

DÉGÉNÉRESCENCE DES PHOTORÉCEPTEURS : STRATÉGIES THÉRAPEUTIQUES ET NOUVELLES PERSPECTIVES

PHOTORECEPTOR DEGENERATION: THERAPEUTIC STRATEGIES AND NEW PERSPECTIVES

Par Mathias FRADOT^{1,2,3}, Ying YANG^{1,2,3}, Serge ROSOLEN^{1,2,3,6}, José SAHEL^{1,2,3,4,5}, Serge PICAUD^{1,2,3,5}
(Communication présentée le 3 février 2011)

RÉSUMÉ

Les maladies oculaires avec dégénérescence des photorécepteurs sont toujours à l'origine de cécités. Cependant, différentes approches thérapeutiques ont récemment été validées pour préserver la vision, comme dans les cas de la dégénérescence maculaire liée à l'âge ou de l'amaurose congénitale de Leber. Pour cette dernière maladie, la thérapie génique a permis de restaurer la vision de patients perdant progressivement la vue à la suite de la dégénérescence de leurs photorécepteurs. Ce succès majeur a ouvert la voie à de nombreuses autres formes de thérapie génique pour prévenir la cécité ou restaurer une certaine vision par la thérapie optogénétique. Dans ce dernier cas, un gène codant une protéine photosensible issue d'algues ou de bactéries est introduit dans le génome d'une cellule pour restaurer une perception à la lumière dans la rétine aveugle. D'autres approches thérapeutiques reposent sur les facteurs trophiques comme le CNTF (*ciliary neurotrophic factor*) ou le RdCVF (*rod-derived cone viability factor*), ou encore les inhibiteurs des canaux Ca²⁺. Enfin, la transplantation de cellules souches est amenée à devenir un mode thérapeutique dans un futur proche. Ces différentes approches offrent donc un grand espoir de traitement des maladies entraînant la cécité et considérées comme incurables.

Mots-clés: dégénérescence des photorécepteurs, thérapie génique, facteurs trophiques, transplantation, prothèse rétinienne, optogénétique.

SUMMARY

Ocular diseases involving photoreceptor degeneration still lead to blindness. However, different therapeutic strategies preserving vision have been validated recently, as in age-related macular degeneration (ARMD) or Leber congenital amaurosis (LCA). In the latter, gene therapy was found to restore vision in patients progressively losing eyesight due the loss of their photoreceptors. This major success opened the way for many other forms of gene therapy to prevent blindness or even restore some degree of sight. Optogenetic therapy is one such example, where a gene coding for a photosensitive protein from algae or bacteria is introduced in the genome of a cell to restore some light perception in the blind retina. Other therapeutic strategies rely on trophic factors, such as Ciliary Neurotrophic factor (CNTF) or RdCVF (rod-derived cone viability factor), or calcium channel blockers. Finally, stem cell transplantation is likely to provide new modes of treatment in a near future. These therapeutic strategies therefore hold great promises for diseases leading to blindness and considered as incurable.

Key words: photoreceptor degeneration, gene therapy, trophic factors, transplantation, retinal prosthesis, optogenetics.

- (1) INSERM, U968, Institut de la Vision, Paris, F-75012, France;
(2) UPMC Univ Paris 06, UMR_S968, Institut de la Vision, Paris, F-75012, France;
(3) CNRS, UMR 7210, Institut de la Vision, Paris, F-75012, France;
(4) Centre Hospitalier National d'Ophtalmologie des Quinze-Vingts, Paris, France;
(5) Fondation Ophtalmologique Adolphe de Rothschild, Paris, France.
(6) Clinique Vétérinaire Voltaire, Asnières, France.

COMMUNICATION

Premier maillon de la perception visuelle, les photorécepteurs sont les neurones rétiniens photosensibles dont la dégénérescence constitue une des principales causes de cécité ou de malvoyance sévère dans les pays développés. Les photorécepteurs se répartissent en deux types distincts, les bâtonnets responsables de la vision nocturne et les cônes responsables de la vision diurne et dont la densité très élevée en région maculaire nous procure notre très grande acuité centrale. Les maladies rétinienne peuvent être d'origine génétique, telles les rétinopathies pigmentaires et l'amaurose congénitale de Leber, ou acquise telle la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA). Suivant le type de photorécepteur atteint en première intention, la perte visuelle sera périphérique dans le cas des bâtonnets comme pour la rétinopathie pigmentaire ou centrale pour les cônes comme dans la maladie de Stargardt ou la DMLA. La perte de vision périphérique associée au dysfonctionnement des bâtonnets ne signifie pas que la vision périphérique est assurée par ces photorécepteurs en condition diurne mais que les cônes nécessitent la présence des bâtonnets pour leur survie (cf. ci-dessous) et qu'ils vont disparaître plus rapidement en périphérie. Malgré leur hétérogénéité, ces maladies ont en commun, d'une part, leur irréversibilité, les neurones ne pouvant pas se régénérer, d'autre part, leur évolution relativement lente, permettant de poser le diagnostic généralement plusieurs années avant la cécité ou la malvoyance sévère. Après la perte des photorécepteurs, le tissu neuronal rétinien se maintient, laissant la possibilité de stimuler ce tissu résiduel pour restaurer une certaine perception visuelle par différentes approches. Si ces stratégies de réhabilitation ont vu le jour, il serait préférable de prévenir la perte initiale des photorécepteurs, c'est pourquoi différentes stratégies correctives ou de neuroprotection sont développées chez l'animal. Une stratégie thérapeutique a récemment été validée avec succès pour traiter la néovascularisation dans la DMLA dite « humide », une complication observée dans 15% des cas. Dans ce document, nous ne présenterons pas cette approche validée mais les nouvelles approches thérapeutiques aux stades d'évaluation clinique ou préclinique sur les dystrophies rétinienne héréditaires dont certaines de ces approches pourraient également avoir des répercussions pour le traitement de la DMLA.

