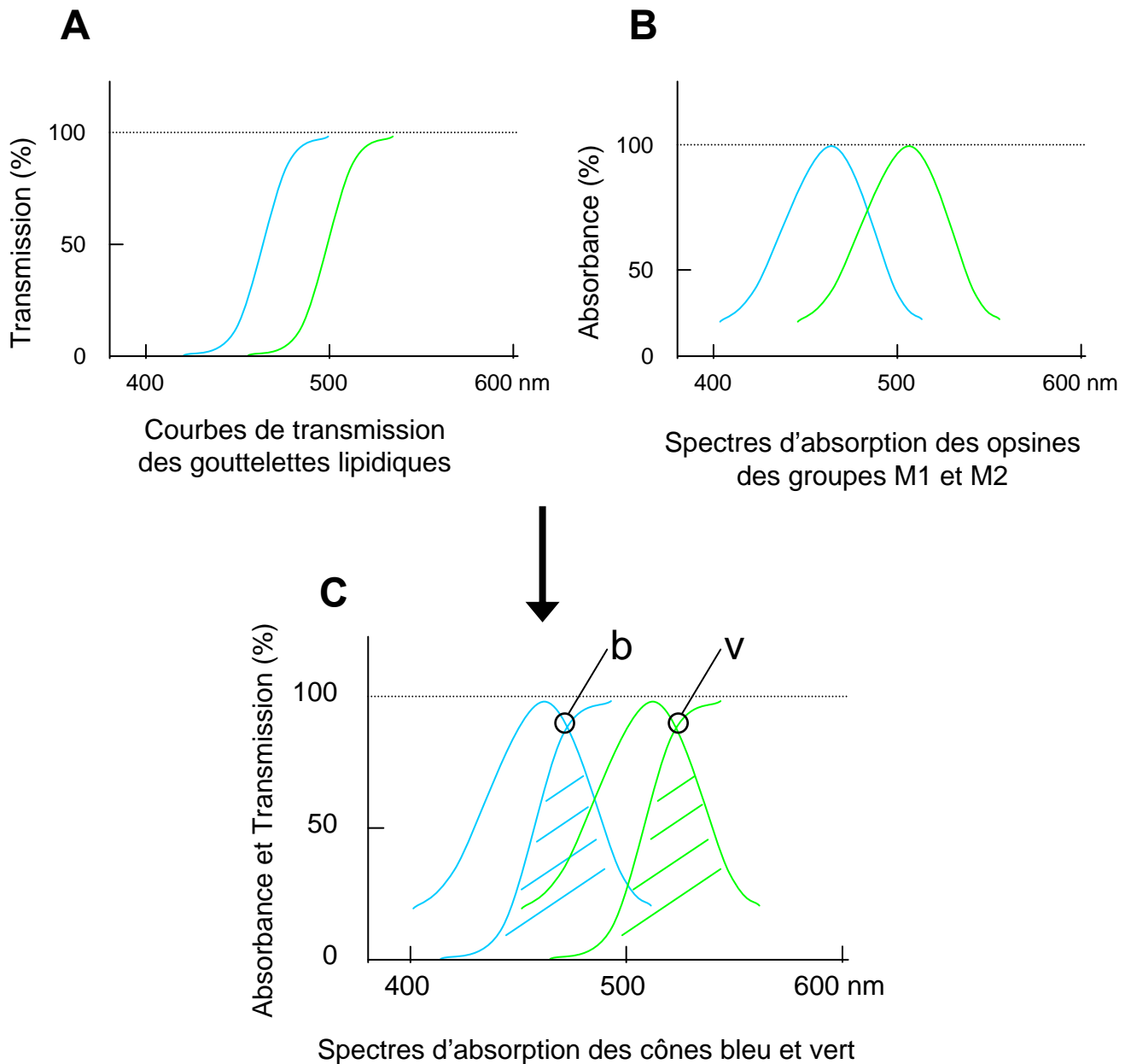


Fig. 6 : Influence des gouttelettes lipidiques sur le spectre d'absorption des cônes chez le poulet (d'après Okano et coll., 1995)

A : Courbes de transmission des gouttelettes lipidiques des cônes bleu et vert (exprimant les opsines M1 et M2). **B** : Spectres d'absorption des opsines des groupes M1 et M2 (bleu et vert respectivement). **C** : Spectres d'absorption des cônes bleu et vert (zones hachurées), ces spectres résultent du spectre d'absorption de l'opsine exprimée corrigé par le filtrage de la gouttelette lipidique. Les points **b** et **v** correspondent aux maxima d'absorption des cônes bleu et vert respectivement.

pour conséquence le décalage des maxima d'absorption vers des longueurs d'onde plus élevées (Harosi, 1994).

Chez les poissons migrants, le passage d'une eau salée à une eau douce est souvent associé au remplacement du chromophore A1 par le chromophore A2, et inversement pour le passage d'une eau douce à une eau salée. Ainsi, lors de l'argenture de l'anguille américaine *Anguilla rostrata*, c'est-à-dire la métamorphose préparant son passage d'une eau salée à une eau douce, le remplacement du chromophore A1 par le chromophore A2 au sein de la rhodopsine génère un nouveau pigment visuel, la porphyropsine, présentant un maximum d'absorption de 523 nm contre 501 nm pour la rhodopsine (Beatty, 1975). Ce changement de chromophore correspond vraisemblablement à une adaptation aux propriétés optiques de l'eau douce, celle-ci absorbant moins les rayons de longueur d'onde élevée que ne le fait l'eau salée.

Assez récemment, une stratégie originale de modification de la sensibilité spectrale des opsines a été mise en évidence chez des poissons des fonds marins. Plusieurs de ces poissons possèdent une paire de photophores émettant une lumière de longueur d'onde très élevée (plus de 700 nm), or une de ces espèces, le poisson dragon *Malacosteus niger* (**Figure 7**), n'exprime que l'opsine du groupe Rh présentant des maxima d'absorption de 517 nm pour la rhodopsine et de 542 nm pour la porphyropsine et ne permettant pas la détection de la lumière émise par les photophores de ses congénères. Douglas et coll. ont montré que l'association de molécules dérivées de la chlorophylle avec les pigments visuels du poisson dragon étendait leur sensibilité spectrale vers des longueurs nettement plus élevées, les rendant sensibles à la lumière émise par le photophore rouge (Douglas et coll., 1998). Cette capacité de modification de la sensibilité spectrale d'un pigment visuel par fixation d'un dérivé de la chlorophylle est conservée chez le bœuf (*Bos taurus*) et la salamandre tigrée (*Ambystoma tigrinum*), suggérant que ce mécanisme pourrait être présent chez d'autres vertébrés (Washington et coll., 2004 ; Isamaya et coll., 2006).

A



B



Fig. 7 : Illustration du poisson dragon *Malacosteus niger* (A) et photographie de sa tête portant deux paires de photophores (B)

A : Adulte, ce poisson des grands fonds mesure entre 15 et 20 cm de long, il est cependant capable d'étendre sa mâchoire inférieure sur une longueur équivalente. **B** : La tête de *Malacosteus niger* porte deux paires de photophores, une paire "classique" produisant une lumière bleue d'une manière similaire à celle de nombreux autres poissons des grands fonds, et une paire émettant une lumière rouge normalement indétectable pour la plupart des autres poissons des fonds marins

L'arbre phylogénétique (**Figure 8**) des pigments visuels indique clairement que la divergence entre les différentes classes d'opsines de vertébré est extrêmement ancienne, les cinq classes étant présentes chez les lamproies (un poisson ancestral dépourvu de mâchoires ; Collin et Trezise, 2004). Ceci suggère fortement que l'ancêtre commun des vertébrés possédait cinq opsines représentant les cinq groupes et était doté d'une vision tétrachromatique. Au cours de l'évolution, certains embranchements ont perdu les pigments visuels d'une ou plusieurs classes comme nous le verrons plus loin (Ahnelt et Kolb, 2000).

Les vertébrés actuels présentent une très grande diversité de leurs populations de photorécepteurs. Les variations peuvent concerner les photorécepteurs en eux-mêmes (nombre d'opsine, leur sensibilité spectrale et leur morphologie) mais aussi la mosaïque formées par les photorécepteurs, c'est-à-dire leur organisation bidimensionnelle à la surface de la rétine. Cette mosaïque est définie par des paramètres tels que les effectifs relatifs des populations de cônes et de bâtonnets, ceux des différentes populations de cônes entre elles, la densité et la distribution de ces populations et des phénomènes de régionalisation.

La sensibilité visuelle et la résolution spatiale constituent des fonctions en conflit permanent. Augmenter la sensibilité nécessite la sommation des signaux perçus par plusieurs photorécepteurs adjacents, ce qui limite la résolution spatiale, à l'inverse, une bonne résolution spatiale requiert un faible niveau de convergence des signaux perçus et donc un niveau de luminosité minimal permettant l'activation d'un maximum de photorécepteurs. Ce conflit entre sensibilité et acuité de la vision fine doit être géré par les cônes et leur mosaïque. La différenciation des photorécepteurs et la mise en place de leur mosaïque ont été étudiées dans de nombreux modèles allant de la drosophile à l'homme. Chacun de ces modèles présente des caractéristiques biologiques et des avantages méthodologiques propres permettant d'aborder de multiples façons l'étude des mécanismes impliqués dans le développement des photorécepteurs.

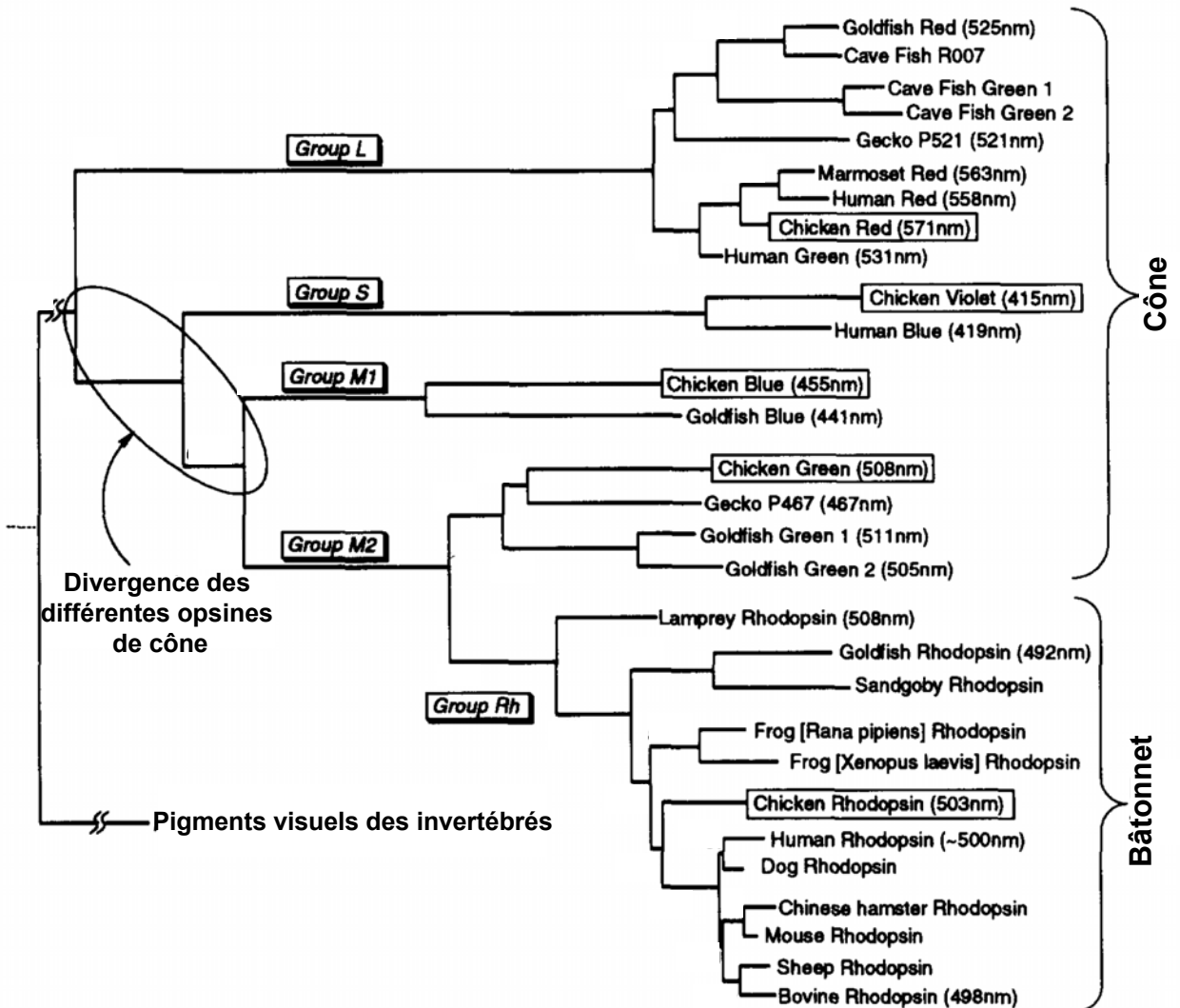


Fig. 8 : Arbre phylogénétique des pigments visuels des vertébrés (Okano et coll., 1995)

Les différentes protéines sont suivies de leur maximum d'absorption, les opsines encadrées correspondent à celles du poulet (Chicken, *Gallus Gallus*). Goldfish : poisson rouge (*Cariassus auratus*), Cave fish : tetra aveugle (*Astyanax fasciatus*), Marmoset : ouistiti (*Callithrix jacchus*), Lamprey : lamproie (*Geotria australis*), Sandgoby : gobie des sables (*Pomatoschistus minutus*), Frog : grenouille, Dog : chien (*Canis lupus familiaris*), Chinese hamster : hamster de Chine (*Cricetulus griseus*), mouse : souris (*Mus musculus*), Sheep : ovin, Bovine : bovin.

B. La drosophile

La drosophile (*Drosophila melanogaster*) constitue le modèle par excellence des recherches génétiques du fait de son temps de génération très court, du séquençage complet de son génome et de l'existence de nombreuses collections de mutants (<http://flybase.bio.indiana.edu/>). L'étude du développement oculaire chez cet organisme est à l'origine d'avancées considérables dans de multiples domaines de la biologie, elle a notamment permis la découverte de plusieurs voies de signalisation retrouvées chez tous les métazoaires. De plus, de nombreux mécanismes intervenant à diverses étapes de ce développement sont conservés chez les vertébrés.

Origine monophylétique de l'oeil

La vision classique d'une origine polyphylétique de l'œil, suggérée par exemple par la comparaison entre les yeux composés retrouvés chez les insectes et les yeux caméra des vertébrés, a été remise en cause par l'identification de la cascade de facteurs de transcription contrôlant le développement oculaire précoce chez la drosophile. En particulier, l'usage universel du gène *Pax 6*, *eyeless* chez la drosophile, dans la morphogenèse oculaire plaide en faveur d'une origine monophylétique de l'œil. Ce gène code pour un facteur de transcription à homéodomaine exprimé dans le disque imaginal de l'œil (structure larvaire à partir de laquelle se développera l'œil de l'organisme adulte), la séquence de la protéine codée est fortement conservée, et des mutations homozygotes de *Pax 6* chez la drosophile, la souris et l'homme sont responsables d'une absence d'œil. Chez l'homme une mutation hétérozygote dominante de *Pax 6* est aussi responsable du syndrome de l'aniridie (absence d'iris ; Gehring, 2002). Ces observations ont suggéré que *Pax 6* était un "*Master control gene*" universel pour la morphogenèse oculaire (Gehring, 2002). Cette hypothèse a été confirmée par le groupe de Gehring qui a réussi à induire la formation d'yeux dans différents territoires définis par les

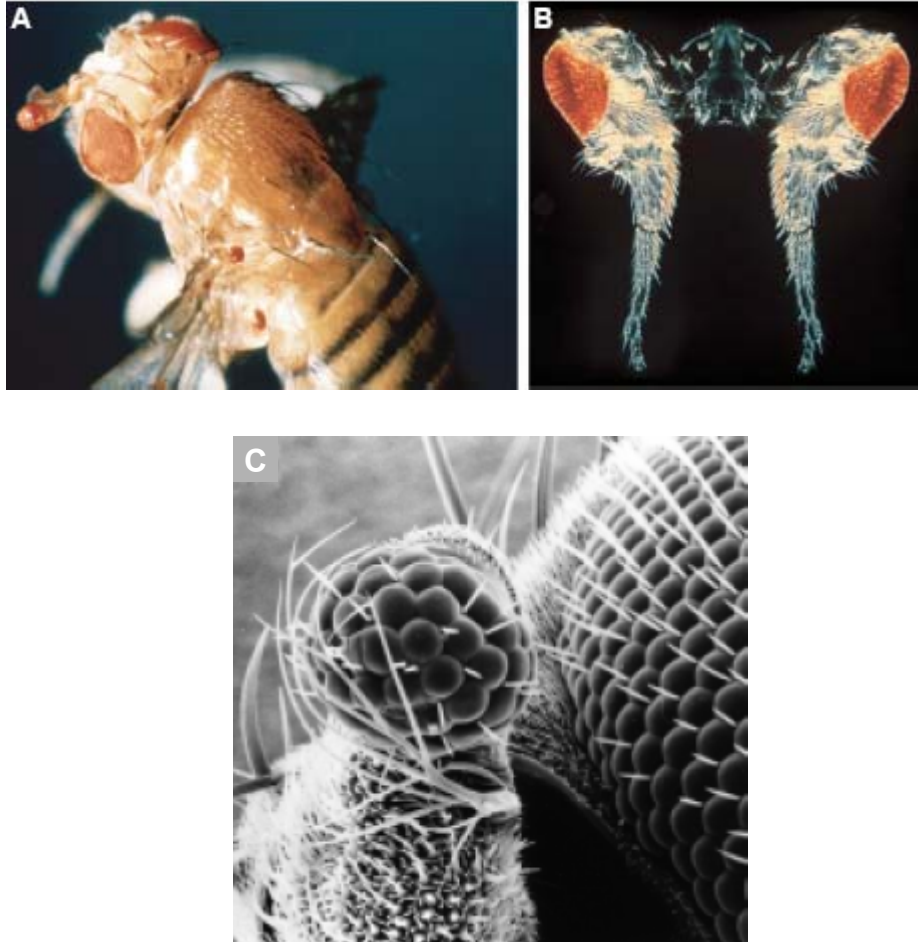


Fig. 9 : Induction d'yeux ectopiques chez la drosophile (Gehring, 2002)

A, B : Induction d'yeux ectopiques par *Eyeless* à la place des antennes et des ailes (A) ou sur les pattes (B). **C :** Induction d'yeux ectopiques à la place des antennes par *Pax 6*, l'orthologue murin de *Eyeless*.

disques imaginaux de la drosophile grâce à l'expression ectopique de Pax 6 (Halder et coll., 1995). Ainsi, des yeux ectopiques parfaitement structurés ont été générés à la place des pattes, antennes et ailes de la drosophile (**Figure 9**). L'expression du gène murin codant Pax 6 est capable de générer des yeux ectopiques chez la drosophile, tandis que l'expression de *eyeless* induit aussi la formation d'yeux ectopiques chez le xénope (Onuma et coll., 2002). Ces expériences montrent que le programme de développement de l'œil a été conservé au cours de l'évolution et qu'il peut être activé par l'homologue *Pax 6* provenant de différentes espèces.

Spécification des photorécepteurs et formation des ommatidies

Les mécanismes du développement oculaire chez la drosophile ont été élucidés grâce à l'étude de multiples mutants obtenus à l'origine par irradiation. L'œil composite de la drosophile est constitué de 800 unités optiques, les ommatidies, chacune contenant huit photorécepteurs associés à des cellules accessoires. Dans chaque ommatidie, les six photorécepteurs externes (R1-R6) expriment la même opsine (Rh1) tandis que les deux photorécepteurs internes (R7 et R8), expriment des opsines de différente sensibilité spectrale. R1-R6 et R7-R8 peuvent être assimilés respectivement aux bâtonnets et aux cônes.

La formation des ommatidies a lieu durant le 3^{ème} stade larvaire et se fait en deux temps : le recrutement des cellules post-mitotiques indifférenciées du disque imaginal par une vague de différenciation marquée par le sillon morphogénétique accompagné d'une spécification des photorécepteurs R8 autour desquels vont ensuite s'organiser les ommatidies.

La propagation du sillon morphogénétique se fait de la région postérieure vers la région antérieure et dépend du facteur diffusible Hedgehog (Hh). Hedgehog est initialement exprimé dans la marge postérieure du disque de l'œil, il va induire l'expression de *Hh* dans les cellules en position immédiatement antérieure, permettant une progression dynamique du sillon

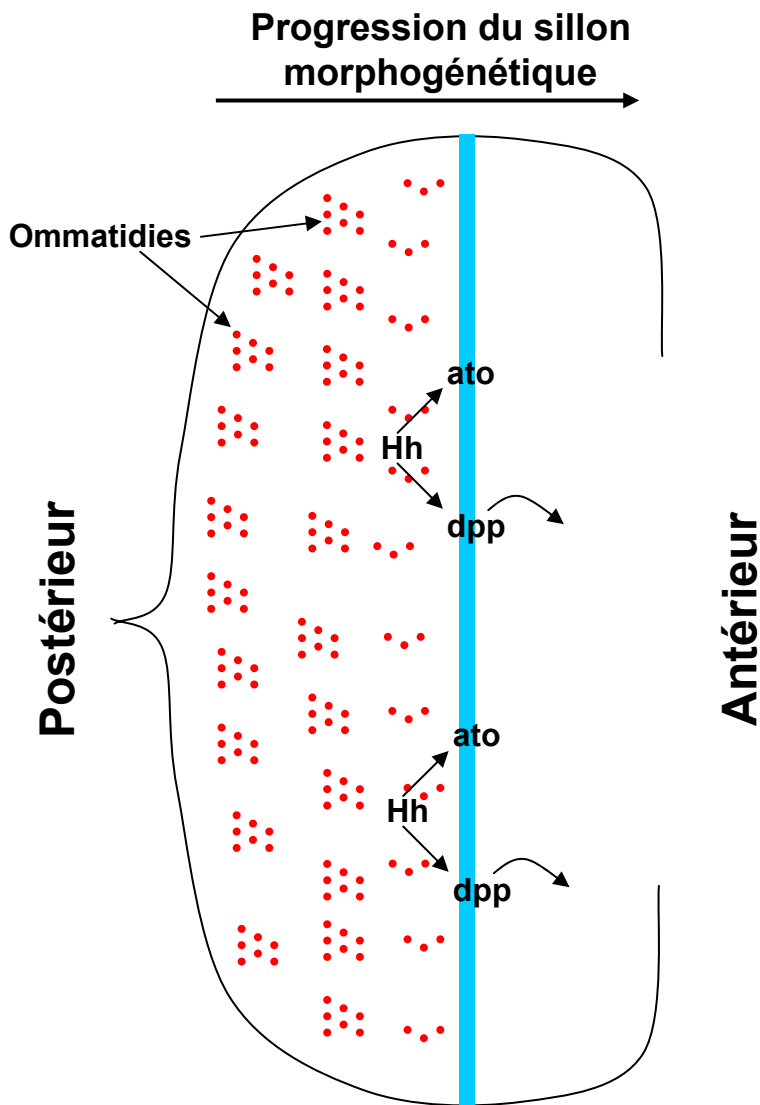


Fig. 10 : Schéma illustrant la progression du sillon morphogénétique

Le sillon morphogénétique (en bleu) progresse de la région postérieure vers la région antérieure (ici de la gauche vers la droite). Cette progression est dirigée par Hh, exprimé par les photorécepteurs en cours de différenciation (points rouges). Outre sa propre expression, Hh induit aussi l'expression de *dpp* et de *ato* au niveau du sillon morphogénétique. L'expression de *ato* va permettre la différenciation des photorécepteurs R8 autour desquels vont s'organiser les ommatidies (en rouge).

morphogénétique à travers un épithélium indifférencié, Hh induit aussi l'expression de *dpp* (decapentaplegic), un morphogène permettant l'acquisition d'un état "pré-proneural" par les cellules en position antérieure, état facilitant la progression du sillon et nécessaire à la maturation de la rétine. (**Figures 10 et 11.A**). Hedgehog va aussi initier la différenciation des photorécepteurs R8 en induisant l'expression d'*atonal*, gène proneural codant pour un facteur de transcription à domaine bHLH (basic Helix-Loop-Helix).

La participation de la voie de signalisation Hedgehog à la morphogénèse rétinienne chez la drosophile constitue un second exemple de mécanisme commun entre vertébrés et invertébrés : chez le poisson zèbre, la vague de neurogenèse débute à proximité du centre de la rétine, centre défini par le pédicule reliant la rétine au tube neural ou tige optique, celle-ci peut être considérée comme l'équivalent de la marge postérieure du disque oculaire de la drosophile. Cette vague s'étend ensuite en périphérie et est marquée par l'expression de l'orthologue de Hh : Sonic hedgehog (Shh) par les cellules ganglionnaires. Comme pour Hh, l'activité de Shh est nécessaire et suffisante pour contrôler la vague de progression de sa propre expression (Neumann et Nüsslein-Volhard, 2000).

La similitude existant entre les vagues morphogénétiques du poisson zèbre et de la drosophile plaide là encore en faveur d'une origine monophylétique de l'œil.

Après détermination, le photorécepteur R8, cellule fondatrice de l'ommatidie, va recruter les cellules avoisinantes et induire la différenciation des autres photorécepteurs dans un ordre spécifique : R2/R5, R3/R4, R1/R6 et R7 en dernier (**Figure 11.B**). La spécification du photorécepteur R7 dépend de l'activation de Sevenless, un récepteur tyrosine kinase, par son ligand Boss, une protéine membranaire exprimée par le photorécepteur R8 (Banerjee et coll., 1987). L'analyse génétique a permis d'identifier d'autres membres de cette voie de signalisation et de relier Sevenless à la cascade Ras/Raf/MAPK, par ailleurs impliquée dans la

Progression du sillon morphogénétique

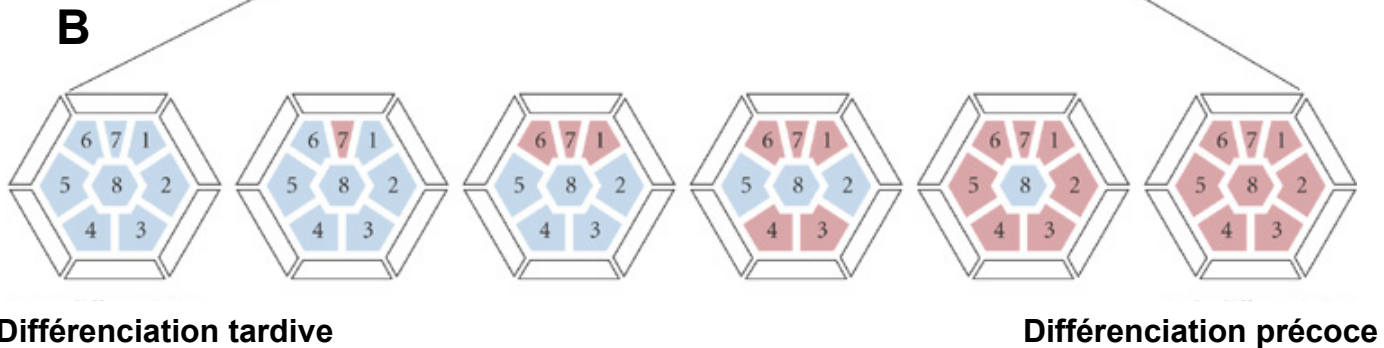
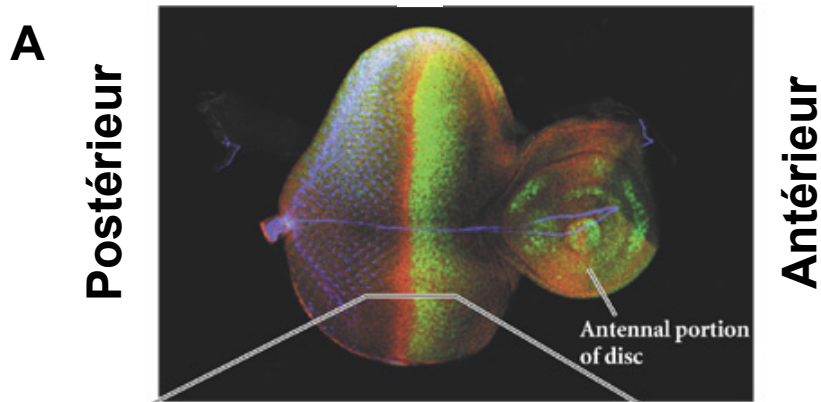


Fig. 11 : Rétinogénèse chez la drosophile

A : Photographie illustrant la progression du sillon morphogénétique (de la gauche vers la droite). Le marquage rouge correspond à la protéine cubitus interruptus dont la concentration est maximale au niveau du sillon morphogénétique. L'œil et l'antenne sont originaires du même disque imaginal. **B** : Détermination séquentielle des huit photorécepteurs de l'ommatidie. A un instant t , les ommatidies en position postérieure présenteront un stade de différenciation plus avancé que celles situées en position antérieure. La couleur bleue indique les cellules à un stade de différenciation avancé.

transformation cellulaire (Nagaraj et Banerjee, 2004). Il est ainsi intéressant de noter que l'étude du développement des photorécepteurs chez la drosophile a permis de mettre à jour des mécanismes moléculaires universels.

Mosaïque des ommatidies

Bien que la capacité à distinguer les couleurs soit apparue indépendamment chez les vertébrés et les insectes, homme et drosophile présentent tous deux une mosaïque rétinienne où les photorécepteurs destinés à la vision chromatique sont répartis de manière aléatoire. Les deux photorécepteurs internes (R7 et R8) expriment des pigments visuels dont la sensibilité spectrale peut différer entre chaque ommatidie. Il est ainsi possible de distinguer trois types d'ommatidies en fonction de leurs photorécepteurs internes : DRA (Dorsal Rim Area), "pale" et "yellow" (p et y). Deux sous-types sont répartis de manière aléatoire dans la rétine, 30% expriment l'opsine Rh3 dans le photorécepteur R7 et Rh5 dans R8, ce sont les ommatidies p, et 70% expriment Rh4 dans R7 et Rh6 dans R8, ce sont les ommatidies y. Les ommatidies DRA expriment l'opsine Rh3 dans R7 et R8 et sont localisées dans la région dorsale de la rétine (**Figure 12.A**).

Cette distribution stochastique des ommatidies dans la rétine reflète la stratégie de spécification durant la formation de la mosaïque rétinienne. Un gène clef contrôlant cette distribution stochastique est *Spineless*, un homologue du récepteur à la dioxine, un facteur de transcription de type bHLH-PAS (bHLH-Period-ARNT-Single-minded). La mosaïque est déterminée par un seuil d'expression critique de *spineless* dans les photorécepteurs R7 à une période précise du développement. Dans 70% des cas, le niveau d'expression de *spineless* dépasse ce seuil critique, induisant l'expression de l'opsine Rh4 par R7 et conduisant à une ommatidie y, tandis que dans 30% des cas, le niveau d'expression est insuffisant, ce qui conduit à l'expression de l'opsine Rh3 par R7, conduisant alors à une ommatidie p (**Figure**

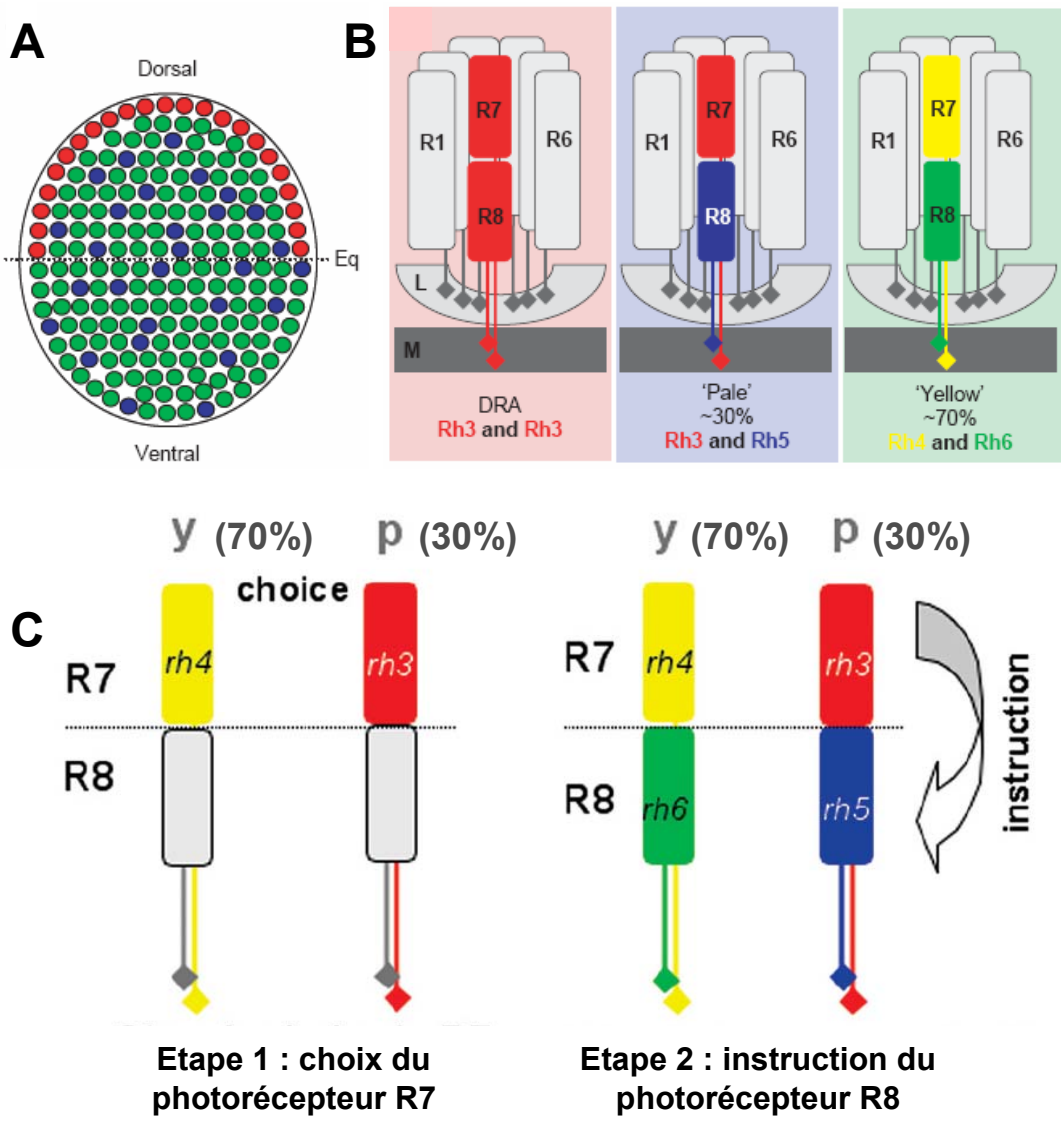


Fig. 12 : Mosaïque des ommatidies chez la drosophile (d'après Wernet et Desplan, 2004)

A : Représentation schématique de la rétine de drosophile. **B** : Représentation schématique des trois types d'ommatidies retrouvés chez la drosophile et se distinguant par les opsines exprimées par les photorécepteurs R7 et R8. La DRA (Dorsal Rim Area) est figurée en rouge. **C** : Détermination séquentielle des identités des photorécepteurs R7 et R8 dans les ommatidies y et p.

12.B). L'identité p ou y des cellules R8 est imposée secondairement par le photorécepteur R7 à l'intérieur de chaque ommatidie (**Figure 12.C** ; Wernet et Desplan, 2004 ; Wernet et coll., 2006).

C. Le poisson zèbre

Les avantages du poisson zèbre (*Danio rerio*) en génétique du développement des vertébrés sont multiples : progéniture importante, temps de génération relativement court, un embryon robuste, translucide et au développement externe rapide, facilitant son observation et sa manipulation. Les techniques utilisées pour l'analyse génétique comprennent une mutagenèse et un criblage des phénotypes à grande échelle et la possibilité de générer des individus haploïdes par parthénogenèse. De plus, la micro-injection d'acide nucléique, ADN, morpholinos (analogues synthétiques d'acide nucléique) ou ARN double brin, à une phase précoce du développement permet d'effectuer des expériences de gain et perte de fonction de gènes.

Mosaïque des cônes chez le poisson zèbre

Le poisson zèbre adulte présente quatre types de cônes d'effectifs proches, se distinguant par leur sensibilité spectrale (opsine exprimée) et leur morphologie : les cônes sensibles aux UV (opsine S) sont les plus courts, ceux sensibles à la lumière bleue (opsine M1) sont de longueur intermédiaire et ceux sensibles aux lumières verte et rouge (opsines M2 et L) sont les plus longs et sont fusionnés entre eux formant ainsi des cônes doubles. (Raymond et Barthel, 2004).

Comme chez d'autres poissons téléostéens, les cônes du poisson zèbre forment une mosaïque extrêmement régulière et précise (**Figure 13**). Les mécanismes contrôlant la mise en place de cette mosaïque sont encore peu connus mais un phénomène d'exclusion entre cellules

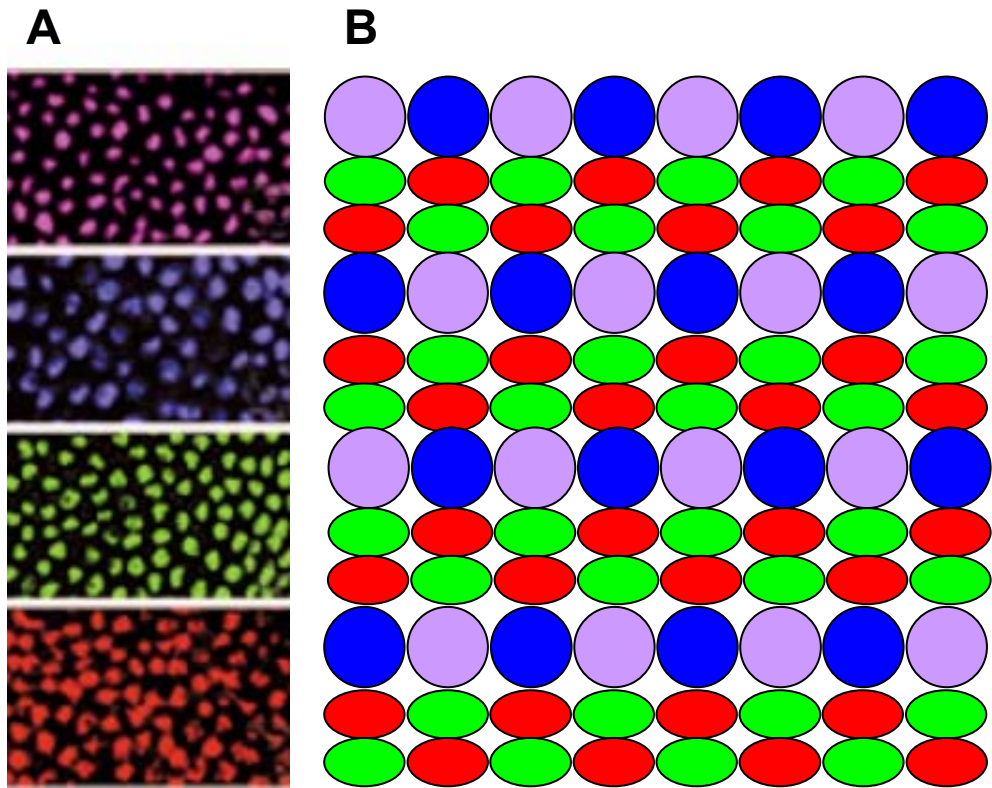


Fig. 13 : Mosaïque des cônes chez le poisson zèbre

A : Photographies des mosaïques formées par les cônes exprimant exclusivement chacune des quatre opsines (de haut en bas: S, M1, M2 et L ; Raymond et Barthel, 2004). **B** : Représentation schématique de la mosaïque des cônes chez le poisson zèbre.

homotypiques semble désormais écarté. L'hypothèse la plus vraisemblable est représenté dans un modèle où, suivant la vague de morphogenèse centro-périphérique, les premiers cônes à se différencier formeraient un réseau régulièrement espacé puis spécifieraient le destin cellulaire des cellules voisines via des interactions latérales. Ces cellules fondatrices, sans doute les cônes rouges, exerceraient un rôle comparable à celui qu'exercent les photorécepteurs R8 dans la formation des ommatidies chez la drosophile (Raymond et Barthel, 2004).

Génération et régénération de la rétine chez les poissons téléostéens

Une caractéristique des poissons téléostéens est la croissance continue de leur rétine tout au long de la vie. Les nouvelles cellules appartenant à tous les types rétiniens sont formées à partir de la zone marginale ciliaire, en périphérie de la rétine. La zone marginale ciliaire (**Figure 14**) présente la caractéristique remarquable d'être spatialement ordonnée par rapport aux stades de développement et de différenciation des cellules progénitrices : des cellules souches à la périphérie aux cellules bien spécifiées et ayant débuté leur différenciation en position centrale. Ce gradient spatial dans la zone marginale ciliaire récapitule la rétino-genèse, ce qui permet d'étudier la cinétique d'expression génique lors de ce processus.

Une autre particularité de la rétine chez les poissons téléostéens adultes est leur capacité de régénération des photorécepteurs après une lésion ou une perte naturelle. Ce phénomène de régénération est circonscrit à la zone de la lésion et ne fait pas intervenir la zone marginale ciliaire. La régénération des cônes peut être observée chez le poisson rouge (*Cariassus auratus*) après ablation au laser des photorécepteurs, et chez la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) après la perte des cônes sensibles aux UV lors de la smoltification, c'est-à-dire la métamorphose préparant le passage de l'eau douce à l'eau de mer, les cônes

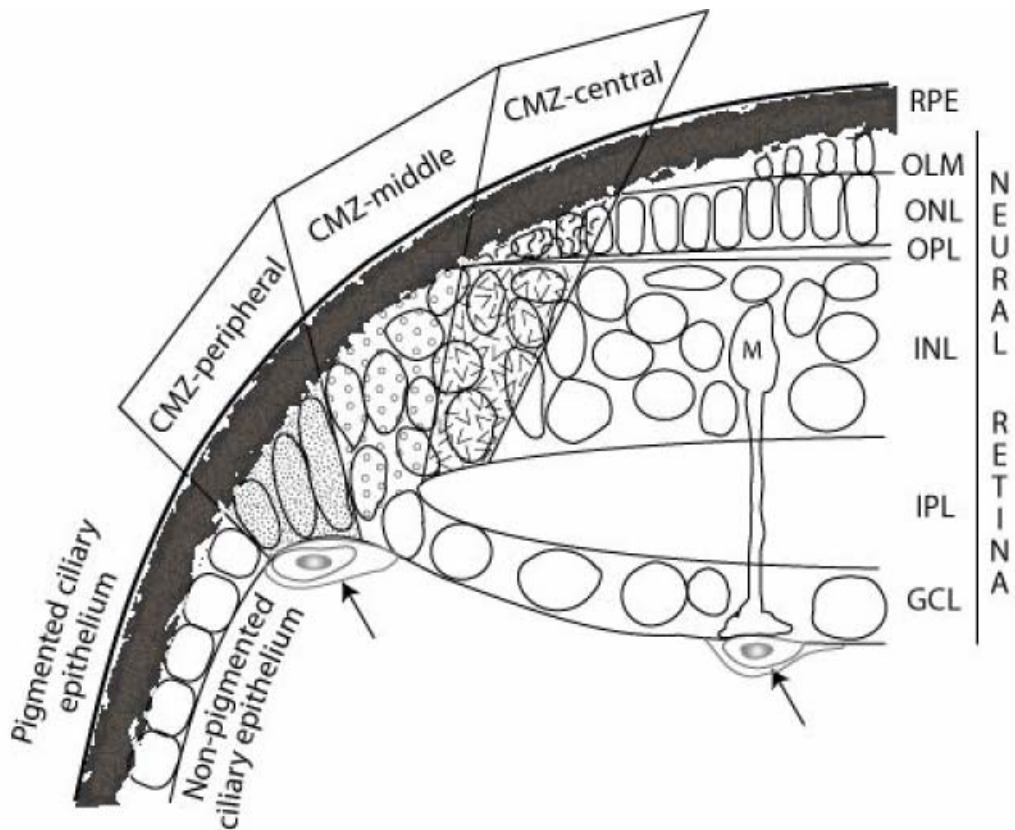


Fig. 14 : Zone marginale ciliaire de poisson zèbre (d'après Raymond et coll., 2006)

Illustration schématique de la zone marginale ciliaire (CMZ) de la rétine de poisson zèbre, divisée en trois régions : périphérique, médiane et centrale. RPE : épithélium pigmentaire rétinien, OLM : membrane limitante externe, ONL : couche nucléaire externe, OPL : couche plexiforme externe, INL : couche nucléaire interne, IPL : couche plexiforme interne, GCL : couche des cellules ganglionnaires, M : cellule gliale de Müller. Les flèches indiquent des vaisseaux sanguins.

ultraviolets étant régénérés lors du séjour en eau de mer (Wu et coll., 2001 ; Hawryshyn et coll., 2003). Les études chez le poisson rouge ont conduit à la mise en évidence de cellules souches localisées dans la couche nucléaire interne de la rétine et capables de régénérer les photorécepteurs à cônes (Wu et coll., 2001). L'existence de cellules souches dans la couche nucléaire interne semble être un phénomène propre aux poissons téléostéens.

Evolution de l'opsine du groupe L chez les cichlides du lac Victoria

L'étude du polymorphisme du gène de l'opsine de groupe L chez des cichlides du lac Victoria a permis la mise en évidence d'un phénomène de sélection naturelle divergente au niveau moléculaire (Terai et coll., 2006). La sélection naturelle divergente désigne une situation où la sélection favorise des phénotypes particuliers en fonction de l'environnement et est considérée comme un des principaux mécanismes de spéciation.

L'analyse du polymorphisme de la séquence codante du gène de l'opsine du groupe L chez plusieurs espèces de cichlides a permis d'identifier plusieurs allèles dont les produits présentent des maxima de sensibilité spectrale situés à différentes longueurs d'onde. La mesure des fréquences de ces allèles au sein des différentes colonies d'une même espèce, tel *Neochromis omnicaeruleus* (**Figure 15**), a permis de mettre en évidence une corrélation entre la proportion de certains allèles et le degré de transparence de l'eau. La turbidité de l'eau modifie la composition spectrale de la lumière transmise par celle-ci : alors qu'une eau claire laisse passer l'ensemble du spectre lumineux, une eau trouble absorbe préférentiellement les rayons de longueurs d'onde courtes ce qui conduit à une lumière transmise dont la composition spectrale est décalée vers les longueurs d'onde élevées. Les colonies vivant dans les zones de forte turbidité présentent une forte proportion de l'allèle codant pour l'opsine dont le maximum de sensibilité spectrale est situé à la longueur d'onde la plus élevée tandis que les colonies vivant dans les eaux les plus transparentes présentent une forte proportion de l'allèle



Fig. 15 : Mâle cichlide de l'espèce *Neochromis omnicaelureus* arborant sa robe nuptiale

codant pour l'opsine dont le maximum de sensibilité spectrale est situé à la longueur d'onde la plus courte (Terai et coll., 2006).

La couleur de la robe nuptiale des cichlides mâles constitue un critère important dans le choix du partenaire sexuel pour les femelles (Seehausen et coll., 1997). Terai et coll. ont aussi pu mettre en évidence que la fréquence de l'allèle codant pour l'opsine dont le maximum de sensibilité spectrale est situé à la longueur d'onde la plus élevée était corrélée à celle de poissons mâles présentant une robe nuptiale de couleur vive (jaune ou rouge) et inversement que la fréquence de l'allèle codant pour l'opsine dont le maximum de sensibilité spectrale est situé à la longueur d'onde la plus courte était corrélée à celle de poissons mâles présentant une robe nuptiale de couleur bleue (Terai et coll., 2006). Ces corrélations entre fréquences des différents allèles de l'opsine L, robe nuptiale des mâles et degré de transparence de l'eau indiquent que ce dernier paramètre influe simultanément sur la fonction visuelle et le choix des partenaires sexuels.

D'après ces travaux, la divergence du gène de l'opsine du groupe L et la fixation d'un allèle particulier au sein d'une colonie de cichlides est la conséquence d'une différence dans l'environnement lumineux. Cette divergence du gène de l'opsine L a très vraisemblablement pour conséquence une modification dans le choix des partenaires sexuels au sein de chaque colonie, conduisant à une divergence dans la coloration de la robe nuptiale des mâles. Cette sélection de la robe nuptiale des mâles constitue une conséquence secondaire de la sélection adaptative de l'opsine du groupe L et entraîne un isolement reproductif éthologique des colonies, c'est-à-dire un isolement basé sur le comportement sexuel des poissons, contribuant ainsi à la fixation des deux caractères (**Figure 16**).

Cette sélection des différents allèles du gène de l'opsine du groupe L en fonction de l'environnement constitue le premier exemple de sélection naturelle divergente mise en évidence au niveau moléculaire. L'influence de cette sélection sur le choix du partenaire

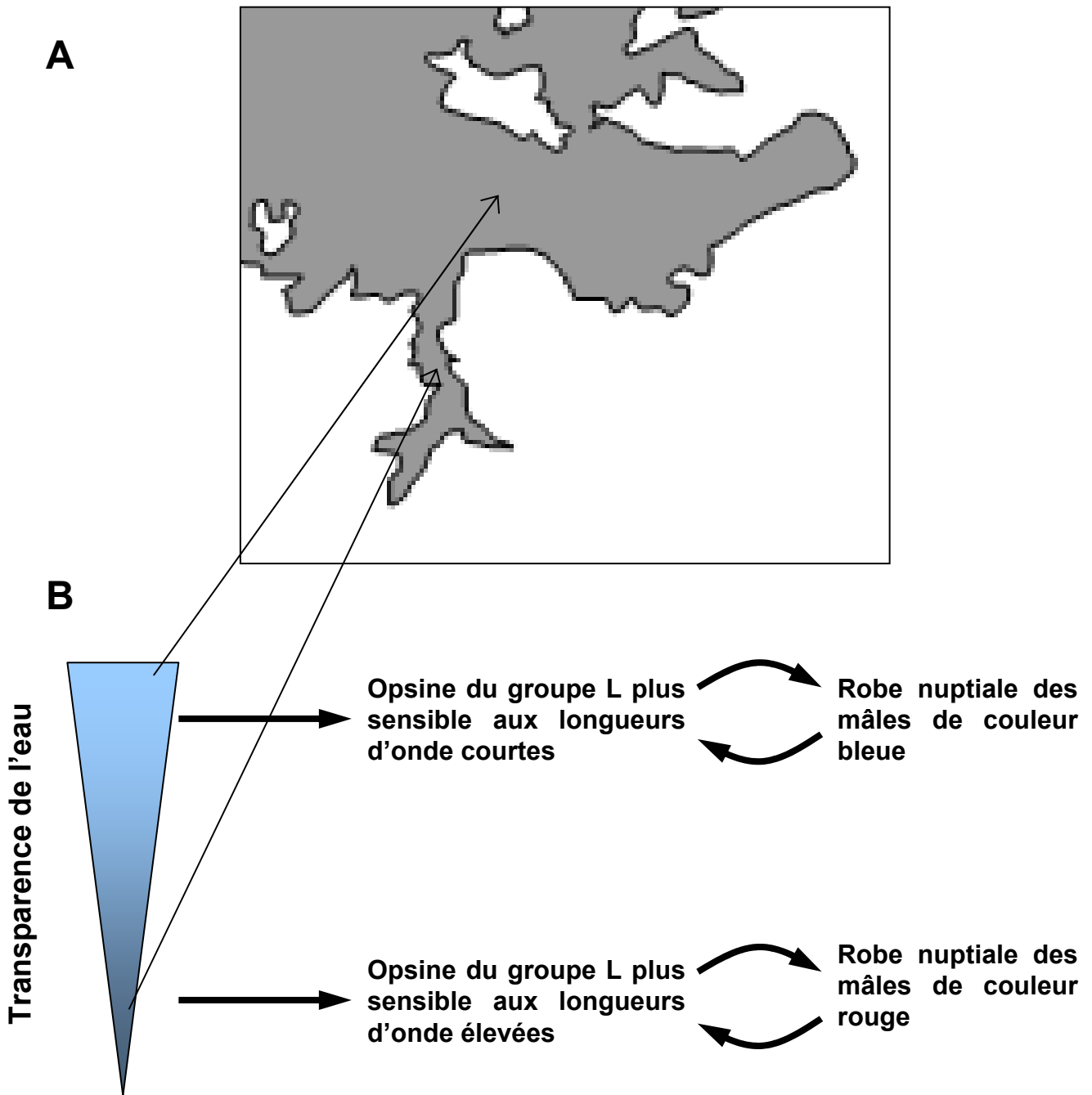


Fig. 16 : Illustration de l'influence de la turbidité de l'eau sur les caractères allèle de l'opsine du groupe L et robe nuptiale des mâles chez les cichlides

A : Carte de la région Sud-Est du lac Victoria. D'une manière générale, les zones proches du rivage présenteront une turbidité plus élevée que les zones éloignées du rivage. **B :** La transparence de l'eau au sein de laquelle vit une colonie de cichlides va exercer une pression sélective sur l'opsine du groupe L, les eaux les plus troubles favorisant l'allèle dont le produit possède un maxima de sensibilité spectrale située à la longueur d'onde la plus élevée. La sélection de cette allèle va favoriser le choix des mâles possédant une robe nuptiale de couleur rouge. Cette sélection sexuelle va conduire à un isolement sexuel des colonies contribuant à la fixation des deux caractères.

sexuel constitue une conséquence secondaire contribuant vraisemblablement à une spéciation sympatrique naissante, c'est-à-dire à l'apparition de nouvelles espèces sous l'action de la sélection naturelle.

D. Le xénope

Le xénope (*Xenopus laevis*) est communément utilisé en biologie du développement et ce depuis très longtemps. Son développement présente de nombreuses caractéristiques similaires à celles du poisson zèbre : progéniture nombreuse, développement externe et rapide, embryon robuste, non translucide mais de taille supérieure à celui du poisson zèbre. De plus, il est possible d'induire l'ovulation par simple injection d'hormones gonadotropiques, facilitant ainsi son élevage.

Si son temps de génération trop long et sa tétraploïdie pénalisent l'analyse génétique chez le xénope, des techniques de micro-injection et de transfection similaires à celles utilisées chez le poisson zèbre sont bien maîtrisées. Un avantage de la transgénèse chez le xénope par rapport au poisson zèbre est la possibilité d'intégrer le transgène dans le génome du gamète mâle avant fécondation, permettant la génération immédiate d'un individu entièrement transgénique.

Xenopus tropicalis constitue une espèce alternative de crapaud griffu permettant de mener des études de génétique "classique". Cette espèce présente en effet le double avantage d'être diploïde et d'avoir un temps de génération relativement court, environ trois mois contre plus d'un an pour *Xenopus laevis*.

La rétine du xénope

La rétine de xénope présente différentes caractéristiques en faisant un bon modèle pour l'étude de la rétino-genèse : son développement est très rapide, une rétine fonctionnelle

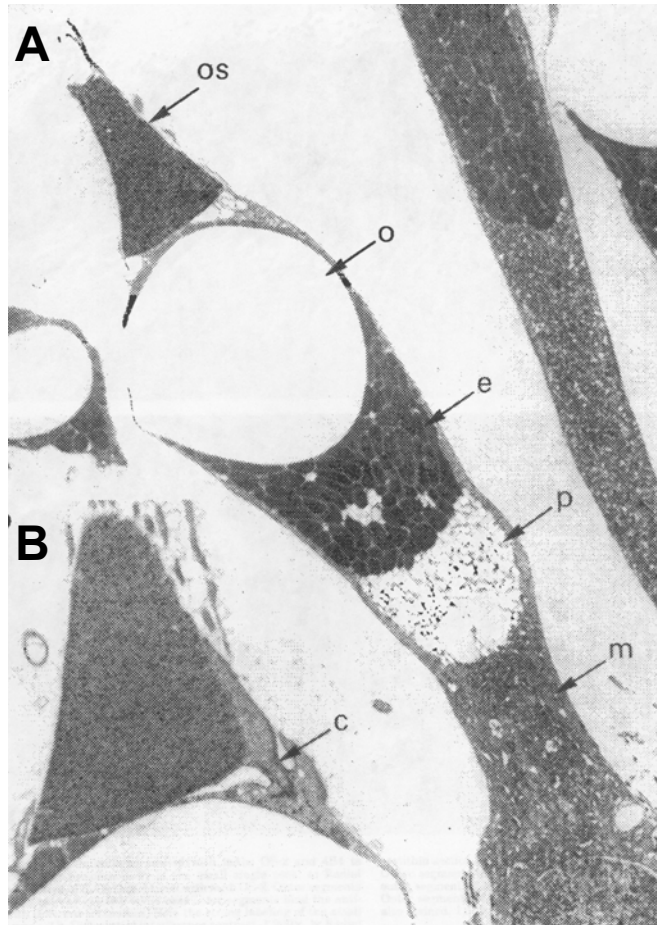


Fig. 17 : Photographie d'un photorécepteur à cône chez le xénope (Röhlich et Szèl, 2000)

A : Photographie des segments externe et interne d'un cône de type simple et de grande taille exprimant l'opsine du groupe L chez le xénope (grossissement 5.000X). **B** : Photographie du segment externe (grossissement 12.000X). OS : segment externe, O : gouttelette lipidique, E : ellipsoïde riche en mitochondries, P et M : parabolioïde et myoïde riches en réticulum endoplasmique, C : cil connectif.

est formée en 3-4 jours, et comme pour le poisson zèbre, cette rétine croit toute la vie avec une génération continue de cellules dans la zone marginale ciliaire (Perron et coll., 1998). De plus, les cônes exprimant l'opsine du groupe L sont particulièrement gros et bien adaptés aux études en biologie cellulaire et en physiologie (**Figure 17**).

L'identification des différents types de photorécepteurs et notamment des opsines exprimées chez le xénope est encore incertaine. En se basant sur leur morphologie et sur une panoplie incomplète d'anticorps, Röhlich et Szél ont identifié quatre types de cônes et deux types de bâtonnets dans la rétine du xénope, confirmant des données électrophysiologiques (Röhlich et Szél, 2000). Environ 45% des photorécepteurs sont des cônes, parmi eux, plus de 80% sont des cônes simples et de grande taille, exprimant l'opsine du groupe L, les autres cônes sont des cônes doubles exprimant l'opsine du groupe L, et des cônes simples de taille intermédiaire et petite. Les deux types de bâtonnets se distinguent d'abord par leur taille, les plus grands sont aussi les plus nombreux (plus de 95%) et seuls ceux-ci expriment la "vraie" rhodopsine (opsine du groupe Rh). La classification des photorécepteurs du xénope, comme celles d'autres amphibiens, constitue un exemple illustrant un aspect du débat actuel sur la distinction entre cônes et bâtonnets. Ainsi, il a été découvert récemment que l'opsine exprimée par la population minoritaire de bâtonnets (bâtonnets de taille réduite), appartient au groupe M1 (blue opsins ; **Tableau 1**), alors que, outre leur morphologie, les données électrophysiologiques les définissent aussi comme des bâtonnets (Darden et coll., 2003). Cette ambiguïté est à rapprocher du cas de la salamandre tigrée (*Ambystoma tigrinum*) qui présente des cônes et des bâtonnets exprimant la même opsine du groupe M1. Les bâtonnets M1 de la salamandre sont reconnus comme tels grâce à leur morphologie, à l'expression de la sous-unité α de la transducine (un membre de la cascade de phototransduction) spécifique des bâtonnets et à des caractéristiques électrophysiologiques propres aux bâtonnets (**Figure 18**;

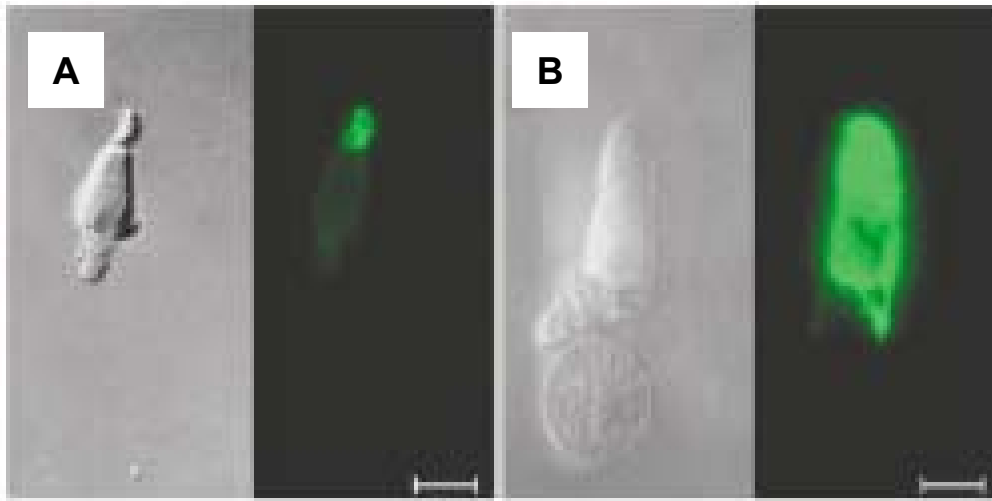


Fig. 18 : Photographies de photorécepteurs à cône (A) et à bâtonnet (B) exprimant l'opsine du groupe M1 chez la salamandre (Ma et coll., 2001)

Photographies en contraste de phase et marquages de l'opsine du groupe M1 (en vert) d'un cône et d'un bâtonnet isolés de la salamandre tigrée. Barres d'échelle = 100 μm .

