

ÉCOLE DOCTORALE des Sciences de la Vie et de la Santé (ED414)

Laboratoire de Génétique Médicale - UMR_S1112

THÈSE

présentée par :

Agnès BRUN

Soutenue le : 30 septembre 2019

Pour obtenir le grade de : **Docteur de l'Université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : **Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie**

Développement de thérapies
pharmacologiques innovantes dans le
traitement des dégénérescences
rétiniennes héréditaires

THÈSE dirigée par :

Madame le Pr DOLLFUS Hélène

Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :

Madame le Dr PERRAULT Isabelle

Université Paris Descartes

Monsieur le Pr LENAERS Guy

Université d'Angers

AUTRES MEMBRES DU JURY :

Monsieur le Dr PFRIEGER Frank

Université de Strasbourg

MEMBRES INVITES :

Monsieur le Dr MARION Vincent

INSERM

Madame le Dr ABGUEGUEN Emmanuelle

InFlectis BioScience, Nantes

A mes parents,

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier le Docteur Isabelle Perrault, le Professeur Guy Lenaers et le Professeur Frank Pfrieger d'avoir accepté d'évaluer le travail de ces années de thèse en étant membres de mon jury.

Je remercie également le Professeur Hélène Dollfus, ma directrice de thèse, qui a accepté de m'accueillir dans son laboratoire depuis mes stages de master et pour ces quatre années de thèse. Je tiens à la remercier pour toute sa bienveillance, ses conseils et son soutien. Je remercie également le Docteur Vincent Marion, mon encadrant au sein du laboratoire, qui a soutenu et dirigé ce projet. Je leur suis sincèrement reconnaissante d'avoir cru en moi en me proposant cette thèse et de m'avoir donné les moyens de la réaliser.

Je remercie également Philippe Guédât et Pierre Miniou d'Inflectis Bioscience, mes employeurs, de m'avoir donné l'opportunité de faire cette thèse et de m'avoir accueilli au sein de leur laboratoire le temps de quelques passages à Nantes. Je remercie également le Docteur Emmanuelle Abgueuen, mon encadrante au sein d'Inflectis Bioscience, qui a co-dirigé ce projet, pour tous ses précieux conseils, sa patience et sa gentillesse.

Un grand merci à toute l'équipe du laboratoire de génétique médicale : Corinne, Cathy, Véronique, Jean, Clarisse, Katia, Ariane, Daniel, Aline, Catherine et toutes les personnes qui sont passées dans l'équipe ces cinq dernières années mais également à Jérémie, qui bien que ne faisant pas partie de l'équipe, a comme les autres dû me supporter pendant ces années. Je les remercie tous de leurs conseils, leur soutien sans faille mais également pour la bonne humeur qu'ils apportent au laboratoire. Merci à Katia pour ces corrections en anglais, merci à Daniel qui a dû faire toutes mes impressions ces six derniers mois.

Un remerciement particulier à Corinne Stoetzel, qui la première m'a encadré dans cette équipe et m'a initié au travail de laboratoire durant mon master mais également à Cathy Obringer sans qui ce travail n'aurait pas été possible. Elle fut d'un soutien quotidien, merci pour tous ses conseils, son extrême patience et gentillesse.

Je tiens également à remercier l'équipe d'Inflectis Bioscience. Bien que ne les connaissant que très peu, ils m'ont accueilli dans leurs locaux et intégrée à l'équipe le temps de mes séjours à Nantes.

Je remercie également tous mes amis qui m'ont soutenu dans ce projet et ont été présents quand j'en avais besoin. En particulier Alexandre et Adeline qui me supportent depuis la licence. Et toute la bande des cassos, pour tous les bons moments passés, ils m'ont permis de tenir jusqu'au bout. Merci également à tous les kenshis qui ont dû subir mon stress, ma fatigue et tout le reste lors des entraînements cette dernière année.

Bien évidemment je remercie ma famille et ma belle-famille pour tout ce qu'ils ont fait pour moi. Ils croient en moi depuis le début, leur confiance, leur soutien et leurs encouragements ont été d'une valeur inestimable. Je remercie particulièrement mes parents sans qui je ne serais pas là aujourd'hui, ils ont fait de moi ce que je suis et m'ont donné les moyens d'en arriver là.

Enfin mille mercis à Nicolas qui partage ma vie depuis dix ans. Il a été là dans les bons et les mauvais moments de ces dernières années, supportant mon mauvais caractère et mon stress sans faillir. Je ne le remercierai jamais assez de tout ce qu'il a fait pour moi, ses conseils, sa patience et bien sûr son soutien. C'est en grande partie grâce à lui que j'en suis là. Merci.

Table des matières

Liste des figures	7
Liste des tableaux	8
Liste des abréviations	9
Avant-propos	14
Introduction	16
I. Rappels anatomiques et fonctionnels de l'appareil visuel	17
A. L'œil et la rétine	17
B. Mécanismes de la vision	24
II. Les dégénérescences rétiniennes héréditaires	29
A. Hétérogénéité des dégénérescences rétiniennes héréditaires	29
B. Hétérogénéité génétique des rétinopathies pigmentaires	31
C. Mécanismes physiopathogéniques conduisant à la mort des photorécepteurs	38
III. Les modèles murins dans les dégénérescences rétiniennes	51
A. Les modèles murins de ciliopathies	52
B. Les modèles murins mutants P23H de la rhodopsine	55
IV. Les thérapies développées pour les rétinopathies pigmentaires	57
A. Les modes d'administration	57
B. Les traitements développés pour les rétinopathies pigmentaires	60
Objectifs de la thèse	72
Matériels et méthodes	76
I. Les lignées de souris	77
A. Les modèles	77
B. Génotypage	79
II. Conditions lumineuses	80
III. Traitement des souris	81
A. Solutions thérapeutiques	81
B. Injection intravitréenne	81
C. Gavage des souris	81
IV. Electrorétinogramme	82
V. Histologie	84
A. Prélèvement et inclusions des échantillons	84
B. Immunofluorescence	84

C. Microscopie Electronique à Transmission (M.E.T)	85
VI. Extraction d'ARN et PCR quantitative	85
A. Extraction des ARN et synthèse d'une banque d'ADNc.....	86
B. RT-qPCR	86
VII. Mesure des niveaux protéiques : ELISA	87
VIII. Analyses statistiques.....	87
Résultats	89
Premier manuscrit:	90
<i>In vivo phenotypic and molecular characterization of retinal degeneration in mouse models of three ciliopathies</i>	90
Deuxième manuscrit:.....	93
<i>Administration of IFB-088 in combination with valproic acid could improve transiently the retinal phenotype in two retinitis pigmentosa models</i>	93
Résultats hors manuscrits :	99
A. Résultats de la caractérisation hors manuscrit.....	99
B. Résultats des traitements hors manuscrit	102
Discussion et perspectives	107
Bibliographie	115
Liste des communications	137
Résumé	139
Résumé en anglais	139

Liste des figures

Figure 1 : Schéma d'une coupe sagittale d'un globe oculaire simplifié	17
Figure 2 : Représentation schématique des différentes couches de la rétine	18
Figure 3 : Représentation schématique d'un fond d'œil	20
Figure 4 : Schéma simplifié d'un photorécepteur (bâtonnet).....	21
Figure 5 : Représentation schématique du cil primaire d'un photorécepteur.....	22
Figure 6 : Représentation schématique de la cascade de la phototransduction.....	24
Figure 7 : Cycle canonique du rétinol	26
Figure 8 : Schéma des segments externes d'un cône et d'un bâtonnet	28
Figure 9 : Représentation schématique de la structure primaire de la Rhodopsine et de la position des mutations identifiées	35
Figure 10 : Schéma d'activation des protéines initiatrices de l'UPR.....	40
Figure 11 : Représentation des différentes branches de l' <i>Unfolded Protein Response</i>	44
Figure 12 : Fonctions de PPP1R15A/GADD34	46
Figure 13 : Représentation schématique des mécanismes apoptotiques	48
Figure 14 : Schéma des voies d'administration.....	60
Figure 15 : Structure chimique du guanabenz et de l'IFB-088 (Sephin1)	67
Figure 16 : Fenêtre d'application des différentes stratégies.....	71
Figure 17 : Stratégie thérapeutique utilisée par Mockel <i>et al.</i> ¹	74
Figure 18 : Tracé caractéristique d'un ERG scotopique	83
Figure 19 : Photographies du dispositif utilisé (photo de droite d'OcuScience®)	84

Liste des tableaux

Tableau 1 : Gènes impliqués dans les RP non syndromique et leur(s) fonction(s).....	32
Tableau 2 : Classifications des mutations autosomiques dominantes de la rhodopsine	33
Tableau 3 : Gènes identifiés dans le syndrome de Bardet-Biedl.....	37
Tableau 4 : Gènes identifiés dans l’Amaurose Congénitale de Leber	38
Tableau 5 : Liste des modèles de souris disponibles pour le syndrome de Bardet-Biedl	53
Tableau 6 : Liste des modèles de souris disponibles pour le syndrome d’Alström	54
Tableau 7 : Liste des modèles de souris disponibles pour l’Amaurose Congénitale de Leber	55
Tableau 8 : Listes des amorces utilisées.....	80
Tableau 9 : Récapitulatif des résultats obtenus lors des traitements	112

Liste des abréviations

A

ACL : Amaurose Congénitale de Leber

ADN : Acide Désoxyribonucléique

ADNc : Acide Désoxyribonucléique complémentaire de l'ARN messager

adRP : Rétinopathie Pigmentaire autosomique dominante

AIF : Apoptosis Inducing Factor

ARN : Acide Ribonucléique

arRP : Rétinopathie Pigmentaire autosomique récessive

ATF4 : Activating Transcription Factor 4

ATF6 : Activating Transcription Factor 6

B

BAK : BCL-2 Antagonist/ Killer 1

BAX : BCL-2 associated X

BBS : Bardet Biedl Syndrome

BCL-2 : B-Cell CLL/Lymphoma 2

BDNF : Brain Derived Neurotrophic Factor

BET : Bromure d'Ethidium

BI-1: Bax Inhibitor 1

BiP : Binding Immunoglobulin Protein (autre nom de GRP78)

BSA : Bovine Serum Albumine

C

C57B/6Jet C57B/6N : fonds génétique des souris

CC : Cil Connecteur

cGMP : Guanosine Monophosphate cyclique

CHOP10 : C/EBP Homologous Protein 10 (autre nom : DDIT3)

CNG : Cyclic-Nucleotide Gate

CNTF : Cilia Neurotrophic Factor

CRISPR : Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats

CSNB : Congenital Stationary Night Blindness

D

DAPI : 4',6-diamidino-2-phénylindole

DDIT3 : DNA Damage Inducible Transcript 3 Protein

DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium

DNAJC3 : DnaJ (Hsp40) Homolog, subfamily C, member 3

DNAJC10 : DnaJ (Hsp40) Homolog, subfamily C, member 10

dNTP : Désoxyribonucléotide Triphosphate

E

EDEM1: ER Degradation Enhancing alpha-Mannosidase like protein 1

eIF2 α : Eukaryotic Initiation Factor 2 subunit α

EIF2AK 1 à 4 : Translation Initiation Factor 2 Alpha Kinase 1 à 4

ELISA : Enzyme Linked Immunosorbent Assay

ERAD : Endoplasmic Reticulum Associated Degradation

ERG : Electrorétinogramme

ERN1 : Endoplasmic Reticulum to Nucleus signaling 1

ERQC : Endoplasmic Reticulum Quality Control

G

GADD153 : Growth Arrest And DNA-Damage-Inducible 153

GADD34 : Growth Arrest And DNA-Damage-Inducible 34 (autre nom: PPP1R15A)

GAP : GTPase-Accelerating Protein

GBZ : Guanabenz

GCAP : Guanylate Cyclase Activating Proteins

GCL : Ganglion Cell Layer

GCN2 : General Control Nonderepressible 2

GDP : Guanosine Diphosphate

GFP : Green Fluorescent Protein

GMP : Guanosine Monophosphate

GNDF : Glial Derived Neurotrophic Factor

GRK1 et -7 : G protein-coupled Receptor Kinase 1 et 7

GRP78 : Glucose-Regulated Protein 78kDa

GTP : Guanosine Triphosphate

H

HDAC : Histone Deacetylase

HMZ : Homozygote

HRI : Heme Regulated Initiation factor 2 alpha kinase

HRP : *Horseradish Peroxidase*

HSPA5 : Heat Shock Protein Family A member 5 (autre nom de GRP78)

HTZ : Hétérozygote

I

ICS : Institut Clinique de la souris

IGBMC : Institute de Génétique et Biologie Moléculaire et Cellulaire

INL : Inner Nuclear Layer

IPL : Inner Plexiform Layer

IRBP : Interphotoreceptor Retinoid-Binding Protein

IRE1 : serine/threonine-protein kinase/endoribonuclease Inositol-Requiring Enzyme 1

IS : Inner Segment

IFT : Intraflagellar Transport

J

JNK : C-Jun N-Terminal Kinase

K

KI : Knock-In

KO : Knock-Out

L

LEDGF : Lens Epithelium Derived Growth Factor

M

MAPK8 : Mitogen-Activated Protein Kinase 8

MET : Microscopie Electronique à Transmission

MKS : Meckel-Gruber Syndrome

N

NGF : Nerve Growth Factor

O

ONL : Outer Nuclear Layer

OPL : Outer Plexiform Layer

OS : Outer Segment

P

P23H : substitution de la proline en position 23 de la rhodopsine par une histidine

p-eiF2 α : forme phosphorylée d'eiF2 α

PBS : Phosphate Buffer Saline

PCR : Polymerase Chain Reaction

PDE : cGMP-specific 3',5' – cyclic Phosphodiesterase

PERK : *Protein* kinase R (PKR)-like Endoplasmic Reticulum Kinase

PKR : Protein Kinase R

PP1c : Protein Phosphatase 1 catalytic subunit

PP2 : Protein Phosphatase 2

P58IPK : Protein Kinase InhibitorP58

PPP1R15A et -15B : Protein Phosphatase 1 Regulatory subunit 15A et 15B

PR : Photorécepteur

PUMA : P53 Up-Regulated Modulator of Apoptosis

R

Rd8 : lignée murine C57Bl/6N porteuse d'une mutation du gène Crb1

RdCVF : Rod-derived Cone Viability Factor

RE : Réticulum Endoplasmique

RGC : Retinal Ganglion Cell

Rho : Rhodopsine

Rho^{P23H/P23H} et Rho^{P23H/+}: forme homozygote et hétérozygote de la mutation P23H

RIDD : Regulated IRE1 Dependant RNA Decay

RIP : Receptor-Intercating Protein

ROS : Reactive Oxygen Species

RP : Rétinopathie Pigmentaire

RPE : Retinal Pigment Epithelium

S

S1P et S2P : Site-1 Proteases et Site-2 Proteases

T

TM : Transmembranaire

TRAF2 : TNF Receptor Associated Factor 2

TUDCA : Tauroursodeoxycholic Acid

TUNEL : Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick End Labeling

U

UPR : Unfolded Protein Response

V

VCP : Valosin containing Protein

VPA : Acide Valproïque

W

WT : Wild-Type

X

XBP1 : X-box binding protein 1

XIAP : X-linked inhibitor of apoptosis

Avant-propos

Le Laboratoire de Génétique Médicale UMRS_1112, au sein duquel s'est déroulée cette thèse, s'intéresse de longue date à un groupe de maladies génétiques rares : les ciliopathies. Ces pathologies se caractérisent par l'atteinte de différents organes liés à la défaillance d'une organelle cellulaire : le cil primaire. Parmi ces atteintes, l'atteinte rétinienne est particulièrement étudiée dans le laboratoire, que ce soit pour la compréhension des mécanismes biologiques sous-jacents ou le développement de thérapies notamment lorsqu'une accumulation protéique anormale est constatée au niveau des photorécepteurs.

En effet, des études préalables réalisées au laboratoire ont permis la compréhension des mécanismes impliqués dans la dégénérescence rétinienne associée au Syndrome de Bardet-Biedl, une ciliopathie emblématique, mais ont également permis le développement d'un traitement pharmacologique ralentissant celle-ci (Mockel et al, 2012)¹.

Le travail effectué et présenté dans cette thèse s'inscrit dans la continuité de ces études. En effet, il porte sur le développement d'approches thérapeutiques innovantes pour les dégénérescences de la rétine de type rétinopathies pigmentaires et tout particulièrement celles liées aux ciliopathies ou qui partagent des mécanismes physiopathogéniques communs. Notre objectif était de poursuivre la caractérisation des mécanismes impliqués pour les dégénérescences rétiniennes d'origine ciliaire à l'aide de modèles murins (PARTIE 1). Un autre objectif (PARTIE 2) était de tester une thérapie pharmacologique qui pourrait permettre de ralentir la dégénérescence rétinienne liée à l'accumulation protéique qui induit l'UPR. InFlectis BioScience est une entreprise pharmaceutique qui développe de petites molécules chimiques afin de traiter des maladies dégénératives dans lesquelles une accumulation anormale de protéines est observée. Compte-tenu de nos résultats initiaux (Mockel et al, 2012)¹, une collaboration a vu le jour permettant d'obtenir une Bourse Cifre. Le projet se situe donc à l'interface du laboratoire public et de l'entreprise, et a permis de tester l'une de leurs molécules pharmacologiques dans différents modèles de rétinopathies pigmentaires ciliaires et dans le cadre de modèles liés à des mutations dans la rhodopsine.

Afin de comprendre le contexte et les enjeux de ce travail, l'introduction commencera par un bref rappel anatomique et fonctionnel de l'œil, en particulier de la rétine et des photorécepteurs. Les aspects physiopathologiques généraux des rétinopathies pigmentaires

seront également abordés. Un focus sera fait sur les mécanismes physiopathogéniques faisant l'objet de cette thèse et donc tout particulièrement ceux liés à l'accumulation protéique et aux conséquences cellulaires conduisant à la dégénérescence des photorécepteurs avec un focus particulier sur les voies de signalisation et protéines cibles du traitement (stress du RE et UPR).

Enfin un bref aperçu général des différentes stratégies thérapeutiques disponibles ou actuellement développées pour les rétinopathies pigmentaires sera fait dans la dernière partie introductive. Nous présenterons ensuite les deux articles qui sont le résultat de ce travail de thèse :

1° ARTICLE

In vivo phenotypic and molecular characterization of retinal degeneration in mouse models of three ciliopathies

Agnès BRUN, Xiangxiang YU, Cathy OBRINGER, Daniel AJOY, Elodie HASER, Corinne STOETZEL, Michel J. ROUX, Nadia MESSADDEQ, Hélène DOLLFUS, Vincent MARION
Experimental Eye Research, Volume 186, September 2019, 107721
<https://doi.org/10.1016/j.exer.2019.107721>

2° ARTICLE

Administration of IFB-088 in combination with valproic acid could improve transiently retinal phenotype in two retinitis pigmentosa models

Agnès BRUN, Cathy OBRINGER, Elodie HASER, Daniel AJOY, Nadia MESSADDEQ, Michel J. ROUX, Philippe GUEDAT, Pierre MINIOU, Hélène DOLLFUS, Emmanuelle ABGUEGUEN, Vincent MARION

Article en préparation

Nous concluons avec une synthèse objective de nos travaux et des réflexions pour la suite de cette étude.

Introduction

I. Rappels anatomiques et fonctionnels de l'appareil visuel

A. L'œil et la rétine

1. Anatomie générale

L'œil est l'organe spécialisé permettant la vision. Par ses différentes structures, il capte l'information lumineuse puis la convertit en signal électrique qui sera transmis au cerveau. Il est divisé en deux parties : le segment antérieur et le segment postérieur^{2,3} (Figure 1).

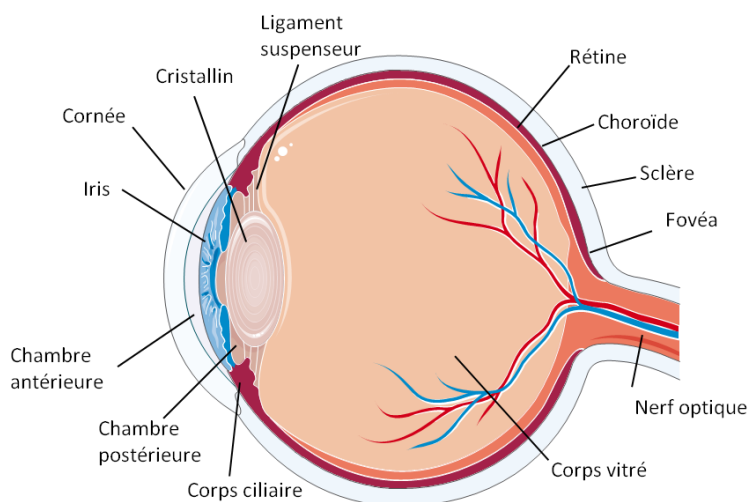


Figure 1 : Schéma d'une coupe sagittale d'un globe oculaire simplifié

Le segment antérieur est composé des éléments situés avant le cristallin : cornée, chambre antérieure, iris, chambre postérieure et le cristallin lui-même. Le segment postérieur est composé du corps vitré, la rétine et des tissus de soutien.

La rétine tapisse le fond de l'œil, elle constitue la partie neurosensorielle de l'œil. Elle est composée de plusieurs types cellulaires organisés en différentes couches^{2,3} (Figure 2) et faisant 250 μ m d'épaisseur au total⁴. De la partie la plus externe vers la plus interne, on distingue sur un plan microscopique diverses couches :

- l'épithélium pigmentaire de la rétine (*Retinal Pigment Epithelium* en anglais (RPE), tissu de soutien des photorécepteurs.

- les photorécepteurs sont divisés en trois structures (ou couches) ; la couche des segments externes (*Outer Segment, OS*) au contact de la RPE, puis la couche des segments internes des photorécepteurs (*Inner Segment, IS*) et enfin la couche des noyaux des photorécepteurs (*Outer Nuclear Layer, ONL*).

- l'OPL (*Outer Plexiform Layer*) qui est la zone de synapses entre les photorécepteurs et les cellules de l'INL (*Inner Nuclear Layer*) composées des cellules bipolaires et des cellules horizontales.

- A la suite de l'INL se trouve l'IPL (*Inner Plexiform Layer*) zone de synapses entre les axones des cellules bipolaires et les dendrites des cellules ganglionnaires de la GCL (*Ganglion Cell Layer*) dont les prolongements axonaux formeront le nerf optique ^{4,5}.

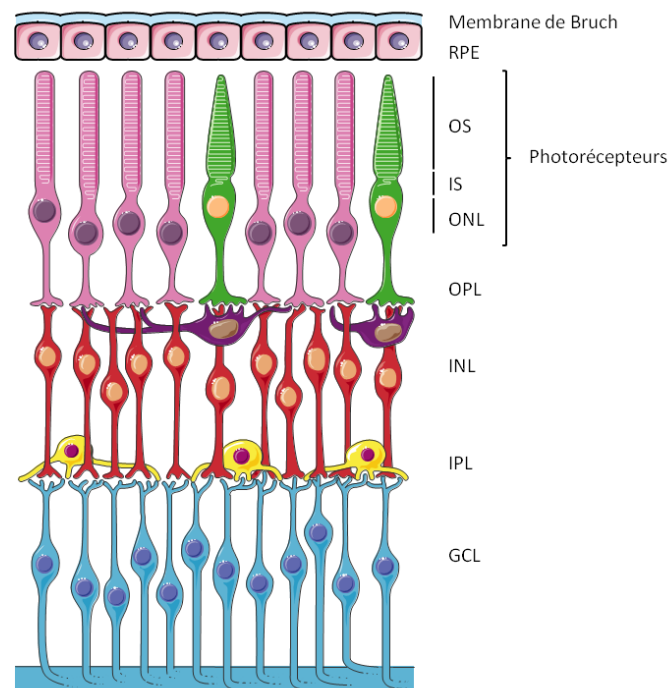


Figure 2 : Représentation schématique des différentes couches de la rétine

Sur cette figure sont indiquées les différents types cellulaires composant la rétine. La couche la plus externe est la partie non neuronale de la rétine : la RPE. La partie neuronale de la rétine est composée des différentes couches cellulaires : les couches des photorécepteurs (OS IS et ONL), l'INL et la GCL, séparées par des zones de synapses : OPL et IPL. Les photorécepteurs sont divisés en deux types : les bâtonnets représentés en rose et les cônes en vert. Au niveau de l'INL figurent les cellules bipolaires en rouge, les cellules horizontales en violet et les cellules amacrines en jaune. Les cellules ganglionnaires sont représentées en bleu.

2. Les photorécepteurs

Les photorécepteurs sont les cellules spécialisées dans la détection du signal lumineux et permettent sa conversion en énergie électromagnétique par un enchaînement de réactions biochimiques en cascade constituant la **transduction visuelle**. Il existe différents types de photorécepteurs sensibles à des longueurs d'ondes et des intensités lumineuses différentes selon la protéine photosensible (opsine) qu'ils contiennent. Parmi le millier d'opsines existant dans le monde animal⁶, l'espèce humaine en possède quatre : une pour les bâtonnets et trois pour les cônes. Les bâtonnets, dont le photopigment est la **rhodopsine** (absorbe les longueurs d'onde de 500nm), est sensible à de faibles intensités lumineuses et permet la vision crépusculaire ainsi que la perception du champ visuel. Les cônes, dont il existe 3 types dans l'espèce humaine, sont sensibles à de plus fortes intensités lumineuses que celles des bâtonnets. Ils permettent la détection des couleurs et la vision diurne. On distingue les cônes en fonction de la longueur d'onde absorbée. Les cônes S sont sensibles aux lumières bleues (437nm), les cônes M aux lumières vertes (533nm) et les cônes L aux lumières rouges (564nm)⁷.

La rétine humaine contient plus de bâtonnets que de cônes, pour un ratio bâtonnets/cônes de 95/5^{8,9}. Les différents photorécepteurs ne sont pas répartis de manière homogène sur la rétine. En effet, dans la région centrale de la rétine se trouve le départ du nerf optique (papille optique), en décalé duquel se trouve une région qui apparaît plus sombre en raison de sa concentration en photorécepteurs et du pigment fovéal ; la macula (Figure 3). En son centre se trouve la fovéa, région la plus riche en cônes de la rétine et dépourvue de bâtonnets. Les cônes y sont concentrés permettant une acuité maximale¹⁰⁻¹² (Figure 3). La périphérie est quant à elle riche en bâtonnets.

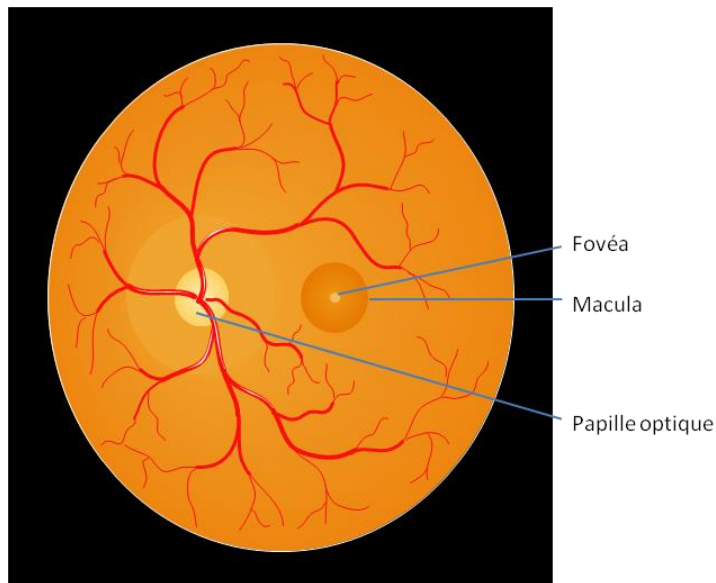


Figure 3 : Représentation schématique d'un fond d'œil

Cette figure montre le réseau vasculaire en rouge mais également les différentes zones remarquables de la rétine : la macula avec en son centre la fovéa, zones riches en cônes et la papille optique correspondant au point de départ du nerf optique.

a. Structure des photorécepteurs

La cellule photoréceptrice est constituée de différentes parties : le segment interne et le segment externe, reliés par le cil connecteur. Le segment interne contient les différentes organelles nécessaires à la synthèse protéique et au métabolisme de la cellule. Le segment externe est lui dépourvu de synthèse protéique et est spécialisé dans la détection de la lumière. Il est formé par un empilement de disques riches en opsine (Figure 4). C'est à ce niveau que se déroule le processus de la phototransduction permettant la détection et la conversion du signal lumineux en un signal électrique. Toutes les protéines présentes au niveau du segment externe seront donc apportées depuis le segment interne par le transport intraciliaire, *via* le cil connecteur^{13,14}.

Chaque jour, 10% du segment externe est renouvelé¹⁵⁻²⁰. Ce processus de synthèse permanente (de la base vers l'apex) nécessite un mécanisme continu de dégradation afin de maintenir l'intégrité de la rétine. Les déchets sont phagocytés au niveau de l'apex par les cellules de la RPE en contact avec le segment externe (Figure 4).

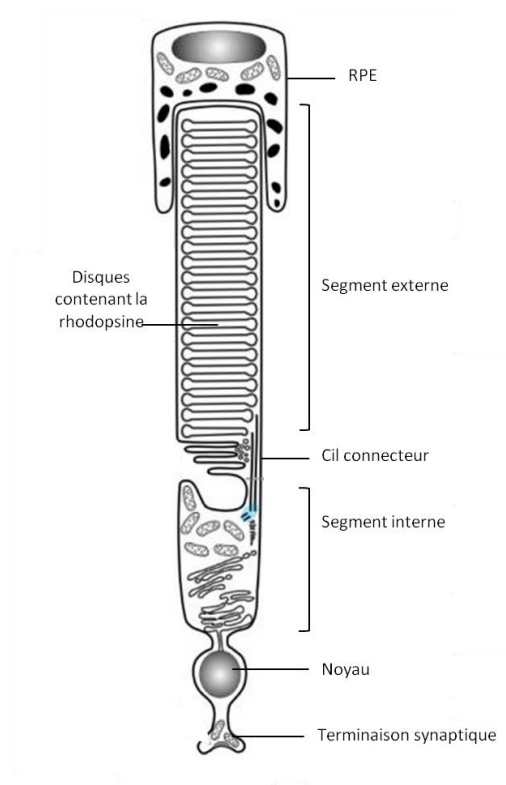


Figure 4 : Schéma simplifié d'un photorécepteur (bâtonnet)

(Adapté de Falk *et al.* 2015²¹)

Cette figure montre le segment externe constitué d'un empilement de disques, le segment interne contenant les différentes organelles de la cellule. Ces segments sont reliés par le cil connecteur, assurant le transport protéique d'un compartiment à l'autre.

b. Le cil connecteur du photorécepteur

Le cil primaire, d'une manière générale, est une évagination de la membrane plasmique dont l'axe est formé par l'association de neuf doublets de microtubules (structure 9+0) à la différence des cils mobiles ayant deux microtubules centraux (structure 9+2)²². Il s'agit d'une organelle ubiquitaire dans l'organisme avec divers rôles en fonction des types cellulaires concernés. Le cil primaire peut notamment avoir un rôle dans la détection des signaux extra cellulaires grâce aux récepteurs présents à sa surface et peut contribuer à l'activation des cascades de signalisation qui en découlent²². A la base de la zone de transition, constituant indispensable à la formation du cil et sélection des constituants ciliaires, se trouve le corps basal. Il est dérivé du centriole mère, est lié à la membrane plasmique par les fibres de transitions. A ce niveau le cil est constitué d'une structure cylindrique composée de neuf

triplets de microtubules à partir desquels se forment la zone de transition puis l'axonème (9+0) formant l'axe du cil (Figure 5). D'une manière générale, un défaut de genèse ou de fonctionnement de celui-ci entraîne des défaillances cellulaires variées avec des conséquences parfois multiples au niveau de l'organisme²².

Au niveau du photorécepteur, le cil est modifié et hautement spécialisé car il représente le passage du segment interne vers le segment externe (et *vice versa*). Il s'agit du cil connecteur véritable zone de transition. Celle-ci est formée, à la base du cil connecteur, par le prolongement des deux microtubules les plus internes du corps basal, donnant une structure de neuf doublets. Ceux-ci sont reliés à la membrane du cil par des structures appelées « *Y-links* » (Figure 5) qui constituent une barrière de diffusion, empêchant la diffusion des protéines solubles^{23,24}. De plus, une invagination de la membrane plasmique sur la hauteur de la zone de transition forme la poche ciliaire. Les microtubules de la zone de transition se prolongent pour former l'axonème du cil (Figure 5). Dans la partie distale du segment externe, seul un microtubule de chaque doublet se prolonge.

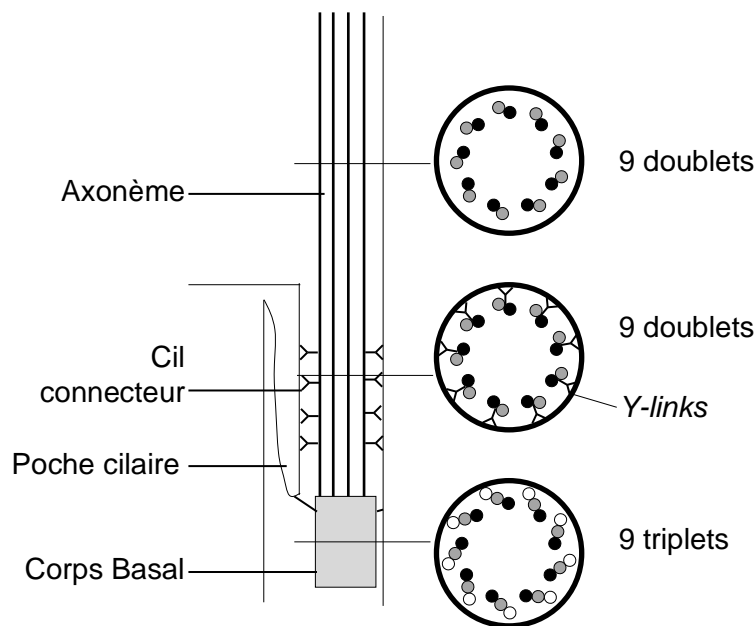


Figure 5 : Représentation schématique du cil primaire d'un photorécepteur

Cette figure montre un cil primaire en coupe longitudinale faisant apparaître le corps basal, la zone de transition correspondant au cil connecteur du photorécepteur et l'axonème. Pour chacun de ces éléments figure une représentation d'une coupe transversale sur lesquelles sont représentés les microtubules.

Au niveau des photorécepteurs, la membrane du cil primaire forme de nombreuses invaginations donnant lieu à un empilement de centaines de disques²⁵ contenant une grande quantité d'opsine. En effet, par exemple pour les bâtonnets, la rhodopsine compte pour 90% des protéines du segment externe des bâtonnets.

2. Les autres cellules composant la rétine

L'information lumineuse convertit en un signal électromagnétique par les photorécepteurs (dans le cadre de la transduction visuelle décrite plus bas) est transmise aux autres cellules de la rétine. Cette transmission se fait d'abord aux cellules bipolaires et cellules horizontales qui forment leurs synapses avec les photorécepteurs au niveau de l'OPL et donnent différentes propriétés au signal reçu (polarité, contraste, vitesse, composition chromatique²⁶ et sensibilité à la lumière selon l'intensité lumineuse²⁷). Les cellules bipolaires assurent la jonction entre la partie externe et la partie interne de la rétine. Le signal est ensuite transmis aux cellules ganglionnaires (RGC). Elles captent le signal et le transmettent *via* le nerf optique, constitué des axones des RGC, au cortex visuel. Certaines RGC (à mélanopsine) sont photosensibles, elles agissent principalement sur le comportement (cycle circadien, sommeil, réflexe pupillaire) en détectant la lumière et transmettant l'information au niveau de structures hypothalamiques^{28 29,30}. Les cellules amacrines interviennent dans l'intégration et la modulation du signal provenant des photorécepteurs. Elles jouent notamment un rôle dans la sensibilité de la vision scotopique, dans la détection des mouvements, dans l'adaptation à la lumière et la modulation du rythme circadien.³¹⁻³⁴

Les cellules de Müller sont les principales cellules macrogliales de l'œil assurant différentes fonctions au niveau de la rétine. Elles assurent le maintien de l'homéostasie extracellulaire (eau, ions, pH), la stabilité de la rétine et participent à la formation des segments externes des photorécepteurs. Elles ont également un rôle dans la barrière sang-rétine et apportent les facteurs trophiques ainsi que l'oxygène nécessaires à la rétine. Elles participent activement à la fonction synaptique, produisant les précurseurs des neurotransmetteurs et récupérant le glutamate libéré au niveau synaptique. Elles participent au cycle du 11-*cis*-rétinal spécifique des cônes (décrit plus bas). Elles permettent également de transporter la lumière à travers l'ensemble des couches de la rétine jusqu'aux photorécepteurs en limitant sa diffusion et donc les pertes d'information.^{35,36}

B. Mécanismes de la vision

1. La phototransduction

La phototransduction permet la conversion du signal lumineux capté au niveau des photorécepteurs en un signal électromagnétique qui sera transmis. Bien que des différences existent entre les cônes et les bâtonnets, la cascade de signalisation de base pour ces deux types cellulaires est similaire

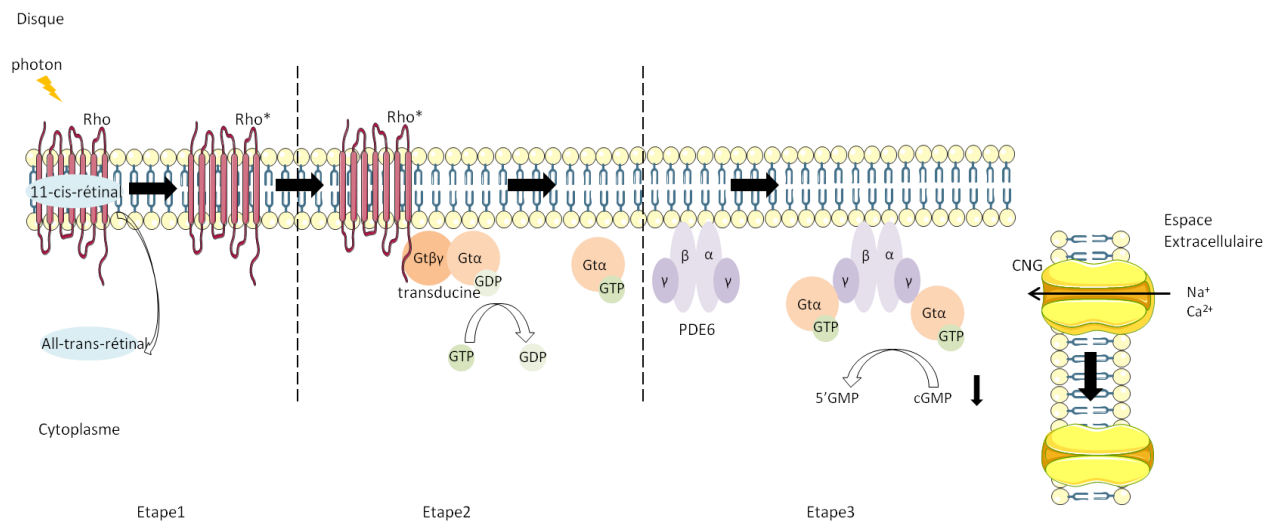


Figure 6 : Représentation schématique de la cascade de la phototransduction

Cette figure montre les différentes étapes de la phototransduction ainsi que les principales protéines impliquées dans la cascade à chaque étape. Le processus est détaillé ci-dessous.

Au niveau des bâtonnets, la rhodopsine est la protéine photosensible, permettant la détection des photons au niveau des disques initiant ainsi la cascade de phototransduction. Il s'agit d'une protéine de 348 acides aminés qui est un récepteur couplé aux protéines G comportant sept domaines transmembranaires^{8,37,38}. Sa synthèse est soumise à un rythme circadien avec une expression maximale en début de journée (début de phase lumineuse) et minimale la nuit^{39,40}. Elle compte pour 30% des protéines des bâtonnets et constitue, comme indiqué plus haut, la majeure partie des protéines du segment externe (90%)⁴¹ avec 48 000 monomères par μm^2 au niveau des disques¹⁴. Au niveau des cônes, la cascade de la phototransduction sera initiée par les opsines *ad hoc* propres à chaque longueur d'onde.

Au niveau des bâtonnets, à l'obscurité, l'opsine est couplée au 11-*cis*-rétinal formant ainsi la rhodopsine. Suite à une exposition lumineuse, la phototransduction débute par la captation d'un photon par la rhodopsine au niveau des disques du segment externe des photorécepteurs.

La captation du photon par la rhodopsine induit la conversion du 11-*cis*-rétinal en all-*trans*-rétinal conduisant à un changement de conformation de la rhodopsine et à la dissociation du complexe opsine-rétinal (Figure 6, étape1). La rhodopsine, ainsi activée, active à son tour la transducine (protéine G composée de trois sous unités : α , β et γ). Ce qui permet l'échange du GDP en GTP au niveau de la sous-unité α ($Gt\alpha$) et entraîne la dissociation de cette dernière des sous unités β et γ ($Gt\beta\gamma$) (Figure 6, étape2). $Gt\alpha$ -GTP, une fois dissociée, se lie aux sous-unités inhibitrices γ de PDE6 (*cGMP-specific 3',5' - cyclic phosphodiesterase 6*) activant cette dernière. PDE6 est une phosphodiesterase composée de quatre sous-unités (deux sous-unités catalytiques $\alpha+\alpha'$ dans les cônes, $\alpha+\beta$ dans les bâtonnets et deux sous-unités inhibitrices γ). Une fois activée, elle hydrolyse le cGMP en 5'GMP diminuant la concentration cytosolique en cGMP et entraînant la fermeture des canaux CNG (*Cyclic-Nucleotide Gate*, codés par les gènes *CNGA1* et *CNGB1*) (Figure 6, étape3). La fermeture de ces canaux entraîne l'arrêt du flux entrant des ions Ca^{2+} et Na^+ . Ce flux présent à l'obscurité permet le maintien du potentiel membranaire à son niveau basal. Son interruption entraîne une diminution de la concentration cytosolique de ces ions et l'hyperpolarisation de la membrane des photorécepteurs réduisant le relargage de glutamate au niveau synaptique ^{4,6,37,42}.

A l'obscurité, le retour à l'état inactif se fait par la phosphorylation, par GRK1 (*G protein-coupled Receptor Kinase 1*), de résidus thréonine et sérine (au niveau de l'extrémité C terminale) de la rhodopsine activée. La rhodopsine ainsi phosphorylée se lie à l'arrestine, empêchant sa déphosphorylation et, de ce fait, diminuant la quantité de rhodopsine pouvant activer la transducine. La transducine est inactivée par hydrolyse du GTP par des GAPs (*GTPase-Accelerating Protein*) entraînant l'inactivation de PDE6. Dans le même temps, des guanylate cyclases sont activées permettant la synthèse de cGMP et le retour à un niveau basal de cGMP, ce qui permet l'ouverture des canaux CNG et le retour du flux ioniques à travers la membrane des photorécepteurs ^{6,12,13,42,43}.

En cas d'exposition prolongée à la lumière, des mécanismes d'adaptation se mettent en place permettant une diminution de la sensibilité à la lumière, une vision à de plus hautes intensités

lumineuses et une meilleure résolution temporelle¹². Un des mécanismes mis en jeu dans l'adaptation à la lumière est l'activation des PDE entraînant la diminution du nombre de canaux ouverts et ainsi la sensibilité des photorécepteurs, celle-ci étant proportionnelle au nombre de canaux ouverts avant un flash. Des mécanismes dépendant de la concentration en Ca^{2+} sont également impliqués. Ainsi la concentration en Ca^{2+} diminuée suite à l'activation de la phototransduction entraîne l'activation de *guanylate cyclase activating proteins* (GCAP) augmentant l'activité des guanylate cyclases qui produisent le cGMP, et contrebalance ainsi l'hydrolyse de celui par PDE6. Le Ca^{2+} permet également le contrôle de GRK1. Ce dernier est négativement régulé par la recoverine, protéine liant le Ca^{2+} . Ainsi lorsque le Ca^{2+} diminue l'inhibition de GRK1 est levée augmentant la phosphorylation de la rhodopsine activée.^{6,12}

2. Le cycle visuel

Le cycle visuel décrit le mécanisme par lequel le 11-*cis*-rétinal, dérivé de la vitamine A, est régénéré après la phototransduction.

a. Le cycle canonique

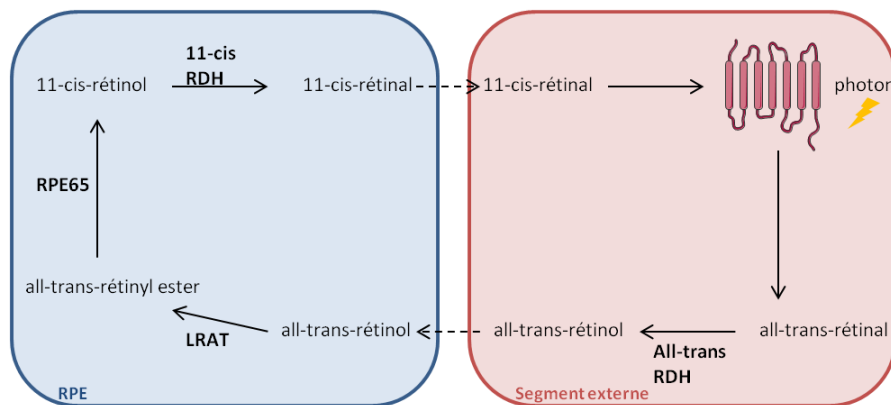


Figure 7 : Cycle canonique du rétinol

Représentation des différentes étapes et enzymes impliquées dans le recyclage du 11-*cis*-rétinal dans les différents compartiments impliqués.

Dans le segment externe des photorécepteurs, le 11-*cis*-rétinal est lié à l'opsine. L'excitation de celle-ci par un photon entraîne l'isomérisation du 11-*cis*-rétinal en all-*trans*-rétinal activant

la rhodopsine et permettant la cascade de phototransduction. Quand la rhodopsine retourne à un état inactif, le *all-trans*-rétinal est libéré et est réduit en *all-trans*-rétinol dans le photorécepteur. Sous cette forme, il quitte le photorécepteur *via* IRBP (*Interphotoreceptor Retinoid-Binding Protein*) vers les cellules de RPE où il est converti en *all-trans*-rétinyl ester par des LRAT (*Lecithin Retinol Acyl Transferase*) puis en *11-cis*-rétinol par RPE65 et enfin en *11-cis*-rétinal par des RDH (*Retinol deHydrogenase*). Il retournera alors dans le segment externe des photorécepteurs pour lier l'opsine^{13,44} (Figure 7).

b. Le cycle non-canonique

Ce cycle a lieu entre les cônes et les cellules de Müller⁴⁵, il permet le renouvellement plus rapide du rétinol nécessaire au fonctionnement des cônes. L'opsine a une affinité moindre pour le *11-cis*-rétinal, entraînant une dissociation et donc un renouvellement du rétinol plus rapide. Le *all-trans*-rétinal libéré sera comme précédemment réduit en *all-trans*-rétinol avant de repasser dans la cellule de Müller *via* les IRBPs¹³. Le *all-trans*-rétinol est converti en *11-cis*-rétinol dans la cellule de Müller avant de passer dans le segment externe des cônes où il sera converti en *11-cis*-rétinal.

3. Différences principales entre les cônes et les bâtonnets

En dehors des différences de fonction et d'opsines mentionnées plus haut, les cônes et les bâtonnets se distinguent au niveau morphologique mais également au niveau des mécanismes activés lors de la phototransduction et des circuits neuronaux en aval.

D'un point de vue morphologique, les cônes ont un segment externe plus court que les bâtonnets avec un axonème présent tout le long du segment externe, au contraire des bâtonnets où il n'est présent que sur une partie du segment externe. La structure des disques diffère également, ainsi les disques des bâtonnets sont individualisés, sans lien avec la membrane plasmique créant ainsi des espaces isolés au sein du segment externe. A l'opposé, les disques des cônes sont en continuité avec la membrane plasmique (Figure 8)⁴⁶.

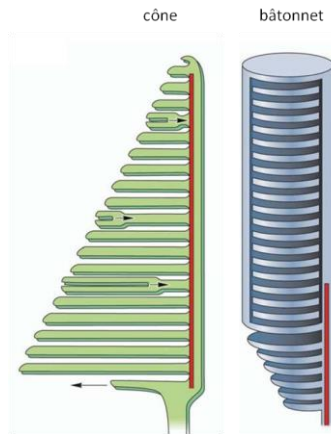


Figure 8 : Schéma des segments externes d'un cône et d'un bâtonnet

(Adapté de Mustafi *et al.* 2009⁴⁶)

Sur cette représentation on peut observer les disques du segment externe et l'axonème (en rouge) présent dans les différents photorécepteurs.

Les mécanismes impliqués dans la détection de la lumière et sa conversion en un signal transmis au cortex visuel, sont globalement similaires entre les différents types de photorécepteurs. Néanmoins comme il a été décrit précédemment, il existe des différences liées à leurs fonctions spécifiques.

Les bâtonnets, spécialisés dans la détection crépusculaire, sont sensibles aux faibles intensités lumineuses, ainsi un seul photon peut conduire à un signal post-synaptique. Les cônes spécialisés dans la vision diurne, sont donc moins sensibles mais ont une meilleure résolution temporelle. La réponse des cônes à un photon est de l'ordre de 100 fois inférieure à celle des bâtonnets (est donc indétectable). En revanche, ils ont une vitesse de réponse supérieure grâce à des mécanismes de renouvellement rapide des différents facteurs impliqués dans la cascade de signalisation. Parmi lesquels, un cycle visuel propre et des opsines ayant une affinité moindre pour le rétinol. Les cônes possèdent également des protéines isoformes de celles des bâtonnets, notamment GRK7 qui est plus exprimée dans la cellule et a une plus grande activité que GRK1 permettant une phosphorylation plus rapide de la rhodopsine⁴⁷.

Suite à la phototransduction, les circuits activés diffèrent également. Les cellules bipolaires sont en contact avec plusieurs bâtonnets alors que celles recevant les afférences des cônes ne

forment qu'une synapse avec ceux-ci. De ce fait, les cônes ont une meilleure résolution spatiale que les bâtonnets⁴⁶.

II. Les dégénérescences rétiniennes héréditaires

Les dégénérescences rétiniennes sont des maladies dégénératives de la rétine touchant des millions de personnes à travers le monde. Les causes sont multiples, elles peuvent avoir une origine génétique (dégénérescences rétiniennes héréditaires ; DRH) ou multifactorielle en particulier avec des facteurs environnementaux comme dans le cas de la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA). Elles peuvent aussi être secondaires à une maladie comme pour les rétinopathies diabétiques. Nous nous focalisons ici sur les DRH.

A. Hétérogénéité des dégénérescences rétiniennes héréditaires

Les DRH sont une cause majeure de malvoyance affectant 1/2000 personne dans le monde⁴⁸. Elles présentent une grande hétérogénéité clinique et une grande variabilité génétique. En effet, plus de 260 gènes ont été identifiés à ce jour dans ces pathologies (<https://sph.uth.edu/retnet/home.htm>)⁴⁹. Les gènes retrouvés sont entre autres impliqués dans le développement ou le fonctionnement de la rétine (la phototransduction, le cycle visuel, le transport ciliaire ou encore le relargage de neurotransmetteur au niveau synaptique). La transmission de ces pathologies peut se faire selon un mode autosomique dominant, autosomique récessif, lié à l'X et dans de plus rare cas, mitochondrial ou digénique^{49,50}. La dégénérescence rétinienne peut être isolée (l'œil étant le seul organe atteint) dans le cas des formes non syndromiques ou associée à des atteintes de plusieurs organes dans le cas des formes syndromiques. Participant à la complexité de ces pathologies, un gène peut être impliqué dans différentes formes cliniques que ce soit dans des formes syndromiques ou non syndromiques c'est le cas notamment du gène ciliaire *CEP290* qui a été un des sujets d'intérêt de cette thèse. De plus, un syndrome peut être causé par des mutations dans différents gènes, c'est le cas du syndrome de Bardet-Biedl, qui nous intéresse aussi particulièrement, avec à ce jour 24 gènes identifiés⁵¹⁻⁵³.

D'un point de vue clinique, les DRH sont réparties en différentes classes selon le type cellulaire atteint en premier lieu. On distingue ainsi classiquement les dystrophies à début central en particulier les « Cones dystrophies » ou encore les « *cone-rod dystrophies* » et les dystrophies à début périphérique dénommées « *rod-cone dystrophies* ».

Pour la première catégorie, les « *cones dystrophies* » et « *cones-rod dystrophies* » se caractérisent par une perte progressive des cônes pouvant être suivie d'une perte des bâtonnets dans le cas des « *cones-rod dystrophies* ». Pour ces atteintes, 35 gènes sont identifiés (<https://sph.uth.edu/retnet/home.htm>). D'un point de vue clinique, les patients présentent une diminution de l'acuité visuelle, une photophobie, un nystagmus et atteinte de la vision des couleurs. Des remaniements pigmentés ainsi qu'une atrophie rétinienne peuvent être observé au niveau de la macula. Au départ la vision périphérique est préservée, la progression se faisant du centre vers la périphérie. Dans les stades les plus avancées, la vision périphérique pourra également perdue^{50,54}. Il existe également des formes dites stationnaires comme l'achromatopsie avec une perte de la vision des couleurs avec une possible atteinte dégénérative mais beaucoup plus tardive. Les dystrophies maculaires, comme leur nom l'indique, présentent une atteinte exclusive et globale de la macula. 21 gènes ont été identifiés à ce jour dans ces atteintes (<https://sph.uth.edu/retnet/home.htm>).

Les dystrophies à début périphérique sont dénommées « *rod-cone dystrophies* »^{50,55} ou sont encore appelées « rétinoopathies pigmentaires ». Elles se caractérisent par une perte primaire des bâtonnets suivie par une perte des cônes. Elles commencent donc par une difficulté d'adaptation à l'obscurité, une perte de la vision nocturne et un rétrécissement du champ visuel. L'atteinte des cônes est souvent secondaire, elle conduira à une diminution de la vision centrale. La vision diurne n'étant pas touchée dans un premier temps, les premiers symptômes passent souvent inaperçus (hespéranopie puis diminution progressive du champ visuel) rendant le diagnostic précoce difficile^{10,56}. Des formes stationnaires d'atteinte des bâtonnets existent, la plus fréquente étant la cécité nocturne congénitale stationnaire (CSNB, *Congenital Stationary Night Blindness*) pour laquelle 15 gènes sont identifiés (<https://sph.uth.edu/retnet/home.htm>). Le phénotype est généralement moins sévère que dans les formes progressives⁵⁰.

Malgré cette classification, le phénotype (sa sévérité, l'âge d'apparition et sa progression) est souvent variable au sein de chacune de ces classes.

B. Hétérogénéité génétique des rétinopathies pigmentaires

Les rétinopathies pigmentaires représentent la cause la plus fréquente de DRH, affectant 1 personne sur 4000 (la prévalence allant de 1/9000 à 1/750 selon les régions et ethnies)^{5,10,12,13}, elles touchent dans le monde plus de 1,5 millions de personnes¹³. La transmission se fait selon un mode autosomique dominant (adRP) dans 15 à 25% des cas, autosomique récessif (arRP) dans 5 à 25% des cas et lié à l’X dans 5 à 15% des cas^{5,10}, 35 à 50% des cas ne sont pas classés. A côté de cette transmission mendélienne classique, une partie des cas sont liées à un digénisme (ou un oligogénisme)^{12,57} ou encore correspondent à des formes de transmission mitochondriale ou très exceptionnellement à des disomies uniparentales. Elles présentent une grande hétérogénéité génétique avec plus de 100 gènes identifiés à ce jour (<https://sph.uth.edu/retnet/home.htm>)⁵⁸.

L’âge d’apparition des rétinopathies pigmentaires (RP) est très variable commençant en moyenne à l’adolescence avec des difficultés d’adaptation à l’obscurité et une perte de la vision nocturne due à la perte des bâtonnets¹², la maladie pouvant évoluer jusqu’à la cécité. La forme la plus précoce est l’amaurose congénitale de Leber décrite plus bas. L’examen classique du fond d’œil dans les formes avancées se caractérise par des dépôts pigmentés suite à la mort des photorécepteurs. Un rétrécissement des vaisseaux, et une papille cireuse sont également observés.^{5,13,59}

Les RP peuvent être divisées en deux groupes ; les RP non syndromiques lorsque l’atteinte rétinienne est isolée (70% des cas) et les RP syndromiques lorsque l’atteinte rétinienne est associée à des anomalies systémiques non ophtalmologiques.

1. Les rétinopathies pigmentaires non syndromiques

a. Les causes génétiques

Les RP non syndromiques, ne présentent aucun signe clinique en dehors de l’atteinte visuelle et sont les formes les plus fréquentes de DRH. Il existe une grande hétérogénéité clinique et génétique, avec à l’heure actuelle plus de 80 gènes identifiés¹³ (<https://sph.uth.edu/retnet/home.htm>). Les protéines codées sont des protéines indispensables à la structure, au développement et/ou à la fonction de la rétine. Parmi elles, des protéines sont

impliquées dans la cascade de phototransduction, dans le cycle visuel ou encore le cil primaire des photorécepteurs (Tableau 1).

Implication	Gènes
Développement rétinien	<i>ARHGEF18; C2orf71; FAM161A; IFT140; IFT172; NEK2; OFD1; SEMA4A; SLC7A14; TOPORS; ZNF408; ZNF513</i>
Segment externe/disque morphogénèse	<i>CDHR1; FSCN2; PROM1; PRPH2; ROM1</i>
Cil : structure et fonction	<i>AGBL5; AH11; ARL2BP; ARL3; ARL6; BBS1; BBS2; BBS9; C2orf71; C8orf37; CDHR1. CLNR1; EYS; FAM161A; IFT140; IFT172; KIZ; MAK; OFD1; POMGNT1; RP1; RP1L1; RP2; RPGR; RPGRIP1; SPATA7; TOPORS; TTC8; TULP1; USH2A</i>
Cycle visuel	<i>ABCA4; LRAT; RBP3; RDH12; RGR; RLBP1; RPE65</i>
Phototransduction	<i>CNGA1; CNGB1; DHDDS; GNAT1; GUCA1B; PDE6A; PDE6B; PDE6G; RHO; SAG</i>
Matrice inter photorécepteur	<i>EYS; IMPG2</i>
Homéostasie rétinienne	<i>BEST1; C4A; CERKL; CLN3; HGSNAT; KLHL7; MVK; MERTK; REEP6</i>
Métabolisme rétinien	<i>HK1; IDH3A; IDH3B; PANK2</i>
Synthèse de nucléotides	<i>IMPDH1</i>
Transcription	<i>GRX; NEUROD1; NR2E3; NRL; SAMD11</i>
Epissage de l'ARN	<i>CWC27; DHX38; PRPF3; PRPF31; PRPF4; PRPF6; PRPF8; RP9; SNRNP200</i>
Division cellulaire	<i>KIZ</i>
Adhésion cellulaire	<i>ARHGEF18; CRB1</i>
Inconnue	<i>ADGRA3; EMCI; KIAA1549; PRCD</i>

Tableau 1 : Gènes impliqués dans les RP non syndromique et leur(s) fonction(s)

(Adapté de Verbakel *et al.* 2018¹³)

b. Les rétinopathies pigmentaires liées aux mutations de la rhodopsine

Le gène de la rhodopsine, protéine photosensible des bâtonnets, a été le premier gène identifié dans les RP non syndromiques en 1990^{60,61}. Les mutations de la rhodopsine sont une cause importante de RP, avec plus de 200 mutations identifiées à ce jour^{5,62,63}, elles sont impliquées dans 20 à 30% des adRP^{10,59}. Elles sont également impliquées dans des formes autosomiques récessives de RP ou encore dans des formes autosomiques dominantes de CSNB⁵⁹. Deux

mutations faux-sens (E150K et M253I) et deux mutations non-sens (E249ter et W161ter) ont été identifiées dans les formes autosomiques récessives, entraînant une perte de fonction de la rhodopsine⁵⁹.

Il existe différentes classifications des mutations autosomiques dominantes (Tableau 2) selon leur manifestations cliniques (2 classes) et sévérité ou selon leurs caractéristiques biochimiques et cellulaires, classiquement divisée en 2 classes. Récemment, une classification basée sur les conséquences biochimiques et cellulaires des mutations a été décrite par Athanasiou *et al*⁵⁹, les répartissant en 7 classes.