STRATÉGIES CORRECTIVES

Empêcher le processus de dégénérescence des photorécepteurs peut d'abord se faire en supprimant la cause de la maladie par thérapie génique correctrice. Cette thérapie génique est restreinte aux dystrophies d'origine monogénique et leurs fortes hétérogénéités génétiques limitent les possibilités de traitements standardisés pour ces maladies héréditaires. Dans le cadre des maladies à transmission autosomique récessive, le principe est d'induire l'expression d'une version correcte du gène muté dans les cellules où sa fonction est requise. La thérapie génique correctrice peut aussi s'appliquer aux maladies dominantes, où l'expression du gène muté doit être supprimée. La thérapie génique a été validée en ophtalmologie sur une forme d'amaurose congénitale de Leber liée à une mutation sur le gène RPE65

exprimé dans l'épithélium pigmentaire rétinien (EPR) et codant une protéine impliquée dans le renouvellement du cofacteur du pigment visuel, le 11-cis retinaldéhyde. Après des résultats concluants obtenus chez des chiens atteints d'une mutation sur ce gène (Acland *et al.* 2001), cette stratégie thérapeutique a été appliquée avec succès chez l'homme (Bainbridge *et al.*, 2008 ; Hauswirth *et al.*, 2008 ; Maguire *et al.*, 2008 ; Cideciyan *et al.* 2009 ; Maguire *et al.* 2009).

Ce premier succès de la thérapie génique en ophtalmologie ouvre la voie à de nouvelles applications pour d'autres formes de dystrophies rétinienne. Des tests précliniques ont aussi été réalisés pour des mutations sur des gènes exprimés dans les photorécepteurs à bâtonnet (PDE β ; Pang *et al.* 2011) ou dans les photorécepteurs à cône (GNAT2 ; Alexander *et al.* 2007). Une thérapie génique est même en cours d'évaluation à l'Institut de la Vision pour une maladie mitochondriale conduisant à la dégénérescence des cellules ganglionnaires de la rétine, la neuropathie optique de Leber. La difficulté résidait dans le fait d'introduire le code génétique d'une protéine mitochondriale dans le noyau. La difficulté a été contournée en rajoutant des séquences qui permettent l'adressage de l'ARN à la surface des mitochondries pour une traduction au niveau de la membrane mitochondriale. Cette approche a été validée sur des fibroblastes de patients puis sur des cellules ganglionnaires en culture pure et sur un modèle de rat (Bonnet *et al.* 2007 ; Ellouze *et al.* 2008).

STRATÉGIES DE NEUROPROTECTION

Les stratégies neuroprotectrices visent à ralentir voire bloquer le processus neurodégénératif. Si la thérapie correctrice se doit d'être spécifique d'un gène, les approches neuroprotectrices peuvent généralement s'appliquer aux différentes formes d'une maladie car elles visent un mécanisme commun de dégénérescence. Lorsqu'il s'agit d'une neuroprotection par une protéine, généralement un facteur trophique, ce dernier peut être apporté de différentes façon :

- 1) l'injection de la protéine,
- 2) l'introduction d'une capsule contenant des cellules produisant le facteur trophique,
- 3) la thérapie génique pour faire exprimer le facteur par un type cellulaire et ainsi augmenter sa production locale.

Si les injections locales et répétées de facteur trophique dans l'œil peuvent paraître problématiques, il faut se rappeler que la stratégie anti-angiogénique pour la DMLA fait actuellement appel à de telles injections mensuelles sur une période de trois ans sans induire de lésions majeures.

En ce qui concerne cette néo-vascularisation dans les maladies comme la forme humide de la DMLA ou la rétinopathie diabétique, des approches par application de facteurs trophiques sont actuellement à l'étude. Dans ces affections, la formation aberrante de néo-vaisseaux dans la région maculaire conduit à terme à une dégénérescence de ses photorécepteurs. Ceci a pour conséquence la formation d'un scotome central et une baisse importante de

l'acuité visuelle. Cette néovascularisation serait la conséquence d'un déséquilibre entre les facteurs pro-angiogéniques, notamment le *vascular endothelial growth factor* (VEGF), et anti-angiogéniques. La stratégie thérapeutique actuelle vise à rééquilibrer cette balance par le blocage du VEGF mais d'autres approches envisagent également de renforcer les facteurs anti-angiogéniques (Campochiaro 2007). S'il n'existe pas réellement de modèle animal de ces maladies, notamment parce que chez les mammifères, seuls les primates sont dotés d'une macula, il est cependant possible de générer la formation de néo-vaisseaux en provoquant une rupture de la membrane de Bruch par un traitement par laser, permettant ainsi de vérifier l'efficacité de traitements anti-angiogéniques (Ryan 1982). Des souris ont été traitées par thérapie génique afin d'exprimer au niveau de la rétine différents facteurs anti-angiogéniques, tels le *pigment epithelium-derived factor* (PEDF ; Mori 2001), l'angiostatine (Lai *et al.* 2001) et une isoforme de *fms-like tyrosine kinase* (sFlt-1 ; Lai *et al.* 2002), avant d'être soumises à un traitement par laser destiné à provoquer une néo-vascularisation. On observe, chez ces animaux, une inhibition de la néovascularisation rétinienne par rapport à des animaux témoins. Cette approche a aussi été appliquée avec succès chez le primate en utilisant un vecteur codant sFlt-1 (Lai *et al.* 2005 ; Lai *et al.* 2009).

L'approche neuroprotectrice a également été utilisée pour cibler directement la survie des photorécepteurs. Ainsi, dès 1990, le rôle neuroprotecteur du *basic fibroblast growth factor* (bFGF) fut mis en évidence chez un rat, modèle de dystrophie rétinienne

(Faktorovich *et al.* 1990). Par la suite, l'introduction d'un transgène codant le bFGF dans la rétine d'un rat modèle de rétinopathie pigmentaire, permit un ralentissement du processus de dégénérescence des photorécepteurs, démontrant ainsi la faisabilité de cette approche *in vivo* (Lau *et al.* 2000). Cependant, l'utilisation du bFGF est limitée par son activité angiogénique, conduisant à une néo-vascularisation rétinienne pathogène (Perry *et al.* 1995). Parmi les autres protéines identifiées pour leur activité neuroprotectrice, la plus efficace est le *ciliary neurotrophic factor* (CNTF) dont l'expression dans la rétine d'un modèle murin de rétinopathie pigmentaire, la souris *rd1*, ralentit considérablement la dégénérescence des photorécepteurs (Cayouette *et al.* 1997 ; Cayouette *et al.* 1998). Depuis, ce facteur trophique a montré une activité neuroprotectrice dans d'autres modèles de dystrophie rétinienne (Liang *et al.* 2001 ; Huang *et al.* 2004). Le seul inconvénient serait une dédifférenciation des photorécepteurs conduisant de ce fait à une diminution de leur activité fonctionnelle mesurée par l'électrorétinogramme (Rhee *et al.* 2007 ; McGill *et al.* 2007). Pour pallier cet inconvénient par la possibilité d'une régulation du taux d'expression du facteur, la stratégie thérapeutique actuellement à l'étude est l'utilisation d'une capsule contenant des cellules exprimant le facteur trophique. Cette capsule introduite et fixée dans l'humeur vitrée va permettre la diffusion du facteur vers la rétine. Dans un premier temps, cette approche a été validée chez le chien (Tao *et al.* 2002) avant le lancement d'essais cliniques en cours aux États-Unis.