Ma et coll., 2001). Contrairement à la salamandre, le xénope ne possède pas de cône exprimant l'opsine M1.

Une différence importante entre les rétines du xénope et du poisson zèbre porte sur la mosaïque des cônes : l'examen de la mosaïque des cônes rouges chez le xénope montre une répartition pan-rétinienne homogène mais imprécise, différente de celle hautement régulière du poisson zèbre (Chang et Harris, 1998).

La transgénèse comme méthode d'étude de la rétine

Avec le développement de techniques permettant de produire rapidement et à grande échelle des embryons transgéniques, il est possible, en utilisant le promoteur adéquat, de cibler l'expression d'un gène dans un tissu ou un type cellulaire particulier. La transgénèse a été utilisée pour étudier différents aspects du développement et de la fonction de la rétine (Hutcheson et Vetter, 2002).

Les promoteurs de plusieurs gènes exprimés spécifiquement par les photorécepteurs ont été analysés : promoteurs de la rhodopsine pour les bâtonnets et de l'opsine du groupe L pour les cônes (Knox et coll., 1998 ; Babu et coll., 2006). Babu et coll. ont pu identifier une séquence du promoteur de l'opsine rouge conservée chez les autres tétrapodes et restreignant l'expression du transgène aux cônes. Des recherches comparatives ont démontré l'existence d'un haut degré de conservation des éléments de régulation transcriptionnelle entre espèces, comme ceux du promoteur de la rhodopsine (Whitaker et Knox, 2004). L'utilisation de la transgénèse chez le xénope devrait donc devenir une méthode d'analyse rapide des promoteurs mammaliens.

En plus de l'étude des mécanismes de contrôle de l'expression tissulaire, l'identification d'un promoteur spécifique permet le ciblage de transgènes dans un tissu particulier, comme dans le

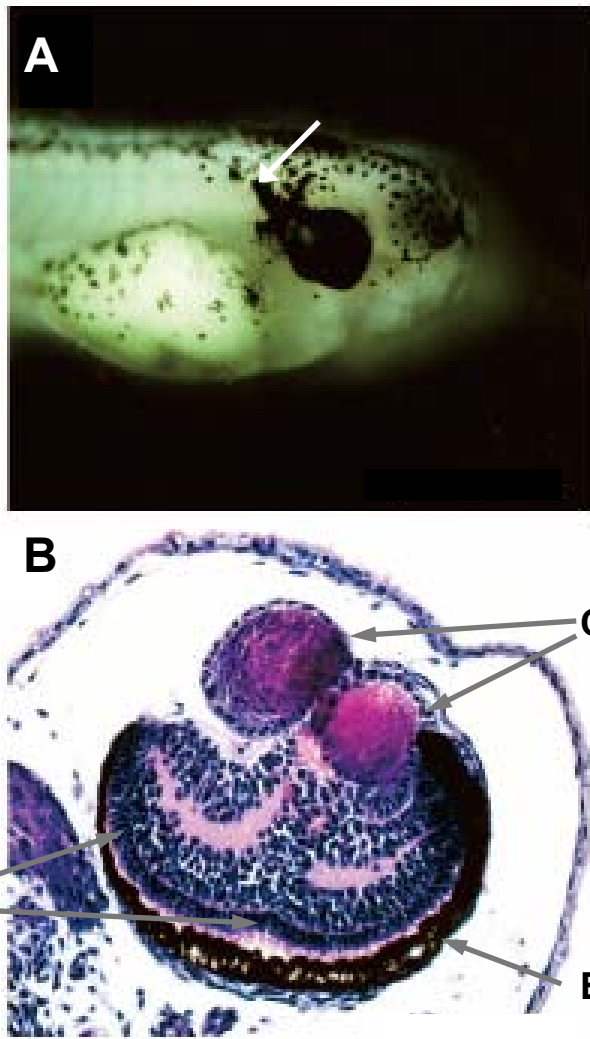


Fig. 19 : Induction par *Eyeless* d'un œil ectopique chez le xénope (Onuma et coll., 2002)

A : Têtard injecté avec l'ARNm *Eyeless* montrant l'expansion de l'épithélium pigmentaire rétinien (flèche blanche). **B :** Section d'un têtard injecté avec l'ARNm *Eyeless* et montrant la duplication de la rétine (R) et du cristallin (C) et l'expansion de l'épithélium pigmentaire rétinien (E).

cas du promoteur de la rhodopsine. L'expression par les bâtonnets d'une protéine de fusion composée de la GFP et de différents fragments de la rhodopsine a conduit à l'identification de la séquence peptidique signal contrôlant la localisation de la rhodopsine dans les segments externes (Tam et coll., 2000 ; Moritz et coll., 2001).

La transgénèse a aussi servi à l'étude de la phototransduction : des animaux exprimant de manière ectopique les orthologues humains de l'opsine rouge dans les bâtonnets et de la rhodopsine dans les cônes ont permis de démontrer qu'une cause majeure de la différence de photosensibilité entre cône et bâtonnet était la fréquence élevée d'isomérisation spontanée du chromophore associé au pigment visuel rouge, ayant pour conséquence une photosensibilité moindre des photorécepteurs à cône (Kefalov et coll., 2003).

Techniques de micro-injection dans l'étude de la rétine

Les techniques d'injection de plasmides, d'ARNm et de morpholinos permettent la surexpression ou l'inhibition d'un gène à un stade précis du développement embryonnaire. La micro-injection est réservée aux stades les plus précoces du développement et permet de cibler grossièrement la rétine si elle est réalisée dans la région dorsale de l'embryon. La transfection, notamment par lipofection, permet l'introduction d'une construction à un stade plus tardif et le ciblage d'une région plus précise (Ohnuma et coll., 2002).

C'est la micro-injection au stade 16 cellules d'ARNm codant pour *Pax 6* ou de ses orthologues drosophiliens *eyeless* et *twin of eyeless* qui a permis d'induire la formation d'yeux ectopiques complets chez le xénope (**Figure 19** ; Chow et coll., 1999 ; Onuma et coll., 2002).

Les techniques d'injection ont aussi permis d'étudier des facteurs de transcription impliqués dans le développement des photorécepteurs tels *XOtx2* et *XOtx5b* (Vicgian et coll., 2003). Ainsi, Vicgian et coll. ont démontré que l'expression de *XOtx5b*, l'orthologue de CRX chez la souris, induisait la différenciation des cellules progénitrices rétiniennes en photorécepteurs

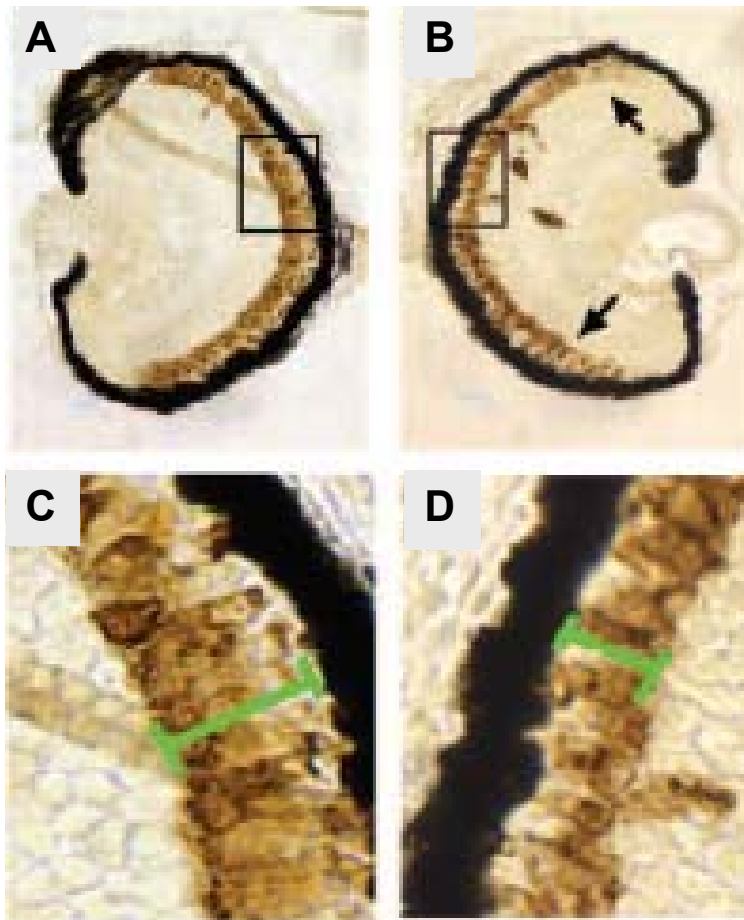


Fig. 20 : Inhibition du facteur de transcription Rx-L suite à l'injection d'un morpholino dirigé contre son ARNm (Pan et coll., 2006)

Coupes d'yeux injectés ou non avec un morpholino dirigé contre l'ARNm de Rx-L et marqué avec un anticorps dirigé contre la rhodopsine. **A** : Œil témoin non injecté. **B** : Œil injecté, les flèches indiquent des zones où le marquage de la rhodopsine est nettement réduit. **C** : Grossissement des segments externes de l'œil non injecté. **D** : Grossissement des segments externes de l'œil injecté. Ceux-ci présentent une longueur réduite d'environ 30% par rapport à ceux de l'œil non injecté.

tandis que la co-expression de XOt2 et XOt5b favorisait la différenciation en cellules bipolaires. L'utilisation d'ARNm codant pour des protéines chimériques dérivées de XOt2 et XOt5b a aussi permis de démontrer que l'activité de spécification cellulaire de ces deux facteurs dépendait de leur région C-terminale.

La micro-injection de morpholinos a aussi été utilisée avec succès dans l'étude de la rétino-genèse chez le xénope. Par rapport aux autres oligonucléotides utilisés dans les stratégies anti-sens, les morpholinos présentent une plus grande stabilité et une résistance aux nucléases leur permettant de persister plus longtemps après injection, ils possèdent aussi une meilleure spécificité et une toxicité moindre.

Des morpholinos ont été utilisés pour étudier le facteur de transcription Rx-L (Retinal Homeobox-Like), facteur exprimé dans la zone marginale ciliaire et par les photorécepteurs en cours de développement (Pan et coll., 2006). L'injection d'un morpholino dirigé contre Rx-L dans un blastomère dorsal au stade 4 cellules permet de réduire à un niveau indétectable l'expression de la protéine Rx-L exprimée normalement 48 heures après fécondation. La rétine développée après inactivation de Rx-L possède une structure normale mais ses photorécepteurs présentent un segment externe de longueur réduite (**Figure 20**) et une forte diminution de l'expression de la rhodopsine et de l'opsine du groupe L, démontrant que ce facteur est nécessaire à la maturation des photorécepteurs mais non à leur spécification (Pan et coll., 2006). L'utilisation de morpholinos à un stade précoce du développement permet donc une inactivation complète d'un gène exprimé tardivement par l'ensemble des cellules issues du blastomère injecté.

Les résultats de ces différents travaux démontrent que les techniques de transgenèse et d'injection ont permis de transformer un modèle essentiellement non-génétique en un puissant outil d'analyse et de manipulation des gènes.

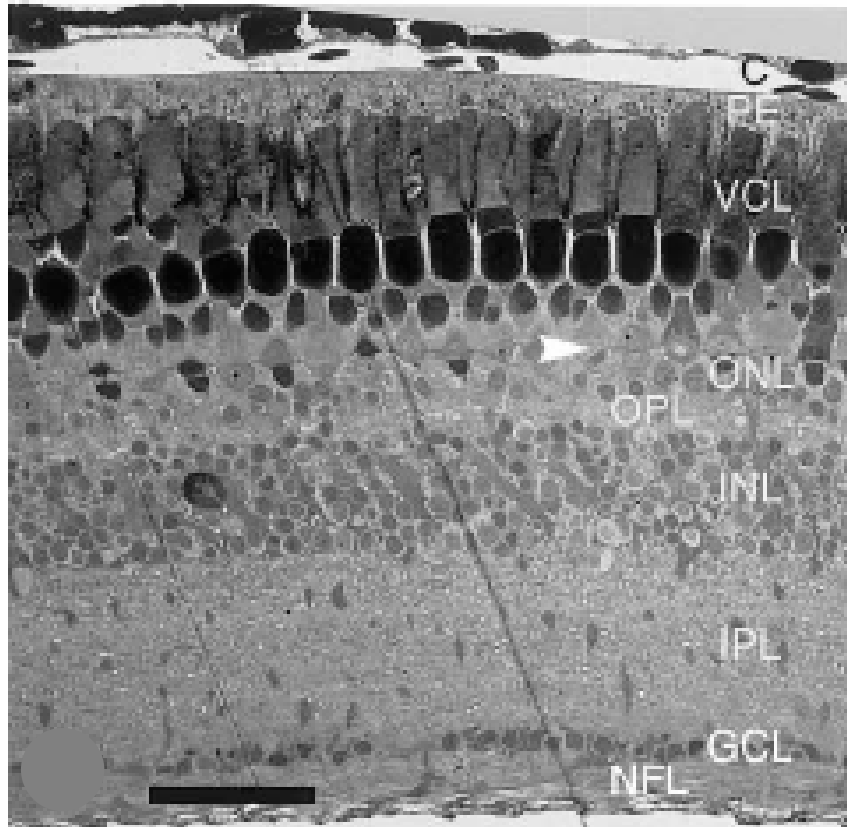


Fig. 21 : Coupe longitudinale de la rétine du gecko *Ailuronyx seychellensis* (Röll, 2001)

Bien qu'appartenant à une espèce au mode de vie crépusculaire, cette rétine est dépourvue de bâtonnets. L'identification formelle des cônes est permise par la présence d'une gouttelette lipidique à la base de leur segment externe. C : choroïde, PE : épithélium pigmentaire rétinien, VCL : couche des segments externes, ONL : couche nucléaire externe, OPL : couche plexiforme externe, INL : couche nucléaire interne, IPL : couche plexiforme interne, GCL : couche des cellules ganglionnaires, NFL : couche des fibres ganglionnaires. Le flèche indique la membrane limitante externe. Barre d'échelle = 50 μ m.

E. Les sauropsidés

Les cônes des sauropsidés actuels (reptiles et oiseaux) présentent une grande variété de morphologies (cônes double ou simple, longueur variable), de gouttelettes lipidiques et de pigments visuels. Cette diversité reflète vraisemblablement une histoire évolutive dominée par des modes de vie diurnes basés sur une vision photopique développée. L'examen de certaines espèces permet d'illustrer la remarquable diversité de l'organisation des photorécepteurs chez les vertébrés.

Absence de bâtonnets chez les geckos

Chez les geckos, la prédation est essentiellement basée sur la vision, que ce soit chez les espèces nocturnes ou diurnes. Or, comme de nombreux autres lézards, la rétine des geckos est composée exclusivement de cônes et n'exprime pas la rhodopsine (opsine du groupe Rh ; Röll, 2000). Cette absence de bâtonnets est vraisemblablement la conséquence d'une activité exclusivement diurne d'un ancêtre commun. L'adaptation de la rétine des geckos nocturnes à la vision scotopique résulte notamment d'une augmentation de la photosensibilité et de la perte des gouttelettes lipidiques chez les cônes de ces espèces. L'absence de gouttelette indique aussi une diminution de l'importance de la vision chromatique dans la prédation. De plus, une fovéa souvent retrouvée chez les espèces diurnes est systématiquement absente chez les espèces nocturnes (Röll, 2001).

Les espèces nocturnes de gecko constituent un exemple d'évolution de la rétine inattendu et illustrent les ambiguïtés pouvant exister entre cônes et bâtonnets. Ainsi, bien que permettant une vision scotopique, les photorécepteurs de ces espèces nocturnes n'expriment pas la rhodopsine et présentent un segment externe avec une morphologie de cône (**Figure 21**).

Le poulet

L'utilisation du poulet (*Gallus gallus*) comme modèle dans l'étude du développement embryonnaire est extrêmement ancienne, des descriptions ayant été effectuées dès l'Antiquité par Aristote. Au cours du XVIII^{ème} siècle, ce fut l'observation du développement de l'œuf de poule qui permit de trancher entre les théories de la préformation (les organes sont formés dès le début du développement) et de l'épigenèse (les nouvelles structures apparaissent progressivement). Aujourd'hui encore, l'embryon de poulet reste un modèle incontournable en biologie du développement.

Le poulet présente de multiples avantages en embryologie : son embryon est facile d'accès, robuste et permet des expérimentations *in ovo*. Son développement est plus lent que celui du xénope mais il atteint une taille supérieure facilitant sa manipulation et fournissant une importante quantité de matériel, permettant notamment de développer des modèles de culture cellulaire. Les techniques utilisées vont de la microchirurgie associée aux greffes à la transgénèse par électroporation, lipofection ou utilisation du vecteur rétroviral RCAS (Replication Competent Avian sarcoma-leukosis virus (ASVL) LTR with Splice acceptor ; <http://www.retrovirus.info/RCAS/index.html>).

Chez le poulet, la rétinogénèse débute dès le troisième jour de développement embryonnaire (E3) pour donner une rétine mature à E18. La prolifération cellulaire s'étale de E3 à E8 environ mais l'expression des différentes opsines ne débute pas avant E14 pour celles des groupes L et M2 et encore plus tard pour les autres. Les différents événements de la rétinogénèse procèdent selon un gradient centro-périphérique et débutent au niveau de l'area centralis avant de s'étendre à la rétine périphérique. L'area centralis correspond à une région spécialisée de la rétine, elle est destinée à la vision fine et présente une forte concentration de cônes et de leurs cellules bipolaires et ganglionnaires associées (Bruhn et Cepko, 1996).

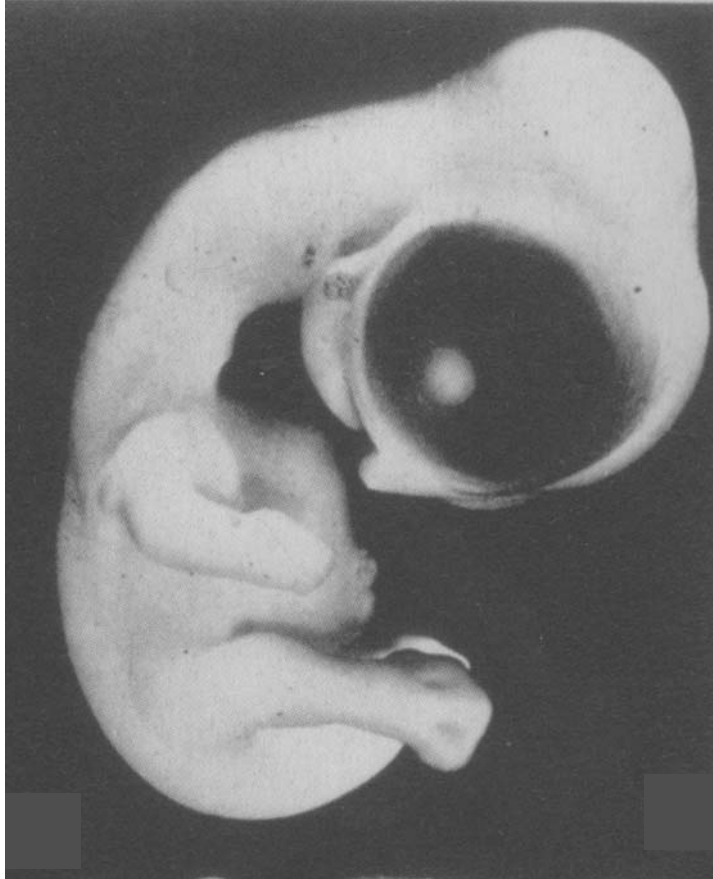


Fig. 22 : Embryon de poulet âgé de 7 jours
(Hamburger et Hamilton, 1951)

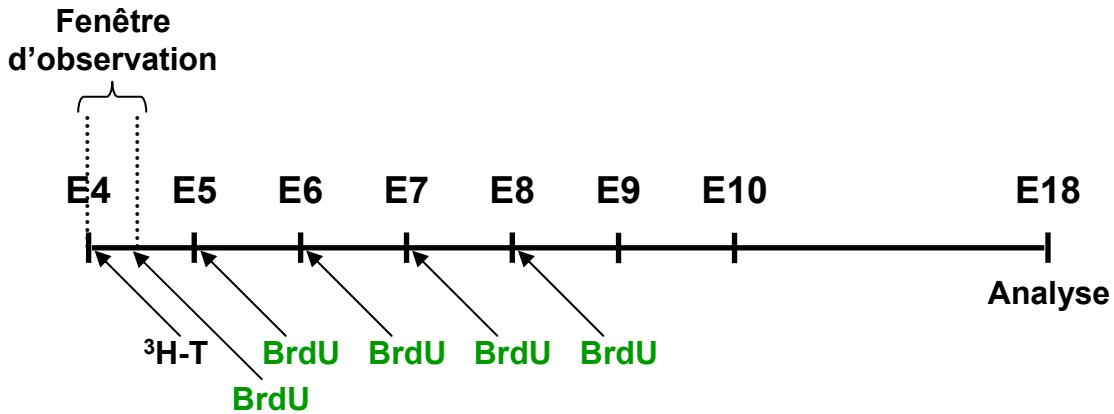
Plutôt qu'une area centralis et contrairement au poulet, la majorité des oiseaux possède une fovéa, structure présentant un degré de spécialisation supérieur.

Quatre opsines de cône, appartenant aux quatre groupes, sont exprimées par une rétine dominée par les cônes. L'examen par hybridation *in situ*, de l'expression des opsines des quatre groupes (**Tableau 1**) montre que l'abondance relative des différents types de cônes varie, les plus nombreux étant ceux exprimant l'opsine L, suivis de ceux du groupe M2, puis du groupe M1 et du groupe S pour les moins nombreux. Ces différents cônes sont répartis de manière homogène à travers toute la rétine mais ne forment pas une mosaïque régulière comme celle observée chez le poisson zèbre. Les bâtonnets présentent une distribution particulière : présents dans toute la rétine à l'exception de l'area centralis, ils sont distribués selon un gradient ventro-dorsal (Bruhn et Cepko, 1996).

La rétine de poulet est un modèle très utilisé en culture cellulaire. En effet, les structures oculaires atteignent vite une taille considérable, permettant de disposer d'une grande quantité de matériel cellulaire (**Figure 22**). Ces cultures cellulaires permettent d'étudier l'effet de l'environnement sur la différenciation des cellules progénitrices.

La phase de prolifération dans la rétinogenèse est beaucoup plus courte chez le poulet que chez la souris, rendant plus ardue la détermination de la chronologie de la différenciation (ordre de naissance des différents types cellulaires) par la technique classique d'autoradiographie après injection de thymidine radioactive (Kahn, 1974). Une variante de cette technique appliquée au poulet et consistant à injecter dans un premier temps la thymidine radioactive puis quelques heures plus tard du BrdU (Bromo-deoxyUridine) permet de créer une fenêtre d'observation (window-labeling) durant laquelle les cellules sortant du cycle mitotique n'ont incorporé que la thymidine radioactive (**Figure 23**). Cette technique a

A : Protocole de double marquage $^3\text{H-T}$ -BrdU



B : Marquages observés

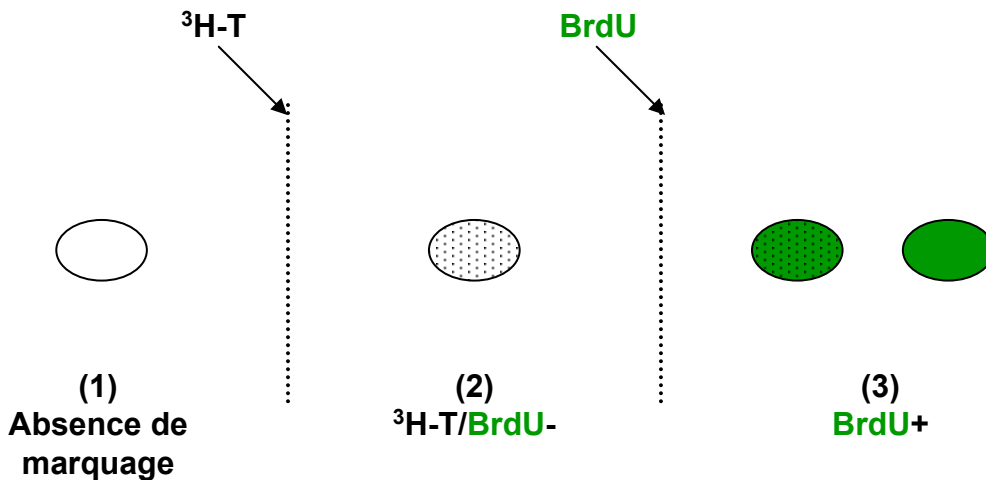


Fig. 23 : Protocole du double marquage $^3\text{H-T}$ -BrdU (Belecky-Adams et coll., 1996)

A : L'injection de thymidine radioactive ($^3\text{H-T}$) est suivie après 5 heures d'une injection de BrdU, injection répétée à plusieurs reprises pour maintenir la disponibilité du BrdU. La période séparant l'injection de la thymidine radioactive et la 1^o injection de BrdU correspond à la fenêtre d'observation. **B** : Représentation des types de marquages observés après le double marquage $^3\text{H-T}$ -BrdU. Les cellules étant sorties du cycle mitotique avant l'injection de la thymidine radioactive sont non marquées (1), les cellules subissant leur dernière phase S après l'injection de la thymidine radioactive et avant la première injection de BrdU, c'est-à-dire durant la fenêtre d'observation, seront marquées uniquement avec la thymidine radioactive (2), et les cellules subissant leur dernière phase S après la première injection de BrdU seront marquées soit uniquement avec le BrdU, soit avec le BrdU et avec la thymidine radioactive (3)

permis de démontrer que, à l'instar des mammifères, les périodes de génération des différents types cellulaires se chevauchent chez le poulet (Belecky-Adams et coll., 1996 ; Adler, 2000).

Combinée à la culture cellulaire, cette technique générant une fenêtre d'observation des cellules post-mitotiques a permis d'étudier l'influence de l'environnement sur le devenir cellulaire. Elle a notamment permis de démontrer que le devenir cellulaire des cellules progénitrices rétiniennes était déterminé de manière post-mitotique : les cellules post-mitotiques ont été définies *in ovo* par la technique de double injection au stade E4, l'embryon est ensuite sacrifié soit immédiatement soit 3 jours après la 2^{ème} injection et les cellules rétiniennes mises en culture à faible densité. Alors que les cellules post-mitotiques isolées et mises en culture juste après le double marquage génèrent essentiellement des photorécepteurs, celles isolées 3 jours après le double marquage génèrent les divers types cellulaires rétiniens d'une manière similaire à leur devenir *in vivo*, démontrant l'influence de l'environnement dans la détermination du devenir cellulaire (Belecky-Adams et coll., 1996).

Les difficultés à identifier et surtout purifier *in vitro* les différents sous-types neuronaux et gliaux constituent une des principales limites dans l'étude des cellules du système nerveux central. Différentes méthodes ont été mises au point et permettent d'obtenir facilement des cultures primaires fortement enrichies en photorécepteurs à partir d'embryon de poulet. L'utilisation de drogues n'affectant pas les photorécepteurs et permettant l'élimination spécifique des autres neurones a constitué une première technique permettant d'obtenir une culture enrichie en photorécepteurs (Politi et Adler, 1986). Une seconde technique consiste à établir une culture primaire à partir de cellules rétiniennes isolées à un stade assez précoce (E6). *In vitro* et en l'absence de signaux de différenciation, ces cellules progénitrices précoces se différencient préférentiellement en photorécepteurs, produisant des cultures enrichies à 70% en cônes chez le poulet (Adler et Hatlee, 1989).

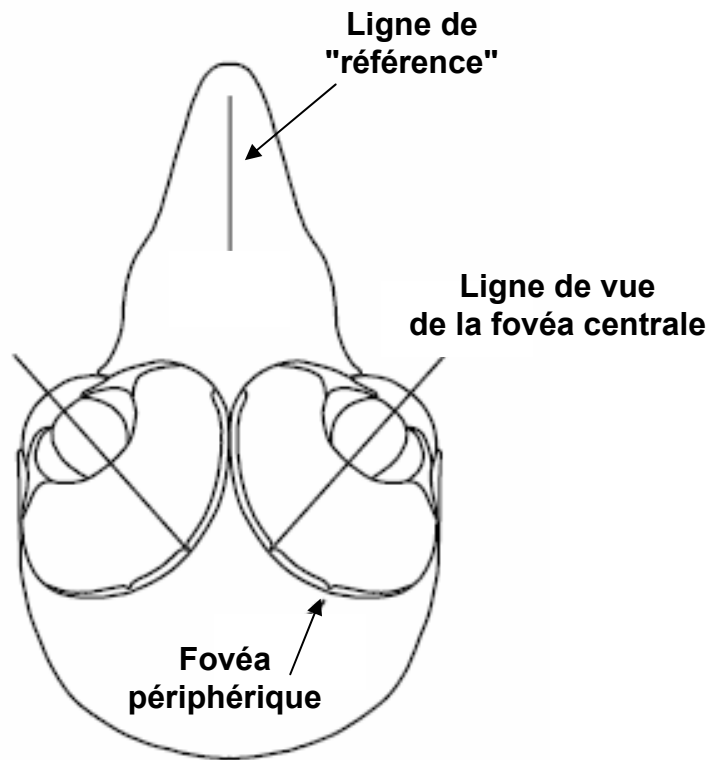


Fig. 24 : Section frontale d'une tête "type" de rapace (d'après Tucker, 2000)

La disponibilité de cultures enrichies en cônes permet des études complémentaires à celles effectuées chez la souris, dont la rétine est largement dominée par les bâtonnets (plus de 95%). Notre laboratoire a utilisé ce modèle de culture dans la recherche de facteurs favorisant la survie des cônes. Le criblage d'une banque d'expression d'ADNc a ainsi permis l'identification d'un facteur de survie des cônes : RdCVF (Rod-derived Cone Viability Factor ; Léveillard et coll., 2004).

Deux fovéas dans la même rétine

Fovéa et area centralis constituent toutes deux des régions de la rétine destinées à la vision fine, cependant la fovéa présente un degré de spécialisation supérieur : il s'agit d'une dépression de la rétine avasculaire, réduite à la seule couche des photorécepteurs et constituée le plus souvent uniquement de cônes. L'absence des couches internes de la rétine et de vaisseaux sanguins a pour conséquence une réduction de la dispersion de la lumière traversant la rétine, limitant la dégradation de l'image. Généralement, les espèces disposant de fovéas n'en possèdent qu'une par œil, située en position centrale dans l'axe optique, cependant, les rétines de plusieurs espèces aviaires, notamment les oiseaux de proie, contiennent deux fovéas : centrale et périphérique (**Figure 24** ; Tucker, 2000). La fovéa centrale, située au centre du fond d'œil, sert à la vision panoramique, tandis que la fovéa périphérique, située dans la région temporale, permet une vision binoculaire. Combinées à d'autres caractéristiques, notamment une rétine en grande partie avasculaire, ces deux fovéas font de ces systèmes visuels aviaires les plus performants des vertébrés et pourraient constituer un modèle pour l'étude du développement de la fovéa.

F. Les mammifères

Les mammifères forment le groupe dont les rétines et les populations de photorécepteurs ont été les mieux étudiées du point de vue histologique. Une caractéristique commune à l'ensemble des mammifères est la perte des opsines de cônes des groupes M1 et M2. Cependant, les photorécepteurs des mammifères non-euthériens (monotrèmes et marsupiaux) présentent des traits semblables à ceux des sauropsidés : présence de cônes doubles et de gouttelettes lipidiques.

Evolution des opsines chez les mammifères

L'absence des opsines des groupes M1 et M2 chez l'ensemble des mammifères reflète vraisemblablement l'existence d'un ancêtre commun possédant un mode de vie nocturne et ne nécessitant pas une vision chromatique élaborée. Le métabolisme et l'activité d'une majorité des reptiles (hétérothermes) et des oiseaux (endothermes mais de température interne élevée) dépendent d'une température minimale, favorisant un mode de vie diurne chez ces espèces. La pression sélective exercée par les sauropsidés diurnes contemporains à l'apparition des mammifères, combinée à une endothermie performante, ont vraisemblablement favorisé l'adoption d'un mode de vie nocturne par les mammifères primitifs ainsi que le développement de la vision scotopique. La "catastrophe" ayant conduit à la disparition des dinosaures a ensuite permis aux mammifères de coloniser les niches écologiques diurnes libérées.

En fait, la conservation de deux opsines de cônes est le minimum nécessaire au maintien d'une vision chromatique, de plus, en conservant les opsines des groupes S et L dont les maxima de sensibilité spectrale sont situés aux extrémités du spectre visible, plutôt que celles des groupes M1 et M2, la vision photopique préservée présente la plus large sensibilité spectrale possible.

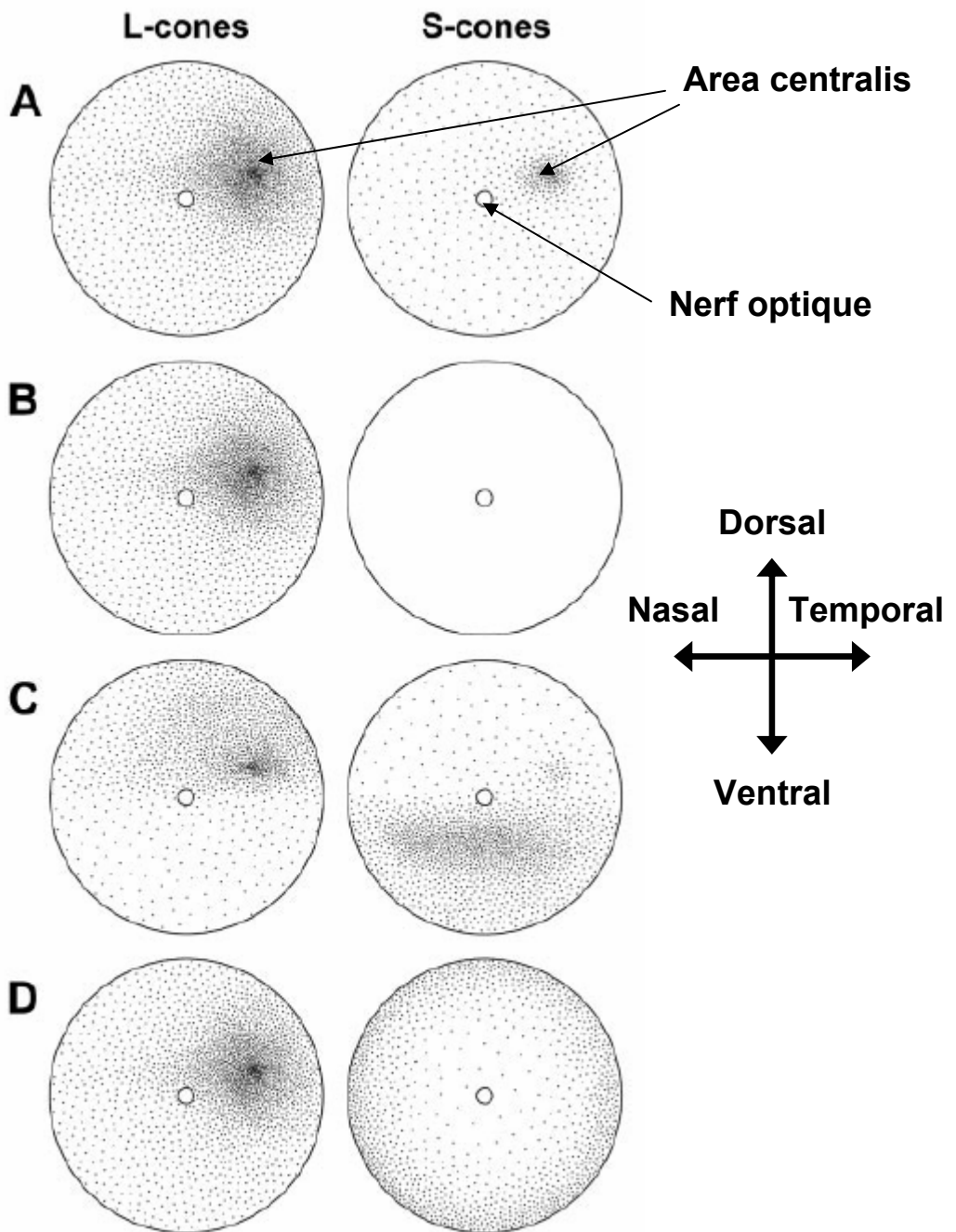


Fig. 25 : Représentations schématiques de différentes mosaïques de cônes chez les mammifères (d'après Peichl., 2002)

A : Rétine type de mammifère euthériens, avec un gradient de cônes centro-périphérique centrée sur une area centralis et une proportion réduite de cônes exprimant l'opsine du groupe S. **B** : Rétine type de mammifères aquatiques avec une absence de cônes exprimant l'opsine du groupe S. **C** : Régionalisation des cônes selon des gradients dorso-ventraux observées chez certains mammifères dont de nombreux rongeurs. **D** : Régionalisation originale observée chez certains primates et marsupiaux, les cônes exprimant l'opsine du groupe S sont répartis selon un gradient centro-périphérique inversé.

Rétine type des mammifères euthériens

Bien que les mammifères euthériens (placentaires) présentent une très grande diversité de mosaïques des photorécepteurs, il est possible de retenir quelques caractéristiques communes à la majorité d'entre eux (**Figure 25.A**) :

- une rétine dominée par les bâtonnets
- la proportion des cônes est corrélée au mode de vie, elle va de 0,5% chez certaines espèces exclusivement nocturnes à plus de 10% chez des espèces diurnes
- présence de deux opsines de cône des groupes S et L
- les cônes rouges (opsine du groupe L) forment la majorité des cônes : 85-95% contre 5-15% pour les cônes bleus (opsine du groupe S)
- cônes et bâtonnets forment un gradient de densité centro-périphérique, partant de l'area centralis (localisée dans la région dorso-temporale) et coïncidant avec un gradient de densité des cellules ganglionnaires
- chez la plupart des mammifères, la vision fine est dépendante d'une région présentant une forte densité de cônes et pouvant prendre plusieurs formes : area centralis, "bande visuelle" (visual streak) et, seulement pour certains primates, une fovéa

Cette rétine type souffre de nombreuses exceptions touchant différents aspects de la mosaïque. En voici quelques exemples :

Rétine dominée par les cônes

Deux groupes de mammifères présentent une rétine dominée par les cônes : les toupayes (ordre des scadentiens, un groupe d'insectivores arboricoles) et les écureuils (ordre des rongeurs, famille des sciuridés). Il est aussi possible d'associer à ces deux groupes les primates disposant d'une fovéa, c'est-à-dire d'une région de la rétine constituée

exclusivement de cônes. Cette rétine dominée par les cônes correspond sans doute à l'adaptation au mode de vie arboricole et diurne par de nombreux membres de ces groupes, bien que plusieurs espèces d'écureuil soient essentiellement terrestres : évoluer dans un milieu tridimensionnel, notamment par saltation, requiert une forte acuité visuelle.

Monochromatisme

Il existe différents mammifères dont la rétine n'exprime pas l'opsine du groupe S et ne possède que des cônes rouges. Ces espèces monochromates sont issues de groupes extrêmement divers : primates, carnivores, les rongeurs étant les plus nombreux. Cette diversité et l'isolement de ces espèces au sein de leur phylum indiquent que la perte d'opsine bleue a eu lieu à plusieurs reprises et de manière indépendante. Ces espèces ont en commun un mode de vie nocturne et la perte de la vision chromatique ne semble pas pénaliser leur survie (Peichl, 2005). Il n'existe aucun exemple de rétine dépourvue d'opsine rouge et ne présentant que des cônes bleus.

Si l'absence de cônes bleus chez les mammifères terrestres est une exception, chez les mammifères marins, tels les phoques ou les otaries, il s'agit de la règle. C'est le cas de l'ordre des cétacés et des membres marins de l'ordre des carnivores. Cette absence de cônes bleus dans deux groupes distants pourrait correspondre à une convergence évolutive : l'œil de mammifère n'est pas adapté à la vie aquatique et la perte des cônes bleus serait une adaptation à ce milieu. Une hypothèse formulée est que l'aberration chromatique générée par la réfraction de la lumière bleue par la lentille (les rayons de longueurs d'onde courtes produits lors la réfraction de la lumière par la lentille ne convergent pas parfaitement au niveau de la rétine) est amplifiée sous l'eau et la perte des cônes bleus supprimerait les effets de cette aberration chromatique (Newman et Robinson, 2005).

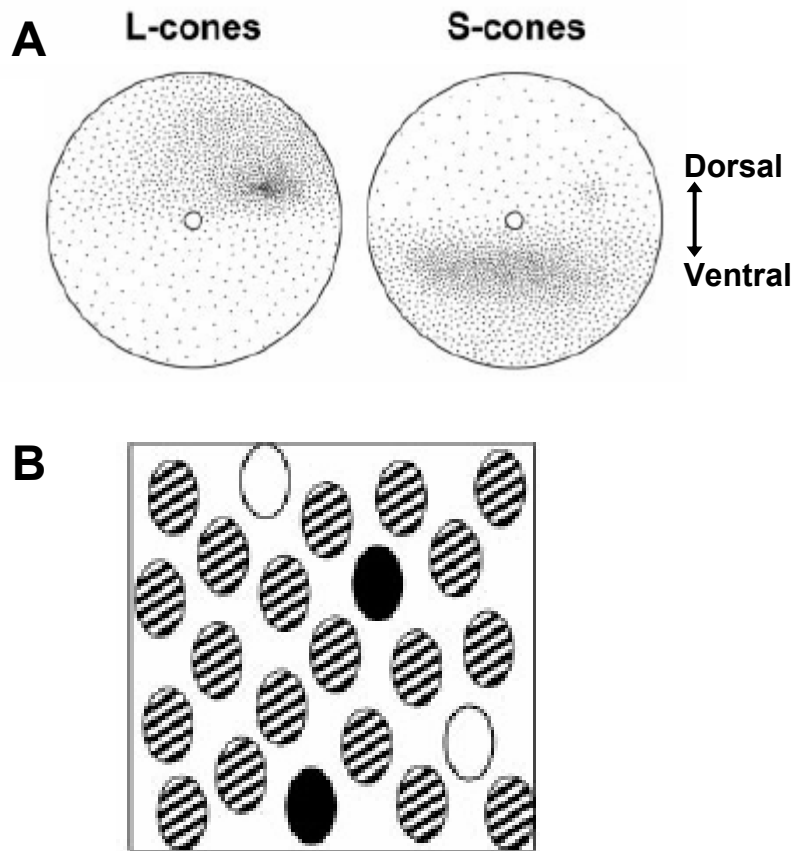


Fig. 26 : Co-expression des opsines des groupes S et L (Peichl, 2002)

A : Régionalisation des cônes selon des gradients dorso-ventraux, courante chez les rongeurs. Le phénomène de co-expression des opsines des groupes S et L par le même cône est localisé dans la zone de transition séparant la rétine ventrale dominée par les cônes exprimant l'opsine S et la rétine dorsale dominée par les cônes exprimant l'opsine L. **B** : Dans la zone de transition, une majorité des cônes co-expriment les opsines des groupes S et L (hachurés), les cônes exprimant exclusivement l'une ou l'autre étant minoritaires.

Régionalisation des cônes

Chez de nombreux mammifères, la répartition d'un ou des deux types de cônes dans la rétine diffère du gradient centro-périphérique (**Figure 25**). Un phénomène assez répandu est celui d'une répartition des cônes bleus selon un gradient ventro-dorsal avec une rétine ventrale dominée par les cônes bleus (Röhlich et coll., 1994). Ce type de gradient ventro-dorsal est retrouvé chez certains carnivores, des lagomorphes (ordre des lapins et lièvres) et des rongeurs et est souvent associé à une forte proportion de cônes bleus. Le bénéfice fonctionnel de cette répartition asymétrique pourrait être une adaptation à la distribution naturelle de la lumière, celle provenant directement du ciel comportant une plus forte proportion de rayons de longueurs d'onde courtes que celle reflétée par le sol, et permettrait par exemple une meilleure identification des prédateurs aériens (Peichl, 2005).

Une autre répartition atypique des cônes bleus, retrouvés chez certains primates et marsupiaux, consiste en un gradient centro-périphérique inversé avec une densité de cônes bleus maximale dans la rétine périphérique.

Comme pour le monochromatisme, le point commun entre ces différentes espèces est un mode de vie nocturne. Par ailleurs, leur diversité et leur isolement au sein de leur phylum suggèrent que ces régionalisations atypiques sont la conséquence d'événements évolutifs indépendants.

Co-expression des opsines des groupes S et L

Si la plupart des mammifères suivent la règle "un récepteur – un neurone", il est apparu que différentes espèces, principalement des rongeurs, présentaient des cônes exprimant à la fois les opsines bleue et rouge (**Figure 26** ; Röhlich et coll., 1994). Ce phénomène est souvent corrélé à la régionalisation ventrale des cônes bleus observée chez certains rongeurs et lagomorphes, les cônes co-exprimant les deux opsines étant localisés dans

la zone de transition située entre la rétine ventrale dominée par les cônes bleus et la rétine dorsale dominée par les cônes rouges ; c'est notamment le cas de la souris commune (*Mus musculus*). Chez certains rongeurs, comme le hamster sibérien (*Phodopus sungorus*), l'ensemble des cônes co-exprime les opsines des groupes S et L (Lukats et coll., 2002). La conséquence de cette co-expression des deux opsines serait d'élargir la sensibilité spectrale des cônes au dépend de leur capacité à distinguer les couleurs, ce qui ne pénaliserait pas la survie de ces espèces essentiellement nocturnes. Applebury et coll. ont suggéré qu'il n'y aurait qu'un seul type de cône chez la souris, exprimant à des degrés divers les opsines S et L. Cependant, la mise en évidence d'un réseau de cellules bipolaires spécifiques des cônes bleus plaide contre cette hypothèse (Applebury et coll., 2000 ; Haverkamp et coll., 2005).

Cônes sensibles aux ultraviolets

Si la plupart des mammifères présente une opsine du groupe S avec une sensibilité maximale s'étendant du violet au bleu (>400 nm), pour de nombreux rongeurs, dont la souris commune, le pic de sensibilité de cette opsine se situe dans les UV (environ 360 nm ; Neitz et Neitz, 2001). Contrairement aux autres mammifères, ces espèces sensibles aux UV présentent aussi une lentille perméable à ces mêmes UV, ce qui a pour conséquence d'élargir la fenêtre de sensibilité spectrale de leur population de cônes (Gouras et Ekesten, 2004). Ces espèces ayant un mode de vie essentiellement nocturne, la perméabilité de leur lentille aux UV ne leur est pas préjudiciable.

Cette diversité des mosaïques des photorécepteurs observée au sein de la seule classe des mammifères illustre la plasticité évolutive nécessaire à l'adaptation aux différents environnements et modes de vie. Cette diversité présente l'avantage de fournir des modèles variés permettant d'aborder différents aspects du développement de cette mosaïque. A

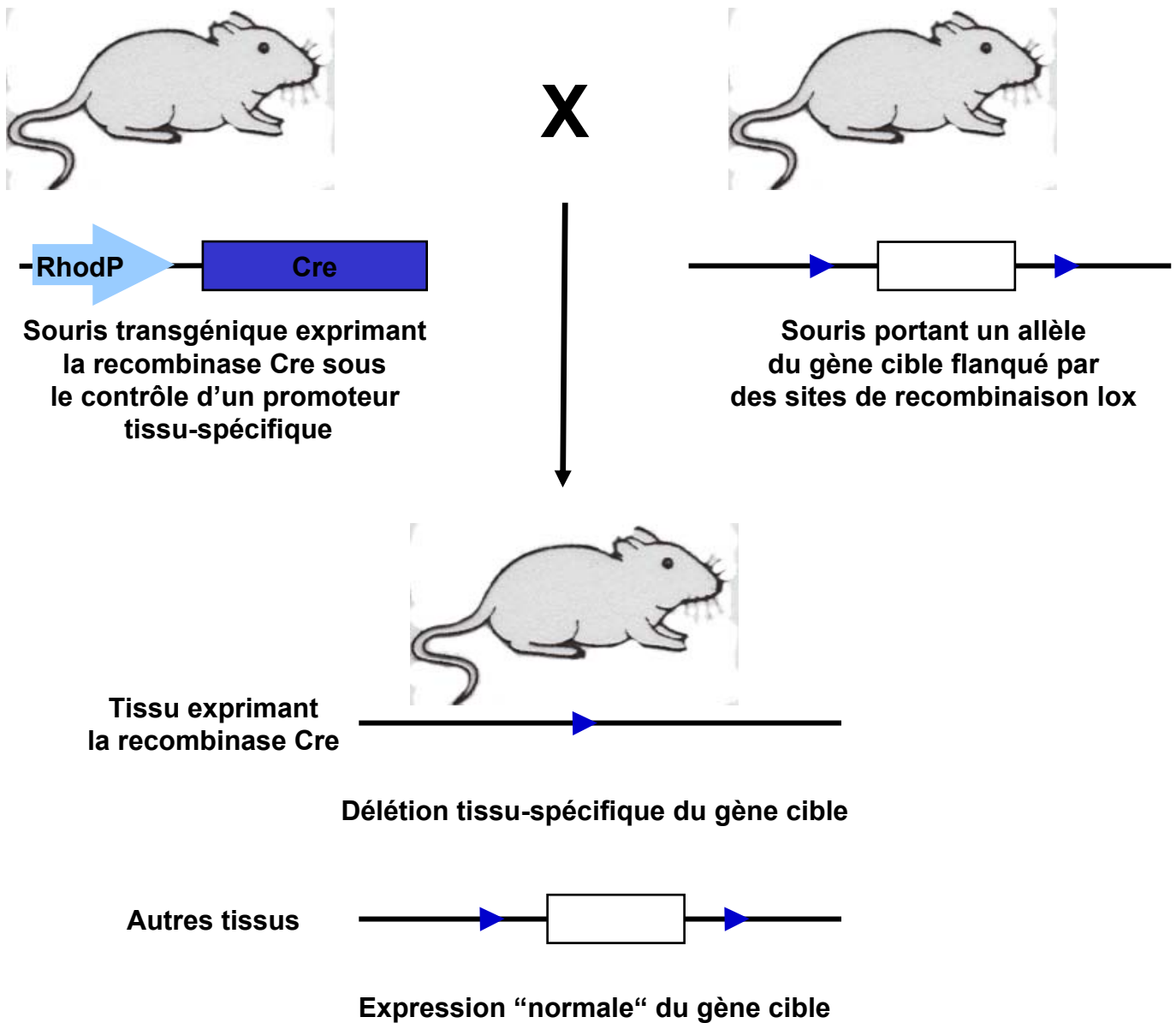


Fig. 27 : Génération d'une souris portant une délétion tissu-spécifique d'un gène grâce à l'utilisation du système Cre-lox

Une souris transgénique exprimant la recombinaise Cre sous le contrôle d'un promoteur tissu-spécifique, tel celui de la rhodopsine (RhodP), est croisée avec une autre souris portant un allèle du gène cible flanqué des sites de recombinaison lox (souris "knock-in" générée par l'insertion de l'allèle flanqué par recombinaison homologue). La génération d'animaux à la fois porteurs du transgène de la recombinaise Cre et homozygotes pour l'allèle du gène cible flanqué permettra une délétion du gène cible spécifiquement dans les bâtonnets.

l'inverse, cette diversité rend délicate l'extension à l'ensemble des mammifères des observations faites sur un modèle particulier. Ainsi, les performances visuelles photopiques observées chez la souris ne sont sûrement pas représentatives de l'ensemble des mammifères, ni même des rongeurs, du fait de l'existence de cônes co-exprimant les deux opsines ainsi que d'une forte proportion de cônes exprimant l'opsine S.

Cette diversité pose aussi la question des mécanismes moléculaires contrôlant la formation de ces mosaïques : il s'agit notamment de savoir si certaines caractéristiques courantes chez les sauropsidés (présence d'une fovéa, prépondérance numérique des cônes) et retrouvées chez un nombre restreint de mammifères, sont contrôlées par des mécanismes communs.

G. La souris commune

La souris commune (*Mus musculus*) présente plusieurs inconvénients par rapport aux modèles exposés précédemment, notamment un développement essentiellement *in utero* et une progéniture peu nombreuse, par contre, son temps de génération (environ trois mois) est comparable à celui du poisson zèbre. L'utilisation comme modèle d'étude d'un marsupial, l'opossum brésilien (*Monodelphis domestica*), permet de contourner l'inconvénient du développement *in utero* (Sakaguchi et coll., 2004).

La plupart des techniques de transgénèse furent à l'origine développées chez la souris avant d'être adaptées à d'autres modèles comme ceux précédemment exposés. Si les techniques de transgénèse sont plus laborieuses que chez le xénope ou le poisson zèbre, la souris est le seul modèle animal permettant une transgénèse par recombinaison homologue et donc la génération d'animaux nuls. Le développement du système Cre-lox permet de contrôler cette inactivation dans le temps et l'espace (**Figure 27**). Un autre attrait de ce modèle est sa proximité phylogénique avec l'homme.

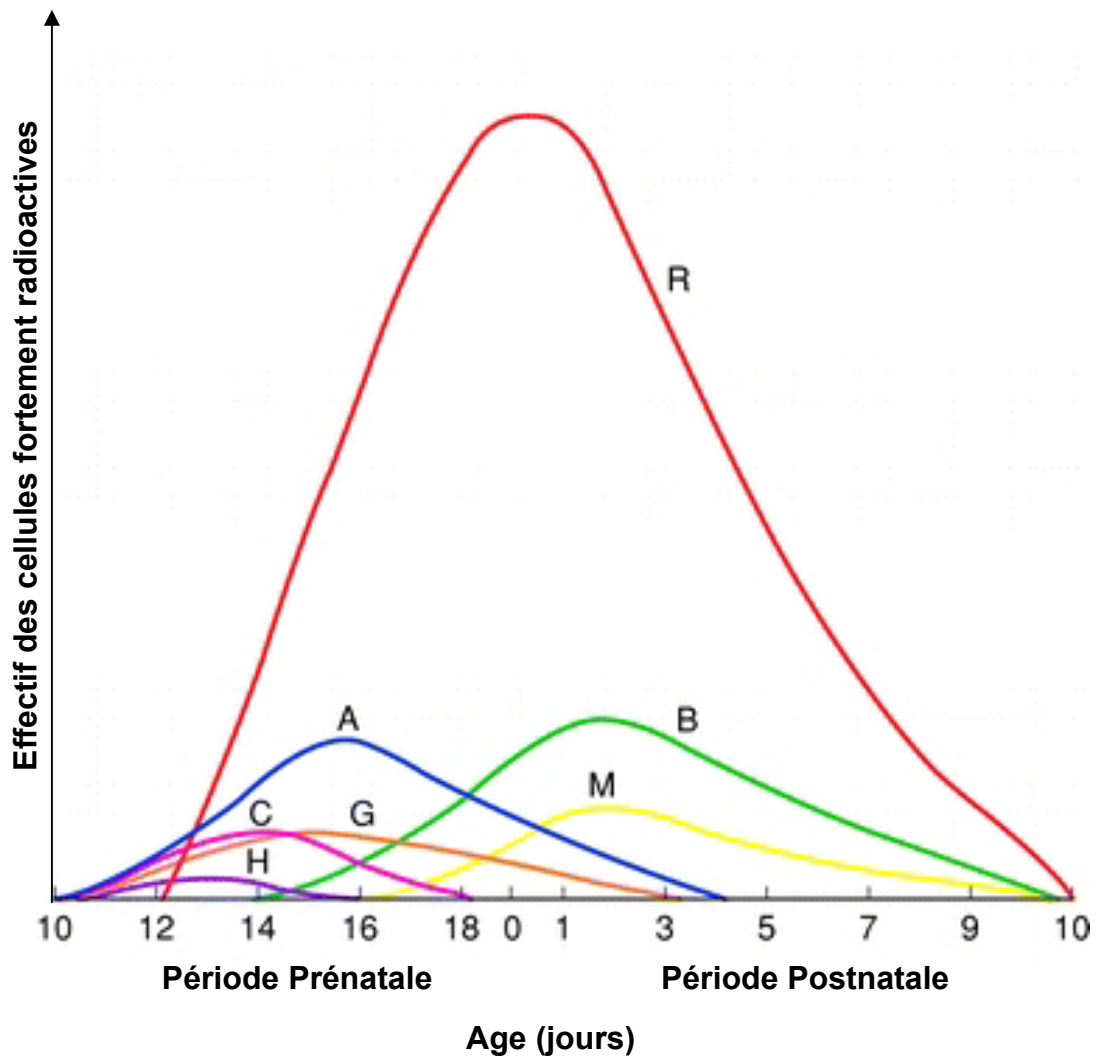


Fig. 28 : Chronologie de la rétino-génèse chez la souris (d'après Young, 1985)

Chronologie établie après injection de thymidine tritiée à différents stades du développement. L'axe des ordonnées représente le nombre de cellules fortement radioactives identifiées pour chaque type cellulaire à l'âge adulte. Il n'y aura pas d'incorporation de thymidine radioactive dans les cellules post-mitotiques au stade de l'injection et le taux d'incorporation dans l'ADN sera d'autant plus important que la phase S finale est proche du stade d'injection, une cellule sera donc d'autant plus marquée que sa sortie du cycle mitotique suit de près l'injection. A : cellules amacrines, B : cellules bipolaires, C : photorécepteurs à cône, G : cellules ganglionnaires, H : cellules horizontales, M : cellules gliales de Müller, R : photorécepteurs à bâtonnet.

La souris est le modèle dont le développement oculaire a été le plus étudié. La rétino-genèse s'étale sur plus de vingt jours. Les premiers précurseurs post-mitotiques apparaissent dès le 10^{ème} jour de développement embryonnaire (E10). Après la naissance, qui a lieu vers E20, la prolifération continue jusqu'à 3 jours (P3) dans la rétine centrale et persiste encore jusqu'à P9 dans les régions les plus périphériques, en bordure de la zone marginale ciliaire. La phase tardive de la différenciation des photorécepteurs, c'est-à-dire la formation des segments externes, se déroule entre P5 et au delà de P9.