Classification clinique	
Classe A	Apparition précoce, dégénérescence des bâtonnets sévère
Classe B	Apparition plus tardive, phénotype moins sévère avec une progression lente
Classifications biochimiques	
Classe I	Protéine correctement formée et atteignant la surface cellulaire
Classe II	Protéine mal repliée, retenue au niveau du RE
Biochimiques et cellulaires	
Classe 1	Trafic post-Golgi et adressage au segment externe
Classe 2	Mauvais repliement, instabilité et rétention au niveau du réticulum endoplasmique
Classe 3	Défaut du trafic vésiculaire et endocytose
Classe 4	Défaut des modifications post traductionnelles et instabilité
Classe 5	Activation de la transducine
Classe 6	Activation constitutive
Classe 7	Défaut de dimérisation

Tableau 2 : Classifications des mutations autosomiques dominantes de la rhodopsine

(Adapté d'Athanasiou *et al.*⁵⁹)

Les mutations en N-terminal de la rhodopsine (jusqu'au 35^{ème} acide aminé) sont des mutations de classe 2 (Figure 9). Cette région N-terminal intervient dans la stabilisation de la liaison de la rhodopsine au rétinol. Elles sont généralement associées à un phénotype à

apparition tardive et à progression lente, avec une dégénérescence plus rapide dans les zones exposées à la lumière⁵⁹. Parmi ces mutations, la mutation P23H de la rhodopsine, où la proline en position 23 est remplacée par une histidine, est l'une des mutations les plus étudiées. Elle représente environ 10% -12% des adRP aux Etats-Unis⁵⁹. Cette mutation en N-terminal de la protéine est décrite comme induisant un mauvais repliement de celle-ci, entraînant sa rétention dans le réticulum endoplasmique. C'est à ce titre qu'elle nous intéresse particulièrement dans notre travail. Elle entraîne aussi une diminution de sa capacité à lier le 11-*cis*-rétinal (mutation de classes B, II et 2 selon les classifications)^{59,62,64}. C'est également le cas d'autres mutations localisées en N-terminal de la protéine telle que la mutation T4K, T17M ou V20G. Il a été montré que la protéine portant la mutation P23H est toxique pour la cellule⁶⁵⁻⁶⁷. Bien que la majorité des protéines mutées soit dégradée⁵⁹, celles qui échappent au système de dégradation forment des agrégats contenant également la protéine normale de la rhodopsine, ou transloquent vers le segment externe du photorécepteur entraînant des anomalies de structure de celui-ci. Cette propriété de la rhodopsine P23H recouvre celle des mutations de classe 4, entraînant une instabilité de la rhodopsine et un effet toxique pour le segment externe.

Parmi les autres mutations de la rhodopsine, les mutations aux niveaux des domaines transmembranaires (TM) sont majoritairement des mutations de classe 2 (Figure 9). Elles entraînent un mauvais repliement de la protéine, c'est le cas de deux mutations du domaine TM1 (M39R et N55K). D'autres mutations localisées dans le domaine d'attachement du rétinol, notamment les substitutions en position 296, entraînent une association de l'arrestine avec la rhodopsine phosphorylée de manière constitutive (classe 3)⁵⁹.

Les mutations en C-terminal (des acides aminés 321 à 348) de la rhodopsine sont, elles, des mutations de classe 1 (Figure 9), entraînant un défaut du transport au segment externe. Elles causent généralement des phénotypes sévères. Le défaut de transport cause une accumulation de protéine au niveau du segment externe et une expression ectopique de la protéine pouvant entraîner la mort des photorécepteurs.

La mutation en position 135 (R135L) cause une dégénérescence sévère et rapide. La protéine synthétisée est correctement repliée et sortie du réticulum endoplasmique mais entraîne une phosphorylation constitutive de la rhodopsine qui lie l'arrestine (mutation de classe 3) (Figure

9). Ceci entraînant l'accumulation du complexe au niveau du segment interne par des mécanismes d'endocytose⁵⁹.

Certaines de ces mutations peuvent appartenir à différentes classes, les mécanismes impliqués dans la pathologie pouvant être multiples (Figure 9). C'est le cas par exemple de la mutation P23H décrite plus haut appartenant aux classes 2 et 4.

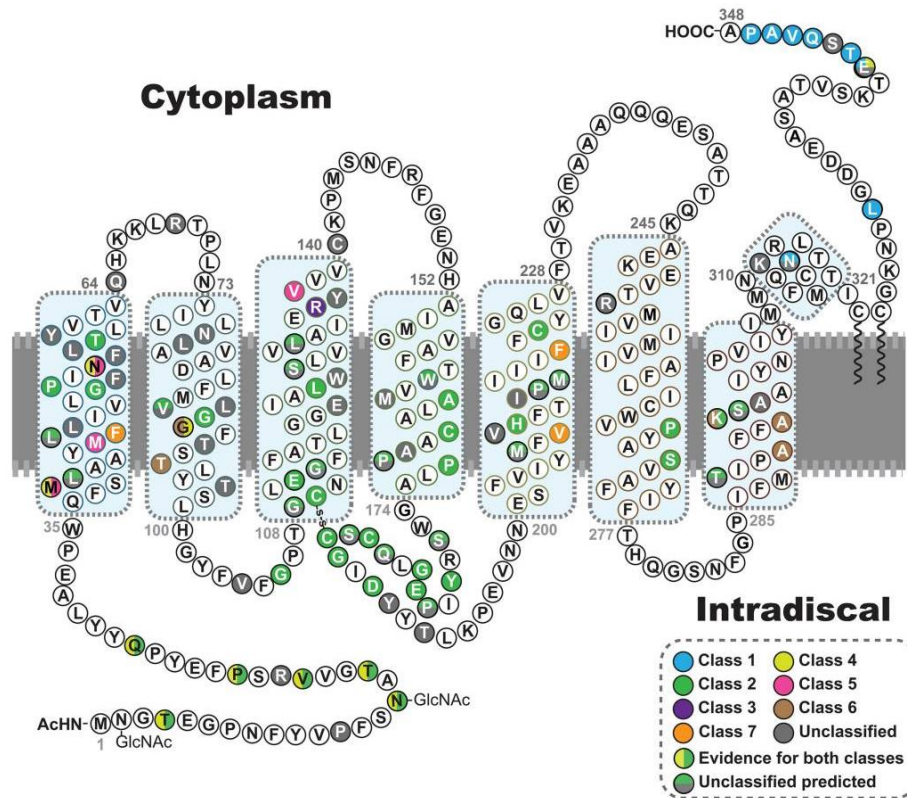


Figure 9 : Représentation schématique de la structure primaire de la Rhodopsine et de la position des mutations identifiées (tirée d'Athanasίου *et al.*⁵⁹)

Cette représentation permet de visualiser les différents domaines de la protéine, qu'ils soient cytoplasmiques, intra discaux ou transmembranaires. Les mutations connues y sont colorées selon leur classification.

Cette représentation reprend la séquence en acides aminés de la rhodopsine, la protéine est insérée dans la membrane d'un disque, faisant apparaître les sept domaines transmembranaires et les boucles dans chacun des compartiments. Les sites des mutations identifiées y figurent, colorés selon leur classification.

2. Un exemple de rétinopathies pigmentaires syndromiques : les ciliopathies

Les RP syndromiques concernent plus de 30 maladies rares et représentent 20 à 30% des RP^{10,13}. Parmi ces formes syndromiques se trouvent les ciliopathies qui font l'objet de cette thèse. Les ciliopathies sont un groupe de maladies rares causées par un défaut du cil primaire. Ce défaut entraîne une dégénérescence rétinienne mais également des défaillances au niveau d'autres organes. Parmi les ciliopathies, nous nous sommes particulièrement intéressés au Syndrome de Bardet-Biedl⁶⁸ et au syndrome d'Alström^{69,70}. Le diagnostic de ces pathologies est rendu difficile par leur hétérogénéité génétique et phénotypique mais également par le chevauchement des différents symptômes observables dans chacun de ses syndromes. En effet les différentes atteintes sont souvent partagées par des différents syndromes. Bien que les ciliopathies soient classiquement des formes syndromiques dans lesquelles divers organes sont atteints, certaines mutations des gènes impliqués peuvent entraîner des formes non syndromiques (ou évoluant en des formes syndromiques). C'est le cas notamment de certaines formes de l'Amaurose Congénitale de Leber (ACL)⁷¹ liées à au gène *CEP290* que nous aborderons également dans cette thèse.

a. Le Syndrome de Bardet-Biedl

Le Syndrome de Bardet-Biedl (BBS) a une prévalence variant selon les populations, il touche par exemple 1/160 000 personnes en Europe du Nord⁷² et augmente dans les populations à forte consanguinité. Les patients présentent différents symptômes parmi lesquels une dégénérescence rétinienne, une obésité, des atteintes rénales, un déficit cognitif, un hypogonadisme et une polydactylie^{72,73}. Il est impliqué dans 5-10 % des cas¹⁰ des RP. A ce jour, plus de 24 gènes (Tableau 3) ont été identifiés comme responsables de cette pathologie⁵¹⁻⁵³. Ils codent des protéines impliquées dans la formation du cil ou dans sa fonction notamment le transport ciliaire. Parmi elles, huit protéines (BBS1, BBS2, BBS4, BBS5, BBS7, BBS8, BBS9 et BBS18)^{74,75} sont impliquées dans la formation du BBSome, complexe protéique impliqué dans la sélection des cargos protéiques, leur passage à travers la barrière formé par la zone de transition et leur transport ciliaire. D'autres agissent comme protéines chaperonnes facilitant sa formation de ce complexe (BBS6, BBS10 et BBS12). D'autres encore sont impliquées dans le trafic ciliaire, telles IFT27 (BBS19) ou IFT172 (BBS20).

Implication	Gènes
BBsome	<i>BBS1</i> ; <i>BBS2</i> ; <i>BBS4</i> ; <i>BBS5</i> ; <i>BBS7</i> ; <i>BBS9</i> ; <i>BBS8 (TTC8)</i> ; <i>BBS18 (BBIP10)</i>
Chaperonnes	<i>BBS6 (MKKS)</i> ; <i>BBS10</i> ; <i>BBS12</i>
Autres	<i>ARL6 (BBS3)</i> ; <i>TRIM32 (BBS11)</i> ; <i>MKS1 (BBS13)</i> ; <i>CEP290 (BBS14)</i> ; <i>WDCPC (BBS15)</i> ; <i>SDCCAG8 (BBS16)</i> ; <i>LZTFL1 (BBS17)</i> ; <i>IFT27 (BBS19)</i> ; <i>IFT172 (BBS20)</i> ; <i>C8ORF37 (BBS21)</i> ; <i>CEP19 (BBS22)</i> ; <i>SCAPER</i>

Tableau 3 : Gènes identifiés dans le syndrome de Bardet-Biedl

b. Le syndrome d'Alström

Le syndrome d'Alström, comme le BBS, est considéré comme une ciliopathie avec une prévalence estimée de 1-9/1 million⁷⁶. Un seul gène est identifié, il code pour une protéine centrosomale, *ALMS1*, mais dont la fonction n'est pour l'heure pas clairement identifiée⁷⁷. Il se caractérise également par l'atteinte de plusieurs organes parmi lesquels : RP précoce, obésité, diabète précoce, surdité, cardiomyopathie. Son diagnostic peut parfois être rendu difficile du fait de son phénotype pouvant être chevauchant avec celui du BBS (et celui d'autres ciliopathies).

c. L'Amaurose Congénitale de Leber

L'ACL est une forme sévère de dystrophie rétinienne touchant 1 personne sur 50 000⁵⁰ avec 25 gènes identifiés (Tableau 4) à ce jour^{78,79}. Elle se caractérise par une apparition au cours des premiers mois de vie, un nystagmus et une absence de réponse à l'ERG précoce⁸⁰. De nombreux mécanismes physiopathogéniques sont décrits. Parmi les différentes formes d'ACL, certaines ont une origine ciliaire c'est le cas notamment des mutations du gène *CEP290*. Parmi ces mutations, la mutation la plus fréquemment retrouvée est la mutation NM_025114.3(CEP290):c.2991+1655A>G, elle est impliquée dans 15-20% des cas d'ACL⁸¹, elle est associée à une RP isolée. D'autres mutations dans ce gène peuvent également être

associées à d'autres manifestations du spectre ciliaire et notamment la forme la plus sévère le syndrome de Meckel-Gruber (MKS)⁸².

Implications	Gènes
Développement rétinien	<i>CRX ; GDF6</i>
Segment externe/disque morphogénèse	<i>PRPH2</i>
Cil : structure et fonction	<i>CEP290 ; IFT140 ; SPATA7 ; TULP1 ; RPGRIP1 ; LCA5 ; CLUAP1 ; IQCB1</i>
Cycle visuel	<i>RPE65 ; LRAT ; RDH12</i>
Phototransduction	<i>GUCY2D ; AIPL1 ; KCNJ13 ; CABP4</i>
Homéostasie rétinienne	<i>RD3</i>
Synthèse de nucléotides	<i>IMPDH1 ; NMNAT1</i>
Division cellulaire	<i>OTX2</i>
Adhésion cellulaire	<i>CRB1</i>
Autres	<i>DTHD1 ; CCT2</i>

Tableau 4 : Gènes identifiés dans l'Amaurose Congénitale de Leber

C. Mécanismes physiopathogéniques conduisant à la mort des photorécepteurs

En fonction du gène et de la mutation impliqués dans la dégénérescence rétinienne, plusieurs mécanismes physiopathogéniques conduisant à la mort cellulaire sont décrits. Au cours de ce travail de thèse nous nous sommes intéressés aux mécanismes de réponses au stress du réticulum endoplasmique connus sous le terme « *Unfolded Protein Response* » (UPR) regroupant différentes voies décrites ci-après.

1. L'Unfolded Protein Response (UPR)

L'*Unfolded Protein Response* (UPR) est un mécanisme biologique commun à différentes formes de RP à l'origine de la dégénérescence cellulaire. En effet l'UPR est activé dans les

cas des mutations de classe 2 de la rhodopsine notamment (dont la mutation P23H⁸³⁻⁸⁵) ou encore pour certaines ciliopathies (telles que le BBS ou l'ACL^{1,86}).

Pour la mutation P23H de la rhodopsine, la mutation entraîne un mauvais repliement de la protéine causant son accumulation au niveau du réticulum endoplasmique dans le segment interne du photorécepteur conduisant à l'activation de l'UPR.

Dans le cas des ciliopathies, le défaut ciliaire entraîne un défaut du transport intraciliaire au niveau des photorécepteurs. En effet, le cil joue un rôle majeur dans le transport protéique des protéines importantes pour la transduction visuelle du segment interne vers le segment externe. Les protéines ne pouvant être transportées vers le segment externe, elles s'accumulent au niveau du segment interne des photorécepteurs notamment au niveau du réticulum endoplasmique^{1,87}. Ce blocage avec accumulation protéique aboutit à l'activation de l'UPR.

D'une manière générale dans la situation d'un stress cellulaire prolongé, l'activation de l'UPR perdure entraînant l'activation de mécanismes apoptotiques et la mort des photorécepteurs causant la dégénérescence rétinienne.

L'UPR est un mécanisme de réponse au stress cellulaire activé lors de surcharge protéique dans le réticulum endoplasmique afin de rétablir l'homéostasie protéique dans la cellule.^{5,12} Son activation est sous contrôle de la protéine GRP78 (*Glucose-Regulated Protein 78kDa*) /BiP (*Binding Immunoglobulin Protein*) /HSPA5 (*Heat Shock Protein Family A member 5*), protéine chaperonne du RE. En absence de stress, elle lie trois protéines transmembranaires du réticulum endoplasmique, les maintenant à un état inactif :

- IRE1 (*serine/threonine-protein kinase/endoribonuclease inositol-requiring enzyme 1*)/ERN1 (*Endoplasmic Reticulum to Nucleus signaling 1*),
- PERK (*protein kinase R (PKR)-like endoplasmic reticulum kinase*)/ EIF2AK3 (*Eukaryotic Translation Initiation Factor 2 Alpha Kinase 3*)
- et ATF6 (*Activating Transcription Factor 6*) (Figure 10).

Dans le cas d'une accumulation de protéines dans le réticulum endoplasmique, BiP, se lie à ces protéines et libère ainsi ces trois protéines transmembranaires. Elles peuvent ainsi activer les trois cascades de signalisation de l'UPR^{5,59} (Figure 10).

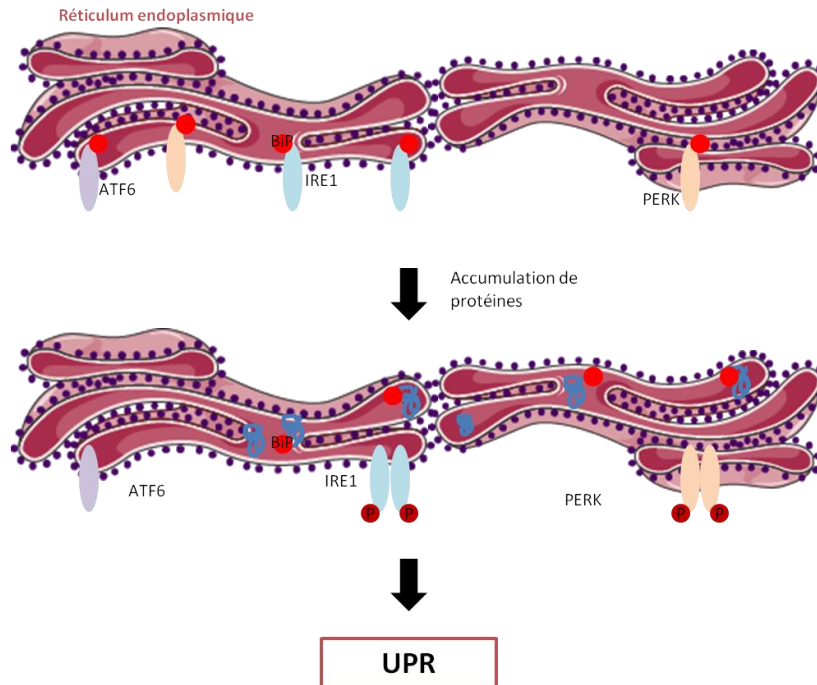


Figure 10 : Schéma d'activation des protéines initiateuses de l'UPR

En absence de stress, la protéine BiP (en rouge) lie ATF6, IRE1 et PERK, trois protéines impliquées dans l'initiation de l'UPR, maintenant celles-ci à l'état inactif. En présence d'une surcharge protéique dans le réticulum endoplasmique, BiP lie ses protéines, libérant ATF6, IRE1 et PERK. Ces protéines ainsi libérées deviennent activées.

a. Les trois branches de l'UPR

Une fois activée, chacune de ces trois protéines va activer une cascade de signalisation qui lui est propre. Elles agiront ainsi de concert afin de réduire le stress du réticulum endoplasmique en régulant différents processus cellulaires. Ces trois voies sont détaillées ci-dessous.

La voie IRE1

C'est la voie la plus conservée au cours de l'évolution. Elle est impliquée dans le repliement, la sortie du réticulum endoplasmique et la dégradation des protéines. Le domaine C-terminal

cytosolique de la protéine IRE1 possède deux fonctions qui sont activées lors de l'UPR, une fonction kinase et une fonction endoribonucléase. Une fois libérée de BiP, IRE1 s'oligomérisse et se trans-autophosphoryle. Une fois activé, IRE1 clive un intron spécifique de l'ARNm de XBP1 (*X-box binding protein 1*). Cette forme stable de XBP1 (XBP1s) est traduite et transloquée au noyau. La protéine induit ensuite l'expression de protéines chaperonnes (par exemple BiP), de protéines impliquées dans le contrôle qualité des protéines (*Endoplasmic Reticulum Quality Control*, ERQC), dans la dégradation associée au réticulum endoplasmique (*Endoplasmic Reticulum Associated Degradation*, ERAD) (Figure 11) mais également dans la synthèse de lipides, le métabolisme oxydatif, l'autophagie et le trafic vésiculaire.⁸⁸

La régulation de cette voie est contrôlée par l'interaction, au niveau du domaine cytoplasmique d'IRE1, de plusieurs protéines, complexe appelé « UPRosome ». Parmi ces protéines, BAX (*BCL2 associated X*) et BAK (*BCL2 Antagonist Killer 1*), deux protéines appartenant à la famille des protéines BCL-2 qui exercent une action anti-apoptotique lorsqu'elles lient IRE1. L'inactivation de la voie est notamment sous contrôle de BI-1 (*BAX Inhibitor 1*) empêchant la liaison de BAX et BAK à IRE1. Lors de son inactivation IRE1 est déphosphorylé par PP2 (*Protein Phosphatase 2*), l'oligomère est dissocié avant ubiquitination et dégradation par le protéasome^{88,89}.

La voie ATF6

Elle est impliquée dans la synthèse de chaperones du réticulum endoplasmique. Après dissociation de BiP, ATF6 transloque du réticulum endoplasmique via le transport vésiculaire vers l'appareil de Golgi où il est clivé par des protéases intramembranaires de l'appareil de Golgi, S1P et S2P (*site-1 proteases* et *site-2 proteases*). Le fragment cytoplasmique (fragment N-terminal) ATF6f produit transloque dans le noyau où il induit l'expression de protéines tel que des chaperones du réticulum endoplasmique (Figure 11) mais également CHOP et XBP1. ATF6 joue également un rôle dans l'augmentation de la taille du réticulum endoplasmique en adaptation au stress chronique⁸⁸. Son action est efficace mais transitoire, l'augmentation de son activité entraînant sa propre dégradation⁸⁸.

La voie PERK

La voie PERK est principalement impliquée dans la régulation de la synthèse protéique. PERK est l'une des quatre kinases pouvant phosphoryler eIF2 α (*eukaryotic Initiation Factor 2 sous unité α*) / eIF2S1 (*eukaryotic Initiation Factor 2 sous unité 1*) avec :

- HRI (*Heme Regulated Initiation factor 2 alpha kinase*) / EIF2AK1 (*Eukaryotic Translation Initiation Factor 2 Alpha Kinase 1*),

-GCN2 (*General Control Nonderepressible 2*) / EIF2AK4 (*Eukaryotic Translation Initiation Factor 2 Alpha Kinase 4*)

- et PKR (*Protein Kinase R*) / EIF2AK2 (*Eukaryotic Translation Initiation Factor 2 Alpha Kinase 2*).

Une fois activée par la dissociation de BiP, PERK s'oligomérisse et s'autophosphoryle. Il phosphoryle ensuite eIF2 α , facteur d'initiation de la traduction, sur la sérine 51 (Figure 11), inhibant ainsi la traduction CAP-dépendante mode de synthèse protéique dont dépend la majorité des protéines.

Ce mode de traduction nécessite une modification de l'extrémité 5' de l'ARNm, appelée coiffe. Il s'agit d'une guanosine méthylée en position 7 qui est liée au premier nucléotide par une liaison triphosphate, la coiffe est ainsi notée 7mGpppN. Elle est nécessaire à la reconnaissance d'eIF4E, un facteur d'initiation de la traduction. Ce dernier permet notamment la reconnaissance d'autres facteurs d'initiation de la traduction parmi lesquels eIF2 incorporé au complexe de pré-initiation (formé notamment de la sous-unité 40S du ribosome et eIF2-GTP-ARNt-Met) permettant l'initiation de la traduction⁹⁰. Le relargage de l'ARNt se fait par l'hydrolyse du GTP en GDP. Le facteur eIF2 β permet ensuite l'échange du GDP par un GTP assurant le recyclage d'eIF2 α .

PERK phosphoryle eIF2 α (P-eIF2 α), qui lie ainsi eIF2 β , responsable de l'échange du GDP en GTP sur eIF2 α , empêchant ainsi la formation du complexe d'initiation de la traduction et inhibant la synthèse protéique CAP-dépendante.

En revanche, la phosphorylation d'eIF2 α permet la traduction de protéines non traduites en absence de stress. L'un des mécanismes impliqués est la présence de plusieurs uORF(s) dans l'extrémité 5'-UTR (*Untranslated region*) de leur ARNm. Parmi ces protéines se trouve ATF4 (*Activating Transcription Factor 4*)⁸⁸ ayant plusieurs uORFs⁹¹. En absence de stress, le complexe de pré-initiation reconnaît la première uORF de l'ARNm d'ATF4, puis la deuxième. La séquence de cette dernière chevauchant la séquence codante de la protéine, la fixation du complexe sur cette deuxième uORF diminue la production d'ATF4⁹¹. En cas de stress et de phosphorylation d'eIF2 α , la quantité de eIF2-GTP est limitée, la réinitiation de la traduction après la première uORF est donc plus lente. Ainsi les ribosomes initient la traduction de la première uORF mais ne pourront pas la réinitier sur la deuxième. Ils lisent donc à travers celle-ci et réinitient la traduction plus tard au niveau de l'uORF de la séquence codante, augmentant la quantité d'ATF4⁹¹.

ATF4 induit ensuite la transcription sélective de gènes codant pour des protéines impliquées dans l'UPR tel que DDIT3 (*DNA Damage Inductible Transcript 3*) /CHOP10 (*C/EBP homologous protein 10*) /GADD153 (*Growth Arrest and DNA Damage-Inductible protein 153*)⁸⁸. Parmi les cibles de CHOP10, PPP1R15A (*Protein Phosphatase 1 Regulatory subunit 15 A*) /GADD34 (*Growth Arrest And DNA-Damage-Inducible 34*) est une sous-unité régulatrice de PP1c (*Protein Phosphatase 1 catalytic subunit*). Elle permet un rétrocontrôle négatif de la voie. Pour cela, PPP1R15A se lie à PP1c, ce complexe phosphatase déphosphoryle P-eIF2 α et permet ainsi la levée de l'inhibition de la traduction initiée par PERK (Figure 11).

L'inactivation de la voie se fait par déphosphorylation de PERK et eIF2 α . DNAJC3 (*DnaJ Heat Shock Protein Family (Hsp40) Member C3*)/P58IPK (*Protein Kinase Inhibitor P58*) lie le domaine kinase de PERK et empêche ainsi la phosphorylation de eIF2 α mais également sa trans-autophosphorylation⁸⁸.

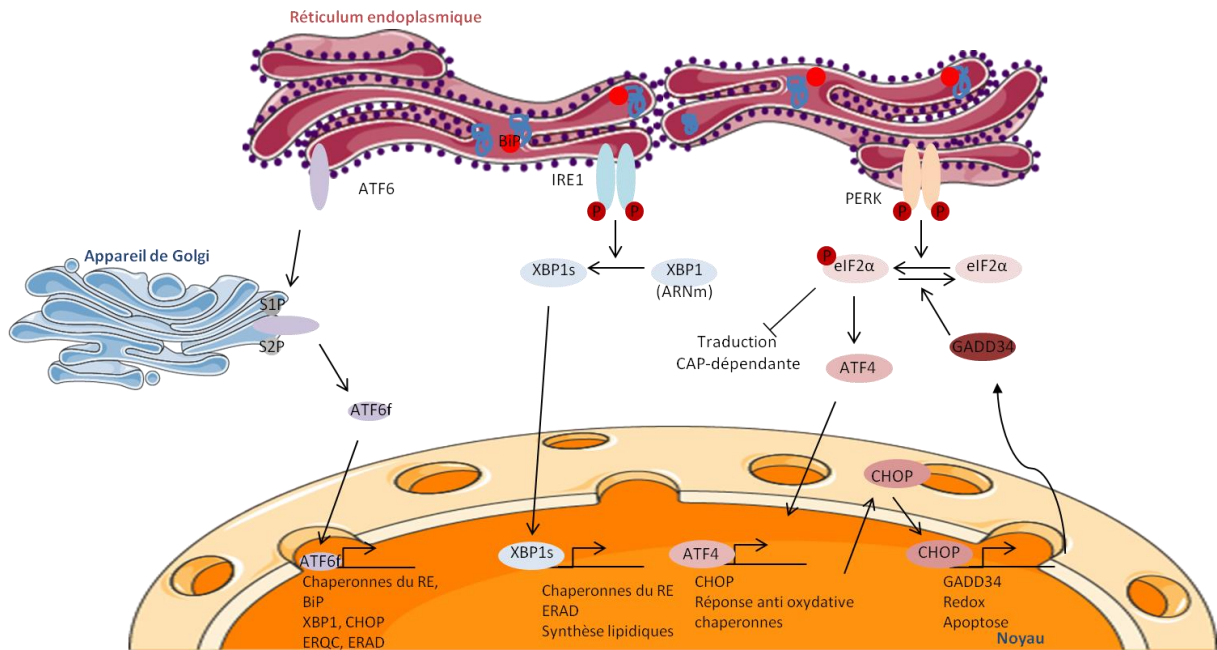


Figure 11 : Représentation des différentes branches de l' *Unfolded Protein Response*

ATF6, IRE1 et PERK activent chacune une cascade de signalisation qui lui est propre. Ces voies agissent au niveau nucléaire pour favoriser l'expression de gènes cible du stress du réticulum endoplasmique. PERK a également une action de régulation de la traduction.

Les trois voies sont activées et désactivées selon des cinétiques différentes. Dans un premier temps, la réponse vise à réduire la charge protéique du réticulum endoplasmique en diminuant la production de protéine par dégradation de l'ARNm (mécanisme associé à IRE1 α) et inhibition de la traduction (mécanisme associé à PERK). Dans un second temps, ce sont des mécanismes de repliement, de contrôles et de dégradation des protéines qui seront activés. Cette phase est médiée par XBP1s, ATF6f et ATF4⁸⁹. Si malgré l'activation des différents mécanismes de régulation, le stress se prolonge, la voie IRE1 s'arrête en premier puis la voie ATF6. Seule la voie PERK semble se maintenir^{89,92,93}, entraînant l'augmentation progressive de CHOP qui à son tour entraîne l'activation de mécanisme pro-apoptotiques. *In fine* ces mécanismes entraînent la mort des photorécepteurs et donc la dégénérescence rétinienne.

b. Les complexes phosphatases d'eIF2 α

Ces complexes déphosphorylant eIF2 α sont fonctionnels sous forme d'un dimère protéique constitué d'une sous unité régulatrice et d'une sous unité catalytique PP1c, portant l'activité enzymatique. Il existe deux complexes phosphatase permettant de déphosphoryler eIF2 α . Ils diffèrent par leur sous unité régulatrice : CReP/PPP1R15B qui est exprimée de manière constitutive et GADD34/PPP1R15A qui est exprimée en cas de stress cellulaire^{94,95}. Ce dernier faisant l'objet de ce travail, nous nous attarderons sur celui-ci. L'analyse de la structure des différentes sous unités régulatrices a montré qu'elles ont en commun leur domaine C-terminal, qui permet leur liaison à la sous unité catalytique PP1c^{95,96}. En plus de ce complexe binaire, il a été décrit l'action de l'actine G comme troisième partenaire de ce complexe, augmentant la spécificité de l'enzyme^{97,98}.

PPP1R15A est une protéine de 674 acides aminés dont la synthèse est elle aussi sous contrôle de l'expression différentielle d'uORFs, sa synthèse est ainsi augmentée en condition de stress⁹⁹. Différents domaines ont été identifiés, le domaine d'interaction avec PP1c se localise en C-terminal (acides aminés 552-591)^{96,100}. L'extrémité N-terminal sert, elle, à l'adressage au réticulum endoplasmique⁹⁶. Entre les deux, une séquence composée de quatre éléments répétés (d'environ 50 acides aminés) permet la liaison à eIF2 α ^{96,100}.

L'une des fonctions connues de PPP1R15A est son rôle dans l'UPR, constituant un mécanisme de rétrocontrôle négatif de la voie PERK. C'est l'une des protéines induites par ATF4 lors de l'activation de la voie PERK. L'association de PPP1R15A à PP1c permet la déphosphorylation d'eIF2 α et permettant la levée de l'inhibition de la traduction CAP-dépendante. La régulation de cette voie paraît donc être un moyen pour de moduler le niveau de traduction CAP-dépendante et ainsi de moduler le stress.

Les fonctions de PPP1R15A ne se limitent pas à la déphosphorylation d'eIF2 α dans le rétrocontrôle négatif de la voie PERK. A côté de cette fonction, PPP1R15A est également connu pour avoir des fonctions non liées à l'UPR. Il a un rôle dans l'inflammation permettant la production d'interféron de type I et de cytokines pro-inflammatoires¹⁰¹ participant ainsi à la réponse anti-microbienne. Il a également un rôle pro apoptotique par inhibition de la voie AKT/mTOR¹⁰²⁻¹⁰⁴, et joue également un rôle dans la régulation positive de l'autophagie, en modulant cette même voie de signalisation¹⁰³ ou l'osmorégulation¹⁰⁵.

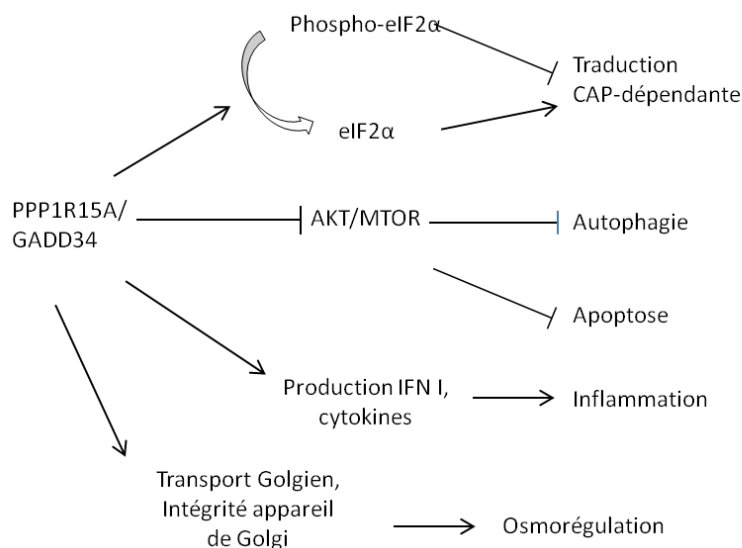


Figure 12 : Fonctions de PPP1R15A/GADD34

PPP1R15A est capable d’agir sur différentes voies de signalisation afin de moduler différents mécanismes cellulaires. Ici sont représentées son action sur la traduction CAP dépendante, l’autophagie, l’apoptose mais également des actions sur l’inflammation ou l’osmorégulation.

2. Apoptose liée à l’UPR

L’apoptose est un mécanisme de mort cellulaire programmée. Elle fait appel à des protéines appelées caspases permettant de cliver, de manière spécifique, différentes protéines. Elle est classiquement divisée en deux voies : la voie extrinsèque (activée par des signaux externes) et la voie intrinsèque (activée par des signaux internes)^{106,107}. La première fait appel à des récepteurs apoptotiques localisés au niveau de la membrane plasmique. Lorsqu’ils sont activés, ils recrutent des protéines adaptatrices et activent les caspases-8 et -10, qui elles-mêmes activent la caspase-3 (Figure 13). La voie intrinsèque (mitochondriale) lorsqu’elle est activée entraîne le relargage de cytochrome-c de la mitochondrie. Il se lie dans le cytoplasme à Apaf-1 et la pro-caspase-9, formant l’apoptosome, activant la caspase-9 qui à son tour active la caspase-3^{106,107} (Figure 13).

Dans le cas de l’UPR, une autre voie apoptotique spécifique est activée, elle met en jeu l’activation de la caspase-12 chez la souris (caspase-4 chez l’Homme), caspase associée au réticulum endoplasmique permettant l’activation de la caspase-3 mais également de la

caspase-9^{106,107}. Néanmoins le rôle de la caspase-12 dans l'apoptose est controversé, elle serait majoritairement impliquée dans des processus inflammatoires¹⁰⁷.

A côté de ces voies liées aux caspases, d'autres mécanismes apoptotiques associés à l'UPR sont activés. Ceux-ci sont liés aux voies IRE1 et PERK.

En cas de stress prolongé, IRE1 recrute TRAF2 (*TNF Receptor Associated Factor 2*) permettant l'activation de MAPK8 (*Mitogen-Activated Protein Kinase 8*) /JNK (*C-Jun N-Terminal Kinase*) activant différentes protéines pro-apoptotiques de la famille des protéines BCL-2 (BAX et BAK) mais également la caspase-12^{92,107-109}. IRE1 est également responsable de la dégradation de l'ARN par le RIDD (*regulated IRE1 dependant RNA decay*) pouvant affecter divers processus cellulaires¹⁰⁹ (Figure 10).

La voie PERK entraîne, elle, l'augmentation de CHOP10 et PPP1R15A. CHOP10 induit notamment l'expression de récepteurs de mort (DR5, *Death Receptor 5*), mais également des protéines pro-apoptotiques de la famille des protéines BCL-2 (BAX, BIM (*BCL2 Intecarcting Mediator of celle death*) /BCL2L11 (*BCL2 Like 11*), PUMA (*P53 Up-Regulated Modulator of Apoptosis*) /BBC3 (*BCL2 Binding Component 3*) et inhibe l'expression de BCL-2 (protéine anti-apoptotique)^{106,108,110}(Figure 10). Elle peut également avoir un rôle dans la régulation de l'autophagie.⁸⁸

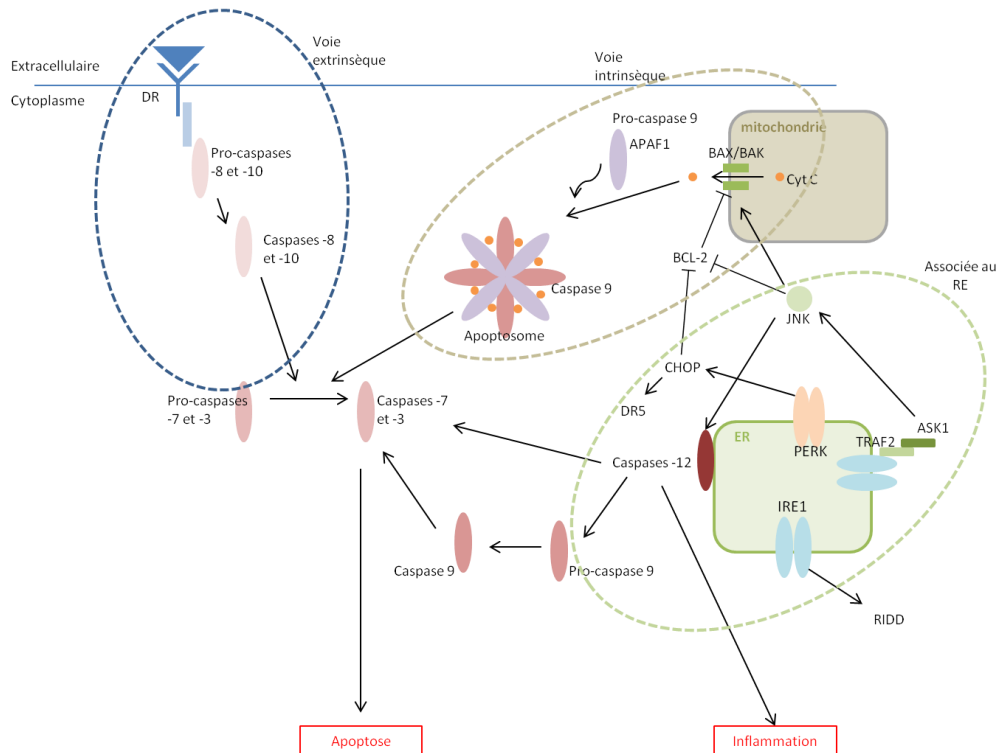


Figure 13 : Représentation schématique des mécanismes apoptotiques

Les différentes voies apoptotiques sont représentées sur ce schéma. La voie extrinsèque fait intervenir des récepteurs de mort (DR) détectant les signaux extracellulaires. A l'opposé la voie intrinsèque détecte des signaux intracellulaires, initiée par des protéines mitochondriales. La voie associée au réticulum endoplasmique fait intervenir la caspase-12 activée en cas de stress de celui-ci. Des protéines associées au réticulum endoplasmique peuvent agir comme mécanismes de régulation de la voie intrinsèque.

3. Effet de la lumière sur le déroulement de la dégénérescence des photorécepteurs

Un autre mécanisme intervenant dans la dégénérescence rétinienne, associée à la mutation P23H notamment, a été décrit, il s'agit de la phototoxicité. Différentes études ont rapporté que la lumière exacerbe le phénotype de diverses dégénérescences rétiniennes et que limiter l'exposition lumineuse permettrait de réduire partiellement celle-ci¹¹¹⁻¹¹⁴. L'implication du 11-*cis*-rétinal dans ce mécanisme a été montrée. Ce dernier agit comme une chaperonne en stabilisant la rhodopsine mutante et facilite sa sortie du réticulum endoplasmique et son transport^{111,113,114}. Néanmoins la rhodopsine P23H possède une affinité diminuée pour le 11-*cis*-rétinal, qui se détache donc rapidement¹¹¹. A l'obscurité, quand la quantité en 11-*cis*-rétinal augmente, une plus grande quantité de rhodopsine mutante est alors stabilisée et

transportée au niveau du segment externe^{113,114}. A l'inverse, à la lumière le 11-*cis*-rétinal est convertit en all-*trans*-rétinal, déstabilisant la rhodopsine et diminuant la quantité de 11-*cis*-rétinal disponible. Ceci a pour conséquence de diminuer la quantité de rhodopsine sortant du réticulum endoplasmique et transportée au niveau du segment externe.^{113,114} Ces mécanismes ont été associés à un ralentissement de la dégénérescence rétinienne à l'obscurité. De même, il a été montré qu'un apport en 11-*cis*-rétinal augmentait la survie cellulaire, là où une déplétion augmente la dégénérescence rétinienne¹¹².

Il a été montré que la toxicité observée en présence de lumière est indépendante de la cascade de phototransduction initiée par la protéine mutée⁶⁶ mais liée à son instabilité.

4. Autres voies de mort cellulaire en plus des mécanismes apoptotiques classiques

Pendant longtemps, l'apoptose a été décrite comme la principale cause de mort cellulaire associée à la dégénérescence rétinienne. A l'heure actuelle, différentes études montrent l'implication de mécanismes de mort cellulaire indépendants des voies apoptotiques décrits ci-dessus dans divers modèles de dégénérescence rétinienne. Ceux-ci peuvent être activés en parallèle des mécanismes apoptotiques décrits précédemment.

Un des mécanismes impliqués est lié à la toxicité du rétinol. C'est le cas notamment des pathologies associées à un défaut dans le cycle du rétinol, ne permettant pas un recyclage correct du all-*trans*-rétinal causant alors son accumulation. Ce sont des pathologies qui sont généralement exacerbées par la lumière. En effet en présence de lumière, le 11-*cis*-rétinal est convertit en all-*trans*-rétinal qui s'accumule alors dans les cellules de la RPE. Le rétinol et la lipofuscine qui en dérive¹¹⁵ seront source de stress oxydatif. En effet, le rétinol induit la production de dérivés actifs de l'oxygène (ROS, *Reactive Oxygen Species*) via la NADPH oxydase¹¹⁶. Lorsqu'il n'est pas correctement recyclé, il entraîne une augmentation de ces ROS causant un stress oxydatif. Ils causent divers dommages qu'ils soient protéiques, membranaires mais également de l'ADN conduisant à la mort cellulaire. Les voies apoptotiques associées au réticulum endoplasmique et aux mitochondries sont également activés suite au stress généré¹¹⁷.

Parmi les mécanismes mis en évidence dans les dégénérescences rétiniennes, la régulation du calcium intracellulaire semble critique. La concentration en calcium peut être altérée par

différents facteurs, comme par le stress du réticulum, le stress oxydatif (notamment associé au *all-trans*-rétinal¹¹⁸) mais également par une augmentation en cGMP. Le réticulum endoplasmique étant le principal lieu de stockage dans la cellule, un stress de celui-ci entraîne le relargage du calcium dans le cytoplasme et une dérégulation de l'homéostasie calcique de la cellule. Il a également été montré qu'une augmentation du niveau en cGMP entraînera l'activation des canaux CNG et l'augmentation de l'influx calcique dans la cellule¹¹⁹. L'augmentation intracellulaire en calcium active des voies apoptotiques (voie intrinsèque et extrinsèque) mais également la caspase-12 via l'activation de calpaïnes^{41,106,107} (protéases dépendantes du calcium). Les calpaïnes clivent AIF (*Apoptosis Inducing Factor*) activant des processus de mort cellulaires indépendants des caspases⁴¹. L'augmentation du calcium intracellulaire peut également entraîner l'activation de processus d'autophagie via l'inhibition de la voie insuline/mTOR¹⁰⁸.

L'augmentation en cGMP active une autre voie de signalisation qui est, elle, indépendante du calcium. Elle entraîne l'activation de PKG (*Protein Kinase G*), qui augmentent l'activité des HDAC (*Histone Deacetylase*) et PARP (*Poly (ADP-Ribose) Polymerase*) causant la mort cellulaire¹¹⁹.

5. La mort secondaire des cônes

Les mécanismes impliqués dans la mort secondaire des cônes (pour les « *rod-cone dystrophies* ») ne sont pas encore tous élucidés. Plusieurs hypothèses ont été émises, n'étant pas exclusives les unes des autres. Toutes ces hypothèses décrivent la mort des cônes comme une conséquence de la perte primaire des bâtonnets^{59,120,121}. Parmi les hypothèses avancées, la perte de bâtonnets entraînerait :

- une perte de support pour les cônes,
- la libération de facteurs toxiques,
- la perte de facteurs trophiques (pro-survie) tel que le RdCVF (*Rod-derived Cone Viability Factor*)^{120,121},
- un stress oxydatif. La mort des bâtonnets entraîne une diminution de la consommation en oxygène, sa concentration augmentant localement^{120,121}.

Des dérégulations du métabolisme du glucose ainsi que de l'autophagie ont également été observées^{59,122}. De plus, un mécanisme de mort par nécrose contrôlée (nécroptosis) a

également été mis en évidence, contrôlée par l'augmentation de RIPs (*Receptor Interacting Protein*)^{59,123}.

III. Les modèles murins dans les dégénérescences rétiniennes

L'utilisation de modèles animaux est une étape indispensable pour la compréhension physiopathogénique des mécanismes conduisant à la dégénérescence des cellules rétiniennes et aux développements de stratégies thérapeutiques qui doivent conduire à terme aux essais cliniques. Notre travail a ainsi comporté l'utilisation de divers modèles murins.

Parmi les modèles disponibles, la souris est l'un des modèles les plus utilisés, sa génétique étant connue et proche de celle de l'espèce humaine. De nombreux modèles mutants sont disponibles pour étudier les pathologies humaines. Bien que la souris soit un modèle couramment utilisé dans l'étude des dégénérescences rétiniennes, il existe des différences anatomiques et fonctionnelles au niveau de la rétine entre la souris et l'Homme. La souris une population de bâtonnets plus importante que la rétine humaine et donc moins de cônes (98/2 contre 95/5 chez l'espèce humaine)¹²⁰ et ne possède pas de zone enrichie en cônes telle que la macula chez l'Homme¹²⁰. De même une différence importante entre la rétine humaine et celle de souris, est la composition en cônes, la souris ne possédant que 2 types de cônes (cônes S et M) et ne possédant pas les cônes L. Ces différences sont à prendre en compte, en particulier lors de l'étude de pathologies associée aux cônes ou à la macula. Néanmoins ces modèles murins restent pertinents, les mécanismes cellulaires impliqués étant similaires et les modèles mutants reproduisant la pathologie humaine. C'est le cas notamment des pathologies associées aux bâtonnets.

A. Les modèles murins de ciliopathies

Ils existent de nombreux modèles de ciliopathies à ce jour, que ce soit pour le BBS, l'ACL ou le syndrome d'Alström étudiés dans cette thèse. Ainsi, nous avons choisi plusieurs modèles murins de ciliopathies présentant une dégénérescence rétinienne afin de caractériser les mécanismes responsables.

1. Les modèles du syndrome de Bardet-Biedl

De nombreux modèles du BBS sont disponibles à ce jour. Plusieurs modèles développés présentent, des atteintes au niveau de plusieurs organes, en particulier une obésité, une infertilité, des anomalies rénales et une atteinte rétinienne (Tableau 5). Ils reproduisent ainsi les principales atteintes présentes dans le BBS. D'autres atteintes ont été mises en évidence dans certains de ces modèles : hyperphagie, hyperinsulinémie, troubles rénaux ou hépatiques, troubles de l'olfaction ou du comportement social. La progression de la dégénérescence rétinienne est variable selon les modèles, les modèles mutants *Bbs1*, *Bbs12* présentent une dégénérescence précoce et rapide alors que le modèle mutant *Bbs5* une dégénérescence plus tardive.

Gène	Modèles	Principales atteintes	
Syndrome de Bardet-Biedl			
BBSome	<i>Bbs1</i>	<i>Bbs1</i> ^{M390R/M390R} 124 <i>Bbs1</i> ^{GTINK} 125	RD, obésité, mâle infertilité RD, obésité olfaction
	<i>Bbs2</i>	<i>Bbs2</i> ^{-/-87}	RD, obésité, mâle infertilité, anomalies rénales, olfaction
	<i>Bbs4</i>	<i>Bbs4</i> ^{-/-87,126,127} <i>Bbs4</i> ^{GTINK} 125	RD, obésité, anomalie hépatique, olfaction, hyperinsulinémie
	<i>Bbs5</i>	<i>Bbs5</i> ^{-/-128,129}	RD, obésité olfaction
	<i>Bbs7</i>	<i>Bbs7</i> ^{-/-130}	RD, obésité
	<i>Bbs8/Tct8</i>	<i>Bbs8</i> ^{-/-128,131} 132	RD, obésité, infertilité
	<i>Bbs18/Bbip10</i>	<i>Bbip10</i> ^{-/-133}	RD, obésité, olfaction RD, obésité, mâle infertilité
chaperonnes	<i>Bbs6/Mkks</i>	<i>Bbs6</i> ^{-/-134} <i>Mkks</i> ^{Gt(0ST367255)} Lex 128,135	RD, obésité, infertilité, olfaction
	<i>Bbs10</i>	<i>Bbs10</i> ^{-/-136}	RD, obésité, anomalies rénales
	<i>Bbs12</i>	<i>Bbs12</i> ¹	RD, obésité
<i>Bbs3/Arl6</i>	<i>Bbs3</i> ^{-/-137} <i>Bbs3L</i> ^{-/-}	RD, mâle infertilité, augmentation de la masse grasse RD	
<i>Bbs11/Trim32</i>	<i>Trim32</i> ^{Gt(BGA355)} Byg 138 <i>Trim32</i> ^{tmlSpc} 139	Trouble musculaire Trouble musculaire	
<i>Bbs13/Mks1</i>	<i>Mks1</i> ^{krc} 140 <i>Mks1</i> ^{del64-323} 141	(Létalité) anomalies squelettiques, hépatiques, rénales, ovariennes (Létalité) anomalies viscérales (notamment œil, foie, rein)	
<i>Bbs14/Cep290</i> *	<i>Cep290</i> ^{Rd16} <i>Cep290</i> ^{-/-142,143} <i>Cep290</i> KI 71,144	RD RD	
<i>Bbs15/Wdpcp</i>	<i>Wdpcp</i> ^{Cys40} 145 <i>Wdpcp</i> KO 145	Létalité embryonnaire RD, anomalies rénales	
<i>Bbs16/Sdccag8</i>	<i>Sdccag8</i> ^{gt/gt} (KO) ¹⁴⁶	RD, obésité, trouble de la fertilité, diabète	
<i>Bbs17/Lztf11</i>	<i>Bbs17</i> ^{-/-147}	RD, obésité, diabète, trouble de la fertilité	
<i>Bbs19/Ift27</i>	<i>Ift27</i> ^{flox/flox} 148 <i>Ift27</i> ^{-/-149}	Mutant conditionnel (Létalité) anomalies viscérales et développementales	
<i>Bbs20/Ift172</i>	<i>Ift172</i> ^{flox/flox} 150	Mutant conditionnel	
<i>Bbs21/C8orf37</i>	<i>C8orf37</i> ^{-/-151}	RD	
<i>Bbs22/Cep19</i>	<i>Cep19</i> ^{-/-152}	Obésité, glucose intolérance	

Tableau 5 : Liste des modèles de souris disponibles pour le syndrome de Bardet-Biedl

* Gène également impliqué dans l'ACL

Modèles utilisés :

Différents modèles ont été utilisés dans ce travail, les souris *Bbs10* **KO**¹³⁶, *Bbs12* **KO**¹ et *Bbs1*^{M390R/M390R} (modèle *Knock-In*, **KI**)¹²⁴. La souris *Bbs1*^{M390R/M390R} est porteuse de la mutation la plus courante chez l'Homme, présente une obésité associée à une hyperphagie et hyperleptinémie, une stérilité et une dégénérescence rétinienne. Les gènes *BBS1* et *BBS10* sont les gènes les plus fréquemment impliqués dans la pathologie humaine¹⁵³. La protéine

BBS1 fait partie du complexe BBSome, impliqué dans le fonctionnement du cil. Les protéines BBS10 et BBS12 agissent comme chaperonnes permettant l'assemblage du BBSome¹⁵⁴. Ces différents modèles présentent tous une RP sévère, se développant dès les premières semaines caractérisées par un ERG plat après quelques mois de vie.

2. Les modèles du syndrome d'Alström

Différents modèles du syndrome d'Alström sont disponibles (Tableau 6). Dans notre étude, le modèle utilisé est un modèle spontané présentant une délétion de 11pb dans l'exon 8 du gène *Alms1*¹⁵⁵. Ce modèle développe une obésité progressive associée à un diabète et hyperinsulinémie. La dégénérescence rétinienne associée à cette mutation se développe tardivement (plusieurs mois après la naissance) à la différence de l'atteinte présente chez l'Homme, chez qui la dégénérescence rétinienne commence dès l'enfance.

Gène	Modèles	Principales atteintes
Syndrome d'Alström		
<i>Alms1</i>	<i>Alms1</i> ^{foz/foz} ¹⁵⁵	RD, obésité, hyperinsulinémie, trouble de la fertilité
	<i>Alms1</i> ^{GT(pGT1Lxf)/Pjn} (KO) ¹⁵⁶	RD, obésité, hyperinsulinémie, hypogonadisme, diabète
	<i>Alms1</i> ^{L231X} ¹⁵⁷	Anomalies de la rétine, fertilité, hépatiques, diabète, obésité

Tableau 6 : Liste des modèles de souris disponibles pour le syndrome d'Alström

3. Les modèles de l'Amaurose congénitale de Leber

L'amaurose congénitale de Leber, contrairement aux pathologies précédentes BBS et ALMS, se présente le plus souvent comme une RP isolée. Différents modèles sont, à ce jour, disponibles (Tableau 7). Parmi les différents gènes associés à l'amaurose congénitale de Leber, le gène *CEP290* est le plus fréquemment retrouvé muté. Il existe différents modèles de souris mutantes pour ce gène, parmi lesquelles la souris *Cep290*^{Rd16}, modèle hypomorphe¹⁵⁸, produisant en faible quantité une forme tronquée de la protéine et la souris *Cep290* KO n'exprimant pas la protéine (suite à une délétion des exons 36 et 37 causant l'apparition d'un codon stop prématuré)¹⁴³. C'est ce dernier modèle qui fut utilisé pour l'étude. Ces modèles développent tous les deux une dégénérescence rétinienne sévère avec une atteinte dès les premières semaines de vie. Un modèle de souris humanisée KI a également été développé,¹⁴⁴ bien que porteur de la mutation humaine, ce modèle ne développe pas d'atteinte

ophtalmologique du au faible taux d'expression du transcrit mutant. Parmi ces modèles, nous avons caractérisé le modèle *Cep290 KO* cité ci-dessus, par analyses histologiques, mesure de la réponse visuelle mais également des mécanismes physiopathogéniques impliqués.

Amaurose congénitale de Leber	
Gènes	Modèles
<i>Lca1/ Gucy2d</i>	<i>Gucy2e</i> ^{-/-} 159 <i>Gucy2f</i> ^{-/-} 160
<i>Lca2/ Rpe65</i>	<i>Rpe65</i> ^{-/-} 161, <i>Rpe65</i> ^{Rd12} 162
<i>Lca3/ Spata7</i>	<i>Spata7</i> ^{-/-} 163
<i>Lca4/ Aipl1</i>	<i>Aipl1</i> ^{-/-} 164
<i>Lca5</i>	<i>Lca5</i> ^{gt/gt} 165
<i>Lca6/ Rpgrip1</i>	<i>Rpgrip1</i> ^{-/-} 166
<i>Lca7/ Crx</i>	<i>Crx</i> ^{-/-} 167
<i>Lca8/ Crb1</i>	<i>Crb1</i> ^{-/-} 168
<i>Lca9/ Nmnat1</i>	<i>Nmnat1</i> ^{-/-} 169
<i>Lca10/ Cep290</i>	Cf Tableau 5
<i>Lca12/ Rd3</i>	<i>Rd3</i> ¹⁷⁰
<i>Lca13/ Rdh12</i>	<i>Rdh12</i> ^{-/-} 170
<i>Lca14/ Lrat</i>	<i>Lrat</i> ^{-/-} 171
<i>Lca15/ Tulp1</i>	<i>Tulp1</i> ^{-/-} 172
<i>Lca16/ Kcnj13</i>	<i>Kcnj13</i> ^{-/-} 173
<i>Otx2</i>	<i>Otx2</i> ^{flox/flo} 174
<i>Cabp4</i>	<i>Cabp4</i> ^{-/-} 175
<i>Cluap1</i>	<i>Cluap1</i> ^{-/-} 176
<i>Iqcb1/ Nphp5</i>	<i>Nphp5</i> ^{-/-} 177
<i>PrPh2</i>	<i>Prph2</i> ^{KΔ/KΔ} 178 <i>Rds</i> ^{-/-} 179

Tableau 7 : Liste des modèles de souris disponibles pour l'Amaurose Congénitale de Leber

B. Les modèles murins mutants P23H de la rhodopsine

Il existe différents modèles murins rats ou souris pour l'étude de la mutation P23H de la rhodopsine.

Pour les modèles de rat, différentes lignées transgéniques ont été générées : P23H-1, P23H-2, P23H-3, elles sont porteuses d'un transgène codant pour la rhodopsine de souris portant la mutation P23H. Ces trois lignées de rats transgéniques ont un nombre de copies de la rhodopsine et un degré de sévérité de la dégénérescence rétinienne variables¹⁸⁰ fonction du nombre de copies du gène. Toutes les lignées présentent une dégénérescence des bâtonnets avec initialement une fonction normale des cônes. La lignée 1 (P23H-1) présente une dégénérescence rapide des bâtonnets, la lignée 2 (P23H-2) une dégénérescence lente et la

lignée 3 (P23H-3) a une progression intermédiaire^{59,181}. Dans ces modèles animaux, il a été montré un stress du réticulum endoplasmique et l'activation de l'UPR dans les photorécepteurs^{93,182,183}.

Chez la souris, des modèles transgéniques exprimant la rhodopsine humaine mutée ont également été développés¹⁸⁴. Un autre modèle transgénique a été développé, le modèle VPP¹⁸⁵, porteur d'un transgène (de deux à cinq copies) de la rhodopsine de souris comportant trois mutations au niveau N-term de la rhodopsine, la mutation P23H mais également les mutations V20G et P27L^{185,186}. Le modèle présente une dégénérescence rétinienne lente associée à la mutation P23H, les deux autres mutations n'étant pas impliquées dans la dégénérescence.¹⁸⁵

A côté des modèles transgéniques décrits ci-dessus, des modèles de souris KI obtenus par recombinaison homologue ont été développés ces dernières années¹¹². La mutation P23H a été introduite dans le génome murin, l'animal possédant ainsi le bon nombre de copie du gène (2 allèles) à la différence des modèles transgéniques chez lesquels un nombre variable et surnuméraire est présent. Ce modèle est donc plus proche des conditions physiologiques et donc plus représentatif de la pathologie humaine où un seul des allèles est muté. L'activation de l'UPR a été montrée dans ce modèle, en particulier la voie IRE1, l'activation de la voie PERK n'a pour l'heure pas été démontrée¹⁸⁷. Un autre modèle de souris KI a été développé à la même période. Comme pour le modèle précédent, un allèle de la rhodopsine est remplacé par un allèle mutant de la rhodopsine humaine mais avec la différence de posséder à son extrémité C-terminal la GFP (*Green Fluorescent Protein*)¹⁸⁸, protéine fluorescente permettant de détecter spécifiquement la rhodopsine mutante.