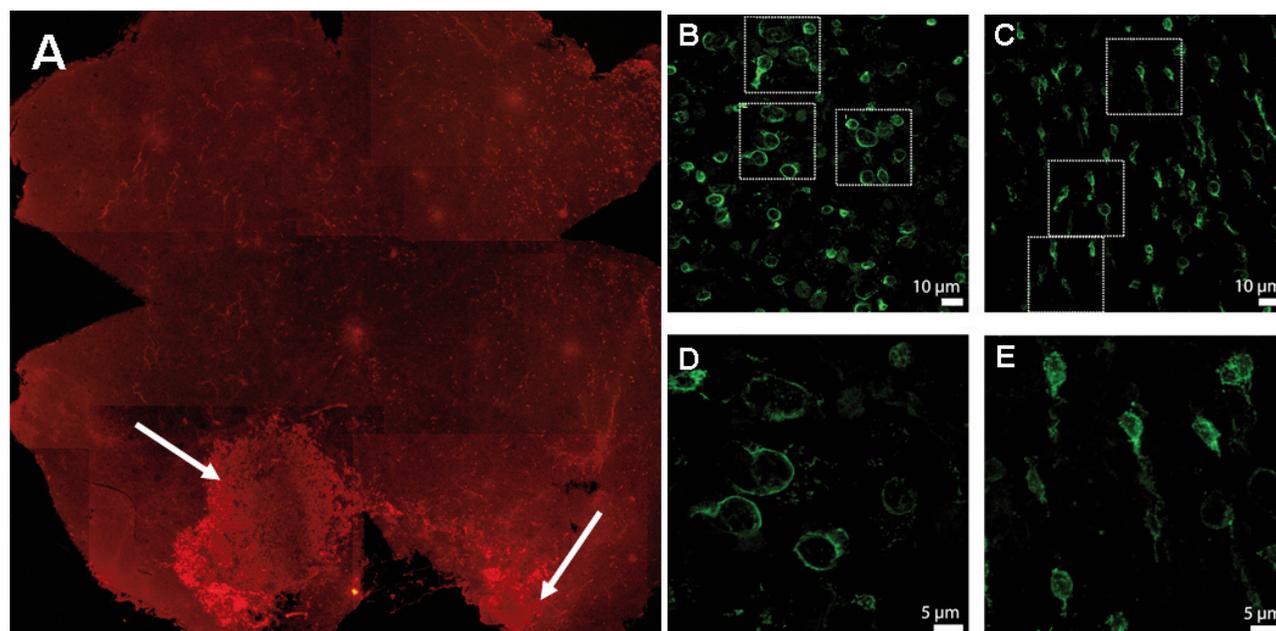


Figure 1 : Démonstration de l'effet trophique des bâtonnets sur les cônes par transplantation de photorécepteurs sains chez le rat P23H, un modèle de rétinopathie pigmentaire.

A : Photographie d'une rétine de rat P23H avec un greffon sain après immunomarquage des bâtonnets par un anticorps dirigé contre la rhodopsine. Une couche pure de photorécepteurs sains, préparée au vibratome, a été transplantée dans la rétine d'un rat P23H âgé de trois mois, puis l'animal a été sacrifié à l'âge de neuf mois. Les flèches blanches montrent l'emplacement du greffon exprimant la rhodopsine, alors que l'absence de marquage de la rétine hôte démontre qu'elle est dépourvue de bâtonnets à ce stade de la maladie.

B, C, D, E : Morphologie des cônes dans des rétines non transplantées (**B, D**) et transplantées (**C, E**). Après dégénérescence des bâtonnets, les cônes perdent les segments internes et externes devenant ainsi non fonctionnels (**B, D**). (**C, E**) Dans une rétine transplantée, les cônes conservent une morphologie proche de la normale indiquant une préservation de leur fonction. Cette préservation s'observe à distance du greffon démontrant la nature diffusible de cet effet (d'après Yang *et al.* 2010).

COMMUNICATION

Plusieurs approches neuroprotectrices ont été développées suite à la démonstration d'un effet neuroprotecteur de la transplantation de photorécepteurs à bâtonnet sur la survie des photorécepteurs à cône. En effet, si la transplantation de neurones rétinien fut d'abord effectuée dans l'espoir de remplacer les photorécepteurs perdus, les études de cette approche ont montré qu'un greffon adulte sain, bien qu'incapable de s'intégrer, exerçait un effet neuroprotecteur sur les cônes de la rétine hôte chez la souris *rd1* comme chez le rat P23H, un autre modèle de rétinopathie pigmentaire (figure 1, Mohand-Said *et al.* 1998 ; Yang *et al.* 2010). Des expériences de co-culture compartimentée mettant en présence une rétine malade à un stade de dégénérescence où seuls les cônes sont encore présents et des photorécepteurs à bâtonnet ont permis de mettre en évidence l'effet trophique de ces derniers (Mohand-Said *et al.* 2000). La nature protéique de cet effet trophique fut démontrée par différentes manipulations du milieu de culture (Fintz *et al.* 2003). Enfin, un criblage à haut débit réalisé sur des cultures enrichies en cônes de poulet a permis d'identifier le facteur de survie des cônes *rod-derived cone viability factor* (RdCVF ; Leveillard *et al.* 2004). L'invalidation du gène codant cette protéine conduit chez la souris à une dégénérescence des photorécepteurs à cône en accord avec son effet trophique sur ces cellules (Cronin *et al.* 2010). Certaines formes de l'amaurose congénitale de Leber seraient associées à des variants génétiques du gène (Hanein *et al.* 2006). L'utilisation de RdCVF pour le traitement des rétinopathies pigmentaires est actuellement en cours d'expérimentation.