Ce développement relativement long a permis de faire certaines observations que la brièveté de la rétino-genèse chez le xénope, le poisson zèbre ou le poulet rendait difficiles. Ainsi, des techniques de marquages ont permis de déterminer la chronologie de la différenciation des photorécepteurs. Ceci a aussi contribué à la mise en évidence du caractère multipotent des cellules progénitrices de la rétine.

Chronologie de la différenciation

L'injection à une souris de thymidine radioactive à différents stades permet de définir l'ordre dans lequel les différentes cellules progénitrices de la rétine deviennent post-mitotiques, une cellule étant d'autant plus marquée que la phase S de sa mitose finale suit de près l'injection du marqueur. Cette technique a été utilisée pour établir un ordre de différenciation dans la rétine de souris en développement (**Figure 28** ; Young, 1985a et b).

Young a pu observer que le devenir des cellules sortant du cycle mitotique change par vagues successives au cours de la rétino-genèse, résultant en une apparition ordonnée des différents types cellulaires. La sortie du cycle mitotique, et les différents événements liés à la différenciation cellulaire, se font selon un gradient centro-périphérique, les premières cellules post-mitotiques apparaissant au centre de la rétine alors que l'activité proliférative persiste plus longtemps dans la rétine périphérique. Les premières cellules post-mitotiques,

apparaissant dès E10, donneront principalement des cellules ganglionnaires, puis naîtront les cônes et les cellules horizontales, les cellules amacrines, les bâtonnets, les cellules bipolaires et les cellules gliales de Müller. L'âge auquel une cellule progénitrice sort du cycle mitotique influence donc fortement son devenir cellulaire mais ne le détermine pas strictement. La probabilité d'adopter un devenir précis parmi d'autres variera en fonction du stade de développement, bien qu'il existe d'importants chevauchements entre les périodes de génération des différents types cellulaires suggérant que les cellules sortant du cycle mitotique à un stade précis présentent encore plusieurs devenirs cellulaires possibles. Cet ordre de génération des différents types cellulaires réiniens est aussi retrouvé chez d'autres vertébrés tels que le poulet ou le singe (Kahn, 1974 ; Lavail et coll., 1991).

Multipotence et compétence des cellules progénitrices réiniennes

L'infection d'une cellule en cours de prolifération par un vecteur rétroviral déficient pour la réplication et portant comme marqueur le gène de la β -galactosidase permet, après coloration, d'observer la descendance de cette cellule : le gène de la β -galactosidase s'intégrant dans le génome, son expression permet d'identifier les cellules filles de la cellule infectée. Ce type de marquage permet de déterminer, à posteriori, l'hétérogénéité ou l'homogénéité de la population de cellules composant le clone issu de la cellule progénitrice infectée. Ce type de marquage utilisé pour l'étude du développement de la rétine a permis de démontrer la multipotence des cellules progénitrices réiniennes chez le rat et la souris (Turner et Cepko 1987 ; Turner et coll., 1990).

Chez le rat, après infection à P4, les clones obtenus pouvaient comporter jusqu'à trois types cellulaires différents, pouvant inclure des cellules gliales de Müller. Ceci démontre adonc que les neurones et cellules gliales sont issus des mêmes cellules progénitrices multipotentes puisque les rétrovirus ne sont capables d'infecter que les cellules en prolifération. Chez la

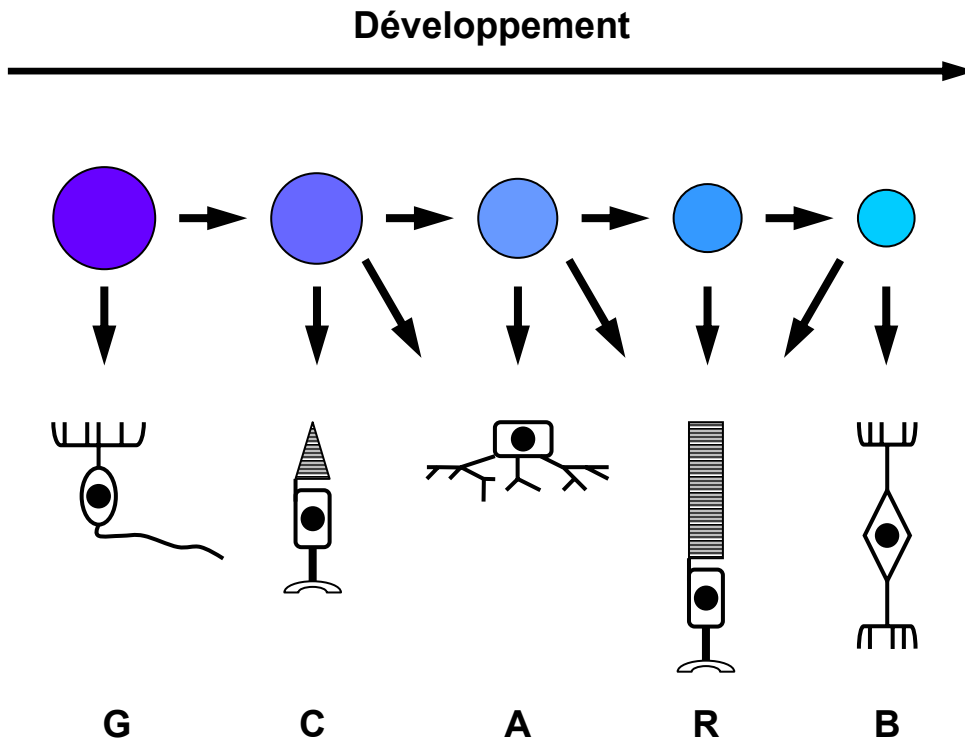


Fig. 29 : Modèle de différenciation lors de la rétino-genèse

Les cellules progénitrices passent par différents états de compétence au cours du développement. Chaque état de compétence permet la génération d'un nombre limité de types cellulaires. A : cellules amacrines, B : cellules bipolaires, C : photorécepteurs à cône, G : cellules ganglionnaires, R : photorécepteurs à bâtonnet (liste non exhaustive).

souris, la même expérience effectuée sur des embryons *ex utero* à un stade plus précoce (E13) permet d'obtenir des clones d'une plus grande diversité cellulaire. Les clones obtenus à E13 se composent notamment de cellules ganglionnaires et de cônes, types cellulaires non observés dans l'expérience précédente, ce qui indique que tous les types de cellules rétiniennes sont issus du même pool de cellules progénitrices.

Modèle de différenciation des cellules progénitrices rétiniennes

Un modèle justifiant le comportement observé des cellules progénitrices rétiniennes a été proposé (Cepko et coll., 1996 ; Cepko, 1999). D'après celui-ci, l'ensemble des cellules rétiniennes serait issu d'un pool commun de cellules progénitrices qui progresseraient à travers différents états de compétence au cours du temps. Chaque état de compétence définit la capacité de la cellule progénitrice à répondre aux signaux extracellulaires et ne permettrait la génération que d'un nombre limité de types cellulaires différents (**Figure 29**). Le devenir cellulaire d'un précurseur post-mitotique serait donc fonction de l'instant de sa sortie du cycle cellulaire et dépendrait d'une combinaison de facteurs extrinsèques, tels des facteurs de croissance et/ou des interactions juxtacrines, et intrinsèques, notamment des facteurs de transcription. Ce sont ces facteurs intrinsèques qui définiraient l'état de compétence de la cellule progénitrice.

Diverses études ont mis en évidence l'existence d'un état de compétence des cellules progénitrices rétiniennes. En particulier, des expériences de transplantations et de cultures hétérochroniques ont montré qu'en dépit de conditions anachroniques, des cellules progénitrices ne peuvent engendrer que des types cellulaires correspondant à leur âge, indiquant la persistance pour la cellule placée dans un environnement différent de la mémoire du stade de développement atteint. Cependant, si des conditions hétérochroniques ne peuvent forcer des cellules progénitrices à générer un type cellulaire ne correspondant pas à leur état

de compétence, elles peuvent modifier les proportions des différentes cellules produites (Watanabe et Raff, 1990 ; Belliveau et Cepko, 1999 ; Rapaport et coll., 2001). Ainsi, des cellules progénitrices issues de rétines embryonnaires (E16) mises en culture en présence d'un excès de cellules rétiniennes post-natales (P0) génèrent des cellules amacrines et des cônes dans des proportions différentes de celles observées si elles avaient été mises en culture isolément, la production de cellules amacrines étant réduite et celle de cônes étant augmentée dans l'expérience d'hétérochronie. Cependant, la mise en culture de cellules progénitrices en présence de cellules post-natales ne permet pas de générer des types cellulaires apparaissant plus tardivement telles des cellules bipolaires ou des cellules gliales de Müller (Belliveau et Cepko, 1999).

Ce modèle représente une vision simplifiée et en partie hypothétique de phénomènes plus complexes. Différentes données en contradiction avec ce modèle en montrent les limites. Ces données remettent en question d'une part l'homogénéité de la population des cellules progénitrices et d'autre part le rôle physiologique des facteurs intrinsèques dans la détermination du devenir cellulaire. Une étude a montré, à P0, l'existence d'une sous-population de cellules progénitrices prolifératives caractérisées par un épitope (VC1.1) produisant préférentiellement des cellules amacrines (Alexiades et Cepko, 1997). L'existence de cette sous-population suggère une hétérogénéité de la population des cellules progénitrices qui remet en cause le modèle précédent. Une alternative réconciliatrice serait que le marqueur VC1.1 reflète le fait que la détermination du devenir cellulaire précède la sortie du cycle cellulaire.

Cayouette et coll. ont montré, chez le rat, que des cellules progénitrices précoces (E17), engendraient des clones similaires en taille et en composition cellulaire qu'elles soient cultivées de manière isolée ou bien en explant. Ce résultat suggère que le nombre de division

et les proportions des différentes cellules filles dans la descendance des cellules progénitrices dépendent essentiellement de facteurs intrinsèques. Les auteurs ont émis l'hypothèse que les facteurs extrinsèques sont en fait impliqués dans la maturation et la survie des cellules différenciées plutôt que dans le choix du devenir cellulaire (Cayouette et coll., 2003).

Développement des photorécepteurs et mise en place de leur mosaïque

Comme de nombreux mammifères nocturnes, la souris présente une très faible proportion de cônes, moins de 3%, et est dépourvue d'area centralis ou de fovéa. Les photorécepteurs à cône sont répartis de manière asymétrique dans la rétine : les cônes bleus représentent près de la moitié des photorécepteurs à cône et sont fortement concentrés dans la région ventrale tandis que les cônes rouges ne sont présents que dans la rétine dorsale. Des cônes, minoritaires et co-exprimant les deux opsines sont présents dans la zone de transition séparant rétine ventrale et dorsale (**Figure 26** ; Szél et coll., 1992).

Le pic d'apparition des précurseurs post-mitotiques des cônes se situe vers E14 contre P0 pour les bâtonnets ; pourtant, malgré cette apparition plus précoce, l'expression des opsines de cône est plus tardive que celle de la rhodopsine. L'expression de la rhodopsine est détectée à P2, contre P5 pour l'opsine bleue (opsine du groupe S) et P10 pour l'opsine rouge (opsine du groupe L ; Szél et coll., 1993). L'initiation de l'expression des opsines de cône chez la souris contraste fortement avec celle observée chez une espèce aussi proche que le rat : dans la rétine de rat, l'ensemble des précurseurs des cônes exprime l'opsine bleue vers P10, puis ils vont majoritairement se transformer en cônes rouges en passant par une phase transitoire de co-expression des deux opsines, une minorité des cônes ne subissent pas cette transition et restent bleus (Szél et coll., 1994). Un phénomène semblable de transdifférenciation est observable chez d'autres mammifères dont l'homme (Xiao et Hendrickson, 2000). Chez la souris, ce

phénomène de transdifférenciation n'est pas observé : les cônes situés dans la région dorsale expriment directement l'opsine rouge sans passer par une phase transitoire d'expression de l'opsine bleue, la totalité des cônes de la moitié ventrale et une minorité des cônes de la moitié dorsale exprimant l'opsine bleue (Szél et coll., 1993).

Facteurs contrôlant la détermination et la différenciation des photorécepteurs

Il est courant de décomposer le processus de différenciation cellulaire en deux phases : la spécification, c'est-à-dire l'adoption définitive d'un devenir cellulaire, et la maturation, ou différenciation terminale, c'est-à-dire l'acquisition de caractères morphologiques et fonctionnels propres.

La distinction entre spécification et maturation semble bien s'appliquer au développement des photorécepteurs chez la souris au vu des délais séparant la sortie du cycle mitotique des phases les plus tardives de la maturation (formation des segments externes et expression des opsines). L'expression des opsines est un paramètre couramment utilisé pour définir le processus de maturation.

Certains facteurs de transcription exprimés précocement et contrôlant l'engagement dans le lignage de type photorécepteur participent également et de façon directe à la régulation de l'expression des opsines, montrant combien la distinction entre spécification et différenciation terminale est une notion complexe à aborder expérimentalement.

Parmi les facteurs de transcription favorables ou nécessaires à la différenciation des photorécepteurs à cône comme à bâtonnet, se trouvent les facteurs à homéodomaine Otx2 et CRX (Cone-Rod Homeobox) et les facteurs de type bHLH, NeuroD et Mash1. L'importance

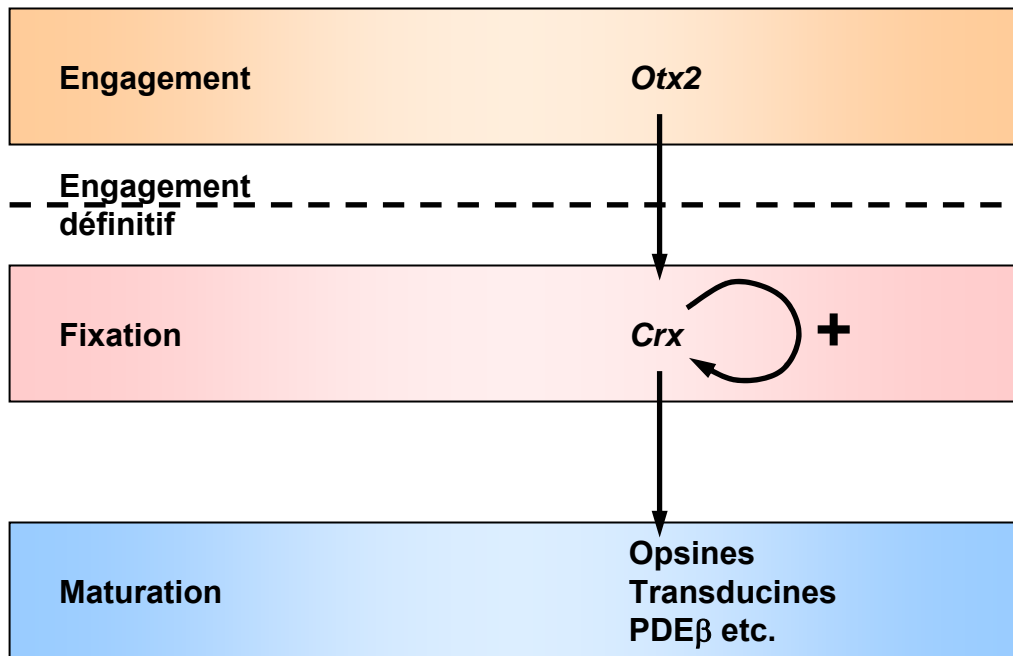


Fig. 30 : Modèle de l'interaction Otx2/Crx lors du développement des photorécepteurs (d'après Nishida et coll., 2003)

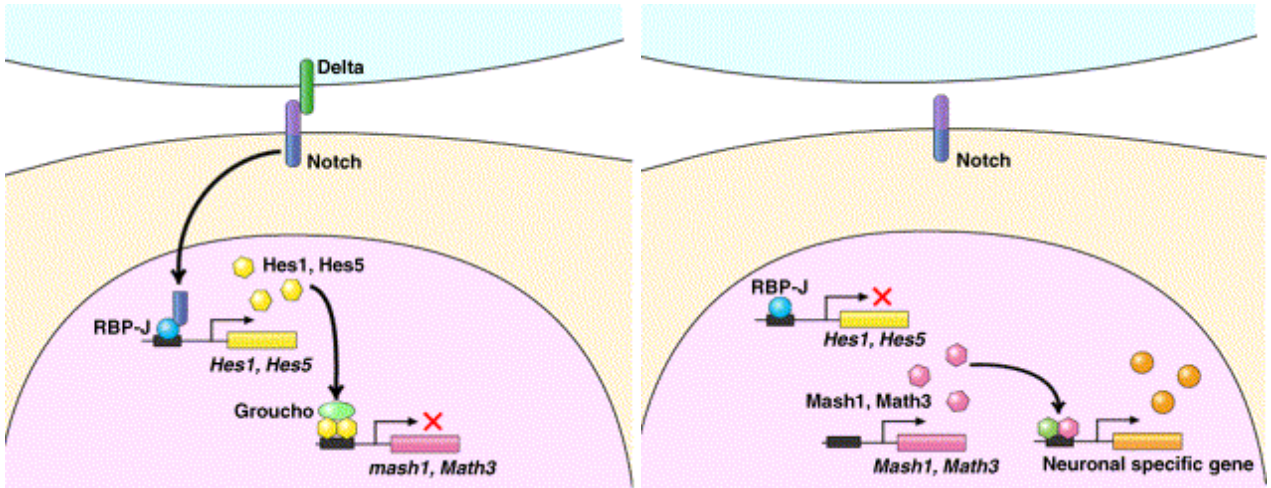
Le développement des photorécepteurs se divise en trois stades: le début de l'expression de Otx2 définit un stade d'engagement, l'initiation par Otx2 de la transcription de Crx, qui est ensuite capable de réguler sa propre transcription définit un stade de fixation, la maturation correspond à l'activation de différents gènes spécifiques des photorécepteurs par CRX.


de ces facteurs de transcription dans le développement des photorécepteurs a été révélée par l'analyse de souris déficientes pour leurs gènes.

Les souris portant une ablation conditionnelle de *Otx2* dans la rétine présentent une absence totale des deux types de photorécepteurs, à cône et à bâtonnet, remplacés par des cellules amacrines, les couches nucléaires interne et externe n'étant plus distinguables (Nishida et coll., 2003). C'est actuellement le seul facteur de transcription dont la déficience, dans la rétine, affecte de manière aussi drastique et spécifique les photorécepteurs. Le rôle de *Otx2* dans la rétinogenèse est cependant ambivalent car sa surexpression par les cellules progénitrices rétiniennes favorise leur différenciation en cellules bipolaires chez la souris et le xénope (Nishida et coll., 2003 ; Viczian et coll., 2003).

CRX est exprimé par l'ensemble des photorécepteurs durant le développement et chez l'adulte (Chen et coll., 1997). Les souris *Crx*^{-/-} présentent une absence totale de segments externes avec une couche nucléaire externe distinguishable mais d'épaisseur réduite. D'autre part, des souris transgéniques exprimant une forme dominante-négative de CRX présentent le même phénotype (Furukawa et coll., 1997 ; Furukawa et coll., 1999). L'expression de *Crx* est dépendante de *Otx2*, puisque les souris déficientes pour *Otx2* n'expriment pas CRX, de plus l'expression de *Otx2* précède celle de CRX par les photorécepteurs. CRX régule positivement la transcription de différents gènes de maturation des photorécepteurs, dont les différentes opsines, et est aussi capable de réguler positivement sa propre transcription (**Figure 30** ; Nishida et coll., 2003 ; Peng et coll., 2005). Des mutations de *CRX* sont responsables de rétinopathies, dont des RP, chez l'homme (Sohocki et coll., 1994).

Différents facteurs de transcription proneuraux de type bHLH exprimés précocement par les cellules progénitrices en cours de prolifération, ont un patron d'expression se restreignant progressivement à certains types cellulaires après la sortie du cycle cellulaire. De même, les



↓
Etat indifférencié 
 ↓
Cellules gliales

↓
Neurones
(dont photorécepteurs)

Fig. 31 : Mécanisme moléculaire de la voie de signalisation Delta/Notch (d'après Hatakeyama et Kageyama, 2004)

L'expression des gènes proneuraux, dont *Mash1* et *Math3*, est inhibée par l'activation de la voie Notch par son ligand Delta.

cellules sortant du cycle cellulaire et s'engageant dans une voie de différenciation spécifique vont exprimer certains facteurs bHLH absents des cellules progénitrices, tel *Ath5*, absent des cellules progénitrices et exprimé exclusivement par les cellules ganglionnaires (Vetter et Brown, 2001).

Chaque type cellulaire rétinien va donc former une combinaison spécifique de ces facteurs de transcription. Ainsi, les facteurs *NeuroD* et *Mash1* sont exprimés par les photorécepteurs au cours de la rétino-genèse. Leur surexpression dans la rétine génère un excès de photorécepteurs ce qui est en corrélation avec l'existence d'éléments de liaison putatifs pour ces deux facteurs dans le promoteur de la rhodopsine (Ahmad, 1995 ; Ahmad et coll., 1998 ; Yan et Wang, 1998 ; Morrow et coll., 1999 ; Hatakeyama et coll., 2001 ; Inoue et coll., 2002). Cependant, chez les souris *NeuroD*^{-/-} ou *Mash1*^{-/-}, la population des photorécepteurs ne semble pas affectée alors que la souris double KO *Mash1*^{-/-}*Math3*^{-/-} présente une absence de cellule bipolaire, indiquant que *Mash1* régule aussi d'autres voies de différenciation (Hatakeyama et coll., 2001).

Inversement, d'autres facteurs de transcription de type bHLH ont été identifiés comme des régulateurs négatifs de la neurogenèse, il s'agit notamment des effecteurs de la voie de signalisation juxtacrine Delta/Notch : *Hes-1* et *-5*. Comme ailleurs dans le système nerveux, cette voie est impliquée dans le maintien dans un état indifférencié des cellules progénitrices et aussi dans le choix entre devenir glial et neuronal (Hatakeyama et Kageyama, 2004). L'activation de la voie Notch par son ligand transmembranaire Delta inhibe, via les répresseurs transcriptionnels *Hes-1* et *-5*, l'activation des gènes proneuraux dont *NeuroD* et *Mash1*, empêchant par un processus d'inhibition latérale la différenciation des cellules progénitrices en neurones au profit des cellules gliales de Müller (**Figure 31** ; de la Pompa et coll., 1997).

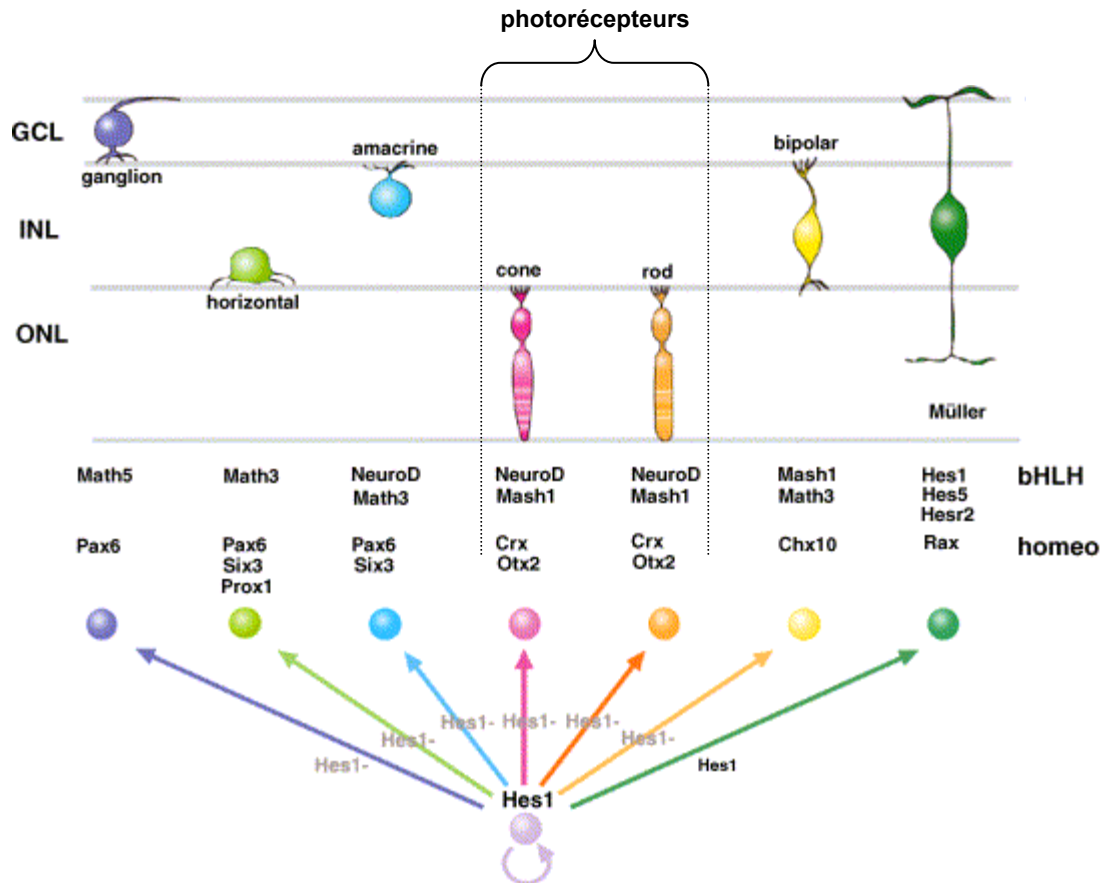


Fig. 32 : Illustration des combinaisons de facteurs de transcription bHLH et à homéodomaine dans la spécification des différents types cellulaires rétiniens (d'après Hatakeyama et Kageyama, 2004)

Des études chez l'animal confortent l'existence de ces deux rôles pour la voie Delta/Notch dans le développement de la rétine : l'inactivation précoce de la voie Notch entraîne une réduction de la prolifération qui conduit à la formation d'yeux de taille réduite. Mais contrairement à cette inactivation précoce qui conduit à la génération excessive de cônes, c'est-à-dire des premiers photorécepteurs à être spécifiés, une inactivation plus tardive conduit à une production presque exclusive de bâtonnets, derniers photorécepteurs à être spécifiés, suggérant que cette voie inhibe en particulier la différenciation des cellules progénitrices en photorécepteurs (**Figure 31** ; Hatakeyama et Kageyama, 2004 ; Jadhav et coll., 2006).

Il apparaît donc, en résumé, que l'identité des différents neurones rétiniens est définie par une combinaison, en partie transitoire, de facteurs de transcription à homéodomaine et de type bHLH proneuraux (**Figure 32**). La simplicité de ce code a été mise à profit pour produire des cellules exprimant des marqueurs de photorécepteurs, notamment la rhodopsine, à partir de cellules issues de l'iris adulte, par délivrance via des vecteurs rétroviraux de gènes codant pour CRX et/ou NeuroD (Haruta et coll., 2001 ; Akagi et coll., 2005). Cependant, ce code ne semble pas suffisant à la détermination entre bâtonnets et cônes.

Facteurs contrôlant le choix entre bâtonnets et cônes

La découverte du facteur de transcription de type "leucine zipper" NRL (Neural Retina Leucine zipper) constitue une étape importante de la recherche des mécanismes contrôlant le choix bâtonnet/cône (Swaroop et coll., 1992). En effet, la rétine des souris *Nrl*^{-/-} présente, parmi d'autres phénotypes, une dysplasie rétinienne et une absence complète des bâtonnets, remplacés par des cônes bleus, ce qui implique que NRL est essentiel à la différenciation des bâtonnets (Mears et coll., 2001). Chez la souris, NRL est exprimé spécifiquement par les photorécepteurs à bâtonnet matures ou en cours de développement (à partir de P0 ; Swain et

coll., 2001 ; Akimoto et coll., 2006). Ce patron d'expression murin diffère de celui observé chez l'homme, en effet, chez ce dernier, NRL est exprimé par l'ensemble des photorécepteurs, mais est spécifiquement séquestré dans le cytoplasme des cônes et n'est observé que dans les noyaux des bâtonnets (Swain et coll., 2001). Il semble donc que le choix bâtonnet/cône soit déterminé, au moins en partie, par l'expression de NRL dans les bâtonnets chez la souris ou par l'accès de NRL au noyau des photorécepteurs chez l'homme, entraînant dans les deux cas l'activation de gènes nécessaires au déterminisme bâtonnet. La translocalisation de NRL chez l'homme pourrait être contrôlée par phosphorylation, de multiples isoformes phosphorylées de NRL étant exprimées dans la rétine (Swain et coll., 2001). Des mutations de *NRL* sont associées à des rétinopathies dont des RP (Bessant et coll., 1999).

Des essais de transplantations de cellules rétiniennes chez des modèles murins de dégénérescence rétinienne ont montré que seuls les précurseurs post-mitotiques exprimant NRL étaient capables de se différencier en bâtonnets et d'établir des connexions synaptiques avec les cellules de la rétine interne de l'hôte. Alors que des cellules prélevées à un stade embryonnaire du développement rétinien survivent mais sont incapables de se différencier, celles prélevées durant une fenêtre de temps située entre P1 et P6 (correspondant au début de l'expression de NRL) sont en mesure de s'intégrer et de restaurer la fonction visuelle de l'animal hôte. L'utilisation de cellules rétiniennes issues d'un animal transgénique exprimant le marqueur GFP (Green Fluorescent Protein) sous le contrôle du promoteur *Nrl* a permis de démontrer que NRL constituait un marqueur cellulaire utile pour réaliser avec succès ce type de transplantation (McLaren et coll., 2006).

La famille des récepteurs nucléaires est aussi impliquée dans le lignage des photorécepteurs. Différentes données indiquent que le récepteur nucléaire NR2E3, aussi nommé PNR (Photoreceptor-cell specific Nuclear Receptor), est situé en aval de NRL dans la

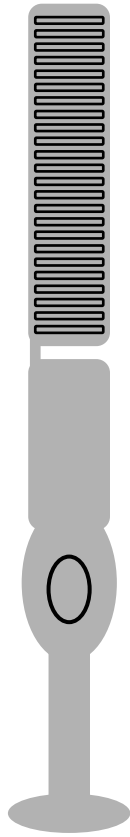
même cascade génique : l'expression de NRL précède celle de NR2E3, son transcrit n'est pas détecté dans la rétine *Nrl*^{-/-}, et la rétine des souris *rd7/rd7*, déficiente pour NR2E3 suite à l'insertion d'un rétrotransposon de type L1 au sein de l'exon 5 du gène *Nr2e3*, présente un phénotype proche de celui de la rétine *Nrl*^{-/-}, notamment un excès de cônes bleus, bien que la majorité des photorécepteurs de la souris *rd7/rd7* continue d'exprimer la rhodopsine (Akhmedov et coll., 2000 ; Haider et coll., 2001 ; Mears et coll., 2001 ; Chen et coll., 2006). Le phénotype de la souris *rd7/rd7*, ainsi que d'autres résultats qui seront exposés dans le chapitre Résultats, indiquent que NR2E3 participe au choix bâtonnet/cône.

Chez l'homme, des mutations récessives de *NR2E3* sont responsables d'une forme particulière de dégénérescence rétinienne caractérisée par un gain de fonction : Le syndrome d'hypersensibilité à la lumière bleue ou Enhanced S-Cone Syndrome (ESCS ; Haider et coll., 2000).

Outre NR2E3, deux autres récepteurs nucléaires ont été impliqués dans la détermination du devenir cellulaire des photorécepteurs et notamment dans le choix de l'opsine exprimée par les cônes : il s'agit du récepteur aux hormones thyroïdiennes TR β (NR1A2), et du récepteur à l'acide rétinoïque RXR γ (NR2B3). Le gène de TR β code pour deux isoformes différant par leur extrémité N-terminale : TR β 1 et TR β 2 (Hodin et coll., 1989), ces deux isoformes servant de médiateurs aux hormones thyroïdiennes, généralement sous la forme d'un hétérodimère avec RXR (Zhang et Pfahl, 1993).

Dans la rétine, l'isoforme TR β 2 est exprimé spécifiquement par les cônes (Roberts et coll., 2005). La rétine des souris *TR β 2*^{-/-} présente une absence totale de cônes exprimant l'opsine du groupe L au profit de cônes exprimant exclusivement l'opsine S, les gradients de distribution des deux opsines étant ainsi abolis. L'expression de l'opsine S est aussi nettement plus précoce, son transcrit étant détectable dès E17,5 contre P5 chez la souris normale (Ng et coll., 2001).

Bâtonnet



NeuroD
Mash1

Crx
Otx2

NRLin
NR2E3

Cône bleu



NeuroD
Mash1

Crx
Otx2

NRLen

Cône rouge



NeuroD
Mash1

Crx
Otx2

NRLen
TR β 2:TR β 2
TR β 2:RXR γ

Fig. 33 : Combinaisons des facteurs de transcription propres aux différents photorécepteurs

La combinaison des facteurs bHLH et à homéodomaine contrôle le devenir en photorécepteur (**Figure 28**). Le facteur de type leucine-zipper NRL et les récepteurs nucléaires NR2E3, TR β 2 et RXR γ contrôlent le choix entre les différents types de photorécepteurs. Chez l'homme, la localisation intracellulaire de NRL (NRLin), induit la différenciation en bâtonnet et l'expression de NR2E3. La séquestration en dehors du noyau de NRL (NRLen) provoque la différenciation en cône, l'identité de l'opsine exprimée sera définie par l'activité des récepteurs TR β 2 et RXR γ . TR β 2 et RXR γ sont aussi exprimés dans les cônes bleus mais ne participent pas à la régulation des opsines S et L.

L'activité régulatrice de TR β 2 sur des régions régulatrices des gènes des opsines S et L a été examinée *in vitro*. En l'absence de ligand, TR β 2 n'a aucune activité sur les régions régulatrices testées, par contre, en présence de son ligand T3 (triiodothyronine), il régule positivement la transcription de l'opsine L et inhibe l'activation de celle de l'opsine S par CRX (Yanagi et coll., 2002). Ces deux activités ligand dépendantes de TR β 2 sur la transcription des opsines S et L ont été confirmées *in vivo* chez la souris (Roberts et coll., 2006).

Les récepteurs nucléaires lient l'ADN sous forme d'homodimère ou d'hétérodimère. Les récepteurs du groupe des RXR, dont RXR γ , jouent le rôle de partenaire de dimérisation commun pour les récepteurs de type non stéroïdien. Dans la rétine murine, RXR γ est exprimé exclusivement par les cônes et les cellules amacrines (Mori et coll., 2001). Chez la souris *RXR γ ^{-/-}*, le gradient de l'opsine S est aboli et l'ensemble des cônes exprime cette opsine alors que le gradient de l'opsine L n'est pas affecté. Les cônes situés dans la région dorsale co-expriment les deux opsines tandis que la majorité des cônes de la région ventrale exprime exclusivement l'opsine bleue (Roberts et coll., 2005).

Le phénotype rétinien de la souris *RXR γ ^{-/-}* permet de proposer un modèle où l'expression de l'opsine S est inhibée de manière spécifique par un hétérodimère TR β 2:RXR γ tandis que celle de l'opsine L est activée par un homodimère TR β 2:TR β 2 (**Figure 33**).

H. Le chien

En tant que modèle animal, le chien (*Canis lupus familiaris*) présente de nombreux inconvénients : coût élevé, temps de génération long et progéniture peu nombreuse, problèmes affectifs, commandos anti-vivisection, faible homogénéité de l'espèce. Paradoxalement, ce dernier critère constitue aussi le principal attrait de l'espèce comme



Fig. 34 : Chien de race Briard ayant bénéficié du premier essai de thérapie génique correctrice effectué avec succès sur un animal de grande taille

modèle expérimental : les croisements consanguins réalisés au cours des siècles pour obtenir puis maintenir les standards des différentes races ont conduit à l'apparition de nombreuses maladies génétiques souvent spécifiques d'une seule race. Actuellement, plus de 350 maladies génétiques sont référencées, la majorité ayant un mode de transmission autosomal récessif (<http://www.upei.ca/~cidd/intro.htm>). Nombre de ces animaux constituent des modèles pour différentes maladies humaines, dont certaines rétinopathies (Petersen-Jones, 2005). Ainsi, des chiens de race Setter irlandais (chien *rcd1/rcd1*) constituent un modèle de RP autosomale récessive, ils présentent en effet une dégénérescence séquentielle des bâtonnets puis des cônes causée par une mutation de la sous-unité β de la phosphodiesterase spécifique des bâtonnets (Suber et coll., 1993). Des mutations de cette protéine impliquée dans la cascade de phototransduction sont aussi responsables de RP chez l'homme et d'une dégénérescence séquentielle des bâtonnets puis des cônes chez la souris *rd1/rd1*.

Le chien présente certains avantages propres à l'étude des rétinopathies comme à celle d'autres pathologies. D'abord, les pedigrees de nombreux chiens de race ont été établis avec rigueur, permettant une analyse génétique utilisant les techniques habituellement dévolues à la génétique humaine avec élaboration rétrospective d'arbres généalogiques relatifs aux pathologies. Son comportement beaucoup plus sophistiqué que celui des modèles déjà présentés facilite l'évaluation de ses performances visuelles. Enfin, c'est l'animal pour lequel nous bénéficions de la meilleure expertise clinique.

Un second exemple de modèle canin d'une rétinopathie humaine est celui des Briards (ou Bergers de Brie), race de chien de berger à poils longs, déficients pour la protéine RPE65 (impliquée dans le métabolisme de la vitamine A) et présentant une dégénérescence progressive des photorécepteurs. Ces chiens constituent un modèle de l'amaurose congénitale de Leber, une forme de cécité infantile résultant dans certains cas de mutations de

l'orthologue humain du gène RPE65 (Aguirre et coll., 1998). Le briard a été utilisé avec succès dans des essais de thérapie génique corrective : l'injection sous-rétinienne d'un adénovirus codant pour une protéine RPE65 fonctionnelle a permis de restaurer une fonction visuelle normale (**Figure 34** ; Acland et coll., 2001). Il s'agit du premier essai réussi de thérapie génique corrective chez un animal de grande taille. De plus, les mesures comportementales ont permis de mettre en évidence une restauration fonctionnelle complète qu'il était difficile d'évaluer chez la souris et qui persiste chez l'animal six ans après le traitement. La même approche a été menée avec succès en France plus récemment (Le Meur et coll., 2006).

I. Le chat

Par rapport au chien, le chat (*Felis silvestris catus*) présente moins de races standardisées et susceptibles de servir de modèles à des maladies génétiques. Il existe cependant plusieurs modèles félins de pathologies oculaires, notamment celui des chats abyssins dont de nombreux membres présentent une forme autosomale récessive de dégénérescence séquentielle des bâtonnets et cônes pouvant servir de modèle de la RP humaine (Narfstrom et Nilsson, 1987). Par rapport à la rétine canine, celle du chat présente plusieurs avantages, d'abord les mosaïques de photorécepteurs sont bien décrites, alors qu'elles sont encore inconnues chez le chien, ensuite la rétine féline présente une organisation plus proche de celle de la rétine humaine que celle du chien. En effet, la rétine canine possède un "visual streak", il s'agit d'une structure riche en cônes, traversant la rétine selon un axe naso-temporal et permettant une vision fine panoramique, alors que la rétine féline présente une area centralis, structure radiale se rapprochant plus de la fovéa humaine.

La rétine de chat est couramment utilisée comme modèle pour l'étude du détachement rétinien, celui-ci étant provoqué de manière expérimentale. Il a été démontré que les cônes et

les bâtonnets présentaient un comportement différent au stress généré par le détachement rétinien : peu après un détachement expérimental, les cônes affectés présentent une baisse du niveau d'expression de leur opsine et une perte de leur segment externe tandis que les bâtonnets continuent d'exprimer la rhodopsine à un niveau normal et conservent leur segment externe. Après rattachement, les cônes ayant survécu au traumatisme retrouvent un niveau d'expression de leur opsine normal et régénèrent leur segment externe. Ces différences de comportement reflètent vraisemblablement des mécanismes de survie différents pour les deux types de photorécepteurs, mécanismes susceptibles d'intervenir aussi dans les dégénérescences rétiniennes d'origine génétique (Rex et coll., 2002a et b).

J. L'homme et les primates

L'ordre des primates est beaucoup plus diversifié que ce que suggère notre impression première basée sur le groupe des catarhiniens (grands singes du vieux monde), cette diversité est aussi reflétée par la mosaïque des photorécepteurs. Parmi les mammifères, de nombreuses caractéristiques rétiniennes paraissent spécifiques à certains primates, il s'agit notamment du trichromatisme et de la présence d'une fovéa retrouvés chez l'ensemble des catarhiniens dont l'homme. Cependant, des primates "primitifs" ayant un mode de vie nocturne, comme de nombreux lémuriniens, ne disposent que d'une vision dichromatique et d'une area centralis. Un trait commun à l'ensemble des primates est une disposition frontale des yeux offrant un champ de vision stéréoscopique d'une largeur maximale, correspondant vraisemblablement à une adaptation des premiers primates à un mode de vie arboricole.

Trichromatisme chez les catarhiniens

L'homme et les autres grands singes du vieux monde possèdent une vision trichromatique, celle-ci étant permise par la duplication de l'opsine du groupe L située sur le

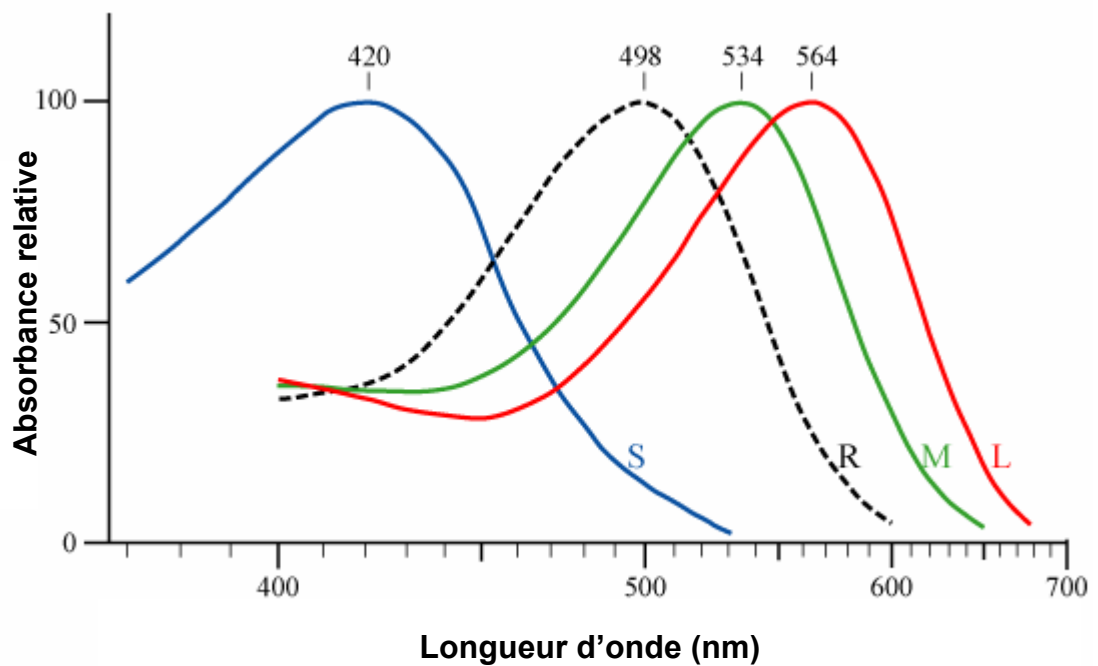


Fig. 35 : Sensibilités spectrales des différentes opsines de primate

S : spectre d'absorption de l'opsine du groupe S, **R** : rhodopsine, **M** : opsine du groupe L verte, **L** : opsine du groupe L rouge.

chromosome X. L'homme possède ainsi quatre pigments visuels dont la rhodopsine, les autres étant l'opsine du groupe S, présentant un maximum d'absorption à 425 nm et exprimée par les cônes bleus, et deux opsines du groupe L, présentant des maxima à 530 et 560 nm et exprimées respectivement par les cônes verts et rouges, par commodité ces opsines sont nommées opsine verte et opsine rouge (**Figure 35** ; Nathans, 1999).

La présence d'une unique opsine du groupe L chez l'ensemble des autres mammifères, dont les primates du nouveau monde, permet de dater la duplication de l'opsine L en opsines verte et rouge à il y a environ 30-40 millions d'années, peu après la séparation tectonique entre l'Afrique et l'Amérique du Sud.

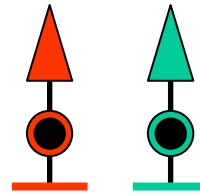
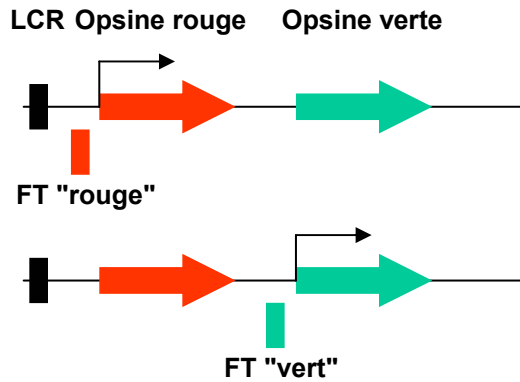
Cependant, ce phénomène de duplication de l'opsine du groupe L n'est pas propre aux catarhiniens et a aussi eu lieu dans une famille de singes du nouveau monde, les singes hurleurs ou alouates, présentant une vision trichromatique comparable à celle des catarhiniens. L'analyse des séquences a montré que cette duplication est due à un événement indépendant et plus récent que chez les catarhiniens, correspondant donc à un phénomène de convergence évolutive.

Certains primates du nouveau monde, tels les ouistitis, présentent une vision trichromatique permise par un mécanisme distinct de la duplication de l'opsine L. Chez certaines espèces, le gène de l'opsine du groupe L possède de multiples formes alléliques codant pour des pigments de sensibilité spectrale variable. Chez les femelles hétérozygotes, le phénomène d'inactivation du chromosome X génère une mosaïque composée de trois types de cônes différents, expliquant ainsi que seules les femelles hétérozygotes sont dotées d'une vision trichromatique (Ahnelt et Kolbe, 2000).

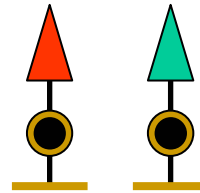
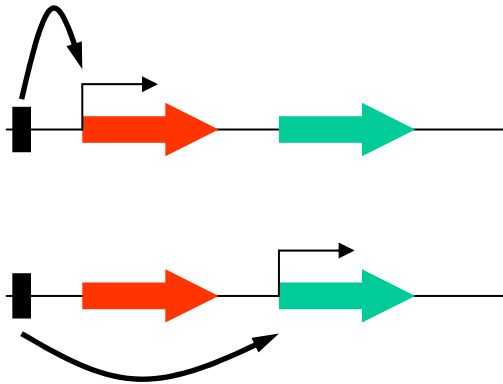
L'avantage évolutif de la vision trichromatique a été discuté par différents auteurs. Le consensus actuel est que la pression sélective ayant favorisé l'apparition d'une vision trichromatique chez certains primates serait liée à leur capacité à identifier les fruits et leur

A : modèle standard

Illustrations des cônes générés



B : modèle stochastique



C : mammifères dichromates

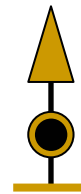
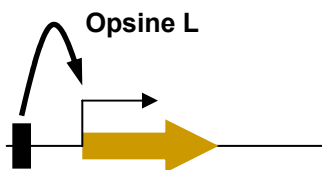


Fig. 36 : Modèles proposés pour l'expression exclusive des opsines rouge et verte chez les catarhiniens (d'après Nathans, 1999)

A : Modèle standard, l'expression des opsines rouge et verte est contrôlée par des facteurs de transcription spécifiques (FT rouge et vert), la fonction du LCR n'est pas définie. Ce modèle autorise une régulation coordonnée du pigment visuel exprimé et de la spécificité synaptique. **B** : Modèle stochastique, l'interaction sélective du LCR avec le promoteur d'une des deux opsines entraîne la transcription exclusive de cette opsine. Les cônes rouge et vert diffèrent uniquement par l'opsine exprimée. **C** : Chez les mammifères dichromates, une seule opsine est portée par le chromosome X et le LCR correspond en fait à un enhancer "classique".

degré de maturité au sein du milieu tropical. De nombreux primates sont essentiellement frugivores et la vision trichromatique facilite la détection des fruits mûrs dispersés au sein d'un feuillage abondant. Ces singes constituent les principaux consommateurs de fruits tropicaux dont ils sont par ailleurs les principaux vecteurs de leur dispersion. Ces observations ont conduit à l'hypothèse d'une co-évolution entre ces primates frugivores et les arbres dont ils consomment les fruits, évolution comparable à celle proposée entre les abeilles et les fleurs dont elles assurent la pollinisation (Chittka et Raine, 2006). Il a de même été proposé que la présence simultanée d'individus dichromates et trichromates au sein d'un groupe présenterait un avantage sélectif car la vision dichromatique est la plus performante pour la détection des objets camouflés. La coopération au sein du groupe expliquerait la fréquence élevée d'individus femelles dichromates chez les espèces comportant des individus dichromates (mâles et femelles homozygotes) et trichromates (femelles hétérozygotes ; Morgan et coll., 1992).

Expression exclusive des opsines rouge et verte

La duplication de l'opsine du groupe L, située sur le chromosome X, chez les catarhiniens est un événement assez récent et constitue un bon modèle pour l'étude des mécanismes contrôlant l'expression exclusive de deux gènes dont les promoteurs sont proches et intriqués. Il a été démontré que l'expression des deux opsines dépendait d'un enhancer commun situé en 5', le Locus Control Region (LCR ; Nathans et coll., 1989).

Deux modèles ont été proposés pour expliquer l'expression exclusive des opsines rouge et verte : un modèle standard où les promoteurs des deux opsines présentent des séquences régulatrices différentes, l'expression de chacune des opsines dépendrait alors de facteurs de transcription spécifiques, et un modèle stochastique, avec une interaction exclusive et aléatoire du LCR avec le promoteur d'une des deux opsines (**Figure 36**). Dans le modèle

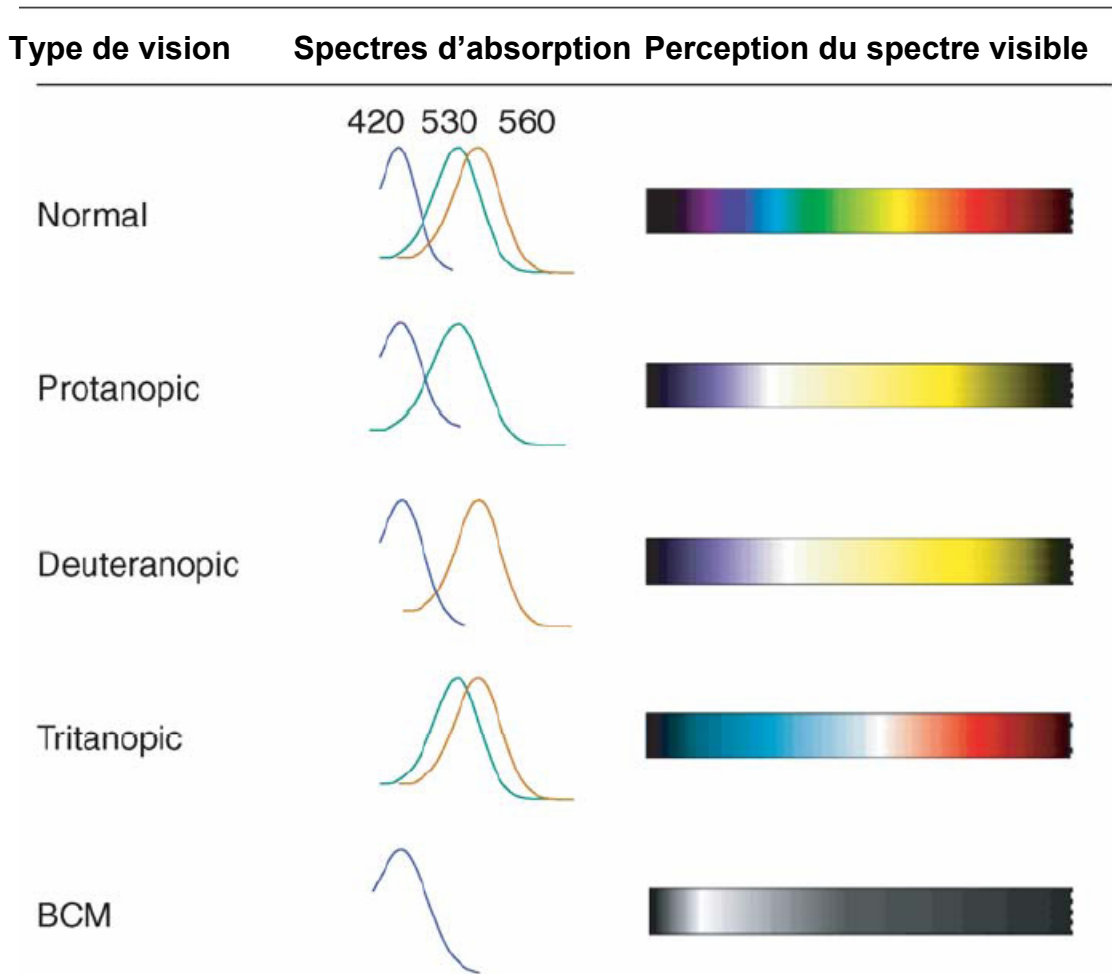


Fig. 37 : Dénomination, spectre d'absorption des opsines de cône et discrimination des couleurs correspondant à différentes déficiences de la vision chromatique chez l'homme (Deeb, 2006)

Les spectres d'absorption indiqués correspondent à ceux des opsines de cône du groupe S (420 nm), et du groupe L verte (530 nm) et rouge (560 nm).

standard, l'existence d'un ou de plusieurs facteurs de transcription spécifiques des cônes soit rouges soit verts pourrait aussi conduire à l'expression différentielle d'autres gènes que ceux des opsines à l'inverse du modèle stochastique (Nathans, 1999).

Une souris transgénique portant une construction codant pour deux gènes reporters différents sous le contrôle des promoteurs des opsines rouge et verte et du LCR a été produite. L'examen histologique des rétines a permis de constater que la plupart des cônes exprimaient de manière aléatoire et exclusive un des deux gènes reporters. Ce résultat plaide en faveur du modèle stochastique, suggérant ainsi que les cônes rouges et verts ne différeraient que par l'identité de leur opsine (Wang et coll., 1999).

Déficiences de la vision chromatique chez l'homme

Le clonage des différentes opsines de cône a ouvert la voie à l'analyse génétique des déficiences de la vision chromatique chez l'homme (Deeb, 2006). Les déficiences les plus connues sont les différents daltonismes, ou dichromatismes, causés par la perte d'une des trois opsines (**Figure 37**) :

- protanopie : perte de l'opsine rouge
- deutéranopie : perte de l'opsine verte
- tritanopie : perte de l'opsine bleue

Protanopie et deutéranopie sont assez courantes chez la population mâle car les gènes des opsines rouge et verte sont situés sur le chromosome X ; elles touchent chacune environ un homme sur cent.

Le monochromatisme à cônes bleus (BCM : Blue Cone Monochromacy) est causé par une délétion du LCR, supprimant simultanément l'expression des opsines rouge et verte (**Figure 37**). Comme la protanopie et la deutéranopie, cette pathologie concerne essentiellement des individus mâles.

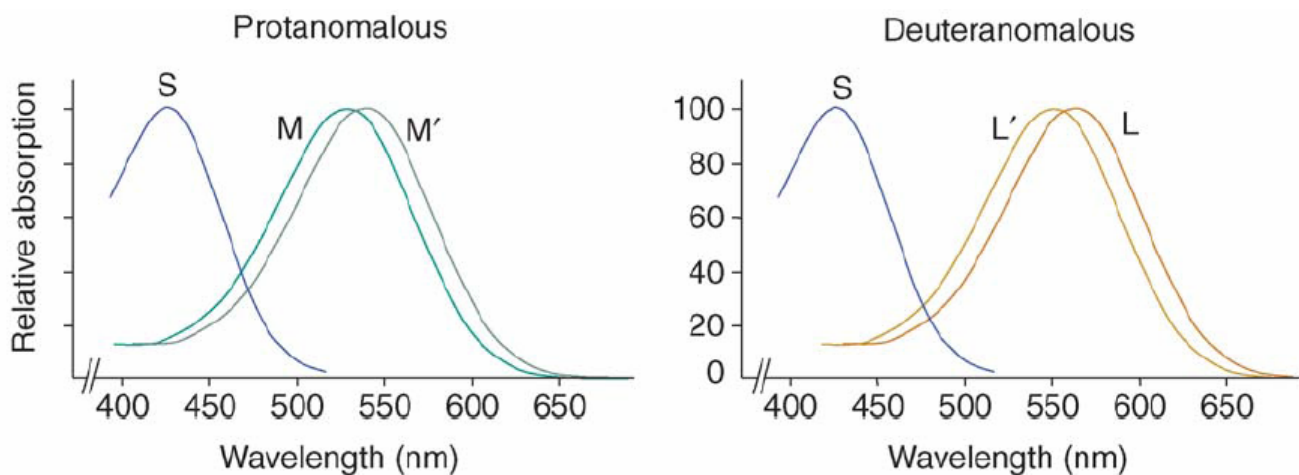


Fig. 38 : Sensibilités spectrales des opsines de cône dans les trichromatismes anormaux (d'après Deeb, 2006)

S : spectre d'absorption de l'opsine du groupe S, **M** et **L** : opsines "normales" du groupe L, **M'** et **L'** : opsines hybrides du groupe L.

Une classe de déficiences plus subtiles est formée par les trichromatismes anormaux, touchant à nouveau essentiellement les individus mâles. Le haut degré d'homologie entre les gènes des deux opsines du groupe L favorise les événements de recombinaison (Nathans et coll., 1986a ; Nathans et coll., 1986b). Ces recombinaisons peuvent conduire à la délétion d'une des opsines, à l'origine d'un daltonisme classique mais elles peuvent aussi générer un gène hybride codant pour une chimère des opsines rouge et verte présentant une sensibilité spectrale légèrement décalée par rapport à celle d'une des deux opsines. Les trichromatismes anormaux sont généralement causés par l'expression d'une des deux opsines "normales" et d'un pigment hybride de sensibilité spectrale voisine : les trichromates anormaux possèdent donc trois types de cônes différents mais les deux types exprimant une opsine du groupe L présentent une sensibilité spectrale extrêmement proche. Les trichromatismes anormaux les plus courants sont la protanomalie où les pigments du groupe L exprimés sont l'opsine verte et une opsine hybride présentant un maximum d'absorption proche de 530 nm et la deutéranomalie où les pigments exprimés sont l'opsine rouge et une opsine hybride présentant un maximum d'absorption proche de 560 nm (**Figure 38**, Deeb, 2006).

Mosaïque des cônes chez l'homme

Chez l'homme, les quatre à six millions de cônes représentent environ 5% de la population totale des photorécepteurs. Les cônes bleus représentent 10% des cônes, les 90% restant étant composés, en proportion variable d'un individu à l'autre, par les cônes verts et rouges, le ratio cônes rouges:cônes verts variant de 1:1 à 16:1 en dehors de la fovéa. Les cônes y sont distribués de manière homogène en une mosaïque irrégulière.