Il a été montré que la protéine mutante est ubiquitinylée et rapidement dégradée par le protéasome¹⁸⁹ mais également par des processus d'autophagie⁶⁴. Ainsi, 90% de la protéine mutée est dégradée rapidement^{59,187,188}, seuls les 10% restants pouvant alors être transportés. Selon ces études, la protéine mutante peut être correctement transportée vers le segment externe où elle aura un effet délétère sur la structure du segment externe⁵⁹ ce qui avait également été montré sur un modèle de xénope¹⁹⁰. Elle peut aussi être mal localisée au niveau de l'ONL¹⁸⁸. Malgré cette dégradation importante, un stress du réticulum endoplasmique ainsi qu'une activation de l'UPR a été mise en évidence, y compris dans le modèle KI (produisant un niveau normal de rhodopsine). Chez ce dernier néanmoins, il semble que la

voie IRE1 soit préférentiellement activée¹⁸⁷. Il a été montré qu'une haplo insuffisance de la rhodopsine n'entraîne pas de dégénérescence rétinienne. La dégradation de près de la moitié de la rhodopsine synthétisée chez les mutants n'est donc pas associée à la mort des photorécepteurs¹⁹¹. Les effets observés sont probablement liés à un gain de fonction toxique de la protéine au niveau des segments externes et internes. Des études ont également montré une sensibilité à la lumière des mutants avec une possible restauration des segments externes en absence de lumière¹⁹². Ceci a également été observé chez le xénope¹¹³.

IV. Les thérapies développées pour les rétinopathies pigmentaires

A l'heure actuelle, peu de traitements sont disponibles pour les rétinopathies pigmentaires. A noter qu'une première thérapie génique destinée à traiter l'ACL liée à des mutations dans le gène RPE65 a été mise sur le marché : le voretignone neparvovec¹⁹³ (LUXTURNA) (<https://luxturna.com/>). A ce jour, plus de 150 études sont en cours sur les rétinopathies pigmentaires dont une centaine d'essais cliniques (<https://clinicaltrials.gov/>) avec une dizaine d'essais de thérapie génique.

Le développement de traitements dans ces pathologies est rendu difficile par plusieurs facteurs notamment les voies d'accès des médicaments aux cellules spécifiquement atteintes de la rétine mais surtout en raison de l'hétérogénéité génétique et de la diversité des mécanismes impliqués dans la mort cellulaire. Afin d'atteindre le segment postérieur de l'œil, en particulier les cellules photoréceptrices, différents modes d'administration ont été développés.

A. Les modes d'administration

Une difficulté dans le développement de thérapies pour les dégénérescences rétiniennes est l'accès à la rétine, en effet de par sa structure et sa localisation, différentes barrières existent (parmi lesquelles la barrière sang-rétine, la RPE, la cornée, les différences de lipophilicités des tissus et membranes de l'œil) et s'opposent au passage des molécules en fonction des modes d'administration¹⁹⁴. Diverses voies d'administration sont ainsi utilisées afin d'atteindre

le segment postérieur de l'œil directement par exemple l'injection intra vitrénne ou sous rétinienne¹⁹⁴ décrites plus bas (Figure 14).

1. Voies systémiques

Ces modes d'administrations, que ce soit par administration intraveineuse ou par voie orale, sont peu utilisés dans le traitement des maladies ophtalmiques, car présentant plusieurs inconvénients. Le premier étant lié à la distribution de la molécule, en effet, pour qu'une molécule puisse atteindre l'œil, en particulier la rétine, elle doit pouvoir franchir la barrière sang-rétine. La quantité de produit actif atteignant le segment postérieur est, de manière générale, réduite (moins de 2%)¹⁹⁴, c'est le cas par exemple de l'hesperidin/hesperetin, étudiées pour leurs propriétés vasoprotectrices dans les rétinopathies diabétiques¹⁹⁵. La majorité est donc perdue dans la circulation ou lors des processus de métabolisation causant une biodisponibilité oculaire négligeable. De plus, l'administration systémique comporte un risque accru d'effets secondaires sur l'organisme comparé aux modes d'administrations locales, la molécule arrivant par voie sanguine, l'ensemble de l'organisme y est exposé (Figure 14). Les modes d'administrations locaux sont donc préférés dans ces pathologies¹⁹⁴.

2. Collyre

Ce mode d'administration consiste à déposer une solution à la surface de l'œil (Figure 14). Les propriétés de la molécule administrée sont alors essentielles pour atteindre le tissu cible (poids moléculaire, taille, lipophilicité, perméabilité cornéenne entre autres critères)¹⁹⁴. Afin d'atteindre la partie postérieure, la solution peut soit passer par les tissus périphériques de l'œil (conjonctive, sclère) soit traverser la cornée. Bien que fréquemment utilisé pour le traitement de pathologies du segment antérieur, son utilisation pour le traitement de pathologies touchant le segment postérieur de l'œil est limitée du fait de la faible quantité atteignant le segment postérieur. En effet, moins de 5% du volume administré atteint la chambre antérieure de l'œil et ce volume administré est encore plus faible pour atteindre la chambre postérieure¹⁹⁴. Ce mode d'administration présente l'avantage de ne pas être invasif à la différence des autres approches citées ci-dessous et ne présente pas les risques qui y sont

associés. Afin d'optimiser son utilisation, des études sont en cours notamment sur l'utilisation de particules magnétiques¹⁹⁶.

3. Injection intravitréenne

Il s'agit de l'un des modes les plus fréquemment utilisés pour le traitement de pathologies rétiniennes. Il permet d'atteindre le segment postérieur de l'œil de manière efficace par injection directe dans le corps vitré. Bien qu'invasif, il ne nécessite pas de recours à la chirurgie. Cette voie permet l'administration du traitement à proximité directe de la rétine¹⁹⁴ (Figure 14). Néanmoins, seuls de petits volumes peuvent être injectés. Les risques liés à l'intervention sont limités, parmi eux, nous trouvons notamment l'endophtalmie, la cataracte, le décollement de la rétine et qui sont d'autant plus importants qu'il faudra répéter les injections¹⁹⁴.

4. Injection sous rétinienne

Ce mode d'administration est de plus en plus utilisé¹⁹⁷, permettant d'atteindre l'espace situé entre la RPE et les photorécepteurs. Le produit est ainsi administré directement au contact des cellules ciblées^{194,197} (Figure 14) ce qui fait de ce mode d'administration le mode privilégié dans les pathologies ayant un défaut au niveau de ces cellules. Les risques associés sont supérieurs à ceux observés lors des injections intravitréennes. Il nécessite l'administration d'une moindre quantité, l'espace d'injection étant plus réduit. L'intervention est cependant délicate et nécessite un chirurgien entraîné.

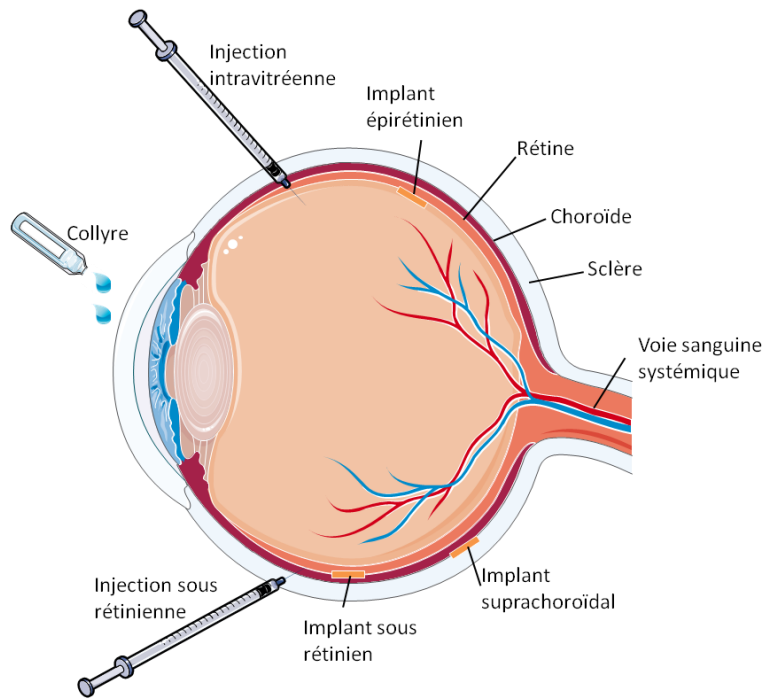


Figure 14 : Schéma des voies d'administration

Sur cette représentation de l'œil en coupe sagittale sont représentés les différentes voies d'accès utilisées dans le traitement du segment postérieur de l'œil : voie sanguine, collyre ou injection intravitréenne ou sous-rétinienne. Y figurent également les différentes possibilités de positionnement d'implants.

B. Les traitements développés pour les rétinopathies pigmentaires

A ce jour, de nombreuses approches thérapeutiques très variables sont en développement, ciblant les différents mécanismes impliqués dans ces pathologies et visant soit le ralentissement du processus dégénératif, son arrêt ou la substitution des photorécepteurs.

1. Le traitement par la vitamine A

La vitamine A est une vitamine issue de l'alimentation indispensable au bon fonctionnement de l'œil, en particulier de la rétine. En effet, le rétinal impliqué dans la phototransduction dérive de cette molécule. La vitamine A a été prescrite dans ces pathologies mais à l'heure actuelle son utilisation est controversée du fait de ses effets secondaires systémiques. La vitamine A peut notamment causer des dommages hépatiques ou des anomalies congénitales

s'il est pris pendant la grossesse^{59,198}. Elle pourrait également avoir des effets délétères dans certaines pathologies rétiniennes, dépendant du génotype. C'est le cas notamment pour le gène *ABCA4* dans la maladie de Stargardt, sensible à de hauts niveaux de vitamine A⁷¹ ou encore la mutation T4K de la rhodopsine¹⁹⁹. Dans ce dernier modèle il a été montré qu'une déprivation en vitamine A a des effets bénéfiques sur la dégénérescence rétinienne ainsi une augmentation de la vitamine A pourrait donc être délétère dans ce modèle.

2. Molécules favorisant la stimulation du repliement protéique

Les chaperonnes pharmacologiques et les kosmotropes (petites molécules chimiques) sont des composés liant les protéines natives et stabilisant ces dernières. Parmi les premières, le 9-*cis*-rétinal^{44,59,111,200,201} et le 11-*cis*-rétinal stabilisent la rhodopsine P23H^{59,62,111,201,202} et réduisent les agrégats et la mort cellulaire associée. Ils ont également montré des effets dans le modèle mutant de la rhodopsine T17M. Une autre molécule (non rétinale), YC-001, a récemment été développée permettant de ralentir la dégénérescence²⁰³.

Parmi les kosmotropes, le 4-PBA (acide 4-phényl butyrique), molécule déjà utilisée dans d'autres applications (les troubles du cycle de l'urée, la drépanocytose, la thalassémie et les fibroses kystiques)⁵⁹, a montré des effets bénéfiques, atténuant notamment le stress du réticulum endoplasmique, dans des modèles mutants de la rhodopsine P23H²⁰¹ et T17M⁵⁹ mais également dans d'autres modèles notamment un mutant RPE65²⁰⁴. Le curcuma²⁰⁵ et TUDCA (tauroursodeoxycholic acid) ont, eux, montré des effets bénéfiques sur le phénotype rétinien (fonction et structure de la rétine) associé à la mutation P23H de la rhodopsine dans des modèles de rats transgéniques^{201,206,207}.

A la différence des approches précédentes ciblant une protéine, certaines stratégies visent des mécanismes régulant l'équilibre et le repliement protéique général dans la cellule. Parmi ces approches, l'induction des molécules chaperonnes (HSR) par des inhibiteurs de Hsp90^{62,201,208} ou bien des inducteurs des HSR²⁰⁹ ont également montré une amélioration du phénotype rétinien dans des modèles de rats transgéniques P23H-1 et P23H-3.

3. Les inhibiteurs apoptotiques et facteurs trophiques

Une autre approche testée dans le développement de thérapies consiste à cibler l'apoptose et afin ralentir la mort cellulaire. Pour cela différents inhibiteurs de l'apoptose ont été testés. Parmi eux, l'érythropoïétine²¹⁰, molécule déjà prescrite dans le traitement de l'anémie a été investiguée, a des propriétés neuroprotectrices par sa faculté à inhiber l'apoptose²¹¹. Elle a notamment montré des effets bénéfiques dans la dégénérescence rétinienne associée à la mutation P23H de la rhodopsine, permettant un maintien des capacités visuelles et des épaisseurs de rétine²¹¹. L'inhibition de caspases a également montré des effets protecteurs sur la dégénérescence rétinienne dans différents modèles. XIAP (*X-linked inhibitor of apoptosis*), inhibiteur des caspases 3, 7 et 9, a permis une amélioration du phénotype dans les modèles P23H-1 et S334ter²¹². Un inhibiteur de la caspase-12 a été testé en combinaison avec des modulateurs de l'UPR¹ (le guanabenz et l'acide valproïque décrits ci-après). Malgré les résultats encourageants, à ce jour, aucun inhibiteur de caspase n'est disponible sur le marché²¹³. D'autres inhibiteurs de mort cellulaires ont également été testés dans le modèle de rat P23H-1 parmi lesquels la necrostatin-1s (inhibiteur de RIP-1 impliquée dans la nécroptose), ou encore la calpeptine (inhibiteur de calpaines) montrant des effets bénéfiques sur le phénotype rétinien²¹⁴.

A l'opposé, des approches favorisant la survie cellulaire par apport en facteur neurotrophique, généralement par un vecteur viral, ont été testées. Lors de celles-ci différents facteurs trophiques ont été testés: CNTF (*Cilia Neurotrophic Factor*)^{215,216}, BDNF (*Brain Derived Neurotrophic Factor*)²¹⁷, GDNF (*Glial Derived Neurotrophic Factor*)²¹⁸, NGF (*Nerve Growth Factor*)²¹⁹, RdCVF (*Rod-derived Cone Viability Factor*)²²⁰⁻²²², LEDGF (*Lens Epithelium Derived Growth Factor*)²²³. Ces différentes études ont montré la possibilité de ralentir la dégénérescence rétinienne associée aux modèles testés (dont des modèles mutants de la rhodopsine P23H et S334ter), préservant ainsi la structure de la rétine et sa fonction.

4. Induction de l'autophagie

Des approches thérapeutiques visant à réguler la protéostasie en agissant sur les mécanismes d'autophagies ont été testées. Ainsi, la rapamycine, inhibiteur de la voie mTOR, induit l'activation de l'autophagie et, dans des modèles P23H, favorise la dégradation de la

rhodopsine réduisant son agrégation^{201,224}. A l'opposé, d'autres études, montrent qu'une inhibition de l'autophagie peut avoir des effets bénéfiques sur la survie cellulaire dans la dégénérescence rétinienne. L'inhibition de l'autophagie par augmentation de la voie mTOR favoriserait la dégradation associée au protéasome^{225,226} mais également l'amélioration du métabolisme cellulaire et ainsi la survie cellulaire²²⁵.

5. Stratégies ciblant le stress cellulaire

Plusieurs études ciblant l'UPR et la dégradation protéique associée ont été réalisées afin de ralentir la dégénérescence rétinienne. Je développerai particulièrement l'acide valproïque et les inhibiteurs du complexe PPP1R15A/GADD34, molécules utilisées pour ce projet.

Ainsi une étude sur des cellules HEK293 (*Human Embryonic Kidney*) a permis de montrer que l'activation des voies ATF6 et PERK permet de réduire les agrégats associés à la mutation P23H de la rhodopsine. La voie ATF6 permettant une diminution spécifique de la rhodopsine mutante là où la voie PERK diminue l'expression de la protéine mutante et non mutante.²²⁷ Ces résultats suggèrent la possibilité de moduler ces voies afin de réduire le stress dans les mutations de classe II de la rhodopsine. En revanche, l'inhibition de CHOP (ayant un rôle pro-apoptotique) seule ne semble pas capable de ralentir la dégénérescence rétinienne^{187,228}.

La metformine (molécule initialement prescrite dans le diabète de type II²²⁹) a également été testée. Elle permet ralentir la traduction CAP-dépendante par son action sur AMPK (*Adénosine 5'-MonoPhosphate activated protein Kinase*) augmentant la phosphorylation d'eIF2 α et inhibant la voie mTOR²²⁹. La metformine n'a montré aucun effet bénéfique sur des modèles P23H, au contraire elle semble aggraver le phénotype²²⁹ notamment en favorisant le repliement et le trafic de la protéine mutée.

Une autre approche consiste à cibler la dégradation protéique associée : l'ERAD. Des études ont notamment montré la possibilité de cibler des protéines impliquées dans la sortie des protéines du réticulum endoplasmique avant leur dégradation. Parmi les protéines ciblées, EDEM1 (*ER Degradation Enhancing alpha-Mannosidase like protein 1*) et DNAJC10 (*DnaJ*

(*Hsp40*) Homolog, subfamily C, member 10) ou VCP (*Valosin containing Protein*). EDEM1 intervient dans la reconnaissance des protéines mal repliées dans le réticulum endoplasmique, DNAJC10 dans les processus de réduction des protéines reconnues par EDEM1 et destinées à être dégradées et VCP facilite la rétrotranslocation des protéines. Ces protéines ont donc un rôle dans la reconnaissance et l'extraction des protéines mal repliées du réticulum endoplasmique et favorisent ainsi leur dégradation. Il a été montré que l'augmentation d'EDEM1 (*in vitro*),²³⁰ ou DNAJC10²³¹ favorise le transport et la dégradation de la rhodopsine mutante P23H. En revanche l'inactivation de VCP dans un modèle de drosophile (*Rhl*) permet de ralentir la dégénérescence rétinienne²³². Ces études montrent la possibilité de diminuer les agrégats protéiques associés aux mutations de la rhodopsine en favorisant sa rétrotranslocation et ainsi sa dégradation. Ces approches pourraient permettre de réduire le stress et de préserver la structure et la fonction de la rétine.

a. Stimuler la production de BiP : L'acide valproïque

BiP, protéine chaperonne du réticulum endoplasmique, intervient notamment dans le repliement protéique et senseur du stress du réticulum endoplasmique. Stimuler BiP permettrait donc d'augmenter les capacités de repliement du réticulum mais également d'augmenter le ratio BiP/protéines diminuant ainsi le stress. Des études sur la lignée de rat mutant P23H-3¹⁸³ ont montré que l'augmentation de BiP, par augmentation du nombre de copies du gène (codant la protéine humaine), permet de diminuer le stress du réticulum endoplasmique, et ainsi de préserver la structure et les fonctions de la rétine¹⁸³.

L'acide valproïque (VPA) est une molécule déjà disponible sur le marché dans le traitement de l'épilepsie^{233,234} (la dose utilisée n'excédant pas 60mg/kg/jour). Il possède différentes propriétés parmi lesquelles des propriétés histones déacétylases inhibitrices (HDACi), permettant de favoriser, de manière non spécifique, l'expression de différents gènes notamment BiP²³⁴⁻²³⁷ et ainsi de moduler l'UPR. Il a également montré des capacités à stimuler l'élimination des agrégats protéiques, notamment de la rhodopsine P23H, en stimulant l'autophagie²³⁴.

L'utilisation de VPA dans le traitement des dégénérescences rétiniennes a montré des effets variables selon les modèles. Il présente des propriétés neuroprotectrices dans différents

modèles, par exemple dans notre laboratoire sur un modèle BBS¹ (en combinaison avec le guanabenz et un inhibiteur de Caspase-12) mais également sur un modèle P23H de xénope²³⁴ ou de souris *Rd1*²³⁸. Dans le modèle xénope porteur de la mutation P23H de la rhodopsine le traitement favorise la dégradation de la protéine mutante, préservant la structure et la fonction des photorécepteurs²³⁴. En revanche, des effets délétères ont été observés dans des modèles des mutations T17M, T4K et Q344ter, accélérant la dégénérescence rétinienne à la lumière²³⁴, mais également dans un modèle de souris *Rd10*²³⁸.

L'utilisation du VPA dans le traitement de dégénérescences rétiniennes, bien qu'ayant été testée dans différentes études (<https://clinicaltrials.gov>), est actuellement controversée. Le VPA possède en effet des effets secondaires importants : une hépatotoxicité liée à une toxicité mitochondriale^{239,240}, des pancréatites, des risques d'anomalies congénitales (en particulier neurodéveloppementaux)²⁴¹. Il exerce également des effets variés sur le système immunitaire²⁴⁰ et le métabolisme cérébral^{240,242}. De plus ses effets sur la dégénérescence rétinienne sont variables selon le modèle utilisé. Néanmoins, cette variation dépendant du génotype est partagée par différentes approches mentionnées ci-dessus et reflète la nécessité de comprendre le modèle et les mécanismes d'actions de la molécule afin de développer un traitement approprié.

b. Inhiber le complexe PPP1R15A /PP1c

PPP1R15A est une protéine impliquée en particulier dans l'UPR, produite en condition de stress. Elle agit en complexe avec PP1c permettant de déphosphoryler P-eIF2 α et levant l'inhibition de la traduction CAP-dépendante comme décrit précédemment. L'inhibition de ce complexe peut donc permettre le maintien de l'atténuation de la traduction CAP-dépendante réduisant l'accumulation de protéines au niveau du réticulum endoplasmique^{95,100,243-245} et ainsi le stress associé. Cette stratégie a montré des résultats bénéfiques dans d'autres maladies neurodégénératives, notamment la maladie de Charcot-Marie-Tooth et la sclérose latérale amyotrophique^{243,246,247}. Une étude a par ailleurs montré des effets bénéfiques de l'inhibition de ce complexe en association avec le VPA, sur la dégénérescence rétinienne associée au BBS¹.

L'effet de l'inhibition du complexe PPP1R15A/PP1c sur la phosphorylation d'eIF2 α est à ce jour controversé. Quelques récentes études réalisées sur des cellules mais également sur des modèles murins montrent que cibler PPP1R15A, que ce soit pharmacologiquement ou génétiquement, ne permettrait pas de moduler le taux de traduction protéique^{97,98,104}. Ainsi une étude réalisée *in vitro* n'a montré aucun effet de la sephin1 (décrite ci-après) sur la stabilité du complexe phosphatase reconstitué *in vitro* et son activité. Cependant il est à prendre en compte que seul le fragment allant de l'acide aminé 325 au 636 de PPP1R15A a été générée dans cette étude, et qu'on se situe hors contexte physiologique⁹⁷. Une autre étude réalisée sur un modèle de souris de RD (*Rd16*) a montré que l'inhibition du complexe PPP1R15A/PP1c (par modification génétique du gène codant PPP1R15A, modèle murin *Gadd34 $\Delta C/\Delta C$*) ne permet pas la diminution de la traduction, bien que permettant l'augmentation de la phosphorylation d'eIF2 α ¹⁰⁴. L'inhibition du complexe PPP1R15A/PP1c, en dehors de son rôle sur la traduction, agirait sur les propriétés apoptotiques mais également pro-autophagique de PPP1R15A¹⁰²⁻¹⁰⁴.

- Le guanabenz

Comme l'acide valproïque, le guanabenz est une molécule déjà disponible sur le marché (sous le nom de Wytensin) dans une indication thérapeutique sans lien avec les dégénérescences rétiniennes. Il est utilisé comme anti hypertenseur²⁴⁸ dans le traitement de l'hypertension artérielle où il est utilisé comme grâce à ses propriétés α -2-adrénérique.

Dans notre étude c'est sa capacité à lier spécifiquement PPP1R15A^{95,100} qui a été retenue. Il a été montré que sa liaison à PPP1R15A entraîne un changement de conformation de celle-ci²⁴³ empêchant sa liaison à PP1c. Le guanabenz empêche ainsi la formation du complexe phosphatase et donc son activité^{95,243}. Il permet donc le maintien de l'inhibition de la traduction CAP-dépendante, réduisant la charge protéique au niveau du réticulum endoplasmique. L'efficacité du guanabenz dans la sclérose latérale amyotrophique, maladie neurodégénérative due à une accumulation de protéines mal repliées, a déjà été montrée et fait l'objet d'essais cliniques²⁴⁹. L'efficacité du guanabenz dans le traitement des RP a, elle, été démontrée dans un modèle de ciliopathie, sur des souris *Bbs12* KO, en combinaison avec le VPA et un inhibiteur de caspase¹. Son utilisation en combinaison a permis de préserver les capacités visuelles chez ces souris.

- L'IFB-088

L'IFB-088, également connu sous le nom de Sefhin1, est une molécule analogue du guanabenz décrit ci-dessus. Le guanabenz a été modifié par chimie médicinale afin d'obtenir l'IFB-088 (brevet N° WO2014/108520), molécule sur laquelle une fonction chlore portée par le cycle aromatique a été supprimée comparée au guanabenz (Figure 15). Il a été montré que l'IFB-088 partage les mêmes propriétés inhibitrices du complexe PPP1R15A/PP1c que le guanabenz permettant de maintenir la phosphorylation d'eIF2 α . Cependant, il présente l'avantage de ne pas posséder les propriétés α -2-adrénergiques du guanabenz pouvant causer des effets secondaires tel que la léthargie^{95,243}. Son efficacité dans le traitement de la sclérose latérale amyotrophique a également été montrée sur modèle murin²⁴³ ainsi que dans un modèle de sclérose en plaque²⁵⁰. La molécule est également en essai clinique de phase I (chez les volontaires sains, <https://clinicaltrials.gov>, NCT03610334), la première indication visée sera la maladie de Charcot-Marie-Tooth. Son efficacité dans les dégénérescences rétinienne héréditaires n'a pas encore été démontrée à ce jour.

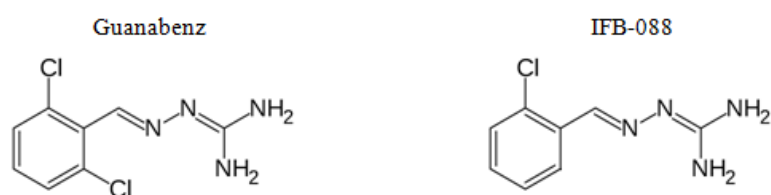


Figure 15 : Structure chimique du guanabenz et de l'IFB-088 (Sefhin1)

Adaptée de Das *et al.* 2015²⁴³

6. Les thérapies à visée génétique

Il existe différentes approches permettant de cibler le génome et ainsi corriger le défaut génétique. Ces approches visent soit à empêcher l'expression de l'allèle muté soit à apporter une version non mutée du gène afin de restaurer une protéine fonctionnelle.

a. La thérapie génique de remplacement

La thérapie génique trouve principalement son application dans les maladies récessives dans lesquelles la mutation entraîne une perte de fonction²⁵¹. L'apport d'une version fonctionnelle du gène permet ainsi de récupérer la fonction et de corriger le défaut génétique. Le moyen d'administration le plus utilisé à ce jour est le vecteur viral AAV, qui est le moyen le plus sûr et présentant la meilleure efficacité. Actuellement, une seule thérapie génique a été autorisée dans les RP. Il s'agit d'une thérapie dans les ACL associées aux mutations du gène *RPE65*^{13,44,252,253}, le voretigène néparvovec (LUXTURNA)¹⁹³. Suite à ce succès, de nombreuses études sont en cours afin de corriger les mutations associées à différents gènes, notamment *USH1B*²⁵¹, *RPGR*²⁵¹, *MYO7A*²⁵³(<https://clinicaltrials.gov/>).

La thérapie génique permettrait également l'apport de protéines pouvant moduler des voies de signalisation impliquées dans la pathologie, c'est le cas de facteurs trophiques ou encore de BiP par exemple. Elle peut également permettre l'apport d'une protéine photosensible dans le traitement par optogénétique (décrit après).

b. Thérapies basées sur la stratégie CRISPR/Cas9

Cette technique présente l'avantage de pouvoir être utilisée dans les pathologies autosomiques dominantes²⁵¹, contrairement à l'approche précédente. Elle permet la reconnaissance spécifique d'une séquence d'ADN et d'y introduire une modification. Dans le cas de la thérapie, cette modification consiste à récupérer la séquence normale du gène²⁵². A l'heure actuelle, son utilisation en thérapie est limitée dû à des effets secondaires « hors cible » pouvant entraîner l'apparition de mutations^{252,254}. Etant une technologie prometteuse, la recherche actuelle vise à augmenter sa spécificité afin d'éviter ces effets secondaires. Plusieurs équipes et compagnies étudient cette approche pour les dystrophies héréditaires de la rétine notamment pour la mutation récurrente *CEP290* (<https://editasmedicine.com/>).

7. Remplacement des tissus

Une fois que les photorécepteurs ont dégénéré, les approches thérapeutiques précédentes ne peuvent plus être utilisées. C'est pourquoi certains traitements visent au remplacement artificiel des capacités photosensibles.

a. L'optogénétique

Cette approche vise à restaurer les capacités visuelles par l'expression d'une protéine photosensible (optogène) dans les cellules neuronales rétinienne restantes^{252,255,256}. L'apport de cette protéine se fait par thérapie génique, le gène codant est délivré par AAV généralement, par injection intravitréenne. Elle peut cibler différents types cellulaires : cellules bipolaires, ganglionnaires ou amacrines, les rendant ainsi photosensibles. L'activation de cette protéine par la lumière entraîne une dépolarisation ou hyperpolarisation (selon la protéine photosensible utilisée) de la membrane à l'origine du signal qui activera le circuit neuronal d'intégration de la lumière, se substituant aux photorécepteurs. Cette approche a pour l'heure des limitations : la vitesse et le seuil de détection de la lumière de ces molécules mais aussi leur spectre d'absorption^{252,257}. De plus la vision des couleurs nécessitant la détection de lumière de différentes longueurs d'ondes, différents optogènes devraient être apportés à différentes cellules²⁵⁷, compliquant son application.

b. La thérapie cellulaire

C'est une technique permettant de réimplanter des cellules non atteintes par le défaut génétique à partir de cellules mises en cultures^{251,252}. Différentes sources de cellules pluripotentes peuvent être utilisées pour cultiver le greffon, des cellules dérivées de cellules souches embryonnaires ou des cellules pluripotentes induites à partir de cellules provenant du patient. Du fait des controverses éthiques, la deuxième approche est privilégiée à ce jour^{251,252}. Cette dernière présente également l'avantage de ne pas nécessiter de recours à des traitements immunosuppresseurs, le greffon provenant de cellules du patient. Plusieurs essais cliniques de phase I ou I/II ont été réalisés sur des cellules de RPE dérivées de cellules pluripotentes, utilisant soit des greffons dérivés de cellules ES^{197,252,258} ou IPSC^{252,259} implantés en sous rétinien. Pour l'heure, il n'y a pas de greffe de photorécepteurs dérivés de cellules

pluripotentes réalisée. Mais des études sur des modèles de souris montrent qu'il est possible de développer des greffons ayant des photorécepteurs matures²⁶⁰. En revanche, la transplantation de cellules RPE est une voie prometteuse, des essais chez l'homme ont déjà été réalisés pour la DMLA sèche^{258,261} mais également prochainement dans les RP²⁶¹. Les transplantations de cellules sont des voies prometteuses mais pour lesquelles il reste beaucoup de travail expérimental avant d'arriver en clinique.

c. Les implants électroniques

Les implants électroniques visent à remplacer artificiellement les capacités visuelles d'un individu par un système électronique stimulant les cellules résiduelles de la rétine (cellules bipolaires ou ganglionnaires). Leur pose nécessite une intervention chirurgicale, ils peuvent être placés en épitrétinien, en sous-rétinien ou suprachoroïdal (Figure 14). Ces systèmes ne permettent pas à l'heure actuelle une restitution totale de la vision mais plutôt une meilleure détection de la lumière et des forts contrastes.

A ce jour, deux systèmes ont reçu le marquage CE et ont été commercialisées^{252,262} mais sont malheureusement arrêtées pour des raisons propres aux industriels :

- Implants de type Argus II^{252,263} (société second sight) : il s'agit d'un implant épitrétinien, (placé sur la face interne, au contact des fibres nerveuses). Ces prothèses ont été les premières approuvées. Elles sont aujourd'hui approuvées en Europe, aux Etats-Unis et au Canada. Le système se compose d'une caméra montée sur une paire de lunettes. Le signal est transmis à une unité externe qui produit le signal et transmet les données à l'implant épitrétinien. Les électrodes de l'implant émettent des signaux électriques stimulant les cellules rétiniennes restantes.
- Alpha IMS²⁵² (société retina implant) : deuxième implant approuvé à ce jour par l'Union Européenne. Il s'agit d'un implant sous rétiniens, placé entre la RPE et les photorécepteurs (si restant). Les cellules de la puce électronique implantée sont elles-mêmes photosensibles. Elles captent donc directement la lumière et la convertissent en un signal électrique stimulant les cellules bipolaires. Le signal sera ensuite transmis via le circuit normal au cortex visuel.

Pour conclure, les approches développées et décrites ci-dessus ne sont pas exclusives les unes des autres. En effet, il est possible de combiner plusieurs approches afin de prolonger le plus longtemps possible les capacités visuelles. Une approche permettant de ralentir la dégénérescence rétinienne pourrait ainsi offrir une fenêtre thérapeutique plus large permettant d'attendre l'arrivée d'approches par thérapies géniques performantes. Il est également possible d'envisager de modifier génétiquement les cellules du patient afin de corriger la mutation pour ensuite pouvoir réaliser un greffon à partir de celles-ci ²⁵⁴. Les possibilités de combinaison sont multiples mais une compréhension de la pathologie (son génotype, ses mécanismes et sa cinétique) est nécessaire pour déterminer la meilleure approche.

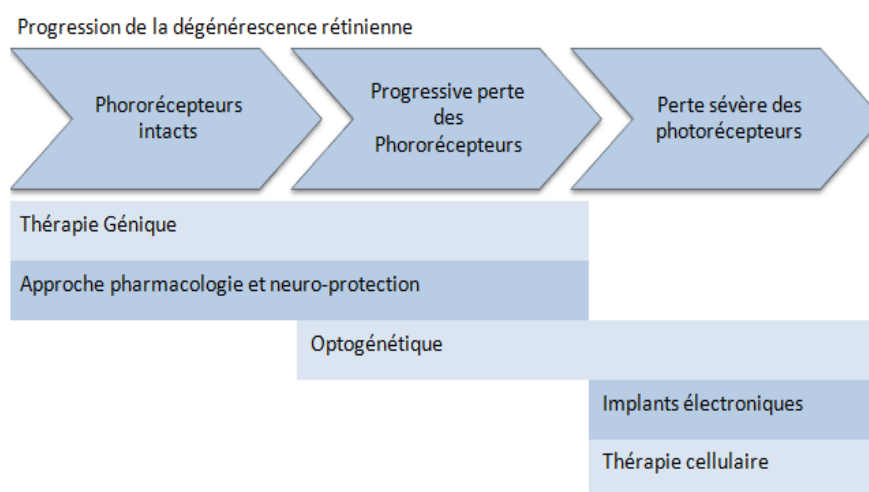


Figure 16 : Fenêtre d'application des différentes stratégies

Représentation schématique des fenêtres d'application en fonction de l'avancement de la pathologie pour les différentes stratégies vues précédemment.

Objectifs de la thèse

Lors de cette thèse, j'ai pu travailler principalement sur deux projets qui constituent les deux parties de cette thèse. Le premier fut un projet de caractérisation de modèles murins et le second un projet de développement d'un traitement pharmacologique ciblant l'UPR dans différents modèles murins de rétinopathies pigmentaires.

PARTIE 1 : Caractérisation de la dégénérescence rétinienne dans trois modèles murins de ciliopathies

Ce projet ayant commencé avant le début de ma thèse, j'ai repris et poursuivi l'étude commencée par Yu X. La publication Brun *et al.* (présentée en première publication de la partie résultats) est l'aboutissement de ce travail. Ce projet visait à comprendre les mécanismes impliqués dans la physiopathogénie de la dégénérescence rétinienne dans différents modèles de ciliopathies, en particulier l'implication de l'UPR. Il apporte ainsi une meilleure compréhension de ces pathologies. La compréhension des mécanismes physiopathogéniques constitue également une première étape nécessaire au développement d'un traitement. Différents modèles murins de ciliopathies ont été caractérisés (*Bbs10*^{-/-}, *Bbs1*^{-/-}, *Cep290*^{-/-} et *Alms1*^{foz/foz}) lors de l'étude. La caractérisation phénotypique a été faite par des analyses histologiques mais également par mesure de la réponse des photorécepteurs (par électrorétinogramme). Sur le plan moléculaire, la caractérisation a permis la en évidence de l'activation de voies de signalisation par PCR quantitative. Cette étude a permis de mettre en évidence un mécanisme physiopathogénique commun à différents modèles.

PARTIE 2 : Développement d'un traitement ciblant l'UPR dans différents modèles murins de RP

Ce projet visant à tester un traitement dans des modèles murins de rétinopathies pigmentaires a constitué le projet principal de ma thèse. Il avait pour objectif le développement d'un traitement pharmacologique pour ces pathologies en ciblant l'UPR, mécanisme physiopathogénique commun à différentes formes de RP.

Ce projet se base pour cela sur une étude antérieure (thèse de Mockel, 2012), réalisée au sein du laboratoire sur un modèle murin de rétinopathie, la souris *Bbs12* KO. Cette étude avait montré la possibilité de moduler l'UPR afin de ralentir la dégénérescence rétinienne associée à ce modèle. Le traitement testé était composé de trois molécules (guanabenz et acide valproïque et un inhibiteur de caspase 12) (Figure 17)¹.

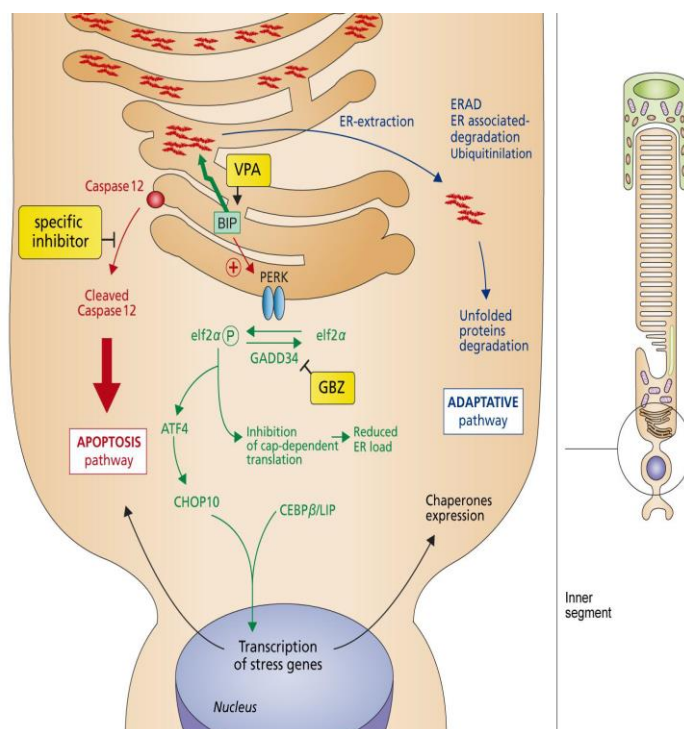


Figure 17 : Stratégie thérapeutique utilisée par Mockel *et al.*¹

Les trois molécules utilisées par Mockel *et al.* ainsi que leur cible sont représentées sur ce schéma. Le VPA a été utilisé pour augmenter la production de BiP, le GBZ pour cibler GADD34 et l'inhibition de la traduction CAP dépendante et l'inhibiteur de la caspase 12 pour inhiber l'apoptose.

Les souris traitées avec cette combinaison présentaient ainsi une réponse à l'électrorétinogramme (test fonctionnel) améliorée par rapport aux groupes contrôles, ainsi qu'une augmentation de l'épaisseur des couches des photorécepteurs. L'amélioration de ces deux marqueurs montre un ralentissement de la dégénérescence rétinienne suite à l'administration du traitement. Il a ainsi été envisagé de développer dans le même registre d'autres molécules et en particulier IFB-088.

Cette thèse a fait l'objet d'une bourse CIFRE financée par InFlectis BioScience, société développant l'utilisation de l'IFB-088 dans différentes indications dont la maladie de Charcot-Marie-Tooth. L'IFB-088 possède les mêmes effets inhibiteurs du complexe PPP1R15A/PP1c, permettant le maintien de l'inhibition de la traduction CAP-dépendante, mais sans les effets secondaires du GBZ (effets hypotenseurs dû à son activité α -2-adrénérgiques). Il a montré des

effets bénéfiques dans des modèles animaux de maladies dégénératives^{243,250}. L'objectif était d'évaluer l'effet de cette molécule sur la dégénérescence rétinienne dans des modèles de rétinopathies pigmentaires. Le projet propose de tester un nouveau traitement dans lequel le guanabenz (GBZ) est remplacé par une molécule analogue : l'IFB-088.

Le projet vise également l'élargissement du traitement testé par Mockel *et al.* à une forme autosomique dominante non syndromique de RP partageant des similarités au niveau des mécanismes physiopathogéniques. La mutation P23H de la rhodopsine a été choisie pour cette étude, cause majeure d'adRP aux USA pour laquelle différents modèles murins sont disponibles.

Dans un premier temps, une caractérisation du modèle murin mutant de la rhodopsine Rho-P23H KI (*Rho*^{P23H/+}) a été réalisée afin de s'assurer que le modèle était qualifié pour le traitement. Suite à cette caractérisation du modèle, nous avons ciblé l'UPR en particulier la voie PERK par inhibition du complexe PPP1R15A/PP1c. La validation de la cible (PPP1R15A) a été faite par une étude génétique basée sur une mutation murine du gène (*Gadd34*) entraînant une perte de fonction de la protéine en combinaison de la mutation de la rhodopsine. Le phénotype rétinien du modèle murin double mutant *Gadd34*^{ΔC/ΔC} *Rho*^{P23H/+} généré dans le laboratoire a été caractérisé.

Enfin, nous avons ciblé PPP1R15A par administration d'IFB-088 à des souris *Rho*^{P23H/+}. L'effet du traitement sur la progression de la dégénérescence rétinienne a été mesuré par des techniques d'électrorétinogramme et d'histologie.

Matériels et méthodes

L'ensemble des procédures et du matériel utilisés est détaillé dans les différents manuscrits présentés dans la partie résultats de cette thèse.

I. Les lignées de souris

Nous avons assuré la production des souris nécessaires au projet par reproduction et la gestion des colonies au sein de l'animalerie agréée auquel le laboratoire est rattaché, en respectant les règles éthiques. Les souris sont gardées en portoir ventilé dans une salle à température et humidité contrôlée, sous un cycle d'éclairage 12h/12h avec accès à volonté à l'eau et à la nourriture. L'intensité lumineuse de l'animalerie est de 100 lux (réglementairement inférieure à 200 lux).

Les croisements de souris ont été faits sur un fond C57B/6J permettant d'éliminer la mutation Rd8 (*retinal degeneration 8*) de la lignée. La mutation Rd8 est une mutation spontanée, par décalage du cadre de lecture, du gène *Crb1* présente dans différents fonds génétiques causant un phénotype rétinien. Afin d'éviter l'apparition de cette mutation et ainsi éviter toute interférence sur le phénotype attendu, les croisements ont été réalisés sur le fond génétique C57B/6J pour lequel il a été montré l'absence de cette mutation²⁶⁴.

A. Les modèles

1. Les modèles de ciliopathies : les souris *Bbs* mutantes et souris *Cep290*^{-/-}

Les lignées de souris *Bbs10* et *Bbs12* ont été initialement obtenues par recombinaison homologue réalisée à l'Institut Clinique de la Souris (Illkirch-Graffenstaden) dans le cadre d'un projet mené par notre laboratoire. La mutation est une délétion de l'exon 2 dans le gène *Bbs10*¹³⁶ et *Bbs12*^{1,265} respectivement.

La lignée *Bbs1* est une souris KI, par insertion d'une mutation dans le gène *Bbs1*¹²⁴ afin d'invalider le gène. La lignée nous a été fournie par le Dr Katsanis Nicholas.

La lignée *Cep290 KO* (*Cep290*^{tm1.1Jgg/J}) a été fournie chez Jackson Laboratory (Stock n°013702). Cette lignée est porteuse d'une délétion des exons 36 et 37 du gène, entraînant l'apparition d'un codon stop prématurée.

Pour chaque lignée, les souris homozygotes et leur contrôle WT (*wild-type*) ont été obtenus par croisement de souris hétérozygotes.

2. Un modèle spontané : les souris *Alsm1*^{foz/foz}

Cette lignée de souris est une lignée avec une délétion spontanée de 11pb dans l'exon 8 du gène *Alms1*¹⁵⁵. La lignée nous a été fournie par le Flinders Medical Centre (Australie). Comme précédemment, les souris homozygotes et les contrôles ont été obtenues par croisement de souris hétérozygotes.

3. Souris *Rho*^{P23H/+}

Les souris *Rho*^{P23H/P23H} ont été générées par Sakami *et al.* par une technique de *knock-in*¹¹². Elles ont été fournies par l'Institut Clinique de la Souris (ICS, Illkirch-Graffenstaden, France). Afin de générer des souris hétérozygotes *Rho*^{P23H/+}, les souris homozygotes ont été croisées avec des souris WT. Des souris hétérozygotes ont été mises en croisement entre elles afin d'obtenir des homozygotes (*Rho*^{P23H/P23H}). Ces dernières seront remises en reproduction avec des WT afin de générer les souris hétérozygotes nécessaires aux expérimentations.

4. Souris *Gadd34*^{ΔC/ΔC}

Les souris *Gadd34*^{ΔC/ΔC} ont initialement été générées par David Ron (Université de Cambridge, Royaume-Unis) et ont été décrites par Novoa *et al.*²⁶⁶. Elles ont été fournies par David Ron et amplifiées par le laboratoire Janvier (Janvier labs) à l'état hétérozygote.

Les souris *Gadd34*^{ΔC/-} fournies ont été croisées avec des souris *Rho*^{P23H/+} afin d'obtenir des doubles hétérozygotes *Gadd34*^{ΔC/ΔC} *Rho*^{P23H/+}. Cette première génération de souris sera mise en croisement avec des *Gadd34*^{ΔC/-}, ce croisement permettant d'obtenir les souris *Gadd34*^{ΔC/ΔC} *Rho*^{P23H/+} utilisées pour l'étude. Les croisements seront faits de sorte à obtenir ces doubles mutants tout en évitant la consanguinité.

B. Génotypage

Le génotypage est l'étape qui nous permet de déterminer si l'animal est porteur ou non de la mutation d'intérêt. Il se fait à partir d'ADN extrait d'un échantillon de tissus (de doigt prélevé durant les premiers jours de vie) provenant de la souris. L'extraction de l'ADN se fait par digestion du tissu dans 500µl de tampon de lyse (Tris/HCl 0,1M pH 8,5, EDTA 5mM pH 8,0, SDS 0,2%, NaCl 0,2M) et contenant de la protéinase K (0,3µg/ml) à 55°C sur la nuit. L'ADN est ensuite précipité avec de l'isopropanol avant d'être resuspendu dans un tampon (Tris/HCl 10mM pH 8,0, EDTA 1mM pH 8,0). Cet ADN sera ensuite utilisé pour faire une PCR (Polymerase Chain Reaction), permettant d'amplifier spécifiquement un fragment d'ADN.

La PCR est effectuée grâce à une enzyme, la Taq polymérase (catalogue # D4545, Sigma-Aldrich), permettant la synthèse du fragment d'ADN d'intérêt à partir des dNTPs, des amorces spécifiques des différentes mutations (tableau 8) et en présence de MgCl₂ co-facteur enzymatique,

Pour le génotypage de la mutation *Rd8*, de *Bbs12*, *Bbs10*, *Bbs1* et de la mutation *Gadd34*, le cycle PCR est de 3 min à 94°C (pour la dénaturation initiale), puis un cycle en 3 étapes est réalisé : 30sec à 94°C (pour la dénaturation), 30sec à 62°C (pour l'hybridation des amorces) et 30sec à 72°C (pour l'élongation), le tout est répété sur 30 cycles avant une dernière phase d'élongation de 5min à 72°C. L'étape d'hybridation dépend des amorces (longueur et contenu), pour le génotypage de la mutation du gène *Alms1* elle est de 30sec à 58°C et pour le génotypage de la rhodopsine P23H de 15sec à 61°C.

Le produit obtenu sera ensuite déposé sur un gel d'agarose afin de faire migrer et séparer les fragments obtenus. Ces fragments seront révélés aux UV grâce à un agent intercalant de l'ADN (le bromure d'éthidium) incorporé au gel.

gènes	amorces	séquences 5' - 3'
<i>Bbs1</i>	A	TCT CCT TGC TCC CTC TCA AA
	B	CCT GGA AAT GGA GAG ATG GA
	LTR	AAA TGG CGT TAC TTA AGC TAG CTT GC
<i>Bbs10</i>	4054	ACA AAT ACA ATT GAT CAT CGA TGT G
	4057	ACC TCC CCA CTT GAA CGA GGT CT
	4058	GTT GCC TGG CTT GGG TGG CA
<i>Bbs12</i>	4511	AGT TGA TGT CTA TCA ATA ACT GCC A
	4514	ACA CCT CCA CTG CTG TTC CTG CC
	4515	CTT CTC GAG CTT AAG GTC GAC CTG
<i>Alms1</i>	Forward	ACA ACT TTT CAT GGC TCC AGT
	Reverse	TTG GCT CAG AGA CAG TTG AAA
<i>Cep290</i>	M11336	TGG AAG ACC AGG CTT CAG AG
	M11340	GGC TCA CTG TGA TCT TGT GC
	W11338	GTA AGT GCC CGA CAG CTA CC
	W11339	AGC GCA GTG CAG AGT ATG TG
P23H	Forward	GCT AGC ACT GTT GGG CAT CT
	Reverse	GAC CCC ACA GAG ACA AGC TC
<i>Gadd34</i>	7S	CCA GGA GAG AAG ACC AAG GGA CGT
	6AS	GGA GAT TGC AAG AGA GTG AAC ACA GC
	4S	AAG CCT TCG CCAT CTG CTT ATC CAG
<i>Rd8</i>	F1	GTG AAG ACA GCT ACA GTT CTG ATC
	F2	GCC CCT GTT TGC ATG GAG GAA ACT TGG AAG ACA GCT ACA GTT CTT CTG
	R	GCC CCA TTT GCA CAC TGA TGA C

Tableau 8 : Listes des amorces utilisées

II. Conditions lumineuses

Afin de tester l'effet de la lumière sur la dégénérescence rétinienne des souris Rho *P23H*^{+/-}, les souris sont placées dans différentes conditions lumineuses. Les souriceaux (et leur mère) sont soit placés dès la naissance soit à l'obscurité et y sont maintenus jusqu'à analyse, le change des souris se faisant sous lumière rouge (catalogue # R125IRR, Philips, Suresnes, France). Soit, elles sont soumises à un cycle lumineux de 12h lumière/12h obscurité. Durant la phase lumineuse, les souris sont soumises à une intensité lumineuse de 12 000 lux (mesurée avec un luxmètre, Testo 540), mélange de lumière blanche et bleue jusqu'à analyse.

III. Traitement des souris

Les différents traitements pharmacologiques ont été administrés par deux voies : une voie d'administration systémique par gavage et une voie d'administration locale par injection intravitréenne. Les traitements commençant à 14 jours post-natal, correspondant à l'âge d'ouverture des yeux chez la souris.

A. Solutions thérapeutiques

Les solutions thérapeutiques utilisés étaient des solutions d'IFB-088 seul ou en combinaison avec du VPA. Les solutions stocks étaient préparées de manière stérile et remplacées toutes les semaines. Le VPA était initialement dilué dans une solution de PBS pH6 et l'IFB-088 dans du PBS pH4,5. Les solutions stocks sont ensuite diluées aux concentrations adaptées dans du PBS pH6, ce dernier servant également de véhicule.

B. Injection intravitréenne

L'injection intravitréenne est réalisée sous anesthésie générale (par injection intrapéritonéale de Kétamine et Domitor) sur des souris âgées de 14 jours. Afin d'éviter le dessèchement de l'œil, du gel ophtalmique (Ocrygel) est mis sur les yeux avant l'injection. Le geste est pratiqué sous loupe afin de contrôler le site d'injection, 1 μ l de solution est injecté. Après l'injection, la souris est réveillée par injection intramusculaire d'Antisedan et maintenue sur support chaud jusqu'à son réveil complet. Différentes concentrations ont été testées : IFB-088 2,5 μ M seul ou en combinaison avec du VPA 0,2mM et IFB-088 25 μ M en combinaison avec du VPA 0,2mM.

C. Gavage des souris

Le gavage des souris commence à 14 jours post-natal pendant une durée de 1 mois à l'aide de sondes adaptées aux différents âges (poids et taille) (catalogue # FTP-22-25 et FTP-20-38,

Phymep, Paris, France). L'administration se fait sur souris vigiles. Différentes séries de gavage ont été testées au cours de l'étude :

Série 1 : Les souris ont été gavées quotidiennement avec les solutions pendant un mois. Les quantités utilisées sont de 2,29mg/kg (3mg/kg d'IFB-088 sous forme d'acétate), 80mg/kg d'acide valproïque.

Série 2 : Les souris ont été gavées un jour sur 2 pendant une semaine, soit 4 administrations entre 14 et 21 jours, avec les solutions aux mêmes dosages que lors de la série 1.

Série 3 : Les souris ont été gavées quotidiennement pendant un mois. Seul l'IFB-088 à 1,145mg/kg (de base libre) et le véhicule ont été testés.

Série 4 : Les souris ont été gavées un jour sur 2, de 14 jours jusqu'à 2 mois. Seul l'IFB-088 à 2,29mg/kg (sous forme de base libre) et le véhicule ont été testés.

IV. Electrorétinogramme

L'électrorétinographie est une technique non invasive d'électrophysiologie permettant de mesurer la réponse des différentes cellules neuronales de la rétine en réponse à des stimuli lumineux. Différents protocoles sont possibles, nous avons réalisés des enregistrements scotopiques permettant de mesurer la réponse des bâtonnets. Pour ces enregistrements, les souris sont préalablement adaptées au noir. Elles sont ensuite soumises à une série de flashes lumineux d'intensité croissante. L'enregistrement caractéristique obtenu est composé d'une première phase d'hyperpolarisation appelée onde a, elle correspond à la réponse des photorécepteurs, suivie d'une phase de dépolarisation appelée onde b, correspondant à la réponse des neurones intégrateurs, principalement les cellules bipolaires (Figure 19).

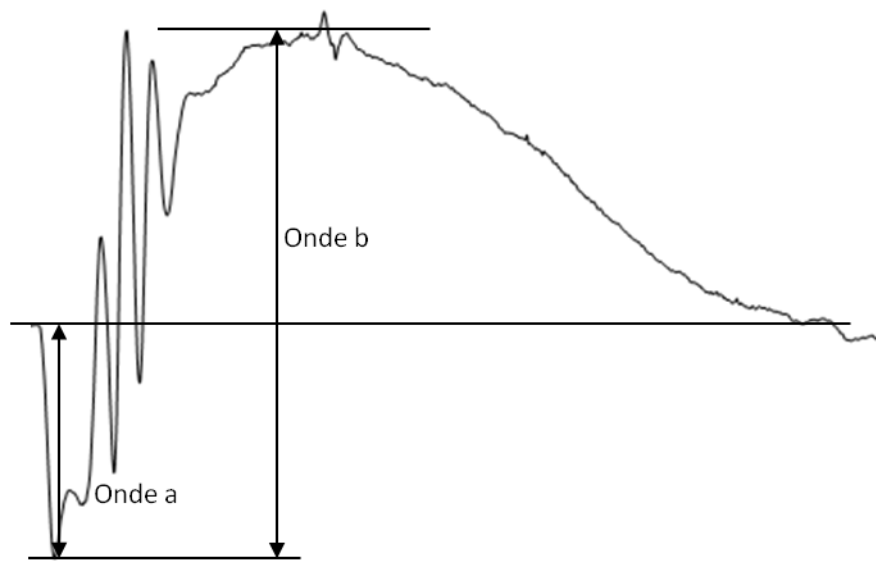


Figure 18 : Tracé caractéristique d'un ERG scotopique

Les électrorétinogrammes (ERGs) sont faits sur le HM_sERG system (HM_sERG Model 2000, Ocuscience® Henderson, Nevada, USA), sur des souris préalablement adaptées à l'obscurité. L'ensemble de l'expérience est réalisé sous lumière rouge pour ne pas perturber l'adaptation des souris. Avant le protocole, les pupilles sont dilatées avec une goutte d'atropine déposée sur la cornée avant anesthésie. Les souris sont ensuite anesthésiées et du gel ophtalmique est mis sur les yeux pour éviter leur dessèchement. Différentes électrodes sont placées en sous-cutané ; une pour le bruit de fond est placée au niveau de la queue et des électrodes de références sont placées au niveau des joues (une de chaque côté). Les électrodes d'enregistrements sont placées sur la cornée, une sur chacun des deux yeux de la souris (Figure 20). Le protocole d'ERG scotopique est ensuite réalisé, les souris sont soumises à des flashes lumineux d'intensité croissante (de 0,1 à 25cd.s/m²). Après le protocole, la souris est réveillée et maintenue au chaud comme précédemment. L'amplitude de l'onde a est ensuite mesurée.

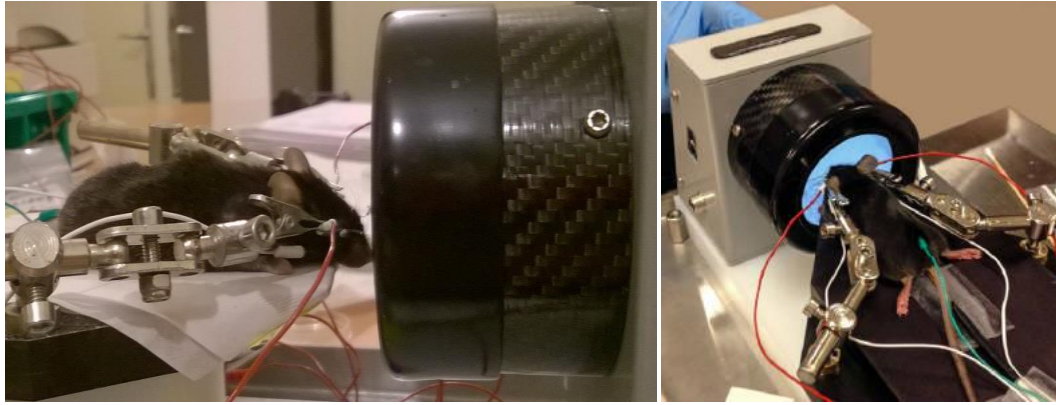


Figure 19 : Photographies du dispositif utilisé (photo de droite d'OcuScience®)

V. Histologie

A. Prélèvement et inclusions des échantillons

Les yeux sont prélevés après sacrifice des souris. Une marque au marqueur est faite sur la cornée, du côté nasal de l'œil afin de maintenir l'orientation. L'œil est ensuite disséqué dans du milieu adapté (milieu de Ame's supplémenté en glucose), la partie antérieure de l'œil (cornée et lentille) est ensuite enlevée. L'œil est ensuite fixé dans de la formaline 4% puis cryoprotégé par des bains successifs dans des solutions de concentrations croissantes en sucrose (de 10%, 20% et 30%, pendant 1h, 2h et sur la nuit respectivement). Cette étape permet de protéger les tissus et maintenir leur intégrité lors de la congélation. Elles sont ensuite incluses en OCT™ (Optimal Cutting Temperature Compound™) et congelées sur de l'heptane (100%) placé dans l'azote liquide avant d'être coupées au cryostat (à 10µm).

B. Immunofluorescence

L'immunofluorescence est une technique de marquage fluorescent de protéines d'intérêt permettant ainsi leur visualisation au sein des tissus avec un microscope à fluorescence.

Pour les immunofluorescences, les cryosections sont lavées à l'eau pendant 15 min puis au PBS 5 min. Elles sont ensuite fixées 3min à la formaline 4%, après 3 lavages au PBS 1X.

Puis, elles sont perméabilisées 5min avec 0,01% de Triton 100X dilué dans du PBS 1X puis bloquée avec de la BSA1% (dans du PBS 1X). Les anticorps primaires sont dilués dans la solution de blocage et incubés sur la nuit à 4°C. Après plusieurs lavages au PBS 1X, les anticorps secondaires sont dilués dans la solution de blocage et incubés 1h à température ambiante. Un marquage nucléaire au DAPI pendant 5min est fait. Les lames sont ensuite montées avec le Vectashield® Mounting Medium. Les images sont obtenues et analysées sur le Zeiss Imager Z2 microscope avec ZEN 2012 software.