Ces résultats montrant l'effet trophique des photorécepteurs à bâtonnet sur les photorécepteurs à cône a suggéré qu'il devait être possible de protéger indirectement les cônes par la préservation des bâtonnets, même si ces derniers n'étaient pas fonctionnels du fait de l'expression d'une mutation pathogène. Dès les années 1970, il avait été montré dans différents modèles animaux de rétinopathies pigmentaires (Farber & Lolley, 1974; Woodford *et al.* 1982 ; Barbehenn *et al.* 1988 ; Kommonen *et al.* 1996), et même chez un patient atteint par cette maladie (Farber *et al.* 1987), que les photorécepteurs contenaient une concentration très élevée de GMPcyclique (cGMP). C'est ainsi le cas pour des setters irlandais (Barbehenn *et al.* 1988), des colleys (Woodford *et al.* 1982) et des labradors retrievers (Kommonen *et al.* 1996). Ce résultat a pris toute son importance après la découverte des canaux activés par le cGMP et responsables du courant d'obscurité dépolarisant les photorécepteurs. Ces canaux étant perméables au Na⁺ et au Ca²⁺, leur suractivation pouvait être tenue responsable de la mort des photorécepteurs à bâtonnet. Pour tester cette hypothèse, nous avons administré du diltiazem, un bloqueur de canaux Ca²⁺, à des souris *rd1* car ce composé bloque les canaux activés par le cGMP (Koch & Kaupp, 1985). Nos résultats indiquent une préservation

modeste des photorécepteurs à bâtonnet ainsi que des photorécepteurs à cône (Frasson *et al.* 1999). Cette neuroprotection a ensuite été reproduite avec d'autres bloqueurs de canaux calciques (Takano *et al.* 2004). L'intérêt de réduire les flux calciques dans ces photorécepteurs en voie de dégénérescence fut confirmé par le croisement de la souris *rd1* avec une souris invalidée pour les canaux Ca²⁺ (Read *et al.* 2002). Si cette approche des bloqueurs de canaux Ca²⁺ ne s'applique pas à tous les modèles de rétinopathies pigmentaires (Bush *et al.* 2000 ; Pearce-Kelling *et al.* 2001), elle a été validée chez le rat RCS⁷ (Yamazaki *et al.* 2002), chez un modèle de rétinopathie associée au cancer (Ohguro *et al.* 2001) et un modèle de dégénérescence induit par la lumière (Donovan & Cotter, 2002). L'utilisation d'explants rétinien *in vitro* a permis de montrer que la dégénérescence est bien liée à une activation excessive des canaux activés par le cGMP (Vallazza-Deschamps *et al.* 2005). Enfin, plusieurs études cliniques ont déjà mis en évidence l'intérêt thérapeutique des bloqueurs de canaux Ca²⁺ pour ralentir l'évolution de la rétinopathie pigmentaire (Pasantes-Morales *et al.* 2002).

STRATÉGIES UTILISANT DES CELLULES SOUCHES

Si les cellules souches sont actuellement considérées pour remplacer les photorécepteurs, les applications cliniques les plus imminentes ont pour objet un renouvellement de l'épithélium pigmentaire rétinien (EPR) visant à une neuroprotection des photorécepteurs adjacents. En effet, la difficulté de l'utilisation des cellules souches est de parvenir à une différenciation correcte de celles-ci : chez la souris *rd1* et d'autres modèles murins, après transplantation, dans la rétine en dégénérescence, de cellules souches rétinien, celles-ci se différencient préférentiellement en glie ou en cellules ganglionnaires (Canola *et al.* 2007). Prétraiter les cellules souches avant leur utilisation, afin de les orienter dans la voie de différenciation désirée, devrait permettre de contourner ce problème. Ces cellules peuvent être d'origine embryonnaire ou provenir de différentes régions du système nerveux adulte (Ahmad 2001) mais récemment, il a été possible de transformer des cellules de peau ou de cheveux en cellules souches pluripotentes pouvant par la suite être différenciées en photorécepteurs ou en cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien (Buchholz *et al.* 2009 ; Lamba *et al.* 2010).

L'épithélium pigmentaire rétinien est indispensable aux photorécepteurs pour leur métabolisme et le renouvellement du pigment visuel, il est aussi impliqué dans le renouvellement des segments externes. Des mutations exprimées par les cellules de l'EPR sont responsables de certaines dystrophies rétinien avec perturbation de la phagocytose des segments externes, le rat RCS procurant un modèle de ces formes de rétinopathies pigmen-

(7) RCS : Royal College of Surgeons. Modèle naturel de dégénérescence rétinienne héréditaire chez le rat lié à l'abolition de la phagocytose des segments externes des photorécepteurs.

taires. La transplantation de cellules de l'EPR chez ce modèle retarde considérablement la perte des photorécepteurs. Cette amélioration de la survie des photorécepteurs passe par la restauration d'un métabolisme normal (Lavail *et al.* 1992), mais aussi par la diffusion de facteurs trophiques (Sahel *et al.* 2001). Des essais ont également été réalisés chez ce modèle avec des cellules souches embryonnaires humaines différenciées en cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien avant transplantation (Lu *et al.* 2009). Des essais cliniques utilisant cette approche sont actuellement en cours de réalisation chez des patients atteints de DMLA.

STRATÉGIES DE RÉHABILITATION

Le principe général des stratégies de réhabilitation réside dans le remplacement des photorécepteurs absents par un dispositif capable d'une part, de transformer les signaux lumineux en signaux électriques et d'autre part, de transmettre ces derniers au système visuel résiduel. La plupart de ces stratégies s'appuient sur la persistance d'une rétine résiduelle après la perte des photorécepteurs, même si les neurones de la rétine interne (cellules bipolaires et cellules ganglionnaires) entrent dans un processus secondaire de dégénérescence chez les modèles animaux (Marc *et al.* 2003 ; Kolomiets *et al.* 2010) comme chez l'homme (Humayun *et al.* 1999). Les approches développées dans ce but sont la greffe de neurones rétinien, l'utilisation de neuroprothèses et la thérapie génique optogénétique.

Transplantation visant au remplacement des photorécepteurs

Des essais de remplacement des photorécepteurs par transplantation ont été effectués en utilisant différents types de greffon d'origine rétinienne (Gouras *et al.* 1994 ; Aramant & Seiler, 1995 ; Klassen *et al.* 2004 ; Klassen *et al.* 2008). Chez la souris, les résultats les plus prometteurs ont été obtenus en utilisant des précurseurs post-mitotiques des bâtonnets sélectionnés sur la base de leur expression du marqueur neural *retina leucine zipper* (Nrl) spécifique des bâtonnets. Transplantées dans une rétine dépourvue de photorécepteurs, ces cellules se différencient systématiquement en bâtonnets et forment des connexions synaptiques fonctionnelles avec la rétine résiduelle (MacLaren *et al.* 2006). Cette approche est cependant limitée par le fait qu'il faille sélectionner les cellules du transplant à un stade précis du développement.