La fovéa consiste en une dépression de la rétine d'environ 300 µm de diamètre, située dans la région centrale de la rétine (la macula), réduite à la seule couche des photorécepteurs, uniquement des cônes (**Figure 39**). La densité des cônes est maximale au niveau de la fovéa

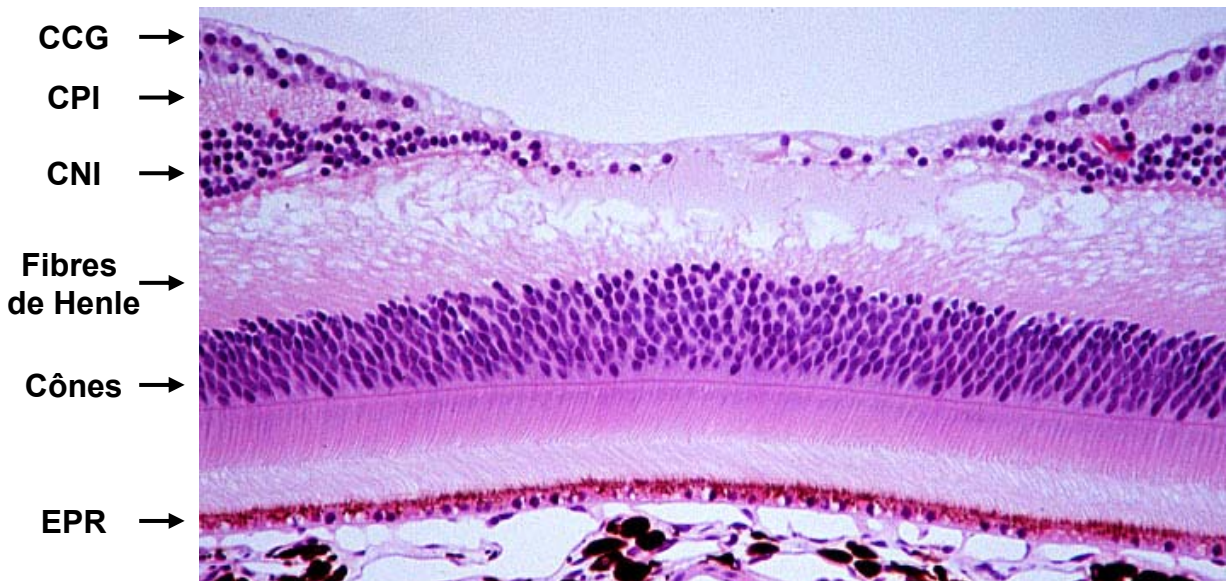


Fig. 39 : Section verticale d'une fovéa humaine

EPR: épithélium pigmentaire rétinien, CNI: couche nucléaire interne, CPI: couche plexiforme interne, CCG: couche des cellules ganglionnaires.

(200.000 cônes/mm²), et celles des cellules bipolaires et ganglionnaires le sont en région péri-fovéale. La densité des bâtonnets est maximale à proximité immédiate de la fovéa (**Figure 40** ; Curcio et coll., 1990). La fovéa permet une vision de forte acuité, son haut degré de résolution est due par l'absence de convergence des signaux générés par les photorécepteurs : le champ réceptif des cellules ganglionnaires est réduit à un seul photorécepteur à cône, chaque cellule ganglionnaire étant reliée à une seule cellule bipolaire elle-même reliée à un seul cône.

La proportion de cônes bleus est de 12% en périphérie de la fovéa alors qu'ils sont exclus de sa région centrale (Curcio et coll., 1990). Cette région centrale, parfois nommée fovéola, est donc constituée uniquement de cônes rouges et verts répartis de manière aléatoire (Hofer et coll., 2005).

Deux raisons pourraient expliquer l'exclusion des cônes bleus du centre de la fovéa :

- limiter l'aberration chromatique générée par réfraction de la lumière bleue sur le cristallin. Cette aberration est d'autant plus grande que l'œil est volumineux, ce qui expliquerait que chez certains singes de petite taille, les cônes bleus ne soient pas exclus du centre de la fovéa

- les cônes bleus sont d'une taille légèrement supérieure à celle des cônes rouges et verts, ceux-ci formant au sein de la rétine centrale un agencement régulier que la présence de cônes bleus perturberait

Développement de la fovéa

Les connaissances portant sur le développement de la mosaïque des cônes et de la fovéa chez l'homme résultent le plus souvent d'extrapolations de découvertes effectuées chez le macaque (*Macaca nemestrina*), qui présente une rétine et des performances visuelles similaires à celles de l'homme.

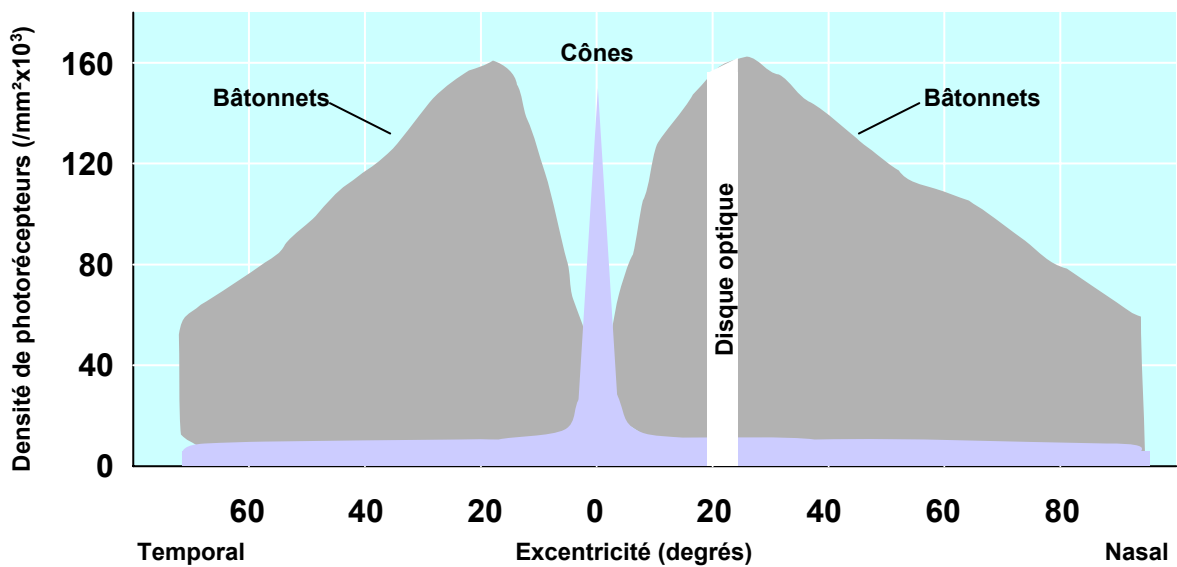


Fig. 40 : Distribution des cônes et bâtonnets dans la rétine humaine

Le pic de cônes correspond à la fovéa. Le disque optique correspond au point de départ du nerf optique formé par la convergence des axones des cellules ganglionnaires, il s'agit d'une région dépourvue de photorécepteurs et donc non photosensible.

Lors du développement de l'œil, la fovéa commence à être distinguable à un stade où elle est encore constituée de trois couches de cellules. Ces cellules sont post-mitotiques et ont précédemment établi des connexions synaptiques. A ce stade, la couche des photorécepteurs est constituée de cônes s'étendant sur une surface cinq fois plus large que celle de la fovéa chez l'adulte.

A partir de ce stade, la fovéa mature va se former à partir de deux types de migration des neurones rétiniens : une migration centrifuge des neurones de la rétine interne et une migration centripète des cônes. Ce phénomène de migration des neurones différenciés et ayant des connexions synaptiques déjà établies est à ce jour unique dans le système nerveux central.

La migration centrifuge des cellules de la rétine interne va conduire à la formation de la dépression fovéale formée de la seule couche des photorécepteurs. Les connexions synaptiques entre cônes et cellules bipolaires étant maintenues durant le processus, les axones des cônes s'étendent latéralement pour former les fibres de Henle.

La migration centripète des cônes va entraîner une forte augmentation de leur densité et le diamètre de la région pure en cônes rétrécit de 1.500 à 300 μm . Cette augmentation de la densité cellulaire est permise par un allongement et un rétrécissement des cônes, le diamètre de leur segment externe diminuant de 6 à 2 μm . A maturité, les cônes de la fovéa forment un agencement hexagonal extrêmement régulier (Hendrickson, 1994).

Faute de modèle expérimental, les mécanismes moléculaires contrôlant la formation de la fovéa sont encore inconnus. Seules des études génétiques nous apportent quelques informations. Ainsi, des formes congénitales dominantes d'hypoplasie fovéale ont été associées à des mutations faux-sens de *Pax6* (Azuma et coll., 1996 ; Azuma et coll., 1999). Le gène *Pax6* produit deux isoformes par épissage alternatif de l'exon 5a : Pax6(-5a) et Pax6(+5a). L'isoforme Pax6(+5a) possède une insertion de 14 acides aminés dans le domaine de fixation à l'ADN de type "Paired" et les deux isoformes présentent des propriétés de

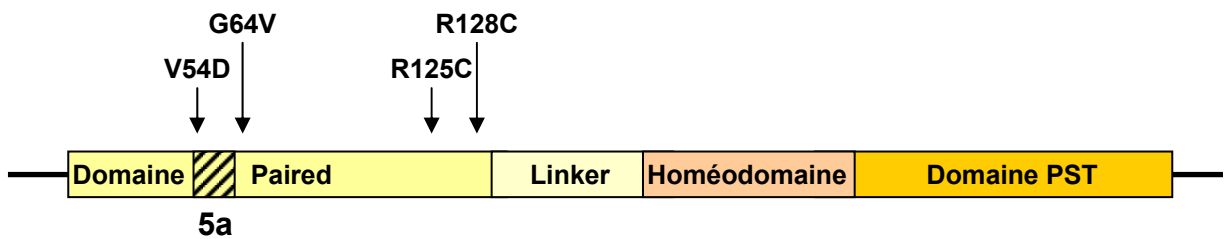


Fig. 41 : Illustration des mutations de Pax6 impliquées dans des hypoplasies de la fovéa

Les quatre mutations sont localisées dans le domaine de fixation à l'ADN de type Paired et altèrent ses propriétés de fixation à l'ADN de l'isoforme Pax6(+5a).

fixation à l'ADN différentes, Pax6(-5a) liant l'ADN via la région N-terminale du domaine "Paired" et Pax6(+5a) via la région C-terminale (Epstein et coll., 1994). Toutes les mutations faux-sens liées à une hypoplasie fovéale altèrent les propriétés de fixation à l'ADN de Pax6(+5a) (**Figure 41** ; Azuma et coll., 1999). Chez le ouistiti (*Callithrix jacchus*), l'isoforme Pax6(+5a) est essentiellement exprimé dans la rétine centrale et la fovéa, et est absente de la rétine périphérique (Azuma et coll., 2005). La surexpression de Pax6(+5a) chez le poulet *in ovo* provoque la formation d'une structure rétinienne ectopique remarquablement bien différenciée, ce dont sont incapables Pax6(-5a) et des versions de Pax6(+5a) portant une mutation associée à une hypoplasie fovéale. Ce résultat suggère que Pax6(+5a) exerce un rôle majeur dans la formation de l'architecture rétinienne (Azuma et coll., 2005).

L'identification des gènes dont l'expression est contrôlée spécifiquement par Pax6(+5a) devrait conduire à l'élucidation des mécanismes contrôlant la formation de la fovéa chez les primates.

INTRODUCTION : LES RECEPTEURS NUCLEAIRES

Les travaux effectués chez la souris et précédemment exposés indiquent que trois récepteurs nucléaires, NR2E3, TR β 2 et RXR γ , régulent la différenciation terminales des photorécepteurs et plus particulièrement leur identité. Les récepteurs nucléaires constituent une superfamille de protéines cumulant les fonctions de récepteur et de facteur de transcription. Leur activité est directement modulée par la concentration intracellulaire de petites molécules liposolubles, leurs ligands.

A. Historique des récepteurs nucléaires

L'histoire des récepteurs nucléaires est liée à celle de l'endocrinologie. Jusqu'au milieu du XIX^{ème} siècle, il était couramment admis par la communauté scientifique que les activités intégratives de l'organisme étaient totalement gouvernées par le système nerveux. Il était aussi connu que la castration d'un animal entraînait un changement de son comportement, notamment une diminution de son agressivité. En 1849, Berthold parvint à restaurer un comportement normal à un chapon grâce une greffe ectopique de testicules. Cette restauration fut si rapide qu'elle excluait une régénération du système nerveux, et Berthold émit l'hypothèse que le tissu greffé sécrétait dans le sang une substance modifiant le comportement de l'hôte du greffon. Cette mise en évidence de l'influence de certaines hormones stéroïdes, hormones ayant pour effecteurs des récepteurs nucléaires, annonce la naissance de l'endocrinologie.

Une étape majeure dans l'histoire de l'endocrinologie fut la purification et la caractérisation des premières hormones. La sécrétine, une hormone peptidique et hydrosoluble sécrétée par le duodénum, fut la première identifiée par Starling et Bayliss en 1902. Au cours des années

Sous-familles de récepteurs nucléaires	Ligands endogènes (ligands synthétiques/exogènes)
AR (NR3C4)	Dihydrotestosterone
CAR (NR1I3)	3 α ,5 α -Androstanol (TCPOBOP)
COUP-TF (NR2F1,2 et 6)	-
DAX (NR0B1)	-
ER (NR3A1 et 2)	Estrogen (E2)
ERR (NR3B1,2 et 3)	(Diethylstilbestrol), (4-Hydroxytamoxifen)
FXR (NR1H4)	Chenodeoxycholic acid, (GW4064)
GCNF (NR6A1)	-
GR (NR3C1)	Cortisol
HNF4 (NR2A1 et 2)	Palmitic acid
LRH (NR5A2)	Phospholipid
LXR (NR1H2 et 3)	24(S)-Hydroxycholesterol
MR (NR3C2)	Aldosterone
NGFI-B (NR4A1, 2 et 3)	-
PNR (NR2E3)	(13-cis-RA)
PPAR (NR1C1,2 et 3)	Eicosapentaenoic acid, 9-HODE
PR (NR3C3)	Progesterone
PXR (NR1I2)	5 β -Pregnane-3,20-dione, (Rifampicin)
RAR (NR1B1,2 et 3)	all-trans RA
Rev-ErbA (NR1D1 et 2)	-
ROR (NR1F1,2 et 3)	Steraic acid
RXR (NR2B1,2 et 3)	9-cis-RA, DHA
SF1 (NR5A1)	Phosphatidyl glycerol
SHP (NR0B2)	-
TLX (NR2E1)	-
TR (NR1A1 et 2)	Tri-iodothyronine (T3)
TR2 (NR2C1 et 2)	-
VDR (NR1I1)	1,25-Dihydroxyvitamin D3

Tab. 2 : Liste des 48 récepteurs nucléaires retrouvés chez l'homme et quelques uns de leurs ligands

1920, plusieurs hormones stéroïdes liposolubles furent isolées, ce qui permit de classer les hormones en fonction de leur liposolubilité

Au milieu des années 1980, le clonage et la caractérisation des récepteurs au glucocorticoïde (Weinberger et coll., 1985 ; Hollenberg et coll., 1985) puis à l'œstrogène (Green et coll., 1986) révélèrent le fait que de nombreuses hormones liposolubles avaient pour médiateurs des protéines réceptrices formant la super famille des récepteurs nucléaires. Chez l'homme, quarante-huit membres ont été identifiés, formant une liste vraisemblablement exhaustive (**Tableau 2** ; Maglich et coll., 2001). Les récepteurs nucléaires sont retrouvés dans l'ensemble du règne animal et sont propres à celui-ci (Kostrouch et coll., 1998).

B. Structure des récepteurs nucléaires

La plupart des récepteurs nucléaires sont composés de six domaines protéiques désignés de A à F. Parmi ces régions, les domaines C et E présentent un haut degré de conservation phylogénique et constituent la signature de la superfamille (**Figure 42** ; Gronemeyer et Laudet, 1995) :

- la région C est le domaine de fixation à l'ADN (DBD : DNA Binding Domain), elle est constituée de deux modules en doigt de zinc. La fixation des récepteurs nucléaires à l'ADN peut se faire sous forme de monomère, d'homodimère ou d'hétérodimère avec le partenaire commun d'hétérodimérisation RXR (Retinoid X Receptor).

- la région E est le domaine de fixation du ligand (LBD : Ligand Binding Domain). Les principales fonctions du LBD sont la fixation du ligand et la transactivation ligand dépendante des gènes cibles (fonction AF-2), il participe aussi à la dimérisation et au contrôle de la localisation nucléaire pour les récepteurs aux hormones stéroïdes. Les structures cristallines de nombreux LBD ont été établies, typiquement, il est constitué de douze hélices-

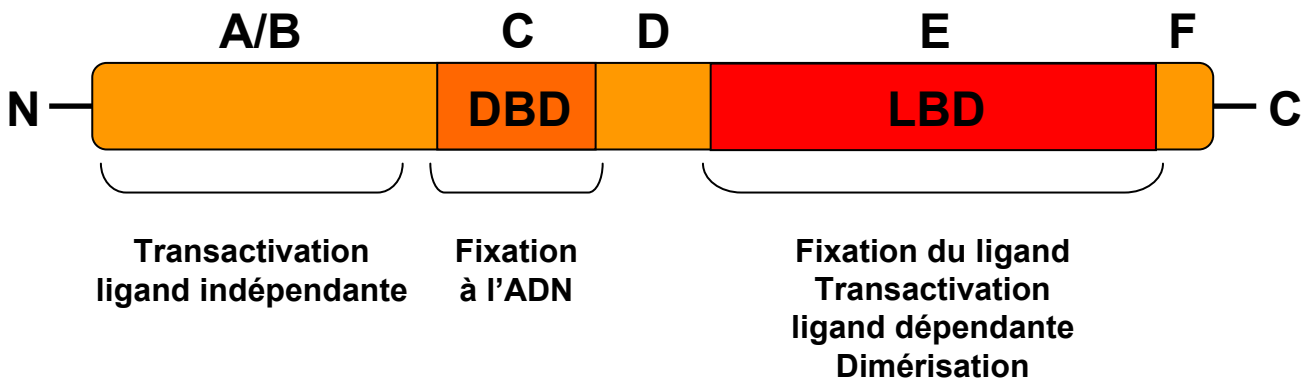


Fig. 42 : Représentation schématique d'un récepteur nucléaire

Les couleurs orange foncée du DBD et rouge du LBD indiquent le haut degré de conservation phylogénique de ces domaines.

α repliées de manière à engendrer une cavité hydrophobe : la poche de fixation du ligand (Li et coll., 2003).

Les autres régions, A, B, D et F, sont peu conservées entre les différents récepteurs nucléaires.

La région F est absente de nombreux récepteurs.

C. Voies de signalisation des récepteurs nucléaires

La voie de signalisation des récepteurs nucléaires peut être divisée en trois grandes étapes : 1) la production et le transport du ligand, celui-ci pouvant avoir diverses origines tissulaires, 2) sa fixation au récepteur, 3) l'activation de la transcription des gènes cibles par le holo-récepteur (récepteur associé à son ligand).

Les récepteurs nucléaires peuvent eux-mêmes être classés selon leur rôle physiologique en deux grandes catégories : 1) médiateurs du système endocrinien et 2) régulateurs du métabolisme lipidique (Chawla et coll., 2001).

Signalisation endocrine

Les récepteurs nucléaires liés à un système endocrinien appartiennent au groupe des récepteurs aux hormones stéroïdes (groupe NR3). Ces hormones secrétées par différentes glandes endocrines, sont transportées jusqu'à la cellule cible via le réseau sanguin ou lymphatique. Elles présentent une affinité élevée pour leur récepteur ($K_d=0,01$ à 10 nM) et sont donc susceptibles d'agir à très faible concentration. Ces récepteurs fonctionnent généralement sous la forme d'homodimère.

Les systèmes endocriniens régulent via les récepteurs stéroïdiens des fonctions intégratives : contrôle de la lactation, de la pression sanguine ou fonctionnement des organes sexuels. Un exemple de ces récepteurs est le récepteur aux glucocorticoïdes (GR ou NR3C1), dont les ligands, telle la cortisol (**Figure 43.A**), sont produits au niveau des glandes surrénales, et

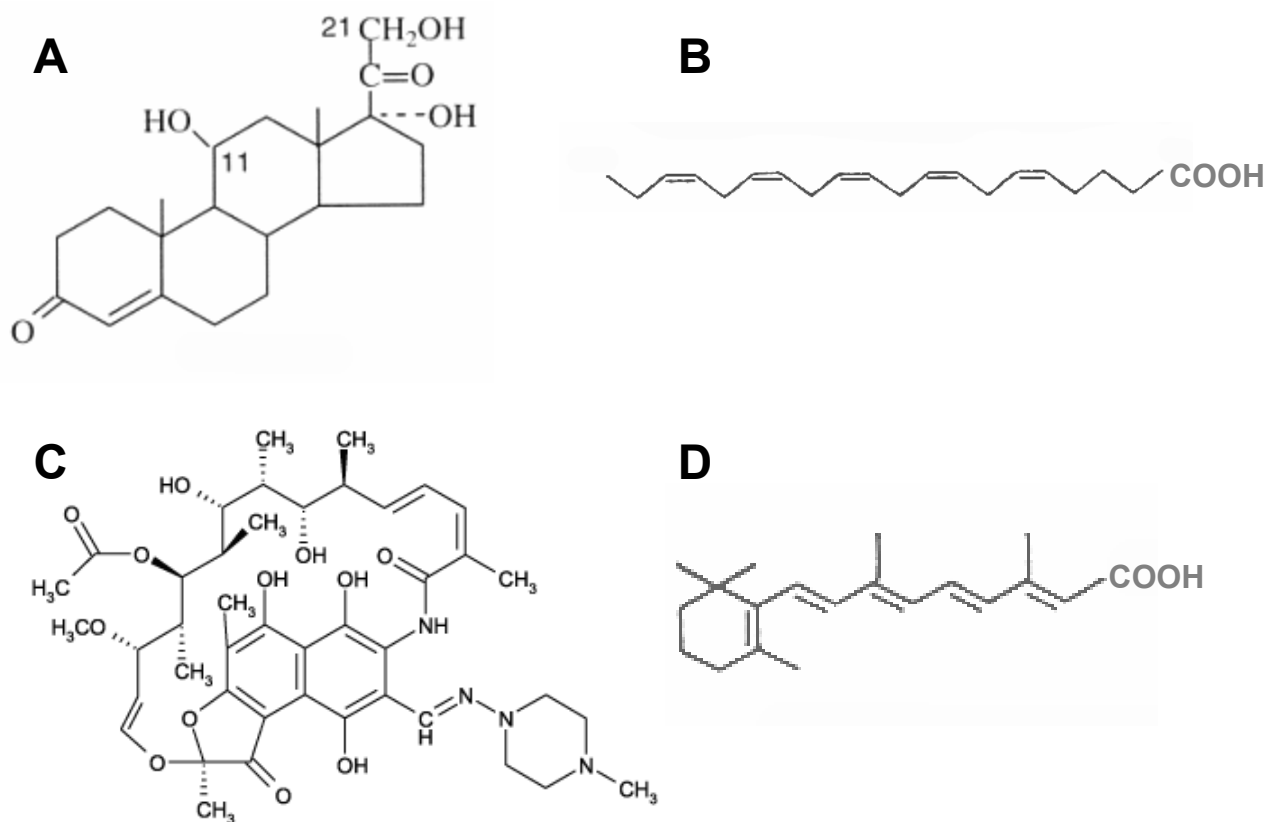


Fig. 43 : Quelques ligands de récepteurs nucléaires

A : Cortisol, ligand du récepteur aux glucocorticoïdes GR, **B** : Acide eicosapentaénoïque, ligand du récepteur PPAR (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor), **C** : Rifampicine (antibiotique), ligand d'origine exogène du récepteur PXR (Pregnane X Receptor) **D** : Acide rétinoïque tout-trans (all-trans RA), ligand des récepteurs de l'acide rétinoïque RAR (Retinoic Acid Receptor).

participant notamment à la régulation du métabolisme protéique et glucidique. Une fonction couramment retrouvée pour ces récepteurs stéroïdiens est la capacité de réguler la production de leur propre ligand par des mécanismes de rétrocontrôle.

Métabolisme lipidique

De nombreux récepteurs nucléaires non stéroïdiens possèdent pour ligands des intermédiaires du métabolisme lipidique, tels des acides gras. Contrairement aux hormones stéroïdes, ces ligands agissent de manière autocrine, c'est-à-dire qu'ils affectent la fonction de la cellule où ils sont produits. Dérivés de lipides d'origine alimentaire, ces ligands sont présents à forte concentration, mais possèdent une faible affinité pour leur récepteur nucléaire ($K_d=1$ à $10 \mu\text{M}$). La plupart de ces récepteurs agissent sous forme d'hétérodimère avec le partenaire commun RXR (**Figure 44**).

La faible affinité de ces récepteurs pour leurs ligands va de pair avec une faible spécificité. Chacun des membres du groupe des PPAR (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor) peut être activé par divers acides gras et dérivés, tel l'acide eicosapentaénoïque (**Figure 43.B** ; Dreyer et coll., 1993), mais aussi d'autres molécules d'origine endogène telle la prostaglandine PGJ2 pour PPAR γ (Kliewer et coll., 1995).

De nombreux gènes cibles de cette catégorie de récepteurs nucléaires codent pour des protéines impliquées dans le métabolisme lipidique, suggérant que la principale fonction de ces récepteurs est de constituer une interface entre les lipides leur servant de ligands et les enzymes régulant l'homéostasie lipidique. La fixation de leurs ligands par ces récepteurs active une cascade métabolique permettant le maintien de l'homéostasie lipidique grâce à la régulation de la transcription de gènes impliqués dans la synthèse, l'élimination, le transport et le stockage des lipides (Chawla et coll., 2001).

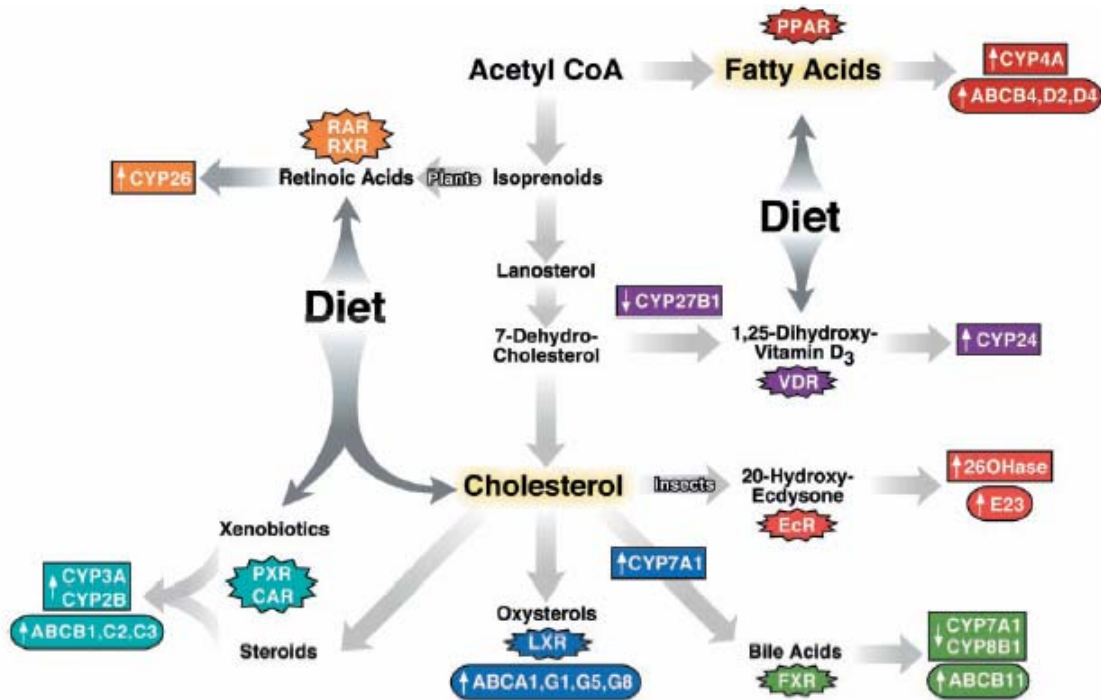


Fig. 44 : Voies du métabolisme lipidique contrôlées par les récepteurs nucléaires (d'après Chawla et coll., 2001)

A l'exception des molécules exogènes (xénobiotiques) et des hormones thyroïdiennes, tous les ligands des récepteurs nucléaires sont dérivés des voies de synthèse du cholestérol et des acides gras à partir de l'acétyl-coenzyme A. Les gènes régulés sont impliqués dans le catabolisme (membres du cytochrome P450 CYP) ou le transport (transporteurs ABC) des molécules lipidiques.

Certains récepteurs classés dans cette catégorie servent de médiateurs à une grande variété de drogues et de molécules d'origine purement exocrine, aussi nommées xénobiotiques. Chez l'homme, les récepteurs PXR (Pregnane X Receptor) et CAR (Constitutive Androstane Receptor) servent de médiateurs à différents xénobiotiques, tel l'antibiotique rifampicine, un ligand de PXR (**Figure 43.C** ; Blumberg et coll., 1998 ; Forman et coll., 1998). Les gènes cibles de ces deux récepteurs codent pour les protéines impliquées dans les processus de détoxification.

Autres voies de signalisation

Certains récepteurs nucléaires échappent à la classification précédente. Il s'agit des récepteurs à l'acide rétinoïque (RAR), aux hormones thyroïdes (TR) et à la vitamine D (VDR). Plus proches du second groupe du point de vue phylogénique, ces récepteurs sont aussi capables d'hétérodimériser avec RXR et la synthèse de leurs ligands dépend d'éléments exogènes (vitamine A pour l'acide rétinoïque, iode pour les hormones thyroïdiennes et lumière du soleil pour la vitamine D). En revanche, ces récepteurs présentent une forte affinité pour leurs ligands, comparable à celle des récepteurs stéroïdiens et leur rôle physiologique (régulation de multiples processus physiologiques) les rapproche d'un système endocrinien.

De nombreux processus développementaux, comme l'établissement de l'axe antéropostérieur ou la mise en place de la symétrie bilatérale, nécessitent l'activité acide rétinoïque (**Figure 43.D**). Lors de certains processus de morphogénèse, il a été démontré que l'acide rétinoïque exerce une activité paracrine ayant pour médiateurs les membres du groupe des récepteurs à l'acide rétinoïque (RAR α , β et γ ; Cho et De Robertis, 1990 ; Vermot et coll., 2005).

Des études chez le xénope ont montré que l'acide rétinoïque participait à l'établissement de l'axe dorso-ventral de la rétine (**Figure 45**). L'incubation de l'embryon avec une forte dose d'acide rétinoïque provoque une ventralisation de la rétine et l'utilisation d'un antagoniste

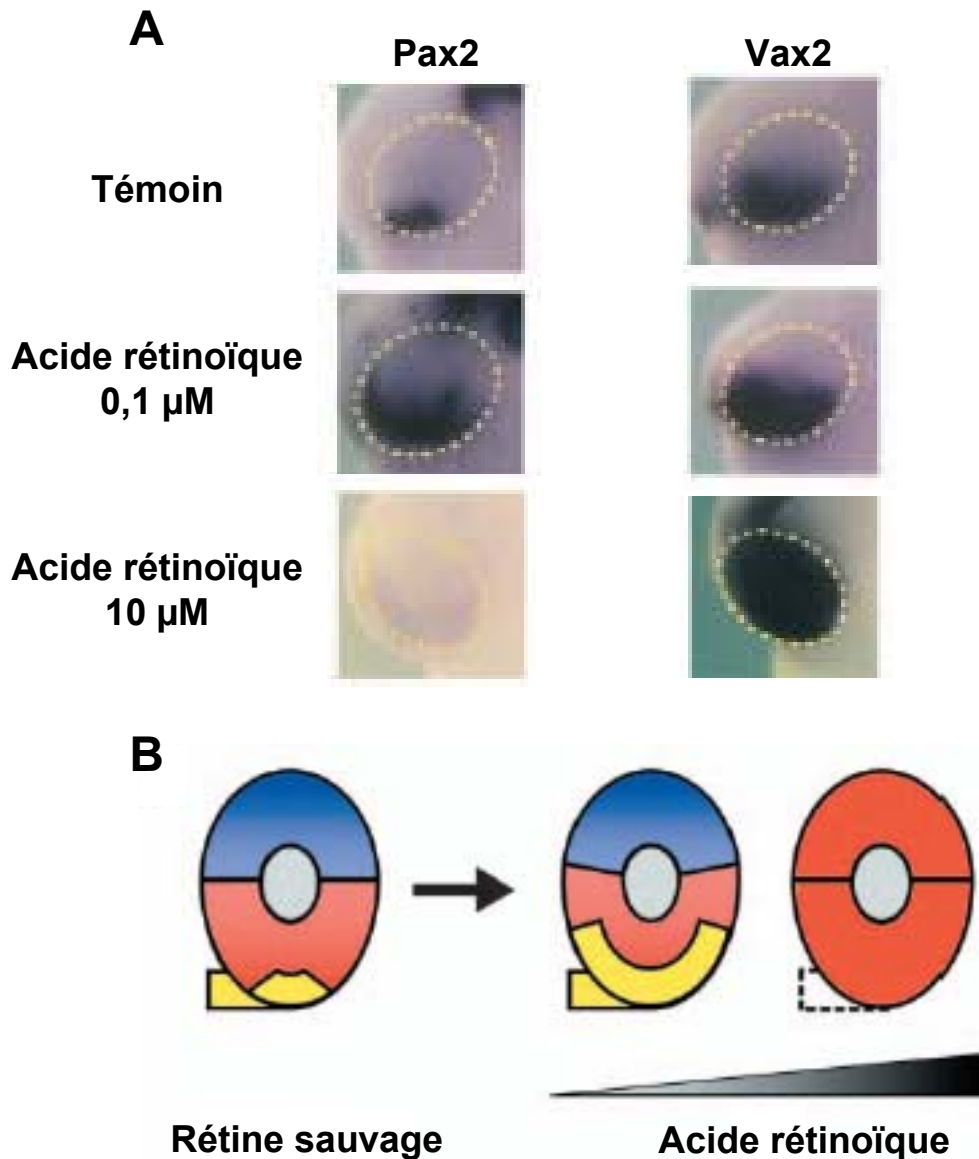


Fig. 45 : Influence de l'acide rétinoïque sur l'établissement de l'axe dorso-ventral de la rétine chez le xénope (Lupo et coll., 2001)

A : Marquages par hybridation *in situ* d'embryons au stade 33 (44 heures). Ces marquages montrent les modifications de l'expression de Pax2, un marqueur de la tige optique, et de Vax2, un marqueur de la rétine ventrale, suite à l'incubation de l'embryon avec différentes concentrations d'acide rétinoïque tout-trans. **B** : A gauche, représentation d'une rétine sauvage où les régions dorsale et ventrale sont représentées en bleu et rouge respectivement et la tige optique (futur nerf optique) en jaune. L'incubation de l'embryon avec une faible dose d'acide rétinoïque entraîne une extension de la région ventrale et de la tige optique et l'incubation avec une forte dose d'acide rétinoïque entraîne une ventralisation complète de la rétine.

spécifique des RAR indique qu'un ou plusieurs de ces récepteurs sont les médiateurs de cette activité. La localisation dans la rétine ventrale de la protéine Radlh3 (Retinal Deshydrogenase 3), une enzyme impliquée dans le métabolisme de l'acide rétinoïque, pourrait être à l'origine du gradient d'acide rétinoïque nécessaire à l'établissement de l'axe dorso-ventral de la rétine (Lupo et coll., 2005).

D. Mécanisme d'action des récepteurs nucléaires

Le mode d'activation de la transcription par de nombreux récepteurs nucléaires possédant un ou plusieurs ligands identifiés s'accorde avec le paradigme suivant : sous sa forme apo, c'est-à-dire non liée au ligand, le LBD est associé à des protéines ayant une fonction de corépresseur et le récepteur inhibe la transcription de ses gènes cibles. La fixation du ligand provoque un changement de conformation du LBD, entraînant la dissociation des corépresseurs puis le recrutement de protéines co-activatrices permettant la transcription des gènes cibles.

Fixation du ligand au LBD

L'affinité et la spécificité d'un récepteur nucléaire pour son ou ses ligands constituent un reflet de sa fonction, une haute affinité étant plutôt caractéristique d'un récepteur médiateur d'un système endocrine ou paracrine tandis que de faibles affinité et spécificité sont caractéristiques d'un système autocrine.

La taille de la poche de fixation du ligand située au sein du LBD constitue un des critères définissant sa spécificité. Bien que le mode de repliement du LBD (structure tertiaire) soit conservé entre les différents récepteurs nucléaires, les poches de fixation du ligand présentent une grande variété de tailles, pouvant aller de 30 à 1400 Å³ (Li et coll., 2003). La grande taille d'une poche permet la fixation de différents ligands avec une faible affinité, et est en général

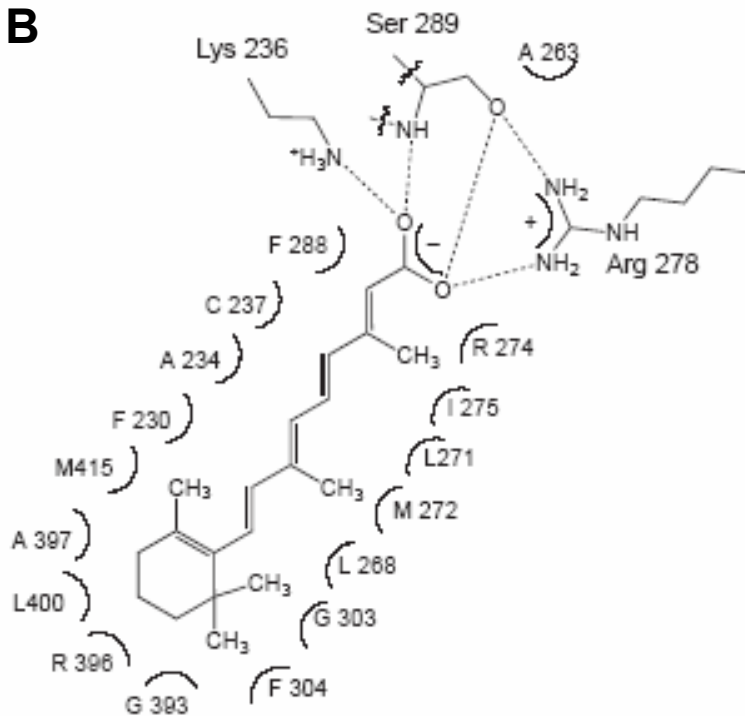
A**B**

Fig. 46 : Illustration de l'holo-LBD de RAR et diagramme de sa poche de fixation hydrophobe (d'après Wheatherman et coll., 1999)

A : Illustration du LBD du RAR sous sa forme holo, l'acide rétinolique tout-trans est représenté en rouge. **B** : Diagramme de la poche de fixation hydrophobe et de ses interactions avec l'acide rétinolique. Des résidus polaires tapissant la poche de fixation servent de points d'ancrage au ligand en établissant des liaisons ioniques ou hydrogènes (indiquées en pointillés) avec sa fonction acide, tandis que les résidus hydrophobes interagissent avec le squelette carboné du ligand via de multiples liaisons de Van Der Waals (schématisées par des arcs de cercle).

caractéristique d'un récepteur participant à un système autocrine. A l'inverse, une poche de taille réduite ne permettra la fixation que d'un ligand unique ou en nombre limité mais avec une forte affinité, et est d'ordinaire caractéristique d'un récepteur fortement sélectif et participant à un système endocrine.

La spécificité de la poche de fixation est aussi définie par sa forme et par la nature des résidus la tapissant. La plupart des résidus formant la poche de fixation sont hydrophobes et une concordance de taille et de forme entre cette poche et le ligand permet l'établissement d'un maximum d'interactions hydrophobes. Des résidus de nature polaire et généralement situés au fond de la poche de fixation servent de points d'ancrage au ligand, établissant des liaisons hydrogènes avec les fonctions polaires du ligand (**Figure 46**; Wheatherman et coll., 1999).

Les protéines co-régulatrices

Les récepteurs nucléaires modulent la transcription de leurs gènes cibles via le recrutement de protéines co-régulatrices (Privalsky, 2004). Les premiers corépresseurs identifiés furent les paralogues SMRT (Silencing Mediator of Retinoid and Thyroid receptor) et N-CoR (Nuclear receptor Co-Repressor ; Chen et Evans, 1995 ; Hörlein et coll., 1995), alors que SRC-1 constitue un des principaux co-activateurs des récepteurs nucléaires (Steroid Receptor Co-activator 1 ; Onate et coll., 1995).

Mécanisme de recrutement des protéines co-régulatrices

Différentes études, notamment l'établissement des structures cristallographiques des formes apo et holo de certains LBD, ont conduit à une compréhension très détaillée des mécanismes d'échange entre corépresseurs et co-activateurs. La fonction de transactivation ligand dépendante AF-2 est souvent associée à l'hélice C-terminale du LBD, ou hélice H12 (Bourguet et coll., 1995).

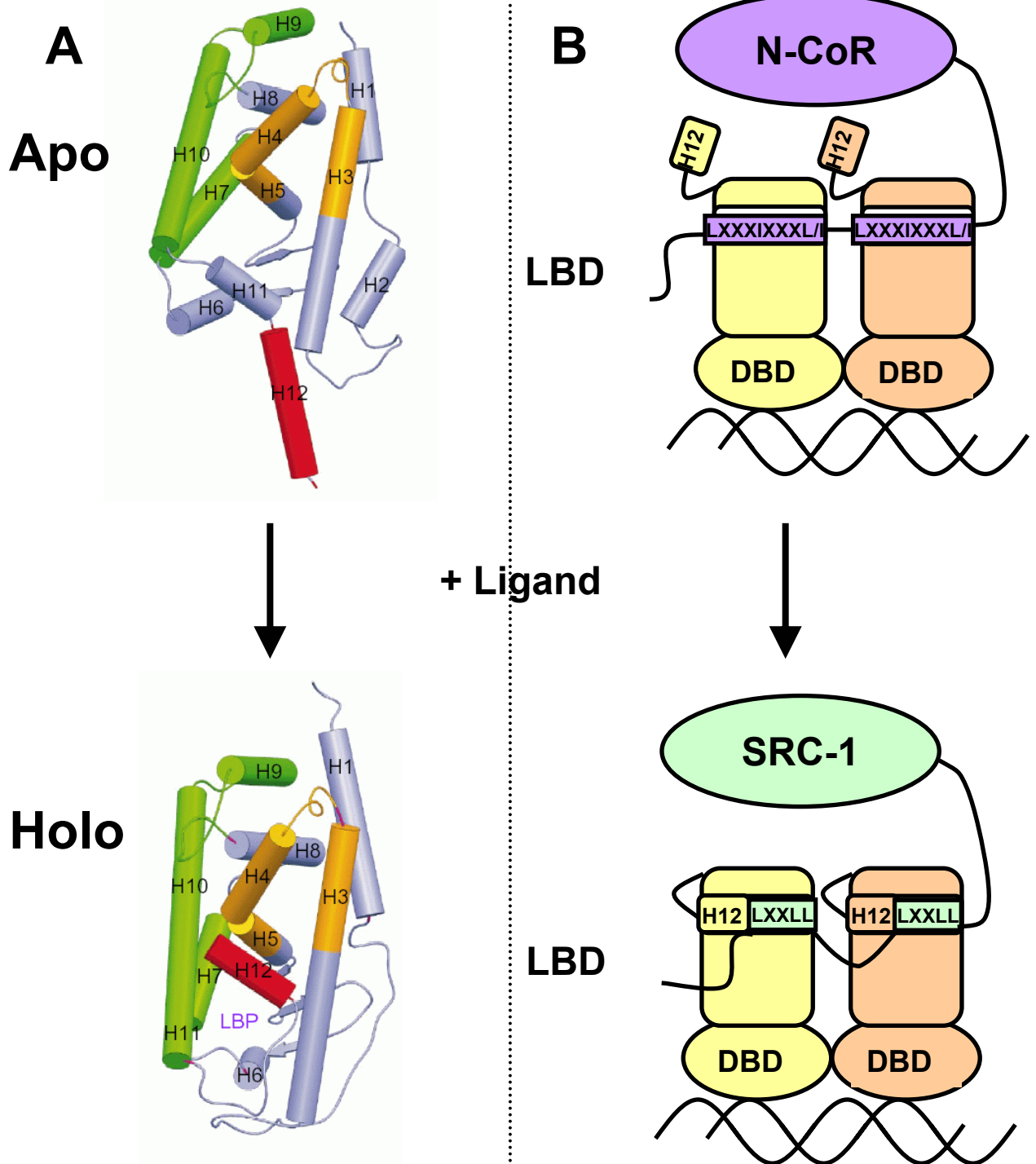


Fig. 47 : Illustration du changement de conformation induit par la fixation du ligand au LBD (A) et modèle de l'échange ligand dépendant des protéines co-régulatrices (B)

A : Formes apo et holo du LBD d'un récepteur nucléaire. La fixation du ligand dans la poche de fixation (LBP) provoque le repliement de l'hélice H12 au sein d'un sillon formé par les hélices 3, 4, 10 et 11. **B** : Un dimère de récepteurs nucléaires recrute le corépresseur N-CoR via deux domaines d'interaction N-terminaux (motif LXXXIXXXL/I). La fixation de leurs ligands par les récepteurs nucléaires entraîne un repositionnement de l'hélice H12 ayant pour conséquence le largage du co-répresseur N-CoR et le recrutement du co-activateur SRC-1 via deux domaines d'interaction N-terminaux (motif LXXLL).

Corépresseurs et co-activateurs lient le récepteur nucléaire selon des modalités assez proches, ce qui explique que leurs fixations soit mutuellement exclusives. Sur le LBD, les hélices 3, 4, 10 et 11 forment un sillon hydrophobe servant de surface d'interaction commune aux corépresseurs et co-activateurs (Nagy et Schwabe, 2004 ; Nettles et Greene, 2005).

Les domaines d'interaction portés par les corépresseurs et les co-activateurs sont aussi similaires entre eux : il s'agit d'une hélice- α amphipathique, c'est-à-dire dont une des faces est composée uniquement de résidus hydrophobes, présentant une longueur significativement plus longue pour les co-répresseurs : des motifs caractéristiques de ces hélices ont été identifiés : LXXLL pour les domaines d'interaction des co-activateurs et LXXXIXXXL/I pour ceux des corépresseurs (Heery et coll., 1997 ; Hu et Lazar, 1999).

En l'absence de ligand, la taille du sillon hydrophobe est adaptée à celle de l'hélice- α amphipathique formant le domaine d'interaction du corépresseur. La fixation du ligand va induire un repositionnement de l'hélice H12 au sein du sillon hydrophobe (**Figure 47.A**), rendant sa longueur incompatible avec le domaine d'interaction des corépresseurs mais maintenant adaptée à celui des co-activateurs, entraînant ainsi un échange entre corépresseurs et co-activateurs. Des protéines co-régulatrices, telles N-CoR et SMRT, comportent couramment plusieurs domaines d'interaction distincts et sont susceptibles d'interagir simultanément avec les deux partenaires d'un dimère (**Figure 47.B**).

E. Récepteurs orphelins et endocrinologie inverse

C'est l'information fournie par la séquence des premiers récepteurs clonés qui a permis d'identifier l'ensemble des membres de cette superfamille grâce aux homologies de séquences. N'étant pas définie par rapport à un ligand, cette recherche a conduit à l'identification de récepteurs nucléaires orphelins : récepteurs pour lesquels aucun ligand n'était associé au moment de leur découverte. Avec la découverte de ces récepteurs orphelins

est apparu le concept d'endocrinologie inverse. Ce concept regroupe l'ensemble des approches permettant l'identification d'un ligand à partir de l'étude de son récepteur (Kliwer et coll., 1999). Une approche utilisée communément en endocrinologie inverse est basée sur l'autonomie du LBD des récepteurs nucléaires : fusionné à un DBD hétérologue, le LBD d'un récepteur nucléaire confère sa fonction de transactivation ligand dépendante à la protéine hybride. (Brasemann et coll., 1993). Un essai fonctionnel utilisant cette propriété du LBD permet de tester des molécules candidates pour leur capacité à moduler l'activité du LBD. Cette approche a conduit à de nombreux succès et a permis l'identification de ligands endogènes pour RAR, RXR et d'autres récepteurs nucléaires (De Urquiza et coll., 2000 ; Blumberg et coll., 1996). Plus récemment, des essais purement biochimiques et basés sur la modulation par le ligand de l'affinité du LBD avec les domaines d'interaction des protéines co-régulatrices ont été développés (Shiau et coll., 2001).

A l'origine utilisé pour l'identification des ligands endogènes des récepteurs orphelins, le concept d'endocrinologie inverse s'est étendu à la recherche de molécules agonistes ou antagonistes d'origine synthétique. La recherche de molécules agonistes pour les récepteurs liés au métabolisme lipidique a notamment permis d'identifier des drogues présentant une forte affinité pour ces récepteurs, affinité comparable celle des hormones stéroïdiennes. Le criblage à grande échelle de banques de molécules synthétiques a ainsi permis d'identifier des drogues d'intérêt thérapeutique tels des dérivés de la thiazolidinedione agissant comme ligands des membres du groupe des PPAR (Lehmann et coll., 1995).

La découverte des récepteurs orphelins a aussi conduit à une controverse portant sur l'existence ou non d'une capacité commune à fixer un ligand pour l'ensemble des membres de la superfamille. Différentes données suggèrent que la capacité de fixation à un ligand a été acquise de manière indépendante par différents récepteurs nucléaires au cours de l'évolution,

ce qui plaiderait en faveur de l'existence de récepteurs ligand indépendants. Un argument supportant cette hypothèse est l'absence de corrélation entre la position phylogénique d'un récepteur et la nature de son ou ses ligands. Ainsi, les différents récepteurs membres du groupe NR1, tels les récepteurs RAR, TR et PPAR, possèdent des ligands endogènes provenant de voies métaboliques totalement différentes. A l'inverse, plusieurs membres du groupe NR1, comme LXR, sont capables de fixer des dérivés du cholestérol à l'instar des membres du groupe NR3, c'est-à-dire celui des récepteurs aux hormones stéroïdes (Escriva et coll., 1997 ; Escriva et coll., 2000).

L'existence de récepteurs nucléaires ligand indépendants a pu être mise en évidence grâce à l'établissement de la structure cristallographique de leur LBD. La structure du LBD de Nurr1 (NR4A2) et de son orthologue drosophilien DHR38 montre une absence de poche de fixation hydrophobe indiquant que ces récepteurs nucléaires constituent de véritables orphelins (Baker et coll., 2003 ; Wang et coll., 2003). D'autres données provenant d'études structurales suggèrent que cette absence de poche de fixation est un trait commun à l'ensemble du groupe NR4 (Benoit et coll., 2004 ; Ingraham et Redinbo, 2005). Un autre cas de figure est celui de récepteurs dont le LBD présente une poche de fixation, mais celle-ci est fermée et non accessible, ceci est notamment le cas de l'orthologue murin de LRH-1 (NR5A2 ; Sablin et coll., 2003).

Ainsi, les travaux d'endocrinologie inverse et les informations fournies par l'étude structurale de différents LBD ont démontré que, hormis au sein du groupe NR4, la majorité des récepteurs nucléaires possèdent un ligand. Cependant, la question de l'existence d'un ligand endogène persiste pour plusieurs récepteurs ne possédant soit aucun ligand identifié, soit uniquement des ligands d'origine synthétique (**Tableau 2**). De futurs travaux devraient permettre de lever la controverse portant sur l'existence d'un ligand endogène pour ces récepteurs encore orphelins.

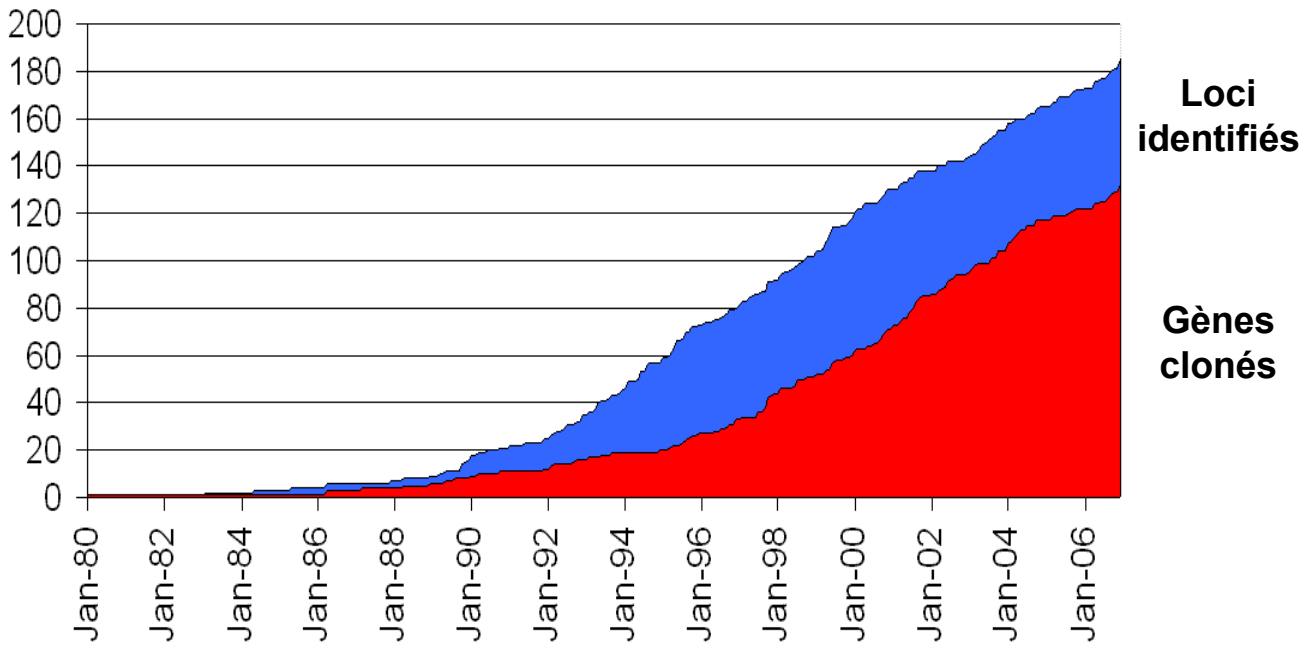


Fig. 48 : Evolution sur la période 1980-2002 du nombre de gènes clonés (rouge) et de loci identifiés (bleu) liés à des pathologies rétiniennes

PROBLEMATIQUE

Les dégénérescences rétiniennes sont des maladies héréditaires extrêmement hétérogènes du point de vue génétique. A l'heure actuelle, plus de 180 loci contenant des gènes responsables de ces dystrophies ont été identifiés et ce nombre ne cesse de croître (**Figure 48**). Ceci complique sérieusement l'approche thérapeutique par remplacement bien qu'elle ait démontré son efficacité dans le cas du gène RPE65 (Acland et coll., 2001). De plus, cette approche est limitée aux mutations récessives et aux formes dominantes présentant un phénomène d'haploinsuffisance et n'est pas directement applicable aux autres formes dominantes.

Les dégénérescences rétiniennes monogéniques touchent près de 40.000 patients en France, ce qui représente globalement un effectif trop restreint vu les coûts élevés du développement d'une stratégie thérapeutique pour chaque gène identifié. Cette constatation a conduit à développer des approches par neuroprotection applicables selon des modalités plus larges. Ainsi les facteurs trophiques GDNF et CNTF sont évalués dans divers modèles animaux de la pathologie mais aussi chez l'homme (Sieving et coll., 2006). Notre laboratoire s'est intéressé à élucider les mécanismes conduisant à la cécité dans un modèle de dégénérescence séquentielle des photorécepteurs, la rétinite pigmentaire. Une proportion statistiquement significative des RP présente des mutations dans des gènes exprimés exclusivement par les bâtonnets, tel celui de la rhodopsine. Cependant, chez ces patients, ainsi que dans l'ensemble des modèles d'élimination sélective des bâtonnets, les cônes sont systématiquement affectés secondairement. Compte tenu de l'importance majeure des cônes pour la vision chez l'homme, leur dégénérescence secondaire représente le principal handicap pour les patients souffrant de RP. Nous avons étudié cette séquence d'évènements chez la souris *rd1/rd1*, qui porte une mutation sur le gène de la sous unité β de la phosphodiesterase des bâtonnets (**Figure 49**). En transplantant des photorécepteurs sains chez une souris ayant perdu ses

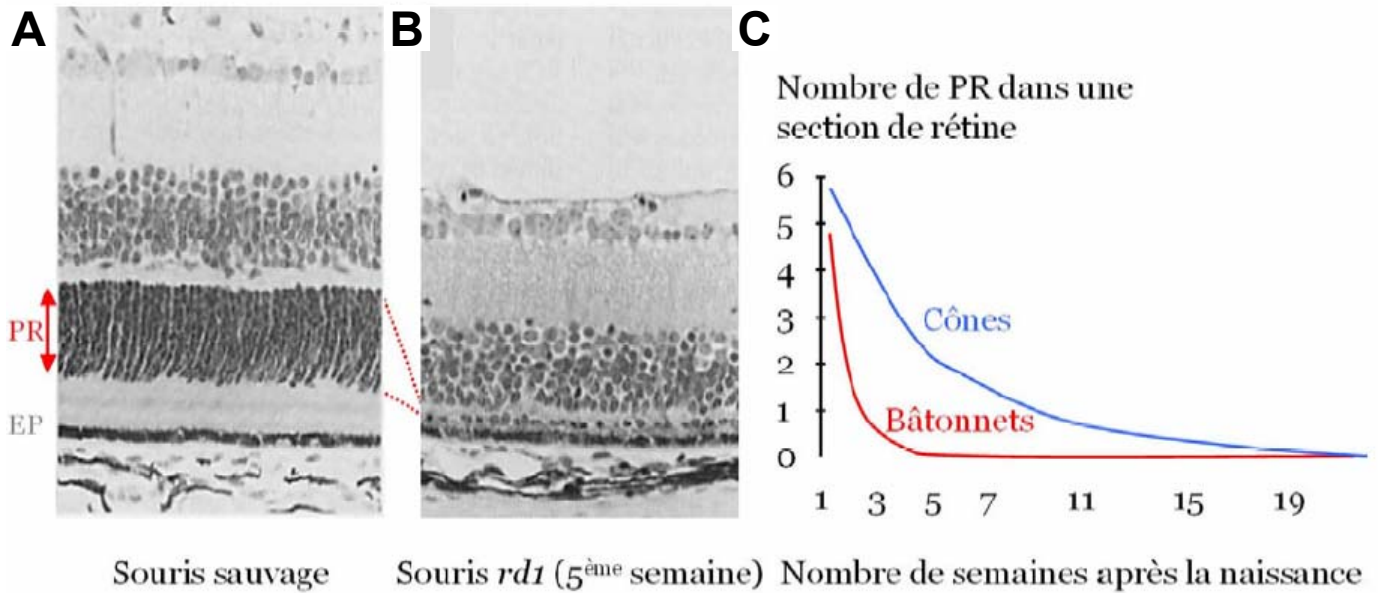


Fig. 49 : Dégénérescence rétinienne chez la souris *rd1/rd1*

A, B : Coupes histologiques de rétines de souris sauvage (**A**) et mutante *rd1/rd1* (**B**) cinq semaines après la naissance. La couche des photorécepteurs a pratiquement disparu chez la souris mutante. **C** : Diagrammes montrant l'évolutions des populations de bâtonnets et cônes chez la souris *rd1/rd1* et illustrant le phénomène de dégénérescence séquentielle des bâtonnets puis des cônes. PR : couche des photorécepteurs, EP : épithélium pigmentaire rétinien.

bâtonnets, nous avons pu observer un ralentissement de la dégénérescence secondaire des cônes alors que ceux-ci n'expriment pas le gène responsable de la pathologie (Mohand-Saïd et coll., 1997 ; Sahel et coll., 2001). Nous avons ensuite démontré que cet effet était lié à la sécrétion de protéines par les bâtonnets, protéines nécessaires à la survie des cônes. Ainsi, la perte des bâtonnets par apoptose chez la souris *rdl/rdl*, mais aussi chez les patients avec une RP résultant des mutations spécifiquement exprimées par les bâtonnets, résulterait en une perte d'expression des facteurs de survie des cônes entraînant secondairement leur dégénérescence. Prévenir la perte secondaire des cônes par restauration de cette signalisation représente une approche thérapeutique généralisable à la majorité des RP. Ainsi, et pour reprendre une citation de Alan Wright, préserver les cônes permettraient de prévenir la cécité chez 1,5 million de personnes de part le monde (Wright, 1997). De plus, cette approche laisse aux médecins une large fenêtre thérapeutique puisque les patients perdent généralement les cônes à l'âge adulte et sur plusieurs années. Ajoutons aussi que la perte de 50% des cônes n'a aucune influence sur l'acuité visuelle, ce qui laisse entrevoir qu'un traitement, même limité, aurait des effets bénéfiques (Geller et Sieving, 1993).