C. Microscopie Electronique à Transmission (M.E.T)

Les échantillons sont disséqués comme précédemment puis fixés par immersion dans du glutaraldéhyde 2.5% et para-formaldéhyde 2.5% dans du cacodylate (0.1M, pH7.4). Les échantillons sont ensuite traités à la plateforme de microscopie de l'Institut de Génétique et Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC, Illkirch-Graffenstaden, France). Ils sont post-fixés dans du tétroxyde d'osmium 1% dans du cacodylate 0.1M pendant 1h à 4°C. Ils sont ensuite déshydratés par des bains successifs d'alcool (50, 70, 90,100%) et oxyde de propylène de 30 min chacun. Les échantillons sont inclus dans Epon™ 812. Des coupes semi fines de 2µm sont ensuite réalisées sur un ultra microtome. Elles sont marquées au bleu de toluidine et analysées au microscope optique. Sur ces images, les mesures des différentes épaisseurs de la rétine ont été faites ainsi que le compte du nombre de noyaux de l'ONL.

Des coupes ultra-fines de 70nm sont également faites puis contrastées avec de l'acétate d'uranyl et citrate de plomb et analysées sur un microscope électronique. Sur les images obtenues, la dilatation du réticulum endoplasmique sera mesurée comme marqueur de stress de celui-ci²⁶⁷.

VI. Extraction d'ARN et PCR quantitative

La PCR quantitative est une technique permettant de mesurer les niveaux d'expression au niveau transcriptomique de gènes d'intérêt. Elle est réalisée sur de l'ADNc obtenu à partir d'ARN extrait des tissus. La qPCR fonctionne selon le même principe que la PCR, par

amplification d'ADN à partir d'amorces spécifiques du gène selon des cycles de dénaturation, hybridation et élongation. La différence avec une PCR est la présence d'une sonde fluorescente, qui sera incorporée (dans le cas du SYBRGreen) ou relarguée (c'est le cas des sondes TaqMan) lors de l'élongation. A chaque cycle, la fluorescence est mesurée. L'amplification étant exponentielle, on obtient alors des courbes sigmoïdes qui permettent de quantifier les niveaux d'expression.

A. Extraction des ARN et synthèse d'une banque d'ADNc

Les rétines sont disséquées comme précédemment puis l'épithélium pigmentaire (RPE) et le nerf optique sont enlevés afin d'isoler la rétine. L'extraction d'ARN est faite en broyant la rétine dans du trizol. Cette méthode d'extraction permet sur un échantillon de séparer les ADN, les ARNs et les protéines, son principe repose sur les propriétés de ces différentes molécules. A pH acide les acides nucléiques sont séparés, les ARNs se trouvent dans la phase aqueuse alors que les ADNs se trouvent dans la phase organique. La phase aqueuse est alors récupérée et les ARN précipités. Un traitement à la DNase est réalisé pour enlever toute trace d'ADN génomique qui pourrait rester suite à l'extraction. La concentration en ARN est mesurée par mesure de l'absorbance à 260nm. Et un dépôt sur gel d'agarose est fait pour s'assurer de l'intégrité de l'ARN, sur gel seront visibles des bandes correspondantes aux ARN ribosomiques 18S et 28S.

La synthèse d'une banque d'ADNc se fait à partir de l'ARN obtenu, par reverse transcription. A la différence des PCR vu précédemment, elle utilise un mélange d'oligonucléotides comme amorces permettant une amplification de l'ensemble des ARNs présents dans l'échantillon. Elle suit les mêmes cycles que précédemment : une phase de dénaturation suivie d'une phase d'hybridation des amorces puis d'élongation.

B. RT-qPCR

La PCR quantitative est faite en utilisant la méthode du SYBR Green pour laquelle la sonde fluorescence se lie au petit sillon de l'ADN et émet alors de la fluorescence. Celle-ci sera

mesurée à chaque fin de cycle. Le cycle PCR est composé d'une première phase de dénaturation à 95°C pendant 30sec suivie de 39 cycles composés chacun d'une phase à 95°C pendant 5sec puis 60°C pendant 30 sec. La quantification des niveaux d'expression des gènes est faite par la méthode $\Delta\Delta\text{Ct}$ en utilisant le *Gapdh* comme référence.

VII. Mesure des niveaux protéiques : ELISA

L'ELISA est une technique permettant de mesurer la concentration d'une protéine donnée pour un échantillon. Il existe différentes variantes de cette technique (ELISA direct ou indirect, ELISA en sandwich ou ELISA par compétition).

L'extraction des protéines se fait sur rétines isolées de la RPE, les rétines sont disséquées comme précédemment pour l'extraction d'ARN. Pour l'extraction chaque rétine est reprise dans le même volume de PBS1X (sans inhibiteurs de protéases, lesquels pourraient interférer avec les kits). Les rétines sont broyées avant sonication. Les ELISA sont ensuite réalisés en suivant les protocoles des différents fournisseurs. Les ELISA réalisés utilisent le principe de l'ELISA en sandwich dans lequel un anticorps spécifique de la protéine d'intérêt est fixé au support. Des standards de concentration en protéine connue (servant pour faire la gamme étalon) ainsi que les échantillons sont ajoutés. Après une phase d'adsorption où la protéine se fixe aux anticorps, les solutions sont enlevées et une solution contenant des anticorps couplés à une enzyme sont ajoutés. Après avoir enlevé l'excès d'anticorps par différents lavages, une solution contenant le substrat de l'enzyme est ajoutée. La réaction enzymatique produite donne un produit coloré. L'absorbance (à la longueur d'onde indiquée) est ensuite mesurée sur un spectrophotomètre. Pour l'analyse, l'absorbance du blanc est soustraite à l'ensemble des absorbances mesurées. La valeur de celle-ci est proportionnelle à la quantité de protéine dans l'échantillon.

VIII. Analyses statistiques

Pour comparer les groupes deux à deux, deux génotypes ou deux traitements, un test de Student a été réalisé. Pour la comparaison de plus de deux groupes, comparaison des

différents traitements au traitement PBS, un test ANOVA a été utilisé. Toutes les analyses statistiques ont été faites sur le logiciel GraphPad Prism. L'ensemble des données sont représentées avec la moyenne \pm SEM. Une valeur de $p \leq 0.05$ est considérée comme significative et est indiquée par un astérisque.

Résultats

Premier manuscrit:

In vivo phenotypic and molecular characterization of retinal degeneration in mouse models of three ciliopathies

Agnès BRUN, Xiangxiang YU, Cathy OBRINGER, Daniel AJOY, Elodie HASER, Corinne STOETZEL, Michel J. ROUX, Nadia MESSADDEQ, H el ene DOLLFUS, Vincent MARION

Experimental Eye Research, September 2019, 107721

<https://doi.org/10.1016/j.exer.2019.107721>

Synopsis en français du papier de Brun *et al.*, 2019²⁶⁸.

Cette étude se focalise sur la compréhension et la caractérisation des mécanismes physiopathologiques dans les RP associées à différentes ciliopathies : le BBS, l'ACL associée à une mutation du gène *Cep290* et le syndrome d'Alström.

Les ciliopathies sont des maladies dues à un défaut de génèse ou de fonctionnement du cil primaire. La variabilité phénotypique au sein même des ciliopathies laisse à penser que différents mécanismes peuvent être impliqués dans le processus physiopathologique conduisant à la dégénérescence rétinienne. L'un des mécanismes impliqués dans les RP associées aux ciliopathies est dû à un défaut du trafic intraciliaire conduisant l'accumulation de protéines dans le segment interne et à l'activation de l'UPR. Ce mécanisme a été démontré dans un modèle murin du BBS (*Bbs12* KO) dans une étude antérieure de notre laboratoire¹.

L'étude présentée ici avait pour but la compréhension des mécanismes impliqués dans les ciliopathies citées plus haut, à travers différents modèles murins et d'étudier en particulier l'activation, ou non, de l'UPR. La mise en évidence de mécanismes communs à ces différentes pathologies permettrait d'envisager une cible thérapeutique commune et donc un traitement afin de ralentir le processus de dégénérescence rétinienne.

Pour cette étude, deux modèles murins du BBS ont été caractérisés : le modèle *Bbs1* KO et *Bbs10* KO. Les gènes *BBS1* et *BBS10* sont les gènes les plus fréquemment retrouvés dans la pathologie humaine, ils sont impliqués dans deux complexes protéiques différents. BBS1 est une protéine du BBSome, complexe protéique localisé au niveau du corps basal et des centrosomes jouant un rôle d'adaptateur protéique pour le transport intra ciliaire. La protéine BBS10 est impliquée dans un complexe de chaperonnes, dont fait partie également la protéine

BBS12, permettant la formation du BBSome. A côté de ces modèles du BBS, un modèle murin d'une forme ciliaire d'ACL associé au gène *Cep290* (modèle *Cep290* KO) a été caractérisé. La protéine CEP290 est centrosomale, elle est localisée au niveau du cil connecteur. Enfin un modèle murin du syndrome d'Alström, le modèle *fat aussie* (*Alms1^{foz/foz}*), a également été caractérisé. Ce modèle est un modèle spontané de la maladie, porteur d'une délétion de 11 paires de bases dans le gène *Alms1*.

Lors de l'étude, la vitesse de la dégénérescence rétinienne a été évaluée par un test fonctionnel, l'électrorétinogramme, mais également par des analyses histologiques. L'activation de l'UPR a été montrée par augmentation des niveaux transcriptomiques de différents gènes marqueurs de stress du réticulum endoplasmique et également de gènes impliqués dans l'apoptose.

Les résultats obtenus ont permis de mettre en évidence une dégénérescence rétinienne précoce dans les modèles *Bbs10* KO (le modèle *Bbs1* ayant déjà été caractérisé sur le plan phénotypique, seul le modèle *Bbs10* restait à caractériser) et d'ACL. Une diminution de la réponse à l'ERG scotopique dès les premiers mois a été montrée mais également une diminution des épaisseurs de rétine visible dès 14 jours. En revanche, le modèle du syndrome d'Alström ne présente pas d'atteinte aussi précoce, la dégénérescence rétinienne est plus lente avec une diminution de la réponse à l'ERG et des épaisseurs de rétine plusieurs mois après. Associée à ces anomalies de structure de la rétine, une mauvaise localisation de la rhodopsine a été observée au niveau du segment interne et de l'ONL dans les modèles de BBS et d'ACL, à la différence du modèle du syndrome d'Alström dans lequel la rhodopsine se localise correctement au niveau du segment externe des photorécepteurs. Cette localisation correcte de la rhodopsine suggère une absence de défaut au niveau du trafic ciliaire dans ce dernier modèle.

En parallèle de ces résultats, nous avons mis en évidence l'activation de l'UPR dans les différents modèles du BBS, que la protéine mutée fasse partie du complexe de chaperonnes ou du BBSome, mais également une activation dans le modèle d'ACL liée à une mutation de *Cep290*. Dans les deux cas, l'activation de l'UPR est déjà présente 14 jours après la naissance. Là encore, le modèle du syndrome d'Alström diffère des précédents modèles par l'absence d'activation de l'UPR dans ce modèle.

L'ensemble des résultats obtenus montre que des mécanismes physiopathogéniques communs peuvent être impliqués dans la dégénérescence rétinienne associée à différentes ciliopathies.

En effet, par cette caractérisation de différents modèles de ciliopathies, nous avons montré l'activation de l'UPR dans des modèles du BBS (*Bbs1* KO et *Bbs10* KO) mais également dans un modèle d'ACL. D'autres ciliopathies pourraient alors impliquer un mécanisme similaire activant l'UPR, faisant de cette voie de signalisation une cible d'intérêt dans le développement de thérapies.

En revanche, d'autres mécanismes semblent être mis en jeu dans la RP associée au syndrome d'Alström, aucune augmentation de marqueurs de l'UPR ne pouvant être mis en évidence dans le modèle choisi. Une explication serait qu'en absence de défaut de trafic ciliaire, les protéines ne s'accumuleraient pas au niveau du segment interne, n'entraînant pas de stress et donc l'activation de l'UPR. Afin de comprendre les mécanismes impliqués dans cette pathologie, des études complémentaires seraient nécessaires. Néanmoins le phénotype rétinien ne semble pas lié à un défaut ciliaire et questionne quant au classement du syndrome d'Alström en tant que ciliopathie. A l'heure actuelle sa classification comme telle est en effet remise en question par différentes études.

A côté des mécanismes physiopathogéniques, nous avons également montré des différences dans l'âge d'apparition et la vitesse de progression de la dégénérescence rétinienne, avec des implications lors d'un développement thérapeutique. Une atteinte de la rétine extrêmement précoce avec une progression rapide comme dans le cas de l'ACL sera plus compliqué à traiter qu'une maladie ayant une progression lente. L'atteinte sévère observée dans l'ACL ne laisse, au mieux, une fenêtre thérapeutique que de quelques jours dans ce modèle, avant que la dégénérescence ne soit trop avancée. Ce constat a également été fait par Starr et *al.*¹⁰⁴. A l'opposé d'une progression plus lente laisse la possibilité d'une fenêtre thérapeutique plus large.

L'étude contribue à la connaissance générale de ces pathologies et montre l'importance de comprendre les mécanismes impliqués dans chacun des modèles afin de pouvoir développer un traitement approprié. Une meilleure compréhension permettrait également de classer correctement ces pathologies et donc les patients afin pouvoir par la suite leur adresser le traitement approprié.



In vivo phenotypic and molecular characterization of retinal degeneration in mouse models of three ciliopathies



Agnès Brun^{a,1}, Xiangxiang Yu^{a,1}, Cathy Obringer^a, Daniel Ajoy^a, Elodie Haser^a, Corinne Stoetzel^a, Michel J. Roux^b, Nadia Messaddeq^b, Hélène Dollfus^a, Vincent Marion^{a,*}

^aINSERM, Laboratoire de Génétique Médicale, UMR_U1112, Ciliopathies Modeling and Associated Therapies Team (CMAT), Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg (FMTS), Institut de Génétique Médicale D'Alsace (IGMA), Université de Strasbourg, 11 Rues Humann, Bâtiment 3, 67085, Strasbourg, France

^bInstitut de Génétique et Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC), 1 Rue Laurent Fries, 67400, Illkirch-Graffenstaden, France

ARTICLE INFO

Keywords:

Ciliopathies
Unfolded protein response
Retinitis pigmentosa
Bardet-biedl syndrome
Alström syndrome
Leber congenital amaurosis

ABSTRACT

Cilia are highly conserved and ubiquitously expressed organelles. Ciliary defects of genetic origins lead to ciliopathies, in which retinal degeneration (RD) is one cardinal clinical feature. In order to efficiently find and design new therapeutic strategies the underlying mechanism of retinal degeneration of three murine model was compared. The rodent models correspond to three emblematic ciliopathies, namely: Bardet-Biedl Syndrome (BBS), Alström Syndrome (ALMS) and CEP290-mediated Leber Congenital Amaurosis (LCA). Scotopic rodent electroretinography (ERG) was used to test the retinal function of mice, Transmitted Electron microscopy (T.E.M) was performed to assess retinal structural defects and real-time PCR for targeted genes was used to monitor the expression levels of the major apoptotic Caspase-related pathways in retinal extracts to identify pathological pathways driving the RD in order to identify potential therapeutic targets. We found that BBS and CEP290-mediated LCA mouse models exhibit perinatal retinal degeneration associated with rhodopsin mislocalization in the photoreceptor and the induction of an Endoplasmic Reticulum (ER) stress. On the other hand, the tested ALMS mouse model, displayed a slower degeneration phenotype, with no Rhodopsin mislocalization nor ER-stress activity. Our data points out that behind the general phenotype of vision loss associated with these ciliopathies, the mechanisms and kinetics of disease progression are different.

1. Introduction

Ciliopathies, a group of rare genetic diseases, can be either of non-syndromic or syndromic nature in which retinal degeneration (RD) is a cardinal clinical feature (Bujakowska et al., 2017; Estrada-Cuzcano et al., 2012). Ciliopathies contain a spectrum of disorders ranging from isolated RD such as in a sub group of Leber Congenital Amaurosis (LCA) (i.e: Cep290), to complex syndromes with multiple organs dysfunction such as, for example, Bardet-Biedl Syndrome (BBS), Alström Syndrome (ALMS) and the lethal manifestations in the Meckel-Gruber syndrome (Adams et al., 2007; Mockel et al., 2011; Waters and Beales, 2011). These syndromes are caused by mutations in different genes coding for proteins with distinct roles and cellular localizations within the ciliated cells (Cui et al., 2013; Estrada-Cuzcano et al., 2012; Knorz et al., 2010; Reiter and Leroux, 2017). Interestingly, the retinal degeneration presents in many ciliopathies is often of early onset leading to severe visual

impairment but can exhibit variable progression phenotypes. For example, RD is characterized by an initial photophobia with nystagmus in Alström syndrome in the first months of life, whereas the first symptoms will be evident only after a few years with nyctalopia and visual field deficiency in BBS (Hamel, 2006; May-Simera et al., 2017). The fact that such differences exist in the RD progression combined with the myriads of mutated genes, lead us to hypothesize that there might be different mechanisms at play at the level of the photoreceptor cell in these different ciliopathies. In view of the heterogeneity, the large number of genes and mutations involved in RD, identifying such mechanistic differences behind these retinal phenotypes is of prime importance in order to properly stratify the patients with future appropriate therapy.

Currently, there is no treatment available for RD; one clinical trial showed the efficacy of gene therapy in LCA (Russell et al., 2017) but it is specific of RPE65 gene mutations. The identification of common

* Corresponding author. INSERM, Ciliopathies Modeling and Associated Therapies Team (CMAT), Laboratory of Medical Genetics (UMRs_U1112), Faculty of Medicine, 11 Rue Humann, Bldg. 3, 9th floor, Room 917, 67085, Strasbourg, France.

E-mail address: vincent.marion@unistra.fr (V. Marion).

¹ These authors contributed equally to the manuscript.

<https://doi.org/10.1016/j.exer.2019.107721>

Received 25 June 2018; Received in revised form 29 May 2019; Accepted 8 July 2019

Available online 11 July 2019

0014-4835/© 2019 The Authors. Published by Elsevier Ltd. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license

(<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Table 1
Primers for genotyping PCR.

Gene	Oligo name	Sequence(5'-3')
Bbs10	4054	ACA AAT ACA ATT GAT CAT CGA TGT G
Bbs10	4057	ACC TCC CCA CTT GAA CGA GGT CT
Bbs10	4058	GTT GCC TGG CTT GGG TGG CA
Cep290	M11336	TGG AAG ACC AGG CTT CAG AG
Cep290	M11340	GGC TCA CTG TGA TCT TGT GC
Cep290	W11338	GTA AGT GCC CGA CAG CTA CC
Cep290	W11339	AGC GCA GTG CAG AGT ATG TG
Rd8	F1	GTGAAGACAGCTACAGTTCTGATC
Rd8	R	GCCCCATTTGCACACTGATGAC
Rd8	F2	GCCCCGTGTTGCATGGAGAACTTGAAGACAGCTACAGTTCTCTCTG
Alms	Forward	ACA ACT TTT CAT GGC TCC AGT
Alms	Reverse	TTG GCT CAG AGA CAG TTG AAA

mechanisms could allow the development of therapeutics applicable to RD regardless of the affected gene and the type of mutation. RD in the ciliopathies is linked to the structure of the photoreceptor itself. The photoreceptors outer segment is connected to the inner segment via the connecting cilium (May-Simera et al., 2017; Sjostrand, 1953). This connecting cilium is a protein highway that allows the efficient connection between the biosynthetic active inner segment and the light detecting outer segment for the visual process to start upon photonic impulse. In ciliopathies, ciliary proteins are defective and therefore are no longer able to play their respective roles in the photoreceptor. One of the commonly associated mechanism to photoreceptor apoptosis in the ciliopathies is a defective intraflagellar transport (IFT) of proteins between the two segments (Wright et al., 2010). This defect ultimately causes protein accumulation in the IS, which in turn triggers a pro-apoptotic unfolded protein response (UPR) associated with an ER-stress (Mockel et al., 2012; Starr et al., 2018). Previously, we have proved that UPR activation occurs in a Bbs12 model, leading us to develop a pharmacological approach (GIVin). The treatment slowed RD in our mouse model (Mockel et al., 2012). Other studies targeting non-ciliopathy models have also shown that UPR is an interesting pathway to target in slow RD presenting ER stress. However, RD mechanisms for other emblematic ciliopathies still need to be characterized. We therefore used mice models for three iconic ciliopathies namely BBS, LCA (CEP290) and ALMS to analyze and compare their respective retinal phenotypes while measuring the key components of the UPR pathway.

To date 21 genes (*BBS1-BBS21*) have been identified in BBS (Heon et al., 2016). Half of these proteins are involved in two major BBS protein complexes, the Bbsome complex containing 7 of the BBS proteins (BBS1, 2, 4, 5, 7, 8 and 9) (Nachury et al., 2007) and the BBS-chaperone complex containing three BBS proteins (BBS 6, 10 and 12) (Seo et al., 2010). The pro-apoptotic mechanism of RD associated with Bbs12 has already been characterized in a mouse model (Mockel et al., 2012) and apoptosis was shown to be induced by a deleterious protein accumulation in the IS, leading to the activation of the UPR pathways. We, therefore, determined whether the other BBS proteins could induce the same type of events leading to RD. In the LCA model we studied the centrosomal protein 290 (CEP290), also known as the LCA10 protein, mutations in this gene may lead to various ciliopathies and remarkably a recurrent mutation in intron 26 of CEP290 is a frequent cause of LCA (Garanto et al., 2015). CEP290 protein is known to be involved in photoreceptor development and when mutated leads to early-onset retinal degeneration (Garanto et al., 2015). Finally, in ALMS, only one gene (*ALMS1*) has been identified to date. In human patients, ALMS is characterized by early onset cone-rod dystrophy leading to blindness but the mechanism behind this phenotype remains elusive (Marshall et al., 2007).

2. Material and methods

2.1. Generation of knockout mice and animal husbandry

All experimental procedures were approved by the local ethical committee of Strasbourg University. *Bbs1*^{M390R/M390R} (henceforth *Bbs1*^{-/-}), *Bbs10*^{-/-}, *Cep290*^{-/-} and *Alms*^{foz/foz} mice with their control wild type littermates were generated as described previously (Arsov et al., 2006; Cognard et al., 2015; Davis et al., 2007; Mockel et al., 2012). Stock *Cep290*^{tm1.1Jgg/J} mice were developed by replacing exons 36, 37 (schematic representation of the mutated allele in Supplementary Fig. 1). Relevant mouse models were bred on a C57BL/6N background and crossbreeding with the C57BL/6J strain to remove the strain-associated interfering Rd8 mutation which interferes with the retinal phenotype (Mattapallil et al., 2012). Mice were kept and bred in humidity- and temperature-controlled rooms on a 12 h light/dark cycle on normal chow and water *ad libitum*. PCR-genotyping were carried out using KAPA Mouse Genotyping Kit (Catalog#KK7302, Kapa Biosystems, Woburn, Massachusetts, USA), primers used for genotyping are listed in Table 1 in supplementary data.

2.2. Electroretinogram

Electroretinograms (ERGs) were performed at the indicated time points with the HMsERG system (Ocuscience®, Kansas City, Missouri, USA). Mice were dark-adapted overnight and then anesthetized by intraperitoneal injection of Domitor® (Medetomidine, 7.6 µg/g body weight) and Ketamine (760 µg/g body weight). The experiments were carried out in dim red light (Catalog #R125IRR, Philips, Suresnes, France). ERGs standard procedure was used according to manufacturer's protocol (Ocuscience®, Kansas City, Missouri, USA). Briefly, the protocol consisted in recording a dark-adapted ERG (Scotopic ERG) after photonic stimuli with intensities ranging from 0.1 to 25 cd s/m². ERG results were amplified and captured digitally by ERG View system 4.3 (Ocuscience®, Kansas City, Missouri, USA). The a-wave (corresponding to the first negative deflection) for the scotopic responses was recorded and analyzed.

2.3. Histology and immunofluorescence

Eyeballs were harvested after ERG examination and were fixed 1 h in 4% formalin (Catalog#F5554-4L, Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Missouri, USA) at 4 °C, and then incubated sequentially in 10%, 20% and 30% sucrose solutions for 1 h. Eyeballs were then transferred into Optimal Cutting Temperature Compound™ (OCT™, Catalog# 4583, Tissue-Tek® OCT™, Sakura® Finetek, Torrance, California, USA) and frozen in liquid nitrogen. 7 µm cryosections were cut with Cryostat Leica CM1950 (Catalog# 14 0477 8001, Leica Biosystems, Wetzlar, Germany). Eye sections were treated for Haematoxylin-Eosin staining. The thickness of photoreceptor (ONL), inner nuclear layer (INL), outer

Table 2
Antibodies used.

Antibodies	Catalog	Company
Rhodopsin mouse monoclonal	MAB5316	Chemicon
Goat-anti mouse Alexa Fluor® 594	A-11032	Invitrogen

segment (OS) and inner segment (IS) were measured five times at 100 µm regular intervals, the first one was measured at 500 µm distance from the optic nerve. For immunofluorescence, cryosections were post-fixed in 4% formalin for 3 min and then permeabilized with 0.01% TritonX-100 in PBS (Catalog #ET330, Euromedex, France) for 5 min. Sections were incubated 30 min in 1%BSA (Catalog #A7030-100G, Sigma-Aldrich, USA) in PBS at room temperature, then incubated overnight with primary antibodies diluted in blocking buffer at 4 °C. Sections were then incubated for 1 h at room temperature with the secondary antibody. Nuclei were counterstained with Hoechst (#D1306, Invitrogen, Carlsbad, California, USA). Slices were then mounted with Vectashield® Mounting Medium (Catalog #H-1000, Vector Laboratories, Burlingame, California, USA). Images were acquired on a Leica SP8 confocal microscope with either a HC PL APO CS2 63x/1.40 or 40x/1.30 oil immersion lens, driven by the LAS X software (Leica, Weitzlar, Germany). Antibodies used are listed in Table 2 in supplementary data.

2.4. Transmission electron microscopy (T.E.M.)

The samples were fixed by immersion in 2.5% Glutaraldehyde and 2.5% Para-formaldehyde in Cacodylate buffer (0.1M, pH 7.4), post fixed in 1% osmium tetroxide in 0.1M Cacodylate buffer for 1 h at 4 °C and then dehydrated through graded alcohol (50, 70, 90, 100%) and propylene oxide for 30 min each. Samples were embedded in Epon™ 812 (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Missouri, USA). Semi-thin sections were cut at 2 µm with an ultra-microtome (Leica Ultracut UCT, Leica Biosystems, Wetzlar, Germany) and stained with Toluidin blue, and histologically analyzed by light microscopy. Ultrathin sections were cut at 70 nm and contrasted with uranyl acetate and lead citrate and examined at 70 kV with a Morgagni 268D electron microscope. Images were captured digitally by Mega View III camera (Soft Imaging System). The thickness of the photoreceptor ONL, INL and OS + IS were measured five times at 100 µm regular intervals on Toluidin blue stained sections, 3 mice were used for per genotype. Nuclei of ONL were counted, on Toluidin blue stained sections. At least 20 rows were counted in each section and 3 eyes were used for each genotype.

2.5. RNA extraction and real-time PCR

Retinal tissues were harvested as previously described (Mockel et al., 2012). RNA extraction was performed using Trizol® reagent (Catalog #15596-018, Invitrogen®, Life Technologies™, Carlsbad, California, USA) and Tissue Ruptor® (Catalog #9001272, Qiagen, Venlo, Nederland). RNA samples were treated with DNase (TURBO™ DNA-free Kit, Catalog #AM1907, Ambion®, Life Technologies™, Carlsbad, California, USA) prior to reverse transcription using the iScript® cDNA synthesis kit (Catalog#170–889, BioRad, USA). Self-design primers were purchased from Sigma-Aldrich. Quanti-tech Primers were purchased from Qiagen, Courtaboeuf, France (Table 3). Real-Time PCR was performed using the iQ SYBR® Green Supermix (Catalog#170–8886, BioRad, USA) on C1000TM thermo-cycler (CFX96, Real-Time System, Bio-Rad, USA). Real-time PCR was carried out according to the following cycle: initial hold at 95 °C for 30 s and then 39 cycles at 95 °C for 5s and 60 °C for 30s. Quantitative gene expression was calculated by the 2^{ΔΔCt} method relative to the reference gene, *Gapdh*. Primers used for real-time PCR are listed in Table 3 in supplementary data.

Table 3
Primers used for real-time PCR.

Gene	Reference	Company
Mu-Bbs10-Rt-F1	TGCTTAGCAGGGATGGAG	Sigma-Aldrich
Mu-Bbs10-Rt-R1	TTGAGAGCCCTGGGAAATAG	Sigma-Aldrich
Alms1 F	CTGATTTCGCTTTGCTGACA	Sigma-Aldrich
Alms1 R	GCCCTCTGTAAGTGGATGC	Sigma-Aldrich
Caspase3	Mm_Casp3_2_SG QT01164779	Qiagen
Caspase6	Mm_Casp6_2_SG QT00494921	Qiagen
Caspase7	Mm_Casp7_1_SG QT01058085	Qiagen
Caspase9	Mm_Casp9_1_SG QT00133280	Qiagen
Caspase12	Mm_Casp12_2_SG QT00495376	Qiagen
Bip	Mm_Hspa5_1_SG QT00172361	Qiagen
Chop10	Mm_Ddit3_2_SG QT01749748	Qiagen
Perk	Mm_Eif2ak3_1_SG QT00147329	Qiagen
Gapdh	Mm_Gapdh_3_SG QT01658692	Qiagen

2.6. Organotypic culture

The retinas were transferred, with retinal pigmented epithelium side down, to a nitrocellulose culture membrane (catalogue number PICMORG50; Millipore, Molsheim, France) and cultivated as previously described (Mockel et al., 2012). Specific gene silencing with lentiviruses that carried a shRNA sequence for *Alms1* (catalogue numbers sc-108080 (*Ctl*), sc-72345-V (*Alms1*)); Santa Cruz Biotechnology, Tebu Bio, Yvelines, France) was performed by adding 20 µl of a viral suspension containing 10⁵ infectious units to the culture medium overnight. The infected explants were then washed and cultured for 3 days, with half the medium refreshed daily. Explants were not maintained longer in culture to avoid unspecific apoptosis in the different retinal layers.

2.7. Statistical analysis

Student's t-test (two-tailed) was applied to all data (two samples). Statistical tests were performed using GraphPad/Prism version 5. All data in bar charts show mean ± SEM. p < 0.05 is considered to have significant differences.

3. Results

3.1. *Bbs* classical retinal apoptotic phenotype

To assess if mutations in other BBS proteins were inducing RD through the same pro-apoptotic pathophysiological mechanism as the one associated with *Bbs12* (Mockel et al., 2012), two BBS models, *Bbs10*^{-/-} mice model and *Bbs1*^{M390R/M390R} mice model have been characterized and compared. The retinal phenotype for *Bbs1*^{M390R/M390R} has been previously characterized (Davis et al., 2007). In both mice models, histology and RNA analysis were performed on 14-days-old retinas and ERG were performed on 3-month-old mice. 3-month-old *Bbs10*^{-/-} mice showed a significant decrease in light detection capacity measured by ERG compared to control mice (Fig. 1A). Toluidin-blue staining showed that 14-days-old *Bbs10*^{-/-} retina present a significant reduction of the retinal thickness in IS, OS, ONL and INL compared to wild type mice (Fig. 1B, Supplementary Fig. 2A) associated to a decreased of the number of ONL nuclei (Supplementary Fig. 2A). The outer and inner segments of the photoreceptors are completely disorganized but with a correctly formed axonemal microtubules in the connecting cilium as observed by T.E.M (Fig. 1B, Supplementary Fig. 2B) and previously described in *Bbs10*^{-/-} mice (Cognard et al., 2015) and in other BBS mouse models (Davis et al., 2007; Dilan et al., 2018; Hsu et al., 2017; Mockel et al., 2012). In 14-days-old *Bbs10*^{+/+} control retinas, rhodopsin was localized in the OS, while rhodopsin is mislocalized in the IS and the ONL in *Bbs10*^{-/-} retinas (Fig. 1C, Supplementary Fig. 2C). The mRNA levels of key UPR proteins were

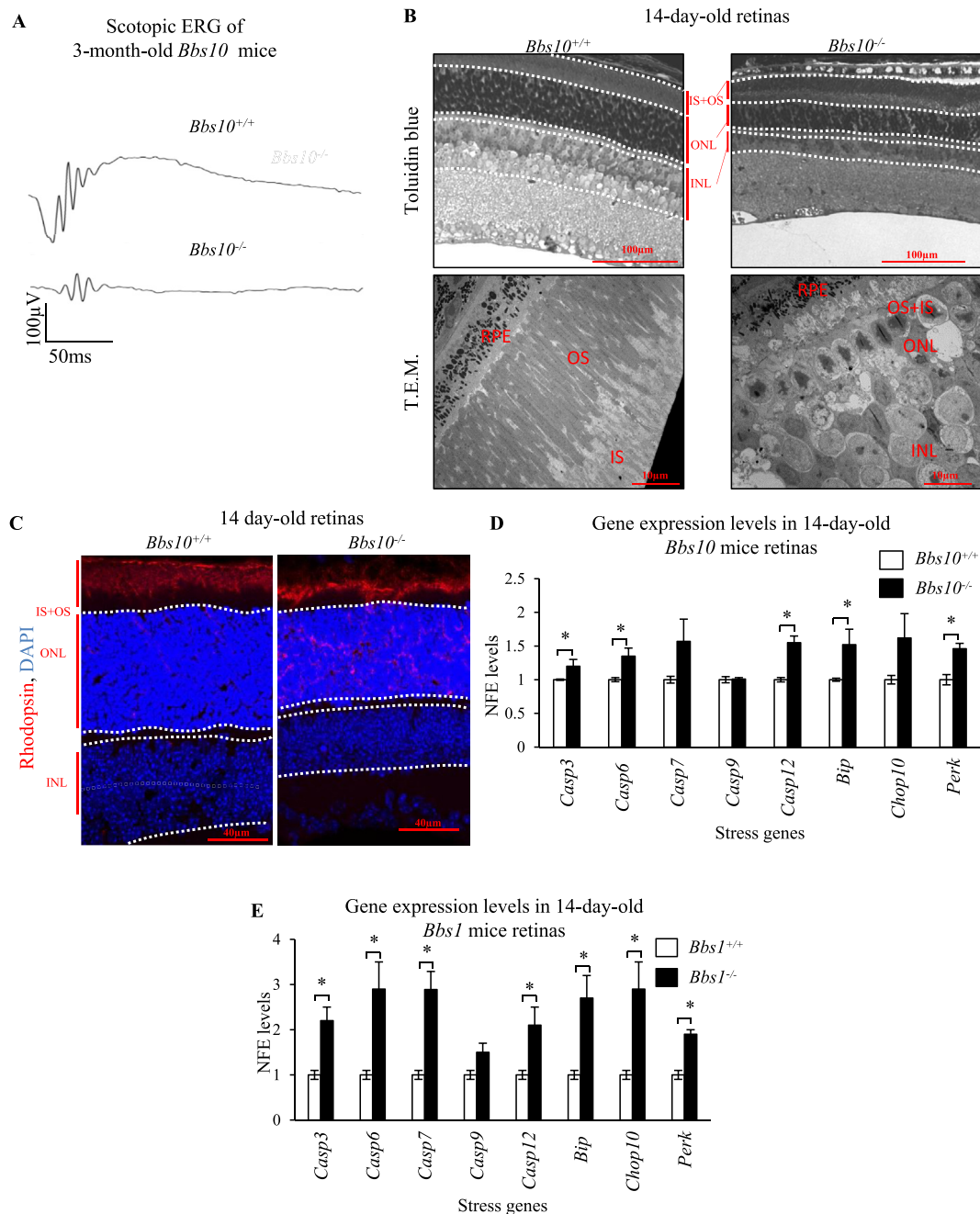


Fig. 1. Retinal phenotype and molecular characterization of *Bbs10* and *Bbs1* mice.

A) Scotopic ERG of 3-month-old *Bbs10* mice (n = 5), *: P ≤ 0.05; B) Toluidin blue staining (Scale bar: 100 μm) and transmission electron microscope (T.E.M.) (Scale bar: 10 μm) of 14-day-old *Bbs10* mice retinas (n = 3). RPE: Retinal Pigment Epithelium, OS: Outer Segment: IS: Inner segment, ONL: Outer Nuclear Layer, INL: Inner Nuclear Layer; C) Immunofluorescence of rhodopsin (red) and counterstained nuclei in DAPI on 14-day-old *Bbs10* mice. (n = 3) (Scale bar: 40 μm); D) Stress genes normalized fold expression (NFE) in 14-day-old *Bbs10* mice (n = 3), *: P ≤ 0.05; E) Stress genes NFE in 14-day-old *Bbs1* mice (n = 3), *: P ≤ 0.05. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

measured in 14-day-old *Bbs10*^{-/-} mice retinas. Endoplasmic reticulum (ER) stress genes such as *Bip* and *Perk*, are significantly increased in *Bbs10*^{-/-} mice retinas. *Caspase 12* along with other caspase effectors like *Caspase 3* and *Caspase 6* are also significantly increased (Fig. 1D). Similarly, we characterized the *Bbs1*^{-/-} mice to confirm the UPR activation as a common mechanism in BBS models. The *Bbs1*^{-/-} mouse model (Davis et al., 2007) exhibits similar retinal degeneration as the other tested BBS model (*Bbs10* and 12) (Mockel et al., 2012). The UPR-related set of genes was also upregulated in the 14-day-old *Bbs1*^{M390R/M390R} retina (Fig. 1E) as in *Bbs10*^{-/-} retina. These data indicate that the inactivation of the BBS1 protein of the Bbsome triggers the same

pro-apoptotic pathway as BBS10.

3.2. LCA-Cep290-mouse model shares the same pro-apoptotic, UPR-mediated mechanism with the Bbs

To verify if this LCA mouse model could share the same pro-apoptotic mechanism as BBS as part of the ciliopathy family, the same experimental approach than BBS was used. At 1-month-old, no ERG signal was detected in *Cep290*^{-/-} mice. (Fig. 2A). Histological studies at 14 postnatal days on Toluidin-blue stained sections showed a disruption and thinning of retinal layers (IS/OS and ONL) in the *Cep290*^{-/-} retina

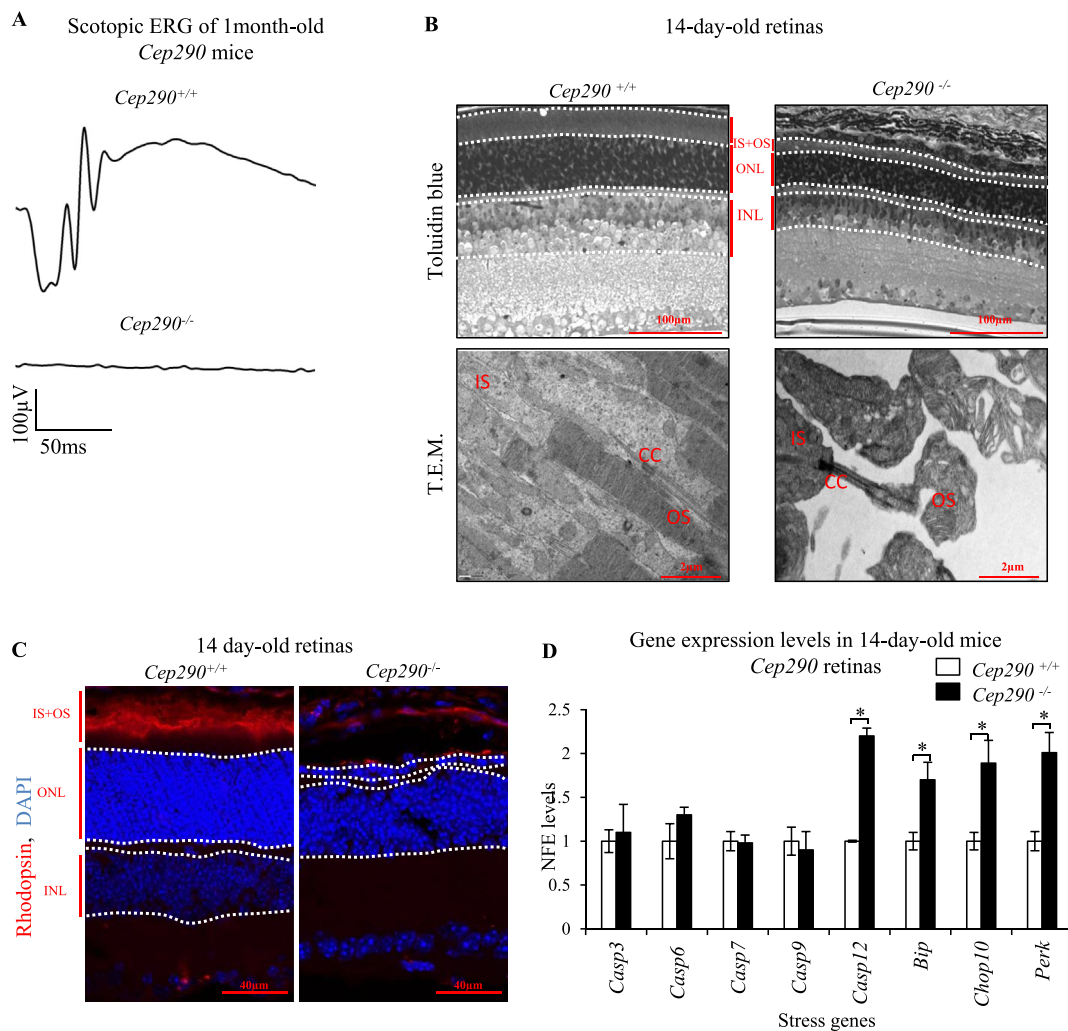


Fig. 2. Retinal phenotype and molecular characterization of *Cep290*^{-/-} mice.

A) Scotopic ERG of 1-month-old *Cep290* mice (n = 3); B) Toluidin blue staining (Scale bar: 100 μm) and T.E.M (Scale bar: 2 μm) of 14-day-old *Cep290* mice retinas. (n = 3) OS: Outer Segment; IS: Inner segment, ONL: Outer Nuclear Layer, INL: Inner Nuclear Layer, CC: Connecting Cilium; C) Immunofluorescence of rhodopsin (red) and counterstained nuclei in DAPI on 14-day-old *Cep290* mice. (n = 3) (Scale bar: 40 μm). The space between the RPE and the OS is due to a detachment of the RPE during preparation.; D) Stress genes NFE in 14-day-old *Cep290* mice retinas *: $P \leq 0.05$. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

(Fig. 2B, Supplementary Fig. 3A). A decrease of nuclei number in the ONL of *Cep290*^{-/-} retina has been observed but it was not statistically significant. T.E.M. analysis revealed the presence of a normal axonal microtubules of the connecting cilium without intact photoreceptors outer segment (Fig. 2B, Supplementary Fig. 3B), which correlates with no ERG signal in *Cep290*^{-/-} mice. On 14-day-old *Cep290*^{+/+} control retinas, immunostaining for rhodopsin showed that rhodopsin localizes in the OS. In contrast, on 14-day-old *Cep290*^{-/-} retinas, rhodopsin was observed in the limits between IS and ONL and in the ONL (Fig. 2C, Supplementary Fig. 3C). The exact location is complicated pinpoint as the IS and OS are severely decreased. At this same age, an upregulation of key genes of the UPR pathway namely *Bip*, *Chop10*, *Perk* and *Caspase12* (Fig. 2D) is also observed in the retinas of *Cep290*^{-/-} mice.

3.3. *Alms1*^{foz/foz} retinal degeneration phenotype

Next, we focused on the retinal phenotype associated with the ALMS syndrome. We investigated the retinal phenotype in the spontaneous mutant mouse line, the Fattie Aussie mouse (*Alms1*^{foz/foz}) (Arsov et al., 2006). Interestingly, the ERG measurements in 1-month-old *Alms1*^{foz/foz} mice did not present any significant attenuation of scotopic ERG

responses compared to wild type mice at the same age (Fig. 3A). The ERGs were consistent with the retinal morphology; no difference in retinal thickness was observed in 1-month-old *Alms1*^{foz/foz} versus control *Alms1*^{+/+} on retinas H&E staining (Fig. 3B and C). On the other hand, flat electroretinograms were obtained in 1-year-old *Alms1*^{foz/foz} (Fig. 3D), suggesting a slow degenerative process of the retina. Concomitantly, significant thinning of the IS/OS and ONL was measured in 1-year-old *Alms1*^{foz/foz} (Fig. 3E and F). In order to identify any temporal tipping point in the ALMS-related retinal phenotype, we monitored the a-wave amplitude of scotopic ERGs, through time over a 9-month period (Fig. 3G). Interestingly, the a-wave amplitude of the *Alms1*^{foz/foz} rapidly decreased through time. By plotting the a-wave amplitude evolution for the two genotypes, we identified an intersecting point at 7 weeks. We thus started focusing on the *Alms1*^{foz/foz} retinas at 7 weeks postnatal. T.E.M analysis of the *Alms1*^{foz/foz} photoreceptors revealed swelling of the IS together with the presence of vacuoles in the cytoplasm as indicated by asterisks (Fig. 4A) and an intact axonemal structure of the connecting cilium in photoreceptors (Supplementary Fig. 4A). Rhodopsin transport was maintained in *Alms1*^{foz/foz} retina, as rhodopsin was primarily detected in the OS of the photoreceptor (Fig. 4B, Supplementary Fig. 4B). Real-time PCR on the 7-week-old

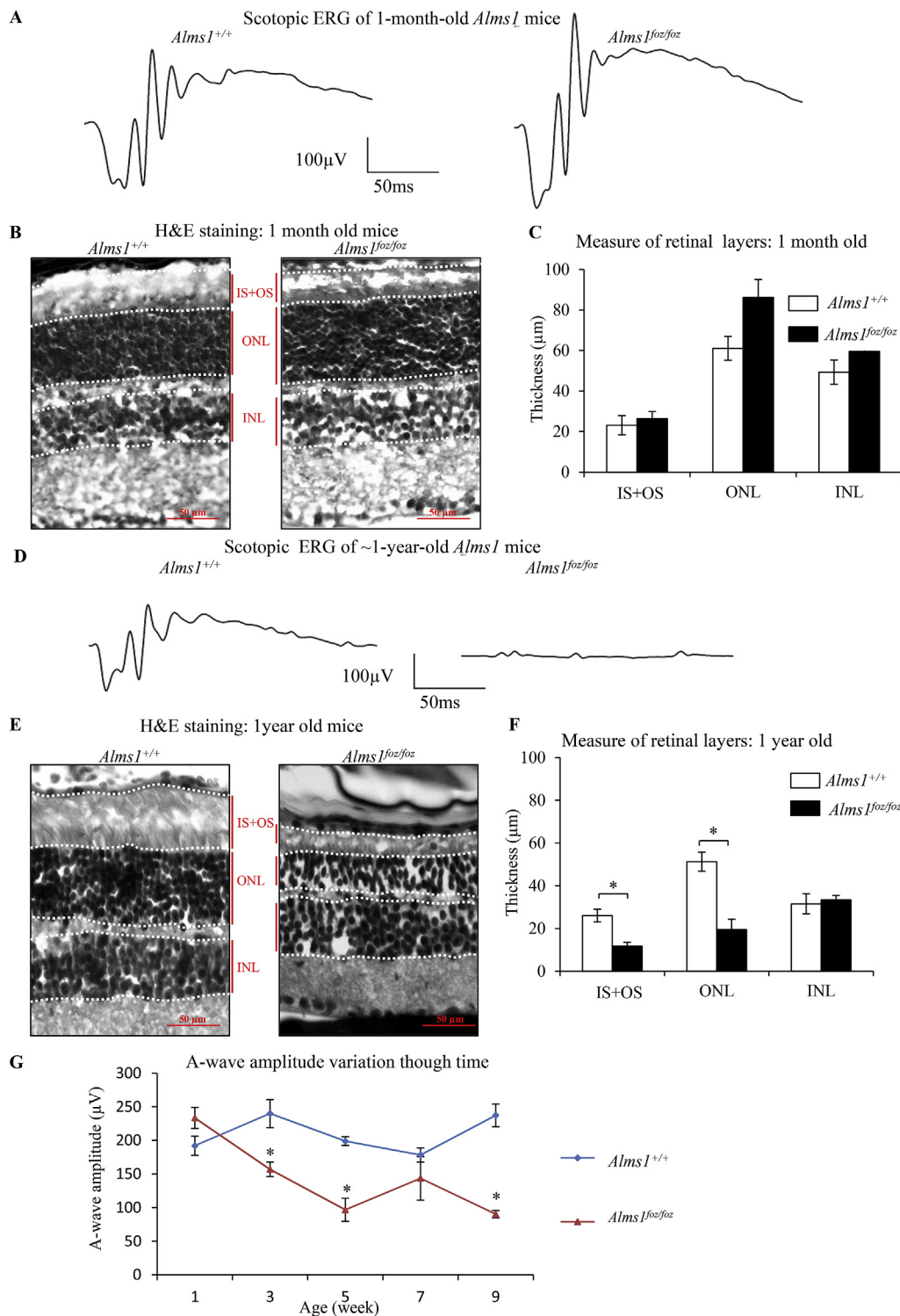


Fig. 3. Retinal phenotype and molecular characterization of *Alms1*^{foz/foz} mice.

A) Scotopic ERGs recording showed retinal function of *Alms1*^{+/+} and *Alms1*^{foz/foz} mice at 1 month-old. B&C). H&E staining (Scale bar: 50 μm) and retinal thickness measurement of 1 month-old *Alms1*^{+/+} and *Alms1*^{foz/foz} mice retinas (n = 3). OS: Outer Segment; IS: Inner segment, ONL: Outer Nuclear Layer, INL: Inner Nuclear Layer; D) Scotopic ERGs recording showed retinal function of *Alms1*^{+/+} and *Alms1*^{foz/foz} mice at 1-year-old. E& F) H&E staining (Scale bar: 50 μm) and retinal thickness measurement of 1-year-old *Alms1*^{+/+} and *Alms1*^{foz/foz} mice retinas (n = 3), *; P ≤ 0.05. G) Evolution of the ERG a-wave amplitude as a function of age for *Alms1*^{+/+} and *Alms1*^{foz/foz} mice.

retinas for the key UPR genes did not show any significant difference in expression level in *Alms1*^{foz/foz} (Fig. 4C) suggesting that the associated phenotype was not linked to the UPR pathways.

Next, we used the organotypic culture approach and culture 14-day-old WT retinas to knock-down *Alms1* using a lentiviral approach as previously performed (Mockel et al., 2012). 3 days post-infection, real-time PCR analysis showed a 40% decrease in *Alms1* expression level (Fig. 4D) with no difference in expression level of the key UPR-related genes (Fig. 4E) as expected without total absence of *Alms1*. The ALMS-mediated retinal degeneration in the *Alms1*^{foz/foz} mice is not primarily

UPR-related.

4. Discussion

RD associated with ciliopathies leads to major visual impairment and understanding the underlying pathogenesis is a prerequisite to define therapeutic options. Describing the pro-apoptotic mechanism underlying ciliopathy-related RD will help to design the therapeutic agents that could hamper the degeneration. With this aim, we studied different murine models for three emblematic ciliopathies, and

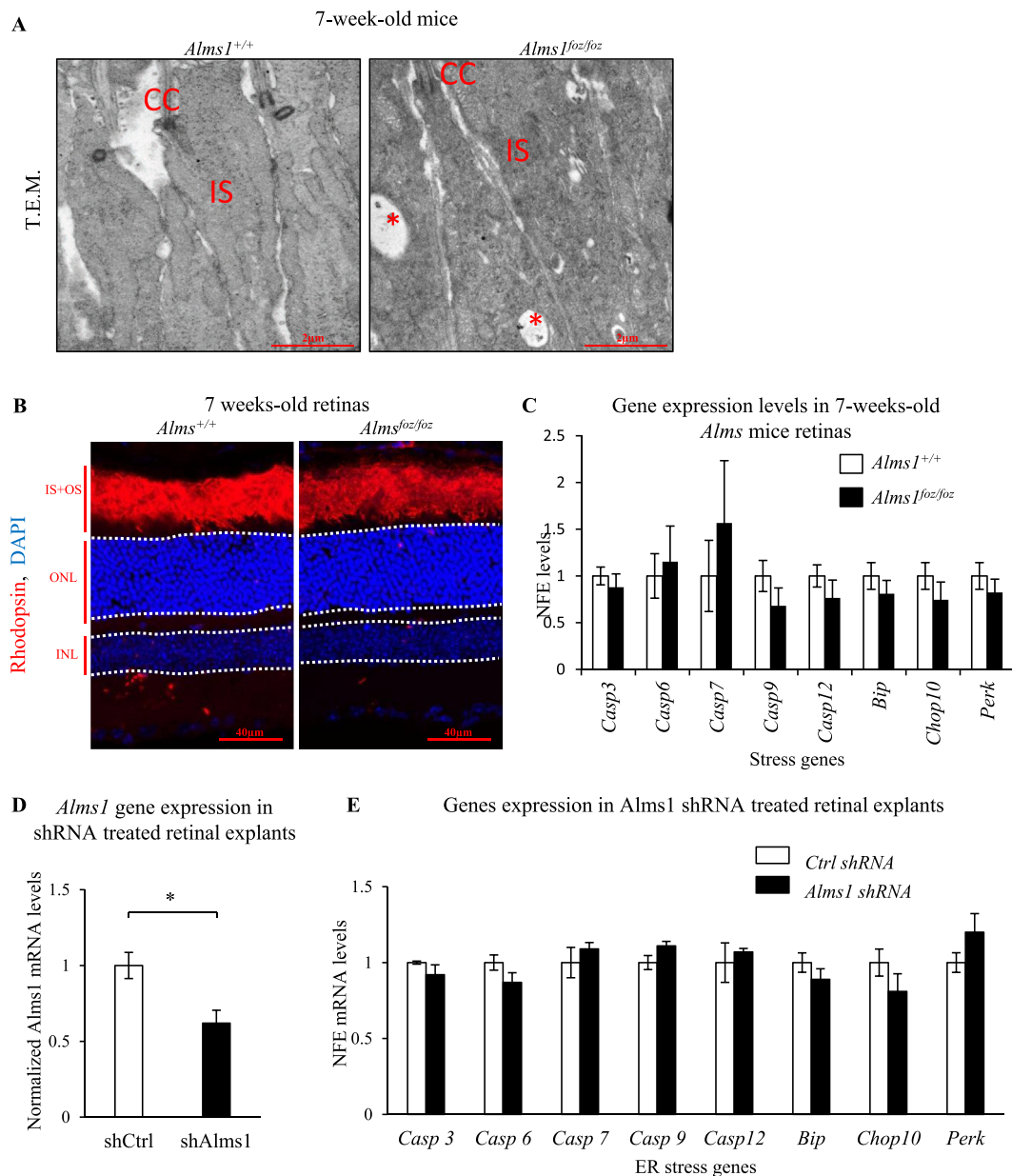


Fig. 4. Ultrastructure of retinas and pathogenic genes expression in 7-week-old *Alms1*^{foz/foz} mice retinas.

A) T.E.M. of 7-week-old *Alms1* mice retina (n = 3) (Scale bar: 2 μm), asterisks indicate the presence of vacuoles in the IS cytoplasm CC: Connecting Cilium; B) Immunofluorescence of localization of rhodopsin (red) and counterstained nuclei in DAPI at 7-week-old on *Alms1* mice retina. (n = 3) (Scale bar: 40 μm). OS: Outer Segment; IS: Inner segment, ONL: Outer Nuclear Layer, INL: Inner Nuclear Layer; C) ER stress genes expressions in 7 week-old *Alms1* mice retina (n = 3). D) *Alms1* gene expression in shRNA treated retinal explants (n = 3), *: P ≤ 0.05. E) Stress genes NFE in *Alms1* shRNA treated retinal explants (n = 3), *: P ≤ 0.05. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

interestingly we could differentiate between UPR-related RD, including the *Cep290*-LCA and three tested BBS mouse models, and non-UPR-related RDs, namely the ALMS mouse model. Interestingly, the progression rate and the severity of the retinal phenotype in these different mouse models of ciliopathies might be related the UPR pathway as indeed the two UPR-related ciliopathies (BBS and LCA) showed a faster retinal degeneration compared to the ALMS UPR-independent ciliopathies.

Our results showed that, associated to Rhodopsin trafficking defect, key components of the ER stress response were upregulated on the transcriptional level that depicts a common mechanism linked to retinal degeneration in BBS syndromes and LCA, the *Bbs1*^{M390R/M390R} mice, *Bbs10*^{-/-} mice and *Cep290*^{-/-} mice models used herein; although further studies are required to verify this impact on the post-

transcriptional level. These mechanisms were also present in *Bbs12*^{-/-} mice model, in the *Rd16* mouse model; a LCA mice model (Mockel et al., 2012; Starr et al., 2018). In *Bbs4*^{-/-} mice models ER stress has not been reported to date even though a Rhodopsin trafficking is already known (Abd-El-Barr et al., 2007). Moreover, the *Cep290*^{-/-} mouse model of LCA was also shown to present ER stress similar to the BBS models showing a possible common mechanism for the RD. *Bbs10*^{-/-} and *Cep290*^{-/-} show a decrease of the different retinal layers at 14 days depicting nuclei loss; with a more significant decrease in *Bbs10*^{-/-} compared to *Cep290*^{-/-}. This more aggressive BBS phenotype correlates with a significant drop in nuclear count compared to a smaller drop in *Cep290*. On the other hand, the related phenotype in ALMS model seems UPR unrelated as no upregulation of key players for UPR was observed. Other recent studies suggested that retinopathy in

the Alström syndrome might be linked to a defect in the phototransduction cascade (Hostelley et al., 2016). Indeed the related genes were upregulated in embryos of *Alms1* mutant zebrafish, while this was not significant in BBS1 mutant zebrafish (Hostelley et al., 2016). We also showed that while all retina layers are decreased in the 14-day-old *Bbs10*^{-/-} and *Cep290*^{-/-} mice, the INL is not decreased in the *Alms1*^{foz/foz} mice. It could be caused by a delay in the retinal degeneration and we may hypothesize that the INL will be decrease at a later stage on the disease.

The results above further indicate that retinopathy in ciliopathies may be caused by different mechanisms albeit they exhibit similarity and overlap of retinal phenotypes, and clinical intervention in the future should be given based on precise mechanism dissection. It is known that the retinal phenotypes of ciliopathies show large heterogeneity within the same diseases (Scheidecker et al., 2015). For example, it is well known that the BBS syndrome is a genetically heterogeneous disease. Clinical observation showed that BBS1 patients display a milder and a relatively slower rate of retinal degeneration than that caused by other BBS gene mutations (Daniels et al., 2012); an hypothesis that is supported by the fact that *Bbs1*^{M390R/M390R} knock-in mice exhibit a relatively slow rate of retinal degeneration compared to other BBS mice models (Cognard et al., 2015; Davis et al., 2007; Mockel et al., 2012). For the LCA, the retinal phenotypes of mouse models of LCA caused by different mutations in different genes (not all associated with ciliopathies) showed large variability in the onset and the courses of diseases, the manifestations of retinal fundus, the pattern of dystrophy (cone-rod dystrophy or rod-cone dystrophy).

The major findings here suggest that it is likely to develop a common therapeutic strategy for retinal dystrophy when ER stress is present, regardless of the causing mutation. In our previous research we demonstrated that treatment targeted at ER stress using *GIVin* could rescue retinal function and retinal morphology in *Bbs12*^{-/-} mice (Mockel et al., 2012). Other studies have also aimed at developing treatment options for common processes instead of targeting directly the defective gene, this is the case of tauroursodeoxycholic acid (TUDCA) or antioxidants (Drack et al., 2012; Komeima et al., 2007). The vast heterogeneity of the mutations causing RP coupled with the fact that there is not always a proper genetic diagnostic for all the patients make targeted gene therapy a difficult approach. Therefore, the study and development of drugs that can be used in several RP causing situations might be the best option for maintaining PR function for as long as possible, creating a wider therapeutic window for the use of specific treatments for the causing mutations or allowing a better genetic diagnosis in patients with uncommon mutations where the causing defect has not been determined.