Prothèses rétiniennes

Des dispositifs destinés à stimuler la rétine, le nerf optique ou même le cortex visuel sont en cours de développement et certains ont déjà été testés chez des modèles animaux et des patients humains (Lee *et al.* 2000 ; Zrenner 2002 ; Humayun *et al.* 2003 ; Chader *et al.* 2009). Les prothèses rétiniennes peuvent être placées dans l'espace sous-rétinien à l'emplacement des photorécepteurs manquant (implant sous-rétinien ; Zrenner 2002) ou du côté de l'humeur vitrée en face des cellules ganglionnaires

(implant épi-rétinien ; Chader *et al.* 2009). Pour un implant sous-rétinien, les neurones cibles de la stimulation sont les cellules bipolaires, normalement post-synaptiques des photorécepteurs, les signaux transmis par l'implant seront donc traités par la rétine résiduelle avant d'être transmis au cerveau par le nerf optique. À l'inverse, un implant épi-rétinien, s'il présente l'avantage d'être moins invasif, fonctionne en stimulant directement les cellules ganglionnaires, l'information transmise nécessitera donc un codage dont les modalités sont cours de caractérisation. D'autres aspects essentiels de ces prothèses sont ceux de leur géométrie (Sommerhalder *et al.* 2004) et de leur biocompatibilité. Des études sont actuellement en cours chez l'animal pour évaluer l'effet des stimulations électriques sur le réseau neuronal *in vivo* et *in vitro* (Stett *et al.* 2000 ; Salzmann *et al.* 2006 ; Kolomiets *et al.* 2010).

Thérapie génique optogénétique

Contrairement à une transplantation ou à l'insertion d'une prothèse qui consistent à remplacer les photorécepteurs absents par un élément exogène, la thérapie optogénétique vise à réintroduire une photosensibilité biologique dans le réseau résiduel. Cette approche présente comme avantages d'être nettement moins invasive et de limiter les risques liés aux rejets et à la biocompatibilité. Cette stratégie est permise par l'existence de protéines issues de bactéries ou d'algues et capables de générer des courants membranaires de manière photodépendante. Parmi celles-ci se trouvent la channelrhodopsin-2 (ChR2), un canal cationique photodépendant provenant de l'algue verte *Chlamydomonas reinhardtii*, et l'halorhodopsine de *Natronomas pharaonis* (NpHR), une pompe à ion chlorure photodépendante (**figure 2A**). Alors que dans les photorécepteurs de vertébrés, la transformation de la lumière en signal électrique est due à la phototransduction, une cascade d'évènements enzymatiques faisant intervenir de nombreuses protéines, les protéines ChR2 et NpHR combinent les fonctions de photodétection et de transport membranaire des ions. L'insertion d'un transgène codant une de ces protéines dans un neurone doit donc lui conférer une photosensibilité. Plus précisément, des neurones exprimant ChR2 ou NpHR seront respectivement dépolarisés et hyperpolarisés par une stimulation lumineuse. Une limite de cette technique est qu'elle nécessite un ciblage précis de l'expression du transgène (**figure 2B**) ; ceci est notamment dû à l'existence en aval des photorécepteurs de deux systèmes visuels parallèles : les voies ON et OFF qui répondent respectivement à une incrémentation et une décrémentation de l'illumination. Chacune de ces voies possède ses propres cellules bipolaires et ganglionnaires et leur activation simultanée générerait des signaux non interprétables par le cerveau.

La première application de l'optogénétique à la rétine a consisté à faire exprimer ChR2 par l'ensemble des cellules ganglionnaires d'une souris *rd1* (Bi *et al.* 2006). Il a ensuite été démontré que malgré l'absence de photorécepteurs, ces rétines modifiées étaient capables de générer des signaux visuels et que ceux-ci étaient transmis au cortex visuel.

COMMUNICATION

Cependant, ChR2 était exprimée indistinctement par les cellules ganglionnaires ON et OFF et aucun comportement visuel n'a pu être constaté sur les souris. Par la suite et toujours chez la souris *rd1*, une expression de ChR2 restreinte aux cellules bipolaires ON a été réalisée en utilisant un promoteur spécifique de ces cellules (*figure 2C* ; Lagali *et al.* 2008). Cette fois-ci, un rétablissement de la fonction visuelle a pu être démontré par des tests optomoteurs à un stade où tous les photorécepteurs sont dégénérés ou non fonctionnels. Cependant, l'impossibilité de produire un vecteur viral capable de transfecter ces cellules n'a pas permis le transfert clinique de cette approche (Fradot *et al.* 2010). La présence de nombreux photorécepteurs à cône non fonctionnels chez les patients aveugles atteints de rétinopathies pigmentaires (Li *et al.* 1995) a suggéré l'idée de réactiver ces cellules dites « dormantes » (*figure 2D*; Busskamp *et al.* 2010). Les photorécepteurs étant normalement hyperpolarisés par la lumière, c'est la protéine NpHR qui a été introduite chez la souris *rd1* à un stade où subsistent des cônes non fonctionnels (Busskamp *et al.* 2010). Les tests optomoteurs réalisés par la suite ont montré un rétablissement de la fonction visuelle démontrant le succès de cette approche. Cette technique a aussi été appliquée sur du tissu rétinien humain *ex vivo*, montrant que l'expression de NpHR pouvait aussi induire des photocourants dans des photorécepteurs humains incapables de

phototransduction, première étape dans une translation du traitement vers les patients humains (Busskamp *et al.* 2010). Par rapport aux approches visant les neurones de la rétine interne, celle-ci présente l'avantage de se conformer à la physiologie de la rétine et de réactiver correctement les voies ON et OFF du système visuel.

CONCLUSIONS

Si la multitude des stratégies de neuroprotection déjà disponibles ou en cours de développement pronostique des possibilités de traitement pour l'ensemble des maladies rétinienues associées à une dégénérescence des photorécepteurs, leur application restera dépendante d'un pronostic précoce de la maladie. Les stratégies de réhabilitation pourront être appliquées aux phases les plus tardives de la dégénérescence mais ne permettent pas, pour l'instant, de restaurer une vision chromatique et l'acuité visuelle d'origine. Les améliorations futures résident notamment dans la mise au point de prothèses avec des matrices comportant un nombre croissant de pixels et dans la réalisation de greffe préparée à partir de précurseurs des photorécepteurs notamment à cône. L'ensemble de ces travaux porte de grand espoir dans l'apparition de nouveaux traitements dans la prochaine décennie et pour tous les stades de la maladie.