Guidé par cette perspective, notre laboratoire a développé une approche systématique dérivée de la génomique fonctionnelle qui a permis l'identification d'un clone codant pour RdCVF (Rod-derived Cone Viability Factor) parmi 210.000 clones testés dans un modèle de survie des cônes. RdCVF est une protéine de 109 acides aminés présentant l'ensemble des caractéristiques du facteur sécrété par les bâtonnets et nécessaire à la survie des cônes. L'homologie de RdCVF avec la famille des thiorédoxines indique une probable implication du stress oxydatif dans la dégénérescence secondaire des cônes (Komeima et coll., 2006).

RdCVF est un facteur avec un potentiel thérapeutique important et constitue le sujet majeur des études au laboratoire. Ayant démontré la capacité de RdCVF à prévenir la dégénérescence des cônes dans plusieurs modèles de RP, nous nous intéressons plus particulièrement à sa

capacité à prévenir le déficit fonctionnel lié à la perte des cônes. En effet, les études des mécanismes de la mort neuronale ont démontré le rôle crucial des caspases dans ces processus, or bloquer par des inhibiteurs l'activité de ces enzymes conduit à un état de fantôme cellulaire non fonctionnel. De plus, la survie de cellules non fonctionnelles peut conduire à la formation de tumeurs (Zhivotsky et Orrenius, 2006). La fonction des cônes étant dépendante de leur état de différenciation, je me suis intéressé tout particulièrement au facteur de transcription NR2E3, un récepteur nucléaire impliqué chez l'homme dans une rétinopathie accompagnée d'un défaut de différenciation des cônes (Haider et coll., 2000).

Mutations <i>NR2E3</i>	Rétinopathies associées
$\Delta 67-69$	CPRD, ESCS, GFS
R76Q	ESCS
R76W	ESCS
R97H	ESCS
R104Q	ESCS
R104W	ESCS
E121K	ESCS
W234S	ESCS
A256E	CPRD
R309G	ESCS
R311Q	CPRD, ESCS, GFS, RP
R334G	ESCS
Q350Stop	ESCS
R385P	ESCS
M407K	ESCS

Tab. 3 : Liste des mutations pathogènes de *NR2E3* et des rétinopathies associées

CPRD : Clumped Pigmentary Retinal Degeneration. ESCS : Enhanced S-cone Syndrome. GFS : Goldmann-Favre Syndrome. RP : Rétinite Pigmentaire.

RESULTATS

Historique de l'ESCS et de la souris *rd7/rd7*

Le syndrome d'hypersensibilité à la lumière bleue ou ESCS, une rétinopathie de type autosomal récessif, constitue l'unique dégénérescence rétinienne humaine présentant un gain de fonction des photorécepteurs. Outre une sensibilité excessive aux longueurs d'onde courtes, cette rétinopathie est aussi caractérisée par une cécité nocturne précoce ainsi que par d'autres symptômes d'incidence variable : diminution de l'acuité visuelle, photophobie, constriction du champ visuel et diverses anomalies morphologiques du fond d'œil, les plus courantes étant la présence d'amas de pigments nummulaires, c'est-à-dire en forme de pièce de monnaie, localisés au niveau de l'épithélium pigmentaires et des anomalies kystiques de la macula (Jacobson et coll., 1990 ; Haider et coll., 2000 ; Audo et coll., soumis).

Différentes études ont permis de décrire l'évolution de la maladie d'un point de vue histologique. L'exploration tomographique (OCT : Optical Coherence Tomography) de la rétine *in vivo* montre que celle-ci présente une épaisseur anormalement importante à un stade précoce de la maladie tandis qu'apparaissent des altérations de l'architecture rétinienne aux stades plus tardifs (Jacobson et coll., 2004). L'examen post-mortem d'un patient âgé de 77 ans a révélé un large excès de cônes bleus accompagné d'un déficit des autres cônes et d'une absence de bâtonnets (Milam et coll., 2002).

Cette dégénérescence est causée par des mutations récessives, la plupart de type faux-sens, du gène codant pour le récepteur nucléaire NR2E3 (Haider et coll., 2000). D'autres rétinopathies ont aussi été associées à des mutations récessives de *NR2E3* : le syndrome de Goldmann-Favre ainsi que certains cas de RP et de "Clumped Pigmentary Retinal Degeneration" (**Tableau 3** ; Gerber et coll., 2001 ; Sharon et coll., 2003 ; Nakamura et coll., 2004 ; Wright et coll., 2004 ; Chavala et coll., 2005 ; Hayashi et coll., 2005).

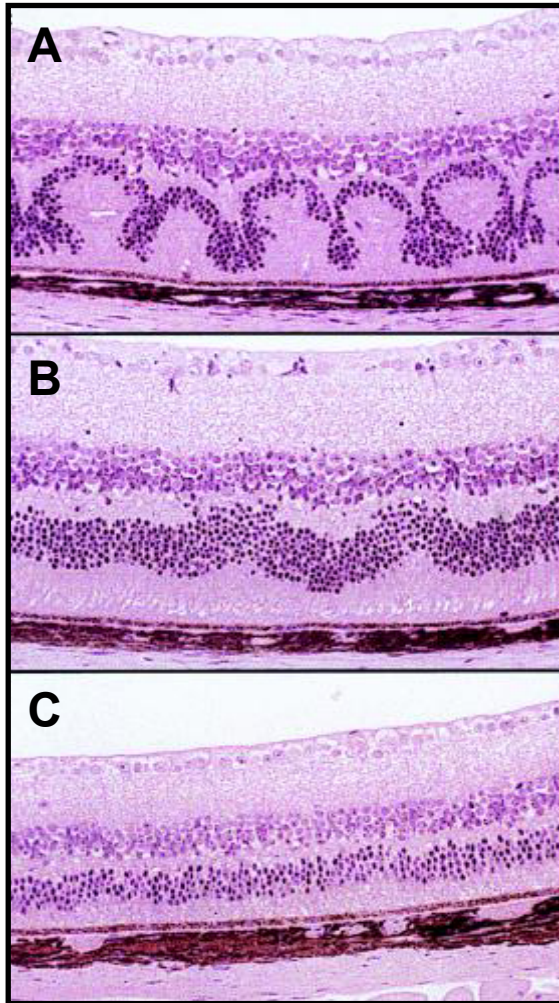


Fig. 50 : Coupes histologiques de rétines de souris *rd7/rd7* à 1 mois (A), 5 mois (B) et 16 mois (C) (d'après Akhmedov et coll., 2000)

La variété des pathologies associées aux mutations récessives de *NR2E3* a conduit certains chercheurs à redéfinir l'ESCS sur la base des symptômes communs à l'ensemble de ces maladies, ceux-ci étant une cécité nocturne et un électrorétinogramme dominé par les voies sensibles aux longueurs d'onde courtes (Audo et coll., soumis).

La souris *rd7/rd7* constitue un modèle animal de dégénérescence rétinienne autosomale récessive causée par l'insertion d'un transposon du type L1 au sein de l'exon 5 du gène *Nr2e3* (Akhmedov et coll., 2000 ; Chen et coll., 2006). Cette dégénérescence fut initialement caractérisée par l'apparition transitoire de taches blanches sur le fond d'œil et par un électrorétinogramme d'amplitude réduite (Hawes et coll., 1999).

L'examen histologique de la rétine *rd7/rd7* a révélé que les taches blanches avaient pour origine une dysplasie rétinienne elle aussi transitoire. Cette dysplasie concerne essentiellement la couche nucléaire externe, elle débute à P10, c'est-à-dire peu après la fin de la rétino-genèse, progresse jusqu'à l'âge adulte avant de s'atténuer pour avoir complètement disparu vers l'âge de 5 mois (Akhmedov et coll., 2000 ; Haider et coll., 2001). A l'âge de 16 mois, une nette diminution de la couche nucléaire externe est visible, indiquant une dégénérescence tardive des photorécepteurs (**Figure 50** ; Akhmedov et coll., 2000).

Des analyses immunohistochimiques chez la souris *rd7/rd7* ont mis en évidence un large excès de cônes, en particulier ceux exprimant l'opsine S (approximativement 2 fois plus que chez la souris non mutée ; Haider et coll., 2001). L'utilisation de la microscopie électronique a révélé que ces cônes bleus surnuméraires présentaient une morphologie normale alors que la majorité des autres photorécepteurs possédait une structure hybride présentant à la fois des caractéristiques morphologiques de cônes et de bâtonnets. L'expression exclusive de la rhodopsine, c'est-à-dire le pigment visuel des bâtonnets, par ces photorécepteurs hybrides

suggère que ceux-ci correspondent à la population des bâtonnets normaux chez une souris non mutée (Corbo et Cepko, 2005).

La mutation de *Nr2e3* et l'excès de cônes bleus observé chez la souris *rd7/rd7* font de celle-ci un modèle pour l'ESCS. Cependant, d'importantes différences fonctionnelles ont pu être constatées entre le phénotype murin et certaines caractéristiques de la pathologie humaine. Une étude électrorétinographique de la souris *rd7/rd7* a montré que l'activité des cônes bleus n'était pas altérée et que celle des bâtonnets était partiellement préservée alors que les patients humains affectés par l'ESCS présentent une hyperactivité des cônes bleus et une cécité nocturne résultant d'une absence d'activité des bâtonnets (Ueno et coll., 2005).

Plusieurs hypothèses sur le rôle de NR2E3 ont été émises en se basant sur les phénotypes humains et murins. L'excès de cônes bleus suggère que les mutations de *NR2E3* pourraient avoir pour conséquence soit un défaut dans le choix entre cône et bâtonnet, soit une levée de l'inhibition par NR2E3 de la prolifération des précurseurs des cônes. La cécité nocturne des patients humains, la morphologie anormale des bâtonnets et la dégénérescence tardive des photorécepteurs observées chez la souris *rd7/rd7* indiquent aussi que NR2E3 est impliqué dans la maturation et la survie des photorécepteurs à bâtonnet.

La détermination du patron d'expression de NR2E3 a permis de préciser la fonction de NR2E3. Alors que la technique d'hybridation *in situ* avait conduit à des résultats controversés, une équipe observant son expression dans les cellules gliales de Müller et l'épithélium pigmentaire (Chen et coll., 1999), d'autres équipes dans la couche nucléaire externe (Kobayashi et coll., 1999 ; Akhmedov et coll., 2000), la mise au point d'anticorps dirigés contre NR2E3 a permis de montrer que ce récepteur est exprimé spécifiquement par les bâtonnets (Bumsted O'Brien et coll., 2004 ; Cheng et coll., 2004 ; Chen et coll., 2005 ; Peng

et coll., 2005). Chez la souris, la protéine NR2E3 est détectable vers P0 et son ARNm vers E18, c'est-à-dire peu après l'apparition des derniers précurseurs des cônes (Yanagi et coll., 2002 ; Cheng et coll., 2004 ; Chen et coll., 2005 ; Peng et coll., 2005). L'expression spécifique de NR2E3 par les bâtonnets plaide en faveur de l'hypothèse selon laquelle l'excès de cônes bleus a pour origine un défaut dans le choix entre cône et bâtonnet plutôt qu'un excès de prolifération des précurseurs des cônes.

Associée aux phénotypes des patients humains et de la souris *rd7/rd7*, l'expression spécifique de ce récepteur nucléaire dans les photorécepteurs à bâtonnet et leurs précurseurs suggère une fonction de régulateur de la transcription de gènes impliqués dans la spécification et la différenciation terminale des bâtonnets. Des analyses des modifications du transcriptome de la souris *rd7/rd7* ont permis d'identifier des gènes cibles et de préciser la fonction transcriptionnelle de NR2E3.

La comparaison des transcriptomes rétiniens des souris *rd7/rd7* et non mutée par la technique des puces à ADN a montré la surexpression de nombreux gènes spécifiques des cônes (Chen et coll., 2005 ; Corbo et Cepko, 2005). L'examen des patrons d'expression des gènes surexprimés chez la souris *rd7/rd7* permet de distinguer deux classes : une correspondant à des gènes dont l'expression est augmentée dans l'ensemble des photorécepteurs, et une autre correspondant à des gènes dont l'élévation du niveau d'expression correspond aux cônes bleus surnuméraires. Parmi la première classe se trouvent des gènes impliqués dans la cascade de phototransduction chez les cônes, tels ceux codant pour la transducine *Gnat2* et la phosphodiesterase *Pde6c* spécifiques des cônes, tandis que l'opsine S est un des membres de la seconde classe (Corbo et Cepko, 2005). Ces analyses ont aussi montré que le transcrit muté de *Nr2e3* est surexprimé chez la souris *rd7/rd7* alors que l'expression des facteurs de

	Gènes analysés	<i>Nrl</i> ^{-/-}	<i>Crx::Nr2e3/Nrl</i> ^{-/-}
Gènes spécifiques des cônes	<i>Opsine S</i>	+	-
	<i>Opsine L</i>	+	-
	<i>Arr3</i>	+	-
	<i>Gnat2</i>	+	-
	<i>Pde6c</i>	+	-
	<i>Clca2</i>	+	-
Gènes spécifiques des bâtonnets	<i>Rhodopsine</i>	-	+
	<i>Cnga1</i>	-	+
	<i>Pde6b</i>	-	NC
	<i>Gnat1</i>	-	NC

Tab. 4 : Modulation par NR2E3 de la transcription des gènes liés à la phototransduction chez la souris *Nrl*^{-/-} (Cheng et coll., 2006)

La première colonne correspond à une liste non exhaustive de gènes liés à la phototransduction et dont l'expression est modifiée chez la souris *Nrl*^{-/-}. La seconde colonne indique les modifications du niveau d'expression de ces gènes chez la souris *Nrl*^{-/-}. La troisième colonne indique les modifications du niveau d'expression de ces gènes chez la souris *Crx::Nr2e3/Nrl*^{-/-} par rapport à la souris *Nrl*^{-/-}. Les gènes analysés sont : l'arrestine des cônes (*Arr3*), la transducine des cônes (*Gnat2*), la sous unité β de la phosphodiésterase des cônes (*Pde6c*), le canal à chlore calcium dépendant (*Cacl3*), le canal cGMP dépendant α -1 (*Cnga1*) la sous unité β de la phosphodiésterase des bâtonnets (*Pde6b*) et la transducine des bâtonnets (*Gnat1*). NC : pas de modification du niveau d'expression.

transcription CRX et NRL n'est pas modifiée, suggérant que NR2E3 régule négativement sa propre expression (Chen et coll., 2005 ; Corbo et Cepko, 2005).

Une autre technique utilisée pour l'identification des gènes cibles de NR2E3 a été la co-immunoprécipitation de la chromatine avec un anticorps dirigé contre ce récepteur. Cette approche a montré que NR2E3 occupe les promoteurs et enhancers de nombreux gènes spécifiques des cônes et des bâtonnets (Peng et coll., 2005). L'analyse par RT-PCR de gènes identifiés par cette approche montre une surexpression des gènes spécifiques des cônes mais aussi une sous-expression des gènes spécifiques des bâtonnets que les études utilisant les puces à ADN n'avaient pas révélée (Chen et coll., 2005 ; Corbo et Cepko, 2005 ; Peng et coll., 2005).

Des souris surexprimant NR2E3 ont été produites sur différents fonds génétiques. Notamment une souris portant un transgène codant pour NR2E3 sous le contrôle d'un promoteur CRX a été générée sur un fond génétique *Nrl*^{-/-} (souris *Crx::Nr2e3/Nrl*^{-/-} ; rappelons que la souris *Nrl*^{-/-} est dépourvue de bâtonnets, remplacés par des cônes bleus, et n'exprime pas NR2E3). L'expression ectopique de NR2E3 chez la souris *Nrl*^{-/-} réduit la dysplasie rétinienne, inhibe la différenciation des cônes et permet la génération de bâtonnets, ceux-ci expriment la rhodopsine et présentent une morphologie proche de la normale bien qu'ils soient cependant non fonctionnels (Cheng et coll., 2006).

L'analyse du transcriptome de la souris *Crx::Nr2e3/Nrl*^{-/-} confirme pour NR2E3 le rôle d'inhibiteur de la transcription des gènes spécifiques des cônes, dont ceux des opsines S et L, et d'activateur d'un sous-ensemble restreint de gènes spécifiques des bâtonnets, dont celui de la rhodopsine (**Tableau 4** ; Cheng et coll., 2006).

Plusieurs études ont permis de commencer l'élucidation des mécanismes moléculaires à l'origine de cette double fonction d'activateur et d'inhibiteur de la transcription. En tant que

récepteur nucléaire, NR2E3 possède un DBD central et un LBD C-terminal (Chen et coll., 1999 ; Kobayashi et coll., 1999). NR2E3 lie l'ADN sous forme d'homodimère et sous forme d'hétérodimère avec RXR et RAR (Chen coll. 1999 ; Kobayashi et coll., 1999). Une séquence consensus de fixation a été identifiée par sélection *in vitro* : 5'-(A/G)AG(A/G)TCAA A(A/G)(A/G)TCA-3' (Chen et coll., 2005). Les capacités d'inhibition transcriptionnelle du LBD de NR2E3 en l'absence de ligand ont été mises en évidence dans le contexte de la protéine entière et dans celui d'une protéine de fusion composée du DBD de Gal4 fusionné au LBD de NR2E3 (Gal4-NR2E3^{LBD} ; Chen et coll., 1999 ; Chen et coll., 2005).

Les interactions physiques et fonctionnelles de NR2E3 avec plusieurs facteurs de transcription impliqués dans la différenciation de photorécepteurs ont été établies. Il a été démontré que NR2E3 interagissait directement avec CRX et le récepteur nucléaire orphelin NR1D1 (Reverba ; Cheng et coll., 2004 ; Peng et coll., 2005). L'existence d'un complexe protéique contenant ces trois protéines ainsi que le facteur NRL a aussi été mis en évidence (Cheng et coll., 2004). Des études *in vitro* ont démontré que NR2E3, CRX et NRL activent de manière synergique des promoteurs de gènes spécifiques des bâtonnets et que NR2E3 réprime l'activation de promoteurs de gènes spécifiques des cônes par CRX (Cheng et coll., 2004 ; Peng et coll., 2005).

La double fonction transcriptionnelle de NR2E3 au sein des bâtonnets indique que ce récepteur participe à leur différenciation d'une part en réprimant l'expression des gènes spécifiques des cônes, d'autre part en agissant comme partenaire des facteurs CRX et NRL pour activer l'expression de nombreux gènes spécifiques des bâtonnets. Le contrôle précis du niveau d'expression de nombreux gènes nécessite l'intervention de plusieurs facteurs de transcription et NR2E3 pourrait avoir comme rôle de seconder CRX et NRL pour permettre un niveau d'expression approprié des gènes spécifiques des bâtonnets.

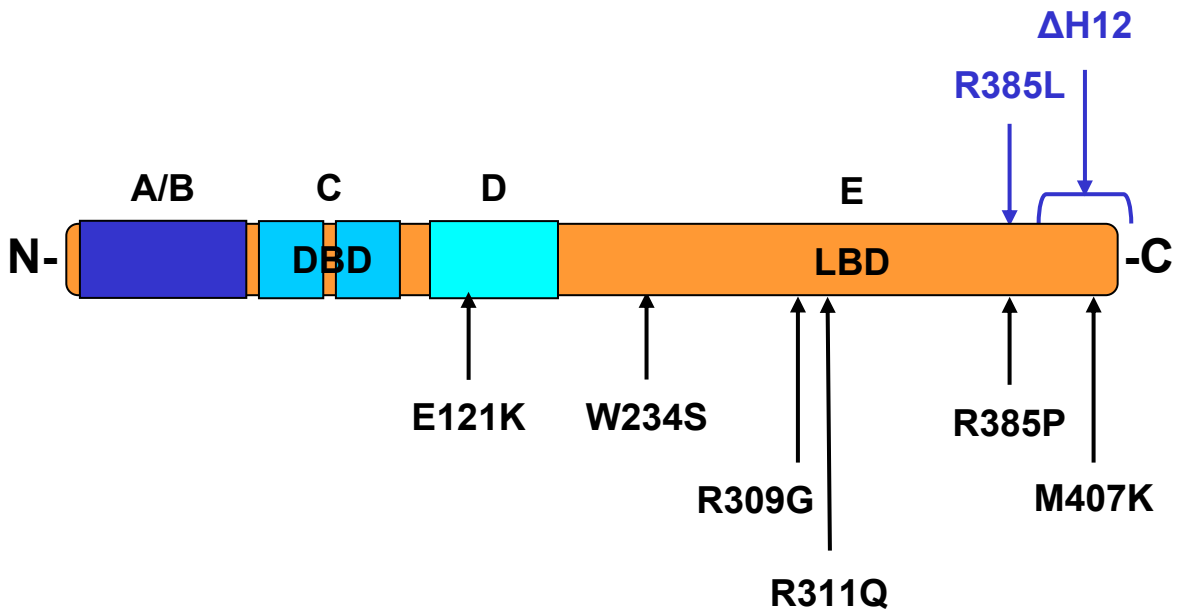


Fig. 51 : Représentation schématique de NR2E3 et localisation des mutations étudiées

Les mutations indiquées en noire correspondent aux mutations associées à des cas d'ESCS, celles indiquées en bleu sont artificielles et ne sont associées à aucune rétinopathie.

Analyse des mutations localisées dans le LBD de NR2E3

Les mutations faux-sens de *NR2E3* associées à des rétinopathies sont localisées essentiellement dans les DBD et LBD du récepteur (**Tableau 3 ; Figure 51**). Peng et coll. ont démontré que la mutation R76W, localisée dans le DBD, inhibait fortement l'interaction entre NR2E3 et CRX tandis que les mutations R97H, aussi localisée dans le DBD, et R311Q et W234S, localisées dans le LBD, n'affectaient pas cette interaction (Peng et coll., 2005). Cependant, l'influence de ces mutations sur l'activité transcriptionnelle de NR2E3, notamment son activité inhibitrice, n'a jamais été étudiée d'une manière exhaustive. Nous avons analysé plusieurs mutations responsables de cas d'ESCS et localisées dans le LBD de NR2E3 afin de déterminer leur influence sur l'activité répressive du récepteur.

Activité répressive de Gal4-NR2E3^{LBD} : Nous avons d'abord voulu confirmer l'activité répressive de la protéine de fusion Gal4-NR2E3^{LBD} sur des promoteurs minimaux associés à des éléments de fixation Gal4-UAS (Gal4-Upstream Activation Sequence ou 17M). Le système d'induction utilisant le DBD du facteur de transcription de levure Gal4 présente l'avantage d'être hautement sélectif, la plupart des cellules mammaliennes ne présentant aucune activité similaire à celle de Gal4. L'activité répressive de Gal4-NR2E3^{LBD} a été confirmée dans l'essai fonctionnel suivant : des cellules COS-1 (cellules rénales de singe vert transformées par le virus SV40) sont transfectées transitoirement avec un vecteur d'expression codant soit pour la protéine de fusion Gal4-NR2E3^{LBD}, soit pour le fragment DBD de Gal4 isolé comme témoin négatif (pCMV-Gal4-NR2E3^{LBD} et pCMV-Gal4^{DBD} respectivement) et avec un vecteur reporter codant pour la luciférase sous contrôle d'un promoteur minimal associé à cinq éléments de fixation Gal4-UAS. Deux vecteurs reporters ont été utilisés, ceux-ci portant deux promoteurs minimaux différents : celui de la β -globine de lapin (17M5- β globin-Luc) et celui du virus SV40 (17M5-SV40-Luc).

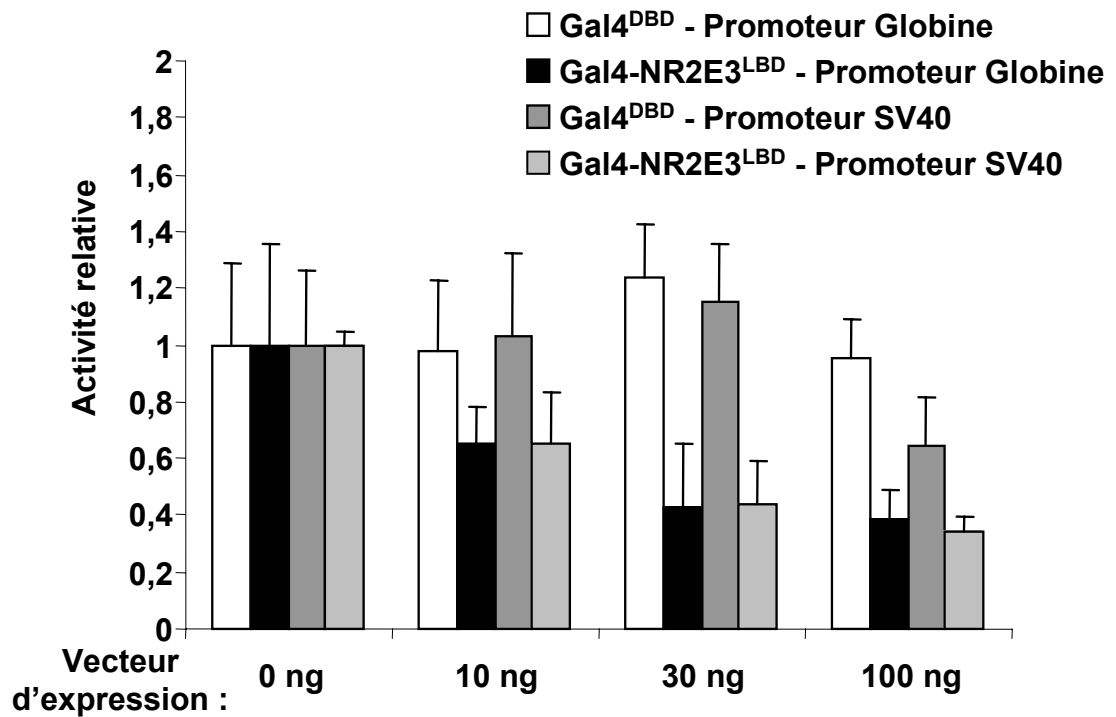


Fig. 52 : Activité répressive de Gal4-NR2E3^{LBD} sur différents promoteurs

Transfections transitoires réalisées dans des cellules COS-1.

La protéine de fusion Gal4-NR2E3^{LBD} inhibe de manière dose dépendante la transcription des deux constructions, tandis que le fragment Gal4^{DBD} n'exerce aucun effet sur la transcription du reporter 17M5- β globin-Luc, et ne produit qu'une faible inhibition du reporter 17M5-SV40-Luc pour la dose maximale de vecteur d'expression (**Figure 52**). Ce résultat est en accord avec l'activité répressive de Gal4-NR2E3^{LBD} et montre que celle-ci est médiée par le LBD de NR2E3. Le fait que le LBD de NR2E3 soit capable de réprimer l'activité des deux promoteurs minimaux utilisés, celui de la β -globine et le promoteur viral SV40, suggère que cette activité est indépendante du contexte.

Analyse des mutations de NR2E3^{LBD} : Les conséquences fonctionnelles de six mutations faux-sens associées à des cas d'ESCS ont été analysées dans le même essai. Cinq de ces mutations sont localisées dans le LBD (W234S, R09G, R311Q, R385P et M407K), la sixième (E121K) étant située dans la région D (**Figure 51**). Deux mutations non associées à des rétinopathies ont également été analysées : la mutation faux-sens R385L correspondant à la même position que la mutation R385P, et la mutation non-sens N397Stop correspondant à une délétion de l'hélice H12 du LBD (Δ H12 ; **Figure 51**). Ces mutations ont été insérées par mutagenèse dirigée dans le vecteur d'expression pCMV-Gal4-NR2E3^{LBD} et l'activité transcriptionnelle des constructions testée dans la lignée cellulaire COS-1 et une lignée issue d'un adénocarcinome humain (HeLa).

Dans les cellules COS-1, sur les six mutations associées à des cas d'ESCS, quatre conservent une activité inhibitrice légèrement réduite par rapport à la version non mutée de Gal4-NR2E3^{LBD} (E121K, W234S, R309G et R311Q), alors que les mutations R385P et M407K présentent une perte totale de cette activité (**Figure 53.A**).

La perte d'activité répressive par le mutant R385P pourrait être due à la contrainte conformationnelle générée par le résidu proline introduit comme à la perte d'un résidu

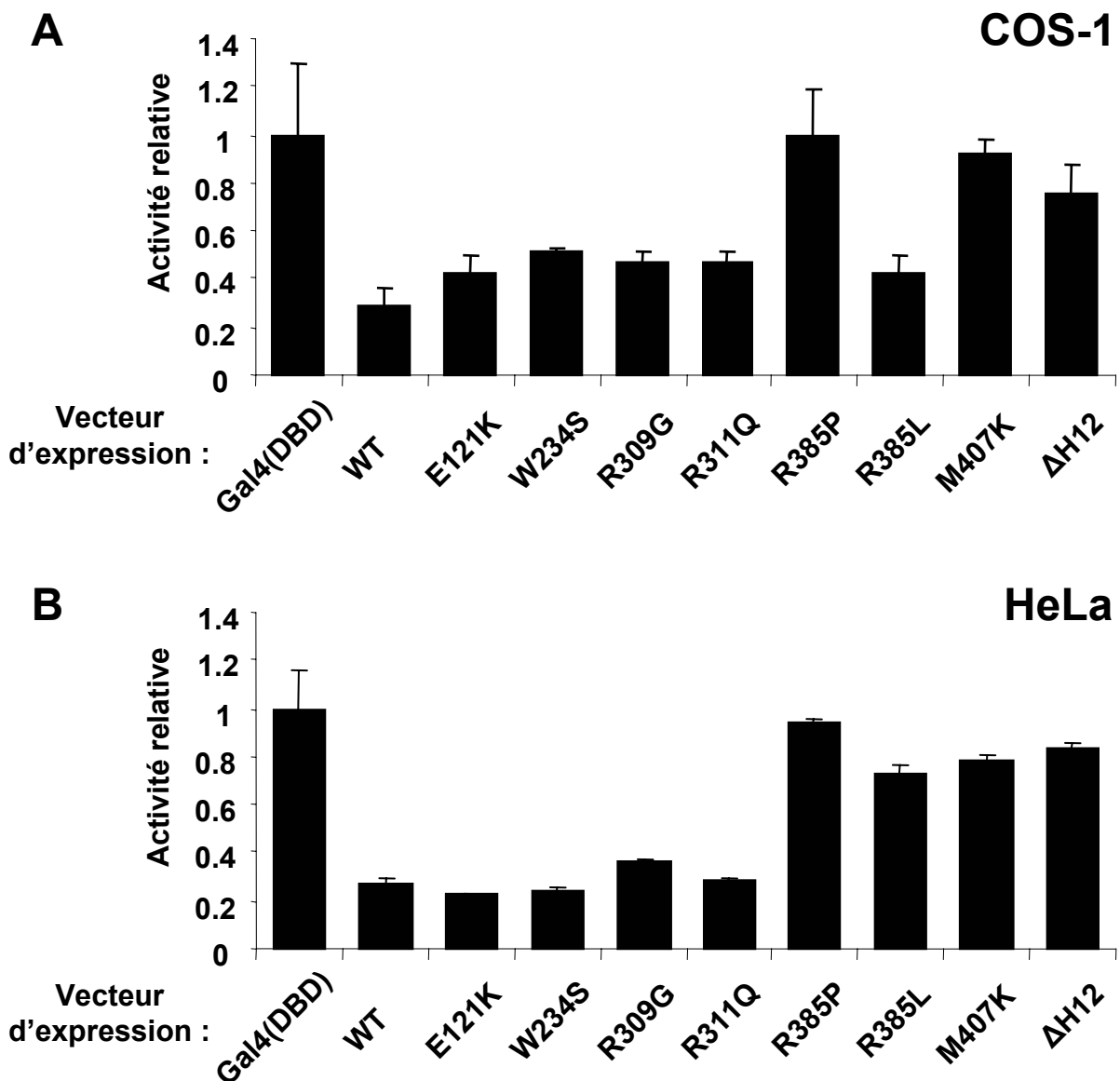


Fig. 53 : Analyse dans la protéine de fusion Gal4-NR2E3^{LBD} de mutations de NR2E3 associées ou non à des rétinopathies

Transfections transitoires réalisées dans des cellules COS-1 avec 100 ng de vecteur d'expression et 500 ng de vecteur reporter (A) et dans des cellules HeLa avec 100 ng de vecteur d'expression et 750 ng de vecteur reporter (B)

essentiel au mécanisme d'inhibition. Pour distinguer parmi ces deux hypothèses, la mutation R385L introduit un résidu leucine présentant une chaîne non chargée et de taille proche de celle de l'arginine. Le mutant R385L présente une activité inhibitrice légèrement réduite par rapport à celle du récepteur Gal4-NR2E3^{LBD} normal, indiquant que la perte d'activité du mutant R385P est vraisemblablement due à une modification conformationnelle du LBD.

La mutation M407K, provoquant une perte d'activité répressive par Gal4-NR2E3^{LBD}, est localisée dans l'hélice H12 du LBD. L'hélice H12, généralement associée à la fonction de transactivation ligand dépendante, peut aussi être requise pour l'interaction entre co-répresseurs et LBD (Moraitis et coll., 2002 ; Nagy et Schwabe, 2004). Pour confirmer l'implication de l'hélice H12 dans l'activité répressive de Gal4-NR2E3^{LBD}, le mutant Δ H12 a été construit et testé. Comme le mutant M407K, le mutant Δ H12 présente une perte totale d'activité inhibitrice par rapport à Gal4-NR2E3^{LBD} sauvage, confirmant le rôle de l'hélice H12 dans l'activité répressive du LBD. Cette perte d'activité des mutants M407K et Δ H12 a aussi été observée dans la lignée cellulaire HEK293 (Chen et coll., 2005).

Dans la lignée HeLa, les six mutants associés à des rétinopathies présentent une activité similaire à celle observée dans la lignée COS-1 : quatre d'entre eux (E121K, W234S, R309G et R311Q) conservent une activité inhibitrice légèrement réduite tandis que les mutants R385P et M407K, ainsi que le mutant artificiel Δ H12, présentent une perte totale de cette activité (**Figure 53.B**). Seul le mutant artificiel R385L présente un comportement différent entre les deux lignées cellulaires : alors qu'il conserve son activité inhibitrice dans la lignée COS-1, il présente une perte de cette activité dans la lignée HeLa. Une hypothèse pouvant expliquer cette différence d'activité entre les lignées COS-1 et HeLa pour le mutant R385L serait que cette mutation réduit l'affinité du LBD pour son ou ses corépresseurs (telle la protéine Ret-CoR, voir le chapitre Discussion et perspectives) sans pour autant abolir complètement ces interactions. Une concentration inférieure dans lignée HeLa par rapport à la

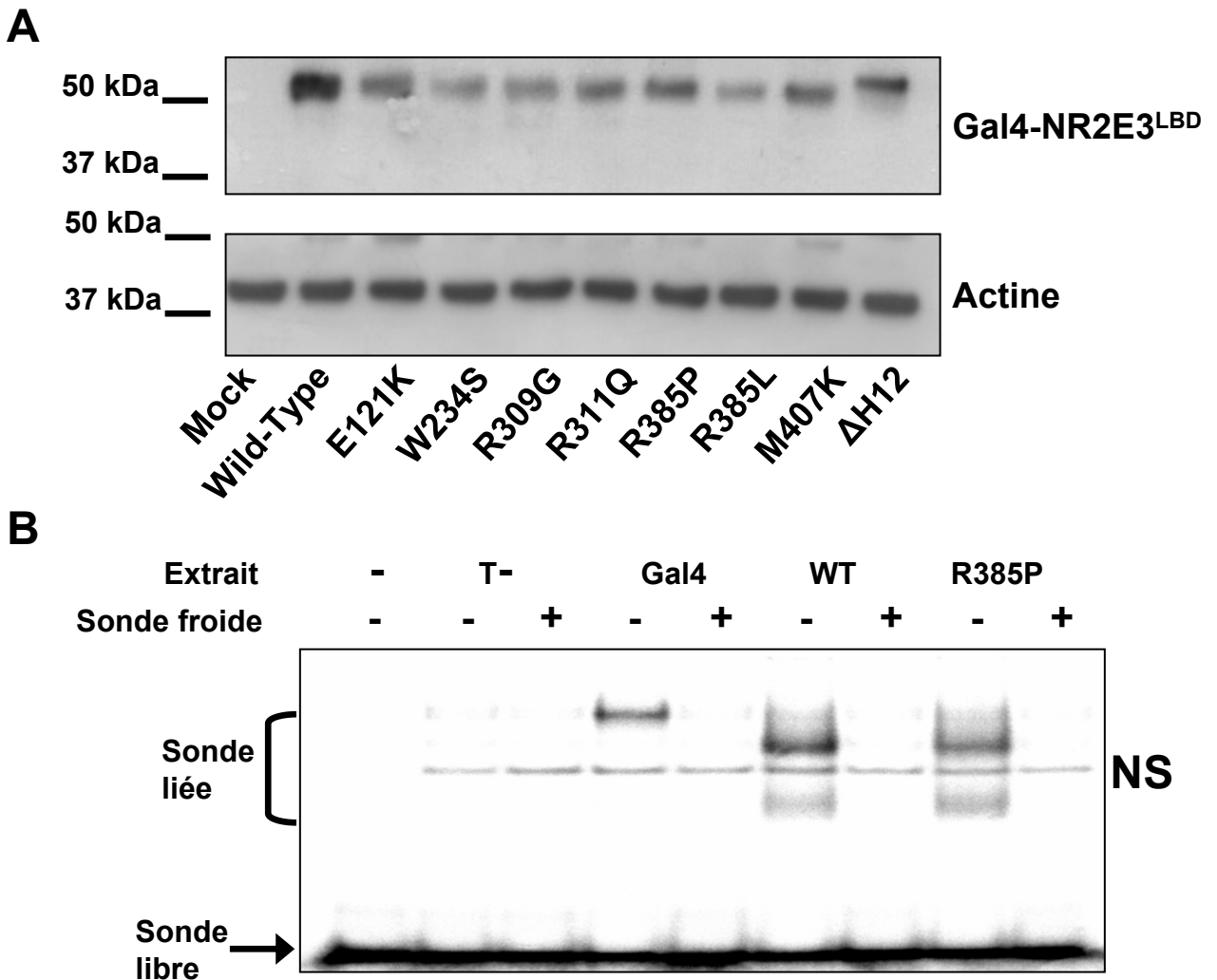


Fig. 54 : Analyse de l'expression et des capacités de fixation à l'ADN des protéines de fusion Gal4-NR2E3^{LBD} sauvage ou mutées

A: Expression de versions normale et mutées de Gal4-NR2E3^{LBD} (haut) et de l'actine (bas) dans des cellules COS-1 transfectées de manière transitoire avec différents vecteur pCMV-Gal4-NR2E3^{LBD}. **B :** Expérience de retard sur gel effectuée avec les protéines Gal4, Gal4-NR2E3^{LBD} normale et portant la mutation R385P exprimées dans des cellules COS-1 après transfection transitoire. T- indique l'utilisation d'un extrait nucléaire de cellules transfectées avec un plasmide non codant. NS : fixation non spécifique.

lignée COS-1 du ou des corépresseurs interagissant avec NR2E3 aurait pour conséquence de rendre visible cette diminution de l'affinité du LBD de NR2E3.

Pour exclure la possibilité que les différences d'activité observées entre les mutants soient dues à des variations du niveau d'expression ou de stabilité des protéines, leur expression a été vérifiée par Western blot. L'analyse d'extraits cellulaires de cellules COS-1 transfectées avec les différentes constructions montre que les récepteurs chimériques testés sont tous exprimés à un niveau similaire et avec la même mobilité, à l'exception du mutant Δ H12 qui curieusement présente une mobilité moindre que celle des autres protéines. Ce résultat réfute l'hypothèse selon laquelle les différences d'activité seraient dues à un défaut de stabilité des protéines présentant une perte de leur activité inhibitrice (**Figure 54.A**).

Puisque nous proposons l'hypothèse d'une modification conformationnelle pour le mutant R385P, nous avons aussi voulu vérifier si cette mutation n'affectait pas la fixation à l'ADN de la protéine chimère. Une expérience de retard sur gel indique que les protéines Gal4-NR2E3^{LBD} sauvage et mutée présentent un profil de migration identique, démontrant que la capacité de fixation à l'ADN du récepteur Gal4-NR2E3^{LBD} n'est pas affectée par la mutation R385P (**Figure 54.B**).

Afin de vérifier si les modifications de l'activité inhibitrice du récepteur chimère Gal4-NR2E3^{LBD} dues à des mutations associées à l'ESCS étaient aussi observées dans le contexte du récepteur NR2E3 entier, les mutations W234S, R311Q, R385P et M407K ont été insérées par mutagenèse dirigée dans le plasmide pCMX-epi-hPNR, un vecteur d'expression codant pour la protéine NR2E3 entière et portant un épitope hémagglutinine en position N-terminale. L'activité transcriptionnelle de ces constructions a été testée sur un promoteur portant des éléments de fixation pour NR2E3 : pTK-PRE4R-Luc (Chen et coll., 2005). Par rapport à la protéine de fusion Gal4-NR2E3^{LBD}, l'utilisation du récepteur NR2E3 entier présente

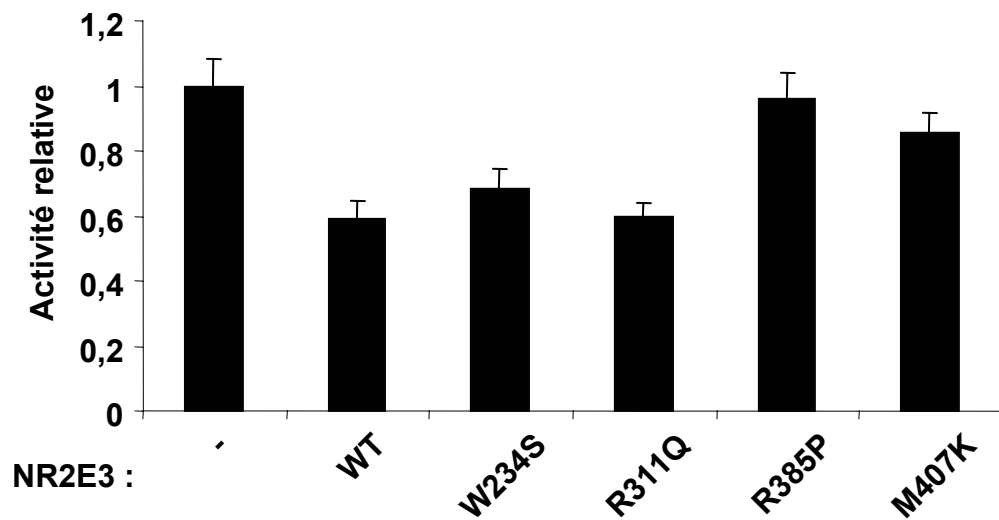


Fig. 55 : Analyse dans la protéine NR2E3 entière de mutations de NR2E3 associées à des cas d'ESCS

Influence des mutations sur l'activité répressive de NR2E3 après transfection transitoire dans des cellules COS-1 avec 30 ng de vecteur d'expression et 500 ng de vecteur reporter.

l'avantage d'être plus proche des conditions physiologiques. Par contre, l'utilisation d'éléments de fixation pour un récepteur nucléaire est susceptible de réduire la sélectivité du système par rapport à celui utilisant Gal4, les éléments de liaison pour NR2E3 étant susceptibles d'interagir avec des récepteurs nucléaires endogènes.

Après co-transfection dans des cellules COS-1, les résultats reproduisent ceux obtenus avec le récepteur chimère Gal4-NR2E3^{LBD} : les protéines mutées W234S et R311Q présentent une activité inhibitrice similaire à celle de NR2E3 normale tandis que les mutants R385P et M407K ne modifient pas la transcription du gène reporter (**Figure 55**). Bien que l'amplitude de l'inhibition du gène reporter par les protéines non mutées, W234S et R311Q soit moindre que celle observée avec le système Gal4, ceci ne modifie pas l'interprétation de ces résultats confirmant ceux obtenus avec le récepteur Gal4-NR2E3^{LBD}.

Le niveau d'expression et la capacité de fixation à l'ADN des protéines mutées ont aussi été testés. Le niveau d'expression des protéines a été vérifié par Western blot à partir d'extraits cellulaires de cellules COS-1 transfectées avec les différentes constructions. Toutes les protéines sont exprimées à un niveau similaire et avec la même mobilité, démontrant que les différences d'activité ne sont pas dues à une différence de stabilité ou d'expression des protéines (**Figure 56.A**).

Pour vérifier que les mutations analysées n'affecteraient pas la fixation à l'ADN de NR2E3, notamment en empêchant le processus de dimérisation, la capacité de fixation des différents mutants a été testée par des expériences de retard sur gel utilisant une sonde portant un site de fixation pour NR2E3. Les quatre récepteurs mutés présentent un profil de migration semblable à celui du récepteur normal, démontrant que les différentes mutations analysées n'affectent pas la capacité de fixation à l'ADN de NR2E3 et donc son processus de dimérisation (**Figure 56.B**). Nous pouvons cependant noter que le mutant R385P fixe moins l'ADN que la protéine normale ou le mutant M407K. Si cette réduction de la capacité de

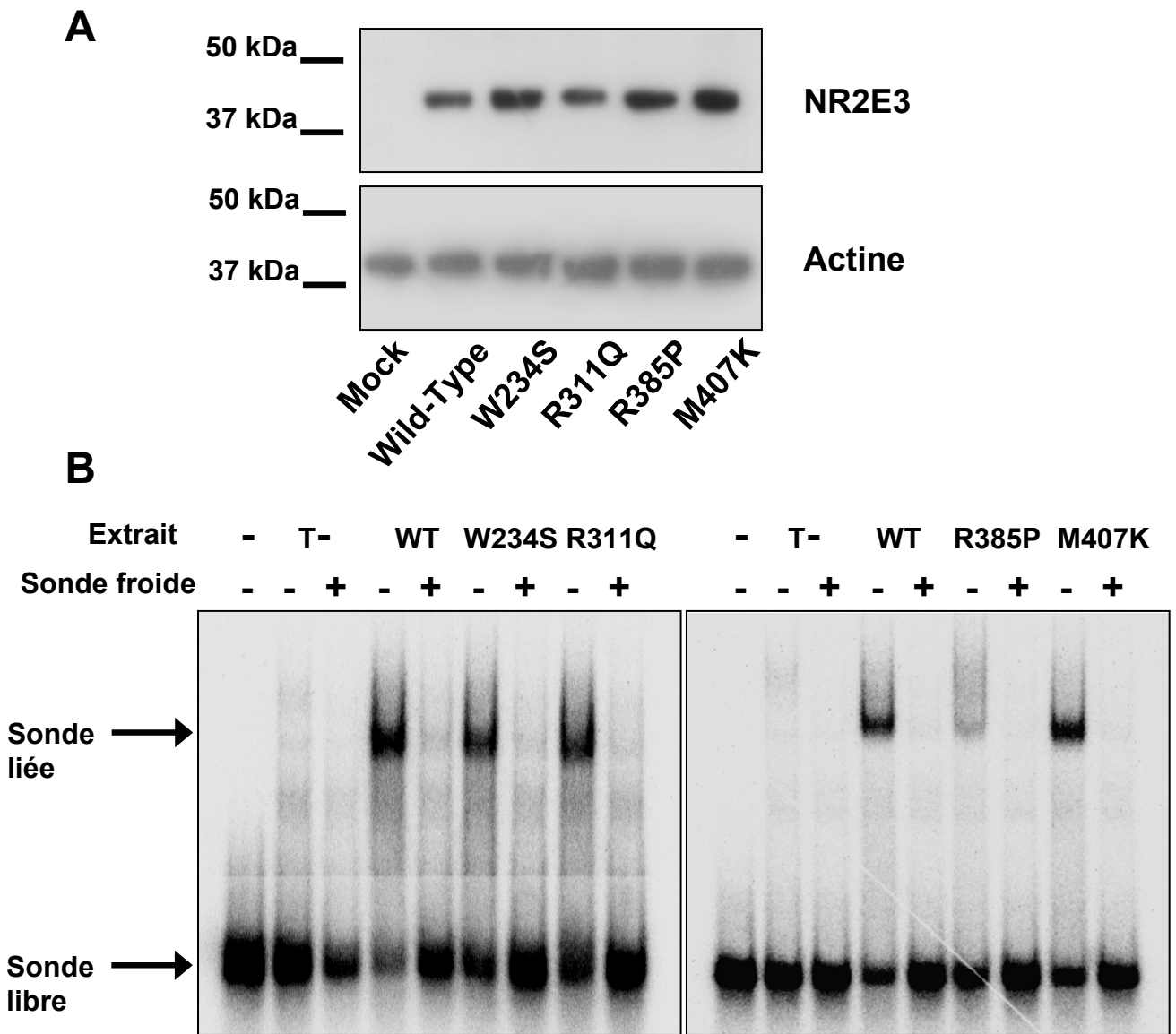


Fig. 56 : Analyse du niveau d'expression et de la capacité de fixation à l'ADN de la protéine NR2E3 entière non mutée ou porteuse de mutations associées à des cas d'ESCS

A : Expression de versions sauvage et mutées de NR2E3 (haut) et de l'actine (bas) dans des cellules COS-1 transfectées de manière transitoire avec des vecteurs pCMV-epi-hPNR. **B** : Expériences de retard sur gel effectuées avec les différentes protéines NR2E3 sauvage et mutées exprimées dans des cellules COS-1 après transfection transitoire. T- indique l'utilisation d'un extrait nucléaire de cellules transfectées avec un plasmide non codant

fixation à l'ADN du mutant R385P est à l'origine de la perte de son activité inhibitrice pour la protéine NR2E3 entière, elle n'explique cependant pas la perte d'activité inhibitrice du récepteur Gal4-NR2E3^{LBD} portant la même mutation.

Les résultats obtenus à partir de la protéine de fusion Gal4-NR2E3^{LBD} montre que sur les six mutations pathogènes testées, quatre conservent une activité inhibitrice similaire à celle de la protéine non mutée (E121K, W234S, R309G, R311Q) tandis que les mutants R385P et M407K présentent une perte de cette activité. L'analyse des mutants W234S, R311Q, R385P et M407K dans le cadre de la protéine NR2E3 entière confirme ces résultats.

D'après un modèle moléculaire du LBD de NR2E3 établi à partir de la structure tridimensionnelle du LBD de RAR (**Figure 57** ; Bourguet et coll., 2000), le résidu R385 est localisé dans la poche de fixation du ligand et pourrait être essentiel à une activité ligand dépendante de NR2E3. Cependant, le mutant R385P présente une perte d'activité inhibitrice, suggérant que ce résidu est en fait impliqué dans les interactions de NR2E3 avec ses corépresseurs. L'analyse du mutant R385L devait permettre de déterminer si le résidu R385 est essentiel à l'activité répressive de NR2E3 ou si la perte d'activité du mutant R385P était la conséquence d'une contrainte conformationnelle. Le mutant R385L présente des résultats variant selon la lignée cellulaire utilisée : alors qu'il conserve son activité inhibitrice dans la lignée COS-1, suggérant que la perte d'activité observée chez le mutant R385P est bien due à une modification de la conformation du LBD, il présente une perte d'activité dans la lignée HeLa. Ce résultat contradictoire ne nous permet pas de conclure sur l'importance de ce résidu pour l'activité répressive du LBD de NR2E3. L'analyse des mutants M407K et Δ H12 indique que l'hélice H12 est impliquée dans les interactions entre NR2E3 et ses corépresseurs.

Le fait que certains mutants conservent leur activité inhibitrice démontre une absence de corrélation entre celle-ci et le phénotype de l'ESCS. Cette absence de corrélation suggère

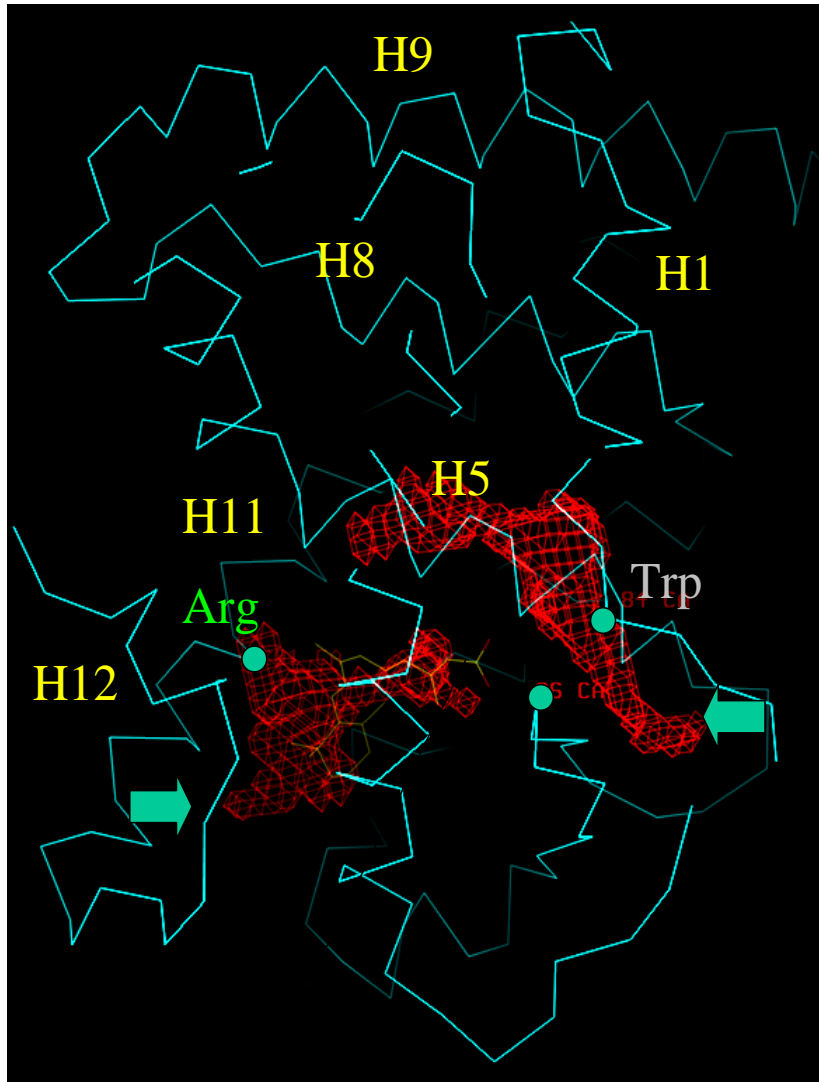


Fig. 57 : Modèle moléculaire du LBD de NR2E3

Modèle basé sur la structure cristallographique du LBD de RAR α . Plusieurs résidus mutés dans l'ESCS sont indiqués (Trp : W234 et Arg : R385). La zone rouge correspond à la poche de fixation du ligand.

qu'une autre activité de NR2E3 serait affectée de manière commune par l'ensemble des mutations associées à l'ESCS et localisées dans le LBD.

Les interactions physiques de NR2E3 ont été mises en évidence avec les facteurs de transcription CRX et NR1D1, cependant, ces interactions sont dépendantes du DBD de NR2E3. Notamment, les mutations W234S et R311Q n'affectent pas l'interaction entre NR2E3 et CRX contrairement à la mutation R76W localisée dans le DBD (Cheng et coll., 2004 ; Peng et coll., 2004). Ceci indique que les différences observées entre les différents mutants ne sont pas dues à des modifications des interactions entre NR2E3 et NR1D1 ou CRX.

L'existence du modèle moléculaire du LBD de NR2E3 montrant l'existence d'une poche de fixation hydrophobe (**Figure 57**), et la découverte de molécules agonistes de NR2E3 d'origine synthétique (Kapitskaya et coll., 2006 ; Wolkenberg et coll., 2006), suggèrent plutôt l'existence d'une fonction de transactivation ligand dépendante pour NR2E3, qui serait systématiquement altérée dans la pathologie.

Recherche de ligands endogènes pour NR2E3

L'identification du ou des ligands endogènes de NR2E3 permettrait de confirmer l'hypothèse d'une fonction ligand dépendante de ce récepteur, nous avons donc entrepris leur recherche par une approche d'endocrinologie inverse similaire à celle ayant permis d'identifier les ligands d'autres récepteurs nucléaires (Brasemann et coll., 1993 ; De Urquiza et coll., 2000). L'identification du ou des ligands endogènes de NR2E3 devrait constituer une étape fondamentale pour la compréhension de son rôle physiologique et des mécanismes physiopathologiques.

L'approche utilisée repose sur les postulats suivants :

- NR2E3 possède un ou plusieurs ligands endogènes capables de moduler son activité transcriptionnelle. Comme pour les autres récepteurs nucléaires, ce ou ces ligands sont de nature liposoluble
- le LBD de NR2E3 conserve sa fonction de transactivation ligand dépendante dans le cadre de la protéine de fusion Gal4-NR2E3^{LBD}
- un récepteur nucléaire et son ligand doivent être co-localisés. Selon ce postulat, la rétine doit constituer une source de ligand pour NR2E3

Dans l'essai fonctionnel utilisé, des cellules COS-1 sont transfectées avec le vecteur d'expression pCMV-Gal4-NR2E3^{LBD} et le vecteur reporter 17M5- β globin-Luc. Cet essai a été utilisé pour cribler des fractions lipidiques issues de rétines : la fixation du ligand de NR2E3 au LBD de la protéine de fusion Gal4-NR2E3^{LBD} devant résulter en la levée de l'inhibition du gène reporter de la luciférase.

Clonage de l'orthologue porcin de NR2E3 : Afin de disposer d'une quantité abondante de matériel pour l'essai fonctionnel, nous avons utilisé des rétines de porc comme source de lipides. Auparavant, et pour être sur que cet animal possède le ou les ligands recherchés, nous avons vérifié l'existence d'un orthologue porcin de *NR2E3*. Un clonage partiel a été réalisé en utilisant la séquence de régions localisées dans le LBD et hautement conservées chez d'autres espèces pour la mise au point d'amorces dégénérées.

Un clone porcin a été obtenu à partir d'une RT-PCR utilisant ces amorces dégénérées sur des ARN de rétine neurale (**Figure 58**). La région de NR2E3 clonée correspond au LBD et présente un fort degré d'identité avec les séquences nucléotidique et protéique de l'homologue humain (92% d'identité pour les séquences nucléique et protéique), démontrant l'existence d'un orthologue porcin de NR2E3 exprimé dans la rétine.