Conflicts of interest

All authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements

The authors thank all the patient associations for their constant support. This research was supported by Retina France, France; Formicoeur, France; UNADEV, France; Inserm, France; and the University of Strasbourg, France.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.exer.2019.107721>.

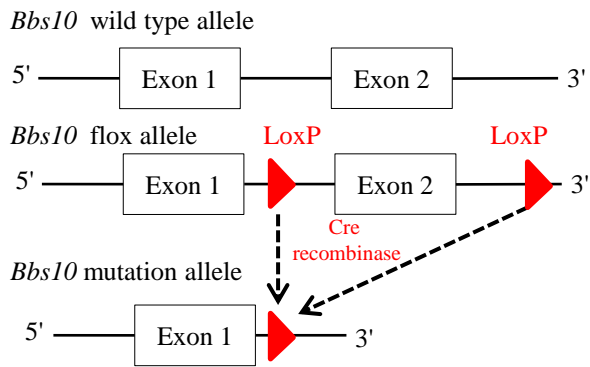
References

Abd-El-Barr, M.M., Sykoudis, K., Andrabli, S., Eichers, E.R., Pennesi, M.E., Tan, P.L., et al., 2007. Impaired photoreceptor protein transport and synaptic transmission in a mouse

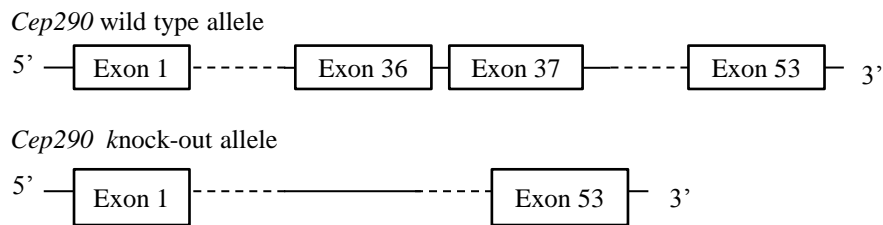
- model of Bardet-Biedl syndrome. *Vis. Res.* 47 (27), 3394–3407. <https://doi.org/10.1016/j.visres.2007.09.016>.
- Adams, N.A., Awadein, A., Toma, H.S., 2007. The retinal ciliopathies. *Ophthalmic Genet.* 28 (3), 113–125. <https://doi.org/10.1080/13816810701537424>.
- Arsov, T., Silva, D.G., O'Bryan, M.K., Sainsbury, A., Lee, N.J., Kennedy, C., et al., 2006. Fat aussie—a new Alstrom syndrome mouse showing a critical role for ALMS1 in obesity, diabetes, and spermatogenesis. *Mol. Endocrinol.* 20 (7), 1610–1622. <https://doi.org/10.1210/me.2005-0494>.
- Bujakowska, K.M., Liu, Q., Pierce, E.A., 2017. Photoreceptor cilia and retinal ciliopathies. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a028274>.
- Cognard, N., Scerbo, M.J., Obringer, C., Yu, X., Costa, F., Haser, E., et al., 2015. Comparing the *Bbs10* complete knockout phenotype with a specific renal epithelial knockout one highlights the link between renal defects and systemic inactivation in mice. *Cilia* 4, 10. <https://doi.org/10.1186/s13630-015-0019-8>.
- Cui, C., Chatterjee, B., Lozito, T.P., Zhang, Z., Francis, R.J., Yagi, H., et al., 2013. Wdpcp, a PCP protein required for ciliogenesis, regulates directional cell migration and cell polarity by direct modulation of the actin cytoskeleton. *PLoS Biol.* 11 (11), e1001720. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001720>. *PBIOLGY-D-13-03195* [pii].
- Daniels, A.B., Sandberg, M.A., Chen, J., Weigel-DiFranco, C., Fielding Hejtmanic, J., Berson, E.L., 2012. Genotype-phenotype correlations in Bardet-Biedl syndrome. *Arch. Ophthalmol.* 130 (7), 901–907. <https://doi.org/10.1001/archophthalmol.2012.89>.
- Davis, R.E., Swiderski, R.E., Rahmouni, K., Nishimura, D.Y., Mullins, R.F., Agassandian, K., et al., 2007. A knockin mouse model of the Bardet-Biedl syndrome 1 M390R mutation has cilia defects, ventriculomegaly, retinopathy, and obesity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104 (49), 19422–19427. <https://doi.org/10.1073/pnas.0708571104>.
- Dilan, T.L., Singh, R.K., Saravanan, T., Moye, A., Goldberg, A.F.X., Stoilov, P., Ramamurthy, V., 2018. Bardet-Biedl syndrome-8 (BBS8) protein is crucial for the development of outer segments in photoreceptor neurons. *Hum. Mol. Genet.* 27 (2), 283–294. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddx399>.
- Drack, A.V., Dumitrescu, A.V., Bhattarai, S., Gratie, D., Stone, E.M., Mullins, R., Sheffield, V.C., 2012. TUDCA slows retinal degeneration in two different mouse models of retinitis pigmentosa and prevents obesity in Bardet-Biedl syndrome type 1 mice. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 53 (1), 100–106. <https://doi.org/10.1167/iovs.11-8544>.
- Estrada-Cuzcano, A., Roepman, R., Cremers, F.P., den Hollander, A.I., Mans, D.A., 2012. Non-syndromic retinal ciliopathies: translating gene discovery into therapy. *Hum. Mol. Genet.* 21 (R1), R111–R124 <https://doi.org/10.1093/hmg/ddx298>.
- Garanto, A., Duijkers, L., Collin, R.W., 2015. Species-dependent splice recognition of a cryptic exon resulting from a recurrent intronic CEP290 mutation that causes congenital blindness. *Int. J. Mol. Sci.* 16 (3), 5285–5298. <https://doi.org/10.3390/ijms16035285>.
- Hamel, C., 2006. Retinitis pigmentosa. *Orphanet J. Rare Dis.* 1, 40 1750-1172-1-40 [pii] <https://doi.org/10.1186/1750-1172-1-40>.
- Heon, E., Kim, G., Qin, S., Garrison, J.E., Tavares, E., Vincent, A., et al., 2016. Mutations in *C8ORF37* cause Bardet Biedl syndrome (BBS21). *Hum. Mol. Genet.* 25 (11), 2283–2294. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddw096>.
- Hostelley, T.L., Lodh, S., Zaghoul, N.A., 2016. Whole organism transcriptome analysis of zebrafish models of Bardet-Biedl Syndrome and Alstrom Syndrome provides mechanistic insight into shared and divergent phenotypes. *BMC Genomics* 17, 318. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-2679-1>.
- Hsu, Y., Garrison, J.E., Kim, G., Schmitz, A.R., Seabry, C.C., Zhang, Q., et al., 2017. BBSome function is required for both the morphogenesis and maintenance of the photoreceptor outer segment. *PLoS Genet.* 13 (10), e1007057. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007057>.
- Knorz, V.J., Spalluto, C., Lessard, M., Purvis, T.L., Adigun, F.F., Collin, G.B., et al., 2010. Centriolar association of ALMS1 and likely centrosomal functions of the ALMS motif-containing proteins C10orf90 and KIAA1731. *Mol. Biol. Cell* 21 (21), 3617–3629. <https://doi.org/10.1091/mbc.E10-03-0246>. [pii].
- Komeima, K., Rogers, B.S., Campochiaro, P.A., 2007. Antioxidants slow photoreceptor cell death in mouse models of retinitis pigmentosa. *J. Cell. Physiol.* 213 (3), 809–815. <https://doi.org/10.1002/jcp.21152>.
- Marshall, J.D., Beck, S., Maffei, P., Naggert, J.K., 2007. Alstrom syndrome. *Eur. J. Hum. Genet.* 15 (12), 1193–1202. <https://doi.org/10.1038/sj.ejhg.5201933>.
- Mattapallil, M.J., Wawrousek, E.F., Chan, C.C., Zhao, H., Roychoudhury, J., Ferguson, T.A., Caspi, R.R., 2012. The Rd8 mutation of the *Crb1* gene is present in vendor lines of C57BL/6N mice and embryonic stem cells, and confounds ocular induced mutant phenotypes. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 53 (6), 2921–2927. <https://doi.org/10.1167/iovs.12-9662>.
- May-Simera, H., Nagel-Wolfrum, K., Wolfrum, U., 2017. Cilia - the sensory antennae in the eye. *Prog. Retin. Eye Res.* <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2017.05.001>.
- Mockel, A., Obringer, C., Hakvoort, T.B., Seeliger, M., Lamers, W.H., Stoetzel, C., et al., 2012. Pharmacological modulation of the retinal unfolded protein response in Bardet-Biedl syndrome reduces apoptosis and preserves light detection ability. *J. Biol. Chem.* 287 (44), 37483–37494. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.386821>.
- Mockel, A., Perdomo, Y., Stutzmann, F., Letsch, J., Marion, V., Dollfus, H., 2011. Retinal dystrophy in Bardet-Biedl syndrome and related syndromic ciliopathies. *Prog. Retin. Eye Res.* 30 (4), 258–274. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2011.03.001>.
- Nachury, M.V., Loktev, A.V., Zhang, Q., Westlake, C.J., Peranen, J., Merdes, A., et al., 2007. A core complex of BBS proteins cooperates with the GTPase Rab8 to promote ciliary membrane biogenesis. *Cell* 129 (6), 1201–1213 [S0092-8674\(07\)00534-X \[pii\]](https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.03.053) <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.03.053>.
- Reiter, J.F., Leroux, M.R., 2017. Genes and molecular pathways underpinning ciliopathies. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.60>.
- Russell, S., Bennett, J., Wellman, J.A., Chung, D.C., Yu, Z.F., Tillman, A., et al., 2017.

- Efficacy and safety of voretigene neparvovec (AAV2-hRPE65v2) in patients with RPE65-mediated inherited retinal dystrophy: a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial. *Lancet* 390 (10097), 849–860. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)31868-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)31868-8).
- Scheidecker, S., Hull, S., Perdomo, Y., Studer, F., Pelletier, V., Muller, J., et al., 2015. Predominantly cone-system dysfunction as rare form of retinal degeneration in patients with molecularly confirmed bardet-biedl syndrome. *Am. J. Ophthalmol.* 160 (2), 364–372. <https://doi.org/10.1016/j.ajo.2015.05.007>. e361.
- Seo, S., Baye, L.M., Schulz, N.P., Beck, J.S., Zhang, Q., Slusarski, D.C., Sheffield, V.C., 2010. BBS6, BBS10, and BBS12 form a complex with CCT/TRiC family chaperonins and mediate BBSome assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107 (4), 1488–1493. <https://doi.org/10.1073/pnas.0910268107>. ([pii]).
- Sjostrand, F.S., 1953. The ultrastructure of the outer segments of rods and cones of the eye as revealed by the electron microscope. *J. Cell. Physiol.* 42 (1), 15–44. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13084705>.
- Starr, C.R., Pitale, P.M., Gorbatyuk, M., 2018. Translational attenuation and retinal degeneration in mice with an active integrated stress response. *Cell Death Dis.* 9 (5), 484. <https://doi.org/10.1038/s41419-018-0513-1>.
- Waters, A.M., Beales, P.L., 2011. Ciliopathies: an expanding disease spectrum. *Pediatr. Nephrol.* 26 (7), 1039–1056. <https://doi.org/10.1007/s00467-010-1731-7>.
- Wright, A.F., Chakarova, C.F., Abd El-Aziz, M.M., Bhattacharya, S.S., 2010. Photoreceptor degeneration: genetic and mechanistic dissection of a complex trait. *Nat. Rev. Genet.* 11 (4), 273–284. <https://doi.org/10.1038/nrg2717>.

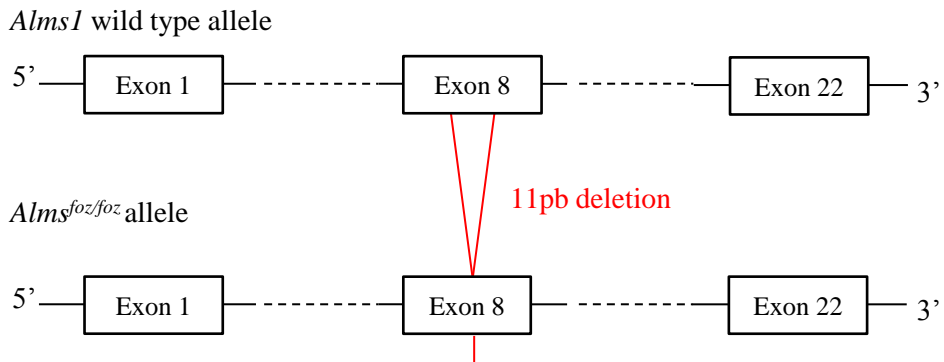
A *Bbs10* mouse model

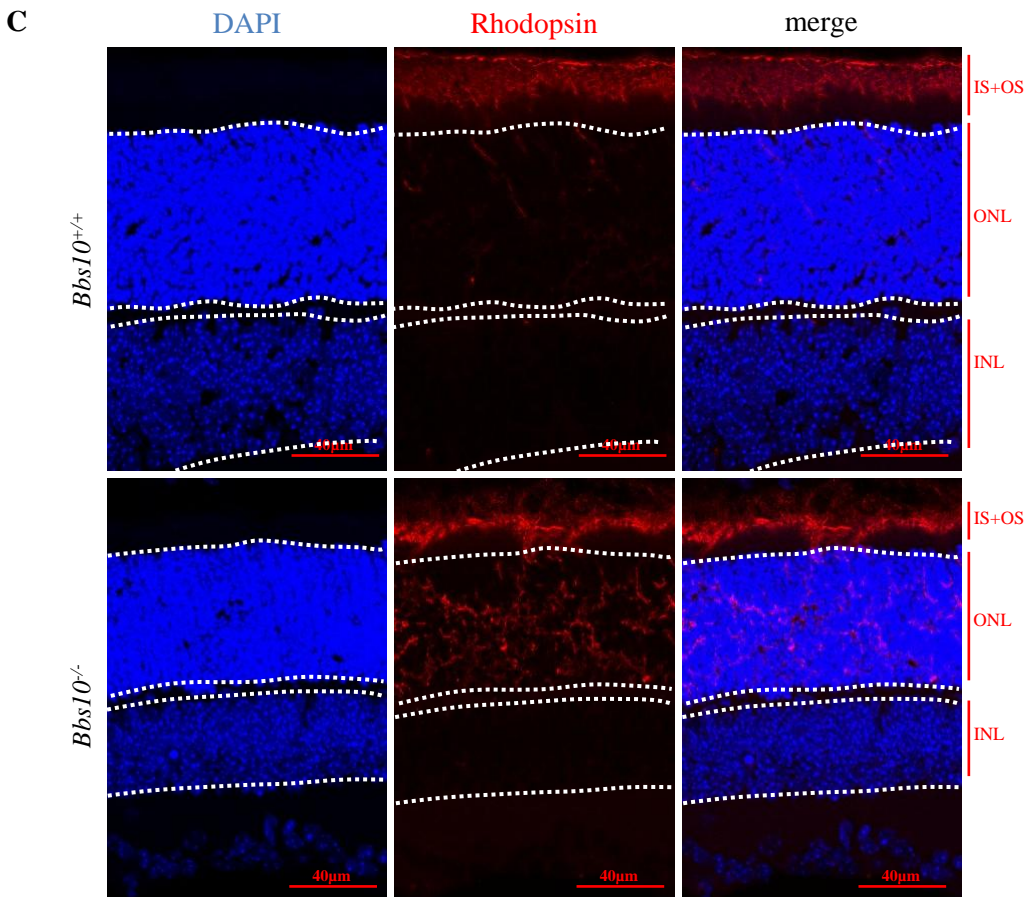
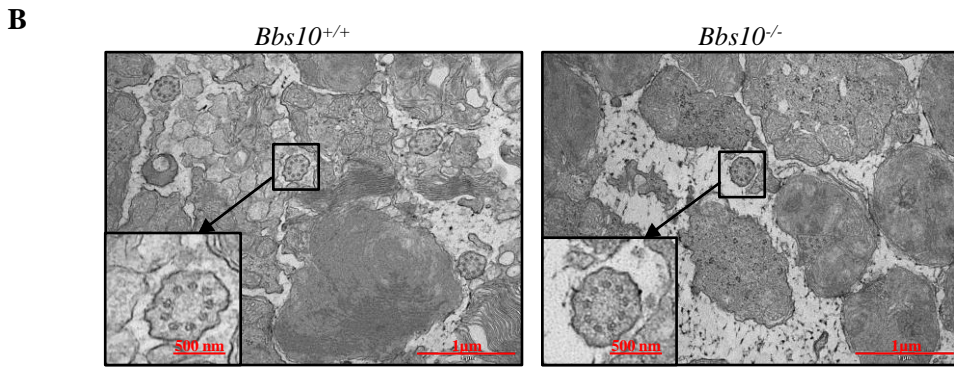
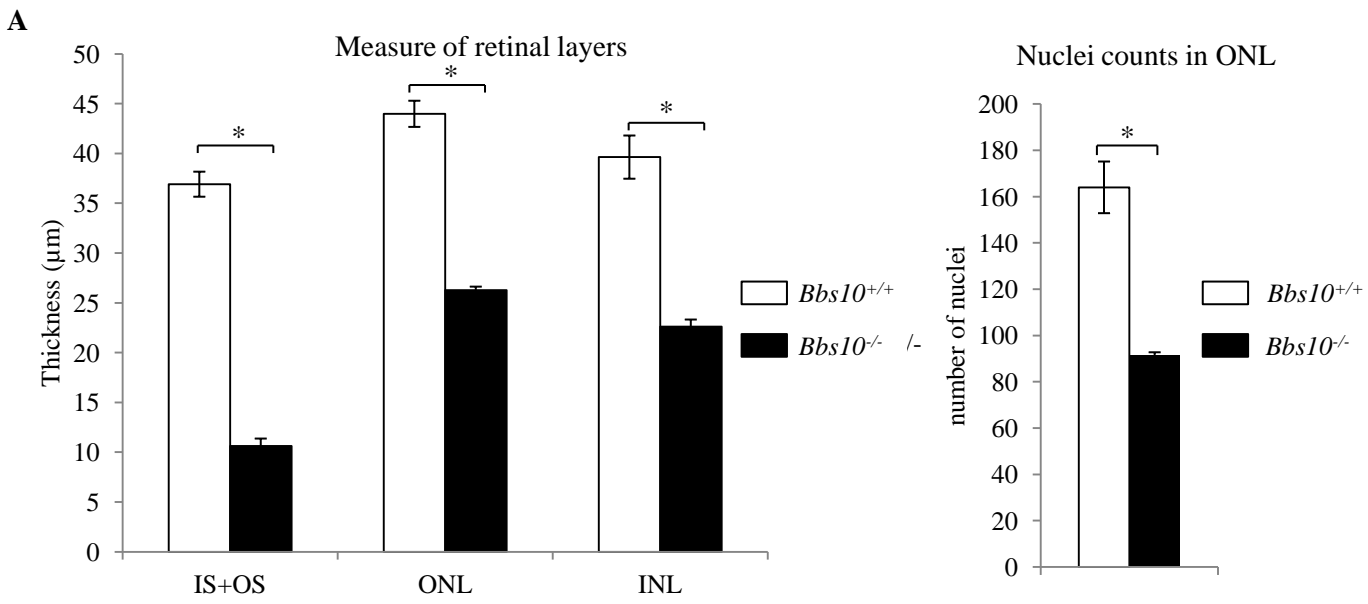


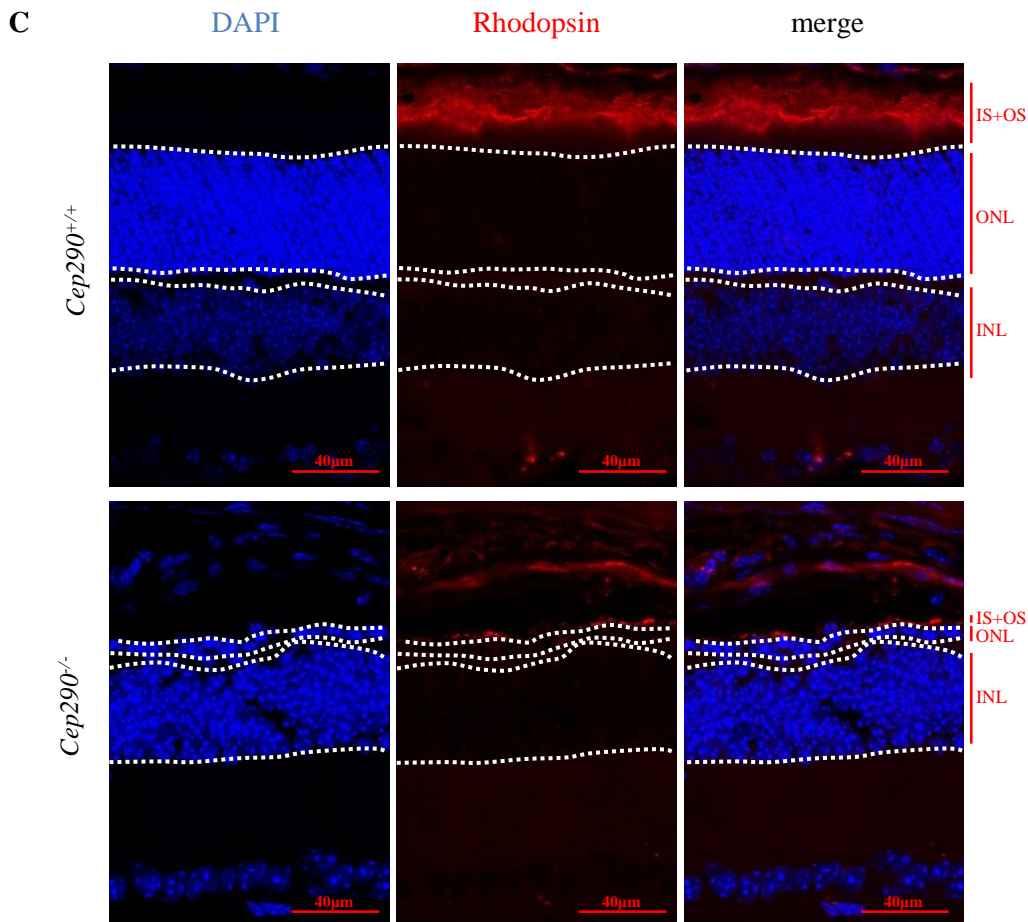
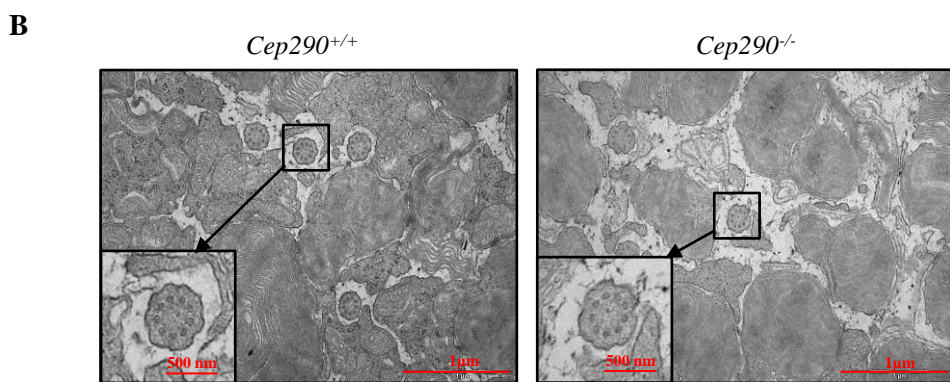
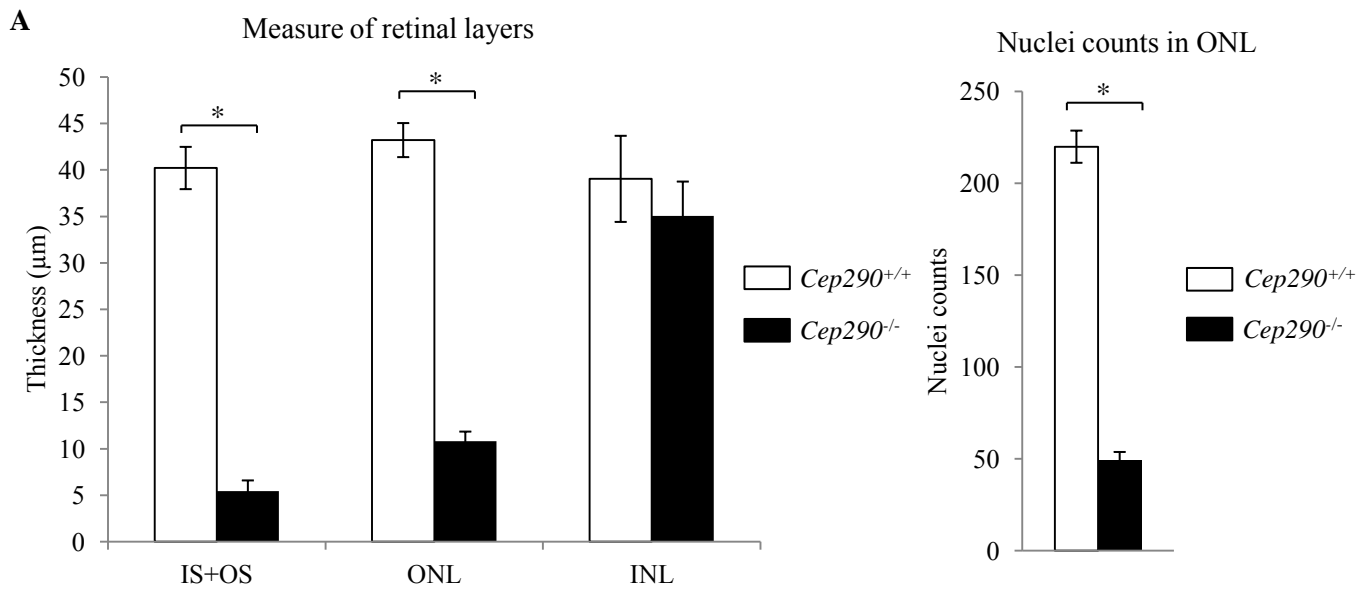
B *Cep290* mouse model

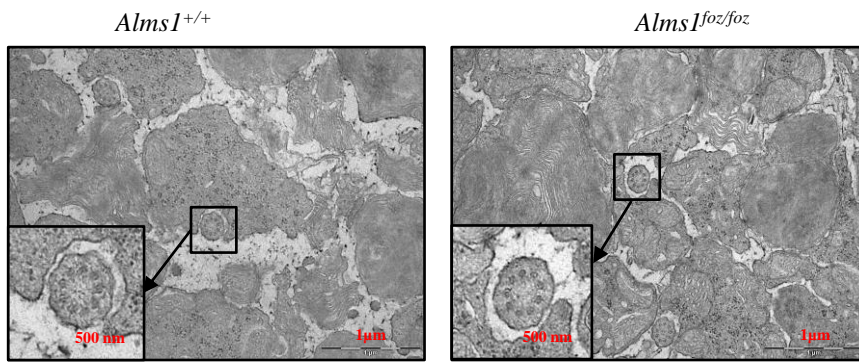
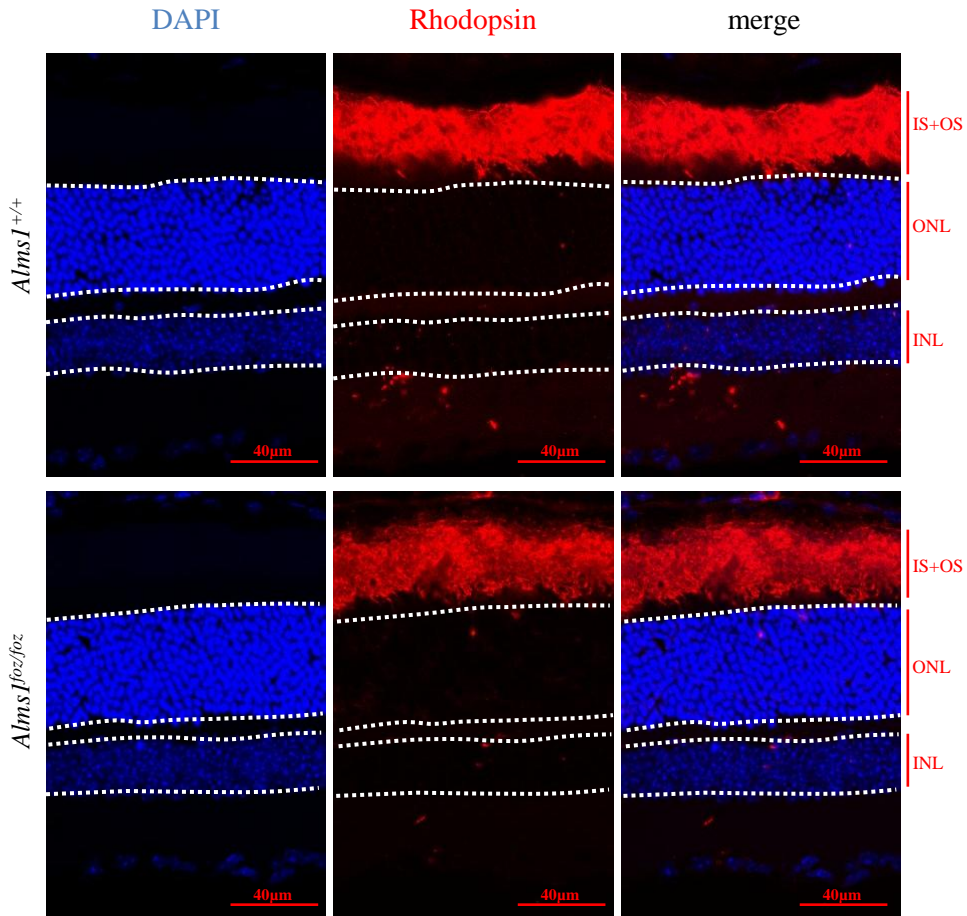


C *Alms1* *foz* mouse model







A**B**

Deuxième manuscrit:

Administration of IFB-088 in combination with valproic acid could improve transiently the retinal phenotype in two retinitis pigmentosa models

Agnès BRUN, Daniel AJOY, Cathy OBRINGER, Elodie HASER, Nadia MESSADDEQ, Michel J. ROUX, Philippe GUEDAT, Pierre MINIOU, Hélène DOLLFUS, Emmanuelle ABGUEGUEN, Vincent MARION

Manuscrit actuellement en préparation

Synopsis en français du Manuscrit 2 :

Cette étude fait suite à l'étude de Mockel *et al.* qui avait montré la possibilité de cibler l'UPR dans un modèle du BBS, la souris *Bbs12* KO¹. Le traitement alors testé était composé de trois molécules. L'**acide valproïque** qui permet notamment d'agir sur le stress du RE et l'UPR en stimulant la production de BiP. Cette protéine favorise le repliement des protéines synthétisées mais agit également comme senseur du stress, la proportion de BiP par rapport aux protéines néo synthétisées jouant un rôle majeur dans l'activation de l'UPR. Le deuxième composé utilisé était le **guanabenz**, couramment prescrit comme hypotenseur. Dans l'étude, ce sont ses propriétés à moduler l'UPR qui furent utilisées. Il permet en effet de prolonger l'inhibition de la traduction CAP-dépendante suite à un stress, par sa propriété inhibitrice du complexe PPP1R15A/PP1c, diminuant la surcharge protéique cause du stress. La troisième molécule composant le traitement était un **inhibiteur de la Caspase-12**, caspase initiateur associée au réticulum endoplasmique. Son inhibition permettrait de réduire l'apoptose des photorécepteurs et donc la dégénérescence rétinienne.

Dans cette nouvelle étude, l'objectif était double, le premier était de développer un traitement permettant de ralentir la dégénérescence rétinienne mais présentant moins de risques d'effets secondaires associés aux différentes molécules. Nous avons repris le traitement précédemment développé en remplaçant le guanabenz par l'IFB-088. Ce dernier est un analogue du guanabenz, possédant son activité inhibitrice du complexe PPP1R15A/PP1c mais pas les effets α -2-adrénérique causes d'effets secondaires chez l'homme mais aussi chez

l'animal avec une léthargie observée dans le modèle murin. L'inhibiteur de la caspase-12 a été supprimé dans la nouvelle combinaison thérapeutique pour les risques pouvant y être associés. La composition finale est donc constituée **d'acide valproïque et de l'IFB-088**. Le deuxième objectif était d'élargir le traitement à une RP plus courante que le BBS. Pour cette étude, nous avons choisi la mutation P23H de la rhodopsine, passant ainsi d'une pathologie ultra-rare, syndromique, à transmission autosomique récessive à une pathologie plus courante, non syndromique et à transmission autosomique dominante.

Afin de répondre au premier objectif du projet, nous avons testé l'IFB-088 sur le même modèle *Bbs12* KO utilisé par Mockel *et al.* Sur ces souris, l'administration a été faite à 14 jours après la naissance par injection intravitréenne, mode d'administration local permettant de confiner la molécule au niveau de l'œil et évitant ainsi les effets systémiques. Les effets ont été mesurés deux semaines plus tard, soit à un mois.

Les résultats ont montré les bénéfices, à court terme, de cette nouvelle combinaison thérapeutique. Deux semaines après une injection unique du traitement, une amélioration fonctionnelle a été observée à l'ERG chez les souris *Bbs12* KO avec de l'IFB-088 seul ou en combinaison avec l'acide valproïque. De manière intéressante, la combinaison des deux molécules améliore également la réponse à l'ERG de près de 30% chez les souris WT, là où l'IFB-088 seul n'a pas d'effet. L'augmentation de la dose d'IFB-088 de 10 fois (passant de 2,5 μ M à 25 μ M) entraîne en revanche une diminution de la réponse, montrant qu'une forte concentration peut avoir des effets délétères sur la vision. D'un point de vue histologique, nous avons mis en évidence une augmentation de l'épaisseur des différentes couches de la rétine avec la combinaison (IFB-088 2,5 μ M et VPA), résultat concordant avec les résultats d'ERG précédent. En revanche, l'effet bénéfique à l'ERG de l'IFB-088 seul n'est pas retrouvé au niveau histologique. On a en effet constaté une diminution de l'épaisseur des différentes couches rétinienne. De même avec la plus forte dose d'IFB-088 testée, une diminution des épaisseurs a été observée. L'analyse de la dilatation du réticulum endoplasmique concorde avec ceux obtenus jusque-là, La combinaison de l'IFB-088 (2,5 μ M) avec le VPA permet de diminuer la dilatation là où les molécules séparées ont moins d'effet.

Ces résultats confirment donc la possibilité de cibler l'UPR dans ce modèle et valident l'IFB-088 comme molécule pouvant se substituer au guanabenz utilisé précédemment. Néanmoins ces résultats montrent que dans ce modèle de RP, l'IFB-088 ne suffit pas à ralentir

la dégénérescence rétinienne bien qu'ayant un effet bénéfique sur les capacités visuelles chez les souris mutantes. La synergie des deux molécules semble, elle, agir sur les capacités visuelles mais également sur la dégénérescence rétinienne. En revanche, les résultats montrent qu'un surdosage de l'IFB-088 pourrait avoir des effets inverses à ceux attendus, accélérant la dégénérescence rétinienne. La combinaison thérapeutique testée ici est donc une alternative possible à la combinaison guanabenz + VPA testée précédemment, permettant comme cette dernière de moduler l'UPR associée à la dégénérescence rétinienne et ainsi de ralentir cette dernière.

Le mode d'administration utilisé ici a permis de confiner la molécule au niveau de l'œil et d'éviter ainsi des effets systémiques. Néanmoins, bien qu'utilisé chez l'adulte, ce mode d'administration reste invasif et présente des risques liés à l'injection elle-même. Pour un développement chez l'enfant, ce mode d'administration n'est pas idéal d'autant, plus si les injections doivent être répétées régulièrement. Pour la seconde partie de l'étude, le traitement sera donc administré par voie orale par gavage, permettant un contrôle de la dose administrée sans risque d'endommager la rétine.

Pour cette deuxième partie, la mutation P23H de la rhodopsine a été choisie comme modèle d'étude. Cette mutation est la première cause de RP autosomique dominante aux USA y causant 10-12% des adRP, elle reste malgré cela une maladie rare.

Dans un premier temps, un modèle de rat transgénique a été utilisé, le modèle transgénique P23H-3. Le mécanisme physiopathogénique associé est déjà caractérisé et a montré une accumulation de protéines mutantes causant un stress du réticulum endoplasmique et l'activation de l'UPR. Les résultats des traitements avec l'IFB-088 seul ou en combinaison avec l'acide valproïque n'ont montré aucune amélioration de la réponse à l'ERG. Des effets sur les niveaux d'expression de protéines de l'UPR ont cependant été observés suite au traitement (avec une augmentation de BiP de 91% et CHOP de 66% et une diminution de 58% de la Rhodopsine) montrant une action du traitement sur sa cible. Bien qu'atteignant sa cible, il semble insuffisant à rétablir l'équilibre protéique au sein des photorécepteurs surexprimant la rhodopsine. Néanmoins, nous avons montré que cette relative inefficacité pourrait s'expliquer par l'augmentation du niveau d'expression de la rhodopsine tant au niveau transcriptomique que protéomique dans ce modèle. Ainsi, dans ce modèle, le stress du réticulum endoplasmique ne serait donc pas uniquement une conséquence de la mutation

P23H, mais pourrait également être dû à la surproduction protéique causée par la forte expression des transgènes de la rhodopsine introduits dans le modèle.

Suite à ces résultats, nous avons choisi un modèle plus pertinent, plus proche de la pathologie humaine, le modèle de souris rhodopsine P23H KI possédant un nombre normal de copie du gène. Nous avons montré précédemment l'importance de la caractérisation du modèle afin de comprendre les mécanismes impliqués dans la dégénérescence rétinienne mais également afin de déterminer la fenêtre thérapeutique optimale propre à chaque modèle. La première étape a donc été de caractériser le modèle.

Dans ce modèle, comme dans le modèle précédent, la dégénérescence commence de manière précoce. En effet, dès 14 jours nous avons mis en évidence une diminution de l'épaisseur des couches de la rétine avec à 1 mois une diminution de la réponse à l'ERG de moitié et un quart des cellules de l'ONL déjà perdues. La mutation dans ce modèle étant à l'état hétérozygote, seule la moitié de la rhodopsine est normale et donc correctement transportée dans le segment externe des photorécepteurs. Malgré cela, nous n'avons pas pu montrer de mauvaise localisation de la rhodopsine (mutante ou non). Néanmoins, le stress du réticulum endoplasmique a pu être mis en évidence à cet âge. Nous avons montré l'augmentation de la dilatation du réticulum endoplasmique ainsi que l'augmentation des niveaux d'expression transcriptomiques de différents marqueurs de l'UPR. L'ensemble des résultats obtenus valide ce modèle pour l'administration du traitement. L'UPR est activé à un stade précoce de la maladie et la fenêtre thérapeutique suffisamment large pour pouvoir l'administrer. Les résultats non présentés dans le manuscrit sont présentés en à la suite de celui-ci, en troisième partie de cette rubrique « Résultats ». Dans cette troisième partie, figurent également des résultats sur l'effet de la lumière bleue sur la dégénérescence rétinienne.

Afin de répondre au deuxième objectif du projet nous avons cibler GADD34. Pour cela deux stratégies ont été testées : d'une part l'inhibition constitutive par croisement des souris *Rho*^{P23H/+} avec une souris *Gadd34*^{ΔC/ΔC} et d'autre part l'inhibition pharmacologique par l'IFB-088.

L'inhibition constitutive de *Gadd34* a permis une augmentation de la réponse à l'ERG sur des souris *Rho*^{P23H/+} de 2 mois. Après 2 mois l'ERG diminue progressivement suivant la même progression que les mutants *Rho*^{P23H/+}. Cette amélioration fonctionnelle ne se reflète pas dans les résultats histologiques. En effet aucune augmentation des épaisseurs de rétine ou du

nombre de noyaux de l'ONL n'a pu être mise en évidence. En revanche, la perte de *Gadd34* impacte l'UPR comme le montre la dilatation du réticulum endoplasmique proche de celle de souris WT du même âge.

En parallèle, nous avons traité les souris *Rho*^{P23H/+} avec l'IFB-088 seul et en combinaison avec l'acide valproïque par gavage. Différentes séries de traitements ont été testées afin d'ajuster les doses d'IFB-088 et d'essayer d'obtenir un effet à long terme. Les résultats des différents traitements non présentés dans le manuscrit sont présentés à la suite de celui-ci. Les résultats obtenus, présentés ici, montrent une amélioration de la réponse à l'ERG à 1 mois (soit 1 semaine après l'arrêt des traitements) avec l'IFB-088 seul. En revanche, cet effet est perdu deux semaines plus tard chez ces mêmes souris. A l'opposé, les souris traitées avec une combinaison des deux molécules ne présentent pas d'amélioration à l'ERG à 1 mois mais une tendance à l'augmentation est visible à 6 semaines. A côté des effets fonctionnels observés, les analyses histologiques réalisées à 6 semaines (3 semaines après l'arrêt des traitements) montrent un effet bénéfique des différents traitements. A cet âge, seule la combinaison semble avoir un effet sur l'épaisseur des couches de la rétine. En revanche, on observe une diminution de la dilatation du réticulum endoplasmique aussi bien avec la combinaison qu'avec l'IFB-088 seul.

Ces résultats semblent indiquer que l'IFB-088 administré seul n'est pas capable de ralentir la dégénérescence rétinienne dans ce modèle mutant de la rhodopsine, comme dans le modèle précédent, *Bbs12* KO. Il ne permet le maintien ni des capacités visuelles, ni de l'épaisseur des couches de la rétine à 6 semaines. En revanche son administration à un stade précoce de la maladie, dès 14 jours, permet d'augmenter les capacités visuelles transitoirement. Ces résultats concordent avec ceux obtenus sur le modèle *Bbs12* KO, où une administration à 14 jours permettait d'observer les mêmes résultats deux semaines après l'injection. Ils concordent également avec ceux obtenus par invalidation génétique où une amélioration transitoire est observée associée à une diminution de la dilatation du réticulum endoplasmique. En revanche, ils diffèrent de ceux obtenus lors d'une étude réalisée récemment sur un modèle *Cep290*^{-/-104}. L'absence de PPP1R15A entraînait une augmentation des épaisseurs de la rétine mais sans effet sur l'ERG. Les auteurs avaient alors émis l'hypothèse que l'absence de PPP1R15A permettrait une inhibition de l'apoptose, ralentissant ainsi la dégénérescence rétinienne.

Les résultats obtenus avec la combinaison montrent également des effets similaires à la précédente étude, présentant une tendance à l'augmentation de la réponse à l'ERG associée à une augmentation des épaisseurs de rétine. La combinaison permettrait donc de ralentir transitoirement la dégénérescence rétinienne dans différentes RP ayant comme mécanisme physiopathogénique commun l'activation de l'UPR.

Des études complémentaires seraient nécessaires pour comprendre les mécanismes d'actions et d'interactions des molécules utilisées afin d'expliquer les résultats obtenus ici. En effet, à ce jour, le mécanisme par lequel la perte fonctionnelle de PPP1R15A permet d'augmenter la réponse à l'ERG sans impacter la mort cellulaire n'est pas encore élucidé. Les propriétés apoptotiques de PPP1R15A ne semblent pas être impactées dans notre étude mais d'autres mécanismes peuvent être affectés tel que la dégradation, le transport protéique ou les processus inflammatoires. L'inhibition de PPP1R15A pourrait permettre de moduler la dégradation protéique favorisant la dégradation associée au protéasome en inhibant l'autophagie^{269,270}. Elle pourrait également permettre de moduler les processus inflammatoires comme il a été montré avec le GBZ, diminuant la réponse inflammatoire²⁷¹.

Administration of IFB-088 in combination with valproic acid could improve transiently retinal phenotype in two retinitis pigmentosa models

Agnès BRUN^{1,2}, Daniel AJOY¹, Cathy OBRINGER¹, Elodie HASER¹, Nadia MESSADDEQ³, Michel J. ROUX³, Philippe GUEDAT², Pierre MINIOU², Hélène DOLLFUS¹, Emmanuelle ABGUEGUEN², Vincent MARION^{1*}

¹: INSERM, Laboratoire de Génétique Médicale, UMRs_U1112, 11 rue Humann, Bâtiment 3, 67085 Strasbourg, France.

²: InFlectis BioScience, 21 rue la Noue Bras de Fer, 44200 Nantes, France

³: Institut de Génétique et Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC), 1 Rue Laurent Fries, 67400 Illkirch-Graffenstaden, France.

*Corresponding author: Vincent Marion, PhD

INSERM, Ciliopathies Modeling and Associated Therapies team (CMAT)

Laboratory of Medical Genetics (UMRs_U1112)11 Rue Humann

Faculty of medicine, Bldg. 3, 9th floor, Room 917

67085 Strasbourg, France

Phone: 0033368853334

Email: vincent.marion@unistra.fr

Abstract

PURPOSE: Retinitis pigmentosa is the first cause of inherited retinal degeneration affecting 1.5 million persons worldwide. Today, no treatment is available for most of these diseases. We aimed to develop a pharmacological approach targeting the Unfolded Protein Response to slowdown retinal degeneration.

METHODS: A PPP1R15A/PP1c phosphatase complex inhibitor alone or in combination with valproic acid (by intravitreal injection or gavage) were administered to *Bbs12*^{-/-} and P23H rhodopsin mutant murine models, starting treatment at 14-days. The efficacy of the treatment was assessed two weeks later by electroretinogram, retinal thickness and endoplasmic reticulum dilatation measurement.

RESULTS: In the 2 mouse models (*Bbs12*^{-/-} and P23H rhodopsin), the combination IFB-088 and VPA treatment transiently improved the light detection capacity, retinal thickness and reduce ER dilation. IFB-088 alone is able to increase photoreceptor response to light with no effect on cell death.

CONCLUSION: These results shown the possibility to target this pathogenic pathway involved in different retinitis pigmentosa to slow down retinal degeneration.

Keywords

BBS, P23H Rhodopsin, retinal degeneration, UPR, pharmacological modulation, IFB-088, VPA

Introduction

Retinitis pigmentosa (RP) is a group of heterogeneous genetic retinal diseases affecting 1/4000 persons^{1,2} worldwide with more than 100 genes identified. RP³ is characterized by a primary loss of rod photoreceptors in the first two decades of life, causing a progressive night blindness and leading to progressive peripheral vision loss^{1,2,4}. The daylight vision is impaired later in the disease leading to blindness. The RP is divided into two forms, syndromic and non-syndromic. In the syndromic forms, the retinal degeneration is associated to other organs defect. It is the case of ciliopathies, a heterogeneous group of rare genetic diseases caused by cilia defect⁵⁻⁸ among them, the Bardet-Biedl Syndrome (BBS)^{5,9,10}. In non-syndromic RP, only the retina is affected such as the RP associated to rhodopsin mutations¹¹ which are the major cause of autosomal dominant form^{1,12} with today 200 mutations identified¹³.

A common pathogenic mechanism, the Unfolded Protein Response (UPR), has been identified in both syndromic^{14,15} and non-syndromic RP¹⁶⁻²⁰. In ciliopathies, the cilia defect causes an intraflagellar (IFT) defect and the proteins overload. In the case of RP associated to rhodopsin mutations, the misfolded mutated rhodopsin proteins are retained and accumulate in the ER²¹⁻²³. This accumulation of proteins in the ER of photoreceptors, observed in both forms of RP, leads to ER stress and to the activation of the UPR pathway to restore protein homeostasis.

The UPR pathway is mediated by three endoplasmic reticulum (ER) transmembrane proteins namely IRE1 (Inositol-requiring enzyme 1), ATF6 (Activating transcription factor 6) and PERK (protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase)^{16,24,25}. In unstressed conditions, BiP/GRP78, an ER chaperone, binds to these three ER transmembrane proteins, maintaining them in an inactive state. In stressed conditions, BiP dissociates to these transmembrane proteins to bind to misfolded proteins. The dissociation of BiP from these three proteins activates the three branches of the UPR pathway. While the IRE1 and ATF6 branches regulates the transcription of genes involved in stress responses, such as ER chaperones or ERAD, the

activation of the PERK pathway leads to the regulation of protein translation. Activated PERK phosphorylates eIF2 α allowing the attenuation of the CAP-dependent protein translation. Although overall global protein synthesis rates are reduced upon the phosphorylation of eIF2 α , several specific mRNAs are preferentially translated under such conditions such as activating transcription factor 4 (ATF4). ATF4 upregulates proteins that function to restore cellular homeostasis, such as ER chaperones and protein involved in amino acid metabolism and redox control. Critically, ATF4 also upregulates Protein Phosphatase 1 Regulatory Subunit 15A (PPP1R15A) (also named GADD34 (Growth Arrest and DNA Damage-inducible protein)), the inducible regulatory subunit of protein phosphatase 1 (PP1) that promotes the dephosphorylation of eIF2 α , providing a negative feedback mechanism that allows the restoration of protein synthesis rate. If the ER stress is unresolved, prolonged expression of ATF4 upregulates the pro-apoptosis factor C/EBP homologous protein (CHOP), which initiates the apoptotic signalling cascade and cell death.

As the UPR pathway is activated in retinal degeneration (RD), it constitutes an interesting target for the development of therapeutic strategies²⁶. Today, there is no available treatment for RP, however several strategies are used to slow down the RD, for example by targeting the UPR pathway^{14,17,27}. In particular, it was demonstrated that the combination of two FDA-approved drugs, valproic acid (VPA) and guanabenz, (GBZ) could slow down the RD in a BBS mouse model¹⁴. VPA, a HDAC inhibitor used in the treatment of epilepsy has been shown to induce the expression of several genes, among them, the ER chaperone BiP^{14,28}. GBZ, an α 2-adrenergic receptor agonist used in the treatment of hypertension, has been described to inhibit the PPP1R15A/PP1c phosphatase complex maintaining the eIF2 α phosphorylation that prolong the CAP-dependent translation attenuation^{19,29}. Therefore, the combination VPA and GBZ could reduce the misfolding protein burden in the ER by decreasing global protein synthesis and increasing the protein folding capacity of the cells, thus preventing cell death.

In this study, we aimed to evaluate the inhibition of PPP1R15A/PP1c phosphatase complex on retinal degeneration in syndromic and non-syndromic RP. GBZ has much greater potency as an agonist at α 2-adrenergic receptors than at PPP1R15A/PP1c phosphatase complex inhibitor so doses that inhibit PPP1R15A/PP1c phosphatase complex would cause severe and unacceptable hypotensive symptoms. Therefore, in this study GBZ was replaced by a PPP1R15A/PP1c phosphatase complex inhibitor devoid of the α 2-adrenergic activity, the IFB-088 (or Sephin1)³⁰. IFB-088 is a GBZ derivative, currently in phase I clinical trial.

To evaluate the potential beneficial effect of IFB-088 on RD of syndromic RP, *Bbs12*^{-/-} mice were treated with IFB-088 alone or in combination with VPA. Next, we evaluate the effect of the inhibition of PPP1R15A/PP1c phosphatase complex on RD in non-syndromic RP associated to the rhodopsin P23H mutation, which is the most prevalent ADRP in North America³¹. First, we evaluated the RD in the in absence of functional PPP1R15A/GADD34 protein³² in Rho-P23H knock-in mice^{33,34} by generating double transgenic mice *Gadd34* ^{Δ C/ Δ C} Rho-P23H mice. Then, we evaluated the pharmacological inhibition of PPP1R15A/PP1c phosphatase complex by IFB-088 alone or in combination with VPA in two rodent models of RP, the transgenic rat model P23H-3 rat³⁵ and Rho-P23H knock-in mice^{33,34}.

We demonstrated here that IFB-088 has the same protective properties as the GBZ in combination with VPA on the RD associated to the BBS. In particular, IFB-088 in combination with VPA was able to improve scotopic ERG response, to prevent the thinning of the retinal thickness and reduce ER dilatation in photoreceptors. We demonstrated the activation of the UPR pathway in the Rho-P23H knock-in mice during the first month of life. The inhibition of PPP1R15A/PP1c phosphatase complex by genetic or pharmacological approaches has a transient beneficial effect on the RD in P23H Rhodopsin models, by improving light detection capacity, increasing retinal layer thickness or decreasing ER dilatation.

Material and methods

Generation of animals and animal management

All experimental procedures were approved by the local ethical committee of Strasbourg University. All mice were kept on C57BL/6J genetic background. They were kept and bred in humidity- and temperature-controlled rooms on a 12-hour light/dark cycle with free access to normal chow and water.

Bbs12^{-/-} mice were obtained as previously described³⁶ *Rho P23H-KI* mutant mice were provided by ICS (Institut Clinique de la Souris, Strasbourg, France). *Gadd34*^{ΔC/ΔC} mice were provided by David Ron (University of Cambridge). The *Gadd34*^{ΔC/ΔC} *Rho*^{P23H/+} mice were obtained by crossing *Gadd34*^{ΔC/ΔC} with *Rho*^{P23H/+} on several generations. The genotype of mice was obtained through Polymerase Chain Reaction (PCR), primers used for genotyping were listed in table 1. Thermocycling condition of PCR was 3 min at 94°C for the initial denaturation; then 35 cycles of denaturation at 94°C for 30s, annealing at 61°C for 15s (for the *rhodopsin* alleles mutation) or 62°C for 30s (for *Gadd34*, *Bbs12* and *Rd8* alleles), extension at 72°C for 30s, (template amplification); and a final extension for 3 minutes at 72°C; at last hold at room temperature.

Reagents preparation

The solutions used for treatments were prepared under sterile condition. 1.25mM IFB-088 stock solution was prepared in PBS pH4.5: 0.016g IFB-088 acetate into 50ml (1.25mM) for intravitreal (IV) injection and 1mg/ml for gavage. 0.2M Valproic acid stock solution was prepared in PBS pH6: 0.5g Valproic acid (Catalog#4543, Sigma-Aldrich) in 30 ml (0.2M) for IV injection and 40mg/ml for gavage. Fresh stock solutions were prepared every week. The stock solutions were then diluted into PBS, pH6 to obtain IFB-088 (2.5μM) alone or in combination with VPA (0.2mM) for IV injection and IFB-088 (300μg/ml) alone or with VPA (8mg/ml).

Treatments by intravitreal injection

At postnatal day 14, 16 mice per group were anesthetized with isoflurane. Pupils of mice were dilated with atropine eye drops (Alcon). Under a surgical microscope, a 33-gauge needle connected to a repeating dispenser (Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, Switzerland) was inserted into the vitreous cavity from the limbus. 1µl treatment solution was injected into the left eye of mice, and 1µl PBS, at pH6 was administered into the right eye as control. Mice with vitreous hemorrhage or retinal damage were excluded from analysis.

Treatment by gavage

For the administration of the treatment by gavage, a 22ga plastic feeding needles (FTP-20-25, Instech Laboratoris, Inc., Plymouth Meeting, PA USA) were used on pups from post-natal day 14 to 30 and 20ga plastic feeding needles (FTP-20-38, Instech Laboratoris, Inc., Plymouth Meeting, PA USA) were used for adult mice. Mice were treated with 2.29mg/kg of IFB-088 corresponding to 3mg/kg acetate salt, with VPA at 80mg/kg or the combination 2.29mg/kg of IFB-088 with 80mg/kg of VPA. Treatment was administered from 14 days post-natal, every two days during one week. (n=6 mice per group)

Electroretinogram

Electroretinograms (ERGs) were performed using the HMsERG system (Ocuscience®, Kansas City, Missouri, USA) as previously described³⁷. Briefly, pupils of dark-adapted mice were dilated with 0.3% atropine eyedrops (Atropine Alcon 0.3%; Alcon, Rueil-Malmaison, France) before anesthetized. Scotopic ERG standard protocol was performed according to manufacturer's protocol (Ocuscience®, Kansas City, Missouri, USA). The a-wave of scotopic responses was then measured.

Optical coherence tomography (OCT)

OCT examination was performed using a Bioptigen R2200 SD-OCT setup (Bioptigen / Leica, Durham, USA), under isoflurane anesthesia (4% induction, 2% maintenance, in a 50/50% mix

of air and O₂, 2 l/min). Pupils were dilated with eye drops of tropicamide 0.5% (Mydriaticum, Théa, France). Corneas were kept moist with ophthalmic gel (Ocry-gel, TVM, France). After imaging, mice were placed in an empty cage placed on a warming pad set at 37°C until full awakening, then placed back in their home cage.

Immunofluorescence

Eyeballs were sampled and embedded as previously described³⁷. Briefly dissected eye was fixed in formalin (Catalog #F5554-4L, Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Missouri, USA) and cryoprotected by successive immersions in increasing concentration sucrose solutions before embedded in OCT Compound™ (OCT™, Catalog #4583, Tissue-Tek® OCT™, Sakura® Finetek, Torrance, California, USA). 10 µm cryosections were fixed before permeabilization 0.01% TritonX-100 in PBS1X (Catalog #ET330, Euromedex, France) then blocking in (BSA 1% in PBS1X) . Then, primary antibodies solutions were incubated overnight at 4°C and secondary antibodies were incubated for 1 hour at room temperature. Nuclei were counterstained with Hoechst (# D1306, Invitrogen, Carlsbad, California, USA). Slides were then mounted with Vectashield® Mounting Medium (Catalog #H-1000, Vector Laboratories, Burlingame, California, USA). Images were acquired with Zeiss Imager Z2 microscope and analyzed by ZEN 2012 software (Carl Zeiss Inc., Oberkochen, Germany). Antibodies used were listed in table 2.

Transmission Electron Microscopy (T.E.M.) and Toluidin blue staining

The samples were dissected as previously described and fixed by immersion in 2.5% Glutaraldehyde and 2.5% Para formaldehyde in Cacodylate buffer (0.1M, pH 7.4). Samples were embedded and analyzed as described before³⁷.

Toluidin semi-thin sections were acquired by light microscopy with Zeiss Imager Z2 microscope and images were analysed by ZEN 2012 software (Carl Zeiss Inc., Oberkochen, Germany). Retinal thicknesses (Inner Segment/Outer Segment IS/OS, Outer Nuclear Layer

ONL and Inner Nuclear Layer INL) were measured on semi-thin sections. Measures were done at 500µm from optical nerve and spaced to every 50µm. Three samples per genotype and per treatment were analyzed. For each sample, three sections and a minimum of five measures per section were performed. The ONL nuclei were also counted on semi-thin sections, 20 rows of nuclei, at least 500µm from the optical nerve, were counted on three sections per sample.

Ultrathin sections were examined at 70kv with a Morgagni 268D electron microscope. Images were captured digitally by Mega View III camera (Soft Imaging System). Endoplasmic reticulum dilatation was measured with ImageJ software on three sections per sample. For each picture, the total ER area was divided by the surface of the picture.

RNA extraction and Real-time PCR

Retina tissues were dissected as previously described¹⁴. RNA samples were obtained as previously described³⁷. RNA were obtained using Trizol® reagent (Catalog #15596-018, Invitrogen®, Life Technologies™, Carlsbad, California, USA) then samples were treated with DNase (TURBO™ DNA-free Kit, Catalog #AM1907, Ambion®, Life Technologies™, Carlsbad, California, USA). Reverse transcription was performed with the iScript® cDNA synthesis kit (Catalog#170–889, BioRad, USA). Real-time PCR was performed using the iQ SYBR® Green Supermix (Catalog#170–8886, BioRad, USA) on C1000™ thermo-cycler (CFX96, Real-Time System, Bio-Rad, USA) as previously described³⁷. Quantitech Primers were purchased from Qiagen (Courtaboeuf, France) (Table 3). Quantitative gene expression was calculated by the $\Delta\Delta$ Ct method relative to *Gapdh* as reference gene.

Statistical analysis

To compare two groups, student *t* test was used and to compare three groups, ANOVA test was used. Statistical analyses were performed with GraphPad Prism software. All data in bar charts show mean \pm SEM. $P < 0.05$ is considered to have significant differences and was indicated by an asterix.