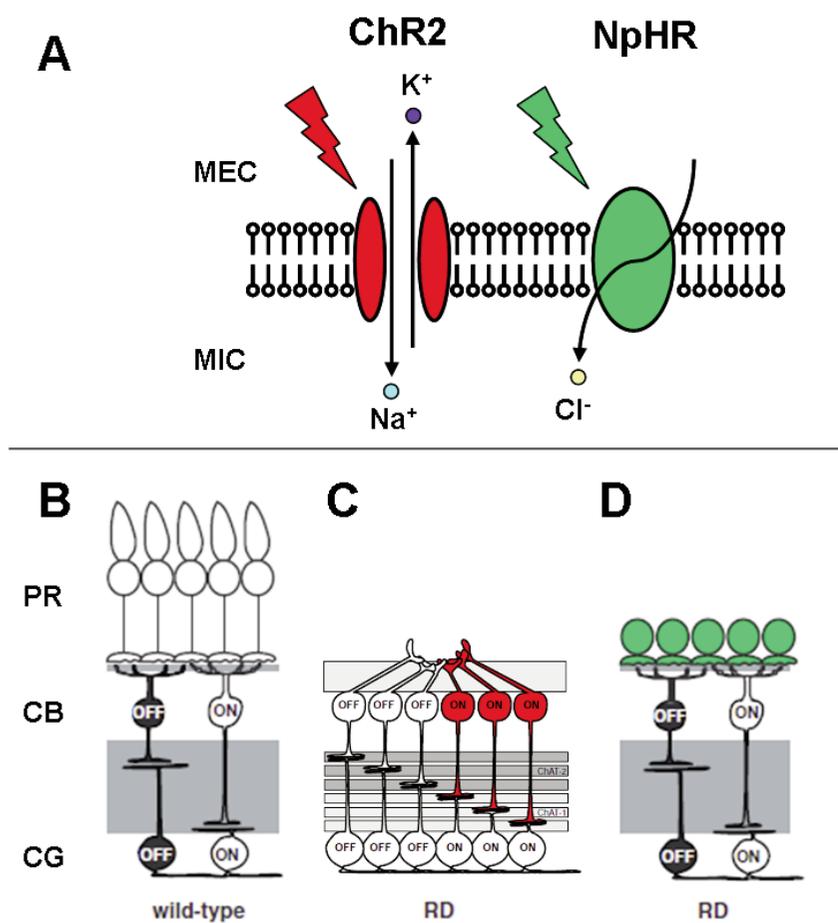


Figure 2 : La thérapie optogénétique.

A : Représentation des protéines channel-rhodopsine 2 (ChR2) et halorhodopsine (NpHR). La protéine ChR2 est un canal ionique photoactivable par la lumière bleue et son ouverture permet une diffusion passive des cations (K^+ et Na^+). La protéine NpHR est une pompe photoactivable et son fonctionnement entraîne un transport actif d'ions Cl^- du milieu extracellulaire (MEC) vers le milieu intracellulaire (MIC).

B : Schéma illustrant les différentes couches de la rétine (PR : photorécepteurs, CB : cellules bipolaires, CG : cellules ganglionnaires).

C : Schéma illustrant la thérapie optogénétique ciblant l'expression de ChR2 dans les cellules bipolaires de type ON. L'ouverture de ChR2 par la lumière dépolarise ces cellules.

D : Schéma illustrant la thérapie optogénétique ciblant l'expression de NpHR dans les photorécepteurs à cône dormants (plus de segment externe et donc plus de cascade de phototransduction). L'activation de NpHR par la lumière hyperpolarise à nouveau ces photorécepteurs dormants (d'après Lagali *et al.* 2008 et Busskamp *et al.* 2010).

REMERCIEMENTS

Nos travaux ont été réalisés grâce au soutien financier de la Fondation Roland Bailly (Geneva, Switzerland), la Fondation pour la Recherche Médicale (Paris, France), l'Agence Nationale pour la Recherche (ANR MEDINAS, ANR RETINE), la Ville de Paris, le Conseil régional de l'Ile-de-France et la Communauté européenne (contrat RETICIRC n° HEALTH-F2-2009-223 156, DREAMS n° NMP 033345 et contrat TREATRUSH n° HEALTH-F2-2010-242013).