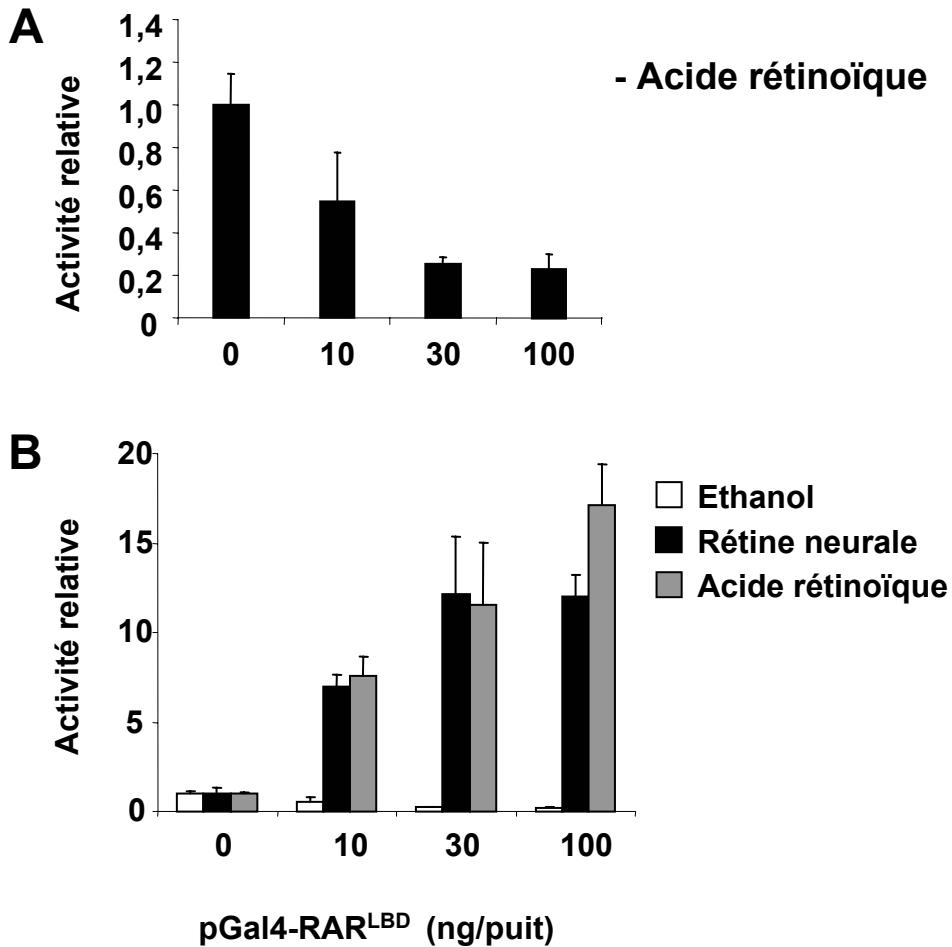


Fig. 59 : Activité du récepteur chimérique Gal4-RAR^{LBD} utilisé dans le cadre de l'essai fonctionnel

A : Inhibition dose dépendante de l'activité luciférase par Gal4-RAR^{LBD} en l'absence de ligand. **B** : Activation dose dépendante de l'activité luciférase par Gal4-RAR^{LBD} en présence d'un extrait lipidique total de rétine de porc ou d'acide rétinoïque tout-trans d'origine synthétique (100 nM). Les essais sont réalisés avec 500 ng de vecteur reporter 17M5- β globin-Luc.

Utilisation du LBD de RAR α comme contrôle positif : Le récepteur chimérique Gal4-RAR^{LBD}, portant le LBD du récepteur à l'acide rétinoïque RAR α , a été utilisé comme témoin positif dans l'essai fonctionnel. L'utilisation de Gal4-RAR^{LBD} dans l'essai fonctionnel doit permettre d'observer l'effet de l'adjonction de son ligand, l'acide rétinoïque tout-trans, d'origine synthétique ou encore sa présence dans les extraits rétiniens, l'acide rétinoïque étant présent à une concentration significative dans la rétine (McCaffery et coll., 1993).

En absence d'acide rétinoïque, Gal4-RAR^{LBD} réprime la transcription du gène reporter d'une manière dose dépendante (**Figure 59.A**). L'adjonction d'acide rétinoïque d'origine synthétique (100 nM) ou d'extraits lipidiques totaux issus de la rétine neurale à une concentration finale de 0,8 mg/ml entraîne une activation dose dépendante du gène reporter (**Figure 59.B**).

Ce résultat indique qu'il est possible d'observer la fonction de transactivation ligand dépendante du LBD de RAR α dans l'essai fonctionnel utilisé. De plus, l'acide rétinoïque est une molécule particulièrement labile, sensible à l'oxydation et à la lumière blanche ; l'activation du récepteur Gal4-RAR^{LBD} par des extraits d'origine biologique montre la présence de l'acide rétinoïque endogène dans l'extrait, indiquant une préservation des molécules labiles dans les extraits lipidiques utilisés.

Criblage des fractions lipidiques : Des extraits lipidiques issus de rétines de porc adulte ont été testés pour leur capacité à moduler l'activité transcriptionnelle de Gal4-NR2E3^{LBD} dans l'essai fonctionnel (**Figure 60.A**). Nous avons testé l'activité d'extraits lipidiques issus de rétine neurale à une concentration finale de 0,8 mg/ml ainsi que celle d'extraits issus d'épithélium pigmentaire rétinien préparés simultanément. L'épithélium pigmentaire a été testé comme source potentiel de ligand pour NR2E3 en raison de sa proximité avec la rétine

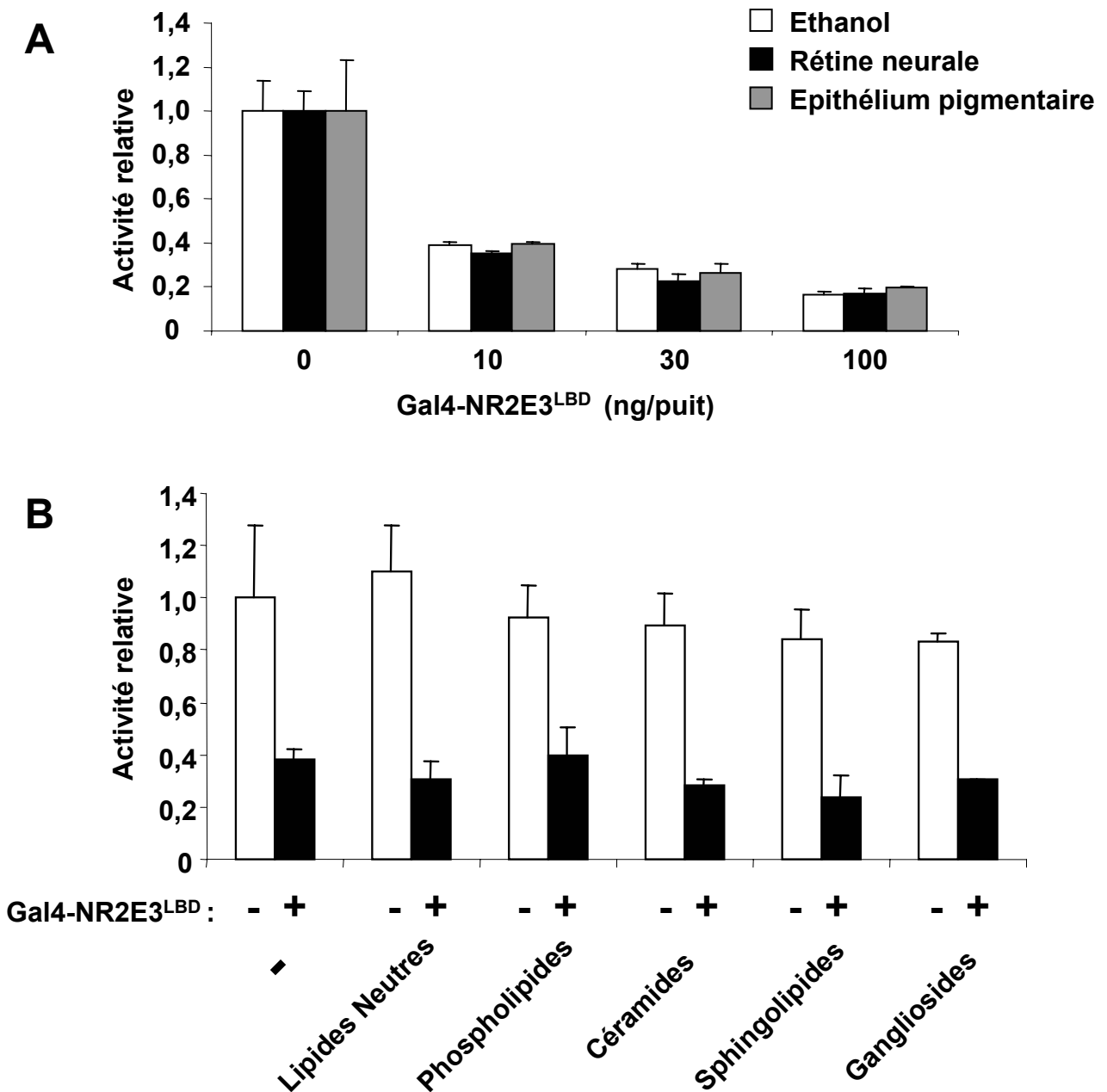


Fig. 60 : Criblage par l'essai fonctionnel de fractions lipidiques issues de rétine de porc adulte

A : Essais de transactivation à partir d'extraits lipidiques totaux issus de la rétine neurale ou de l'épithélium pigmentaire rétinien. **B** : Essais de transactivation à partir de fractions lipidiques de rétine neurale. L'essai fonctionnel a été réalisé avec 10 ng de vecteur d'expression pCMV-Gal4-NR2E3^{LBD} et 500 ng de vecteur reporter 17M5- β globin-Luc.

neurale et du fait que l'expression de NR2E3 dans l'épithélium rétinien avait été décrite dans des travaux antérieurs (Chen et coll., 1999).

En l'absence d'extrait lipidique, Gal4-NR2E3^{LBD} inhibe la transcription du gène reporter de manière dose dépendante. Cette activité répressive n'est modifiée ni par l'adjonction de l'extrait lipidique de rétine neurale, ni par celle de l'extrait lipidique d'épithélium pigmentaire rétinien.

Différentes fractions lipidiques séparées en fonction de leur degré d'hydrophobicité ont été préparées à partir d'extrait lipidique total de rétine neurale dans le but de tester dans l'essai fonctionnel différents échantillons chacun enrichis dans une catégorie de lipide particulier (catégories des : lipides neutres, phospholipides, céramides, sphingolipides et gangliosides). Ces différentes fractions ont aussi été testées et n'ont pas permis de modifier l'activité répressive de Gal4-NR2E3^{LBD} (**Figure 60.B**).

Ce crible a été effectué à plus de vingt reprises et en modifiant différents paramètres de l'essai fonctionnel : modification des doses des vecteurs d'expression ou reporter, durée d'incubation des extraits lipidiques ; il n'a jamais permis d'identifier de fraction lipidique capable de moduler l'activité répressive de Gal4-NR2E3^{LBD} et donc de mettre en évidence la présence d'un ligand de NR2E3.

Utilisation de l'acide 13-cis rétinolique dans l'essai fonctionnel : Récemment, Kapitskaya et coll. ont mis au point un essai fonctionnel destiné au criblage à grande échelle de molécules synthétiques pour leur capacité à moduler l'activité transcriptionnelle du LBD de NR2E3 (Kapitskaya et coll., 2006). L'utilisation de cet essai a permis l'identification de molécules agonistes de NR2E3, notamment l'isomère 13-cis de l'acide rétinolique et des dérivés du 2-phényl-benzimidazole (Wolkenberg et coll., 2006). Bien que détectable dans la rétine, l'acide 13-cis rétinolique agit à une concentration non physiologique (50 μ M ; Kapitskaya et coll.,

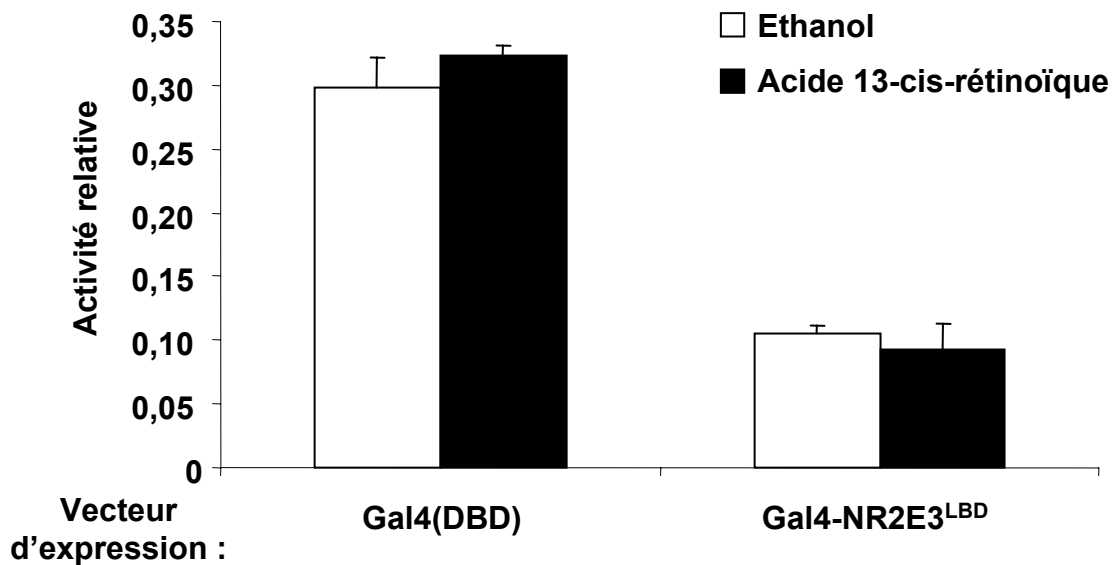


Fig. 61 : Activité de l'acide 13-cis rétinolique dans notre essai fonctionnel

Transfections transitoires réalisées dans des cellules COS-1 avec 100 ng de vecteur d'expression et 500 ng de vecteur reporter. L'ajout d'acide 13-cis rétinolique (50 μ M) ne modifie pas l'activité de la protéine de fusion Gal4-NR2E3^{LBD}.

2006). Rappelons ici que l'isomère tout-trans de l'acide rétinoïque est capable d'activer le récepteur Gal4-RAR^{LBD} à une concentration inférieure à 100 nM (**Figure 59.A**), la concentration d'acide rétinoïque 13-cis requise par Kapitskaya et coll. pour activer NR2E3 indique que cette molécule ne constitue pas son ligand physiologique.

Nous avons voulu tester l'acide 13-cis rétinoïque pour sa capacité à modifier l'activité transcriptionnelle de Gal4-NR2E3^{LBD}. Curieusement, l'adjonction d'acide 13-cis rétinoïque à une concentration de 50 µM ne modifie pas l'activité répressive de Gal4-NR2E3^{LBD} dans notre essai fonctionnel utilisant des cellules COS-1 (**Figure 61**). Cette absence d'activité de l'acide 13-cis rétinoïque sur Gal4-NR2E3^{LBD} exprimé dans les cellules COS-1 pourrait être la raison pour laquelle notre essai fonctionnel ne nous a pas permis d'observer une quelconque activité des fractions lipidiques de rétine de porc.

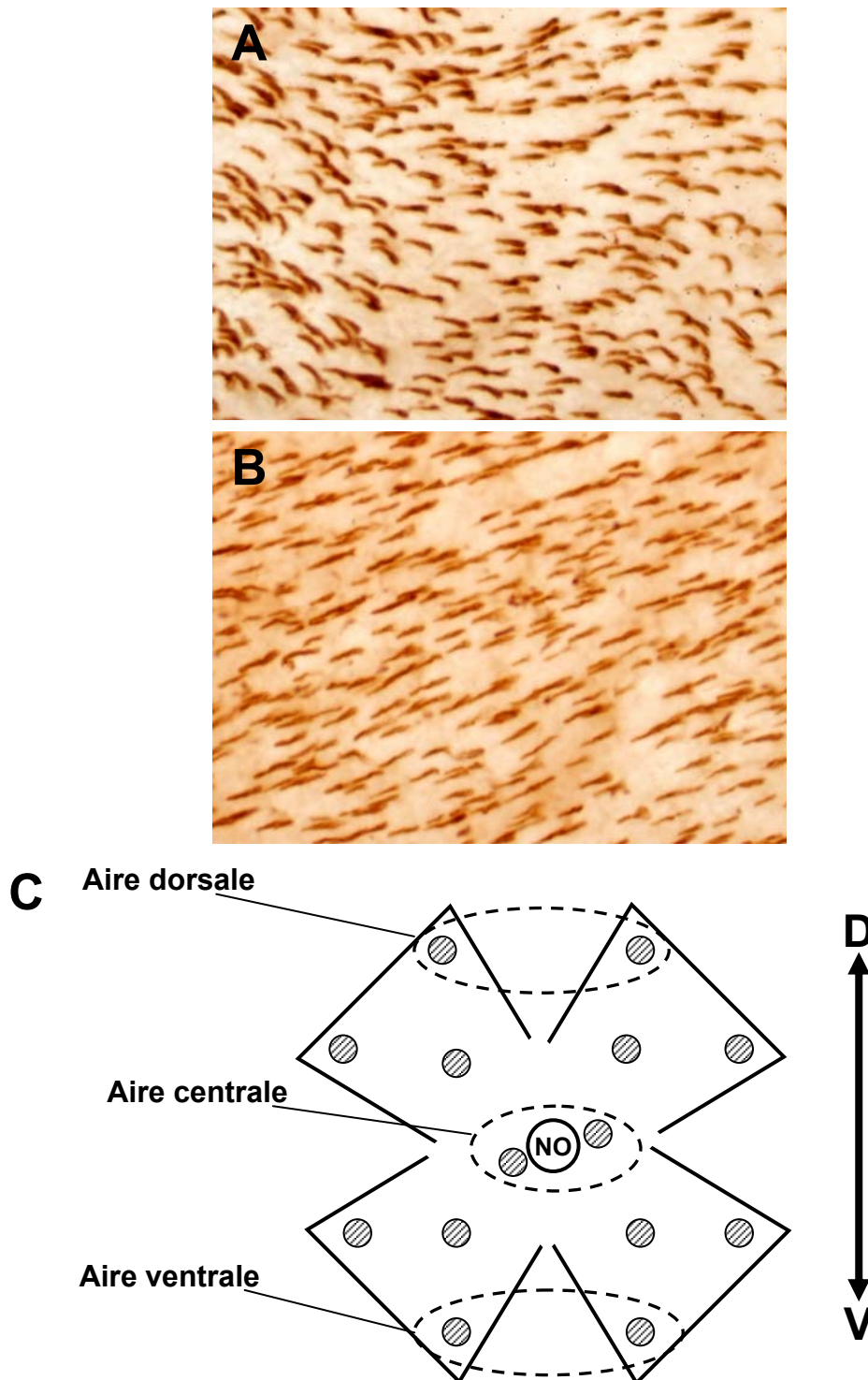


Fig. 62 : Marquages de rétines sauvages à P35 avec des anticorps spécifiques des cônes bleus (A) ou des cônes rouges (B) et répartitions des zones comptées (C)

Les cercles hachurés indiquent les zones où ont été effectués les comptages et à partir desquelles a été calculée la densité moyenne, les cercles pointillés désignent les zones utilisées pour calculer les densités régionales. NO désigne le nerf optique (C).

Résultats complémentaires :

Expression des opsines des groupes S et L chez les souris sauvage, *rd7/rd7* et *TRβ*^{-/-} :

Comme décrit dans l'introduction, la rétine murine présente une répartition asymétrique des photorécepteurs à cône, avec une rétine dorsale dominée par les cônes rouges et une rétine ventrale ne comportant que des cônes bleus. Nous avons voulu déterminer dans quelle mesure les récepteurs nucléaires NR2E3 et TRβ2 participent à la mise en place de ces gradients de cônes. Les déficiences de ces facteurs de transcription affectent toutes deux le développement des photorécepteurs à cône, entraînant une absence de cônes rouges au profit des cônes bleus chez la souris *TRβ2*^{-/-} et un excès de cônes bleus d'origine indéterminée chez la souris *rd7/rd7* (Haider et coll., 2001 ; Ng et coll., 2001). Cependant, les éventuelles modifications des gradients formant la mosaïque des cônes n'ont pas été examinées chez ces souris.

Les topographies des cônes bleus et rouges ont été établies dans les lignées sauvage (lignée C57BL/6@N), *rd7/rd7* (fond génétique C57BL/6) et *TRβ*^{-/-} (fond génétique 129/SV). Après des marquages spécifiques des opsines S et L sur des rétines entières (**Figure 62.A et B**), les densités locales des deux types de cône ont été mesurées pour différentes régions de la rétine, permettant d'établir des cartes densimétriques et de calculer les densités moyennes pour les trois lignées étudiées (**Figure 62.C**).

La densité moyenne (**Figure 63**), c'est-à-dire calculée pour l'ensemble de la rétine, et celles des régions ventrale, centrale (à proximité du disque optique) et dorsale (**Figure 64 ; Tableau 5**), ont été établies pour les trois lignées aux âges suivants : P15, P35 et 3-4 mois. L'évolution entre 3 et 4 mois est supposée négligeable et les cônes co-exprimant les deux opsines n'a pas été pris en compte, leur effectif étant nettement minoritaire (Röhlich et coll., 1994).

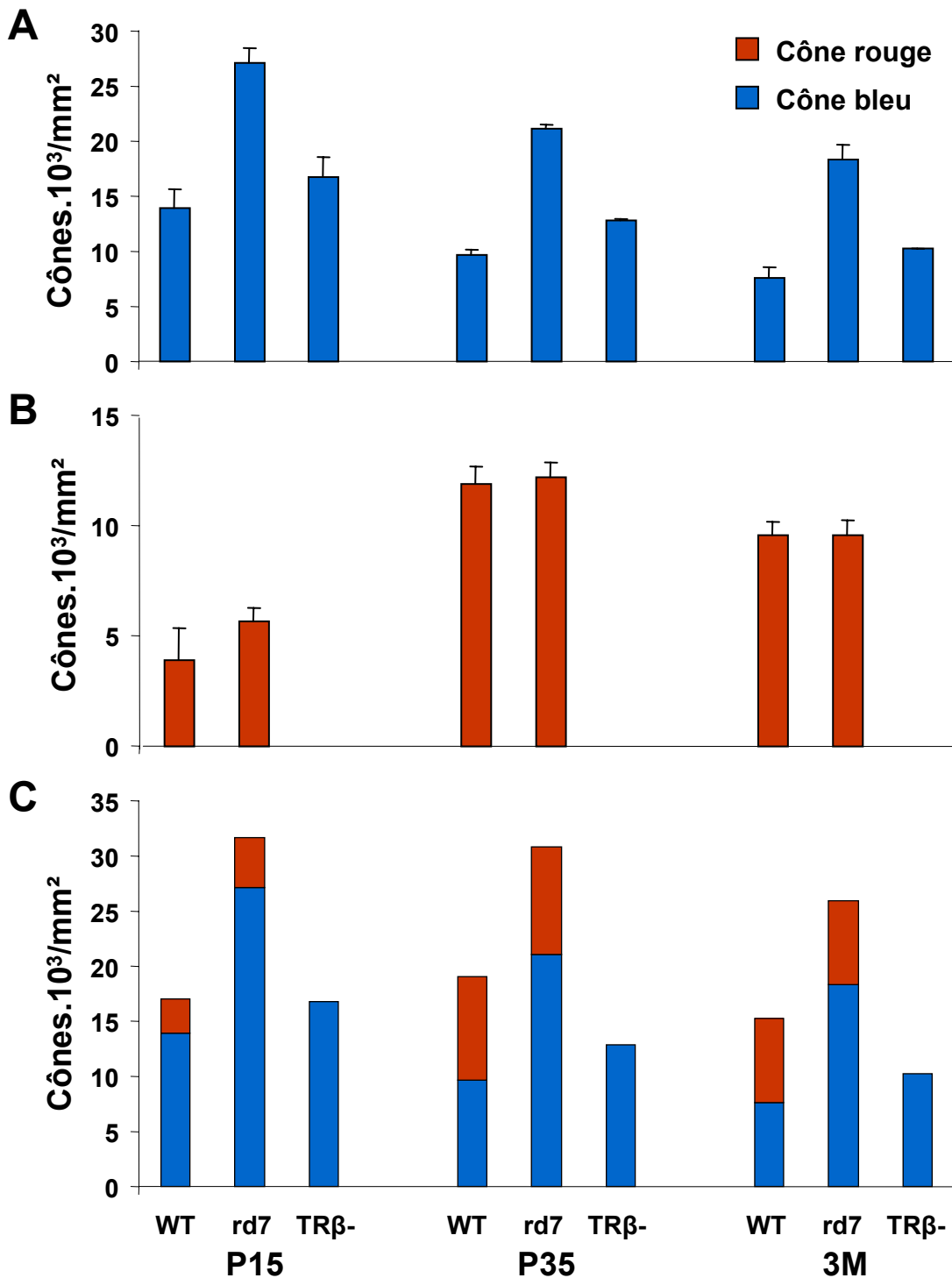


Fig. 63 : Densités moyennes des cônes bleus et rouges dans les rétines de souris sauvage (WT), *rd7/rd7* (rd7) et *TR β -/-* (TR β -)

Les densités moyennes ont été établies à P15, P35 et 3-4 mois (3M) à partir des moyennes faites pour 14 aires de comptage réparties uniformément dans la rétine. **A** : Densités moyennes des cônes bleus. **B** : Densités moyennes des cônes rouges. **C** : Densités moyennes des cônes bleus et rouges cumulés. Notez le changement d'échelle de l'axe des ordonnées entre les graphiques **A** et **C** d'une part et **B** d'autre part.

Chez la souris sauvage, la densité moyenne totale des cônes, c'est-à-dire des cônes bleus et rouges confondus, est constante entre P15 et P35 puis diminue légèrement entre P35 et 3-4 mois (**Figure 63**). Entre P15 et P35, la densité des cônes bleus diminue fortement au profit de celle des cônes rouges, ceux-ci représentant alors près de la moitié de la population totale.

L'examen des densités régionales à P15 montre une densité similaire des cônes bleus dans les trois régions alors que les cônes rouges sont exclus de la rétine ventrale et présents à faible densité dans les régions centrale et dorsale. Entre P15 et P35, une augmentation de la densité des cônes rouges conjointe à une nette diminution de celle des cônes bleus a lieu dans la rétine dorsale, conduisant à une rétine dorsale dominée par les cônes rouges, alors que la région ventrale reste dominée par les cônes bleus. Les densités des cônes bleus et rouges évoluent peu entre P35 et 3-4 mois (**Figure 64**).

Le passage d'une rétine dominée par les cônes bleus et symétrique à une rétine mixte et asymétrique indique l'existence d'un phénomène de transdifférenciation des cônes bleus en cônes rouges ayant lieu principalement entre P15 et P35 et concernant essentiellement la région dorsale de la rétine. Ce phénomène de transdifférenciation, rappelant celui observé dans la rétine de rat, diffère de la description faite par Szél et coll. chez la souris où les cônes situés dans la région ventrale expriment directement l'opsine rouge sans passer une phase transitoire d'expression de l'opsine bleue (Szél et coll., 1993 ; Szél et coll., 1994). Une différence entre notre étude et celle effectuée par Szél et coll. est que cette dernière porte sur des souris de la lignée BALB/c, suggérant que la cinétique d'expression des opsines de cône varie en fonction du fond génétique.

A tous les stades examinés, la rétine *rd7/rd7* présente une densité moyenne totale nettement supérieure à celle observée chez la souris sauvage (notez le changement d'échelle dans la **Figure 64**). Cette augmentation de la densité totale est exclusivement attribuable à un excès

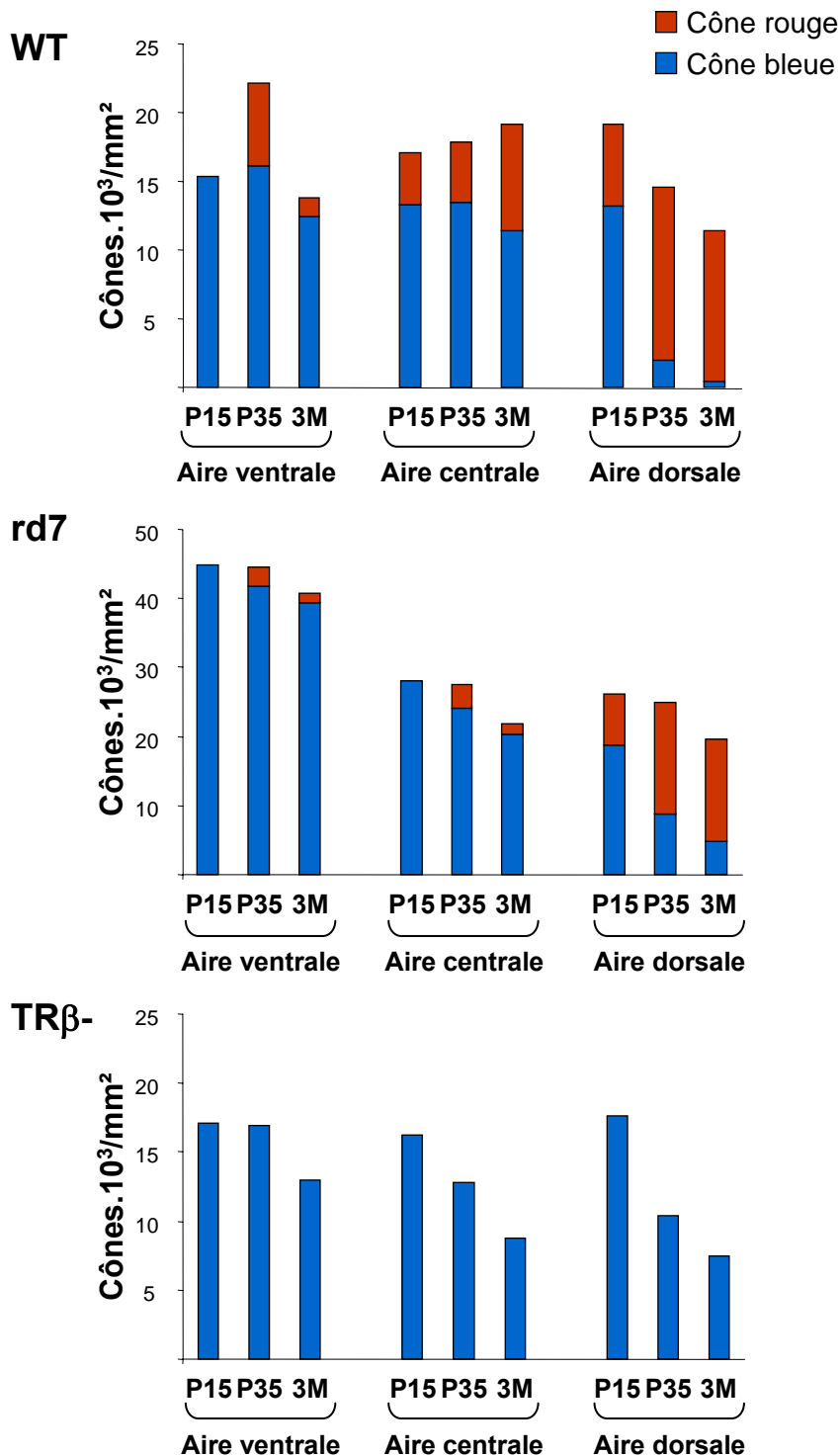


Fig. 64 : Densités régionales des cônes bleus et rouges dans les rétines de souris sauvage (WT), *rd7/rd7* (*rd7*) et *TRβ*^{-/-} (*TRβ*⁻)

Les densités ont été établies à P15, P35 et 3-4 mois (3M), à partir des moyennes faites pour 2 aires de comptage situées dans les régions dorsale, centrale et ventrale (**Figure 62.C**). Notez le changement d'échelle de l'axe des ordonnées entre les graphiques des souris sauvage et *TRβ*^{-/-} d'une part et *rd7/rd7* d'autre part.

de cônes bleus, la densité moyenne de cônes rouges étant similaire entre animaux sauvages et *rd7/rd7* aux trois stades examinés. Le phénomène de transdifférenciation constaté chez la souris sauvage est aussi observable chez la souris *rd7/rd7*, indiquant que NR2E3 n'est pas impliqué dans ce processus (**Figure 63**).

L'examen des densités régionales à P15 montre que l'excès de cônes bleus n'est pas distribué de manière homogène et est essentiellement localisé dans la rétine ventrale. A P15, l'augmentation de la densité de cônes bleus dans cette zone est d'environ 200% par rapport à celle de la rétine sauvage contre 100% dans la rétine centrale et 50% dans la rétine dorsale. Aux stades P35 et 3-4 mois, les densités de cônes de cônes bleus restent largement supérieures dans les trois régions alors que les densités de cônes rouges varient peu entre les rétines *rd7/rd7* et sauvage, confirmant que le phénomène de transdifférenciation n'est pas perturbé chez la souris *rd7/rd7* (**Figure 64**).

Comme attendu, la rétine *TRβ*^{-/-} présente une absence de cônes rouges à tous les stades examinés. A P15, la densité moyenne de cônes bleus chez la souris *TRβ*^{-/-} est équivalente à la densité moyenne totale chez la souris sauvage, suggérant que l'absence de cônes rouges est intégralement compensée par un excès de cônes bleus. A P35 puis 3-4 mois, la densité moyenne des cônes bleus dans la rétine *TRβ*^{-/-} diminue par rapport à la densité totale dans la rétine sauvage (**Figure 63**).

L'examen des densités régionales montre que, à P15, la densité de cônes bleus chez la souris *TRβ*^{-/-} est équivalente à la densité totale pour les trois régions examinées. A P35 puis 3-4 mois, les régions centrale et dorsale présentent une nette diminution de la densité des cônes bleus que ce soit par rapport aux mêmes régions chez la souris sauvage ou par rapport à la région ventrale de la rétine *TRβ*^{-/-}. Ainsi, au stade 3-4 mois, la densité de la région dorsale est inférieure de 50% par rapport à celle de la région ventrale (**Figure 64**).

			Aire ventrale			Aire centrale			Aire dorsale		
			P15	P35	3M	P15	P35	3M	P15	P35	3M
WT	Cônes bleus	M	15,33	16,11	12,44	13,28	13,44	11,39	13,17	1,94	0,44
		ET	2,99	0,63	3,3	1,65	0	0,39	1,18	0,55	0
	Cônes rouges	M	0	6,05	1,33	3,83	4,36	7,78	5,97	12,61	10,94
		ET	-	1,18	1,89	0,39	3,1	1,89	4,12	1,57	0,39
rd7	Cônes bleus	M	44,88	41,83	39,38	27,94	24	20,33	18,66	8,72	4,83
		ET	13,98	2,91	11,71	1,02	0,94	2,2	0,47	1,02	0,55
	Cônes rouges	M	0	2,72	1,26	0	3,44	1,44	7,44	16,22	14,7
		ET	-	3,06	0,1	-	1,81	0,42	3,61	3,06	0,31
TR β -	Cônes bleus	M	17,11	16,89	13	16,11	12,83	8,78	17,55	10,33	7,44
		ET	1,26	3,14	2,51	0,63	0,39	0,79	0,63	1,41	0,16

Tab 5. : Comptages des cônes bleus et rouges dans les rétines de souris sauvage (WT), *rd7/rd7* (rd7) et *TR β -/-* (TR β -)

Les densités ont été établies à P15, P35 et 3-4 mois (3M) et sont indiquées en milliers de cônes par mm². M : Moyenne, ET : Ecart-type.

Le fait que cette diminution soit essentiellement localisée dans la moitié dorsale de la rétine, c'est-à-dire la région normalement dominée par les cônes rouges, suggère que chez la souris *TRβ*^{-/-}, les cônes bleus situés dans la région dorsale et n'ayant pas subi la transdifférenciation en cônes rouges, diffèrent des cônes bleus "normaux" localisés dans la région ventrale et seraient sujets à une mort cellulaire programmée. L'examen de souris plus âgées devrait permettre de confirmer cette observation.

L'établissement et l'analyse des topographies des cônes bleus et rouges pour ces trois lignées nous montrent que :

- chez la souris sauvage, un phénomène de transdifférenciation des cônes bleus en cônes rouges a lieu entre P15 et P35. Ce phénomène est essentiellement localisé dans la région dorsale et contraste avec la description du développement des cônes et de leur mosaïque faite par Szél et coll. (Szél et coll., 1993)
- ce phénomène de transdifférenciation n'est pas perturbé chez la souris *rd7/rd7* et n'a pas lieu chez la souris *TRβ*^{-/-}
- chez la souris *TRβ*^{-/-}, les cônes situés dans la région dorsale et n'ayant pas subi la transdifférenciation dégénèrent avec l'âge
- l'inactivation de NR2E3 chez la souris *rd7/rd7* a pour conséquence une augmentation exclusive de la densité de cônes bleus. Cette augmentation est surtout visible dans la rétine ventrale mais est aussi observable dans la rétine dorsale, indiquant que l'altération concerne l'ensemble de la population des cônes bleus et non une zone particulière de la rétine

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Activité transcriptionnelle de NR2E3 et recherche de ses ligands endogènes : Nos travaux ont démontré l'absence de corrélation entre l'activité inhibitrice du LBD de NR2E3 et le phénotype de l'ESCS. Cette absence de corrélation suggère qu'une autre fonction liée au LBD de NR2E3 est systématiquement affectée par l'ensemble des mutations associées à l'ESCS localisées dans le LBD. L'analyse du modèle moléculaire du LBD de NR2E3 nous a conduit à envisager l'existence d'une fonction de transactivation ligand dépendante qui constituerait cette fonction systématiquement affectée par les mutations associées à l'ESCS.

Si la récente identification de molécules synthétiques agonistes de NR2E3 confirme l'existence d'une activité de transactivation ligand dépendante, notre recherche ne nous a pas permis d'identifier de ligand endogène pour NR2E3 à partir d'extraits lipidiques issus de rétine de porc (Kapitskaya et coll., 2006 ; Wolkenberg et coll., 2006).

Il est possible de distinguer deux catégories d'hypothèses susceptibles d'expliquer notre absence de réussite, selon qu'elles concernent l'étape de l'extraction lipidique ou celle de l'essai fonctionnel.

La limite liée à l'étape d'extraction lipidique est qu'il est impossible d'affirmer que le ou les ligands de NR2E3 aient été présents dans les échantillons testés. Deux postulats justifiaient l'utilisation d'extraits lipidiques issues de la rétine ou de l'épithélium pigmenté : la nature liposoluble supposée du ou des ligands de NR2E3 et leur présence dans la rétine. Différentes hypothèses peuvent expliquer l'absence de ligand de NR2E3 dans les échantillons issus de rétine porcine :

- de nombreux ligands de récepteurs nucléaires, telles les différentes isoformes de l'acide rétinoïque, sont particulièrement sensibles à l'oxydation et/ou aux UV et susceptibles

d'être dégradés lors de l'extraction lipidique. Malgré les précautions prises au cours de l'extraction (ajout de BHT, un anti-oxydant, aux solvants utilisés, minimalisation de l'exposition à la lumière blanche, conservation des échantillons sous argon, un gaz neutre), l'éventualité d'une dégradation du ou des ligands de NR2E3 ne peut être exclue. Cependant, l'utilisation du récepteur Gal4-RAR^{LBD} indique une préservation, au moins partielle, de l'acide rétinoïque présent dans la rétine, et plaide contre cette hypothèse

- la concentration du ligand dans la rétine ou l'épithélium pigmentée est trop faible pour être détectable dans l'essai fonctionnel

- le ligand de NR2E3 serait absent de la rétine adulte. Chez la souris, l'expression de NR2E3 débute vers P0 et son pic d'expression se situe vers P6 alors que la rétinoïdogenèse se termine à P9. Le ligand de NR2E3 pourrait n'être présent que durant le développement. Selon cette hypothèse et en reprenant le schéma de la **Figure 29**, le ligand de NR2E3 ne serait important que pour la phase précoce d'engagement et non pour la phase plus tardive de maturation où seule la fonction répressive interviendrait

- le ligand endogène de NR2E3 est hydrophile et n'est pas présent dans les extraits lipidiques testés. Il a été montré récemment que le D-glucose et le D-glucose-6-phosphate constituaient des ligands endogènes de LXR (Liver X Receptor) alors que ce récepteur possède aussi comme ligands des dérivés du cholestérol (**Tableau 2**). Ceci démontre qu'un récepteur nucléaire peut avoir une molécule hydrosoluble pour ligand (Mitro et coll., 2007)

- NR2E3 ne possède pas de ligand endogène

En postulant que le ou les ligands de NR2E3 aient été présents dans les échantillons testés, différentes limites liées à l'essai fonctionnel pourraient expliquer pourquoi celui-ci n'a pas permis leur détection :

- le ligand est présent dans l'échantillon testé mais est dégradé par les cellules COS-1

- une molécule antagoniste de NR2E3 pourrait être présente dans les cellules COS-1. L'existence de molécules d'origine endogène et agissant comme des agonistes inverses a été mise en évidence pour le récepteur CAR. Initialement défini comme un récepteur exerçant une activité transcriptionnelle constitutive, des ligands avec des effets négatifs ou positifs ont été identifiés, des hormones androgènes agissant comme agoniste inverse, c'est-à-dire que leur fixation supprimant l'activité transcriptionnelle constitutive de CAR (Tzameli et Moore, 2001)

- des protéines co-régulatrices essentielles à l'activité de transactivation ligand dépendante de NR2E3 ne sont pas exprimées dans les cellules COS-1. Cette hypothèse n'explique cependant pas pourquoi l'activité inhibitrice de Gal4-NR2E3^{LBD} persisterait après fixation du ligand dans les cellules COS-1

Récemment a été identifié Ret-CoR (Retina Co-Repressor), un corépresseur exprimé dans la rétine et cerveau et interagissant avec NR2E3 via des domaines d'interaction LXXLL. L'analyse des lignées cellulaires 293F, Y79 et HepG2 a montré que Ret-CoR n'est exprimé que dans les deux premières (Takezawa et coll., 2007). L'expression de Ret-CoR n'a pas été vérifiée dans les lignées HeLa et COS-1, mais son absence des cellules COS-1 pourrait être une des raisons pour lesquelles notre essai ne nous a pas permis d'identifier de ligand pour NR2E3. Ces données suggèrent que le choix de la lignée cellulaire utilisée dans l'essai fonctionnel est fondamental pour son succès. Il conviendra donc pour la répétition du criblage d'extraits lipidiques, d'utiliser une ou plusieurs lignées exprimant Ret-CoR et éventuellement d'autres protéines capables d'interagir avec NR2E3. Ainsi, la lignée Y79, issue d'une rétinoblastome humain, exprime non seulement Ret-CoR et NR2E3, mais aussi les facteurs de transcription CRX et NRL, ce qui en fait un candidat de choix dans la perspective d'une répétition du criblage (Kobayashi et coll., 1999 ; Takezawa et coll., 2007).

Le fait que notre essai fonctionnel, contrairement à celui utilisé par Kapitskaya et coll., ne nous ait pas permis de mettre en évidence l'activité de l'acide 13-cis rétinolique suggère fortement que notre absence de succès dans l'identification d'un ligand endogène pour NR2E3 a pour origine une limite de notre essai fonctionnel. Comme notre essai fonctionnel, celui mis au point par Kapitskaya et coll. repose sur la capacité du LBD de NR2E3 à réguler la transcription d'une manière ligand dépendante. Cet essai utilise aussi un récepteur chimérique Gal4-NR2E3^{LBD} et un gène reporter sous le contrôle d'éléments de fixation pour Gal4 mais diffère du notre sur plusieurs autres paramètres :

- utilisation de la lignée CHO (Chinese Hamster Ovary) au lieu de la lignée COS-1
- utilisation d'autres promoteurs minimaux pour le gène reporter (SV40 et E1b contre β -globin)
- établissement et sélection de lignées transfectées de manière stable et ayant intégré par recombinaison hétérologue le gène d'expression de Gal4-NR2E3^{LBD} et le gène reporter de la β -lactamase, alors que notre essai utilise uniquement des transfections transitoires

Concernant ce dernier point, pour établir ces lignées transfectées de manière stable, Kapitskaya et coll. ont utilisé en parallèle le récepteur chimérique Gal4-TR^{LBD}, portant le LBD de récepteur TR β , et son ligand T3 comme témoin positif. Ils ont en effet montré que la plupart des lignées transfectées de manière stable ne permettait pas de détecter l'activité du T3 dans l'essai fonctionnel utilisant Gal4-TR^{LBD}. Ces lignées diffèrent entre elles par le site d'intégration du gène reporter, démontrant ainsi l'importance de cette variable pour l'efficacité de l'essai fonctionnel. Si l'utilisation de transfection transitoire nous permet d'éliminer cette variable liée au site d'intégration, d'autres variables définissant le gène reporter pourraient être à l'origine de l'absence d'efficacité de notre essai fonctionnel.

La principale différence entre les deux essais fonctionnels réside dans leur finalité. Celui de Kapitskaya était destiné à un criblage à grande échelle de banques de molécules synthétiques. Par rapport à l'emploi d'extraits d'origine biologique, celui de banques présente l'avantage d'utiliser des concentrations permettant la détection d'agonistes présentant une faible affinité pour NR2E3, ce qui fut notamment le cas pour l'acide 13-cis rétinolique. La forte concentration des molécules testées pourrait être la principale raison du succès de Kapitskaya et coll.

Parallèlement à l'utilisation d'essais fonctionnels, l'identification des ligands de plusieurs récepteurs nucléaires orphelins a été permise, de manière indirecte, par l'établissement par rayons X des structures cristallographiques de leur LBD (Benoit et coll., 2004 ; Ingraham et Redinbo, 2005).

Un premier apport de la cristallographie concerne les récepteurs dont l'analyse de la structure du LBD a permis de mettre en évidence l'absence d'activité ligand dépendante. Ainsi, l'absence de poche de fixation observée pour le LBD de Nurr1 ou la "non accessibilité" constatée de la poche de fixation du LBD de l'orthologue murin de LRH-1 indiquent que ces récepteurs sont vraisemblablement ligand indépendants (Wang et coll., 2003 ; Krylova et coll., 2005).

Un phénomène courant lors des travaux permettant l'établissement de la structure cristallographique du LBD d'un récepteur nucléaire est celui de la fixation d'une molécule lipidique provenant de la bactérie où a eu lieu la synthèse protéique. Lorsque ce phénomène a lieu, l'identification du ligand fortuit permet la sélection de lipides eucaryotes comme molécules candidates pour le rôle de ligand endogène du même récepteur. Ainsi, la co-cristallisation du LBD du récepteur SF-1 (Steroidogenic Factor 1) avec un phospholipide bactérien a conduit à l'identification de différents phospholipides présents chez les eucaryotes

comme ligands endogènes de SF-1 (Krylova et coll., 2005). Ce phénomène de co-cristallisation d'un LBD avec un lipide bactérien lors de sa synthèse a aussi été observé pour les récepteurs HNF4 α et HNF4 γ et l'orthologue humain de LRH-1 (revu dans Ingraham et Redinbo, 2005).

Des travaux préliminaires effectués en vue de l'établissement de la structure cristallographique du LBD de NR2E3 indiquent que lors de son expression dans *E. coli*, la protéine His6-NR2E3^{LBD} est complexée à une molécule bactérienne. A l'instar du récepteur SF-1, l'identification de ce ligand fortuit par des techniques de spectrométrie de masse pourra permettre une sélection de molécules candidates basée sur leur appartenance à la même classe de lipide et sur leur présence à une concentration significative dans la rétine.

Une autre contribution possible de l'établissement de la structure cristalline du LBD de NR2E3 à l'identification de son ligand passe par une approche de type "molecular docking". Cette approche regroupe un ensemble de techniques permettant de déterminer les molécules susceptibles d'interagir avec une protéine à partir de la structure de cette dernière. Les informations fournies par la structure du LBD de NR2E3 et sa comparaison avec celles d'autres récepteurs nucléaires permettront d'établir une matrice de la poche de fixation du ligand à partir de laquelle il sera possible de tester des molécules candidates *in silico* pour leur capacité à servir de ligand pour NR2E3 (Sasorith et coll., 2002). Une des limites de ce type d'approche est que la flexibilité de la poche de fixation d'un récepteur nucléaire peut lui permettre d'adopter des formes totalement différentes en fonction du ligand auquel elle est associée. Ceci est notamment le cas du récepteur à l'ecdysone EcR (NR1H1), un récepteur nucléaire présent chez les invertébrés, l'analyse structurale de son LBD montrant que sa poche de fixation adopte des formes totalement différentes selon qu'il soit complexé à un ligand stéroïdien ou non stéroïdien (Billas et coll., 2003).

Expression des opsines chez les souris sauvage et mutantes : Nos comptages ont montré que l'inactivation de NR2E3 chez la souris *rd7/rd7* avait pour conséquence une augmentation exclusive de la densité des cônes bleus, la densité et la régionalisation des cônes verts n'étant pas affectées. Cette augmentation est surtout visible dans la rétine ventrale, dominée par les cônes bleus, mais est aussi observée dans la rétine dorsale, indiquant que l'altération concerne l'ensemble de la population des cônes bleus et non une zone particulière de la rétine.

Nous pouvons proposer deux hypothèses expliquant pourquoi la déficience de NR2E3 affecte exclusivement la population de cônes bleus, alors que la population de cônes rouges, qui semble "provenir" de la population de cônes bleus, n'est pas affectée. La première serait que l'identité des cônes bleus et rouges est déterminée dès leur sortie du cycle mitotique. Les précurseurs des cônes rouges seraient les premiers à apparaître et ne seraient pas affectés par NR2E3 dont l'expression ne débute pas avant P18 (rappelons que le pic d'apparition des précurseurs des cônes se situe vers E14). Dans cette hypothèse, le récepteur TR β 2 n'aurait qu'un rôle de maturation (rôle crucial car nécessaire à l'expression de l'opsine L et à la suppression de celle de l'opsine S) et son activité ne participerait pas à la détermination de l'identité du cône.

Une seconde hypothèse serait que l'apparition des précurseurs des cônes persiste plus longtemps dans la rétine ventrale et soit déjà terminée dans la rétine dorsale lorsque débute l'expression de NR2E3 dans la rétine. Dans cette seconde hypothèse, l'identité des cônes serait déterminée par l'activité du récepteur TR β 2.

Une donnée appuyant la première hypothèse est que le phénomène de dégénérescence observée dans la rétine dorsale de la souris *TR β -/-* suggère que les cônes dorsaux et ventraux, bien qu'exprimant la même opsine chez cette souris, sont intrinsèquement différents. Un autre argument est que l'augmentation de la densité des cônes bleus concerne l'ensemble de la rétine et non juste la région ventrale, ce qui plaide contre la seconde hypothèse. Par contre,

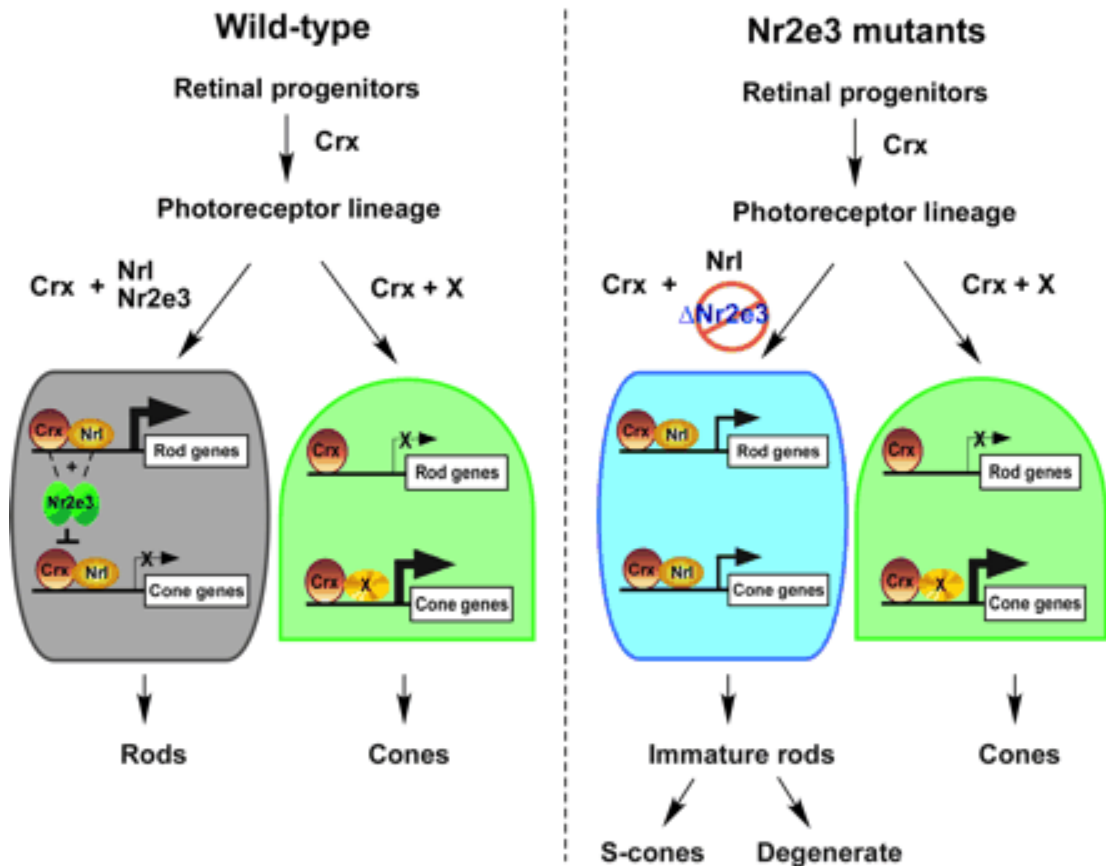


Fig. 65 : Modèle illustrant les fonctions transcriptionnelles de NR2E3 (Peng et coll., 2005)

Il est proposé que NR2E3 interagisse avec CRX pour amplifier l'activation par CRX et NRL des gènes spécifiques des bâtonnets et pour réprimer cette même activation pour les gènes spécifiques des cônes. Les précurseurs exprimant NRL mais non NR2E3 présentent une expression altérée des gènes spécifiques des bâtonnets comme des cônes.

l'existence de cônes co-exprimant les deux opsines et localisés dans la région médiane de la rétine, suggérant que les cônes dorsaux et ventraux diffèrent uniquement par le niveau d'expression des deux opsines et ne sont pas intrinsèquement différents, plaide en faveur de la seconde hypothèse (hypothèse émise par Applebury et coll. suggérant l'existence d'un seul type de cône exprimant à divers degrés les deux opsines ; Applebury et coll., 2000).

Déterminer si les stades d'apparitions des précurseurs des cônes bleus et rouges sont identiques ou différents devrait permettre de trancher entre ces deux hypothèses.

Quel rôle pour NR2E3 dans la différenciation des photorécepteurs ? : A l'heure actuelle, la fonction transcriptionnelle de NR2E3 reste sujette à controverse. Selon certaines équipes, NR2E3 aurait pour fonction de réprimer l'expression des gènes spécifiques des cônes et d'activer simultanément l'expression des gènes spécifiques des bâtonnets (**Figure 65** ; Peng et coll., 2005 ; Cheng et coll., 2006). Cependant, si le rôle de répresseur de la transcription des gènes spécifiques des cônes est admis, l'analyse du transcriptome rétinien de souris *rd7/rd7* par certaines équipes n'a pas permis de mettre en évidence le rôle d'activateur de certains gènes spécifiques des bâtonnets constaté par d'autres équipes pour NR2E3 (Chen et coll., 2005 ; Corbo et Cepko, 2005). L'identification de molécules agonistes pour NR2E3 et les études démontrant que ce récepteur active, *in vitro* et de manière synergique avec CRX et NRL, les promoteurs de gènes spécifiques des bâtonnets plaident fortement en faveur d'une fonction de transactivation ligand dépendante (Cheng et coll., 2004 ; Kapitskaya et coll., 2006 ; Peng et coll., 2005). L'identification du ou des ligands endogènes de NR2E3 devrait permettre de résoudre définitivement cette controverse.

Bien que NR2E3 ne soit pas exprimé par les photorécepteurs à cône, le phénotype de la souris *rd7/rd7* et l'examen de patients atteints de l'ESCS lui attribuent aussi un rôle dans la régulation de la population des cônes. Deux hypothèses peuvent expliquer ce paradoxe,

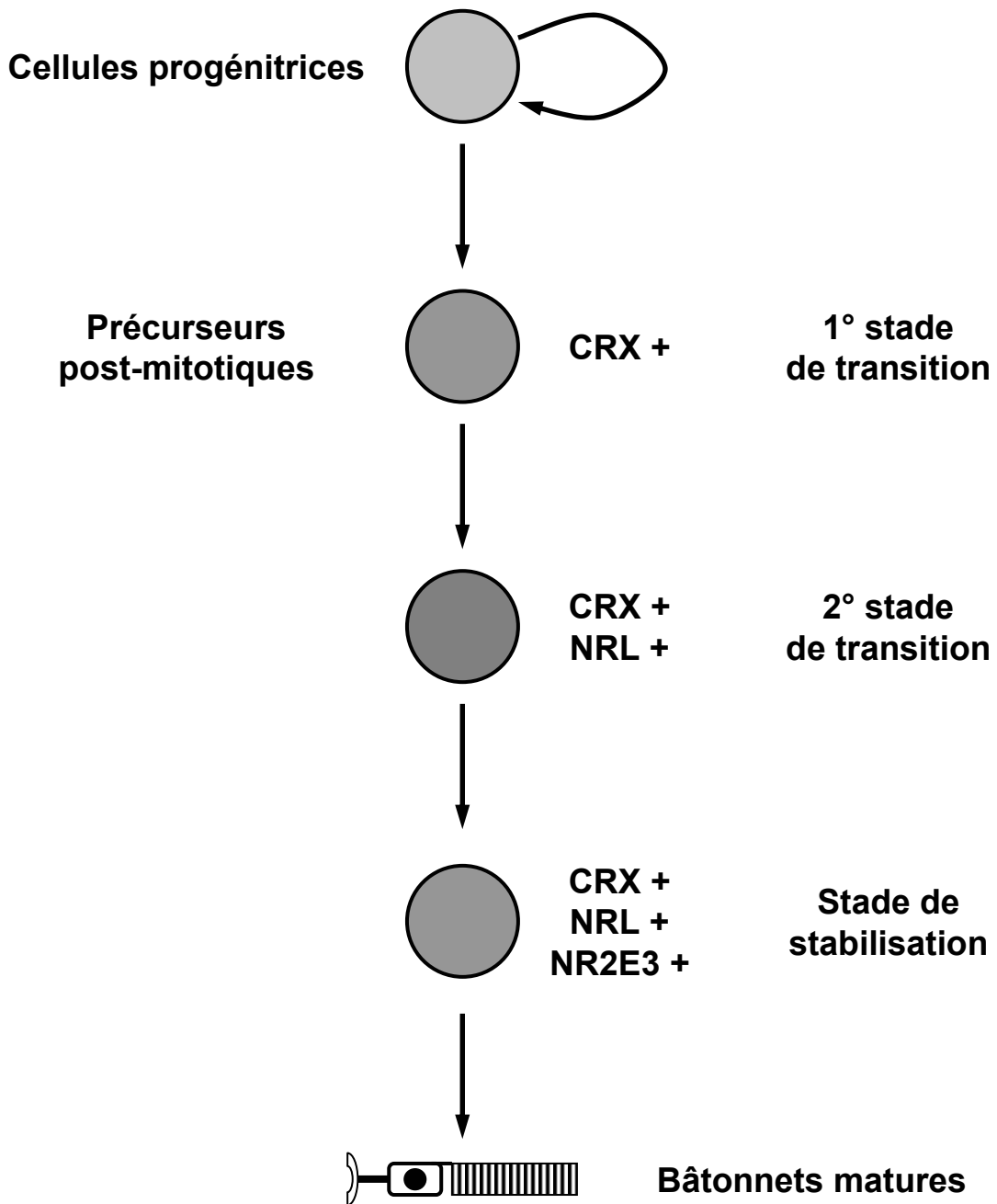


Fig. 66 : Représentation schématique de la fonction de NR2E3 durant le développement des photorécepteurs (d'après Cheng et coll., 2006)

Les précurseurs post-mitotiques exprimant CRX s'engagent dans la voie de différenciation des photorécepteurs en passant par différents stades de transition. L'expression de NRL durant un de ces stades de transition oriente le précurseur dans la voie de différenciation des bâtonnets mais seule l'expression postérieure de NR2E3 permettra un engagement définitif, son expression marquant un stade de stabilisation.

d'abord NR2E3 pourrait influencer l'apparition des précurseurs des cônes via un effet trophique exercé par les premiers bâtonnets, ensuite cônes et bâtonnets possèderaient un précurseur commun dont le devenir serait affecté par l'expression de NR2E3. L'expression transitoire de NR2E3 par l'ensemble des photorécepteurs au cours du développement est justement observée chez le poisson zèbre (Chen et coll., 2005). La **Figure 66** illustre cette seconde hypothèse où l'expression de NR2E3 aurait pour rôle de stabiliser l'engagement de ces précurseurs communs dans la voie de différenciation des bâtonnets (**Figure 66** ; Cheng et coll., 2006).