Results

IFB-088 with VPA slows down retinal degeneration in *Bbs12*^{-/-} mice

Bbs12^{-/-} mice retinal phenotypes and mechanisms were described in previous publication¹⁴. In attempt to slow down retinal degeneration, we treated *Bbs12*^{-/-} and WT mice with different concentrations of IFB-088 (2.5 μ M or 25 μ M) alone or in combination with VPA (0.2mM) by intravitreal injection. Two weeks after the injection, the effect of the treatment was assessed by ERG measurement by comparing the control eye (PBS injected) to the treated eye. In *Bbs12*^{-/-} mice, we observed a beneficial effect on the a-wave scotopic ERG amplitude of IFB-088 at 2.5 μ M alone or in combination, with an increase of 11% and 17% respectively (Fig.1A). However, at the concentration of 25 μ M of IFB-088, we observed a decrease of this a-wave amplitude³⁸. In WT mice, visual capacity was largely improved by the injection of the combination (IFB-88 2.5 μ M+ VPA; 25% increase) while the injection of IFB-088 alone has no effect on this parameter (Fig.1A).

Next, we focused on the structure of the retina, in particular the thickness of the retina layers which could reflect cell death, and the ER dilatation which is a robust marker of ER stress. In accordance to the ERG results, we observed an increase of the thickness of the retina layers (of 10 μ m for each layers) with the combination IFB-088 at 2.5 μ M and VPA and a decrease with the combination IFB-088 at 25 μ M and VPA (Fig.1B&C). However, when IFB-088 is administrated alone at 2.5 μ M, retinal layers were decreased (of 5 μ m, 10 μ m and 12 μ m for IS/OS, ONL and INL respectively) (Fig.1B&C), which could reflect an increase of cell death in the *Bbs12*^{-/-} mice. ER dilatation was reduced in photoreceptors of eye treated with the combination 2.5 μ M of IFB-088 and VPA (Fig.1D). These results are consistent with the increased of retinal layer thickness and improvement of the light detection capacity measured

by scotopic ERG. Two weeks after intravitreal injection, IFB-088 at 2.5 μ M in combination with VPA 0.2mM slows down RD in *Bbs12*^{-/-} mice.

***Rho*^{P23H/+} mice phenotype characterization**

To ensure that the *Rho*^{P23H/+} mice are qualified for the treatment, we first characterized the retinal phenotype of this model. By OCT imaging, a progressive decrease of the thickness of photoreceptors layers is observed in *Rho*^{P23H/+} compared to WT from 3 weeks to 7 weeks (Fig.2A). This decrease was also observed on Toluidin blue stained sections from retina of 1-month old *Rho*^{P23H/+} mice (Fig.2B). Indeed, at this age a significant decrease of the different retinal layers thickness is observed in *Rho*^{P23H/+} compared to WT (50% decrease and 30% decrease for IS/OS and ONL, respectively) (Fig.2C). Despite the decrease of the thickness of the OS in *Rho*^{P23H/+} retina, the rhodopsin is correctly localized in the outer segment (Fig.2D) as previously described³⁴. On retina from 1-month-old mice, an significant increase of the ER dilatation (from 34%) is observed in photoreceptors of *Rho*^{P23H/+} mice compared to WT mice (Fig.2E&F) which could reflect an ER stress in photoreceptors of *Rho*^{P23H/+} mice. At 1 month of age, 50% of the a-wave amplitude was lost in *Rho*^{P23H/+} mice compared to WT mice (Fig.2G). Then this a-wave amplitude decreased progressively from 1 month to 6 months (Fig.2H) in these mice. These results are in accordance which previous study from Sakami *et al.*³⁴.

***Rho*^{P23H/+} mice molecular characterization**

To confirm the activation of UPR pathway and apoptosis in retinal degeneration in *Rho*^{P23H/+} mice, a transcriptomic analysis was performed on retina of *Rho*^{P23H/+} and WT mice from post-natal day 14 to 21. The level of total rhodopsin mRNA (WT and mutated forms) is similar in *Rho*^{P23H/+} and WT retina (Fig.3A). The expression level of the WT allele was not modified by the expression of the mutated allele as the WT rhodopsin transcripts represent 50% of the total rhodopsin transcripts in heterozygous mice *Rho*^{P23H/+} compared to WT mice (Fig.3B).

To determine whether the UPR pathway and apoptosis were activated in the *Rho*^{P23H/+} mice retina during the week following the eye opening, quantitative PCR were performed on UPR and apoptosis gene markers on retina from 14 days, 18 days and 21-day-old mice. Previous study showed activation of the UPR, specially the IRE1 branch³³. But weak activation of the PERK branch was showed and no increased of Chop mRNA level. The data obtained here might indicate an increase of the UPR markers, in particular a significant increase of BiP at 18 days, and caspases 3 and 12 during the first week after the eyes open (Fig.3C). Further characterization on the protein level will be performed to validate the real time PCR results. In *Rho*^{P23H/+} mice, apoptosis and UPR pathways, in particular PERK branch, are activated from post-natal day 14.

Constitutive deletion of *Gadd34* improves visual capacities of *Rho*^{P23H/+} mice

To demonstrate the involvement of *Gadd34* in retinal degeneration, *Rho*^{P23H/+} mice expressing GADD34 (PPP1R15A) deleted of the PP1c binding domain (*Gadd34* ΔC) were generated by crossing *Rho*^{P23H/+} mice with *Gadd34*^{ΔC/ΔC} mice. While *Gadd34*^{ΔC/ΔC} mice did not present any modification of the a-wave amplitude compared to WT (Supplementary Fig.2), the *Gadd34*^{ΔC/ΔC} *Rho*^{P23H/+} mice presented a significant increase of the a-wave amplitude (from 44% at 3cd.s/m²) compared to *Rho*^{P23H/+} mice (Fig.4A). Despite the progressive decrease of the a-wave amplitude in both transgenic lines between 1 month and 6 months, the *Gadd34*^{ΔC/ΔC} *Rho*^{P23H/+} mice were still showing a higher a-wave amplitude compared to *Rho*^{P23H/+} mice at the same age (Fig.4B). As expected, the rhodopsin in *Gadd34*^{ΔC/ΔC} *Rho*^{P23H/+} retina was correctly localized in the Outer Segment (Fig.4C). Despite the ERG improvement, no difference on retinal layers thickness or ONL nuclei number were observed at 2-month-old in *Gadd34*^{ΔC/ΔC} *Rho*^{P23H/+} mice compared to *Rho*^{P23H/+} mice (Fig.4D-F). However, a significant decrease of the ER dilatation in *Gadd34*^{ΔC/ΔC} *Rho*^{P23H/+} retina was observed by T.E.M. (Fig.4G&H). While the surface of ER dilatation in *Rho*^{P23H/+} retina was twice the surface of ER in WT retina, the surface covered by the ER in

Gadd34^{ΔC/ΔC} Rho^{P23H/+} retina was reduced by half compared to *Rho^{P23H/+}* retina (Fig.4G&H) suggesting a reduction of the ER stress in *Gadd34^{ΔC/ΔC} Rho^{P23H/+}* retina. The absence of the functional PPP1R15A/PP1c phosphatase complex in *Rho^{P23H/+}* mice slows down retinal degeneration by improving light detection capacity measured by scotopic ERG and by reducing ER dilatation in photoreceptors.

IFB-088 transiently improved visual capacities of *Rho^{P23H/+}* mutant rodent models

To evaluate the potential beneficial effect of IFB-088 alone or in combination with VPA on RD in non-syndromic RP model, two rodent models were tested, the rat P23H-3 and the *Rho^{P23H/+}* KI mice. PBS (control), IFB-088 at 2.29mg/kg alone or in combination with VPA at 80mg/kg were administrated by daily oral gavage injection for 90 days in rat P23H-3 line from 28-day old. In these P23H-3 rats, rhodopsin expression is significantly increased compared to WT rats (Supplementary Figure 1). Two days and 52 days after the beginning of the treatment, no difference in the a-wave amplitude, on the ER dilatation or in the retinal thickness measured by OCT were observed between the control group and the group treated with IFB-088 alone or in combination (Supplementary Fig.3). However, in retina from P23H-3 rats treated with the combination IFB-088 and VPA, rhodopsin protein expression is significantly reduced and BiP protein expression is significantly increased compared to control P23H-3 retina. The ratio BiP/rhodopsin was significantly increased in the combination treated group (Supplementary Fig.4A-C) suggesting that the combination of IFB-088 and VPA was able to decrease ER stress in the retina of P23H-3 rats.

The treatments IFB-088 (2.29mg/kg) alone or in combination with VPA (80mg/kg) were administrated by oral gavage in another RP model, the *Rho^{P23H/+}* mice.

IFB-088 (2.29mg/kg) alone or in combination with VPA (80mg/kg) were administrated in *Rho^{P23H/+}* mice by oral gavage every other day for 1 week from post-natal day 14 (Fig.5A). One week after the last oral administration of the IFB-088, the a-wave amplitude is increased by

25% compared to control group (Fig. 5B). However, 3 weeks after the last oral administration, this increased of the a-wave amplitude in the IFB-088 group is lost (Fig. 5C). A slight increase of a-wave amplitude (18%) was observed 3 weeks after the end of the last administration of the combination IFB-088 and VPA in compared to control *Rho*^{P23H/+} mice (Fig.5B-C). In these 6 weeks old treated mice, the combination IFB-088 and VPA significantly increased IS/OS (29%), ONL (29%) and INL (16.5%) retinal thickness 3 weeks after the end of the last administration compared to control group (Fig.5C-D). 3 weeks after the last administration of IFB-088 or the combination IFB-088 and VPA, the ER dilatation in the photoreceptors are significantly decreased by 60% and 40% respectively (Fig.5E&F).

The pharmacological inhibition of PPP1R15A/PP1c phosphatase complex in combination with VPA transiently prevent RD in *Rho*^{P23H/+} mice in which the level of total rhodopsin protein expression (WT and mutated) is similar to the WT mice, by increasing retinal thickness and by reducing ER dilatation even 3 weeks after the last administration.

Discussion

Since the identification of ER stress and the UPR pathway activation as common mechanisms in both form of RP, syndromic and non-syndromic RP, several studies have shown that targeting the UPR pathway could be beneficial to slow down the retinal degeneration^{14,17,27,39}. For example, the increase of ER chaperone expression, BiP, by VPA was efficacious to slow down the retinal degeneration in RP^{14,27}. The inhibition of PPP1R15A/PP1c phosphatase complex has also shown some promising results on the retinal degeneration in RP mouse models. The genetic invalidation of PPP1R15A in a LCA mouse model, Rd16 mice has slow down the retinal degeneration⁴⁰. A recent study has also shown that combining the increase the ER folding capacities by VPA to the attenuation of global protein translation by inhibiting PPP1R15A/PP1c phosphatase complex with GBZ was also able to slow down retinal

degeneration in a BBS mouse model, the *Bbs12*^{-/-} mice¹⁴. Despite its PPP1R15A/PP1c phosphatase complex inhibition activity, GBZ has much greater potency as an agonist at α 2-adrenergic receptors than at PPP1R15A/PP1c phosphatase complex inhibitor¹⁹ so doses that inhibit PPP1R15A/PP1c phosphatase complex would cause severe and unacceptable hypotensive symptoms. Therefore, the utilization of a PPP1R15A/PP1c phosphatase complex inhibitor devoid of α 2-adrenergic activity is required to slow down retinal degeneration in RP. In this study, GBZ was replaced by IFB-088, a PPP1R15A/PP1c phosphatase complex inhibitor devoid of α 2-adrenergic activity³⁰. We demonstrated that IFB-088 in combination with VPA slows down retinal degeneration in *Bbs12*^{-/-} mice. The light detection capacity was improved 2 weeks after the intravitreal injection of IFB-088 alone or in combination with VPA. However, only the combination IFB-088 and VPA increased significantly retinal layers thickness in the *Bbs12*^{-/-} mice. This increase of thickness of the retinal layers was associated with a reduction in the ER enlargement in photoreceptors suggesting a decrease of the protein accumulation in the ER and so a reduction of ER stress. These results confirmed the results previously obtained with the combination GBZ and VPA in *Bbs12*^{-/-} mice¹⁴ indicating that targeting PPP1R15A/PP1c could be a promising therapeutic target to slow down the retinal degeneration in syndromic RP.

To determine if the inhibition of PPP1R15A/PP1c phosphatase complex could also be a valuable approach to slow down the retinal degeneration in a non-syndromic RP, we first demonstrated that ER stress and UPR activation were occurring during retinal degeneration in a model of non-syndromic RP, the Rho P23H-KI mouse model³⁴. As shown previously³⁴, the *Rho*^{P23H/+} mice display a 50% reduction of the light detection capacity compared to WT at 1-month-old. From 1-month old to 6-month old, the light detection capacity of these mice decreases slowly. The visual impairment is associated to a reduction of the thickness of the retinal layers. Despite the location of rhodopsin in the outer segment of the photoreceptors, the

photoreceptors of *Rho*^{P23H/+} mice displayed enlarged ER indicating ER stress in these cells. We demonstrated that the ER chaperone expression, BiP, increased in the week following the opening of the eye of *Rho*^{P23H/+} mice. However, we could not observe an increase of Chop and Perk at the mRNA level which was in accordance with a previous observation from Chiang and colleagues³³.

To demonstrate that preventing the dephosphorylation of eIF2 α by inhibiting PPP1R15A/PP1c phosphatase complex could be a valuable approach to slow down the retinal degeneration in RP, we analyzed the phenotype of the *Gadd34*^{AC/AC} *Rho*^{P23H/+} mice. These *Rho*^{P23H/+} mice express an unfunctional PPP1R15A/PP1c phosphatase complex³². *Gadd34*^{AC/AC} *Rho*^{P23H/+} mice displays a better light detection capacity than the *Rho*^{P23H/+} mice. However, the retinal layers thickness and the ONL nuclei number were not increased. These results differed from the study on *Rd16* mice with the same constitutive *Gadd34* deletion⁴⁰ in which the unfunctional PPP1R15A/PP1c phosphatase complex leads to an increase of nuclei in the ONL without functional improvement. The functional improvement observed in *Gadd34*^{AC/AC} *Rho*^{P23H/+} mice is associated to a reduction of ER enlargement in photoreceptors suggesting that the absence of a functional PPP1R15A/PP1c phosphatase complex could reduce ER stress in photoreceptors and improve light detection capacity. Therefore, targeting the PPP1R15A/PP1c phosphatase complex could be a valuable approach to slow down the retinal degeneration in non-syndromic RP and in particular the most prevalent form of ADRP, the Rhodopsin P23H mutation.

To evaluate the effect of the pharmacological inhibition of PPP1R15A/PP1c phosphatase complex on retinal degeneration of RP, IFB-088 alone or in combination with VPA were administered in two P23H rhodopsin rodent models, the P23H-3 rats and the *Rho*^{P23H/+} mice. First, the combination IFB-088 and VPA was administered to P23H-3 rats in which the mutated P23H rhodopsin is overexpressed in retina. Although the daily administration of combination could not improve the light detection capacity of these transgenic rats, the combination IFB-

088 and VPA was able to reduce the rhodopsin level in retina and increase the ER chaperone, BiP. These observations could suggest that the level of rhodopsin in treated P23H-3 rats was not low enough to impact the survival of the photoreceptors and thus to improve light detection capacity. To evaluate the effect of IFB-088 alone and the combination IFB-088 with VPA in a rodent model in which rhodopsin is not overexpressed, we used the *Rho*^{P23H/+} mice. These mice express a normal level of total rhodopsin, P23H mutated rhodopsin and WT rhodopsin. In these mice, we demonstrated that IFB-088 administered every other day in the week following the eye opening transiently improves light detection capacity one week after the last administration. Three weeks after the last administration, the ER enlargement in photoreceptors was only reduced in retina of IFB-088 treated *Rho*^{P23H/+} mice. In contrast, IFB-088 combined to VPA was able, 3 weeks after the last administration, to improve light detection capacity, to increase retinal layers thickness and to reduce ER enlargement in photoreceptors. In contrast with the data obtained on an overexpressing P23H mutated rhodopsin model, the combination IFB-088 and VPA has slow down the retinal degeneration observed in a P23H rhodopsin knock-in model in which the expression of rhodopsin is normal. In ADRP patient, the rhodopsin protein level is also normal suggesting that the combination of VPA with IFB-088 could be beneficial to slow down retinal degeneration. However, more studies have to be done to determine the dose of VPA and IFB-088 and the dosing regimen to prolong the positive effect of the combination. To conclude, we demonstrate that the pharmacological inhibition of PPP1R15A/PP1c phosphatase complex could slow down retinal degeneration by reducing the ER enlargement and ER stress. To further slow-down retinal degeneration in RP, the IFB-088 might be associated with VPA which should increase the protein folding capacity of the ER. However, more studies are needed to determine the dosing regimen of the combination IFB-088 and VPA to be more efficacious to slow down retinal degeneration in syndromic and non-syndromic RP.

Conflict of interest

Philippe Guédat, Pierre Miniou and Emmanuelle Abgueguen are from Inflection Bioscience developing IFB88 for clinical applications.

IN PROGRESS

References

- 1 Fernandez-San Jose, P. *et al.* Prevalence of Rhodopsin mutations in autosomal dominant Retinitis Pigmentosa in Spain: clinical and analytical review in 200 families. *Acta Ophthalmol* **93**, e38-44, doi:10.1111/aos.12486 (2015).
- 2 Hartong, D. T., Berson, E. L. & Dryja, T. P. Retinitis pigmentosa. *Lancet* **368**, 1795-1809, doi:10.1016/S0140-6736(06)69740-7 (2006).
- 3 Megaw, R. & Hurd, T. W. Photoreceptor actin dysregulation in syndromic and non-syndromic retinitis pigmentosa. *Biochem Soc Trans* **46**, 1463-1473, doi:10.1042/BST20180138 (2018).
- 4 Daiger, S. P., Sullivan, L. S. & Bowne, S. J. Genes and mutations causing retinitis pigmentosa. *Clin Genet* **84**, 132-141, doi:10.1111/cge.12203 (2013).
- 5 Adams, N. A., Awadein, A. & Toma, H. S. The retinal ciliopathies. *Ophthalmic genetics* **28**, 113-125, doi:10.1080/13816810701537424 (2007).
- 6 Bujakowska, K. M., Liu, Q. & Pierce, E. A. Photoreceptor Cilia and Retinal Ciliopathies. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, doi:10.1101/cshperspect.a028274 (2017).
- 7 Kim, Y. J. & Kim, J. Therapeutic perspectives for structural and functional abnormalities of cilia. *Cell Mol Life Sci*, doi:10.1007/s00018-019-03158-6 (2019).
- 8 Reilly, M. L. & Benmerah, A. Ciliary kinesins beyond IFT: Cilium length, disassembly, cargo transport and signalling. *Biol Cell* **111**, 79-94, doi:10.1111/boc.201800074 (2019).
- 9 Abd-El-Barr, M. M. *et al.* Impaired photoreceptor protein transport and synaptic transmission in a mouse model of Bardet-Biedl syndrome. *Vision Res* **47**, 3394-3407, doi:10.1016/j.visres.2007.09.016 (2007).

- 10 Forsythe, E. & Beales, P. L. Bardet-Biedl syndrome. *European journal of human genetics : EJHG* **21**, 8-13, doi:10.1038/ejhg.2012.115 (2013).
- 11 Verbakel, S. K. *et al.* Non-syndromic retinitis pigmentosa. *Progress in retinal and eye research*, doi:10.1016/j.preteyeres.2018.03.005 (2018).
- 12 Rex, T. S. *et al.* Erythropoietin Slows Photoreceptor Cell Death in a Mouse Model of Autosomal Dominant Retinitis Pigmentosa. *PloS one* **11**, e0157411, doi:10.1371/journal.pone.0157411 (2016).
- 13 Chan, P., Stolz, J., Kohl, S., Chiang, W. C. & Lin, J. H. Endoplasmic reticulum stress in human photoreceptor diseases. *Brain Res* **1648**, 538-541, doi:10.1016/j.brainres.2016.04.021 (2016).
- 14 Mockel, A. *et al.* Pharmacological modulation of the retinal unfolded protein response in Bardet-Biedl syndrome reduces apoptosis and preserves light detection ability. *The Journal of biological chemistry* **287**, 37483-37494, doi:10.1074/jbc.M112.386821 (2012).
- 15 Starr, C. R., Pitale, P. M. & Gorbatyuk, M. Translational attenuation and retinal degeneration in mice with an active integrated stress response. *Cell Death Dis* **9**, 484, doi:10.1038/s41419-018-0513-1 (2018).
- 16 Athanasiou, D. *et al.* The role of the ER stress-response protein PERK in rhodopsin retinitis pigmentosa. *Human molecular genetics* **26**, 4896-4905, doi:10.1093/hmg/ddx370 (2017).
- 17 Gorbatyuk, M. S. *et al.* Restoration of visual function in P23H rhodopsin transgenic rats by gene delivery of BiP/Grp78. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 5961-5966, doi:10.1073/pnas.0911991107 (2010).

- 18 Kunte, M. M. *et al.* ER stress is involved in T17M rhodopsin-induced retinal degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **53**, 3792-3800, doi:10.1167/iovs.11-9235 (2012).
- 19 Tsaytler, P., Harding, H. P., Ron, D. & Bertolotti, A. Selective inhibition of a regulatory subunit of protein phosphatase 1 restores proteostasis. *Science* **332**, 91-94, doi:10.1126/science.1201396 (2011).
- 20 Yu, Y. *et al.* A new rhodopsin R135W mutation induces endoplasmic reticulum stress and apoptosis in retinal pigment epithelial cells. *J Cell Physiol*, doi:10.1002/jcp.28100 (2019).
- 21 da Cruz, L. *et al.* Phase 1 clinical study of an embryonic stem cell-derived retinal pigment epithelium patch in age-related macular degeneration. *Nat Biotechnol* **36**, 328-337, doi:10.1038/nbt.4114 (2018).
- 22 Khanna, H. Photoreceptor Sensory Cilium: Traversing the Ciliary Gate. *Cells* **4**, 674-686, doi:10.3390/cells4040674 (2015).
- 23 Wright, A. F., Chakarova, C. F., Abd El-Aziz, M. M. & Bhattacharya, S. S. Photoreceptor degeneration: genetic and mechanistic dissection of a complex trait. *Nat Rev Genet* **11**, 273-284, doi:10.1038/nrg2717 (2010).
- 24 Bergmann, T. J. & Molinari, M. Three branches to rule them all? UPR signalling in response to chemically versus misfolded proteins-induced ER stress. *Biol Cell* **110**, 197-204, doi:10.1111/boc.201800029 (2018).
- 25 Jain, B. P. An Overview of Unfolded Protein Response Signaling and Its Role in Cancer. *Cancer Biother Radiopharm* **32**, 275-281, doi:10.1089/cbr.2017.2309 (2017).
- 26 Hetz, C. & Saxena, S. ER stress and the unfolded protein response in neurodegeneration. *Nat Rev Neurol* **13**, 477-491, doi:10.1038/nrneurol.2017.99 (2017).

- 27 Vent-Schmidt, R. Y. J. *et al.* Opposing Effects of Valproic Acid Treatment Mediated by Histone Deacetylase Inhibitor Activity in Four Transgenic *X. laevis* Models of Retinitis Pigmentosa. *J Neurosci* **37**, 1039-1054, doi:10.1523/JNEUROSCI.1647-16.2016 (2017).
- 28 Wang, J. F., Bown, C. & Young, L. T. Differential display PCR reveals novel targets for the mood-stabilizing drug valproate including the molecular chaperone GRP78. *Mol Pharmacol* **55**, 521-527 (1999).
- 29 Carrara, M., Sigurdardottir, A. & Bertolotti, A. Decoding the selectivity of eIF2alpha holophosphatases and PPP1R15A inhibitors. *Nat Struct Mol Biol* **24**, 708-716, doi:10.1038/nsmb.3443 (2017).
- 30 Das, I. *et al.* Preventing proteostasis diseases by selective inhibition of a phosphatase regulatory subunit. *Science* **348**, 239-242, doi:10.1126/science.aaa4484 (2015).
- 31 Parfitt, D. A. & Cheetham, M. E. Targeting the Proteostasis Network in Rhodopsin Retinitis Pigmentosa. *Advances in experimental medicine and biology* **854**, 479-484, doi:10.1007/978-3-319-17121-0_64 (2016).
- 32 Novoa, I. *et al.* Stress-induced gene expression requires programmed recovery from translational repression. *EMBO J* **22**, 1180-1187, doi:10.1093/emboj/cdg112 (2003).
- 33 Chiang, W. C. *et al.* Robust Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation of Rhodopsin Precedes Retinal Degeneration. *Molecular neurobiology* **52**, 679-695, doi:10.1007/s12035-014-8881-8 (2015).
- 34 Sakami, S. *et al.* Probing mechanisms of photoreceptor degeneration in a new mouse model of the common form of autosomal dominant retinitis pigmentosa due to P23H opsin mutations. *The Journal of biological chemistry* **286**, 10551-10567, doi:10.1074/jbc.M110.209759 (2011).

- 35 LaVail, M. M. *et al.* Phenotypic characterization of P23H and S334ter rhodopsin transgenic rat models of inherited retinal degeneration. *Exp Eye Res* **167**, 56-90, doi:10.1016/j.exer.2017.10.023 (2018).
- 36 Marion, V. *et al.* BBS-induced ciliary defect enhances adipogenesis, causing paradoxical higher-insulin sensitivity, glucose usage, and decreased inflammatory response. *Cell metabolism* **16**, 363-377, doi:10.1016/j.cmet.2012.08.005 (2012).
- 37 Brun, A. *et al.* In vivo phenotypic and molecular characterization of retinal degeneration in mouse models of three ciliopathies. *Exp Eye Res* **186**, 107721, doi:10.1016/j.exer.2019.107721 (2019).
- 38 Vasilescu, J., Smith, J. C., Ethier, M. & Figeys, D. Proteomic analysis of ubiquitinated proteins from human MCF-7 breast cancer cells by immunoaffinity purification and mass spectrometry. *J Proteome Res* **4**, 2192-2200, doi:10.1021/pr050265i (2005).
- 39 Chiang, W. C., Hiramatsu, N., Messah, C., Kroeger, H. & Lin, J. H. Selective activation of ATF6 and PERK endoplasmic reticulum stress signaling pathways prevent mutant rhodopsin accumulation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **53**, 7159-7166, doi:10.1167/iovs.12-10222 (2012).
- 40 Starr, C. R. & Gorbatyuk, M. S. Delineating the role of eIF2alpha in retinal degeneration. *Cell Death Dis* **10**, 409, doi:10.1038/s41419-019-1641-y (2019).
- 41 Vasireddy, V. *et al.* Rescue of photoreceptor degeneration by curcumin in transgenic rats with P23H rhodopsin mutation. *PloS one* **6**, e21193, doi:10.1371/journal.pone.0021193 (2011).

Supplementary:

Supplementary material and methods

Generation of animals and animal management

The P23H heterozygous rats were supplied by LaVail (University of California) and delivered at Institut de la Vision by Charles River. Young rats of 10-15 days were sent with their respective mother in order to adapt in the animal facility before the onset of experimental procedures.

Treatments

Oral gavage was performed once a day every day on P23H-3 rats from postnatal day 28 during 90 days. 2.29 mg/kg of IFB-088 alone or in combination with 80mg/kg of VPA were administrated.

Optical Coherence Tomography (OCT)

OCT was used to measure the retinal layer thickness changes *in vivo* during the whole treatment using a non-invasive procedure. Two measurements were performed: the first one around P30, the second one 50 days later (at 80 days). A circular scan was performed at 800 μ M from the optic nerve and four images were extracted (nasal, temporal, dorsal, ventral) to perform measurements. The total retinal thickness and the photoreceptor layer thickness were measured.

Electroretinogram

Electroretinography on rats was used to evaluate the retinal function by measuring the electric activity of retinal cells. They were performed at Institut de la Vision. Two measurements were performed: the first one around P30, the second one 50 days later (at 80 days). Full field ERGs were performed in scotopic and photopic conditions.

ELISA

Retina were dissected as previously described and proteins were extracted in PBS 1X. ELISAs were performed according from manufacturer's protocol. Kits used are listed in Table 4.

IN PROGRESS

Table 1: Primers list

gene	Primer	Sequence (5'-3')
<i>Rhodopsin</i> <i>P23H</i>	P23H F	GGTAGCACTGTTGGGCATCT
	P23H R	GACCCACAGAGACAAGCTC
<i>Gadd34</i>	4AS	AAGCCTTCGCCATCTGCTTATCCAG
	6AS	GGAGATTGCAAGAGAGTGAACACAGC
	G7S	CCAGGAGAGAAGACCAAGGGACGT
<i>Rd8</i>	Rd8 F1	GTGAAGACAGCTACAGTTCTGATC
	Rd8 F2	GCCCCTGTTTGCATGGAGGAACTTGGAAAGACAGCTAC AGTTCTTCTG
	Rd8 R	GCCCCATTTGCACACTGATGAC
<i>Bbs12</i>	4511	AGT TGA TGT CTA TCA ATA ACT GCC A
	4514	ACA CCT CCA CTG CTG TTC CTG CC
	4515	CTT CTC GAG CTT AAG GTC GAC CTG

Table 2: Antibodies used for immunofluorescence

Antibody	Reference	Company
Primary antibodies		
Rhodopsin	R9153	Sigma-aldrich
Calnexin	GTX629976	GeneTex
Secondary antibodies		
Goat anti mouse Alexa Fluor 594	A-11032	Invitrogen
Goat anti-rabbit FITC	Ab6717-1	Abcam

Table 3: qPCR primers

Gene	Reference	company
<i>Rhodopsin</i>	Mm_Rho_1_SG QT00099022	Qiagen
<i>BiP</i>	Mm_Hspa5_1_SG QT00172361	Qiagen
<i>Chop</i>	Mm_Ddit3_2_SG QT01749748	Qiagen
<i>Perk</i>	Mm_Eif2ak3_1_SG QT00147329	Qiagen

<i>Caspase-3</i>	Mm_Casp3_2_SG QT01164779	Qiagen
<i>Caspase-6</i>	Mm_Casp6_2_SG QT00494921	Qiagen
<i>Caspase-7</i>	Mm_Casp7_1_SG QT01058085	Qiagen
<i>Caspase-9</i>	Mm_Casp9_1_SG QT00133280	Qiagen
<i>Caspase-12</i>	Mm_Casp12_2_SG QT00495376	Qiagen
<i>Gapdh</i>	Mm_Gapdh_3_SG QT01658692	Qiagen

Table 4: ELISA kit list

Protein	Reference	Company
BiP	ADI-900-214	Enzo Life technologies
CHOP	SEJ282Mu	Cloud-Clone Corp.
GADD34	Sec199Mu	Cloud-Clone Corp.
RHODOPSIN	Sec777Mu	Cloud-Clone Corp.

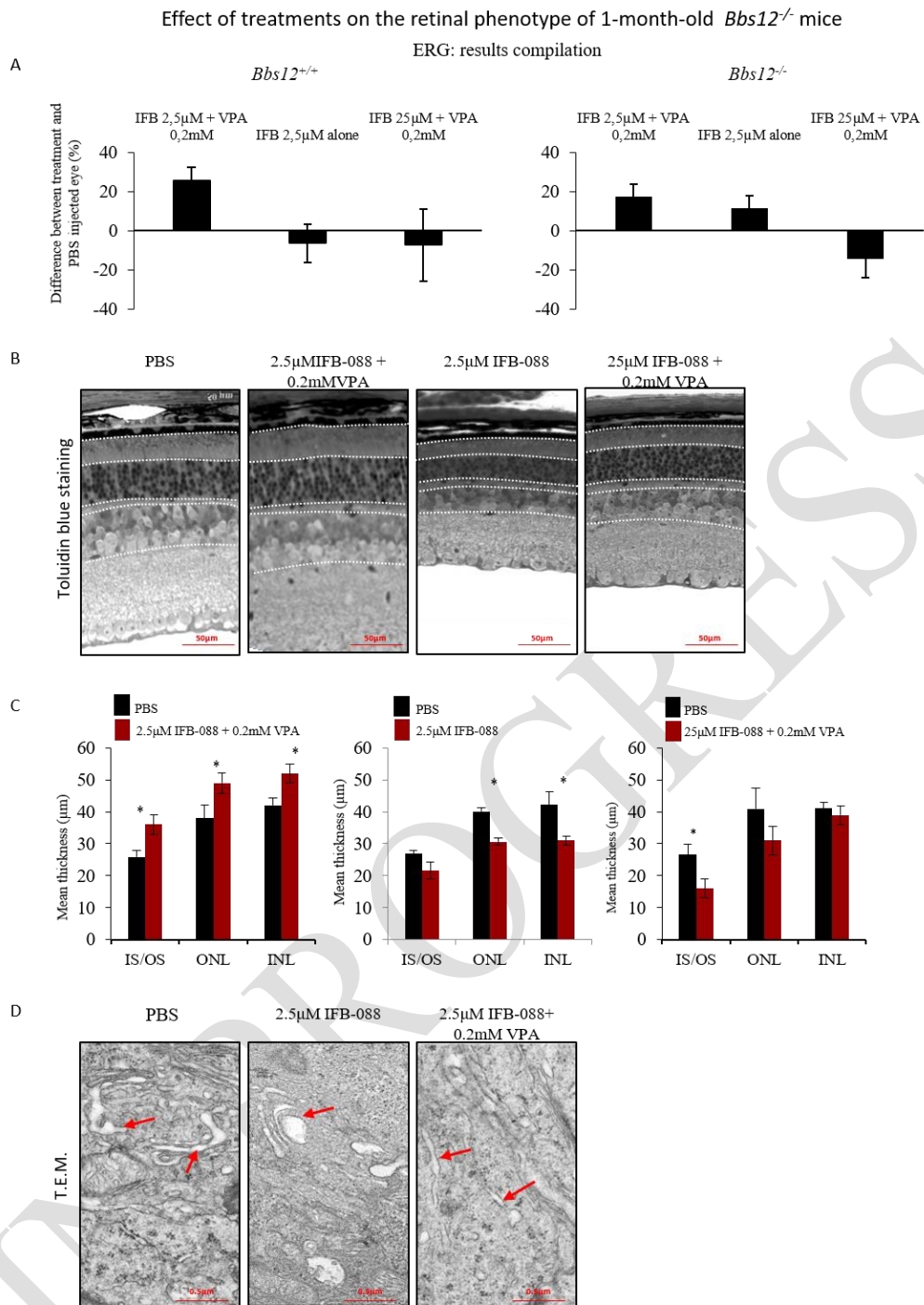


Figure 1

Figure 1: Effect of IFB-088 alone or in combination with VPA on the retinal degeneration of 1-month-old *Bbs12*^{-/-} mice, 2 weeks after intravitreal injection.

A) Tabulated mean of the percentage different between the drug-treated eye versus the vehicle treated eye (PBS) in WT (*Bbs12*^{+/+}) and *Bbs12*^{-/-} mice. Positive translates an increase in ERG response and negative translates a decrease in ERG compared to control PBS treated eye. n = 10-14 per group. B) Representative pictures of toluidin blue staining sections of 1-month-old treated *Bbs12*^{-/-} mice; scale bar: 50µm. C) Measurement of the retinal layers thickness (IS/OS, ONL and INL) on 1-month-old treated *Bbs12*^{-/-} mice. n = 6 per group. mean ± SEM D) Representative TEM pictures of 1-month-old treated *Bbs12*^{-/-} mice showing the ER dilatation; scale bar: 0.5µm. The red arrows indicated the ER cisternae

Rho^{P23H/+} mice phenotype characterization

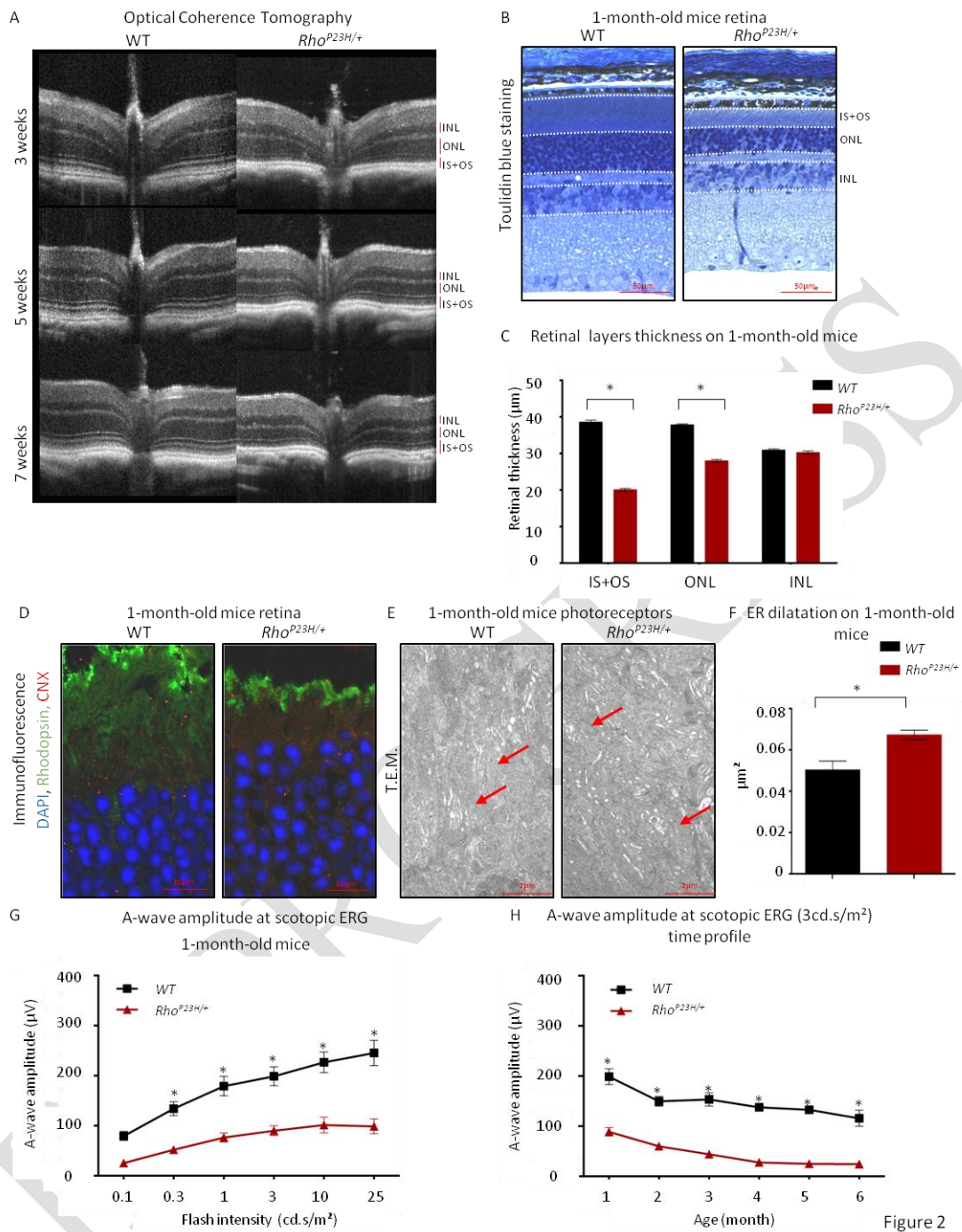


Figure 2

Figure 2: Retinal degeneration characterization of *Rho*^{P23H/+} mice

A) Representative optical coherence tomography pictures of WT and *Rho*^{P23H/+} mice at 3, 5 and 7 weeks (each picture measured 1,4mm horizontally and 300µm vertically). B) Representative pictures of toluidin blue staining sections of 1-month-old WT and *Rho*^{P23H/+} mice. Scale bar: 50µm. C) Measurement of the retinal layers thickness on 1-month-old WT and *Rho*^{P23H/+} mice. N=3, *: p<0.05. mean ± SEM D) Representative immunolocalization pictures of rhodopsin in retina from WT and *Rho*^{P23H/+} mice. Rhodopsin (green), Calnexin (CNX, red)⁴¹ and DAPI (Blue). (Magnification: 63X/1.40) Scale bar: 10µm. E) Representative TEM pictures of photoreceptors from 1-month-old WT and *Rho*^{P23H/+} mice showing the ER dilatation. The red arrows indicated the ER cisternas. Scale bar: 2µm. F) ER dilatation measurement on 1-month-old WT and *Rho*^{P23H/+} mice. N=3 *: p<0.05 (student *t* test). mean ± SEM G) A-wave amplitudes at scotopic ERG on 1-month-old WT and *Rho*^{P23H/+} mice. N=7, *:

$p \leq 0.05$ mean \pm SEM H) A-wave amplitudes measured at 3cd.s/m² by scotopic ERG from 1-month-old to 6-month-old WT and *Rho*^{P23H/+} mice N=5-11. *: $p \leq 0.05$. mean \pm SEM

IN PROGRESS

Molecular characterization of *Rho*^{P23H/+} mice

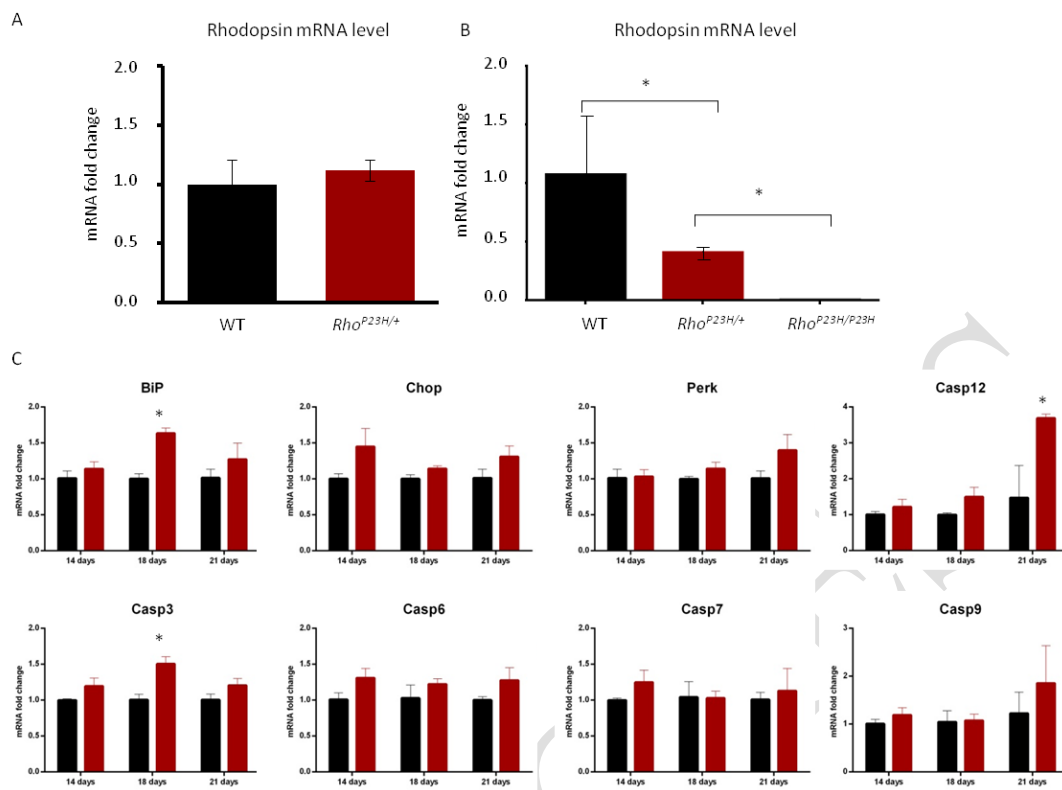


Figure 3

Figure 3: Molecular characterization of *Rho*^{P23H/+} mice

A) *Rhodopsin* mRNA level in 1-month-old WT and *Rho*^{P23H/+} mice. N=3. B) WT *Rhodopsin* mRNA level in retina from 1-month-old WT and *Rho*^{P23H/+} mice. N=3. Mean ± SEM *:p<0.05 (student *t* test).C) mRNA levels of ER stress makers and apoptosis genes and in retina from 14, 18 and 21-day-old WT and *Rho*^{P23H/+} mice N=3. mean ± SEM *:p<0.05 (student *t* test).

Effect of *Gadd34* inactivation on *Rho*^{P23H/+} mice retinal phenotype

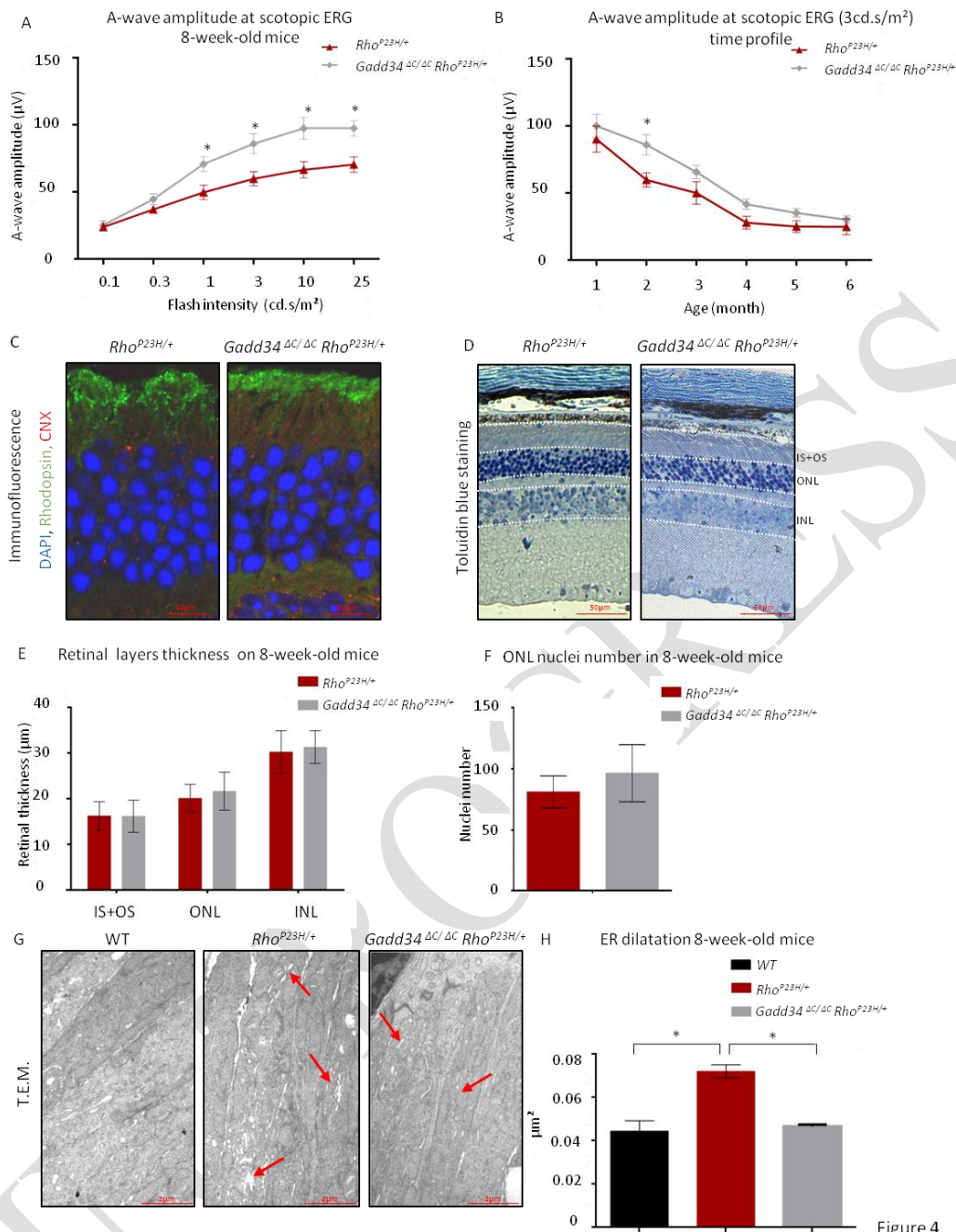


Figure 4

Figure 4: Effect of the genetic inactivation of PPP1R15A/PP1c phosphatase complex on the retinal degeneration of *Rho*^{P23H/+} mice

A) A-wave amplitudes recorded by scotopic ERG in 2-month-old *Rho*^{P23H/+} and *Gadd34*^{ΔC/ΔC} *Rho*^{P23H/+} mice. N=11, mean ± SEM ; *: p≤0.05 (student *t* test). B) A-wave amplitude measured at 3cd.s/m² by scotopic ERG (intensity: 3cd.s/m²) on 1-month-old to 6-month-old *Rho*^{P23H/+} and *Gadd34*^{ΔC/ΔC} *Rho*^{P23H/+} mice N=5-11. mean ± SEM *:p≤0.05 (student *t* test). C) Representative immunolocalization of rhodopsin in retina from 2-month-old *Rho*^{P23H/+} and *Gadd34*^{ΔC/ΔC} *Rho*^{P23H/+} mice. Rhodopsin (green), Calnexin (red) and DAPI. (Magnification: 63X/1.40) N=3; scale: 10µm. D) Representative picture of toluidin blue staining sections of retina from 2-month-old *Rho*^{P23H/+} and *Gadd34*^{ΔC/ΔC} *Rho*^{P23H/+} mice. scale: 50µm. E) Measurement of the retinal layer thickness of 2-month-old *Rho*^{P23H/+} and *Gadd34*^{ΔC/ΔC} *Rho*^{P23H/+} mice. N=3, mean ± SEM *: p≤0.05 (student *t* test). F) ONL nuclei number in retina from 2-month-old *Rho*^{P23H/+} and *Gadd34*^{ΔC/ΔC} *Rho*^{P23H/+} mice. N=3; mean ± SEM G) Representative TEM pictures of retina from 2-month-old *Rho*^{P23H/+} and *Gadd34*^{ΔC/ΔC} *Rho*^{P23H/+} mice. The

red arrows indicated the ER cisternas. Scale bar: 2 μ m. H) ER dilatation measurement in retina from 2-

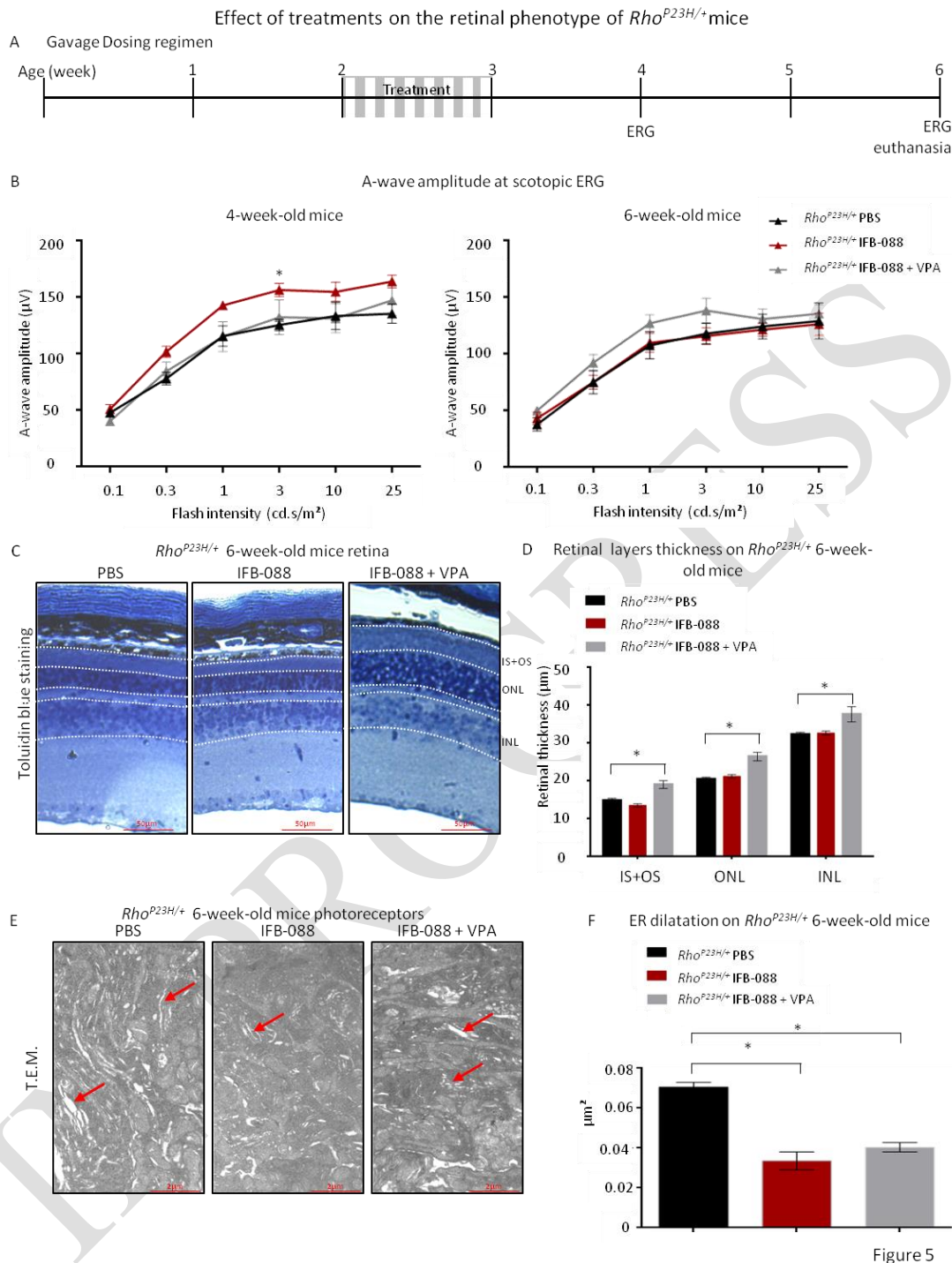


Figure 5

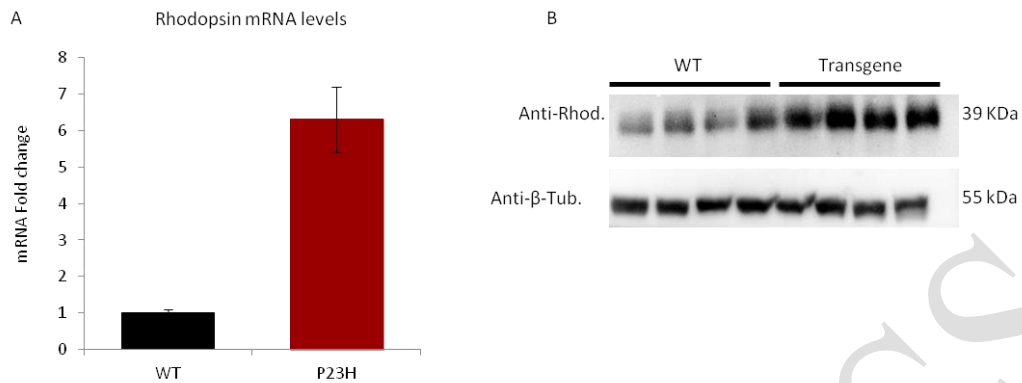
month-old *Rho*^{P23H/+} and *Gadd34*^{Δ/Δ}*Rho*^{P23H/+} mice N=3 mean \pm SEM, *: $p \leq 0.05$ (ANOVA test).

Figure 5: Effect of the treatments on the retinal phenotype of *Rho*^{P23H/+} mice

A) Schematic representation of the dosing regimen used for the oral administration of PBS, IFB-088 (2.29mg/kg) alone or in combination with VPA (80mg/kg) of *Rho*^{P23H/+} mice. The treatment was administrated every other day from post-natal day 14 to 21. B) A-wave amplitudes recorded by scotopic ERG on 1-month-old and 6-week-old *Rho*^{P23H/+} treated mice. N=6, mean \pm SEM, *: $p \leq 0.05$. C) Representative pictures of toluidin blue staining sections of retina from 6-week-old *Rho*^{P23H/+} treated mice. N=3, scale bar: 50 μ m. D) Measurement of the retinal layers thickness on 6-week-old *Rho*^{P23H/+} treated mice. N=3, mean \pm SEM, *: $p \leq 0.05$ (ANOVA test). E) Representative TEM pictures of retina

from 6-week-old *Rho*^{P23H/+} treated mice. Red arrows indicated the ER cisternas. scale bar: 2μm F) ER

P23H-3 line transgenic rat model

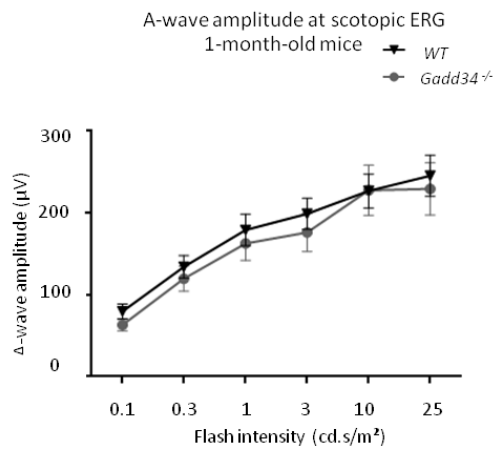


Supplementary Figure 1

dilatation measurement in photoreceptors from 6-week-old *Rho*^{P23H/+} treated mice N=3, mean ± SEM, *: p≤0.05 (ANOVA test).

Supplementary Figure 1: P23H-3 line transgenic rat model

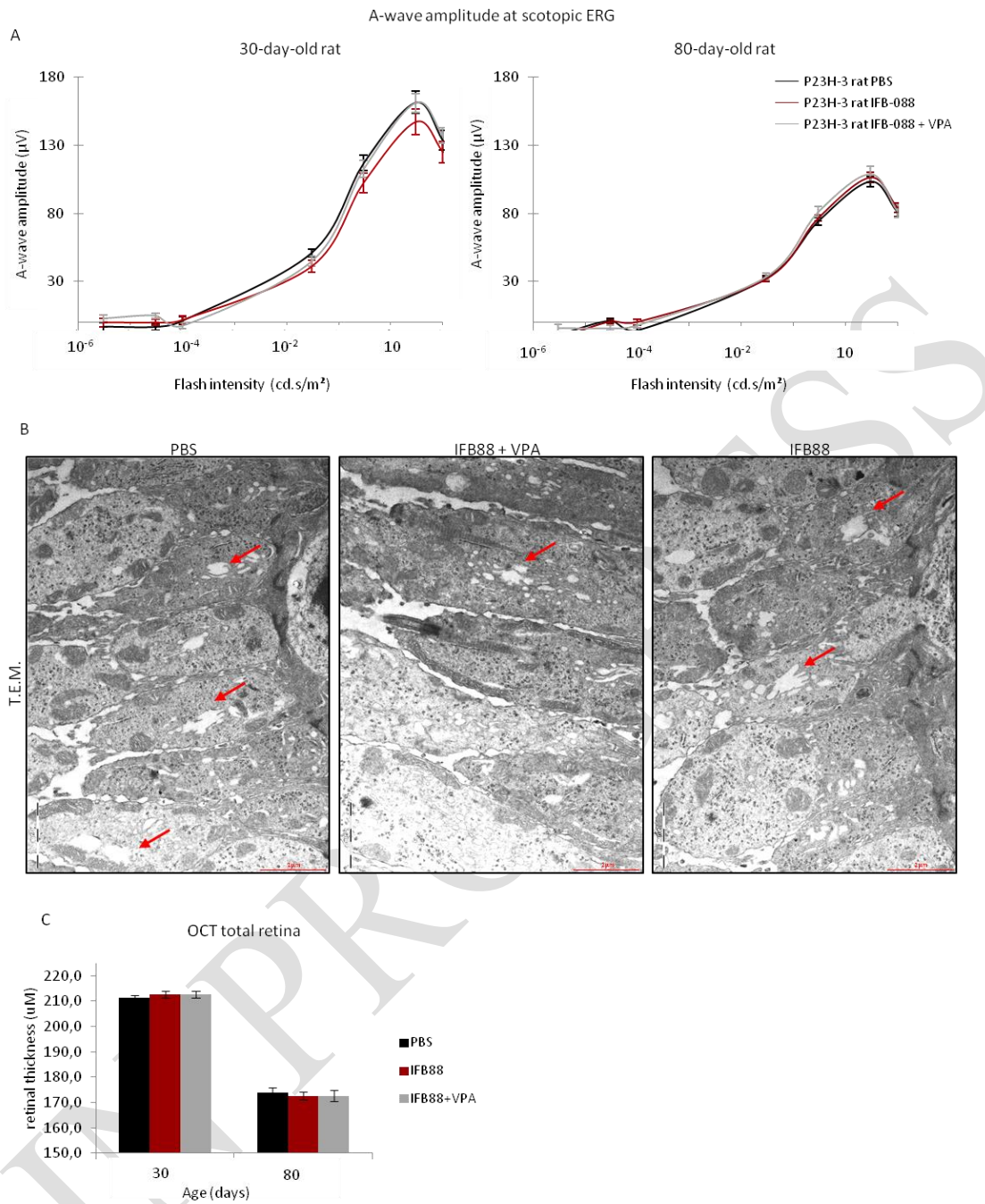
A) *Rhodopsin* mRNA level in retina from WT and P23H-3 rat. N=3. mean ± SEM, *: p≤0.05 (student *t* test). B) Representative image of immunostaining of Rhodopsin and β-Tubulin in protein samples from WT and P23H-3 rats. N=4.