BIBLIOGRAPHIE

- Acland, G.M., Aguirre, G.D., Ray, J., Zhang, Q., Aleman, T.S., Cideciyan, A.V., Pearce-Kelling, S.E., Anand, V., Zeng, Y., Maguire, A.M. et al. 2001. Gene therapy restores vision in a canine model of childhood blindness. *Nat Genet.* 28(1): 92–95.
- Ahmad, I. 2001. Stem cells: new opportunities to treat eye diseases. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 42(12): 2743–2748.
- Alexander, J.J., Umino, Y., Everhart, D., Chang, B., Min, S.H., Li, Q., Timmers, A.M., Hawes, N.L., Pang, J.J., Barlow, R.B. et al. 2007. Restoration of cone vision in a mouse model of achromatopsia. *Nat Med.* 13(6): 685–687.
- Aramant, R.B., Seiler, M.J. 1995. Fiber and synaptic connections between embryonic retinal transplants and host retina. *Exp Neurol.* 133(2): 244–255.
- Bainbridge, J.W., Smith, A.J., Barker, S.S., Robbie, S., Henderson, R., Balaggan, K., Viswanathan, A., Holder, G.E., Stockman, A., Tyler, N. et al. 2008. Effect of gene therapy on visual function in Leber's congenital amaurosis. *N Engl J Med.* 358(21): 2231–2239.
- Barbehenn, E., Gagnon, C., Noelker, D., Aguirre, G., Chader, G. 1988. Inherited rod-cone dysplasia: abnormal distribution of cyclic GMP in visual cells of affected Irish setters. *Exp Eye Res.* 46(2): 149–159.
- Bi, A., Cui, J., Ma, Y.P., Olshevskaya, E., Pu, M., Dizhoor, A.M., Pan, Z.H. 2006. Ectopic expression of a microbial-type rhodopsin restores visual responses in mice with photoreceptor degeneration. *Neuron* 50(1): 23–33.
- Bonnet, C., Kaltimbacher, V., Ellouze, S., Augustin, S., Benit, P., Forster, V., Rustin, P., Sahel, J.A., Corral-Debrinski, M. 2007. Allotopic mRNA localization to the mitochondrial surface rescues respiratory chain defects in fibroblasts harboring mitochondrial DNA mutations affecting complex I or v subunits. *Rejuvenation Res.* 10(2): 127–144.
- Buchholz, D.E., Hikita, S.T., Rowland, T.J., Friedrich, A.M., Hinman, C.R., Johnson, L.V., Clegg, D.O. 2009. Derivation of functional retinal pigmented epithelium from induced pluripotent stem cells. *Stem Cells* 27(10): 2427–2434.
- Bush, R.A., Kononen, L., Machida, S., Sieving, P.A. 2000. The effect of calcium channel blocker diltiazem on photoreceptor degeneration in the rhodopsin Pro213His rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 41(9): 2697–2701.
- Busskamp, V., Duebel, J., Balya, D., Fradot, M., Viney, T.J., Siebert, S., Groner, A.C., Cabuy, E., Forster, V., Seeliger, M. et al. 2010. Genetic reactivation of cone photoreceptors restores visual responses in retinitis pigmentosa. *Science* 329 (5990): 413–417.
- Campochiaro, P.A. 2007. Molecular targets for retinal vascular diseases. *J Cell Physiol.* 210(3): 575–581.
- Canola, K., Angénioux, B., Tekaya, M., Quiambao, A., Naash, M.I., Munier, F.L., Schorderet, D.F., Arsenijevic, Y. 2007. Retinal stem cells transplanted into models of late stages of retinitis pigmentosa preferentially adopt a glial or a retinal ganglion cell fate. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 48(1): 446–454.
- Cayouette, M., Gravel, C. 1997. Adenovirus-mediated gene transfer of ciliary neurotrophic factor can prevent photoreceptor degeneration in the retinal degeneration (rd) mouse. *Hum Gene Ther.* 8(4): 423–430.
- Cayouette, M., Behn, D., Sendtner, M., Lachapelle, P., Gravel, C. 1998. Intraocular gene transfer of ciliary neurotrophic factor prevents death and increases responsiveness of rod photoreceptors in the retinal degeneration slow mouse. *J Neurosci.* 18(22): 9282–9293.
- Chader, G.J., Weiland, J., Humayun, M.S. 2009. Artificial vision: needs, functioning, and testing of a retinal electronic prosthesis. *Prog Brain Res.* 175: 317–332.
- Cideciyan, A.V., Hauswirth, W.W., Aleman, T.S., Kaushal, S., Schwartz, S.B., Boye, S.L., Windsor, E.A., Conlon, T.J., Sumaroka, A., Pang, J.J. et al. 2009. Human RPE65 gene therapy for Leber congenital amaurosis: persistence of early visual improvements and safety at 1 year. *Hum Gene Ther.* 20(9): 999–1004.
- Cronin, T., Raffelsberger, W., Lee-Rivera, I., Jaillard, C., Niepon, M.L., Kinzel, B., Clérin, E., Petrosian, A., Picaud, S., Poch, O. et al. 2010. The disruption of the rod-derived cone viability gene leads to photoreceptor dysfunction and susceptibility to oxidative stress. *Cell Death Differ.* 17(7): 1199–1210.
- Donovan, M., Cotter, T.G. 2002. Caspase-independent photoreceptor apoptosis *in vivo* and differential expression of apoptotic protease activating factor-1 and caspase-3 during retinal development. *Cell Death Differ.* 9(11): 1220–1231.
- Ellouze, S., Augustin, S., Bouaita, A., Bonnet, C., Simonutti, M., Forster, V., Picaud, S., Sahel, J.A., Corral-Debrinski, M. 2008. Optimized allotopic expression of the human mitochondrial ND4 prevents blindness in a rat model of mitochondrial dysfunction. *Am J Hum Genet.* 83(3): 373–387.
- Faktorovich, E.G., Steinberg, R.H., Yasumura, D., Matthes, M.T., LaVail, M.M. 1990. Photoreceptor degeneration in inherited retinal dystrophy delayed by basic fibroblast growth factor. *Nature* 347(6288): 83–86.
- Farber, D.B., Lolley, R.N. 1974. Cyclic guanosine monophosphate: elevation in degenerating photoreceptor cells of the C3H mouse retina. *Science* 186(4162): 449–451.
- Farber, D.B., Flannery, J.G., Bird, A.C., Shuster, T., Bok, D. 1987. Histopathological and biochemical studies on donor eyes affected with retinitis pigmentosa. *Prog Clin Biol Res.* 247: 53–67.
- Fintz, A.C., Audo, I., Hicks, D., Mohand-Said, S., Lèveillard, T., Sahel, J. 2003. Partial characterization of retina-derived cone neuroprotection in two culture models of photoreceptor degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 44(2): 818–825.
- Frasson, M., Sahel, J.A., Fabre, M., Simonutti, M., Dreyfus, H., Picaud, S. 1999. Retinitis pigmentosa: rod photoreceptor rescue by a