L'absence de corrélation entre l'activité répressive du LBD de NR2E3 et les mutations associées à l'ESCS pose la question des conséquences de ces mutations sur la régulation du programme transcriptionnelle spécifique des bâtonnets. Le fait que la majorité des versions mutantes de NR2E3 conserve leur capacité répressive suggère que c'est l'absence d'activation de certains gènes cibles qui conduirait aux phénotypes associés à l'ESCS. Cette hypothèse contraste avec le fait que certaines équipes n'aient pas réussi à identifier de gènes sous exprimés chez la souris *rd7/rd7*. En effet, l'activation de certains gènes par NR2E3 devrait entraîner leur sous expression en son absence. Une hypothèse pouvant réconcilier ces deux constatations serait que le ou les ligands de NR2E3 ne sont présents qu'au cours du développement.

La génération de souris transgéniques exprimant des versions de NR2E3 portant des mutations humaines associées à l'ESCS devrait permettre de progresser dans cette recherche. L'analyse de ces souris permettra notamment de confirmer si certaines versions mutantes de NR2E3 conservent leur capacité répressive *in vivo*.

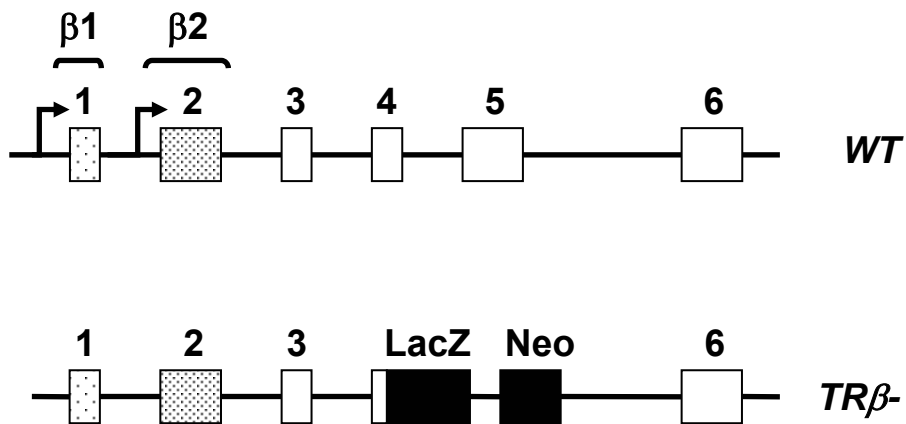


Fig. 67 : Description des allèles sauvage et mutant du gène *TRβ*

$\beta 1$ et $\beta 2$ désignent les exons spécifiques des isoformes *TRβ1* et *TRβ2* respectivement.

MATERIELS ET METHODES

A. Modèles animaux

Les différentes études ont été menées sur des animaux élevés dans des conditions standards [température de 25°C, alternance lumière/obscurité de (12h/12h), eau et nourriture en abondance]. Les animaux témoins utilisés sont de fond génétique C57BL/6.

Lignée *rd7/rd7*

La souris *rd7/rd7* constitue un modèle spontané pour l'ESCS. Cette lignée déficiente pour NR2E3 a été dérivée sur un fond génétique C57BL/6. L'allèle *rd7* de *Nr2e3* présente une insertion d'un retrotransposon de type L1 dans l'exon 5 (Cheng et coll., 2006). Cette insertion provoque un épissage aberrant avec suppression des exons 4 et 5. L'ARNm présente une délétion de 380 nucléotides couvrant une partie du LBD et provoquant un décalage du cadre de lecture (Akhmedov et coll., 2000 ; Haider et coll., 2001). La protéine NR2E3 est indétectable chez la souris *rd7/rd7*, indiquant une perte de fonction totale de NR2E3 (Peng et coll., 2005).

Lignée *TRβ*^{-/-}

La souris *TRβ*^{-/-} a été générée par transgénèse et dérivée sur un fond génétique 129/SV (Gauthier et coll., 1999). Les exons 4 et 5, communs aux 2 isoformes et où est localisé le DBD de TRβ, ont été supprimés par recombinaison homologue avec une cassette contenant la séquence codante *LacZ* en phase avec celle de *TRβ* et la séquence codante *NeoR* sous le contrôle d'un promoteur β-actine (**Figure 67**). La présence de deux sites de polyadénylation en aval des gènes *LacZ* et *NeoR* empêche la transcription de la séquence codante de *TRβ* située en aval.

B. Techniques de biologie cellulaire

Lignée cellulaire COS-1

La lignée cellulaire COS-1 est dérivée de la lignée CV-1 transformée avec un virus SV40 défectif codant pour l'antigène T (Gluzman, 1981). La lignée cellulaire CV-1 est issue d'une cellule rénale de singe vert d'Afrique adulte infectée avec le virus du sarcome de Rough (Jensen et coll., 1964). Les cellules sont maintenues dans du DMEM (Invitrogen) avec 10% de sérum de veau fœtal (Invitrogen), à 37°C et sous 5% de CO₂.

Lignée cellulaire HeLa

La lignée cellulaire HeLa est issue d'un adénocarcinome humain de l'épithélium du col de l'utérus. Les cellules sont maintenues dans du DMEM (Invitrogen) avec 10% de sérum de veau fœtal (Invitrogen), à 37°C et sous 5% de CO₂.

Vecteurs plasmidiques

- pCMX-epi-hPNR : Vecteur d'expression codant pour la protéine NR2E3 humaine entière avec, en position N-terminale, l'épitope hémagglutinine.

- pCMV-Gal4-NR2E3^{LBD} (Gerber et coll., 2000) : Vecteur d'expression codant pour une protéine de fusion composée des régions N-terminale de la protéine de levure Gal4 (résidus 1-142), région contenant la totalité du DBD, et C-terminale de la protéine NR2E3 humaine (résidus 122-410), contenant la totalité du LBD (Gerber et coll., 2000).

- pGal4-hRAR α (DEF) (J.M. Garnier, IGBMC, Strasbourg, France) : Vecteur d'expression codant pour une protéine de fusion composée des régions N-terminale de Gal4 et C-terminale de la protéine RAR α humaine, contenant la totalité du LBD.

- pTK-PRE4R-Luc (Chen et coll., 2005) : Vecteur codant pour la luciférase de ver luisant *Photinus pyralis* sous le contrôle d'un promoteur thymidine kinase et de sites de fixation pour NR2E3 positionnés dans le sens indirect

- 17M5- β globin-Luc (Jausons-Loffreda et coll., 1993) : Vecteur codant pour la luciférase du ver luisant sous le contrôle d'un promoteur β -globine et de sites de fixation Gal4.

- pRL-TK (Promega) : Vecteur reporter interne codant pour la luciférase du cnidaire *Renilla reniformis* sous le contrôle d'un promoteur thymidine kinase.

Transfection transitoire : précipités de phosphate de calcium

Les transfections transitoires des cellules COS-1 sont effectuées par la méthode des précipités de phosphate de calcium (Chen et Okayama, 1987). Les cellules sont rincées avec du PBS 1X puis dissociées avec de la trypsine, 0,05% m/v (Invitrogen). Ces cellules dissociées sont reprises à 7.10^5 cellules/ml dans du DMEM avec 10% de sérum puisensemencées dans une plaque de 24 puits (0,5 ml/puits). Les cellulesensemencées sont incubées 2 heures $\frac{1}{4}$ à 37°C et sous 5% de CO₂ avant l'ajout du mélange de transfection.

La transfection est réalisée en ajoutant à chaque puits 75 μ l de mélange de transfection suivant : 37,5 μ l d'une solution d'ADN 20 ng/ μ l (750 ng/puit)-CaCl₂ 0,25M complétées à 75 μ l avec une solution de BBS2X [250 ml de BBS2X : 3,66 g BES (Sigma)-14 ml NaCl 5M-325 μ l Na₂HPO₄ 1M ; ajustée à pH6,95 et filtrée sur 0,22 μ m]. Les cellules sont rincées et du milieu frais est ajouté 24 heures après transfection.

La mesure de l'activité luciférase est effectuée 48 heures après transfection en utilisant le système de mesure double-luciférase selon le protocole du fabricant (Dual-Luciferase Reporter Assay System ; Promega).

Transfection transitoire : lipofection

Les transfections transitoires des cellules HeLa sont effectuées par lipofection en utilisant comme vecteur la Lipofectamine-2000 (Invitrogen). Les cellules à confluence sont rincées avec du PBS 1X, dissociées avec de la trypsine, 0,05% m/v (Invitrogen) et réensemencées dans du DMEM avec 10% de sérum puisensemencées dans une plaque de 6 puits (2 ml/puits) en étant diluées trois fois. Les cellules sont incubées jusqu'à ce qu'elles atteignent un niveau de confluence de 70-80% (environ 24 heures), elles sont alors rincées et leur milieu est remplacé par du milieu OPTI-MEM (sans sérum ni antibiotique ; Invitrogen). La transfection est réalisée en ajoutant 500 µl de mélange de transfection suivant : dans deux fois 250 µl d'OPTI-MEM sont dilués 1 µg d'ADN à transférer et 2,5 µl de Lipofectamine-2000. Les deux solutions sont mélangées doucement, celle contenant la Lipofectamine-2000 est laissée à incuber 5 minutes avant d'être ajoutée à celle contenant l'ADN. Le mélange contenant l'ADN et la Lipofectamine-2000 est agité doucement et laissé à incuber 20 minutes avant d'être ajouté aux cellules. La mesure de l'activité luciférase est effectuée 48 heures après transfection.

C. Techniques de biologie moléculaire

Mini-préparation d'ADN plasmidique

Les mini-préparations d'ADN plasmidique sont réalisées à partir de 1,5 ml de culture bactérienne saturée en utilisant la méthode de lyse alcaline. Après centrifugation (800g, 5 min à 4°C) le culot bactérien est repris dans 100 µl de solution de suspension à 4°C (Tris 25mM pH8-EDTA 10mM-glucose 1,2%). Sont ajoutés en mélangeant par inversion, 100 µl d'une solution de lysozyme à 20 mg/ml pour une incubation de 5 min, 200 µl d'une solution de lyse (NaOH 200mM-SDS 1%) pour une incubation de 10 min, et 200 µl d'une solution de neutralisation (CH₃COOK 5M pH5,2) pour une incubation de 10 min. Après centrifugation du

lysats (10 min), les protéines sont extraites du surnageant avec 1 vol phénol-chloroforme (1/1, v/v ; Invitrogen). L'ADN plasmidique contenu dans la phase aqueuse est précipité avec de l'éthanol glacial, repris dans 100 µl de TE 10-1 (Tris 10mM pH8-EDTA 1mM) puis incubé 30 min à 37°C avec 2 µl de RNase A (10 mg/ml). L'enzyme est ensuite extraite avec 1 vol de phénol-chloroforme, l'ADN plasmidique est précipité puis repris dans 50 µl d'H₂O. La concentration en ADN est déterminée en mesurant la DO à 260 nm.

Maxi-préparation d'ADN plasmidique

Les grandes quantités de plasmides sont préparées à partir de 450 ml de culture bactérienne saturée en utilisant la méthode de purification sur gradient de CsCl. Après centrifugation (5.000g, 10 min à 4°C) l'ADN est extrait par une lyse alcaline semblable à celle décrite pour les mini-préparations. Le lysat est centrifugé (14.000g, 30 min), le surnageant est filtré sur gaze, puis l'ADN et les protéines sont précipités avec de l'éthanol glacial en incubant 1 heure à 0°C. Le culot est repris dans 10 ml de TEN (Tris 10mM pH8-EDTA 1mM-NaCl 100mM), puis les protéines sont extraites avec 1 vol de phénol-chloroforme. L'ADN contenu dans la phase aqueuse est précipité puis repris dans 2 ml de TE 50-1 (Tris 50mM pH8-EDTA 1mM). Sont ajoutés 3,2 g de CsCl et 200 µl d'une solution de BET à 10 mg/ml (Invitrogen), le mélange est ensuite transféré dans un tube pour ultracentrifugeuse que l'on complète avec une solution de CsCl à 1 g/ml. L'ADN est centrifugé la nuit à 200.000g suivi d'une décélération progressive. La bande plasmidique (en position supérieure) est récupérée à l'aide d'une seringue, 50 µl de BET y sont ajoutés et l'ADN est à nouveau centrifugé pendant 6 heures à 200.000g. La bande plasmidique est récupérée et le BET est éliminé par des mélanges et des décantations successifs avec une solution d'isopropanol saturée en CsCl. Le CsCl est éliminé par une dialyse contre du TE 10-

1 la nuit à 4°C. L'ADN est précipité et repris dans le volume désiré d'H₂O. La concentration d'ADN est déterminée en mesurant la DO à 260 nm.

Extraction d'ARN

L'ARN est préparé à partir de rétines murines en utilisant une méthode adaptée de purification sur gradient de CsCl (Chirgwin et coll., 1979). La plupart des solutions utilisées a été traité avec du diéthyl-pyrocarbonate (DEPC). Les rétines sont prélevées dans 2,4 ml de Guanidium-HCl 6M (Promega), broyées jusqu'à homogénéisation puis 270 µl de CH₃COOK 2M pH5 sont ajoutés. Le mélange est agité vigoureusement 10 min puis centrifugé (5000g, 10 min). Le surnageant est prélevé et mélangé à 3,2 g de CsCl et 5,3 ml d'une solution de Tris 100mM pH8,1-N-lauryl sarcosine 1%. Après avoir déposé 1,8 ml d'une solution de CsCl-EDTA (1 g/ml et 10mM) dans un tube pour ultracentrifugeuse, le mélange y est transféré délicatement afin de ne pas le mélanger avec la solution de CsCl-EDTA, puis centrifugé 24 heures à 125.000g. Après centrifugation, le surnageant est éliminé, le culot contenant l'ARN est rincé avec 160 µl de Guanidium-HCl 6M, laissé sécher à l'air libre puis repris dans 150 µl d'une solution de Tris 10mM pH7,5-EDTA 1mM-SDS 0,1%. L'ARN est précipité avec de l'éthanol glacial en incubant 30 min à 0°C puis repris dans 50 µl d'H₂O-DEPC. La qualité de l'ARN est vérifiée par migration sur un gel d'agarose/formaldéhyde.

Electrophorèse d'ARN sur gel d'agarose/formaldéhyde

Le gel d'agarose et la migration sont effectués dans du matériel soigneusement lavé et traité à l'H₂O₂ 3%. Un gel d'agarose à 1% est coulé à partir du tampon de migration [formaldéhyde 2,2M-MOPS1X (MOPS 20mM-CH₃COONa 8mM pH7-EDTA 1mM) complété avec H₂O-DEPC]. Les échantillons sont préparés en mélangeant 1 µl d'ARN avec 3,2 µl de tampon pour échantillon (MOPS 12,5mM-formaldéhyde 3M-formamide 62,5%,

Nom	Mutation	Séquence
hPmut1	E121K	5'-CAG AAC GAA CGC CAG CCG CGA AGC AC-3'
hPmut2	E121K	5'-GTG CTT CGC GGC TGG CGT TCG TTC TG-3'
hPmut3	W234S	5'GTC AAG TCG GCC AAG AAC CTG CCT GT-3'
hPmut4	W234S	5'-ACA GGC AGG TTC TTG GCC GAC TTG AC-3'
hPmut5	R309G	5'-ATC TCT GGG TTC CGG GCA TTG GCG GT-3'
hPmut6	R309G	5'-ACC GCC AAT GCC CGG AAC CCA GAG AT-3'
hPmut7	R311Q	5'-CGG TTC CAG GCA TTG GCG GTG GAC CC-3'
hPmut8	R311Q	5'-GGG TCC ACC GCC AAT GCC TGG AAC CG-3'
hPmut9	R385P	5'-TGC GGA ACC CAT CGA GCT CCT CTT TTT CC-3'
hPmut10	R385P	5'-GGA AAA AGA GGA GCT CGA TGG GTT CCG CA-3'
hPmut11	M407K	5'-CTT TGT GAT AAG TTC AAA AAC TAG TGG GG-3'
hPmut12	M407K	5'-CCC CAC TAG TTT TTG AAC TTA TCA CAA AG-3'
hPmut13	N397Stop	5'-CAA GAC CAT AGG GTA AAC TCC AAT GGA GAA G-3'
hPmut14	N397Stop	5'-CTT CTC CAT TGG AGT TTA CCC TAT GGT CTT G-3'
hPmut15	R385L	5'-GTT TAT CAC TGC GGA ACT CAT CGA GCT CCT C-3'
hPmut16	R385L	5'-GAG GAG CTC GAT GAG TTC CGC AGT GAT AAAC-3'

Tab. 6 : Liste des oligonucléotides utilisés pour les insertions de mutations ponctuelles

Marquage radioactif de sondes nucléotidiques

Un fragment double brin contenant le site de fixation étudié, est formé par hybridation de 2 oligonucléotides complémentaires. La sonde est marquée par complémentation des extrémités 5' avec du dCTP radioactif. La réaction a lieu dans un volume de 20 µl incubé 30 min à 37°C et contenant 100 ng d'oligonucléotides appariés, 2,5mM d'ATP, de dGTP et de dTTP, 5 µl de [α -³²P]-dCTP (6.000 Ci/mmol ; Amersham Biosciences), le tampon de réaction pour polymérase 1X et 5U d'ADN polymérase I (fragment de Klenow ; Promega). Le volume réactionnel est ensuite complété à 50 µl avec de l'H₂O, puis les nucléotides non incorporés sont éliminés par une chromatographie d'exclusion en déposant les 50 µl sur une colonne de Sephadex G50 (Amersham Biosciences). La sonde est conservée à -80°C après mesure de son activité.

Expérience de retard sur gel

Les expériences de retard sur gel sont réalisées à partir de 40.000 cpm de sonde et 5 µg de protéines nucléaires. La réaction de fixation est effectuée dans un volume de 50 µl contenant la sonde et les protéines nucléaires, 3 µg de poly(dI-dC) (Amersham Biosciences), du tampon de fixation 1X [HEPES 25mM pH7,5-KCl 50mM-MgCl₂ 5mM-EDTA 0,1mM-NP40 0,1% (v/v)-glycérol 10 % (v/v)] et, éventuellement, un large excès de sonde froide (50 à 100 fois la quantité de sonde radioactive déposée). Ce mélange réactionnel est incubé 20 min à température ambiante avant d'être déposé sur gel [acrylamide-bisacrylamide 30:1 4% (Sigma)-NP40 0,01% (v/v)-glycérol 1% (v/v)-catalyseurs Temed et persulfate d'ammonium] préparé avec du tampon de migration TBE 0,5X (TBE 1X pH8,3 : Tris-HCl 90mM-H₃BO₃ 90mM-EDTA 2mM). La migration s'effectue pendant 3 heures à 1 mA/cm, le gel est ensuite séché sous vide et la radioactivité détectée par autoradiographie.

D. Techniques de biochimie

Préparation de protéines nucléaires

Les extraits nucléaires sont préparés à partir de boîte de culture (\varnothing : 10 cm) de cellules COS-1 transfectées transitoirement. Toutes les étapes sont effectuées dans la glace. Les cellules transfectées sont rincées avec du PBS 1X, récupérées par grattage et centrifugées (800g, 5 min). Le culot de cellules est rincé une fois avec 5vol de tampon hypotonique [HEPES 10mM pH7,5-Inhibiteurs de protéases "Complete" 1X (Boehringer Mannheim)-KCl 10mM-MgCl₂ 1,5mM-DTT 0,5mM], recentrifugé, repris dans 3vol de tampon hypotonique et incubé 10 min sur glace. La membrane cytoplasmique est disloquée mécaniquement et les noyaux sont récupérés par centrifugation (1.200g, 15 min). Le culot contenant les noyaux est repris dans 0,5vol de tampon A pauvre en sel [HEPES 10mM pH7,5-Inhibiteurs de protéases 1X-KCl 2mM-MgCl₂ 1,5mM-EDTA 0,2mM-DTT 0,5mM-glycérol 25% (v/v)] et la membrane nucléaire est disloquée en ajoutant goutte à goutte 0,5vol de tampon B riche en sel [HEPES 10mM pH7,5-Inhibiteur de protéases 1X-KCl 1,2M-MgCl₂ 1,5mM-EDTA 0,2mM-DTT 0,5 mM-glycérol 25% (v/v)]. Le lysat nucléaire est incubé 30 min sous agitation, centrifugé (14.000g, 30 min) et le surnageant contenant les protéines nucléaires solubles est aliquoté et conservé à -80°C.

Western-blot

Les extraits nucléaires sont analysés par la technique de Western-blot. Après dosage, 10 μ g de protéines sont dénaturés dans du tampon d'échantillon 1X [Tris 10mM pH8- EDTA 1mM- DTT 20mM-SDS 3% (v/v)-glycérol 10% (v/v)-bleu de bromophénol 0,1% (m/v)] pendant 5 min à 95°C, puis déposés sur un gel de SDS-polyacrylamide discontinu (Invitrogen). La migration est effectuée dans du tampon de migration (Invitrogen) à 20 V/cm pendant environs 45 min. Après migration, les protéines sont transférées du gel à une

membrane de nitrocellulose (Schleicher and Schuell). Le transfert dure 2 heures à 5 mA/cm² dans du tampon de transfert [Tris 20mM-Glycine 150mM-Méthanol 20% (v/v) ; préparé extemporanément]. La membrane est ensuite rincée avec du PBS1X, puis incubée 1 heure sous agitation dans une solution de blocage [PBS 1X-Tween20 0,05% (v/v)-lait écrémé et déshydraté 5% (m/v)]. La membrane est incubée avec l'anticorps primaire, dilué dans la solution de blocage, la nuit à 4°C et sous légère agitation. Les anticorps primaires utilisés sont : un anticorps murin monoclonal anti-HA-Tag (Cell Signaling Technology) dilué au 1/1.000, et un anticorps murin monoclonal anti-Gal4^{DBD} (don du Pr. Pierre Chambon) dilué au 1/2.000. La membrane est ensuite rincée avec du PBS-Tween20 (1X-0,05%) puis incubée pendant 2 heures avec un anticorps secondaire dirigé contre les IgG murins et couplé à la peroxydase (Jackson ImmunoResearch Laboratories) dilué au 1/15.000. La membrane est à nouveau rincée avec du PBS-Tween20 puis incubée 5 min avec 1 ml de réactif chimioluminescent (ECL ; Amersham Biosciences) avant l'exposition d'un film argentique.

Extraction et purification des lipides

Les lipides sont extraits à partir de rétines ou d'épithéliums pigmentés réiniens issus d'yeux de porcs prélevés à l'abattoir. La technique employée est similaire à celle utilisée par Dreyfus et coll. (Dreyfus et coll., 1997). Brièvement, la rétine neurale et l'épithélium pigmenté rétinien sont séparés des autres tissus oculaires puis homogénéisés mécaniquement dans de l'H₂O déionisée. Les lipides sont extraits en ajoutant un large excès de solvants organiques [10 vol de Chloroforme-Méthanol (1:1, v/v)]. Les différentes classes de lipides sont séparées par chromatographie sur une colonne d'acide silicique. Les fractions lipidiques finales sont séchées sous un flux d'azote avant d'être reprises dans de l'éthanol puis testées comme ligand de NR2E3 dans un essai fonctionnel. Afin de préserver les lipides sensibles à la lumière ou à l'oxydation, l'exposition à la lumière et à l'air est réduite autant que possible et

un antioxydant est ajouté aux différents solvants (BHT : Butylated Hydroxy-Toluene 0,1mM ; Sigma).

E. Techniques d'immunohistochimie

Anticorps utilisés

- SE2107 : Anticorps polyclonal développé chez le lapin. Il est dirigé contre le peptide synthétique CGPDWYTVGTKYRSE correspondant aux résidus 182 à 196 de l'opsine bleue de souris (Léveillard et coll., 2004).

- COS-1 : Anticorps murin monoclonal. Il a été développé à partir d'un extrait membranaire de photorécepteurs issu d'une rétine aviaire et est capable de reconnaître l'opsine rouge de souris (Szél et coll., 1986).

Marquage sur rétine entière

La technique de marquage sur rétine entière est similaire à celle utilisée par Szél et coll. (Szél et coll., 1992). L'œil, orienté par une légère incision de la cornée, est énucléé, immergé 5 min dans du PBS 1X-paraformaldéhyde 4% pour le rigidifier, puis perforé au niveau du limbe. Après 30 min de fixation, la cornée est enlevée, l'orientation étant conservée par une incision de la sclère. L'œil est laissé à fixer la nuit à 4°C, rincé avec du PBS 1X et conservé à 4°C. Les couches externes de l'œil (sclère, choroïde et EPR) sont retirées peu avant l'immunomarquage.

Les sites de fixation non spécifique sont bloqués en préincubant la rétine pendant 1 heure dans du PBS 1X-Triton X100 0,25% (v/v)-BSA 2,5% (m/v). Les incubations et rinçages suivants sont effectués dans du PBS 1X-Triton X100 0,25% (v/v)-BSA 1% (m/v). La rétine est incubée avec l'anticorps primaire 6 heures à température ambiante ou bien 24 heures à 4°C, puis rincée 3 fois 1 heure sous agitation. L'anticorps primaire est détecté à l'aide du système

Vectastain et selon le protocole du fabricant (Vectastain ABC IgG kit ; Vector Laboratories).

La rétine est ensuite incubée avec le substrat colorimétrique de la peroxydase (diaminobenzidine ; Vector Laboratories) jusqu'à ce que la coloration des cônes devienne visible, puis la réaction est arrêtée par plusieurs lavages à l'H₂O déionisée.

La rétine aplatie est laissée à sécher la nuit, couche des photorécepteurs en position supérieure, puis passée dans une série de bains d'éthanol de 20 min (2 fois 70%, 2 fois 95% et 2 fois 100%). Après une dernière incubation dans du xylène, la rétine est montée sur lame avec de la solution de montage Pertex (Histolab).

Comptage des populations de photorécepteurs à cône

Les photorécepteurs à cône sont comptés sur des rétines entières marquées soit avec l'anticorps SE2107, soit avec l'anticorps COS-1. Les densités moyennes de 14 zones réparties régulièrement sur la rétine sont calculées en faisant la moyenne des comptages de 10 carrés de 30 µm de côté pour chaque zone. La densité moyenne pour la rétine entière est calculée à partir de ces 14 zones.

BIBLIOGRAPHIE**A.**

- 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.
- Adler R (2000) A model of retinal cell differentiation in the chick embryo. *Prog Retin Eye Res* 19:529-557.
- Adler R, Hatlee M (1989) Plasticity and differentiation of embryonic retinal cells after terminal mitosis. *Science* 243:391-393.
- Aguirre GD, Baldwin V, Pearce-Kelling S, Narfstrom K, Ray K, Acland GM (1998) Congenital stationary night blindness in the dog: common mutation in the RPE65 gene indicates founder effect. *Mol Vis* 4:23.
- Ahmad I (1995) Mash-1 is expressed during rod photoreceptor differentiation and binds an E-box, E(opsin)-1 in the rat opsin gene. *Brain Res Dev Brain Res* 21:184-189.
- Ahmad I, Acharya HR, Rogers JA, Shibata A, Smithgall TE, Dooley CM (1998) The role of NeuroD as differentiation factor in the mammalian retina. *J Mol Neurosci* 11:165-178.
- Ahmad I, Tang L, Pham H (2000) Identification of neural progenitors in the adult mammalian eye. *Biochem Biophys Res Commun* 270:517-521.
- Ahnelt PK, Kolb H (2000) The mammalian photoreceptor mosaic-adaptative design. *Prog Retin Eye Res* 19:711-777.
- Akagi T, Mandai M, Ooto, S, Hiram Y, Osakada F, Kageyama R, Yoshimura N, Takahashi M (2004) Otx2 homeobox gene induces photoreceptor-specific phenotypes in cells derived from adult iris and ciliary tissue. *Invest Ophthalmol Vis Res* 45:4570-4575.
- Akhmedov NB, Piriev NI, Chang B, Rapoport AL, Haxes NL, Nishina PM, Nusinowitz S, Heckenlively JR, Roderick TH, Kozak, CA, Dancinger M, Davisson MT, Farber DB (2000) A deletion in a photoreceptor-specific nuclear receptor mRNA causes retinal degeneration in the *rd7* mouse. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:5551-5556.

- Akimoto M, Cheng H, Zhu D, Brzezinski JA, Khanna R, Filippova E, Oh EC, Jing Y, Linares JL, Brooks M, Zareparisis S, Mears AJ, Hero A, Glaser T, Swaroop A (2006) Targeting of GFP to newborn rods by Nrl promoter and temporal expression profiling of flow-sorted photoreceptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:3890-3895.
- Alexiades MR, Cepko CL (1997) Subsets of retinal progenitors display temporally regulated and distinct biases in the fates of their progeny. *Development* 124:1119-1131.
- Applebury ML, Antoch MP, Baxter LC, Chun LL, Falk JD, Farhangfar F, Kage K, Krzystolik MG, Lyass LA, Robbins JT (2000) The murine cone photoreceptor : a single cone type expresses both S and M opsins with retinal spatial patterning. *Neuron* 27:513-523.
- Audo I, Michaelidas M, Hawlina M, Robson AG, Sandbach JM, Neveu MM, Hogg CR, Hunt M, Moore AT, Bird AC, Webster AR, Holder GE. Phenotypic variation in Enhanced -Cone Syndrome. *Soumis*
- Azuma N, Nishina S, Yanagisawa H, Okuyama T, Yamada M (1996) PAX6 missense mutation in isolated foveal hypoplasia. *Nat Genet* 13:141-142.
- Azuma N, Yamaguchi Y, Handa H, Hayakawa M, Kanai A, Yamada M (1999) Missense mutation in the alternative splice region of the PAX6 gene in eye anomalies. *Am J Hum Genet* 65:656-663.
- Azuma N, Tadokoro K, Asaka A, Yamada M, Yamaguchi Y, Handa H, Matsushima S, Watanabe T, Kohsaka S, Kida Y, Shiraishi T, Ogura T, Shimamura K, Nakafuku M (2005) The Pax6 isoform bearing an alternative spliced exon promotes the development of the neural retinal structure. *Hum Mol Genet* 14:735-745.

B.

- Babu S, McIlvain V, Whitaker SL, Knox BE (2006) Conserved cis-element in the *Xenopus* red opsin promoter necessary for cone-specific expression. *FEBS Lett* 580:1479-1484.
- Baker KD, Shewchuk LM, Kozlova T, Makishima M, Hassell A, Wisely B, Caravella JA, Lambert MH, Reinking JL, Krause H, Thummel CS, Willson TM, Mangelsdorf DJ (2003) The drosophila orphan nuclear receptor DHR38 mediates an atypical ecdysteroid signalling pathway. *Cell* 113:731-742.
- Banerjee U, Renfranz PJ, Hinton DR, Rabin BA, Benzer S (1987) The sevenless+ protein is expressed apically in cell membranes of the developing drosophila retina; it is not restricted to cell R7. *Cell* 51:151-158.

- Beatty DD (1975) Visual pigments of the american eel *Anguilla rostrata*. *Vision Res* 15:771-776.
- Beatty DD (1984) Visual pigments and the labile scotopic visual system of fish *Vision Res* 24:1563-1573.
- Belecky-Adams T, Cook B, Adler R (1996) Correlations between terminal mitosis and differential fate of retinal precursor cells in vivo and in vitro: analysis with the “window-labeling” technique. *Dev Biol* 178:304-315.
- Belliveau MJ, Cepko CL (1999) Extrinsic and intrinsic factors control the genesis of amacrine and cone cells in the rat retina. *Development*. 126:555-566.
- Benko S, Love JD, Beladi M, Schwabes JW, Nagy L (2003) Molecular determinants of the balance between co-repressor and co-activator recruitment to the retinoic acid receptor. *J Biol Chem* 278:43797-43806.
- Benoit G, Malewicz M, Perlmann T (2004) Digging deep into the pockets of orphan nuclear receptors: insights from structural studies. *Trends Cell Biol* 14:369-376.
- 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.
- Blumberg B, Bolado J Jr, Derguini F, Craig AG, Moreno TA, Chakravarti D, Heyman RA, Buck J, Evans RM (1996) Novel retinoic acid receptor ligands in xenopus embryos. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:4873-4878.
- Billas IM, Iwema T, Garnier JM, Mitschler A, Rochel N, Moras D (2003) Structural adaptability in the ligand-binding pocket of the ecdysone hormone receptor. *Nature* 426:91-96.
- Blumberg B, Sabbagh W Jr, Juguilon H, Bolado J Jr, VanMeter CM, Ong ES, Evans RM (1998) SXR, a novel steroid and xenobiotic-sensing nuclear receptor. *Genes Dev* 12:3195-3205.
- Bourguet W, Ruff M, Chambon P, Gronemeyer H, Moras D (1995) Crystal structure of the ligand-binding domain of the human nuclear receptorRXR-alpha. *Nature* 375:359-360.
- Bourguet W, Vivat V, Wurtz JM, Chambon P, Gronemeyer H, Moras D (2000) Crystal structure of a heterodimeric complex of RAR and RXR ligand-binding domains. *Mol Cell* 5:289-298.
- Brasemann S, Graninger P, Busslinger M (1993) A selective transcriptional induction system for mammalian cells based on Gal4-estrogen receptor fusion proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:1657-1661.

Bruhn SL, Cepko CL (1996) Development of the pattern of photoreceptors in the chick retina. *J Neurosci* 16:1430-1439.

Bumsted O'Brien KM, Cheng H, Jiang Y, Schulte D, Swaroop A, Hendrickson AE (2004) Expression of photoreceptor-specific nuclear receptor NR2E3 in rod photoreceptors of fetal human retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45:2807-2812.

C.

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.

Chang WS, Harris WA (1998) Sequential genesis and determination of cone and rod photoreceptors in *Xenopus*. *J Neurobiol* 35:227-244.

Chavala SH, Sari A, Lewis H, Pauer GJ, Simpson E, Hagstrom SA, Traboulsi EI (2005) An Arg311Gln NR2E3 mutation in a family with classic Goldmann-Favre syndrome. *Br J Ophthalmol* 89:1065-1066.

Chawla A, Repa JJ, Evans RM, Mangelsdorf DJ (2001) Nuclear receptors and lipid physiology: opening the X-files. *Science* 294:1866-1870.

Chen C, Okayama H (1987) High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Mol Cell Biol* 7:2745-2752.

Chen JD, Evans RM (1995) A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors. *Nature* 377:454-457.

Chen F, Figueroa DJ, Marmorstein AD, Zhang Q, Petrukhin K, Caskey CT, Austin CP (1999) Retina-specific nuclear receptor: a potential regulator of cellular retinaldehyde-binding protein expressed in retinal pigment epithelium and Müller glial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:15149-15154.

Chen J, Rattner A, Nathans J (2005) The rod photoreceptor-specific nuclear receptor Nr2e3 represses transcription of multiple cone-specific genes. *J Neurosci* 25:118-129.

Chen J, Rattner A, Nathans J (2006) Effects of L1 retrotransposon insertion on transcript processing, localization and accumulation: lessons from the retinal degeneration 7 mouse and implications for the genomic ecology of L1 elements. *Hum Mol Genet* 15:2146-2156.

- Cheng H, Khanna H, Oh EC, Hicks D, Mitton KP, Swaroop A (2004) Photoreceptor-specific nuclear receptor NR2E3 functions as a transcriptional activator in rod photoreceptors. *Hum Mol Genet* 13:1563-1575.
- Cheng H, Aleman TS, Cideciyan AV, Khanna R, Jacobson SG, Swaroop A (2006) *In vivo* function of the orphan nuclear receptor NR2E3 in establishing photoreceptor identity during mammalian retinal development. *Hum Mol Genet* 15:2588-2602.
- Chirgwin JM, Przybyla AE, MacDonald RJ, Rutter WJ (1979) Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* 18:5294-5299.
- Chittka L, Raine NE (2006) Recognition of flowers by pollinators. *Curr Opin Plant Biol* 9:428-435.
- Cho KW, De Robertis EM (1990) Differential activation of xenopus homeo box genes by mesoderm-inducing growth factors and retinoic acid. *Genes Dev* 4:1910-1916.
- Chow RL, Altmann CR, Lang RA, Hemmati-Brivanlou A (1999) Pax6 induces ectopic eyes in a vertebrate. *Development* 126:4213-4222.
- Collin SP, Trezise AE (2004) The origins of colour vision in vertebrates. *Clin Exp Optom* 87:217-223.
- Corbo JC, Cepko CL (2005) A hybrid photoreceptor expressing both rod and cone genes in a mouse model of enhanced S-cone syndrome. *PLoS Genet* 1:e11.
- Curcio CA, Sloan KR, Kalina RE, Hendrickson AE (1990) Human photoreceptor topography. *J Comp Neurol* 292:497-523.

D.

- Darden AG, Wu BX, Znoiko SL, Hazard ES 3rd, Kono M, Crouch RK, Ma JX (2003) A novel *Xenopus* SWS2, P434 visual pigment: structure, cellular location, and spectral analyses. *Mol Vis* 9:191-199.
- Deeb SS (2006) Genetics of variation in human color vision and the retinal cone mosaic. *Curr Opin Genet Dev* 16:301-307.
- De la Pompa JL, Wakeham A, Correia KM, Samper E, Brown S, Aguilera RJ, Nakano T, Honjo T, Mak TW, Rossant J, Conlon RA (1997) Conservation of the Notch signalling pathway in mammalian neurogenesis. *Development* 124:1139-1148.
- Delyfer MN, Léveillard T, Mohand-Saïd S, Hicks D, Picaud S, Sahel JA (2004) Inherited retinal degenerations: therapeutic prospects. *Bio Cell* 96:261-269.

- De Urquiza AM, Liu S, Sjoberg M, Zetterstrom RH, Griffiths W, Sjobvall J, Perlmann T (2000) Docosahexaenoic acid, a ligand for the retinoid X receptor in mouse brain. *Science* 290:2140-2144.
- Douglas RH, Partridge JC, Dulai K, Hunt D, Mullineaux CW, Tauber AY, hynninen PH (1998) Dragon fish see using chlorophyll. *Nature* 393:423-424.
- Dreyer C, Keller H, Mahfoudi A, Laudet V, Krey G, Wahli W (1993) Positive regulation of the peroxysomal beta-oxydation pathway by fatty acids through activation of peroxysome proliferators-activated receptors (PPAR) *Biol Cell* 77:67-76.
- Dreyfus H, Guérolde B, Freysz L, Hicks D (1997) Successive isolation and separation of the major lipid fractions including gangliosides from single biological samples. *Anal Biochem* 249:67-78.
- Dryja TP (2000) Molecular genetics of Oguchi disease, fundus albipunctus, and other forms of stationary night blindness: LVII Edward Jackson Memorial Lecture. *Am J Ophthalmol* 130:547-563.

E.

- Ebray T, Koutalos Y (2001) Vertebrate photoreceptors. *Prog Ret Eye Res* 20:50-83.
- Epstein JA, Glaser T, Cai J, Jepeal L, Walton DS, Maas RL (1994) Two independent and interactive DNA-binding subdomains of the Pax6 paired domain are regulated by alternative splicing. *Genes Dev* 8:2022-2034.
- Escriva H, Safi R, Hänni C, Langlois MC, Saumitou-Laprade P, Stehelin D, Capron A, Pierce R, Laudet V (1997) Ligand binding was acquired during evolution of nuclear receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:6803-6808.
- Escriva H, Delaunay F, Laudet V (2000) Ligand binding and nuclear receptor evolution. *Bioessays* 22:717-727.

F.

- Fischer AJ, Reh TA (2001) Müller glia are a potential source of neural regeneration in the postnatal chicken retina. *Nat Neurosci* 4:247-252.
- Forman BM, Tzamelis I, Choi HS, Chen J, Simha D, Deol W, Evans RM, Moore DD (1998) Androstane metabolites bind to and deactivate the nuclear receptor CAR-beta. *Nature* 395:612-615.

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.

Furukawa T, Morrow EM, Li T, Davis FC, Cepko CL (1999) Retinopathy and attenuated circadian entrainment in Crx-deficient mice. *Nat Genet* 23:466-470.

G.

Gauthier K, Chassande O, Plateroti M, Roux JP, Legrand C, Pain B, Rousset B, Weiss R, Trouillas J, Samarut J (1999) Different functions for the thyroid hormone receptors TRalpha and TRbeta in the control of thyroid hormone production and post-natal development. *EMBO J* 18:623-631.

Gehring WJ (2002) The genetic control of eye development and its implications for the evolution of the various eye-types. *Int J Dev Biol* 46:65-73.

Gehring WJ (2005) New perspectives on eye development and the evolution of eyes and photoreceptors. *J Hered* 96:171-184.

Gellet AM, Sieving PA (1993) Assessment of foveal cone photoreceptors in Stargardt's macular dystrophy using a small dot detection task. *Vision Res* 33:1509-1524.

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

Gluzman Y (1981) SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell* 23:175-172.

Gouras P, Ekesten B (2004) Why do mice have ultra-violet vision? *Exp Eye Res* 79:887-892.

Green S, Walter P, Greene V, Krust A, Goffin C, Jensen E, Scrace G, Waterfield M, Chambon P (1986) Cloning of the human oestrogen receptor cDNA. *J Steroid Biochem* 24:77-83.

Gronemeyer H, Laudet V (1995) Transcription factors 3: nuclear receptors. *Protein Profile* 2: 1173-1308.

v/v). L'ARN est dénaturé par chauffage 15 min à 65°C puis 4 µl tampon de migration contenant du BET à 2 mg/ml sont ajoutés. Après migration, le gel est rincé avec du SSC2X (SSC1X : NaCl 150mM-CitrateNa 15mM) puis visualisé sous UV.

Transcription inverse

La réaction de transcription inverse est effectuée à partir de 2,5 µg d'ARN dilués dans 24 µl d'H₂O-DEPC. L'ARN est dénaturé par chauffage 5 min à 65°C puis incubé 2 heures à 37°C après avoir ajouté : 1 µl de RNasin 40 U/µl (Promega), 5 µl de DTT 100mM, 2,5 µl d'un mélange des 4 dNTP à 10mM, 2,5 µl d'amorce pdN6, 5 µl de reverse transcriptase Superscript II à 200 U/µl et 10 µl de tampon 5X (Invitrogen). Après incubation, le mélange est complété à 50 µl avec de l'H₂O-DEPC puis l'enzyme est extraite avec 1 vol de phénol-chloroforme. L'ADNc est précipité à l'éthanol glacial puis repris dans 50 µl d'H₂O.

Insertion de mutations ponctuelles

Les mutations ponctuelles sont introduites dans la région NR2E3 du plasmide pCMV-Gal4-NR2E3^{LBD} par la méthode de mutagenèse dirigée par des oligonucléotides. La réaction se fait à partir de 1,5 µg de plasmide et de 25 pmoles de chacun des 2 oligonucléotides portant la mutation (**Tableau 6**), dans un volume de 25 µl contenant les 4 dNTP à 100µM, le tampon de réaction pour polymérase 1X, et 2U d'ADN polymérase thermostable (Deep Vent ; New England Biolabs Inc). La réaction de polymérisation consiste en 18 cycles de 30 sec à 96°C, 30 sec à 50°C et 12 min à 68°C précédés d'une dénaturation initiale de 5 min à 96°C et suivis d'une étape finale de 6 min à 68°C. Le produit d'amplification est digéré par une incubation de 1 heure à 37°C avec 5U d'endonucléase DpnI (New England Biolabs Inc). Le produit de digestion est précipité à l'éthanol puis repris dans 10 µl d'H₂O. La présence des mutations est vérifiée par séquençage.

H.

- Haider NB, Jacobson SG, Cideciyan AV, Swiderski R, Streb LM, Searby C, Beck G, Hockey R, Hanna DB, Gorman S, Duhl D, Carmi R, Bennett J, Weleber RG, Fishman GA, Wright AF, Stone EM, Sheffield VC (2000) Mutation of nuclear receptor, *NR2E3*, causes enhanced S cone syndrome, a disorder of retinal cell fate. *Nat Genet* 24:127-131.
- Haider NB, Naggert JK, Nishina PM (2001) Excess cone cell proliferation due to a lack of a functional NR2E3 causes retinal dysplasia and degeneration in *rd7/rd7* mice. *Hum Mol Genet* 10:1619-1626.
- Halder G, Callaerts P, Gehring WJ (1995) New perspectives on eye evolution. *Curr Opin Genet Dev* 5:602-609.
- Hamburger V, Hamilton HL (1951) Series of embryonic chicken growth. *J Morphology* 88:49-92
- Harosi FI (1994) An analysis of two spectral properties of vertebrate visual pigments. *Vision Res* 34:1359-1367.
- Haruta M, Kosaka M, Kanegae Y, Saito I, Inoue T, Kageyama R, Nishida A, Honda Y, Takahashi (2001) Induction of photoreceptor-specific phenotypes in adult mammalian iris tissue. *Nat Neurosci* 4:1163-1164.
- Hatakeyama J, Tomita K, Inoue T, Kageyama R (2001) Roles of homeobox and bHLH genes in specification of a retinal cell type. *Development* 128:1313-1322.
- Hatakeyama J, Kageyama R (2004) Retinal cell fate determination and bHLH factors. *Semin Cell Dev Biol* 15:83-89.
- Haverkamp S, Wassle H, Duebel J, Kuner T, Augustine GJ, Feng G, Euler T (2005) The primordial, blue-cone color system of the mouse retina. *J Neurosci* 25:5438-5445.
- Hawes NL, Smith RS, Chang B, Davisson M, Heckenlively JR, John SWM (1999) Mouse fundus photography and angiography: A catalogue of normal and mutant phenotypes. *Mol Vis* 5:22.
- Hawryshyn CW, Martens G, Allison WT, Anholt BR (2003) Regeneration of ultraviolet-sensitive cones in the retinal cone mosaic of thyroxin-challenged post-juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J Exp Biol* 206:2665-2673.
- Hayashi T, Gekka T, Goto-Omoto S, Takeuchi T, Kubo A, Kitahara K (2005) Novel NR2E3 mutations (R104Q, R334G) associated with a mild form of enhanced S-cone syndrome demonstrate compound heterozygosity. *Ophthalmology* 112:2115.

- Heery DM, Kalkhoven E, Hoare S, Parker MG (1997) A signature motif in transcriptional co-activators mediates binding to nuclear receptors. *Nature* 387:733-736.
- Hendrickson AE (1994) Primate foveal development: a microcosm of current questions in neurobiology. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35:3129-3133.
- Hims MM, Diager SP, Inglehearn CF (2003) Retinitis pigmentosa: genes, proteins and prospects. *Dev Ophthalmol* 37:109-125.
- Hodin RA, Lazar MA, Wintman BI, Darling DS, Koenig RJ, Larsen PR, Moore DD, Chin WW (1989) Identification of a thyroid hormone receptor that is pituitary specific. *Science* 244:76-79.
- Hofer H, Carroll J, Neitz J, Neitz M, Williams DR (2005) Organization of the human cone mosaic. *J Neurosci* 25:9669-9679.
- Hollenberg SM, Weinberger C, Ong ES, Cerelli G, Oro A, Lebo R, Thompson EB, Rosenfeld MG, Evans RM (1985) Primary structure and expression of a functional human glucocorticoid receptor cDNA. *Nature* 318:635-641.
- Hörlein AJ, Näär AM, Heinzl T, Torchia J, Gloss B, Kurokawa R, Ryan A, Kamei Y, Söderström M, Glass CK, Rosenfeld MG (1995) Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor. *Nature* 377:397-404.
- Hu X, Lazar MA (1999) The CoRNR motif controls the recruitment of corepressors by nuclear hormone receptors. *Nature* 402:93-96.
- Hutcheson DA, Vetter ML (2002) Transgenic approaches to retinal development and function in *Xenopus laevis*. *Methods* 28:402-410.
- I.**
- Ingraham HA, Redinbo MR (2006) Orphan nuclear receptor adopted by crystallography. *Curr Opin Struct Biol* 15:708-715.
- Inoue T, Hojo M, Bessho Y, Tano Y, Lee JE, Kageyama R (2002) Math3 and NeuroD regulate amacrine cell fate specification in the retina. *Development* 129:831-842.
- Isayama T, Alexeev D, Makino CL, Washington I, Nakanishi K, Turro NJ (2006) An accessory chromophore in red vision. *Nature* 443:649.

J.

- Jacobson SG, Marmor MF, Kemp CM, Knighton RW (1990) SWS (blue) cone hypersensitivity in a newly identified retinal degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 31:827-838.
- Jacobson SG, Sumaroka A, Aleman TS, Cideciyan AV, Schwartz SB, Roman AJ, McInnes RR, Sheffield VC, Stone EM, Swaroop A, Wright AF (2004) Nuclear receptor NR2E3 gene mutations distort human retinal laminar architecture and cause an unusual degeneration. *Hum Mol Genet* 13:1893-1902.
- Jadhav AP, Mason HA, Cepko CL (2006) Notch 1 inhibits photoreceptor production in the developing mammalian retina. *Development* 133:913-923.
- Jausons-Loffreda N, Balaguer P, Roux S, Fuentes M, Pons M, Nicolas JC, Gelmini S, Pazzagli M (1994) Chimeric receptors as a tool for luminescent measurement of biological activities of steroid hormones. *J Biolumin Chemilumin* 9:217-221.
- Jensen FC, Girardi AJ, Gilden RV, Koprowski H (1964) Infection of human and simian tissue cultures with Rous sarcoma virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 52:53-59.

K.

- Kahn AJ (1974) An autoradiographic analysis of the time of appearance of neurons on the developing chick neural retina. *Dev Biol* 38:30-40.
- Kapitskaya M, Cunningham ME, Lacson R, Kornienko O, Bednar B, Petrukhin K (2006) Development of the high throughput screening assay for identification of agonists of an orphan nuclear receptor. *Assay Drug Dev Technol* 4:253-262.
- Kefalov V, Fu Y, Marsh-Armstrong N, Yau KW (2003) Role of visual pigment properties in rod and cone phototransduction. *Nature* 425:526-531.
- 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.
- Kliwer SA, Lenhard JM, Willson TM, Patel I, Morris DC, Lehmann JM (1995) A prostaglandin J2 metabolite binds peroxysome proliferators-activated receptor gamma and promotes adipocyte differentiation. *Cell* 83:813-809.
- Kliwer SA, Lehmann JM, Willson TM (1999) Orphan nuclear receptors: shifting endocrinology into reverse. *Science* 284:757-760.

- Knox BE, Schlueter C, Sanger BM, Green CB, Besharse JC (1998) Transgene expression in *Xenopus* rods. *FEBS Lett* 423:117-121.
- Kobayashi M, Takezawa SI, Hara K, Yu RT, Umesono Y, Agata K, Taniwaki M, Yasuda K, Umesono K (1999) Identification of a photoreceptor cell-specific nuclear receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:4814-4819.
- Komeima K, Roger BS, Lu L, Campochiaro PA (2006) Antioxidants reduce cone cell death in a model of retinitis pigmentosa. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:11300-11305.
- Kostrouch Z, Kostrouchova M, Love W, Jannini E, Piatigorsky J, Rall JE (1998) Retinoic acid X receptor on the diploblast *tripedalia cystophora*. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:13442-13447.
- Krylova IN, Sablin EP, Moore J, Xu RX, Waitt GM, McKay JA, Juzumiene D, Bynum JM, Madauss K, Montana V, Lebedeva L, Suzawa M, Williams JD, Williamms JW, Guy RK, Thornton SP, Fletterick, Willson TM, Ingraham HA (2005) Structural analyses reveal phosphatidyl inositols as ligands for the NR5 orphan nuclear receptors SF-1 and LRH-1. *Cell* 120:343-355.

L.

- LaVail MM, Rapaport DH, Rakic P (1991) Cytogenesis in the monkey retina. *J Comp Neurol* 309:86-114.
- Lehmann JM, Moore LB, Smith-Oliver TA, Wilkison WO, Willson TM, Kliewer SA (1995) An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxysome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma). *J Biol Chem* 270:12953-12956.
- Le Meur G, Stieger K, Smith AJ, Weber M, Deschamps JY, Nivard D, Mendes-Madeira A, Provost N, Pereon Y, Cherel Y, Ali RR, Hamel C, Moullier P, Rolling F (2006) Restoration of vision in RPE65-deficient Briard dogs using an AAV serotype vector that specifically targets the retinal pigmented epithelium. *Gene Ther*, sous presse
- Léveillard T, Mohand-Saïd S, Lorentz O, Hicks D, Fintz AC, Clérin E, Simonutti M, Forster V, Cavusoglu N, Chalmel F, Dollé P, Poch O, Lambrou G, Sahel JA (2004) Identification and characterization of rod-derived cone viability factor. *Nat Genet* 36:755-759.
- Li Y, Lambert MH, Xu HE (2003) Activation of nuclear receptors: a perspective from structural genomics. *Structure* 11:741-746.

- Love JD (2005) Nuclear receptors and disease. Encyclopedia of Life Science, John Wiley & Sons, LTD
- Lukats A, Dkhissi-Benyahya O, Szepessy Z, Röhlich P, Vigh B, Bennett NC, Cooper HM, Szél A (2002) Visual pigment coexpression in all cones of two rodents, the siberian hamster, and the pouched mouse. Invest Ophthalmol Vis Sci 43:2468-2473.
- Lupo G, Liu Y, Qiu R, Chandraratna RA, Barsacchi G, He RQ, Harris WA (2005) Dorsoventral patterning of the *Xenopus* eye: a collaboration of Retinoid, Hedgehog and FGF receptor signalling. Development 132:1737-1748.

M.

- Maglich JM, Sluder A, Guan X, Shi Y, McKee DD, Carrick K, Kamdar, Willson TM, Moore JT (2001) Comparison of complete nuclear receptor sets from the human, *Caenorhabditis elegans* and *Drosophila* genomes. Genome Biol 2.
- McCaffery P, Posch KC, Napoli JL, Gudas L, Drager UC (1993) Changing patterns of the retinoic acid system in the developing retina. Dev Biol 158:390-399.
- McLaren RE, Pearson RA, McNeil A, Douglas RH, Salt TE, Akimoto M, Swaroop A, Sowden JC, Ali RR (2006) Retinal repair by transplantation of photoreceptor precursors. Nature 444:156-157.
- Mears AJ, Kondo M, Swain PK, Takada Y, Bush RA, Saunders TL, Sieving PA, Swaroop A (2001) Nrl is required for rod photoreceptor development. Nat Genet 29:447-452.
- Milam AH, Rose L, Cideciyan AV, Barakat MR, Tang WX, Gupta N, Aleman TS, Wright AF, Stone EM, Sheffield VC, Jacobson SG (2002) The nuclear receptor *NR2E3* plays a role in human retinal photoreceptor differentiation and degeneration. Proc Natl Acad Sci USA 99:473-478.
- Mitro N, Mak PA, Vargas L, Giodo C, Hampton E, Molteni V, Kreusch A, Saez E (2007) The nuclear receptor LXR is a glucose sensor. Nature 445:219-223.
- Mohand-Saïd S, Hicks D, Simonutti M, Tran-Minh D, Deudo-Combe A, Dreyfus H, Silverman MS, Ogilvie JM, Tenkova T, Sahel JA (1997) Photoreceptor transplants increase host cone survival in the retinal degeneration (rd) mouse. Ophthalmic Res 29:290-297.

- Moraitis AN, Giguere V, Thompson CC (2002) Novel mechanism of nuclear receptor corepressor interaction dictated by activation function 2 helix determinants. *Mol Cell Biol* 22:6831-6841
- Morgan MJ, Adam A, Mollon JD (1992) Dichromats detect colour-camouflaged objects that are not detected by trichromats. *Proc Biol Sci* 248:291-295.
- Mori M, Ghyselinck NB, Chambon P, Mark M (2001) Systematic immunolocalization of retinoid receptors in developing and adult mouse eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42:1312-131318.
- Moritz OL, Tam BM, Papermaster DS, Nakayama T (2001) A functional rhodopsin-green fluorescent protein fusion protein localizes correctly in transgenic *Xenopus laevis* retinal rods and is expressed in a time dependent pattern. *J Biol Chem* 276:28242-28251.
- Morrow EM, Furukawa T, Lee JE, Cepko CL (1999) NeuroD regulates multiple functions in the developing neural retina in rodent. *Development* 126:23-26.

N.

- Nagaraj R, Banerjee U (2004) The little R cell that could. *Int J Dev Biol* 48:755-760.
- Nagy L, Schwabe JWR (2004) Mechanism of the nuclear receptor molecular switch. *Trends Biochem Sci* 29:317-324.
- Nakamura Y, Hayashi T, Kozaki K, Kubo A, Omoto S, Watanabe A, Toda K, Takeuchi T, Gekka T, Kitahara K (2004) Enhanced S-cone syndrome in a Japanese family with a nonsense NR2E3 mutation (Q350X). *Acta Ophthalmol Scand* 82:616-622.
- Nathans J, Piantanida TP, Eddy RL, Shows TB, Hogness DS (1986) Molecular genetics of inherited variation in human color vision. *Science* 232:203-210.
- Nathans J, Thomas D, Hogness DS (1986) Molecular genetics of human color vision: the genes encoding blue, green, and red pigments. *Science* 232:193-202.
- Nathans J, Davenport CM, Maumenee IH, Lewis RA, Hejtmancik JF, Litt M, Lovrien E, Weleber R, Bachynski B, Zwas F et al. (1989) Molecular genetics of human blue cone monochromacy. *Science* 245:831-838.
- Nathans J (1999) The evolution and physiology of human color vision: insights from molecular genetic studies of visual pigments. *Neuron* 24:299-312.
- Narfstrom K, Nilsson SE (1987) Hereditary rod-cone degeneration in a strain of Abyssinian cat. *Prog Clin Biol Res* 247:349-368.

- Neitz M, Neitz J (2001) The uncommon retina of the common house mouse. *Trends Neurosci* 24:248-250.
- Nettles KW, Greene GL (2005) Ligand control of coregulator recruitment to nuclear receptors. *Annu Rev Physiol* 67:309-333.
- Neumann CJ, Nüsslein-Volhard C (2000) Patterning of the zebrafish retina by a wave of sonic hedgehog activity. *Science* 289:2137-2139.
- Newman LA, Robinson PR (2005) Cone visual pigments of aquatic mammals. *Vis Neurosci* 22:873-879.
- Ng L, Hurley JB, Dierks B, Srinivas M, Saltó C, Vennström B, Reh TA, Forrest D (2001) A thyroid hormone receptor that is required for the development of green cone photoreceptors. *Nat Genet* 27:94-98.
- Nilsson DE, Gislén L, Coates MM, Skogh C, Garm A (2005) Advanced optics in a jellyfish eye. *Nature* 435:201-205.
- 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.
- Nishida A, Furukawa A, Koike C, Tano Y, Aizawa S, Matsuo I, Furukawa T (2003) Otx2 homeobox gene controls retinal photoreceptor cell fate and pineal gland development. *Nat Neurosci* 6:1255-1263.

O.