Supplementary Figure 2

Supplementary Figure 2: Light detection capacity in 1-month-old WT ant *Gadd34*^{AC/AC} mice
A-wave amplitude recorded by scotopic ERG on 1-month-old WT ant *Gadd34*^{AC/AC} mice. N=7

Effect of the treatment on the P23H line 3 transgenic rat model

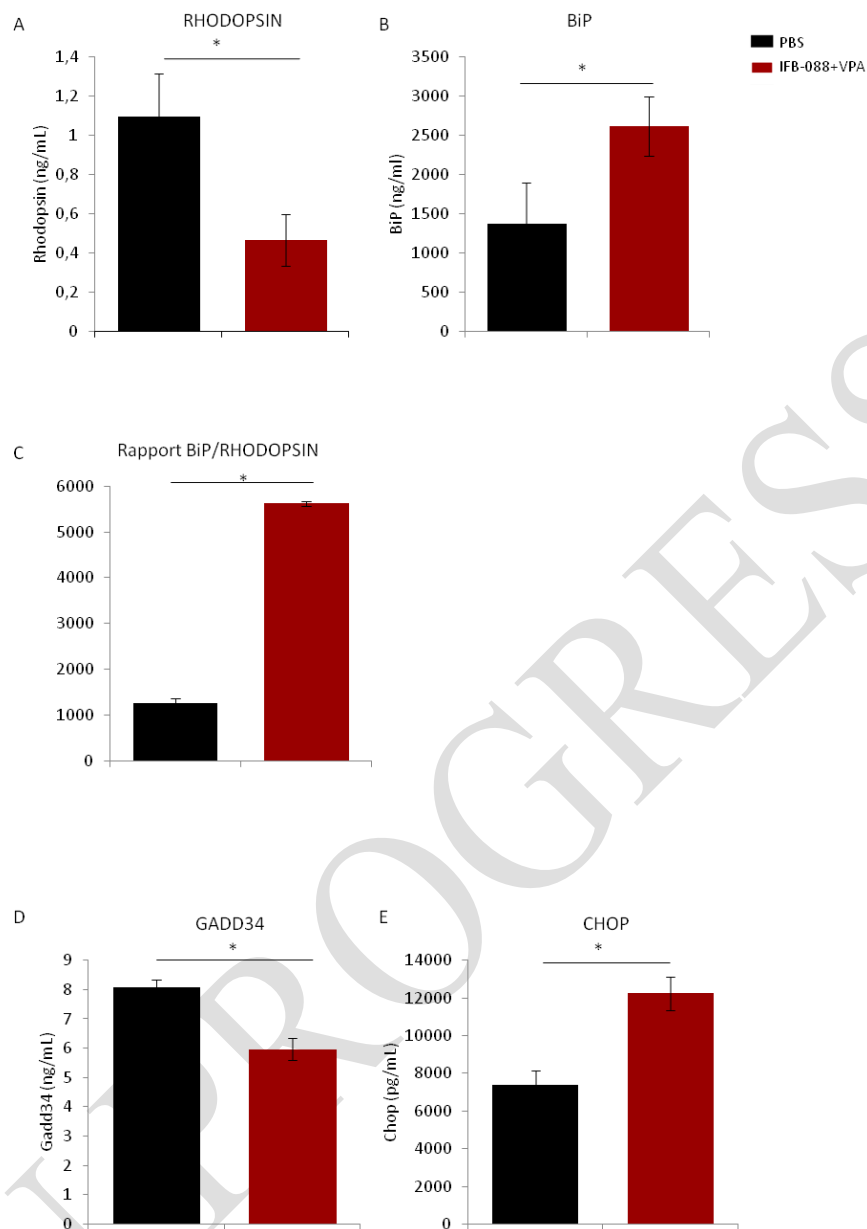


Supplementary Figure 3

Supplementary Figure 3: Evaluation IFB-088 alone or in combination with VPA on retinal degeneration of the P23H line 3 transgenic rat model

A) A-wave amplitude at scotopic ERG on 30 and 80-day-old treated rat. N=12. mean \pm SEM B) Representative TEM pictures on 4-month-old treated rat. Red arrow indicating the ER. scale bar: $2\mu\text{m}$. C) total retina thickness on 30 and 80-day-old treated rat measured by OCT. N=12

Effect of the treatment on the proteins level in the P23H line 3 transgenic rat model



Supplementary Figure 4

Supplementary figure 4: Evaluation IFB-088 alone or in combination with VPA on rhodopsin, ER stress markers protein level in retina from P23H line 3 transgenic rat model

Protein levels measured by ELISA on 4-month-old treated rat A) Rhodopsin level. B) BiP level. C) Ratio of the proteins level BiP/Rhodopsin. D) GADD34 level and E) CHOP level. mean \pm SEM N=3, *: $p < 0.05$ (student *t* test).

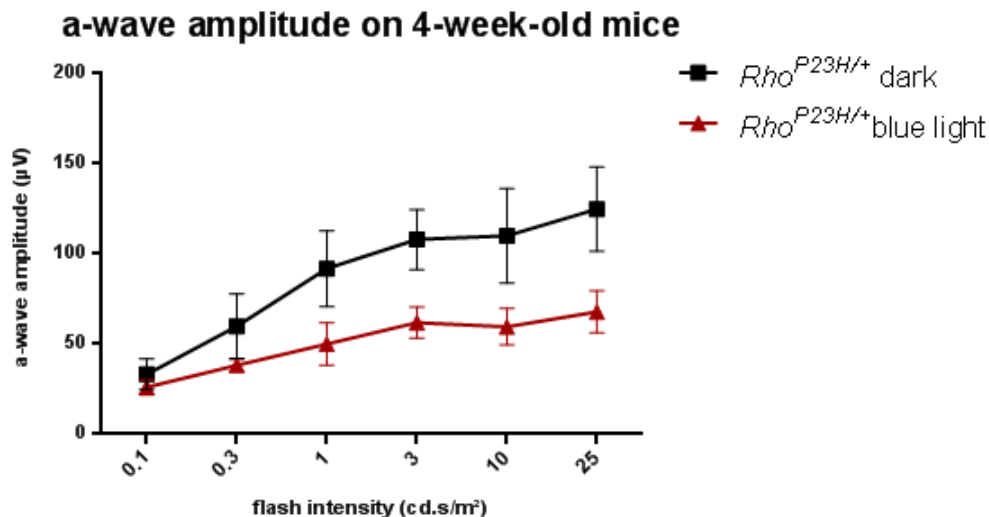
Résultats hors manuscrits :

A. Résultats de la caractérisation hors manuscrit

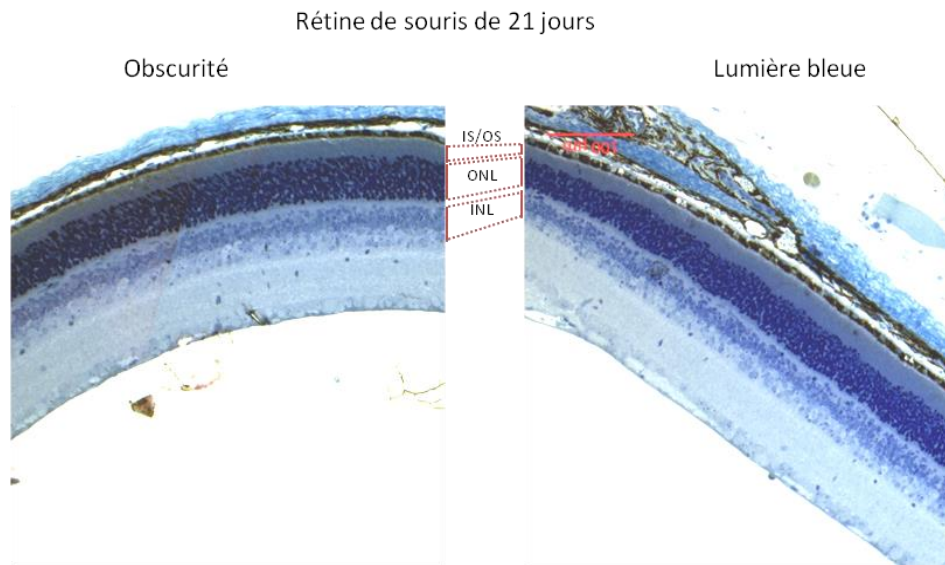
Effet de la lumière sur le phénotype rétinien des souris $Rho^{P23H/+}$

L'effet délétère de la lumière sur le phénotype rétinien associé à la mutation P23H de la rhodopsine a déjà été montré dans différentes études, montrant notamment des altérations du métabolisme rétinien^{113,192,272}. Lors de la caractérisation des souris $Rho^{P23H/+}$ nous nous sommes intéressés à l'effet de la lumière sur la dégénérescence rétinienne, en particulier sur l'activation de l'UPR, mécanisme d'intérêt dans notre étude. Nous avons donc soumis les souris à différentes conditions lumineuses afin de mettre des différences tant phénotypiques que moléculaires au niveau rétinien.

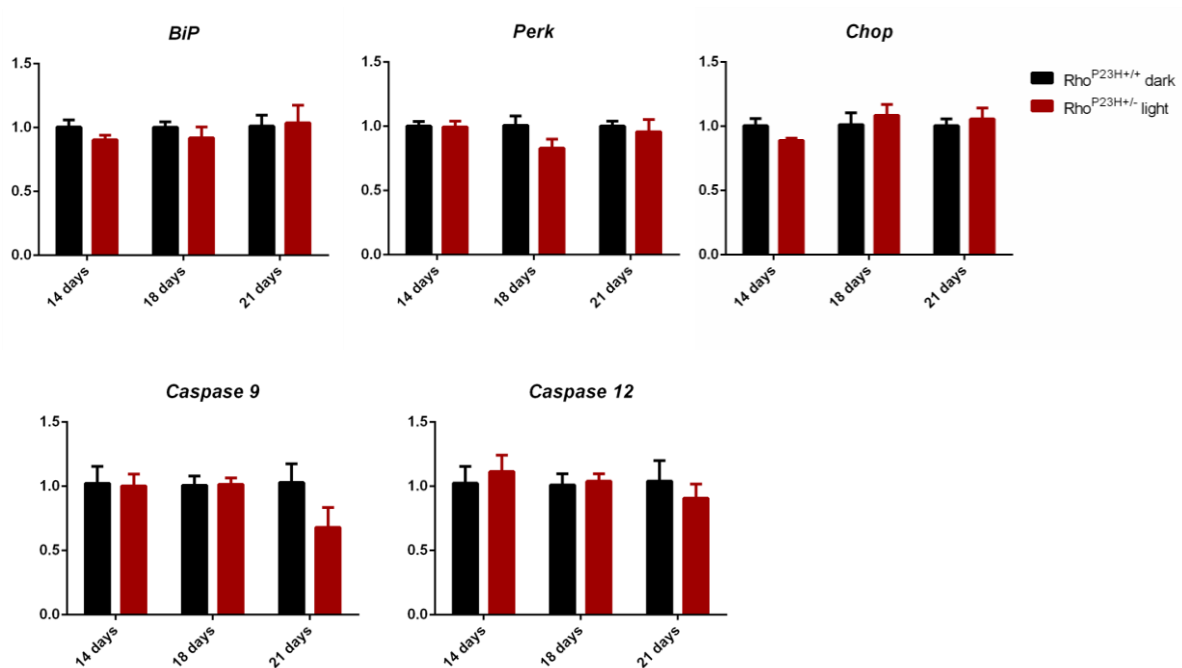
Les résultats d'ERG obtenus sur ces souris montrent un effet important de la lumière sur les capacités visuelles des souris mutantes. En effet, à 1 mois, la réponse à l'ERG est diminuée de moitié lorsque les souris ont été exposées à la lumière intense (mélange de lumière bleue et blanche) 12h par jour comparé à des souris qui n'ont jamais été exposées à la lumière.

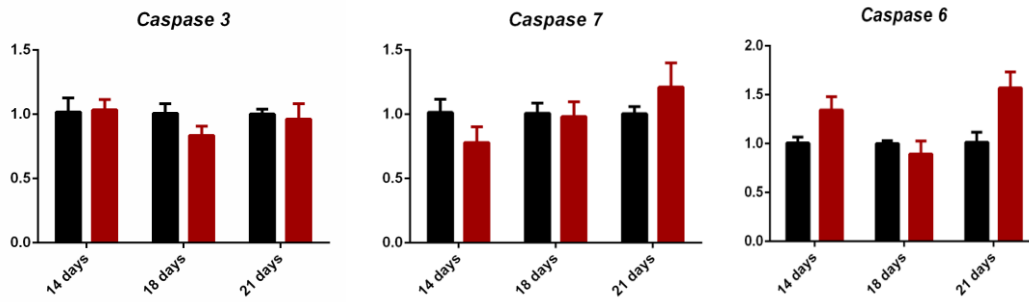


Cette diminution de la réponse à l'ERG est accompagnée par une augmentation de la vitesse de la dégénérescence rétinienne comme le montre les images de coupes semi-fines. Les épaisseurs des couches de la rétine sont amincies chez des souris de 21 jours exposées à la lumière de forte intensité.

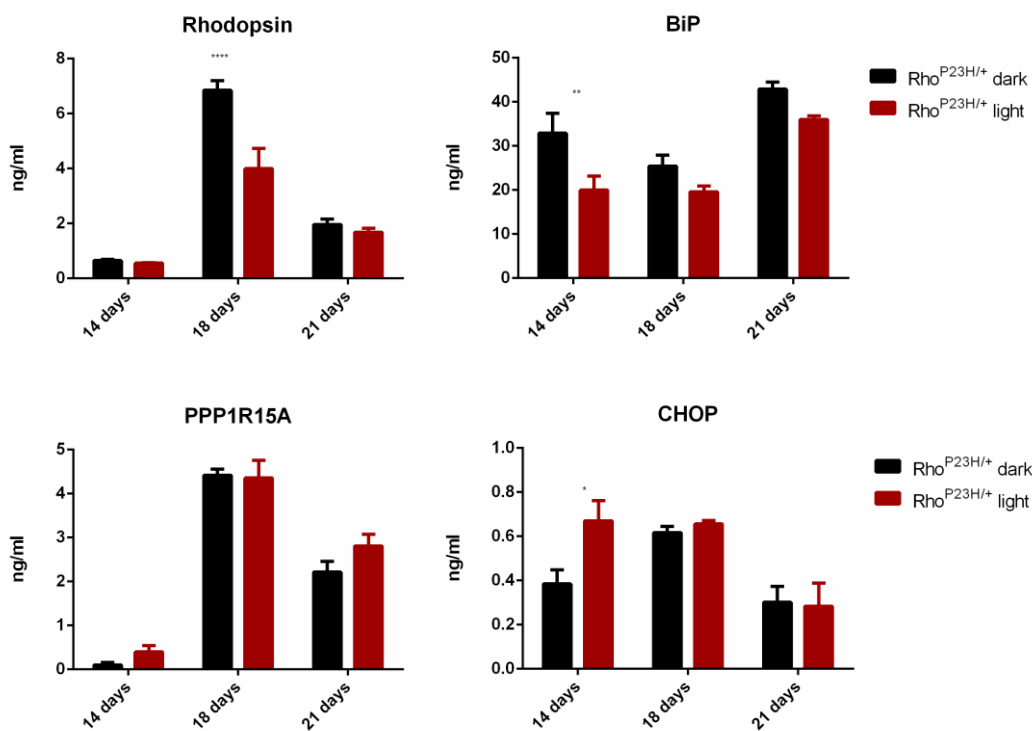


En revanche l'analyse des marqueurs de l'UPR et apoptotiques, durant la première semaine suivant l'ouverture des yeux, ne montre pas de variation des niveaux d'expression au niveau transcriptomique suivant l'exposition lumineuse.





Des variations des niveaux protéiques de quelques marqueurs de l'UPR ont cependant été observées durant la première semaine suivant l'ouverture des yeux (entre 14 et 21 jours).



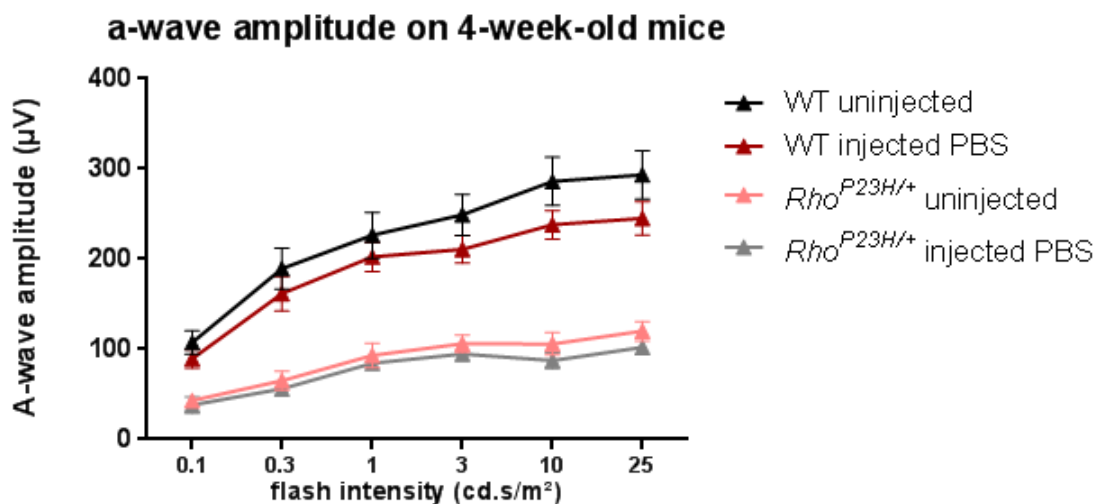
L'exposition à la lumière affecte donc négativement les capacités visuelles, ainsi que la structure de la rétine, en particulier au niveau des couches des photorécepteurs. Nous montrons ici que l'UPR ne semble pas impliqué dans ce processus, les niveaux des différents marqueurs variant peu entre les différentes conditions lumineuses.

B. Résultats des traitements hors manuscrit

1. Administration du traitement par injection intravitréenne

Différentes séries de traitement ont été réalisées au cours de l'étude. L'une d'entre elles a été faite par injection intravitréenne sur des souris *Rho*^{P23H/+} âgées de 14 jours. Ce mode d'administration ayant été utilisé lors de l'étude sur les souris *Bbs12* KO et ayant montré des résultats bénéfiques, nous avons d'abord voulu l'appliquer à notre modèle et ainsi comparer les résultats obtenus avec l'étude précédente.

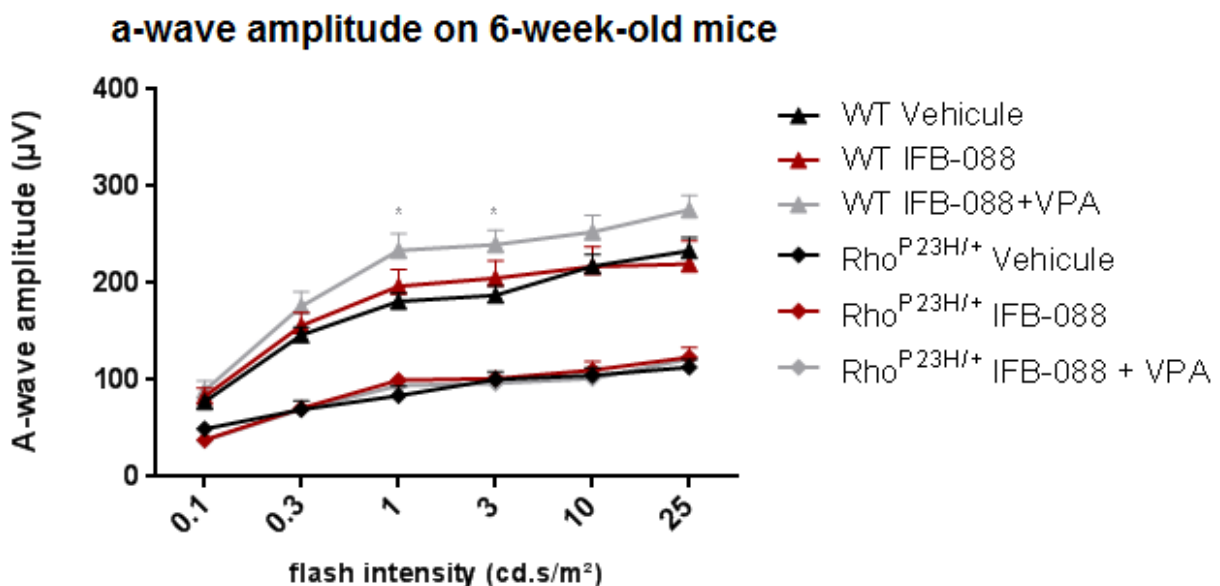
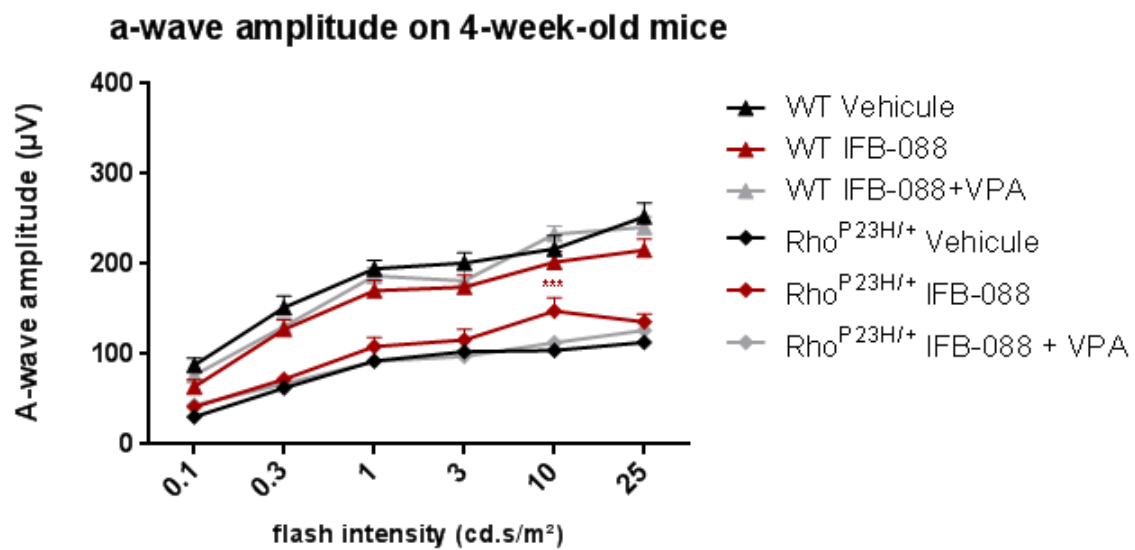
Les premiers résultats obtenus après injection de PBS ont montré un effet délétère de l'injection en elle-même avec une diminution de la réponse à l'ERG scotopique. Les traitements avec les substances actives n'ont donc pas été effectués au vu de ces résultats, ceux-ci entraînant un biais dans l'analyse. En effet la réponse mesurée aurait été composée de l'effet du traitement mais également de l'effet de l'injection.



L'ensemble de l'étude a donc été effectuée par administration des traitements par gavage. Différentes séries ont été faites afin d'ajuster les doses et essayer de prolonger l'effet des traitements.

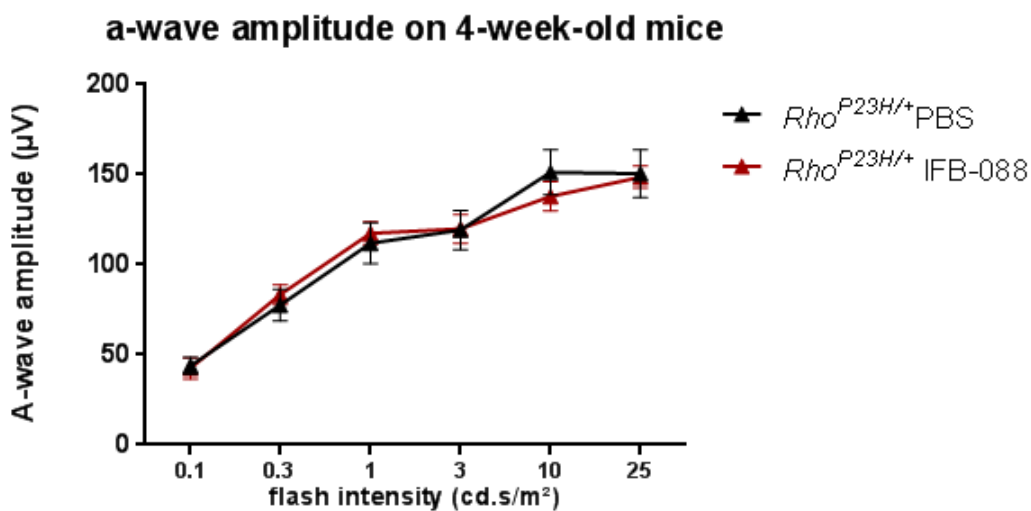
2. Administration du traitement par gavage

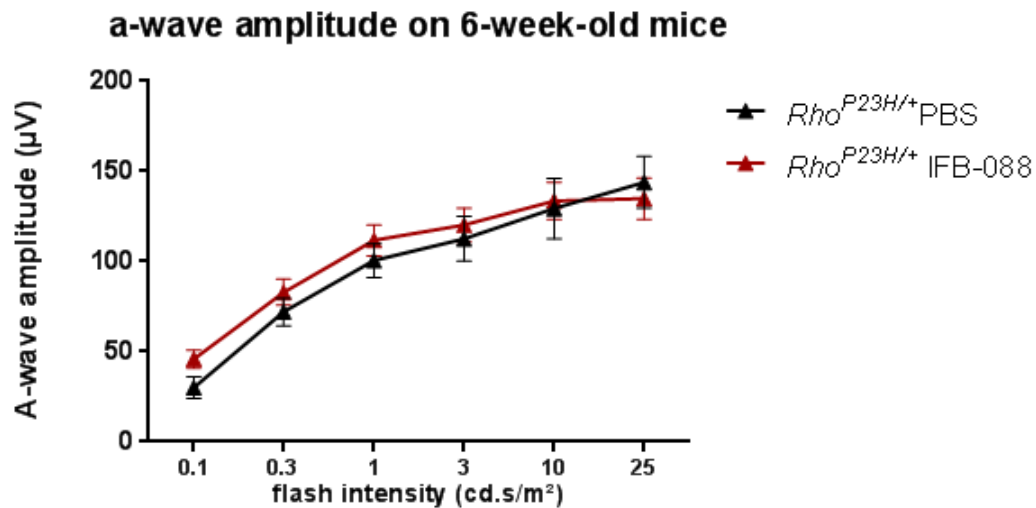
La première série de traitement effectuée consistait à administrer le traitement de manière quotidienne dès 14 jours et tout au long de l'étude, soit jusqu'à 6 semaines (les doses utilisées étaient de 2,29mg/kg d'IFB-088 sous forme de base libre et 80mg/kg de VPA). Les résultats obtenus ont montré une légère augmentation à 4 semaines (soit 2 semaines après début du traitement) avec l'IFB-088 seul, la combinaison ne semblant pas avoir d'effet à ce stade. En revanche deux semaines plus tard aucune amélioration de la réponse à l'ERG n'est visible.



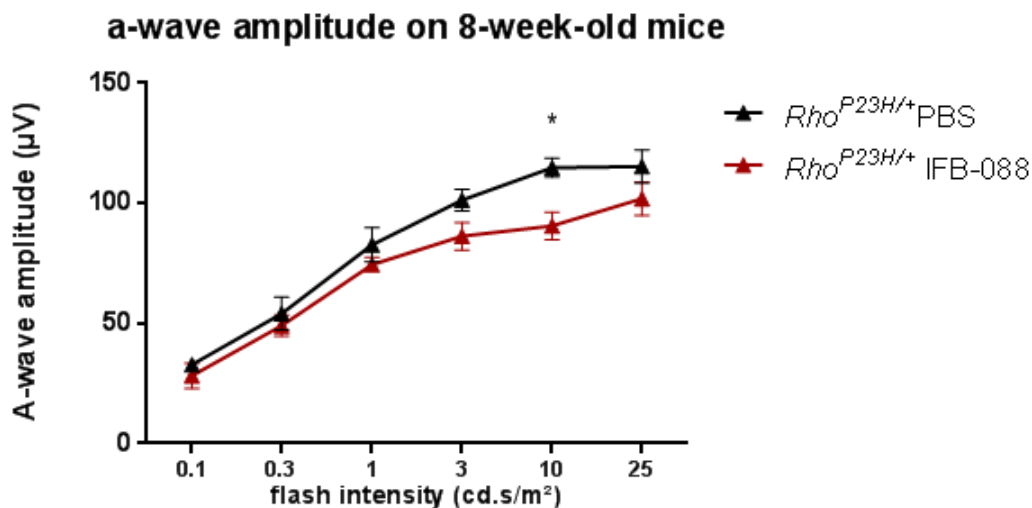
A la vue de ces résultats, nous avons pensé à un effet de surdosage des molécules. L'administration a donc été faite un jour sur deux afin de diminuer l'exposition. L'IFB-088 semblant avoir un effet principalement durant le premier mois, nous l'avons administré durant la troisième semaine de vies de la souris, soit de 14 à 21 jours. Les résultats de cette série de traitement sont ceux figurant dans le deuxième manuscrit présenté. Les résultats ont montré un effet bénéfique de l'IFB-088 seul à 4 semaines, effet perdu deux semaines plus tard. Ces résultats sont similaires à ceux observés lors de la première série de traitement. En revanche une tendance à l'augmentation de la réponse avec la combinaison a été observée à 6 semaines, ce qui n'avait pas été observé précédemment.

Les résultats de cette seconde série présentant plus d'effets que la première série, nous avons réalisé une troisième série de traitements par administration quotidienne en diminuant la dose d'IFB-088 administrée de moitié (soit 1,145mg/kg sous forme libre). Malgré la diminution de la dose qui semblait bénéfique précédemment, aucune amélioration de la réponse à l'ERG scotopique n'a pu être mesurée en suivant ce régime d'administration, cela aussi bien à 4 qu'à 6 semaines. La dose diminuée de moitié par rapport à la première série semble donc insuffisante pour produire les effets bénéfiques qui avaient alors été observés et qui le sont également lors de l'administration un jour sur deux.





Une dernière série de traitement a été réalisée suivant un régime d'administration d'un jour sur deux, de 14 jours comme précédemment jusqu'à 2 mois afin de voir si ce régime d'administration pouvait prolonger l'effet observé précédemment avec l'IFB-088. Malheureusement cette série de traitement n'a pas permis de montrer un effet à plus long terme avec l'IFB-088, en effet à 2 mois aucune amélioration à l'ERG n'est visible.



L'ensemble des traitements réalisés montrent qu'il est possible de moduler l'UPR dans ce modèle mutant de la rhodopsine, comme le montre les deux premières séries de

traitement. Cependant l'effet observé est de courte durée, ne dépassant pas les 6 semaines. Le régime d'administration (dose et fréquence) semble critique dans l'effet observé comme le montre les différences entre les différentes séries de traitement. Un dosage trop fort (série 1) ou insuffisant (série 3) ne permettant que peu d'amélioration des capacités visuelles même à court terme.

Des optimisations seraient encore nécessaires pour tenter d'augmenter et prolonger l'effet observé dans cette étude.

Discussion et perspectives

A ce jour très peu de traitements pour les RP sont disponibles à la prescription, à l'exception des rétinopathies pigmentaires associées à des mutations du gène *RPE65*, pour lesquelles une thérapie génique est sur le marché ¹⁹³. Le développement de thérapies pour ces maladies est donc un enjeu majeur. Un traitement ciblant les mécanismes physiopathologiques impliqués dans la dégénérescence rétinienne plutôt que le gène qui en est responsable permettrait de toucher un plus large groupe de malades. A cette fin, la compréhension des mécanismes physiopathogéniques et leur régulation est une étape déterminante dans le développement de thérapies.

Les résultats obtenus au cours de ce travail de thèse ont notamment permis de contribuer à la compréhension des mécanismes impliqués dans les RP associées à différentes ciliopathies. Au cours des différentes études, nous avons ainsi démontré **l'activation de l'UPR comme mécanisme associé à différentes formes de dégénérescences rétiniennes** : les ciliopathies (dans les modèles du BBS ou de celui de l'*ACL-CEP290*) ou des variants de la rhodopsine (forme non syndromique de RP). Cette observation fait de l'UPR une cible thérapeutique d'intérêt dans le développement d'un traitement pour ces pathologies. Néanmoins, bien que l'UPR soit activée dans différents modèles de ciliopathies, une généralisation n'est pas possible comme l'a montré l'étude du modèle du Syndrome d'Alström. Dans ce dernier modèle, nous avons montré que l'UPR ne semble pas impliquée dans le processus de dégénérescence rétinienne. L'appartenance du syndrome d'Alström au groupe des ciliopathies est cependant actuellement discutée, aucune anomalie directe du cil n'ayant été mise en évidence. La protéine ALMS1 semblerait impliquée dans d'autres processus cellulaires, trafic intracellulaire, endocytose notamment²⁷³. Un rôle d'ALMS1 dans le transport de GLUT4, transporteur du glucose retrouvé notamment au niveau de la rétine, a été montré²⁷⁴. La rétine est un tissu à haut niveau métabolique utilisant exclusivement le glucose, un déficit en glucose peut donc entraîner des troubles importants dans le fonctionnement de ce tissu.

Nous avons également montré des **différences importantes dans les cinétiques associées à la dégénérescence rétinienne** des différents modèles étudiés. Nous avons constaté un développement précoce avec une progression rapide associée au modèle *Cep290*^{-/-}, phénotype similaire à la pathologie humaine. L'âge d'apparition précoce ainsi que la vitesse de progression ne laissent que peu de temps pour une éventuelle intervention thérapeutique. A l'opposé, une cinétique plus lente ou avec un âge d'apparition tardif laisserait une fenêtre thérapeutique plus large pour intervenir durant les premiers stades de développement de la

pathologie. C'est le cas du BBS ou de la mutation P23H de la rhodopsine notamment, qui bien qu'ayant un âge d'apparition précoce, présentent une progression plus lente que celle associée à l'ACL, récapitulant le phénotype rétinien des patients.

Ces différents points sont des facteurs déterminants dans le développement d'un traitement, à commencer par le **choix du modèle expérimental**. En effet, la pertinence du modèle est cruciale pour ce genre d'étude, un modèle sera d'autant plus pertinent qu'il reproduit la pathologie humaine. Parmi les modèles utilisés, celui du syndrome d'Alström présente une dégénérescence tardive à l'opposé de ce que l'on peut observer chez les patients. D'autres modèles couramment utilisés dans l'étude des RP sont les lignées de rats transgéniques mutant P23H de la rhodopsine possédant un nombre surnuméraire de copies du gène de la rhodopsine pouvant être source de stress. Cette surexpression n'étant pas retrouvée dans la pathologie humaine, elle introduit un biais dans l'étude de cette lignée comme modèle de la pathologie humaine. Ce qui remet en cause leur pertinence en tant que modèle dans la compréhension des mécanismes impliqués mais également pour le développement de thérapies. Nous avons montré qu'un traitement ciblant l'UPR est sans effet dans ce modèle. L'une des hypothèses est que le traitement ne permet pas de compenser le niveau d'expression anormalement élevé de la protéine.

En prenant en compte ces différents paramètres, plusieurs modèles ont été choisis pour l'étude de traitements pharmacologiques avec la molécule IFB-088 : la souris *Bbs12*^{-/-} déjà utilisée précédemment et un modèle de RP non syndromique : le modèle murin Rho-P23H KI.

La première étape fut la validation de l'IFB-088 comme molécule de substitution au GBZ dans un modèle *Bbs12* KO. Nous avons ainsi montré que **la combinaison IFB-088 + VPA présente les mêmes effets que le GBZ + VPA sur la dégénérescence rétinienne** dans le modèle de souris, mais sans les effets hypotenseurs du GBZ. En effet nous avons pu mettre en évidence, sur ce modèle de BBS, un maintien partiel des capacités visuelles ainsi qu'une diminution de la dilatation du RE, indiquant une diminution de l'accumulation protéique source du stress, après traitement avec l'IFB-088 + VPA. La combinaison thérapeutique testée semble donc exercer son effet au moins pendant les deux semaines suivant l'injection.

Après avoir confirmé les propriétés protectrices de l'IFB-088 en combinaison avec le VPA sur la dégénérescence rétinienne associée au BBS, nous l'avons testé sur le modèle mutant de la rhodopsine P23H KI. Ce modèle présente une dégénérescence rétinienne précoce avec une progression similaire à celle du modèle BBS. Bien que possédant des caractéristiques communes avec le BBS, le modèle mutant de la rhodopsine P23H KI se situe à l'opposé de ce dernier. En effet, le BBS implique un défaut de trafic ciliaire causant une accumulation protéique globale. La mutation P23H de la rhodopsine, elle, entraîne une accumulation de la seule protéine mutée. La pertinence du maintien de l'inhibition de la traduction protéique globale est donc moins évidente dans ce dernier. Néanmoins l'étude a montré que l'approche développée dans ce projet permettait d'améliorer le phénotype rétinien associée à cette mutation. Lors de la caractérisation du modèle mutant de la rhodopsine P23H KI, nous avons également montré un effet délétère de la lumière sur le phénotype rétinien. Néanmoins cet effet n'étant pas associé à une activation l'UPR, nous n'avons pas exploré davantage son implication dans la pathologie.

Afin de cibler PPP1R15A sur ce dernier modèle, deux approches ont été utilisées : une mutation du gène *Ppp1r15a* résultant en une perte de fonction de la protéine, et l'approche pharmacologique par administration d'IFB-088. Pour cette dernière approche différents régime d'administration ont été testés, faisant varier la dose et la fréquence d'administration. Cette stratégie a permis de montrer qu'un sous dosage de l'IFB-088 n'a pas d'effet sur le phénotype rétinien (1,5mg chez les souris Rho-P23H KI). A l'opposé nous avons montré sur le modèle BBS qu'un surdosage de l'IFB-088 peut avoir un effet délétère sur le phénotype rétinien (à 25µm sur le modèle du BBS). Nous avons donc choisi d'approfondir l'étude du régime d'administration ayant présenté le plus d'effet à l'ERG.

Nous avons ainsi pu démontrer que **de l'inhibition du complexe PPP1R15A/PP1c seule permet de moduler le stress du RE** mais ne suffit pas à ralentir la dégénérescence rétinienne. En effet, nous avons montré que l'inhibition de ce complexe, qu'elle soit pharmacologique dans les modèles, *Bbs12*^{-/-} et *Rho*^{P23H/+}, ou par invalidation génétique sur le modèle *Rho*^{P23H/+}, ne montre aucun effet sur la mort cellulaire. Malgré cela, l'IFB-088 a montré un effet bénéfique sur le stress du RE en diminuant la dilatation de celui-ci. Nous avons également montré une **amélioration fonctionnelle par inhibition du complexe PPP1R15A/PP1c**, par l'amélioration transitoire des capacités visuelles des différents mutants (*Bbs12* KO et *Rho*^{P23H/+}) à un stade précoce de la maladie, à 1 mois par inhibition

pharmacologique. L'effet de l'invalidation génétique est plus tardif, avec une apparition à 2 mois seulement. La comparaison directe des deux modèles est néanmoins rendue compliquée par le temps d'action de l'inhibition, qui se fait dès la naissance et de manière permanente dans le cas de l'invalidation génétique contre une exposition transitoire entre 14 et 21 jours pour les traitements. Les mécanismes d'action semblent néanmoins similaires jouant notamment un rôle sur la diminution de la charge protéique du RE. L'absence de fonction de PPP1R15A semble donc potentialiser la réponse des photorécepteurs, augmentant la réponse à l'ERG scotopiques des différents modèles. Les mécanismes par lesquels se font cet effet ne sont pas clairs, de par l'implication de PPP1R15A dans diverses voies de signalisation, notamment les processus inflammatoires²⁷¹, l'autophagie¹⁰³ ou la maturation et le transport protéique¹⁰⁵. L'inhibition de PPP1R15A/PP1c pourrait notamment favoriser la dégradation protéique, en diminuant la synthèse protéique rendant le système de dégradation plus efficace mais également par la modulation de l'autophagie. Ceci permettrait de réduire les agrégats protéiques et ainsi favoriserait le transport de la protéine WT vers le segment externe des photorécepteurs.

En revanche, nous avons montré un **effet bénéfique de la combinaison IFB-088 + VPA dans le modèle de souris Rho P23H-KI de dégénérescence rétinienne**. La combinaison a en effet permis de ralentir celle-ci dans le modèle mutant P23H KI de la rhodopsine, comme dans le modèle *Bbs12* KO. L'effet précoce que pouvait avoir l'inhibition du complexe PPP1R15A/PP1c seule sur les capacités visuelles semble perdu avec l'ajout de l'acide valproïque au traitement. En revanche, les effets sur le stress du RE sont toujours présents plusieurs semaines après l'arrêt des traitements. Cette approche a également permis une amélioration de la réponse à l'ERG à 6 semaines donc plus tardive que celle observée avec l'IFB-088 seul qui apparaissait à 4 semaines. De plus, cette amélioration ne semble pas être seulement fonctionnelle, mais aussi due à l'augmentation de la survie des photorécepteurs ce qui n'avait pas été observé avec l'IFB-088 seul. Ainsi, l'ajout d'acide valproïque au traitement permet un effet synergique avec l'IFB-088 et augmente la survie cellulaire.

Bien que l'acide valproïque ne soit pas utilisé seul, celui-ci pouvant entraîner des effets délétères sur la dégénérescence rétinienne, son utilisation en combinaison avec l'IFB-088 pourrait donc préserver les capacités visuelles dans différents modèles de rétinoopathies

pigmentaires en agissant notamment sur le stress cellulaire. Il a également été montré un rôle de celui-ci dans l'inflammation, l'apoptose²⁷⁵⁻²⁷⁷ ou dans l'autophagie²³⁴ ces différentes actions pouvant aussi avoir un impact sur le phénotype rétinien.

L'ensemble des résultats obtenus, sur les différents modèles, montrent donc **la possibilité de cibler l'UPR pour ralentir la dégénérescence rétinienne** en agissant sur deux composantes de cette voie : BiP et PPP1R15A. Cette stratégie permet un **effet à court terme sur la dégénérescence** rétinienne, les essais à plus de six semaines ne montrant aucun effet. Le pic de dégénérescence intervenant entre la deuxième et la troisième semaine⁴¹, il est possible que l'UPR suive cette même cinétique. L'UPR ne serait donc plus activée, ou cause minoritaire de mort cellulaire, dans les stades plus tardifs de la maladie. Le traitement aurait donc un effet maximal durant le premier mois. Les mécanismes activés après seraient ainsi indépendants de l'UPR, différents mécanismes ont été proposés dans la littérature, tel que l'autophagie, la nécrose où l'activation de processus inflammatoire. Cibler ces mécanismes pourrait être une approche complémentaire afin de prolonger l'effet.

	<i>Bbs12</i> ^{-/-}	<i>Rho</i> ^{P23H/+}
IFB-088	<ul style="list-style-type: none"> • ↗réponse à l'ERG • ↘épaisseurs de rétine 	<ul style="list-style-type: none"> • ↗ temporaire de la réponse à l'ERG • = épaisseurs de rétine • ↘dilatation du réticulum endoplasmique
IFB-088+VPA	<ul style="list-style-type: none"> • ↗réponse à l'ERG • ↗épaisseurs de rétines • ↘dilatation du réticulum endoplasmique 	<ul style="list-style-type: none"> • ↗réponse à l'ERG • ↗épaisseurs de rétine • ↘dilatation du réticulum endoplasmique
<i>Gadd34</i> ^{-/-}		<ul style="list-style-type: none"> • ↗ temporaire de la réponse à l'ERG • = épaisseurs de rétine • ↘dilatation du réticulum endoplasmique

Tableau 9 : Récapitulatif des résultats obtenus lors des traitements

Il est à souligner que les résultats obtenus par invalidation de *Ppp1r15a* diffèrent de ceux obtenus récemment par Starr *et al.*¹⁰⁴. Les auteurs ont procédé à l'invalidation génétique de *Ppp1r15a* par croisement avec la même lignée de souris que celle utilisée au cours de notre étude sur le mutant Rd16 de *Cep290*. A l'opposé des résultats que nous avons obtenus, ils montrent un effet bénéfique de l'invalidation de *Ppp1r15a* sur la mort cellulaire sans effet fonctionnel à l'ERG ou sur le niveau de synthèse protéique. L'hypothèse émise par les auteurs est que l'effet sur le phénotype ne serait pas lié au niveau de phosphorylation d'eIF2 α mais à une autre propriété de PPP1R15A, en particulier ses propriétés pro-apoptotiques indépendantes de la phosphorylation d'eIF2 α . PPP1R15A peut en effet favoriser l'apoptose par inhibition de la voie AKT/mTOR. L'inhibition de PPP1R15A permettrait ainsi de lever cette inhibition et d'inhiber l'apoptose. Néanmoins les résultats de notre étude suggèrent l'implication d'un autre mécanisme. L'IFB-088 seul ne semble avoir aucun effet sur la mort cellulaire mais semble favoriser une amélioration fonctionnelle des photorécepteurs. L'ensemble des mécanismes par lesquels agit l'inhibition de PPP1R15A n'étant pas connus, cibler celui-ci pourrait entraîner des effets non souhaités. Ceci est à prendre en considération pour un développement thérapeutique futur. Cependant aucun effet lié à ces mécanismes n'a, à ce jour, été rapporté chez les patients chez qui l'IFB-088 est testé.

Conclusions générales

Bien que les gènes impliqués dans les rétinopathies pigmentaires soient multiples et entraînent une hétérogénéité de mécanismes physiopathogéniques, certains mécanismes peuvent être partagés par différentes rétinopathies pigmentaires. L'UPR fait partie de ces mécanismes fréquemment impliqués dans les dégénérescences rétiniennes, ce qui en fait une cible de choix dans le développement de thérapies. Développer un traitement ciblant ce mécanisme serait une opportunité de ralentir la dégénérescence rétinienne associée à des causes génétiques diverses.

Ici, à travers ces différentes études, nous avons montré l'activation de l'UPR dans des modèles de rétinopathies pigmentaires de causes différentes, partant de formes syndromiques ultra rares associées aux ciliopathies à une forme plus courante non syndromique, la mutation P23H de la rhodopsine. Les premières sont des formes autosomiques récessives dues à un défaut du trafic ciliaire, la seconde une forme autosomique dominante causant un mauvais

repliement protéique. Elles ont en commun d'aboutir à une surcharge protéique au niveau du segment interne du photorécepteur aboutissant à l'activation de l'UPR.

En appliquant une stratégie agissant à différents niveaux de l'UPR, nous avons montré qu'il était possible de ralentir transitoirement la dégénérescence rétinienne dans différents modèles murins. Nous avons montré que cet effet était lié à une diminution du stress du réticulum endoplasmique comme attendu. Mais nous avons également mis en évidence que d'autres mécanismes pouvaient être impliqués, notamment par la modulation de l'activité de PPP1R15A. En effet une amélioration de la réponse à l'ERG a été observée chez les souris *Bbs12^{-/-}* malgré une diminution des épaisseurs de rétine. L'inhibition spécifique du complexe impliquant PPP1R15A intervient dans la modulation de la traduction CAP-dépendante, cible du traitement, mais de par les différentes actions de PPP1R15A il peut également entraîner des effets indépendants de l'inhibition de la traduction.

La compréhension des mécanismes d'action des différentes molécules, seules ou en combinaison, est indispensable afin d'optimiser le traitement mais également afin d'éviter de potentiels effets secondaires. Pour cela des études complémentaires seraient nécessaires afin d'optimiser le traitement (dose et régime d'administration) mais également afin de comprendre l'ensemble des voies régulées par les différentes molécules utilisées. Néanmoins le projet a montré une approche prometteuse pour ralentir la dégénérescence rétinienne dans les rétinopathies pigmentaires associées à une activation de l'UPR.

Ce type d'approche pharmacologique diffère des approches de thérapie génique. Ces dernières corrigent le défaut génique spécifique causant la maladie et permettent de ralentir la dégénérescence rétinienne à long terme. Les traitements pharmacologiques, eux, ciblent les mécanismes impliqués dans différentes pathologies et permettent un effet à court terme. Ces différentes approches offrent ainsi des stratégies complémentaires. En effet, appliquées suffisamment tôt, durant les phases précoces de dégénérescence, les approches pharmacologiques pourraient ralentir la dégénérescence et maintenir suffisamment de cellules pour pouvoir plus tard traiter par thérapie génique. La lumière ayant un effet délétère sur la dégénérescence rétinienne, limiter l'exposition lumineuse de manière précoce pourrait être une autre approche complémentaire envisageable.

Bibliographie

- 1 Mockel, A. *et al.* Pharmacological modulation of the retinal unfolded protein response in Bardet-Biedl syndrome reduces apoptosis and preserves light detection ability. *J Biol Chem* **287**, 37483-37494, doi:10.1074/jbc.M112.386821 (2012).
- 2 Sung, C. H. & Chuang, J. Z. The cell biology of vision. *J Cell Biol* **190**, 953-963, doi:10.1083/jcb.201006020 (2010).
- 3 Hejtmancik, J. F. & Nickerson, J. M. Overview of the Visual System. *Prog Mol Biol Transl Sci* **134**, 1-4, doi:10.1016/bs.pmbts.2015.05.006 (2015).
- 4 Grossniklaus, H. E., Geisert, E. E. & Nickerson, J. M. Introduction to the Retina. *Prog Mol Biol Transl Sci* **134**, 383-396, doi:10.1016/bs.pmbts.2015.06.001 (2015).
- 5 Athanasiou, D. *et al.* The cell stress machinery and retinal degeneration. *FEBS Lett* **587**, 2008-2017, doi:10.1016/j.febslet.2013.05.020 (2013).
- 6 Yau, K. W. & Hardie, R. C. Phototransduction motifs and variations. *Cell* **139**, 246-264, doi:10.1016/j.cell.2009.09.029 (2009).
- 7 Kolb, H. in *Webvision: The Organization of the Retina and Visual System* (eds H. Kolb, E. Fernandez, & R. Nelson) (1995).
- 8 Ebrey, T. & Koutalos, Y. Vertebrate photoreceptors. *Prog Retin Eye Res* **20**, 49-94 (2001).
- 9 Hadjikhani, N. & Tootell, R. B. Projection of rods and cones within human visual cortex. *Hum Brain Mapp* **9**, 55-63 (2000).
- 10 Hartong, D. T., Berson, E. L. & Dryja, T. P. Retinitis pigmentosa. *Lancet* **368**, 1795-1809, doi:10.1016/S0140-6736(06)69740-7 (2006).
- 11 Kolb, H. in *Webvision: The Organization of the Retina and Visual System* (eds H. Kolb, E. Fernandez, & R. Nelson) (1995).
- 12 Wert, K. J., Lin, J. H. & Tsang, S. H. General pathophysiology in retinal degeneration. *Dev Ophthalmol* **53**, 33-43, doi:10.1159/000357294 (2014).
- 13 Verbakel, S. K. *et al.* Non-syndromic retinitis pigmentosa. *Prog Retin Eye Res*, doi:10.1016/j.preteyeres.2018.03.005 (2018).
- 14 Bujakowska, K. M., Liu, Q. & Pierce, E. A. Photoreceptor Cilia and Retinal Ciliopathies. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **9**, doi:10.1101/cshperspect.a028274 (2017).
- 15 Young, R. W. The renewal of photoreceptor cell outer segments. *J Cell Biol* **33**, 61-72, doi:10.1083/jcb.33.1.61 (1967).
- 16 Besharse, J. C., Hollyfield, J. G. & Rayborn, M. E. Turnover of rod photoreceptor outer segments. II. Membrane addition and loss in relationship to light. *J Cell Biol* **75**, 507-527, doi:10.1083/jcb.75.2.507 (1977).

- 17 Besharse, J. C., Hollyfield, J. G. & Rayborn, M. E. Photoreceptor outer segments: accelerated membrane renewal in rods after exposure to light. *Science* **196**, 536-538, doi:10.1126/science.300504 (1977).
- 18 Besharse, J. C. & Hollyfield, J. G. Turnover of mouse photoreceptor outer segments in constant light and darkness. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **18**, 1019-1024 (1979).
- 19 Besharse, J. C. & Hollyfield, J. G. Renewal of normal and degenerating photoreceptor outer segments in the Ozark cave salamander. *J Exp Zool* **198**, 287-302, doi:10.1002/jez.1401980302 (1976).
- 20 Besharse, J. C., Forestner, D. M. & Defoe, D. M. Membrane assembly in retinal photoreceptors. III. Distinct membrane domains of the connecting cilium of developing rods. *J Neurosci* **5**, 1035-1048 (1985).
- 21 Falk, N., Losl, M., Schroder, N. & Giessl, A. Specialized Cilia in Mammalian Sensory Systems. *Cells* **4**, 500-519, doi:10.3390/cells4030500 (2015).
- 22 Satir, P., Pedersen, L. B. & Christensen, S. T. The primary cilium at a glance. *J Cell Sci* **123**, 499-503, doi:10.1242/jcs.050377 (2010).
- 23 Khanna, H. Photoreceptor Sensory Cilium: Traversing the Ciliary Gate. *Cells* **4**, 674-686, doi:10.3390/cells4040674 (2015).
- 24 Baehr, W. *et al.* Insights into photoreceptor ciliogenesis revealed by animal models. *Prog Retin Eye Res*, doi:10.1016/j.preteyeres.2018.12.004 (2018).
- 25 Goldberg, A. F., Moritz, O. L. & Williams, D. S. Molecular basis for photoreceptor outer segment architecture. *Prog Retin Eye Res* **55**, 52-81, doi:10.1016/j.preteyeres.2016.05.003 (2016).
- 26 Euler, T., Haverkamp, S., Schubert, T. & Baden, T. Retinal bipolar cells: elementary building blocks of vision. *Nat Rev Neurosci* **15**, 507-519 (2014).
- 27 Chaya, T. *et al.* Versatile functional roles of horizontal cells in the retinal circuit. *Sci Rep* **7**, 5540, doi:10.1038/s41598-017-05543-2 (2017).
- 28 Gooley, J. J., Lu, J., Fischer, D. & Saper, C. B. A broad role for melanopsin in nonvisual photoreception. *J Neurosci* **23**, 7093-7106 (2003).
- 29 Langer, K. B. *et al.* Retinal Ganglion Cell Diversity and Subtype Specification from Human Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell Reports* **10**, 1282-1293, doi:10.1016/j.stemcr.2018.02.010 (2018).
- 30 Schmidt, T. M., Chen, S. K. & Hattar, S. Intrinsically photosensitive retinal ganglion cells: many subtypes, diverse functions. *Trends Neurosci* **34**, 572-580, doi:10.1016/j.tins.2011.07.001 (2011).
- 31 Kolb, H. in *Webvision: The Organization of the Retina and Visual System* (eds H. Kolb, E. Fernandez, & R. Nelson) (1995).

- 32 Balasubramanian, R. & Gan, L. Development of Retinal Amacrine Cells and Their Dendritic Stratification. *Curr Ophthalmol Rep* **2**, 100-106, doi:10.1007/s40135-014-0048-2 (2014).
- 33 Marc, R. E., Anderson, J. R., Jones, B. W., Sigulinsky, C. L. & Lauritzen, J. S. The AII amacrine cell connectome: a dense network hub. *Front Neural Circuits* **8**, 104, doi:10.3389/fncir.2014.00104 (2014).
- 34 Kolb, H. Amacrine cells of the mammalian retina: neurocircuitry and functional roles. *Eye (Lond)* **11 (Pt 6)**, 904-923, doi:10.1038/eye.1997.230 (1997).
- 35 Reichenbach, A. & Bringmann, A. New functions of Muller cells. *Glia* **61**, 651-678, doi:10.1002/glia.22477 (2013).
- 36 Franze, K. *et al.* Muller cells are living optical fibers in the vertebrate retina. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 8287-8292, doi:10.1073/pnas.0611180104 (2007).
- 37 Fain, G. L., Hardie, R. & Laughlin, S. B. Phototransduction and the evolution of photoreceptors. *Curr Biol* **20**, R114-124, doi:10.1016/j.cub.2009.12.006 (2010).
- 38 Palczewski, K. G protein-coupled receptor rhodopsin. *Annu Rev Biochem* **75**, 743-767, doi:10.1146/annurev.biochem.75.103004.142743 (2006).
- 39 Korenbrot, J. I. & Fernald, R. D. Circadian rhythm and light regulate opsin mRNA in rod photoreceptors. *Nature* **337**, 454-457, doi:10.1038/337454a0 (1989).
- 40 Bowes, C., van Veen, T. & Farber, D. B. Opsin, G-protein and 48-kDa protein in normal and rd mouse retinas: developmental expression of mRNAs and proteins and light/dark cycling of mRNAs. *Exp Eye Res* **47**, 369-390 (1988).
- 41 Comitato, A. *et al.* Dominant and recessive mutations in rhodopsin activate different cell death pathways. *Hum Mol Genet* **25**, 2801-2812, doi:10.1093/hmg/ddw137 (2016).
- 42 He, W., Cowan, C. W. & Wensel, T. G. RGS9, a GTPase accelerator for phototransduction. *Neuron* **20**, 95-102 (1998).
- 43 Chen, C. K. RGS Protein Regulation of Phototransduction. *Prog Mol Biol Transl Sci* **133**, 31-45, doi:10.1016/bs.pmbts.2015.02.004 (2015).
- 44 Hussain, R. M., Gregori, N. Z., Ciulla, T. A. & Lam, B. L. Pharmacotherapy of retinal disease with visual cycle modulators. *Expert Opin Pharmacother* **19**, 471-481, doi:10.1080/14656566.2018.1448060 (2018).
- 45 Wang, J. S. & Kefalov, V. J. The cone-specific visual cycle. *Prog Retin Eye Res* **30**, 115-128, doi:10.1016/j.preteyeres.2010.11.001 (2011).
- 46 Mustafi, D., Engel, A. H. & Palczewski, K. Structure of cone photoreceptors. *Prog Retin Eye Res* **28**, 289-302, doi:10.1016/j.preteyeres.2009.05.003 (2009).
- 47 Tachibanaki, S., Arinobu, D., Shimauchi-Matsukawa, Y., Tsushima, S. & Kawamura, S. Highly effective phosphorylation by G protein-coupled receptor kinase 7 of light-

- activated visual pigment in cones. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 9329-9334, doi:10.1073/pnas.0501875102 (2005).
- 48 Cremers, F. P. M., Boon, C. J. F., Bujakowska, K. & Zeitz, C. Special Issue Introduction: Inherited Retinal Disease: Novel Candidate Genes, Genotype-Phenotype Correlations, and Inheritance Models. *Genes (Basel)* **9**, doi:10.3390/genes9040215 (2018).
- 49 Farrar, G. J. *et al.* Toward an elucidation of the molecular genetics of inherited retinal degenerations. *Hum Mol Genet* **26**, R2-R11, doi:10.1093/hmg/ddx185 (2017).
- 50 Berger, W., Kloeckener-Gruissem, B. & Neidhardt, J. The molecular basis of human retinal and vitreoretinal diseases. *Prog Retin Eye Res* **29**, 335-375, doi:10.1016/j.preteyeres.2010.03.004 (2010).
- 51 Heon, E. *et al.* Mutations in C8ORF37 cause Bardet Biedl syndrome (BBS21). *Hum Mol Genet* **25**, 2283-2294, doi:10.1093/hmg/ddw096 (2016).
- 52 Schaefer, E. *et al.* Identification and Characterization of Known Biallelic Mutations in the IFT27 (BBS19) Gene in a Novel Family With Bardet-Biedl Syndrome. *Front Genet* **10**, 21, doi:10.3389/fgene.2019.00021 (2019).
- 53 Wormser, O. *et al.* SCAPER localizes to primary cilia and its mutation affects cilia length, causing Bardet-Biedl syndrome. *Eur J Hum Genet* **27**, 928-940, doi:10.1038/s41431-019-0347-z (2019).
- 54 Gill, J. S., Georgiou, M., Kalitzeos, A., Moore, A. T. & Michaelides, M. Progressive cone and cone-rod dystrophies: clinical features, molecular genetics and prospects for therapy. *Br J Ophthalmol*, doi:10.1136/bjophthalmol-2018-313278 (2019).
- 55 Diakatou, M., Manes, G., Bocquet, B., Meunier, I. & Kalatzis, V. Genome Editing as a Treatment for the Most Prevalent Causative Genes of Autosomal Dominant Retinitis Pigmentosa. *Int J Mol Sci* **20**, doi:10.3390/ijms20102542 (2019).
- 56 Hamel, C. Retinitis pigmentosa. *Orphanet J Rare Dis* **1**, 40, doi:10.1186/1750-1172-1-40 (2006).
- 57 Wang, D. Y. *et al.* Gene mutations in retinitis pigmentosa and their clinical implications. *Clin Chim Acta* **351**, 5-16, doi:10.1016/j.cccn.2004.08.004 (2005).
- 58 Megaw, R. & Hurd, T. W. Photoreceptor actin dysregulation in syndromic and non-syndromic retinitis pigmentosa. *Biochem Soc Trans* **46**, 1463-1473, doi:10.1042/BST20180138 (2018).
- 59 Athanasiou, D. *et al.* The molecular and cellular basis of rhodopsin retinitis pigmentosa reveals potential strategies for therapy. *Prog Retin Eye Res* **62**, 1-23, doi:10.1016/j.preteyeres.2017.10.002 (2018).
- 60 Dryja, T. P. *et al.* Mutations within the rhodopsin gene in patients with autosomal dominant retinitis pigmentosa. *N Engl J Med* **323**, 1302-1307, doi:10.1056/NEJM199011083231903 (1990).