- Ohnuma S, Mann F, Boy S, Perron M, Harris WA (2002) Lipofection strategy for the study of *Xenopus* retinal development. *Methods* 28:411-419.
- Okano T, Kojima D, Fukada Y, Shichida Y, Yoshizawa T (1992) Primary structures of chicken cone visual pigments: Vertebrate rhodopsins have evolved out of cone visual pigments. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:5932-5936.
- Okano T, Fukada Y, Yoshizawa T (1995) Molecular basis for tetrachromatic color vision. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 112:405-414.
- Onate SA, Tsai SY, Tsai MJ, O'Malley BW (1995) Sequence and characterization of a coactivator for the steroid hormone receptor superfamily. *Science* 270:1354-1357.
- Onuma Y, Takahashi S, Asashima M, Murata S, Gehring WJ (2002) Conservation of Pax6 function and upstream activation by Notch signalling in eye development of frogs and flies. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:2020-2025.

P.

- Pan Y, Nekkalapudi S, Kelly LE, El-Hodiri HM (2006) The Rx-like homeobox gene (Rx-L) is necessary for normal photoreceptor development. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47:4245-4253.
- Peichl L (2005) Diversity of mammalian photoreceptor properties: adaptations to habitat and lifestyle? *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 287:1001-1012.
- Peng GH, Ahmad O, Ahmad F, Liu J, Chen S (2005) The photoreceptor-specific nuclear receptor Nr2e3 interacts with Crx and exerts opposing effects on the transcription of rod versus cone genes. *Hum Mol Genet* 14:747-764.
- Perissi V, Staszewski LM, McInerney EM, Kurokawa R, Kronen A, Rose DW, Lambert MH, Milburn MV, Glass CK, Rosenfeld MG (1999) Molecular determinants of nuclear receptor-corepressor interaction. *Genes Dev* 13:3198-3208.
- 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.
- Petersen-Jones S (2005) Advances in the molecular understanding of canine retinal diseases. *J Small Anim Pract* 46:371-380.
- Politi LE, Adler R (1986) Generation of enriched populations of cultured photoreceptor cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 28:118-125.
- Privalsky ML (2004) The role of corepressors in transcriptional regulation by nuclear hormone receptors. *Annu Rev Physiol* 66:315-360.

R.

- Rapaport DH, Patheal SL, Harris WA (2001) Cellular competence plays a role in photoreceptor differentiation in the *xenopus* retina. *J Neurobiol* 49:129-141.
- Raymond PA, Barthel LK (2004) A moving wave patterns the cone photoreceptor mosaic array in the zebrafish retina. *Int J Dev Biol* 48:935-945.
- Raymond PA, Barthel LK, Bernardos RL, Perkowski JJ (2006) Molecular characterization of retinal stem cells and their niches in adult zebrafish. *BMC Dev Biol* 6:36.
- Rex TS, Fariss RN, Lewis GP, Linberg KA, Sokal I, Fisher SK (2002) A survey of molecular expression by photoreceptors after experimental retinal detachment. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43:1234-1247.
- Rex TS, Lewis GP, Geller SF, Fisher SK (2002) Differential expression of cone opsin mRNA levels following experimental detachment and reattachment. *Mol Vis* 8:114-118.

- Roberts MR, Hendrickson A, McQuire CR, Reh TA (2005) Retinoid X receptor (gamma) is necessary to establish the S-opsin gradient in cone photoreceptors of the developing mouse retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46:2897-2904.
- Roberts MR, Srinivas M, Forrest D, Morreale de Escobar G, Reh TA (2006) Making the gradient: thyroid hormone regulates cone opsinexpression in the developing mouse retina. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:6218-6223.
- Röhlich P, vanVeen T, Szél A (1994) Two different visual pigments in one retinal cone cell. *Neuron* 13:1159-1166.
- Röhlich P, Szél A (2000) Photoreceptor cells in the *Xenopus* retina. *Microsc Res Tech* 50:327-337.
- Röll B (2000) Gecko vision-visual cells, evolution, and ecological constraints. *J Neurocytol* 29:471-484.
- Röll B (2001) Gecko vision-retinal organization, foveae and implications for binocular vision. *Vision Res* 41:2043-2056.

S.

- Sablin EP, Krylova IN, Fletterick RJ, Ingraham HA (2003) Structural basis for ligand-independent activation of the orphan nuclear receptor LRH-1. *Mol Cell* 11:1575-1585.
- Sahel JA, Mohand-Saïd S, Lévillard T, Hicks D, Picaud S, Dreyfus H (2001) Rod-cone interdependence: implications for therapy of photoreceptor cell diseases. *Prog Brain Res* 131:649-661.
- Sakaguchi DS, Van Hoffelen SJ, Theusch E, Parker E, Orasky J, Harper MM, Benediktsson A, Young MJ (2004) Transplantation of neural progenitor cells into the developing retina of the Brazilian opossum: an in vivo system for studying stem/progenitor cell plasticity. *Dev Neurosci* 26:336-345.
- Sasorith S, Billas IML, Iwema T, Moras D, Wurtz JM (2002) Structure-based analysis of the ultraspiracle protein and docking studies of putative ligands. *J Insect Sci* 2:25 Epub.
- Seehausen O, vanAlphen JJM, Witte F (1997) Cichlid fish diversity threatened by eutrophication that curbs sexual selection. *Science* 277:1808-1811.
- Sieving PA, Caruso RC, Tao W, Coleman HR, Thompson DJ, Fullmer KR, Bush RA (2006) Ciliary neurotrophic factor (CNTF) for human retinal degeneration: phase I trial of CNTF delivery by encapsulated cell intraocular implants. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:3896-3901.

- Sharon D, Sandberg MA, Caruso RC, Berson EL, Dryja TP (2003) Shared mutations in NR2E3 in enhanced S-cone syndrome, Goldmann-Favre syndrome, and many cases of clumped pigmentary retinal degeneration. *Arch Ophthalmol* 121:1316-1323.
- Shiau AK, Coward P, Schwarz M, Lehmann JM (2001) Orphan nuclear receptors: from new ligand discovery technologies to novel signalling pathways. *Curr Opin Drug Discov Devel* 4:575-590.
- Suber ML, Pittler SJ, Qin N, Wright GC, Holcombe V, Lee RH, Craft CM, Lolley RN, Baehr W, Hurwitz RL (1993) Irish setter dogs affected with rod/cone dysplasia contain a nonsense mutation in the rod cGMP phosphodiesterase beta-subunit gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:3968-3972.
- Swain PK, Hicks D, Mears AJ, Apel IJ, Smith JE, John SK, Hendrickson A, Milam AH, Swaroop A (2001) Multiple phosphorylated isoforms of NRL are expressed in rod photoreceptors. *J Biol Chem* 276:36824-36830.
- Swaroop A, Xu JZ, Pawar H, Jackson A, Skolnick C, Agarwal N (1992) A conserved retina-specific gene encodes a basic motif/leucine zipper domain. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:266-270.
- Szél A, Takacs L, Monostori E, Diamantstein T, Vigh-Teichmann I, Röhlich P (1986) Monoclonal antibody-recognising cone visual pigment. *Exp Eye Res* 43:871-883.
- Szél A, Röhlich P, Caffé AR, Juliusson B, Aguirre G, VanVeen T (1992) Unique topographic separation of two spectral classes of cones in the mouse retina. *J Comp Neurol* 325:327-342.
- Szél A, Röhlich P, Mieziowska K, Aguirre G, VanVeen T (1993) Spatial and temporal differences between the expression of short- and middle-wave sensitive cone pigments in the mouse retina: a developmental study. *J Comp Neurol* 331:564-577.
- Szél A, VanVeen T, Röhlich P (1994) Retinal cone differentiation. *Nature* 370:336.

T.

- Tagami T, Madison LD, Nagaya T, Jameson JL (1997) Nuclear receptor corepressors activate rather than suppress basal transcription of genes that are negatively regulated by thyroid hormone. *Mol Cell Biol* 17:2642-2648.
- Takezawa S, Yokoyama A, Okada M, Fujiki R, Iriyama A, Yanagi Y, Ito H, Takada I, Kishimoto M, Miyajima A, Takeyama K, Umesono K, Kitagawa H, Kato S (2007). A

- cell cycle-dependant co-repressor mediates photoreceptor cell-specific nuclear receptor function. *EMBO J* e:1-11.
- Tam BM, Moritz OL, Hurd LB, Papermaster DS (2000) Identification of an outer segment targeting signal in the COOH terminus of rhodopsin using transgenic *Xenopus laevis*. *J Cell Biol* 151:1369-1380.
- Terai Y, Seehausen O, Sasaki T, Takahashi K, Mizoiri S, Sugarawa T, Sato T, Watanabe M, Konijnendijk N, Mrosso HDJ, Tachida H, Imai H, Shichida Y, Okada N (2006) Divergent selection on opsins drives incipient selection in lake Victoria cichlids. *PLoS Biol* 4:e433.
- 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.
- Tropepe V, Coles BL, Chiason BJ, Horsford DJ, Elia AJ, McInnes RR, van der Kooy D (2000) Retinal stem cells in the adult mammalian eye. *Science* 287:2032-2036.
- Tucker VA (2000) The deep fovea, sideways vision and spiral flight paths in raptors. *J Exp Biol* 203:3745-3754.
- Turner DL, Cepko CL (1987) A common progenitor for neurons and glia persists in rat retina late in development. *Nature* 328:131-136.
- Turner DL, Synder EY, Cepko CL (1990) Lineage-independent determination of cell type in the embryonic mouse retina. *Neuron* 4:833-845.
- Tzamelis I, Moore DD (2001) Role reversal: new insights from new ligands for the xenobiotic receptor CAR. *Trends Endocrinol Metab* 12:7-10.

U.

- Ueno S, Kondo M, Miyata K, Hirai T, Miyata T, Usukura J, Nishizawa Y, Miyake Y (2005) Physiological function of S-cone system is not enhanced in rd7 mice. *Exp Eye Res* 81:751-758.
- Uteza Y, Rouillot JS, Kobetz A, Marchant D, Pecqueur S, Arnaud E, Prats H, Honiger J, Dufier JL, Abitbol M, Neuner-Jehle M (1999) Intravitreal transplantation of encapsulated fibroblast secreting the human fibroblast growth factor 2 delays photoreceptor cell degeneration in Royal College of Surgeons rats. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:3126-3131.

V.

- Vermot J, Gallego Llamas J, Fraulob V, Niederreither K, Chambon P, Dolle P (2005) Retinoic acid controls the bilateral symmetry of somite formation in the mouse embryo. *Science* 308:563-566.
- Vetter ML, Brown NL (2001) The role of basic helix-loop-helix in vertebrate retinogenesis. *Semin Cell Dev Biol* 12:491-498.
- Viczian AS, Vignali R, Zuber ME, Barsacchi G, Harris WA (2003) XOtx5b and XOtx2 regulate photoreceptor and bipolar fates in the *Xenopus* retina. *Development* 130:1281-1294.

W.

- Wang Y, Smallwood PM, Cowan M, Blesh D, Lawler A, Nathans J (1999) Mutually exclusive expression of human red and green visual pigment-reporter transgenes occurs at high frequency in murine cone photoreceptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:4743-4745.
- Wang Z, Benoit G, Liu J, Prasad S, Aarnisalo P, Liu X, Xu H, Walker NP, Perlmann T (2003) Structure and function of Nurr1 identifies a class of ligand-independent nuclear receptors. *Nature* 423:555-560.
- Washington I, Brooks C, Tutto NJ, Nakanishi K (2004) Porphyrins as photosensitizers to enhance night vision. *J Am Chem Soc* 126:9892-9893.
- Watanabe T, Raff MC (1990) Rod photoreceptor development in vitro: intrinsic properties of proliferating neuroepithelial cells change as development proceeds in the rat retina. *Neuron* 4:461-467.
- Weatherman RV, Fletterick RJ, Scanlan TS (1999) Nuclear receptor ligands and ligand-binding domains. *Annu Rev Biochem* 68:559-581.
- Weinberger C, Hollenberg SM, Ong ES, Harmon JM, Brower ST, Cidlowski J, Thompson EB, Rosenfeld MG, Evans RM (1985) Identification of human glucocorticoid receptor complementary DNA clones by epitope selection. *Science* 228:470-472.
- Wernet MF, Desplan C (2004) Building a retinal mosaic: cell-fate decision in the fly eye. *Trends Cell Biol* 14:576-584.
- Wernet MF, Mazzoni EO, Celik A, Duncan DM, Duncan T, Desplan C (2006) Stochastic spineless expression creates the retinal mosaic for colour vision. *Nature* 440:174-180.

- Whitaker SL, Knox BE (2004) Conserved transcriptional activators of the xenopus rhodopsin gene. *J Biol Chem* 279:49010-49018.
- Wolkenberg SE, Zhao Z, Kapitskaya M, Webber AL, Petrukhin K, Tang YS, Dean DC, Hartman GD, Lindsley CW (2006) Identification of potent agonists of photoreceptor-specific nuclear receptor (NR2E3) and preparation of radioligand. *Bioorg Med Chem Lett* 16:5001-5004.
- Wright AF (1997) A searchlight through the fog. *Nat Genet* 17:132-134.
- Wright AF, Reddick AC, Schwartz SB, Ferguson JS, Aleman TS, Kellner U, Jurklies B, Schuster A, Zrenner E, Wissinger B, Lennon A, Shu X, Cideciyan AV, Stone EM, Jacobson SG, Swaroop A (2004) Mutation analysis of NR2E3 and NRL genes in enhanced S cone syndrome. *Hum Mutat* 24:439.
- 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.

X.

- Xiao M, Hendrickson A (2000) Spatial and temporal expression of short, long/medium, or both opsins in human fetal cones. *J Comp Neurol* 425:545-559.

Y.

- Yanagi Y, Takezawa SI, Kato S (2002) Distinct functions of photoreceptor cell-specific nuclear receptor, thyroid hormone receptor β 2 and CRX in cone photoreceptor development. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43:3489-3494.
- Yan RT, Wang SZ (1998) neuroD induces photoreceptor cell overproduction in vivo and de novo generation in vitro. *J Neurobiol* 36:485-496.
- Young RW (1985) Cell proliferation during postnatal development of the retina in the mouse. *Brain Res* 353:229-239.
- Young RW (1985) Cell differentiation in the retina of the mouse. *Anat Rec* 212:199-205.

Z.

- Zhang XK, Pfahl M (1993) Hetero- and homodimeric receptors in thyroid and vitamin A action. *Receptor* 3:183-191.

Zhivotsky B, Orrenius S (2006) Carcinogenesis and apoptosis: paradigms and paradoxes. *Carcinogenesis* 27:1939-1945.



The loss of transcriptional inhibition by the photoreceptor-cell specific nuclear receptor (NR2E3) is not a necessary cause of enhanced S-cone syndrome

Mathias Fradot,¹ Olivier Lorentz,¹ Jean-Marie Wurtz,² José-Alain Sahel,^{1,3} Thierry Lévillard¹

¹Inserm U592 Université Pierre et Marie Curie, Laboratoire de Physiopathologie Cellulaire et Moléculaire de la Rétine, Hôpital Saint-Antoine, 75571 Paris, France; ²Département de Biologie et de Génomique Structurales, IGBMC, CNRS/Inserm/Université Louis Pasteur, BP10142, Illkirch Cedex, France; ³University College of London, Institute of Ophthalmology, UK

Purpose: To investigate functional consequence on photoreceptor-cell specific nuclear receptor (NR2E3) transcriptional activity of enhanced S-cone syndrome (ESCS) mutations localized in ligand binding domain (LBD).

Methods: Point mutations were introduced into the LBD of full length and Gal4 chimeric NR2E3 receptors and transcriptional activity was investigated by using transient co-transfection assay on corresponding luciferase reporters. Expression and DNA binding properties of transfected mutant and wild-type receptors were tested by Western blotting and gel shift assay.

Results: Our analysis show that two ESCS mutations, missense mutations R385P and M407K, abolished NR2E3 repressive activity in the context of full-length and Gal4 chimeric receptors, while W234S and R311Q mutants retained their repressive activity in both assays. All mutant receptors maintained their stability and DNA binding ability.

Conclusions: These results showed that NR2E3 mutations localized in LBD induce ESCS disease without affecting inhibitory activity as recorded in vitro. This demonstrates the absence of correlation between transcriptional inhibition and ESCS phenotype. This analysis suggests that NR2E3 might have transcriptional activation properties not yet identified.

Enhanced S-cone syndrome (ESCS) is an autosomal recessive retinopathy characterized by a gain of visual function: Patients with ESCS exhibit electroretinogram (ERG) responses to short wavelength stimulation 30 times higher in amplitude than normal corresponding to S-cone function. This disease also includes night blindness and similar photopic and scotopic ERGs [1,2]. Histological data from one elderly patient with advanced disease showed an absence of rods but a two-fold increase in the cone population, 92% of which were thought to be S-cones, while in vivo examination of early disease has shown an abnormal retinal architecture [3,4]. These histological findings would explain the gain of function observed in ESCS patients. ESCS could therefore be considered as a developmental defect, which results in an increase in photoreceptor cells taking an S-cone fate [5].

Identification of mutations in the *NR2E3* gene, encoding an orphan nuclear receptor transcription factor, has paved the way to our current understanding of the disease [6,7]. The expression of NR2E3 is restricted to rod photoreceptors in human, although the disease is characterized by an increase in S-cone function [7-9].

Studies of *rd7* mouse retinas, a murine model with a homozygous insertion of a L1 retrotransposon into exon 5 of

Nr2e3 gene, have also revealed a two fold increase in S-cone number, retinal dystrophy at early stages and slow retinal degeneration [10-12]. Expression of NR2E3 in mouse retina is restricted to rod nuclei, starts after the completion of cone cell birth, and peaks after completion of rod cell differentiation [13,14].

The current hypothesis is that NR2E3 represses S-cone fate as well as participates in rod photoreceptor commitment [5,13-17]. The intrinsic genetic program appears to be the major determinant of cell-fate commitment in the retina [18]. The competence model of cell-fate determination proposes that a homogeneous pool of multipotent progenitors passes through states of competence where it can produce a given set of cell types [19]. Transcription factors are among the best characterized intrinsic factors, and NR2E3 may have a similar role as its paralog NR2E1 in driving pluripotent cells to a particular fate [20].

NR2E3, as a nuclear receptor, possesses a central DNA binding domain (DBD), and a C-terminal ligand binding domain (LBD) [21]; it was originally described as a transcriptional repressor and binds DNA as a homodimer [14,22]. Physical and functional interactions of NR2E3 with several transcription factors involved in photoreceptor differentiation have been established [14,23]. It has recently been shown that NR2E3 directly interacts with the nuclear receptor NR1D1 and the homeoprotein Crx [14,23]. These interactions lead to enhanced expression of rod-specific genes and reduced expression of cone-specific genes in vitro. NR2E3 also interacts

Correspondence to: Dr. Thierry Lévillard, Laboratoire de Physiopathologie Cellulaire et Moléculaire de la Rétine, Inserm U592-Université Pierre et Marie Curie, Hôpital Saint-Antoine, 75571 Paris, Cedex 12 France; Phone: 33 (0)1 49 28 46 03; FAX: 33 (0)1 49 28 46 05; email: leveilla@st-antoine.inserm.fr

with Nrl, a photoreceptor specific transcription factor, and modulates its transcriptional activity [15]. The absence of functional *Nrl* gene in mouse gives a severe phenotype with a complete loss of rods replaced by S-cones. Interestingly, the expression of NR2E3 has been shown to be dependent upon Nrl, suggesting that the increase in S-cones in the *Nrl*^{-/-} mouse results in part from the absence of expression of NR2E3 [16].

Analysis of gene expression modification in *rd7* mouse retina has been performed using different approaches [14,15,17]. Microarray analyses revealed an up-regulation of numerous cone-specific genes in *rd7* mouse retina, pointing out NR2E3 repressive function [14,17], while chromatin immunoprecipitation assays associated with reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis, demonstrated that NR2E3 represses cone specific genes but activates the expression of rod-specific genes [15]. In addition, the transcriptome of the retina of transgenic mice overexpressing NR2E3 confirms the role of NR2E3 as a suppressor of the expression of cone-specific genes [24]. Corbo and Cepko also reported a delay of rhodopsin expression in *rd7* mouse [17]. In rat, during development, there is about a week-long period between birth of rods and onset of rhodopsin expression [25]. During this period, NR2E3 would suppress S-cone fate by reducing S-cone gene expression as well as promoting rod fate by activating rod-specific promoters [14,15,23,24].

In the present paper, we analyzed the transcriptional properties of the LBD of NR2E3 (from residue 113 to 410) mutants found in ESCS, fused to a heterologous DBD (Gal4^{DBD}), to circumvent a problem due to DNA binding specificity [26], as well as the full length protein to get a better understanding of the activity of NR2E3 mutants in a more physiological context [14].

We confirmed that NR2E3 inhibitory properties involve the helix H12 of the LBD as observed for other nuclear receptors [14,27]. We reported an absence of correlation between transcriptional inhibitory properties of NR2E3^{LBD} and ESCS, implying the existence of some transcriptional activation properties that might be controlled by a yet to be identified ligand [28].

METHODS

Transfection assays in COS-1 and HeLa cells: Transfections were performed in COS-1 and HeLa cells, which were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Gibco, Cergy-Pontoise, France) supplemented with 10% fetal bovine serum (Gibco).

COS-1 cells were transiently transfected by the calcium phosphate precipitate method [29]: Cells were plated at a density of 3.5X 10⁵ cells/ml in 24-well tissue culture plates (500 µl/well) and incubated for 2 h at 37 °C in a humidified 5% CO₂ incubator before transfection. Cells were transfected with 500 ng of Gal4 or NR2E3 responsive luciferase reporter construct [14], 10 ng of pRL-TK internal reporter construct (Promega, Charbonnières, France) and a variable amount of different expression constructs. One day after transfection, cells were washed with medium without serum and changed to fresh medium. Two days after transfection, lysates were collected

and luciferase activity was measured using the Dual Luciferase Reporter Assay System (Promega).

HeLa cells were transfected using Lipofectamine 2000 reagent (Gibco-BRL). Cells were plated in six-well tissue culture plates (2 µl/well) and left until they reached 80% confluence. Before transfection, cells were washed and changed to OPTI-MEM medium (Gibco-BRL). Cells were transfected with 750 ng of Gal4-responsive luciferase reporter construct, 10 ng of pRL-TK internal reporter construct, a variable amount of different expression constructs and 2.5 µl of Lipofectamine 2000 according to the manufacturer's instructions. Two days after transfection, lysates were collected and luciferase activity was measured using the Dual Luciferase Reporter Assay System. All transfection assays were performed in triplicate. Each assay group was repeated at least twice.

Site-directed mutagenesis: Point mutations were introduced in NR2E3^{LBD} from pCMV-Gal4-NR2E3^{LBD} and pCMX-HA-NR2E3 constructs obtained from Dr. Mime Kobayashi [6]. Mutations were introduced by oligonucleotide-directed mutagenesis using the thermostable Deep Vent DNA polymerase (New England Biolabs Inc., Beverly, MA). Amplified DNA was digested by *DpnI* (New England Biolabs Inc.) and used to transform XL-10 Gold ultra-competent *E. coli* cells (Stratagene Europe, Hogehilweg, Netherlands). Mutations were confirmed by sequencing.

Nuclear protein extraction: Nuclear extracts were prepared from transiently transfected COS-1 cells. Transfected cells were rinsed with 1X PBS, harvested by centrifugation for 5 min at 800x g at 4 °C, and washed with 5 volumes of hypotonic buffer (10 mM HEPES, pH 7.5, 1X complete protease inhibitor cocktail [Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany], 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.5 mM DTT). The cells were suspended with 3 volumes of hypotonic buffer, and incubated for 10 min on ice. Cytoplasmic membranes were disrupted with a pestle B. Nuclei were harvested by centrifugation for 15 min at 1,200x g, suspended with 0.5 volume of low salt buffer (20 mM HEPES, pH 7.5, 1X Complete protease inhibitor cocktail, 2 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM EDTA, 0.5 mM DTT, 25% glycerol) before the disruption of nuclear membranes by drop-wise addition of 0.5 volume of high salt buffer (20 mM HEPES, pH 7.5, 1X Complete protease inhibitor cocktail, 1.2 M KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM EDTA, 0.5 mM DTT, 25% glycerol). Nuclear lysates were incubated 30 min on ice under agitation and harvested by centrifugation for 30 min at 16,000x g at 4 °C. Supernatants were aliquoted and stored at -80 °C until assayed.

NR2E3 protein binding assays: NR2E3 protein binding was detected by electrophoretic mobility shift assays. DNA probes containing Gal4 (5'-GGG CCG ACG GGT GAC AGC CCT CCG ACG GCC C-3') and Kni x2 binding site (5'-TAA CCT TTT AAA AGT CAA AAG TCA ACT TCC AAC-3') [6] were prepared by annealing complementary oligonucleotides and labeled at both end with [α-³²P]dCTP (6,000 Ci/mmol; Amersham Biosciences, Saclay, France) by filling with the large fragment of DNA polymerase I (Promega). Binding reactions contained 40,000 cpm of probe, 1 µg of double stranded poly(dI-dC) (Amersham Biosciences), and 12.5 µg of bovine

serum albumin in 50 μ l of binding buffer (25 mM HEPES, pH 7.5, 50 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 0.1 mM EDTA, 0.1% NP40, 10% glycerol), with the nuclear protein fraction and competitor oligonucleotide, 100 fold excess, as indicated. Reaction mixtures were incubated 40 min at room temperature, and protein-DNA complexes were separated by electrophoresis on 4% polyacrylamide gels in 0.5X Tris-borate-EDTA buffer at room temperature. Radioactivity in gels was detected by autoradiography.

Western blot: Nuclear extracts from transiently transfected COS-1 cells were analyzed by Western-blot. Protein concentrations were estimated by Bradford's technique. Proteins (10 μ g/lane) were separated by 10% SDS-PAGE and transferred onto nitrocellulose membrane (Schleicher and Schuell, Mantes-la-Ville, France), blocked with non-fat milk (5% w/v) and incubated with the appropriated primary antibody overnight at 4 °C. Gal4-NR2E3^{LBD} fusion proteins were detected using anti-Gal4^{DBD} mouse monoclonal antibody (1/2,000, gift from Pierre Chambon, Ph.D. France) while NR2E3 full length proteins were detected using anti-HA-Tag mouse monoclonal antibody (1/1,000, Cell Signaling Technology Inc., Danvers,

MA). The membrane was then washed, incubated with horseradish peroxidase labeled secondary antibody (1/15,000, Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., West Grove, PA), and immunoreactive bands were detected by enhanced chemiluminescence (ECL+; Amersham, Biosciences).

RESULTS

Analysis of transcriptional repression by NR2E3^{LBD}: In order to study the transcriptional properties of the LBD of NR2E3, we expressed it as a chimeric protein, fused to the DBD of the yeast transcription activator Gal4. This construct was transiently transfected into COS-1 cells and tested on Gal4-responsive reporter plasmids using luciferase assay (Figure 1A). First, to verify that the inhibitory properties of Gal4-NR2E3^{LBD} reported by others [14,22] were not due to specific elements in the promoter, we performed experiments using Gal4 binding sites, upstream of two different minimal promoters; the β -globin and the SV40 proximal promoter. In Figure 1A, transcriptional inhibition mediated by Gal4-NR2E3^{LBD} was dose-dependent from 10-100 ng for both reporter constructs. This inhibition is due to the NR2E3^{LBD}, since the heterologous DBD

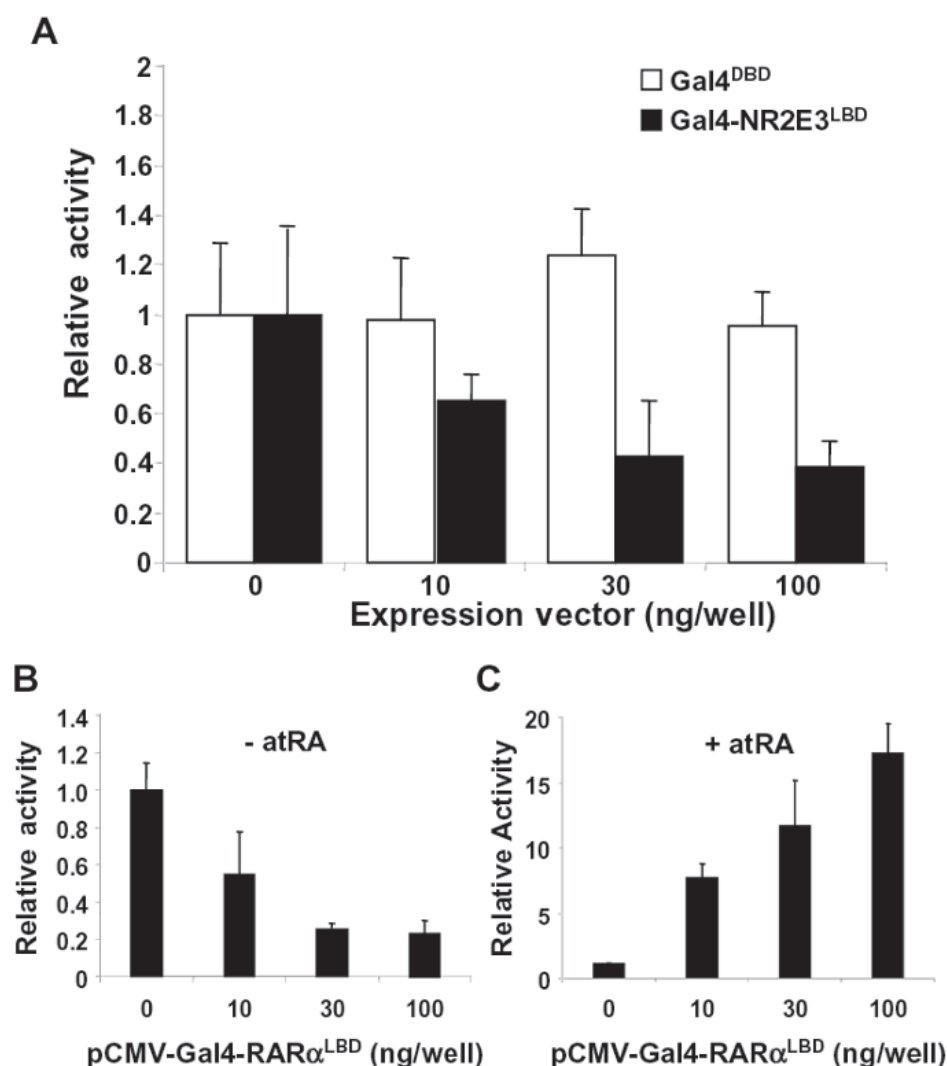


Figure 1. Transcriptional repression by NR2E3^{LBD}. COS-1 cells were transiently transfected with Gal4^{DBD} or Gal4-NR2E3^{LBD} expression plasmids. Transcriptional activity was measured for the different luciferase Gal4-reporter genes. **A:** Luciferase activity in the presence of an increasing amount of GAL-NR2E3^{LBD}. **B:** Luciferase activity in the presence of an increasing amount of GAL-RAR α ^{LBD}. **C:** Luciferase activity in the presence of an increasing amount of GAL-RAR α ^{LBD} in the presence of its ligand RA. Normalized values are expressed as relative luciferase activity.

alone did not significantly inhibit the expression of luciferase at 10 and 30 ng and was inhibitory only for the highest amount of expression vector used (100 ng) with the SV40 promoter. The activity was similar to that obtained with another nuclear receptor, RAR α , tested under the same conditions, and in absence of its ligand (Figure 1B). This inhibition was reverted in presence of RAR ligand, the all-trans retinoic acid (Figure 1C).

Mutational analysis of NR2E3^{LBD}: To examine the functional consequences of NR2E3 mutations described in ESCS, we introduced six mutations found in ESCS (E121K, W234S,

R309G, R311Q, R385P, and M407K) and two artificially designed mutations (R385L and α H12) into the Gal4-chimeric receptor by site-directed mutagenesis. Most mutations examined are localized in the LBD, between positions 163 and 410, of the human NR2E3 protein [7]. These Gal4-NR2E3^{LBD} mutant constructs were transfected into COS-1 cells and tested for their ability to repress transcription from a Gal4 responsive element fused to the β -globin minimal promoter (Figure 2A). Four out of six of the ESCS mutations (E121K, W234S, R309G and R311Q) had slightly reduced inhibitory activity as compared to wild-type. For these mutants, there was no correlation between the NR2E3^{LBD} transcriptional inhibition activity and the ESCS phenotype.

As described previously, and confirmed here in another cell line, the deletion of mutant H12 (N397Stop) results in the total absence of transcriptional repression [14]. This is in agreement with others studies where deletion of helix H12 enhances repression and co-repressor binding, although several nuclear

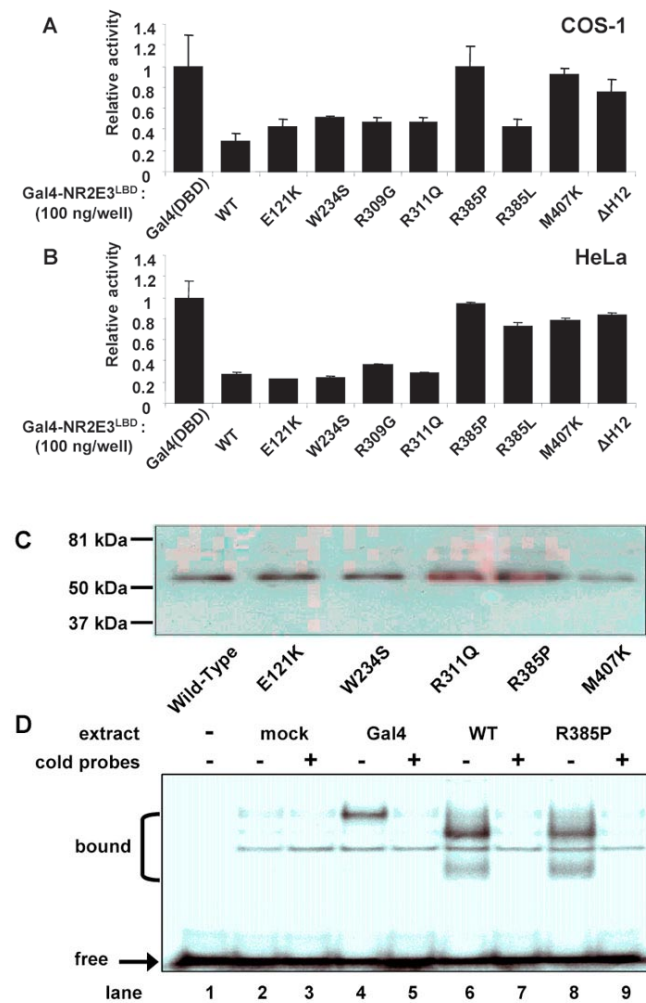


Figure 2. Transcriptional effect of NR2E3 mutations on Gal4 chimeric receptor. **A:** COS-1 cells were transiently transfected with 100 ng of Gal4-NR2E3^{LBD} wild-type and mutant expression plasmids. Transcriptional activity of a Gal4 responsive reporter gene was measured. **B:** HeLa cells were transiently transfected with 100 ng of Gal4-NR2E3^{LBD} wild-type and mutant expression plasmids, and transcriptional activity of a Gal4 responsive reporter gene was measured. Normalized values are expressed as relative luciferase activity. **C:** Expression of Gal4-NR2E3^{LBD} wild-type and mutants in COS-1 transfected cells. **D:** Electrophoretic mobility shift assay of Gal4 full-length, wild-type (WT), and R385P mutated Gal4-NR2E3^{LBD} using a Gal4 probe. Bound indicates the different shifted bands, and free denotes unbound probe.

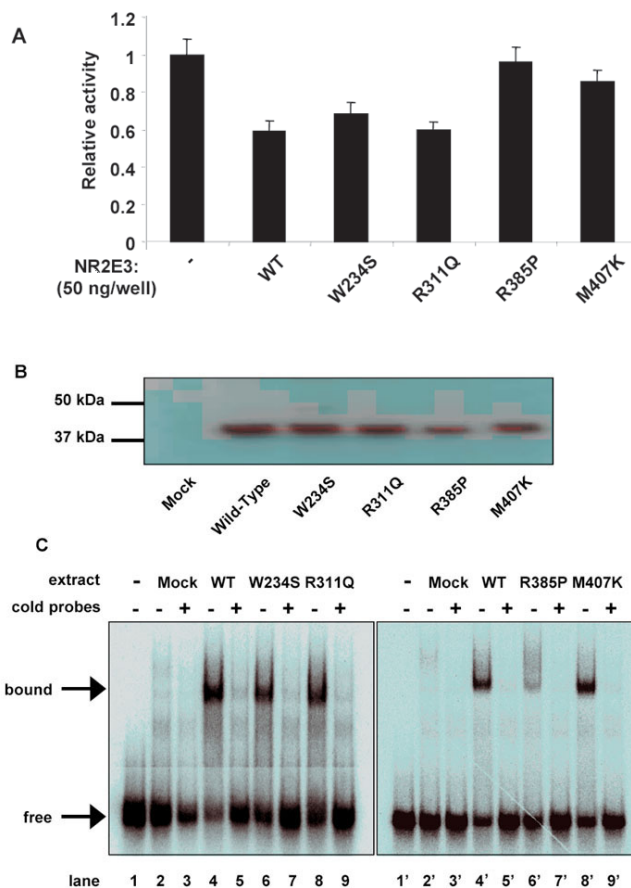


Figure 3. Transcriptional effect of NR2E3 mutations on full-length receptor. **A:** COS-1 cells were transiently transfected with 100 ng of NR2E3 wild-type and mutant expression plasmids, and transcriptional activity of a NR2E3 responsive reporter gene was measured. Normalized values are expressed as relative luciferase activity. **B:** Expression of NR2E3 wild-type and mutants in COS-1 transfected cells. **C:** Electrophoretic mobility shift assay of full-length wild-type (WT) and mutated NR2E3 using a Kni x2 probe [6]. Bound indicates shifted bands, and free denotes unbound probe.

receptors lacking helix H12 act as transcriptional repressor [30-32].

The ESCS mutation M407K corresponds to a position in the helix H12 of nuclear receptors known to modulate the affinity of the LBD to co-regulators. Again, and as seen by others, the M407K NR2E3 mutant protein is not able to mediate transcriptional repression [14].

The ESCS R385P mutation also results in loss of inhibition. This mutant is not localized within the helix H12, and the loss of transcriptional inhibitory property must result from a distinct mechanism. In order to test the possibility of a conformational constraint that might be created by the proline residue, we designed the artificial R385L mutant with an arginine residue replaced by a leucine residue. The R385L mutant has an inhibitory activity slightly weaker than of the wild-type NR2E3 and similar to that of four ESCS mutants.

Mutational analysis was also performed in HeLa cells using Gal4 chimeric receptors and Gal4 responsive reporters (Figure 2B). The six examined ESCS mutations presented similar behavior in HeLa and COS-1 cells; four of them (E121K, W234S, R309G, and R311Q) retained a slightly reduced inhibitory activity, while R385P and M407K mutants were not able to mediate transcriptional inhibition in HeLa cells. Only the R385L artificial mutant has different behavior in the two cell lines. It lost its repressive activity in COS-1 but remained active in HeLa cells. The α H12 mutant displayed similar activity in both cell lines.

In order to check that the lack of transcriptional inhibition was not the result of a difference in protein stability in COS-1 cells, we performed Western blotting analysis (Figure 2C). The mutant fusion proteins were confirmed to be expressed at similar levels. The R385P mutant, which lacks the inhibitory activity, was even expressed at a slightly higher level than the wild-type construct. The loss of activity of the R385P mutant could also theoretically result from misfolding of the protein, and the resulting inability of this mutant to bind the Gal4 responsive element. To study this hypothesis, nuclear extracts from COS-1 transfected cells were prepared and used in gel mobility assays in conjunction with oligonucleotides corresponding to the Gal4 binding site (Figure 2D). Gal4 protein, used as a positive control, gave a shift in agreement with its molecular weight (lane 4 and 5). Wild-type Gal4-NR2E3^{LBD} displayed two bands shifted in mobility (lanes 6 and 7) that were also observed when the R385P mutant protein extract was used (lanes 8 and 9). This provides the evidence that R385P mutation has no effect on the conformation of the heterologous DNA binding domain.

Mutational analysis of full-length NR2E3: Functional consequences of NR2E3 mutations were also examined in full-length protein. Four mutations found in ESCS (W234S, R311Q, R385P, and M407K) were introduced into HA-tagged full-length NR2E3 by site directed mutagenesis. These mutated NR2E3 constructs were transfected into COS-1 cells and tested for their ability to repress transcription from a NR2E3

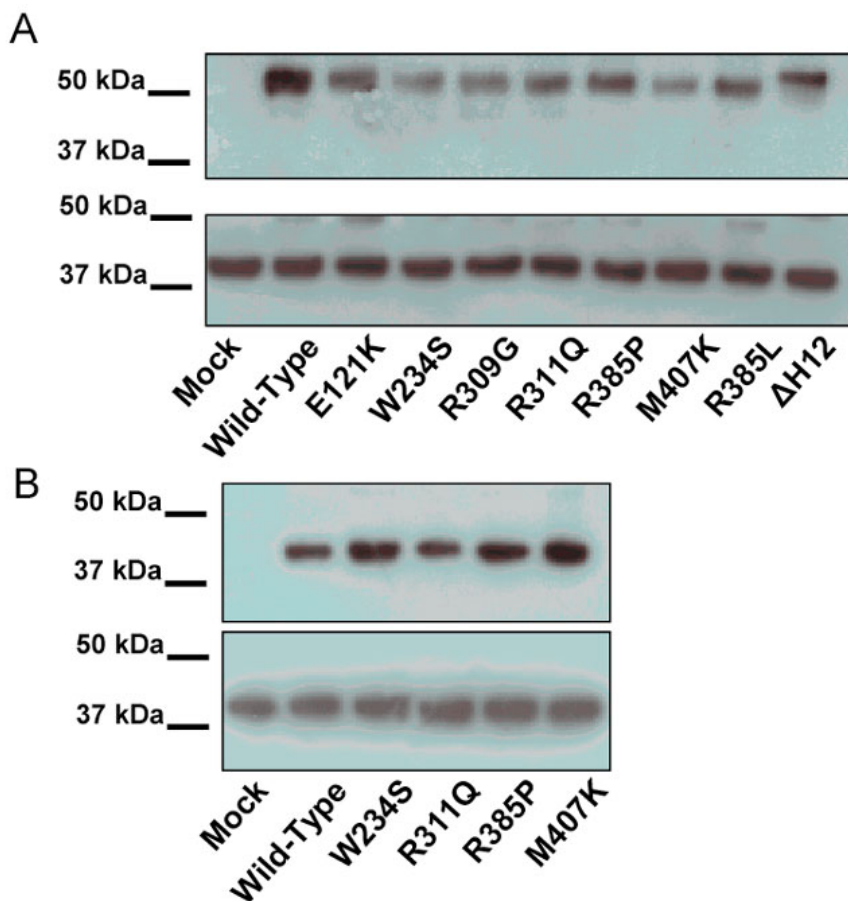


Figure 4. Expression of Gal4-NR2E3^{LBD}. **A** and **B** mutant proteins after transfection into COS-1 cells. The bottom panels represents β -actin loading controls. **A**: Western blotting against the GAL4-NR2E3 fusion proteins. **B**:L Western blotting against the hemagglutinin antigene (HA) tagged NR2E3 proteins.

responsive element fused to the thymidine kinase minimal promoter (Figure 3A) [7,14]. Two out of four of the mutations (W234S and R311Q) had slightly reduced inhibitory activity as compared to wild-type, while R385P and M407K mutants lost most of their repressive activity.

To check for the stability of NR2E3 mutant proteins, we analyzed COS-1 transfected cells by Western blotting. All the full-length receptors, mutant or wild-type, were expressed at similar level and had the expected electrophoretic mobility (Figure 3B and Figure 4). As no natural DNA response element has been identified for NR2E3, we used Kni 2X2, a dimeric response element, which NR2E3 is able to bind [6,14]. Dimerization of several nuclear receptors has been shown to be dependant upon LBD, indicating that LBD-localized mutations could affect DNA binding ability. Nuclear extracts from COS-1 transfected were analyzed by gel-shift mobility with oligonucleotides corresponding to Kni X2 response element [6] in order to check for the DNA binding of the different NR2E3 proteins; mutant and wild-type (Figure 3C). All the mutated full-length proteins displayed a band (lanes 6, 6', 8, and 8') that was also observed with the wild-type full-length protein (lanes 4 and 4'). This provides evidence that NR2E3 dimerization ability was not affected by these ESCS mutations.

In order to test the possibility that NR2E3 is behaving differently on inactivated and activated promoters, we tested the four mutants for their ability to repress transcription driven by Gal4 activation (Figure 5). The activation by Gal4 is resulting from a cryptic Gal4 binding Element beside the NR2E3 responsive element in the reporter construct used [14]. Activation (two-folds) was observed in the presence of Gal4 protein. This activation was repressed by wild-type NR2E3. The ESCS mutants have similar inhibitory properties toward this Gal4-mediated transcriptional activity.

DISCUSSION

The transcriptional inhibitory property of NR2E3 was also reported in other cell types, such as the human embryonic kidney (HEK) cells HEK 293, the kidney cells CV-1, and more

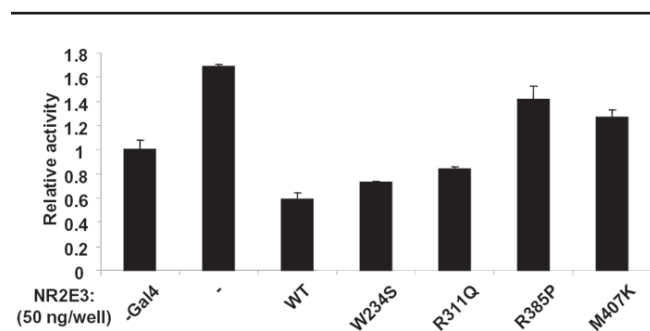


Figure 5. Repression of Gal4 activated promoter by NR2E3 wild-type and mutant full-length proteins. COS-1 cells were transfected with various combinations of Gal4 (50 ng) and NR2E3 wild-type and mutant (100 ng) expression plasmids. Transcriptional activity of a NR2E3 responsive reporter gene was measured. Normalized values are expressed as relative luciferase activity.

important the retinal pigmented epithelium (RPE) cells RPE-J [14,22]. This inhibition was also observed when NR2E3 was tested as a full-length protein on a selected DNA binding element [14]. We have observed that the inhibition mediated by NR2E3 resembles that of unliganded RAR α . This suggests the following: (1) that the inhibitory function of NR2E3 results from interactions of the LBD with co-repressors; (2) that only a conformational change, may be induced by binding to a ligand not present in these cells; (3) the exchange of co-repressors to co-activators could result in transcriptional activation [27]. Candidate ligands, as the all-trans and 9-cis retinoic acid and the 11-cis retinaldehyde, have been previously excluded [22]. Nevertheless, the 13-cis retinoic acid was recently reported as an NR2E3 agonist using a transcriptional activation assay [28].

We have demonstrated here that some of the NR2E3 mutants that cause ESCS disease are not defective in transcriptional inhibitory activity. Four mutant proteins (E121K, W234S, R309G, and R311Q) retain transcriptional repression when tested as Gal4-fusion. Two of these mutants (W234S and R311Q) that tested as full length on the identified NR2E3

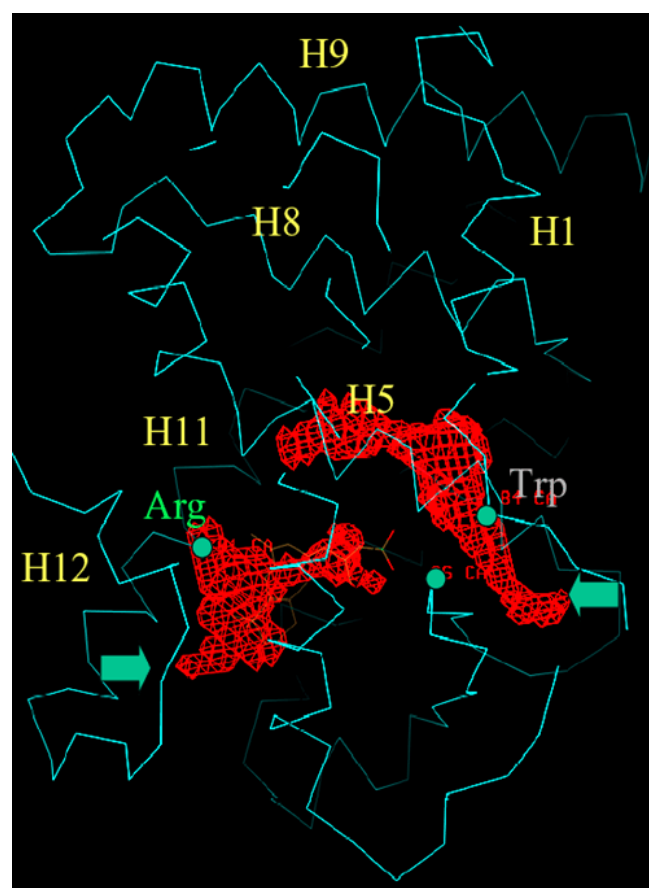


Figure 6. Molecular model of NR2E3^{LBD}. Homology modeling of the NR2E3^{LBD} based on the RAR^{LBD} crystal structure. Highlighted are several residues that mutated in enhanced S-cone syndrome. The residue R385, shown in green, was predicted to localize in the ligand hydrophobic pocket. Mutation of W234, shown in red, was predicted to modify the ligand pocket conformation.

responsive element are also fully capable of repressive function. The activation by Gal4 is resulting from a cryptic Gal4 binding Element beside the NR2E3 responsive element in the reporter construct used (M407K and R385P). This absence of correlation was also observed for Gal4 activated transcriptional activation (Figure 5). A molecular model of NR2E3^{LBD} was established from the RAR^{LBD} crystal structure (Figure 6) [33]. The importance of position of M407K in the α -helix H12 of nuclear receptors that interacts with co-regulators [30] is suggested by the loss of repressive activity of the artificial mutant with a deletion of that helix (DH12). The position of the R385P mutation within a predicted hydrophobic pocket in a structural model of the LBD of NR2E3 might suggest the requirement of that residue in the interaction with a putative activating ligand [28]. It is unclear why the artificial mutant R385L retains transcriptional repression in COS-1 but not in HeLa cells.

The work presented here demonstrates that there is no correlation between the transcriptional inhibition mediated, in vitro, by the ligand binding domain of NR2E3 and the phenotype of ESCS. The difference between the ESCS mutants observed is not the result of differential interactions with protein partners such as the nuclear receptor NR1D1 or the homeoprotein Crx reported to involve the DBD of NR2E3 [15,23].

There is an ongoing debate about the mechanisms leading to excess of S-cones in ESCS. The models currently discussed involved the inhibition of S-cone specific genes by NR2E3 with [15,23,24] or without activation of rod-specific genes [14]. The absence of rod function in ESCS [3,4] argues for the involvement of NR2E3 in regulating rod-specific genes, while the absence of perturbation of rod-specific expression in the *rd7* retina [14] indicates that in the absence of NR2E3, rod-specific genes are expressed at a normal level.

While our results do not address the mechanisms behind the lack of correlation between NR2E3 mutations and ESCS the results point to the possible existence of transcriptional activation properties of NR2E3 regulated by a yet to be identified ligand. ESCS mutants might all be defective in transcriptional activation in addition for some of them to reduced transcriptional inhibition. The recent identification of NR2E3 agonists is an element supporting this hypothesis.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to P. Chambon, H. Gronemeyer, D. Metzger, Y. Lutz, and J.M. Garnier for the gifts of 17M5-G-Luc plasmid and for anti-GAL^{DBD} antibody, to M. Kobayashi for the gift of human Gal4-NR2E3^{LBD} and pCMH-HA-NR2E3 recombinant plasmids, and to J. Nathans for NR2E3 responsive reporter construct. We thank J.P. Renaud for helpful discussion and D. Zack and I. Audo for critical reading of the manuscript. This work was funded by Novartis, INSERM, CNRS, Ministère de la Recherche, the ULP de Strasbourg, the Biozentrum, the Association Française contre les Myopathies, the Fédération des Aveugles de France, Retina France, Foundation Fighting Blindness (U.S.A.), IPSEN Foundation, the European Community (PRO-AGE-RET program), the FNS

(GENOPOLE), the SPINE (E.C. contract number QL2-CT-2002-00988), EVI-GENORET and the RETNET (E.C. contract number MRTN-CT-2003-504003) projects.

REFERENCES

- Jacobson SG, Marmor MF, Kemp CM, Knighton RW. SWS (blue) cone hypersensitivity in a newly identified retinal degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1990; 31:827-38.
- Marmor MF, Jacobson SG, Foerster MH, Kellner U, Weleber RG. Diagnostic clinical findings of a new syndrome with night blindness, maculopathy, and enhanced S cone sensitivity. *Am J Ophthalmol* 1990; 110:124-34.
- Milam AH, Rose L, Cideciyan AV, Barakat MR, Tang WX, Gupta N, Aleman TS, Wright AF, Stone EM, Sheffield VC, Jacobson SG. The nuclear receptor NR2E3 plays a role in human retinal photoreceptor differentiation and degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99:473-8.
- Jacobson SG, Sumaroka A, Aleman TS, Cideciyan AV, Schwartz SB, Roman AJ, McInnes RR, Sheffield VC, Stone EM, Swaroop A, Wright AF. Nuclear receptor NR2E3 gene mutations distort human retinal laminar architecture and cause an unusual degeneration. *Hum Mol Genet* 2004; 13:1893-902.
- Cepko C. Giving in to the blues. *Nat Genet* 2000; 24:99-100.
- Kobayashi M, Takezawa S, Hara K, Yu RT, Umesono Y, Agata K, Taniwaki M, Yasuda K, Umesono K. Identification of a photoreceptor cell-specific nuclear receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96:4814-9.
- Haider NB, Jacobson SG, Cideciyan AV, Swiderski R, Streb LM, Searby C, Beck G, Hockey R, Hanna DB, Gorman S, Duhl D, Carmi R, Bennett J, Weleber RG, Fishman GA, Wright AF, Stone EM, Sheffield VC. Mutation of a nuclear receptor gene, NR2E3, causes enhanced S cone syndrome, a disorder of retinal cell fate. *Nat Genet* 2000; 24:127-31.
- Bumsted O'Brien KM, Cheng H, Jiang Y, Schulte D, Swaroop A, Hendrickson AE. Expression of photoreceptor-specific nuclear receptor NR2E3 in rod photoreceptors of fetal human retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004; 45:2807-12.
- Wright AF, Reddick AC, Schwartz SB, Ferguson JS, Aleman TS, Kellner U, Jurkles B, Schuster A, Zrenner E, Wissinger B, Lennon A, Shu X, Cideciyan AV, Stone EM, Jacobson SG, Swaroop A. Mutation analysis of NR2E3 and NRL genes in Enhanced S Cone Syndrome. *Hum Mutat* 2004; 24:439.
- Akhmedov NB, Piriev NI, Chang B, Rapoport AL, Hawes NL, Nishina PM, Nusinowitz S, Heckenlively JR, Roderick TH, Kozak CA, Danciger M, Davisson MT, Farber DB. A deletion in a photoreceptor-specific nuclear receptor mRNA causes retinal degeneration in the *rd7* mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97:5551-6.
- Haider NB, Naggert JK, Nishina PM. Excess cone cell proliferation due to lack of a functional NR2E3 causes retinal dysplasia and degeneration in *rd7/rd7* mice. *Hum Mol Genet* 2001; 10:1619-26.
- Chen J, Rattner A, Nathans J. Effects of L1 retrotransposon insertion on transcript processing, localization and accumulation: lessons from the retinal degeneration 7 mouse and implications for the genomic ecology of L1 elements. *Hum Mol Genet* 2006; 15:2146-56.
- Yanagi Y, Takezawa S, Kato S. Distinct functions of photoreceptor cell-specific nuclear receptor, thyroid hormone receptor beta2 and CRX in one photoreceptor development. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002; 43:3489-94.
- Chen J, Rattner A, Nathans J. The rod photoreceptor-specific

- nuclear receptor Nr2e3 represses transcription of multiple cone-specific genes. *J Neurosci* 2005; 25:118-29.
15. Peng GH, Ahmad O, Ahmad F, Liu J, Chen S. The photoreceptor-specific nuclear receptor Nr2e3 interacts with Crx and exerts opposing effects on the transcription of rod versus cone genes. *Hum Mol Genet* 2005; 14:747-64.
 16. Mears AJ, Kondo M, Swain PK, Takada Y, Bush RA, Saunders TL, Sieving PA, Swaroop A. Nrl is required for rod photoreceptor development. *Nat Genet* 2001; 29:447-52.
 17. Corbo JC, Cepko CL. A hybrid photoreceptor expressing both rod and cone genes in a mouse model of enhanced S-cone syndrome. *PLoS Genet* 2005; 1:e11.
 18. Cayouette M, Barres BA, Raff M. Importance of intrinsic mechanisms in cell fate decisions in the developing rat retina. *Neuron* 2003; 40:897-904.
 19. Livesey FJ, Cepko CL. Vertebrate neural cell-fate determination: lessons from the retina. *Nat Rev Neurosci* 2001; 2:109-18.
 20. Yu RT, Chiang MY, Tanabe T, Kobayashi M, Yasuda K, Evans RM, Umesono K. The orphan nuclear receptor Tlx regulates Pax2 and is essential for vision. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97:2621-5.
 21. Li Y, Lambert MH, Xu HE. Activation of nuclear receptors: a perspective from structural genomics. *Structure* 2003; 11:741-6.
 22. Chen F, Figueroa DJ, Marmorstein AD, Zhang Q, Petrukhin K, Caskey CT, Austin CP. Retina-specific nuclear receptor: A potential regulator of cellular retinaldehyde-binding protein expressed in retinal pigment epithelium and Muller glial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96:15149-54.
 23. Cheng H, Khanna H, Oh EC, Hicks D, Mitton KP, Swaroop A. Photoreceptor-specific nuclear receptor NR2E3 functions as a transcriptional activator in rod photoreceptors. *Hum Mol Genet* 2004; 13:1563-75.
 24. Cheng H, Aleman TS, Cideciyan AV, Khanna R, Jacobson SG, Swaroop A. In vivo function of the orphan nuclear receptor NR2E3 in establishing photoreceptor identity during mammalian retinal development. *Hum Mol Genet* 2006; 15:2588-602.
 25. Morrow EM, Belliveau MJ, Cepko CL. Two phases of rod photoreceptor differentiation during rat retinal development. *J Neurosci* 1998; 18:3738-48.
 26. Braselmann S, Graninger P, Busslinger M. A selective transcriptional induction system for mammalian cells based on Gal4-estrogen receptor fusion proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90:1657-61.
 27. Steinmetz AC, Renaud JP, Moras D. Binding of ligands and activation of transcription by nuclear receptors. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 2001; 30:329-59.
 28. Wolkenberg SE, Zhao Z, Kapitskaya M, Webber AL, Petrukhin K, Tang YS, Dean DC, Hartman GD, Lindsley CW. Identification of potent agonists of photoreceptor-specific nuclear receptor (NR2E3) and preparation of a radioligand. *Bioorg Med Chem Lett* 2006; 16:5001-4.
 29. Chen C, Okayama H. High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Mol Cell Biol* 1987; 7:2745-52.
 30. Lazar MA. Nuclear receptor corepressors. *Nucl Recept Signal* 2003; 1:e001.
 31. Nagy L, Schwabe JW. Mechanism of the nuclear receptor molecular switch. *Trends Biochem Sci* 2004; 29:317-24.
 32. Renaud JP, Harris JM, Downes M, Burke LJ, Muscat GE. Structure-function analysis of the Rev-erbA and RVR ligand-binding domains reveals a large hydrophobic surface that mediates corepressor binding and a ligand cavity occupied by side chains. *Mol Endocrinol* 2000; 14:700-17.
 33. Bourguet W, Vivat V, Wurtz JM, Chambon P, Gronemeyer H, Moras D. Crystal structure of a heterodimeric complex of RAR and RXR ligand-binding domains. *Mol Cell* 2000; 5:289-98.