- 61 Dryja, T. P. *et al.* A point mutation of the rhodopsin gene in one form of retinitis pigmentosa. *Nature* **343**, 364-366, doi:10.1038/343364a0 (1990).
- 62 Parfitt, D. A. & Cheetham, M. E. Targeting the Proteostasis Network in Rhodopsin Retinitis Pigmentosa. *Adv Exp Med Biol* **854**, 479-484, doi:10.1007/978-3-319-17121-0_64 (2016).
- 63 Chan, P., Stolz, J., Kohl, S., Chiang, W. C. & Lin, J. H. Endoplasmic reticulum stress in human photoreceptor diseases. *Brain Res* **1648**, 538-541, doi:10.1016/j.brainres.2016.04.021 (2016).
- 64 Griciuc, A., Aron, L. & Ueffing, M. ER stress in retinal degeneration: a target for rational therapy? *Trends Mol Med* **17**, 442-451, doi:10.1016/j.molmed.2011.04.002 (2011).
- 65 Tam, B. M. & Moritz, O. L. Characterization of rhodopsin P23H-induced retinal degeneration in a *Xenopus laevis* model of retinitis pigmentosa. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **47**, 3234-3241, doi:10.1167/iovs.06-0213 (2006).
- 66 Chen, Y. *et al.* Inherent instability of the retinitis pigmentosa P23H mutant opsin. *J Biol Chem* **289**, 9288-9303, doi:10.1074/jbc.M114.551713 (2014).
- 67 Mendes, H. F., van der Spuy, J., Chapple, J. P. & Cheetham, M. E. Mechanisms of cell death in rhodopsin retinitis pigmentosa: implications for therapy. *Trends Mol Med* **11**, 177-185, doi:10.1016/j.molmed.2005.02.007 (2005).
- 68 Beales, P. L., Elcioglu, N., Woolf, A. S., Parker, D. & Flintner, F. A. New criteria for improved diagnosis of Bardet-Biedl syndrome: results of a population survey. *J Med Genet* **36**, 437-446 (1999).
- 69 Collin, G. B. *et al.* Mutations in ALMS1 cause obesity, type 2 diabetes and neurosensory degeneration in Alstrom syndrome. *Nat Genet* **31**, 74-78, doi:10.1038/ng867 (2002).
- 70 Alstrom, C. H., Hallgren, B., Nilsson, L. B. & Asander, H. Retinal degeneration combined with obesity, diabetes mellitus and neurogenous deafness: a specific syndrome (not hitherto described) distinct from the Laurence-Moon-Bardet-Biedl syndrome: a clinical, endocrinological and genetic examination based on a large pedigree. *Acta Psychiatr Neurol Scand Suppl* **129**, 1-35 (1959).
- 71 Charbel Issa, P., Barnard, A. R., Herrmann, P., Washington, I. & MacLaren, R. E. Rescue of the Stargardt phenotype in *Abca4* knockout mice through inhibition of vitamin A dimerization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**, 8415-8420, doi:10.1073/pnas.1506960112 (2015).
- 72 Forsythe, E. & Beales, P. L. Bardet-Biedl syndrome. *Eur J Hum Genet* **21**, 8-13, doi:10.1038/ejhg.2012.115 (2013).
- 73 Adams, N. A., Awadein, A. & Toma, H. S. The retinal ciliopathies. *Ophthalmic genetics* **28**, 113-125, doi:10.1080/13816810701537424 (2007).

- 74 Nakayama, K. & Katoh, Y. Ciliary protein trafficking mediated by IFT and BBSome complexes with the aid of kinesin-2 and dynein-2 motors. *J Biochem* **163**, 155-164, doi:10.1093/jb/mvx087 (2018).
- 75 Katoh, Y., Nozaki, S., Hartanto, D., Miyano, R. & Nakayama, K. Architectures of multisubunit complexes revealed by a visible immunoprecipitation assay using fluorescent fusion proteins. *J Cell Sci* **128**, 2351-2362, doi:10.1242/jcs.168740 (2015).
- 76 Alvarez-Satta, M., Castro-Sanchez, S. & Valverde, D. Alstrom syndrome: current perspectives. *Appl Clin Genet* **8**, 171-179, doi:10.2147/TACG.S56612 (2015).
- 77 Hearn, T. ALMS1 and Alstrom syndrome: a recessive form of metabolic, neurosensory and cardiac deficits. *J Mol Med (Berl)* **97**, 1-17, doi:10.1007/s00109-018-1714-x (2019).
- 78 Kumaran, N., Moore, A. T., Weleber, R. G. & Michaelides, M. Leber congenital amaurosis/early-onset severe retinal dystrophy: clinical features, molecular genetics and therapeutic interventions. *Br J Ophthalmol* **101**, 1147-1154, doi:10.1136/bjophthalmol-2016-309975 (2017).
- 79 Thompson, J. A., De Roach, J. N., McLaren, T. L. & Lamey, T. M. A Mini-Review: Leber Congenital Amaurosis: Identification of Disease-Causing Variants and Personalised Therapies. *Adv Exp Med Biol* **1074**, 265-271, doi:10.1007/978-3-319-75402-4_32 (2018).
- 80 Perrault, I. *et al.* Spectrum of NPHP6/CEP290 mutations in Leber congenital amaurosis and delineation of the associated phenotype. *Hum Mutat* **28**, 416, doi:10.1002/humu.9485 (2007).
- 81 den Hollander, A. I., Roepman, R., Koenekoop, R. K. & Cremers, F. P. Leber congenital amaurosis: genes, proteins and disease mechanisms. *Prog Retin Eye Res* **27**, 391-419, doi:10.1016/j.preteyeres.2008.05.003 (2008).
- 82 Baala, L. *et al.* Pleiotropic effects of CEP290 (NPHP6) mutations extend to Meckel syndrome. *Am J Hum Genet* **81**, 170-179, doi:10.1086/519494 (2007).
- 83 Kunte, M. M. *et al.* ER stress is involved in T17M rhodopsin-induced retinal degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **53**, 3792-3800, doi:10.1167/iovs.11-9235 (2012).
- 84 Yu, Y. *et al.* A new rhodopsin R135W mutation induces endoplasmic reticulum stress and apoptosis in retinal pigment epithelial cells. *J Cell Physiol*, doi:10.1002/jcp.28100 (2019).
- 85 Shinde, V. M., Sizova, O. S., Lin, J. H., LaVail, M. M. & Gorbatyuk, M. S. ER stress in retinal degeneration in S334ter Rho rats. *PloS one* **7**, e33266, doi:10.1371/journal.pone.0033266 (2012).
- 86 Starr, C. R., Pitale, P. M. & Gorbatyuk, M. Translational attenuation and retinal degeneration in mice with an active integrated stress response. *Cell Death Dis* **9**, 484, doi:10.1038/s41419-018-0513-1 (2018).

- 87 Nishimura, D. Y. *et al.* Bbs2-null mice have neurosensory deficits, a defect in social dominance, and retinopathy associated with mislocalization of rhodopsin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 16588-16593, doi:10.1073/pnas.0405496101 (2004).
- 88 Bravo, R. *et al.* Endoplasmic reticulum and the unfolded protein response: dynamics and metabolic integration. *Int Rev Cell Mol Biol* **301**, 215-290, doi:10.1016/B978-0-12-407704-1.00005-1 (2013).
- 89 Woehlbier, U. & Hetz, C. Modulating stress responses by the UPRosome: a matter of life and death. *Trends Biochem Sci* **36**, 329-337, doi:10.1016/j.tibs.2011.03.001 (2011).
- 90 Jackson, R. J., Hellen, C. U. & Pestova, T. V. The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**, 113-127, doi:10.1038/nrm2838 (2010).
- 91 Iwawaki, T. *et al.* Transgenic mouse model for imaging of ATF4 translational activation-related cellular stress responses in vivo. *Sci Rep* **7**, 46230, doi:10.1038/srep46230 (2017).
- 92 Hetz, C., Chevet, E. & Harding, H. P. Targeting the unfolded protein response in disease. *Nat Rev Drug Discov* **12**, 703-719, doi:10.1038/nrd3976 (2013).
- 93 Lin, J. H. *et al.* IRE1 signaling affects cell fate during the unfolded protein response. *Science* **318**, 944-949, doi:10.1126/science.1146361 (2007).
- 94 Reid, D. W. *et al.* Complementary Roles of GADD34- and CREP-Containing Eukaryotic Initiation Factor 2alpha Phosphatases during the Unfolded Protein Response. *Mol Cell Biol* **36**, 1868-1880, doi:10.1128/MCB.00190-16 (2016).
- 95 Carrara, M., Sigurdardottir, A. & Bertolotti, A. Decoding the selectivity of eIF2alpha holophosphatases and PPP1R15A inhibitors. *Nat Struct Mol Biol* **24**, 708-716, doi:10.1038/nsmb.3443 (2017).
- 96 Brush, M. H., Weiser, D. C. & Shenolikar, S. Growth arrest and DNA damage-inducible protein GADD34 targets protein phosphatase 1 alpha to the endoplasmic reticulum and promotes dephosphorylation of the alpha subunit of eukaryotic translation initiation factor 2. *Mol Cell Biol* **23**, 1292-1303, doi:10.1128/mcb.23.4.1292-1303.2003 (2003).
- 97 Crespillo-Casado, A., Chambers, J. E., Fischer, P. M., Marciniak, S. J. & Ron, D. PPP1R15A-mediated dephosphorylation of eIF2alpha is unaffected by Sephin1 or Guanabenz. *Elife* **6**, doi:10.7554/eLife.26109 (2017).
- 98 Crespillo-Casado, A. *et al.* A Sephin1-insensitive tripartite holophosphatase dephosphorylates translation initiation factor 2alpha. *J Biol Chem* **293**, 7766-7776, doi:10.1074/jbc.RA118.002325 (2018).
- 99 Lee, Y. Y., Cevallos, R. C. & Jan, E. An upstream open reading frame regulates translation of GADD34 during cellular stresses that induce eIF2alpha phosphorylation. *J Biol Chem* **284**, 6661-6673, doi:10.1074/jbc.M806735200 (2009).

- 100 Choy, M. S. *et al.* Structural and Functional Analysis of the GADD34:PP1 eIF2alpha Phosphatase. *Cell Rep* **11**, 1885-1891, doi:10.1016/j.celrep.2015.05.043 (2015).
- 101 Perego, J. *et al.* Guanabenz inhibits TLR9 signaling through a pathway that is independent of eIF2alpha dephosphorylation by the GADD34/PP1c complex. *Sci Signal* **11**, doi:10.1126/scisignal.aam8104 (2018).
- 102 Farook, J. M. *et al.* GADD34 induces cell death through inactivation of Akt following traumatic brain injury. *Cell Death Dis* **4**, e754, doi:10.1038/cddis.2013.280 (2013).
- 103 Ito, S. *et al.* GADD34 inhibits activation-induced apoptosis of macrophages through enhancement of autophagy. *Sci Rep* **5**, 8327, doi:10.1038/srep08327 (2015).
- 104 Starr, C. R. & Gorbatyuk, M. S. Delineating the role of eIF2alpha in retinal degeneration. *Cell Death Dis* **10**, 409, doi:10.1038/s41419-019-1641-y (2019).
- 105 Krokowski, D. *et al.* GADD34 Function in Protein Trafficking Promotes Adaptation to Hyperosmotic Stress in Human Corneal Cells. *Cell Rep* **21**, 2895-2910, doi:10.1016/j.celrep.2017.11.027 (2017).
- 106 Jing, G., Wang, J. J. & Zhang, S. X. ER stress and apoptosis: a new mechanism for retinal cell death. *Exp Diabetes Res* **2012**, 589589, doi:10.1155/2012/589589 (2012).
- 107 Shiraishi, H., Okamoto, H., Yoshimura, A. & Yoshida, H. ER stress-induced apoptosis and caspase-12 activation occurs downstream of mitochondrial apoptosis involving Apaf-1. *J Cell Sci* **119**, 3958-3966, doi:10.1242/jcs.03160 (2006).
- 108 Sano, R. & Reed, J. C. ER stress-induced cell death mechanisms. *Biochimica et biophysica acta* **1833**, 3460-3470, doi:10.1016/j.bbamcr.2013.06.028 (2013).
- 109 Hiramatsu, N., Chiang, W. C., Kurt, T. D., Sigurdson, C. J. & Lin, J. H. Multiple Mechanisms of Unfolded Protein Response-Induced Cell Death. *Am J Pathol* **185**, 1800-1808, doi:10.1016/j.ajpath.2015.03.009 (2015).
- 110 Li, Y., Guo, Y., Tang, J., Jiang, J. & Chen, Z. New insights into the roles of CHOP-induced apoptosis in ER stress. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* **46**, 629-640, doi:10.1093/abbs/gmu048 (2014).
- 111 Noorwez, S. M. *et al.* Retinoids assist the cellular folding of the autosomal dominant retinitis pigmentosa opsin mutant P23H. *J Biol Chem* **279**, 16278-16284, doi:10.1074/jbc.M312101200 (2004).
- 112 Sakami, S. *et al.* Probing mechanisms of photoreceptor degeneration in a new mouse model of the common form of autosomal dominant retinitis pigmentosa due to P23H opsin mutations. *J Biol Chem* **286**, 10551-10567, doi:10.1074/jbc.M110.209759 (2011).
- 113 Tam, B. M. & Moritz, O. L. Dark rearing rescues P23H rhodopsin-induced retinal degeneration in a transgenic *Xenopus laevis* model of retinitis pigmentosa: a chromophore-dependent mechanism characterized by production of N-terminally truncated mutant rhodopsin. *J Neurosci* **27**, 9043-9053, doi:10.1523/JNEUROSCI.2245-07.2007 (2007).

- 114 Tam, B. M., Qazalbash, A., Lee, H. C. & Moritz, O. L. The dependence of retinal degeneration caused by the rhodopsin P23H mutation on light exposure and vitamin a deprivation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **51**, 1327-1334, doi:10.1167/iovs.09-4123 (2010).
- 115 Plafker, S. M., O'Mealey, G. B. & Szweda, L. I. Mechanisms for countering oxidative stress and damage in retinal pigment epithelium. *Int Rev Cell Mol Biol* **298**, 135-177, doi:10.1016/B978-0-12-394309-5.00004-3 (2012).
- 116 Chen, Y. *et al.* Mechanism of all-trans-retinal toxicity with implications for stargardt disease and age-related macular degeneration. *J Biol Chem* **287**, 5059-5069, doi:10.1074/jbc.M111.315432 (2012).
- 117 Li, J. *et al.* Involvement of endoplasmic reticulum stress in all-trans-retinal-induced retinal pigment epithelium degeneration. *Toxicol Sci* **143**, 196-208, doi:10.1093/toxsci/kfu223 (2015).
- 118 Maeda, A. *et al.* Involvement of all-trans-retinal in acute light-induced retinopathy of mice. *J Biol Chem* **284**, 15173-15183, doi:10.1074/jbc.M900322200 (2009).
- 119 Arango-Gonzalez, B. *et al.* Identification of a common non-apoptotic cell death mechanism in hereditary retinal degeneration. *PloS one* **9**, e112142, doi:10.1371/journal.pone.0112142 (2014).
- 120 Campochiaro, P. A. & Mir, T. A. The mechanism of cone cell death in Retinitis Pigmentosa. *Prog Retin Eye Res* **62**, 24-37, doi:10.1016/j.preteyeres.2017.08.004 (2018).
- 121 Sancho-Pelluz, J. *et al.* Photoreceptor cell death mechanisms in inherited retinal degeneration. *Molecular neurobiology* **38**, 253-269, doi:10.1007/s12035-008-8045-9 (2008).
- 122 Punzo, C., Kornacker, K. & Cepko, C. L. Stimulation of the insulin/mTOR pathway delays cone death in a mouse model of retinitis pigmentosa. *Nat Neurosci* **12**, 44-52, doi:10.1038/nn.2234 (2009).
- 123 Murakami, Y. *et al.* Necrotic enlargement of cone photoreceptor cells and the release of high-mobility group box-1 in retinitis pigmentosa. *Cell Death Discov* **1**, 15058, doi:10.1038/cddiscovery.2015.58 (2015).
- 124 Davis, R. E. *et al.* A knockin mouse model of the Bardet-Biedl syndrome 1 M390R mutation has cilia defects, ventriculomegaly, retinopathy, and obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 19422-19427, doi:10.1073/pnas.0708571104 (2007).
- 125 Kulaga, H. M. *et al.* Loss of BBS proteins causes anosmia in humans and defects in olfactory cilia structure and function in the mouse. *Nat Genet* **36**, 994-998, doi:10.1038/ng1418 (2004).
- 126 Eichers, E. R. *et al.* Phenotypic characterization of Bbs4 null mice reveals age-dependent penetrance and variable expressivity. *Hum Genet* **120**, 211-226, doi:10.1007/s00439-006-0197-y (2006).

- 127 Mykytyn, K. *et al.* Bardet-Biedl syndrome type 4 (BBS4)-null mice implicate Bbs4 in flagella formation but not global cilia assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 8664-8669, doi:10.1073/pnas.0402354101 (2004).
- 128 Kretschmer, V. *et al.* Progressive Characterization of Visual Phenotype in Bardet-Biedl Syndrome Mutant Mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **60**, 1132-1143, doi:10.1167/iovs.18-25210 (2019).
- 129 Dickinson, M. E. *et al.* High-throughput discovery of novel developmental phenotypes. *Nature* **537**, 508-514, doi:10.1038/nature19356 (2016).
- 130 Zhang, Q. *et al.* BBS7 is required for BBSome formation and its absence in mice results in Bardet-Biedl syndrome phenotypes and selective abnormalities in membrane protein trafficking. *J Cell Sci* **126**, 2372-2380, doi:10.1242/jcs.111740 (2013).
- 131 Tadenev, A. L. *et al.* Loss of Bardet-Biedl syndrome protein-8 (BBS8) perturbs olfactory function, protein localization, and axon targeting. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 10320-10325, doi:10.1073/pnas.1016531108 (2011).
- 132 Hsu, Y. *et al.* BBSome function is required for both the morphogenesis and maintenance of the photoreceptor outer segment. *PLoS Genet* **13**, e1007057, doi:10.1371/journal.pgen.1007057 (2017).
- 133 Loktev, A. V. & Jackson, P. K. Neuropeptide Y family receptors traffic via the Bardet-Biedl syndrome pathway to signal in neuronal primary cilia. *Cell Rep* **5**, 1316-1329, doi:10.1016/j.celrep.2013.11.011 (2013).
- 134 Fath, M. A. *et al.* Mkks-null mice have a phenotype resembling Bardet-Biedl syndrome. *Hum Mol Genet* **14**, 1109-1118, doi:10.1093/hmg/ddi123 (2005).
- 135 Ross, A. J. *et al.* Disruption of Bardet-Biedl syndrome ciliary proteins perturbs planar cell polarity in vertebrates. *Nat Genet* **37**, 1135-1140, doi:10.1038/ng1644 (2005).
- 136 Cognard, N. *et al.* Comparing the Bbs10 complete knockout phenotype with a specific renal epithelial knockout one highlights the link between renal defects and systemic inactivation in mice. *Cilia* **4**, 10, doi:10.1186/s13630-015-0019-8 (2015).
- 137 Zhang, Q. *et al.* Bardet-Biedl syndrome 3 (Bbs3) knockout mouse model reveals common BBS-associated phenotypes and Bbs3 unique phenotypes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 20678-20683, doi:10.1073/pnas.1113220108 (2011).
- 138 Kudryashova, E., Wu, J., Havton, L. A. & Spencer, M. J. Deficiency of the E3 ubiquitin ligase TRIM32 in mice leads to a myopathy with a neurogenic component. *Hum Mol Genet* **18**, 1353-1367, doi:10.1093/hmg/ddp036 (2009).
- 139 Kudryashova, E., Struyk, A., Mokhonova, E., Cannon, S. C. & Spencer, M. J. The common missense mutation D489N in TRIM32 causing limb girdle muscular dystrophy 2H leads to loss of the mutated protein in knock-in mice resulting in a Trim32-null phenotype. *Hum Mol Genet* **20**, 3925-3932, doi:10.1093/hmg/ddr311 (2011).

- 140 Weatherbee, S. D., Niswander, L. A. & Anderson, K. V. A mouse model for Meckel syndrome reveals Mks1 is required for ciliogenesis and Hedgehog signaling. *Hum Mol Genet* **18**, 4565-4575, doi:10.1093/hmg/ddp422 (2009).
- 141 Cui, C. *et al.* Disruption of Mks1 localization to the mother centriole causes cilia defects and developmental malformations in Meckel-Gruber syndrome. *Dis Model Mech* **4**, 43-56, doi:10.1242/dmm.006262 (2011).
- 142 Rachel, R. A. *et al.* CEP290 alleles in mice disrupt tissue-specific cilia biogenesis and recapitulate features of syndromic ciliopathies. *Hum Mol Genet* **24**, 3775-3791, doi:10.1093/hmg/ddv123 (2015).
- 143 Lancaster, M. A. *et al.* Defective Wnt-dependent cerebellar midline fusion in a mouse model of Joubert syndrome. *Nat Med* **17**, 726-731, doi:10.1038/nm.2380 (2011).
- 144 Garanto, A. *et al.* Unexpected CEP290 mRNA splicing in a humanized knock-in mouse model for Leber congenital amaurosis. *PloS one* **8**, e79369, doi:10.1371/journal.pone.0079369 (2013).
- 145 Cui, C. *et al.* Wdpcp, a PCP protein required for ciliogenesis, regulates directional cell migration and cell polarity by direct modulation of the actin cytoskeleton. *PLoS Biol* **11**, e1001720, doi:10.1371/journal.pbio.1001720 (2013).
- 146 Airik, R. *et al.* Renal-retinal ciliopathy gene Sdccag8 regulates DNA damage response signaling. *J Am Soc Nephrol* **25**, 2573-2583, doi:10.1681/ASN.2013050565 (2014).
- 147 Datta, P. *et al.* Accumulation of non-outer segment proteins in the outer segment underlies photoreceptor degeneration in Bardet-Biedl syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**, E4400-4409, doi:10.1073/pnas.1510111112 (2015).
- 148 Zhang, Y. *et al.* Intraflagellar transporter protein (IFT27), an IFT25 binding partner, is essential for male fertility and spermiogenesis in mice. *Dev Biol* **432**, 125-139, doi:10.1016/j.ydbio.2017.09.023 (2017).
- 149 Eguether, T. *et al.* IFT27 links the BBSome to IFT for maintenance of the ciliary signaling compartment. *Dev Cell* **31**, 279-290, doi:10.1016/j.devcel.2014.09.011 (2014).
- 150 Gupta, P. R. *et al.* Ift172 conditional knock-out mice exhibit rapid retinal degeneration and protein trafficking defects. *Hum Mol Genet* **27**, 2012-2024, doi:10.1093/hmg/ddy109 (2018).
- 151 Sharif, A. S. *et al.* C8ORF37 Is Required for Photoreceptor Outer Segment Disc Morphogenesis by Maintaining Outer Segment Membrane Protein Homeostasis. *J Neurosci* **38**, 3160-3176, doi:10.1523/JNEUROSCI.2964-17.2018 (2018).
- 152 Shalata, A. *et al.* Morbid obesity resulting from inactivation of the ciliary protein CEP19 in humans and mice. *Am J Hum Genet* **93**, 1061-1071, doi:10.1016/j.ajhg.2013.10.025 (2013).

- 153 Forsythe, E., Kenny, J., Bacchelli, C. & Beales, P. L. Managing Bardet-Biedl Syndrome-Now and in the Future. *Front Pediatr* **6**, 23, doi:10.3389/fped.2018.00023 (2018).
- 154 Seo, S. *et al.* BBS6, BBS10, and BBS12 form a complex with CCT/TRiC family chaperonins and mediate BBSome assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 1488-1493, doi:10.1073/pnas.0910268107 (2010).
- 155 Arsov, T. *et al.* Fat aussie--a new Alstrom syndrome mouse showing a critical role for ALMS1 in obesity, diabetes, and spermatogenesis. *Mol Endocrinol* **20**, 1610-1622, doi:10.1210/me.2005-0494 (2006).
- 156 Collin, G. B. *et al.* Alms1-disrupted mice recapitulate human Alstrom syndrome. *Hum Mol Genet* **14**, 2323-2333, doi:10.1093/hmg/ddi235 (2005).
- 157 Li, G. *et al.* A role for Alstrom syndrome protein, alms1, in kidney ciliogenesis and cellular quiescence. *PLoS Genet* **3**, e8, doi:10.1371/journal.pgen.0030008 (2007).
- 158 Estrada-Cuzcano, A., Roepman, R., Cremers, F. P., den Hollander, A. I. & Mans, D. A. Non-syndromic retinal ciliopathies: translating gene discovery into therapy. *Hum Mol Genet* **21**, R111-124, doi:10.1093/hmg/dds298 (2012).
- 159 Yang, R. B. *et al.* Disruption of a retinal guanylyl cyclase gene leads to cone-specific dystrophy and paradoxical rod behavior. *J Neurosci* **19**, 5889-5897 (1999).
- 160 Baehr, W. *et al.* The function of guanylate cyclase 1 and guanylate cyclase 2 in rod and cone photoreceptors. *J Biol Chem* **282**, 8837-8847, doi:10.1074/jbc.M610369200 (2007).
- 161 Redmond, T. M. *et al.* Rpe65 is necessary for production of 11-cis-vitamin A in the retinal visual cycle. *Nat Genet* **20**, 344-351, doi:10.1038/3813 (1998).
- 162 Pang, J. J. *et al.* Retinal degeneration 12 (rd12): a new, spontaneously arising mouse model for human Leber congenital amaurosis (LCA). *Mol Vis* **11**, 152-162 (2005).
- 163 Eblimit, A. *et al.* Spata7 is a retinal ciliopathy gene critical for correct RPGRIP1 localization and protein trafficking in the retina. *Hum Mol Genet* **24**, 1584-1601, doi:10.1093/hmg/ddu573 (2015).
- 164 Ramamurthy, V., Niemi, G. A., Reh, T. A. & Hurley, J. B. Leber congenital amaurosis linked to AIPL1: a mouse model reveals destabilization of cGMP phosphodiesterase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 13897-13902, doi:10.1073/pnas.0404197101 (2004).
- 165 Boldt, K. *et al.* Disruption of intraflagellar protein transport in photoreceptor cilia causes Leber congenital amaurosis in humans and mice. *J Clin Invest* **121**, 2169-2180, doi:10.1172/JCI45627 (2011).
- 166 Zhao, Y. *et al.* The retinitis pigmentosa GTPase regulator (RPGR)- interacting protein: subserving RPGR function and participating in disk morphogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 3965-3970, doi:10.1073/pnas.0637349100 (2003).

- 167 Furukawa, T., Morrow, E. M., Li, T., Davis, F. C. & Cepko, C. L. Retinopathy and attenuated circadian entrainment in Crx-deficient mice. *Nat Genet* **23**, 466-470, doi:10.1038/70591 (1999).
- 168 van de Pavert, S. A. *et al.* Crumbs homologue 1 is required for maintenance of photoreceptor cell polarization and adhesion during light exposure. *J Cell Sci* **117**, 4169-4177, doi:10.1242/jcs.01301 (2004).
- 169 Greenwald, S. H. *et al.* Mouse Models of NMNAT1-Leber Congenital Amaurosis (LCA9) Recapitulate Key Features of the Human Disease. *Am J Pathol* **186**, 1925-1938, doi:10.1016/j.ajpath.2016.03.013 (2016).
- 170 Chang, B., Heckenlively, J. R., Hawes, N. L. & Roderick, T. H. New mouse primary retinal degeneration (rd-3). *Genomics* **16**, 45-49, doi:10.1006/geno.1993.1138 (1993).
- 171 Batten, M. L. *et al.* Lecithin-retinol acyltransferase is essential for accumulation of all-trans-retinyl esters in the eye and in the liver. *J Biol Chem* **279**, 10422-10432, doi:10.1074/jbc.M312410200 (2004).
- 172 Hagstrom, S. A., Duyao, M., North, M. A. & Li, T. Retinal degeneration in tulp1^{-/-} mice: vesicular accumulation in the interphotoreceptor matrix. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **40**, 2795-2802 (1999).
- 173 Zhong, H., Chen, Y., Li, Y., Chen, R. & Mardon, G. CRISPR-engineered mosaicism rapidly reveals that loss of Kcnj13 function in mice mimics human disease phenotypes. *Sci Rep* **5**, 8366, doi:10.1038/srep08366 (2015).
- 174 Fossat, N., Chatelain, G., Brun, G. & Lamonerie, T. Temporal and spatial delineation of mouse Otx2 functions by conditional self-knockout. *EMBO Rep* **7**, 824-830, doi:10.1038/sj.embor.7400751 (2006).
- 175 Maeda, T., Lem, J., Palczewski, K. & Haeseleer, F. A critical role of CaBP4 in the cone synapse. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **46**, 4320-4327, doi:10.1167/iovs.05-0478 (2005).
- 176 Botilde, Y. *et al.* Cluap1 localizes preferentially to the base and tip of cilia and is required for ciliogenesis in the mouse embryo. *Dev Biol* **381**, 203-212, doi:10.1016/j.ydbio.2013.05.024 (2013).
- 177 Ronquillo, C. C. *et al.* Ciliopathy-associated IQCB1/NPHP5 protein is required for mouse photoreceptor outer segment formation. *FASEB J* **30**, 3400-3412, doi:10.1096/fj.201600511R (2016).
- 178 Chakraborty, D., Conley, S. M., Zulliger, R. & Naash, M. I. The K153Del PRPH2 mutation differentially impacts photoreceptor structure and function. *Hum Mol Genet* **25**, 3500-3514, doi:10.1093/hmg/ddw193 (2016).
- 179 Jansen, H. G. & Sanyal, S. Development and degeneration of retina in rds mutant mice: electron microscopy. *J Comp Neurol* **224**, 71-84, doi:10.1002/cne.902240107 (1984).

- 180 LaVail, M. M. *et al.* Phenotypic characterization of P23H and S334ter rhodopsin transgenic rat models of inherited retinal degeneration. *Exp Eye Res* **167**, 56-90, doi:10.1016/j.exer.2017.10.023 (2018).
- 181 Orhan, E. *et al.* Genotypic and phenotypic characterization of P23H line 1 rat model. *PloS one* **10**, e0127319, doi:10.1371/journal.pone.0127319 (2015).
- 182 Athanasiou, D. *et al.* The role of the ER stress-response protein PERK in rhodopsin retinitis pigmentosa. *Hum Mol Genet* **26**, 4896-4905, doi:10.1093/hmg/ddx370 (2017).
- 183 Gorbatyuk, M. S. *et al.* Restoration of visual function in P23H rhodopsin transgenic rats by gene delivery of BiP/Grp78. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 5961-5966, doi:10.1073/pnas.0911991107 (2010).
- 184 Olsson, J. E. *et al.* Transgenic mice with a rhodopsin mutation (Pro23His): a mouse model of autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Neuron* **9**, 815-830 (1992).
- 185 Naash, M. I., Hollyfield, J. G., al-Ubaidi, M. R. & Baehr, W. Simulation of human autosomal dominant retinitis pigmentosa in transgenic mice expressing a mutated murine opsin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 5499-5503, doi:10.1073/pnas.90.12.5499 (1993).
- 186 Wu, T. H. *et al.* Opsin localization and rhodopsin photochemistry in a transgenic mouse model of retinitis pigmentosa. *Neuroscience* **87**, 709-717 (1998).
- 187 Chiang, W. C. *et al.* Robust Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation of Rhodopsin Precedes Retinal Degeneration. *Molecular neurobiology* **52**, 679-695, doi:10.1007/s12035-014-8881-8 (2015).
- 188 Price, B. A. *et al.* Mislocalization and degradation of human P23H-rhodopsin-GFP in a knockin mouse model of retinitis pigmentosa. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **52**, 9728-9736, doi:10.1167/iovs.11-8654 (2011).
- 189 Illing, M. E., Rajan, R. S., Bence, N. F. & Kopito, R. R. A rhodopsin mutant linked to autosomal dominant retinitis pigmentosa is prone to aggregate and interacts with the ubiquitin proteasome system. *J Biol Chem* **277**, 34150-34160, doi:10.1074/jbc.M204955200 (2002).
- 190 Haeri, M. & Knox, B. E. Rhodopsin mutant P23H destabilizes rod photoreceptor disk membranes. *PloS one* **7**, e30101, doi:10.1371/journal.pone.0030101 (2012).
- 191 Lem, J. *et al.* Morphological, physiological, and biochemical changes in rhodopsin knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 736-741, doi:10.1073/pnas.96.2.736 (1999).
- 192 Jozwick, C., Valter, K. & Stone, J. Reversal of functional loss in the P23H-3 rat retina by management of ambient light. *Exp Eye Res* **83**, 1074-1080, doi:10.1016/j.exer.2006.05.012 (2006).
- 193 Russell, S. *et al.* Efficacy and safety of voretigene neparvovec (AAV2-hRPE65v2) in patients with RPE65-mediated inherited retinal dystrophy: a randomised, controlled,

- open-label, phase 3 trial. *Lancet* **390**, 849-860, doi:10.1016/S0140-6736(17)31868-8 (2017).
- 194 Nayak, K. & Misra, M. A review on recent drug delivery systems for posterior segment of eye. *Biomed Pharmacother* **107**, 1564-1582, doi:10.1016/j.biopha.2018.08.138 (2018).
- 195 Srirangam, R., Hippalgaonkar, K., Avula, B., Khan, I. A. & Majumdar, S. Evaluation of the intravenous and topical routes for ocular delivery of hesperidin and hesperetin. *J Ocul Pharmacol Ther* **28**, 618-627, doi:10.1089/jop.2012.0040 (2012).
- 196 Giannaccini, M. *et al.* Magnetic nanoparticles: a strategy to target the choroidal layer in the posterior segment of the eye. *Sci Rep* **7**, 43092, doi:10.1038/srep43092 (2017).
- 197 Schwartz, S. D., Tan, G., Hosseini, H. & Nagiel, A. Subretinal Transplantation of Embryonic Stem Cell-Derived Retinal Pigment Epithelium for the Treatment of Macular Degeneration: An Assessment at 4 Years. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **57**, ORSFC1-9, doi:10.1167/iovs.15-18681 (2016).
- 198 Massof, R. W. & Fishman, G. A. How strong is the evidence that nutritional supplements slow the progression of retinitis pigmentosa? *Arch Ophthalmol* **128**, 493-495, doi:10.1001/archophthalmol.2010.46 (2010).
- 199 Tam, B. M., Noorwez, S. M., Kaushal, S., Kono, M. & Moritz, O. L. Photoactivation-induced instability of rhodopsin mutants T4K and T17M in rod outer segments underlies retinal degeneration in *X. laevis* transgenic models of retinitis pigmentosa. *J Neurosci* **34**, 13336-13348, doi:10.1523/JNEUROSCI.1655-14.2014 (2014).
- 200 Saliba, R. S., Munro, P. M., Luthert, P. J. & Cheetham, M. E. The cellular fate of mutant rhodopsin: quality control, degradation and aggresome formation. *J Cell Sci* **115**, 2907-2918 (2002).
- 201 Mendes, H. F. & Cheetham, M. E. Pharmacological manipulation of gain-of-function and dominant-negative mechanisms in rhodopsin retinitis pigmentosa. *Hum Mol Genet* **17**, 3043-3054, doi:10.1093/hmg/ddn202 (2008).
- 202 Krebs, M. P. *et al.* Molecular mechanisms of rhodopsin retinitis pigmentosa and the efficacy of pharmacological rescue. *J Mol Biol* **395**, 1063-1078, doi:10.1016/j.jmb.2009.11.015 (2010).
- 203 Chen, Y. *et al.* A novel small molecule chaperone of rod opsin and its potential therapy for retinal degeneration. *Nat Commun* **9**, 1976, doi:10.1038/s41467-018-04261-1 (2018).
- 204 Li, S., Samardzija, M., Yang, Z., Grimm, C. & Jin, M. Pharmacological Amelioration of Cone Survival and Vision in a Mouse Model for Leber Congenital Amaurosis. *J Neurosci* **36**, 5808-5819, doi:10.1523/JNEUROSCI.3857-15.2016 (2016).
- 205 Vasireddy, V. *et al.* Rescue of photoreceptor degeneration by curcumin in transgenic rats with P23H rhodopsin mutation. *PloS one* **6**, e21193, doi:10.1371/journal.pone.0021193 (2011).

- 206 Fernandez-Sanchez, L. *et al.* Controlled delivery of tauroursodeoxycholic acid from biodegradable microspheres slows retinal degeneration and vision loss in P23H rats. *PloS one* **12**, e0177998, doi:10.1371/journal.pone.0177998 (2017).
- 207 Fernandez-Sanchez, L., Lax, P., Pinilla, I., Martin-Nieto, J. & Cuenca, N. Tauroursodeoxycholic acid prevents retinal degeneration in transgenic P23H rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **52**, 4998-5008, doi:10.1167/iovs.11-7496 (2011).
- 208 Aguila, M. *et al.* Hsp90 inhibition protects against inherited retinal degeneration. *Hum Mol Genet* **23**, 2164-2175, doi:10.1093/hmg/ddt613 (2014).
- 209 Parfitt, D. A. *et al.* The heat-shock response co-inducer arimoclomol protects against retinal degeneration in rhodopsin retinitis pigmentosa. *Cell Death Dis* **5**, e1236, doi:10.1038/cddis.2014.214 (2014).
- 210 Cronin, T. *et al.* The disruption of the rod-derived cone viability gene leads to photoreceptor dysfunction and susceptibility to oxidative stress. *Cell Death Differ* **17**, 1199-1210, doi:10.1038/cdd.2010.2 (2010).
- 211 Rex, T. S. *et al.* Erythropoietin Slows Photoreceptor Cell Death in a Mouse Model of Autosomal Dominant Retinitis Pigmentosa. *PloS one* **11**, e0157411, doi:10.1371/journal.pone.0157411 (2016).
- 212 Leonard, K. C. *et al.* XIAP protection of photoreceptors in animal models of retinitis pigmentosa. *PloS one* **2**, e314, doi:10.1371/journal.pone.0000314 (2007).
- 213 Guadagni, V., Novelli, E., Piano, I., Gargini, C. & Strettoi, E. Pharmacological approaches to retinitis pigmentosa: A laboratory perspective. *Prog Retin Eye Res* **48**, 62-81, doi:10.1016/j.preteyeres.2015.06.005 (2015).
- 214 Viringipurampeer, I. A. *et al.* NLRP3 inflammasome activation drives bystander cone photoreceptor cell death in a P23H rhodopsin model of retinal degeneration. *Hum Mol Genet* **25**, 1501-1516, doi:10.1093/hmg/ddw029 (2016).
- 215 Liang, F. Q. *et al.* Long-term protection of retinal structure but not function using RAAV.CNTF in animal models of retinitis pigmentosa. *Mol Ther* **4**, 461-472, doi:10.1006/mthe.2001.0473 (2001).
- 216 Wen, R. *et al.* Regeneration of cone outer segments induced by CNTF. *Adv Exp Med Biol* **723**, 93-99, doi:10.1007/978-1-4614-0631-0_13 (2012).
- 217 Okoye, G. *et al.* Increased expression of brain-derived neurotrophic factor preserves retinal function and slows cell death from rhodopsin mutation or oxidative damage. *J Neurosci* **23**, 4164-4172 (2003).
- 218 Dalkara, D. *et al.* AAV mediated GDNF secretion from retinal glia slows down retinal degeneration in a rat model of retinitis pigmentosa. *Mol Ther* **19**, 1602-1608, doi:10.1038/mt.2011.62 (2011).
- 219 Sacchetti, M. *et al.* Recombinant Human Nerve Growth Factor Treatment Promotes Photoreceptor Survival in the Retinas of Rats with Retinitis Pigmentosa. *Curr Eye Res* **42**, 1064-1068, doi:10.1080/02713683.2017.1279634 (2017).

- 220 Byrne, L. C. *et al.* Viral-mediated RdCVF and RdCVFL expression protects cone and rod photoreceptors in retinal degeneration. *J Clin Invest* **125**, 105-116, doi:10.1172/JCI65654 (2015).
- 221 Leveillard, T. *et al.* Therapeutic strategy for handling inherited retinal degenerations in a gene-independent manner using rod-derived cone viability factors. *C R Biol* **337**, 207-213, doi:10.1016/j.crvi.2013.12.002 (2014).
- 222 Yang, Y. *et al.* Functional cone rescue by RdCVF protein in a dominant model of retinitis pigmentosa. *Mol Ther* **17**, 787-795, doi:10.1038/mt.2009.28 (2009).
- 223 Baid, R., Scheinman, R. I., Shinohara, T., Singh, D. P. & Kompella, U. B. LEDGF(1-326) decreases P23H and wild type rhodopsin aggregates and P23H rhodopsin mediated cell damage in human retinal pigment epithelial cells. *PloS one* **6**, e24616, doi:10.1371/journal.pone.0024616 (2011).
- 224 Sizova, O. S., Shinde, V. M., Lenox, A. R. & Gorbatyuk, M. S. Modulation of cellular signaling pathways in P23H rhodopsin photoreceptors. *Cell Signal* **26**, 665-672, doi:10.1016/j.cellsig.2013.12.008 (2014).
- 225 Venkatesh, A. *et al.* Activated mTORC1 promotes long-term cone survival in retinitis pigmentosa mice. *J Clin Invest* **125**, 1446-1458, doi:10.1172/JCI79766 (2015).
- 226 Yao, J. *et al.* Inhibiting autophagy reduces retinal degeneration caused by protein misfolding. *Autophagy* **14**, 1226-1238, doi:10.1080/15548627.2018.1463121 (2018).
- 227 Chiang, W. C., Hiramatsu, N., Messah, C., Kroeger, H. & Lin, J. H. Selective activation of ATF6 and PERK endoplasmic reticulum stress signaling pathways prevent mutant rhodopsin accumulation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **53**, 7159-7166, doi:10.1167/iovs.12-10222 (2012).
- 228 Adekeye, A., Haeri, M., Solessio, E. & Knox, B. E. Ablation of the proapoptotic genes CHOP or Ask1 does not prevent or delay loss of visual function in a P23H transgenic mouse model of retinitis pigmentosa. *PloS one* **9**, e83871, doi:10.1371/journal.pone.0083871 (2014).
- 229 Athanasiou, D. *et al.* Rescue of mutant rhodopsin traffic by metformin-induced AMPK activation accelerates photoreceptor degeneration. *Hum Mol Genet* **26**, 305-319, doi:10.1093/hmg/ddw387 (2017).
- 230 Kosmaoglou, M., Kanuga, N., Aguila, M., Garriga, P. & Cheetham, M. E. A dual role for EDEM1 in the processing of rod opsin. *J Cell Sci* **122**, 4465-4472, doi:10.1242/jcs.055228 (2009).
- 231 Athanasiou, D. *et al.* The co-chaperone and reductase ERdj5 facilitates rod opsin biogenesis and quality control. *Hum Mol Genet* **23**, 6594-6606, doi:10.1093/hmg/ddu385 (2014).
- 232 Griciuc, A. *et al.* Inactivation of VCP/ter94 suppresses retinal pathology caused by misfolded rhodopsin in Drosophila. *PLoS Genet* **6**, doi:10.1371/journal.pgen.1001075 (2010).

- 233 Clemson, C. M. *et al.* Therapeutic potential of valproic acid for retinitis pigmentosa. *Br J Ophthalmol* **95**, 89-93, doi:10.1136/bjo.2009.175356 (2011).
- 234 Vent-Schmidt, R. Y. J. *et al.* Opposing Effects of Valproic Acid Treatment Mediated by Histone Deacetylase Inhibitor Activity in Four Transgenic *X. laevis* Models of Retinitis Pigmentosa. *J Neurosci* **37**, 1039-1054, doi:10.1523/JNEUROSCI.1647-16.2016 (2017).
- 235 Shi, Y., Gerritsma, D., Bowes, A. J., Capretta, A. & Werstuck, G. H. Induction of GRP78 by valproic acid is dependent upon histone deacetylase inhibition. *Bioorg Med Chem Lett* **17**, 4491-4494, doi:10.1016/j.bmcl.2007.06.006 (2007).
- 236 Wang, J. F., Bown, C. & Young, L. T. Differential display PCR reveals novel targets for the mood-stabilizing drug valproate including the molecular chaperone GRP78. *Mol Pharmacol* **55**, 521-527 (1999).
- 237 Zhang, Z. *et al.* Valproate protects the retina from endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis after ischemia-reperfusion injury. *Neurosci Lett* **504**, 88-92, doi:10.1016/j.neulet.2011.09.003 (2011).
- 238 Mitton, K. P. *et al.* Different effects of valproic acid on photoreceptor loss in Rd1 and Rd10 retinal degeneration mice. *Mol Vis* **20**, 1527-1544 (2014).
- 239 Finsterer, J. & Zarrouk Mahjoub, S. Mitochondrial toxicity of antiepileptic drugs and their tolerability in mitochondrial disorders. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* **8**, 71-79, doi:10.1517/17425255.2012.644535 (2012).
- 240 Soria-Castro, R. *et al.* Exploring the Drug Repurposing Versatility of Valproic Acid as a Multifunctional Regulator of Innate and Adaptive Immune Cells. *J Immunol Res* **2019**, 9678098, doi:10.1155/2019/9678098 (2019).
- 241 Ornoy, A. Valproic acid in pregnancy: how much are we endangering the embryo and fetus? *Reprod Toxicol* **28**, 1-10, doi:10.1016/j.reprotox.2009.02.014 (2009).
- 242 Mann Brukner, A., Ben-Hur, T., Honig, A., Ekstein, D. & Eyal, S. Effects of Valproic Acid on Cerebral Nutrient Carriers' Expression in the Rat. *Front Pharmacol* **9**, 1054, doi:10.3389/fphar.2018.01054 (2018).
- 243 Das, I. *et al.* Preventing proteostasis diseases by selective inhibition of a phosphatase regulatory subunit. *Science* **348**, 239-242, doi:10.1126/science.aaa4484 (2015).
- 244 Tsaytler, P., Harding, H. P., Ron, D. & Bertolotti, A. Selective inhibition of a regulatory subunit of protein phosphatase 1 restores proteostasis. *Science* **332**, 91-94, doi:10.1126/science.1201396 (2011).
- 245 Boyce, M. *et al.* A selective inhibitor of eIF2 α dephosphorylation protects cells from ER stress. *Science* **307**, 935-939, doi:10.1126/science.1101902 (2005).
- 246 Jiang, H. Q. *et al.* Guanabenz delays the onset of disease symptoms, extends lifespan, improves motor performance and attenuates motor neuron loss in the SOD1 G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroscience* **277**, 132-138, doi:10.1016/j.neuroscience.2014.03.047 (2014).

- 247 Wang, L., Popko, B., Tixier, E. & Roos, R. P. Guanabenz, which enhances the unfolded protein response, ameliorates mutant SOD1-induced amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Dis* **71**, 317-324, doi:10.1016/j.nbd.2014.08.010 (2014).
- 248 Holmes, B., Brogden, R. N., Heel, R. C., Speight, T. M. & Avery, G. S. Guanabenz. A review of its pharmacodynamic properties and therapeutic efficacy in hypertension. *Drugs* **26**, 212-229, doi:10.2165/00003495-198326030-00003 (1983).
- 249 Bella, E. D. *et al.* Protein misfolding, amyotrophic lateral sclerosis and guanabenz: protocol for a phase II RCT with futility design (ProMISe trial). *BMJ Open* **7**, e015434, doi:10.1136/bmjopen-2016-015434 (2017).
- 250 Chen, Y. *et al.* Sephin1, which prolongs the integrated stress response, is a promising therapeutic for multiple sclerosis. *Brain* **142**, 344-361, doi:10.1093/brain/awy322 (2019).
- 251 Sengillo, J. D., Justus, S., Tsai, Y. T., Cabral, T. & Tsang, S. H. Gene and cell-based therapies for inherited retinal disorders: An update. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* **172**, 349-366, doi:10.1002/ajmg.c.31534 (2016).
- 252 Wood, E. H. *et al.* STEM CELL THERAPIES, GENE-BASED THERAPIES, OPTOGENETICS, AND RETINAL PROSTHETICS: Current State and Implications for the Future. *Retina* **39**, 820-835, doi:10.1097/IAE.0000000000002449 (2019).
- 253 DiCarlo, J. E., Mahajan, V. B. & Tsang, S. H. Gene therapy and genome surgery in the retina. *J Clin Invest* **128**, 2177-2188, doi:10.1172/JCI120429 (2018).
- 254 Burnight, E. R. *et al.* Using CRISPR-Cas9 to Generate Gene-Corrected Autologous iPSCs for the Treatment of Inherited Retinal Degeneration. *Mol Ther* **25**, 1999-2013, doi:10.1016/j.ymthe.2017.05.015 (2017).
- 255 Busskamp, V., Picaud, S., Sahel, J. A. & Roska, B. Optogenetic therapy for retinitis pigmentosa. *Gene Ther* **19**, 169-175, doi:10.1038/gt.2011.155 (2012).
- 256 Henriksen, B. S., Marc, R. E. & Bernstein, P. S. Optogenetics for retinal disorders. *J Ophthalmic Vis Res* **9**, 374-382, doi:10.4103/2008-322X.143379 (2014).
- 257 Scholl, H. P. *et al.* Emerging therapies for inherited retinal degeneration. *Sci Transl Med* **8**, 368rv366, doi:10.1126/scitranslmed.aaf2838 (2016).
- 258 da Cruz, L. *et al.* Phase 1 clinical study of an embryonic stem cell-derived retinal pigment epithelium patch in age-related macular degeneration. *Nat Biotechnol* **36**, 328-337, doi:10.1038/nbt.4114 (2018).
- 259 Mandai, M., Kurimoto, Y. & Takahashi, M. Autologous Induced Stem-Cell-Derived Retinal Cells for Macular Degeneration. *N Engl J Med* **377**, 792-793, doi:10.1056/NEJMc1706274 (2017).
- 260 Mandai, M. *et al.* iPSC-Derived Retina Transplants Improve Vision in rd1 End-Stage Retinal-Degeneration Mice. *Stem Cell Reports* **8**, 1112-1113, doi:10.1016/j.stemcr.2017.03.024 (2017).

- 261 Ben M'Barek, K. *et al.* Human ESC-derived retinal epithelial cell sheets potentiate rescue of photoreceptor cell loss in rats with retinal degeneration. *Sci Transl Med* **9**, doi:10.1126/scitranslmed.aai7471 (2017).
- 262 Mills, J. O., Jalil, A. & Stanga, P. E. Electronic retinal implants and artificial vision: journey and present. *Eye (Lond)* **31**, 1383-1398, doi:10.1038/eye.2017.65 (2017).
- 263 da Cruz, L. *et al.* Five-Year Safety and Performance Results from the Argus II Retinal Prosthesis System Clinical Trial. *Ophthalmology* **123**, 2248-2254, doi:10.1016/j.ophtha.2016.06.049 (2016).
- 264 Mattapallil, M. J. *et al.* The Rd8 mutation of the Crb1 gene is present in vendor lines of C57BL/6N mice and embryonic stem cells, and confounds ocular induced mutant phenotypes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **53**, 2921-2927, doi:10.1167/iovs.12-9662 (2012).
- 265 Marion, V. *et al.* BBS-induced ciliary defect enhances adipogenesis, causing paradoxical higher-insulin sensitivity, glucose usage, and decreased inflammatory response. *Cell Metab* **16**, 363-377, doi:10.1016/j.cmet.2012.08.005 (2012).
- 266 Novoa, I. *et al.* Stress-induced gene expression requires programmed recovery from translational repression. *EMBO J* **22**, 1180-1187, doi:10.1093/emboj/cdg112 (2003).
- 267 Walter, P. & Ron, D. The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science* **334**, 1081-1086, doi:10.1126/science.1209038 (2011).
- 268 Brun, A. *et al.* In vivo phenotypic and molecular characterization of retinal degeneration in mouse models of three ciliopathies. *Exp Eye Res* **186**, 107721, doi:10.1016/j.exer.2019.107721 (2019).
- 269 Uddin, M. N., Ito, S., Nishio, N., Suganya, T. & Isobe, K. Gadd34 induces autophagy through the suppression of the mTOR pathway during starvation. *Biochem Biophys Res Commun* **407**, 692-698, doi:10.1016/j.bbrc.2011.03.077 (2011).
- 270 Holczer, M., Banhegyi, G. & Kapuy, O. GADD34 Keeps the mTOR Pathway Inactivated in Endoplasmic Reticulum Stress Related Autophagy. *PloS one* **11**, e0168359, doi:10.1371/journal.pone.0168359 (2016).
- 271 Takigawa, S. *et al.* Guanabenz Downregulates Inflammatory Responses via eIF2alpha Dependent and Independent Signaling. *Int J Mol Sci* **17**, doi:10.3390/ijms17050674 (2016).
- 272 Acosta, M. L. *et al.* Retinal metabolic state of the proline-23-histidine rat model of retinitis pigmentosa. *Am J Physiol Cell Physiol* **298**, C764-774, doi:10.1152/ajpcell.00253.2009 (2010).
- 273 Collin, G. B. *et al.* The Alstrom syndrome protein, ALMS1, interacts with alpha-actinin and components of the endosome recycling pathway. *PloS one* **7**, e37925, doi:10.1371/journal.pone.0037925 (2012).

- 274 Favaretto, F. *et al.* GLUT4 defects in adipose tissue are early signs of metabolic alterations in Alms1GT/GT, a mouse model for obesity and insulin resistance. *PloS one* **9**, e109540, doi:10.1371/journal.pone.0109540 (2014).
- 275 Todd, L. & Zelinka, C. Valproic Acid for a Treatment of Retinitis Pigmentosa: Reasons for Optimism and Caution. *J Neurosci* **37**, 5215-5217, doi:10.1523/JNEUROSCI.0774-17.2017 (2017).
- 276 Liu, Q. *et al.* Valproic acid attenuates inflammation of optic nerve and apoptosis of retinal ganglion cells in a rat model of optic neuritis. *Biomed Pharmacother* **96**, 1363-1370, doi:10.1016/j.biopha.2017.11.066 (2017).
- 277 Totan, Y., Guler, E., Yuce, A. & Dervisogullari, M. S. The adverse effects of valproic acid on visual functions in the treatment of retinitis pigmentosa. *Indian J Ophthalmol* **65**, 984-988, doi:10.4103/ijo.IJO_978_16 (2017).

Liste des communications

Liste des publications :

In vivo phenotypic and molecular characterization of retinal degeneration in mouse models of three ciliopathies

Agnès BRUN, Xiangxiang YU, Cathy OBRINGER, Daniel AJOY, Elodie HASER, Corinne STOETZEL, Michel J. ROUX, Nadia MESSADDEQ, Hélène DOLLFUS, Vincent MARION
Experimental Eye Research, accepté Juillet 2019

En cours de rédaction:

Administration of IFB-088 in combination with valproic acid could improve transiently retinal phenotype in two retinitis pigmentosa models

Agnès BRUN, Daniel AJOY, Cathy OBRINGER, Elodie HASER, Nadia MESSADDEQ, Michel J. ROUX, Philippe GUEDAT, Pierre MINIOU, Hélène DOLLFUS, Emmanuelle ABGUEGUEN, Vincent MARION

An overview of current therapeutic approaches for retinal ciliopathies

Daniel AJOY, Agnès BRUN, Vincent MARION, Hélène DOLLFUS

Liste des communications orales :

Poster:

Study of the proteasome response in retinal degenerations associated with ciliopathies

Agnès BRUN, Xiangxiang YU, Cathy OBRINGER, Hélène DOLLFUS, Vincent MARION
Cils, Flagelles et Centrosomes, 12-14 octobre 2015, Strasbourg, France

Characterization and comparison of the retinal phenotype between a P23H-KI mouse model and Bardet-Biedl syndrome knockout mice

Agnès BRUN, Cathy OBRINGER, Nadia MESSADDEQ, Michel J. ROUX, Hélène DOLLFUS, Hélène DOLLFUS, Vincent MARION

Cilia 2016, 4-7 octobre 2016, Amsterdam, Pays-Bas

FMTS 2017, 27-28 avril 2017, Strasbourg, France

Présentation :

IFB-088, a clinically tested molecule, is effective in slowing down Bardet-Biedl Syndrome associated retinal degeneration

Agnès BRUN, Cathy OBRINGER, Emmanuelle Abgueuen, Philippe Guédat, Hélène DOLLFUS, Hélène DOLLFUS, Vincent MARION

Cilia 2018, 2-5 octobre 2018, Copenhague, Danemark

Résumé

Les rétinopathies pigmentaires sont la première cause de dégénérescence rétinienne héréditaire, affectant 1,5 millions de personnes dans le monde. A ce jour, aucun traitement n'est disponible dans la majorité de ces pathologies. Basé sur une étude antérieure, le projet vise au développement d'un traitement dans certaines d'entre elles. L'approche testée cible une voie activée dans plusieurs de ces atteintes ; l'Unfolded Protein Response (UPR), mécanisme de réponse au stress activée en particulier au cas de surcharge protéique. Le traitement permet de diminuer cette charge protéique. Il est composé d'IFB-088, inhibiteur du complexe GADD34/PP1c, permettant le maintien de l'inhibition de la traduction induit par l'UPR et d'acide valproïque stimulant BiP et les capacités de repliement du réticulum. Il a été testé dans deux modèles présentant une activation de l'UPR. Les résultats ont montré qu'il pouvait ralentir la dégénérescence rétinienne à court terme, réduisant le stress cellulaire et maintenant les capacités visuelles.

Rétinopathies pigmentaires ; UPR ; thérapie pharmacologique ; inhibiteur GADD34/PP1c ; VPA

Résumé en anglais

Retinitis pigmentosa is the first cause of inherited retinal degeneration affecting 1.5 million persons worldwide. Currently, there is no available treatment for most of these diseases. Based on a previous study, the project aims to develop a treatment for some of them. The tested approach targets a common cellular pathway activated in many of these diseases; the Unfolded Protein Response (UPR), pathway activated in response to a stress due to a protein overload. The treatment decreases this overload. The treatment is composed of IFB-088, a GADD34/PP1c inhibitor, allowing maintaining the translation inhibition and of valproic acid which increases BiP and the folding capacities of the reticulum. The treatment was tested in two models displaying UPR activation. In these models, the treatment slow-down the short-term retinal degeneration by decreasing cellular stress to maintain visual capacities.

Retinitis pigmentosa; UPR; pharmacologic therapy; GADD34/PP1c inhibitor; VPA