COMMUNICATION

- calcium-channel blocker in the rd mouse. *Nat Med*. 5(10): 1183-1187.
- Fradot, M., Picaud, S., Fradot, V., Lèveillard, T., Sahel, J.A., Roska, B., Busskamp V., Cronin, T., Bennett, J. 2010. Gene therapy in ophthalmology: validation on cultured retinal cells and explants from post-mortem human eyes. *Hum Gene Ther*. Epub.
 - Gouras, P., Du, J., Kjeldbye, H., Yamamoto, S., Zack, D.J. 1994. Long-term photoreceptor transplants in dystrophic and normal mouse retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 35(8): 3145-3153.
 - Hanein, S., Perrault, I., Gerber, S., Dollfus, H., Dufier, J.L., Feingold, J., Munnich, A., Bhattacharya, S., Kaplan, J., Sahel, J.A. *et al.* 2006. Disease-associated variants of the rod-derived cone viability factor (RdCVF) in Leber congenital amaurosis. Rod-derived cone viability variants in LCA. *Adv Exp Med Biol*. 572: 9-14.
 - Hauswirth, W.W., Aleman, T.S., Kaushal, S., Cideciyan, A.V., Schwartz, S.B., Wang, L., Conlon, T.J., Boye, S.L., Flotte, T.R., Byrne, B.J. *et al.* 2008. Treatment of leber congenital amaurosis due to RPE65 mutations by ocular subretinal injection of adeno-associated virus gene vector: short-term results of a phase I trial. *Hum Gene Ther*. 19(10): 979-990.
 - Huang, S.P., Lin, P.K., Liu, J.H., Khor, C.N., Lee, Y.J. 2004. Intraocular gene transfer of ciliary neurotrophic factor rescues photoreceptor degeneration in RCS rats. *J Biomed Sci*. 11(1): 37-48.
 - Humayun, M.S., Prince, M., de Juan, E. Jr., Barron, Y., Moskowitz, M., Klock, I.B., Milam, A.H. 1999. Morphometric analysis of the extramacular retina from postmortem eyes with retinitis pigmentosa. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 40(1): 143-148.
 - Humayun, M.S., Weiland, J.D., Fujii, G.Y., Greenberg, R., Williamson, R., Little, J., Mech, B., Cimmarusti, V., Van Boemel, G., Dagnelie, G. *et al.* 2003. Visual perception in a blind subject with a chronic microelectronic retinal prosthesis. *Vision Res*. 43(24): 2573-2581.
 - Klassen, H.J., Ng, T.F., Kurimoto, Y., Kirov, I., Shatos, M., Coffey, P., Young, M.J. 2004. Multipotent retinal progenitors express developmental markers, differentiate into retinal neurons, and preserve light-mediated behavior. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 45(11): 4167-4173.
 - Klassen, H., Warfvinge, K., Schwartz, P. H., Kiilgaard, J.F., Shamie, N., Jiang, C., Samuel, M., Scherfig, E., Prather, R.S., Young, M.J. 2008. Isolation of progenitor cells from GFP-transgenic pigs and transplantation to the retina of allorecipients. *Cloning Stem Cells* 10(3): 391-402.
 - Koch, K.W., Kaupp, U.B. 1985. Cyclic GMP directly regulates a cation conductance in membranes of bovine rods by a cooperative mechanism. *J Biol Chem*. 260(11): 6788-6800.
 - Kolomiets, B., Dubus, E., Simonutti, M., Rosolen, S., Sahel, J.A., Picaud, S. 2010. Late histological and functional changes in the P23H rat retina after photoreceptor loss. *Neurobiol Dis*. 38(1): 47-58.
 - Kommonen, B., Kylma, T., Cohen, R.J., Penn, J.S., Paulin, L., Hurwitz, M., Hurwitz, R.L. 1996. Elevation of cGMP with normal expression and activity of rod cGMP-PDE in photoreceptor degenerate labrador retrievers. *Ophthalmic Res*. 28(1): 19-28.
 - Lagali, P.S., Balya, D., Awatramani, G.B., Münch, T.A., Kim, D.S., Busskamp, V., Cepko, C.L., Roska, B. 2008. Light-activated channels targeted to ON bipolar cells restore visual function in retinal degeneration. *Nat Neurosci*. 11(6): 667-675.
 - Lai, C.C., Wu, W.C., Chen, S.L., Xiao, X., Tsai, T.C., Huan, S.J., Chen, T.L., Tsai, R.J., Tsao, Y.P. 2001. Suppression of choroidal neovascularization by adeno-associated virus vector expressing angiostatin. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 42(10): 2401-2407.
 - Lai, C.M., Shen, W.Y., Brankov, M., Lai, Y.K., Barnett, N.L., Lee, S.Y., Yeo, I.Y., Mathur, R., Ho, J.E., Pineda, P. *et al.* 2005. Long-term evaluation of AAV-mediated sFlt-1 gene therapy for ocular neovascularization in mice and monkeys. *Mol Ther*. 12(4): 659-668.
 - Lai, C.M., Estcourt, M.J., Wikstrom, M., Himbeck, R.P., Barnett, N.L., Brankov, M., Tee, L.B., Dunlop, S.A., Degli-Esposti, M.A., Rakoczy, E.P. 2009. rAAV.sFlt-1 gene therapy achieves lasting reversal of retinal neovascularization in the absence of a strong immune response to the viral vector. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 50(9): 4279-4287.
 - Lai, Y.K., Shen, W.Y., Brankov, M., Lai, C.M., Constable, I.J., Rakoczy, P.E. 2002. Potential long-term inhibition of ocular neovascularization by recombinant adeno-associated virus-mediated secretion gene therapy. *Gene Ther*. 9(12): 804-813.
 - Lamba, D.A., McUsic, A., Hirata, R.K., Wang, P.R., Russell, D., Reh, T.A. 2010. Generation, purification and transplantation of photoreceptors derived from human induced pluripotent stem cells. *PLoS One* 5(1): e8763.
 - Lavail, M.M., Li, L., Turner, J.E., Yasumura, D. 1992. Retinal pigment epithelial cell transplantation in RCS rats: normal metabolism in rescued photoreceptors. *Exp Eye Res*. 55(4): 555-562.
 - Lau, D., McGee, L.H., Zhou, S., Rendahl, K.G., Manning, W.C., Escobedo, J.A., Flannery, J.G. 2000. Retinal degeneration is slowed in transgenic rats by AAV-mediated delivery of FGF-2. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 41(11): 3622-3633.
 - Lee, H.W., Hong, S.B., Seo, D.W., Tae, W.S., Hong, S.C. 2000. Mapping of functional organization in human visual cortex: electrical cortical stimulation. *Neurology* 54(4): 849-854.
 - Lèveillard, T., Mohand-Said, S., Lorentz, O., Hicks, D., Fintz, A.C., Clérin, E., Simonutti, M., Forster, V., Cavusoglu, N., Chalmel, F. *et al.* 2004. Identification and characterization of rod-derived cone viability factor. *Nat Genet*. 36(7): 755-759.
 - Li, Z.Y., Kljavin, I.J., Milam, A.H. 1995. Rod photoreceptor neurite sprouting in retinitis pigmentosa. *J Neurosci*. 15(8): 5429-5438.
 - Liang, F.Q., Aleman, T.S., Dejneka, N.S., Dudus, L., Fisher, K.J., Maguire, A.M., Jacobson, S.G., Bennett, J. 2001. Long-term protection of retinal structure but not function using RAAV.CNTF in animal models of retinitis pigmentosa. *Mol Ther*. 4(5): 461-472.
 - Lu, B., Malcuit, C., Wang, S., Girman, S., Francis, P., Lemieux, L., Lanza, R., Lund, R. 2009. Long-term safety and function of RPE from human embryonic stem cells in preclinical models of macular degeneration. *Stem Cells* 27(9): 2126-2135.
 - MacLaren, R.E., Pearson, R.A., MacNeil, A., Douglas, R.H., Salt, T.E., Akimoto, M., Swaroop, A., Sowden, J.C., Ali, R.R. 2006. Retinal repair by transplantation of photoreceptor precursors. *Nature* 444(7116): 203-207.
 - Maguire, A.M., Simonelli, F., Pierce, E.A., Pugh, E.N. Jr., Mingozzi, F., Bencicelli, J., Banfi, S., Marshall, K.A., Testa, F., Surace, E.M. 2008. Safety and efficacy of gene transfer for Leber's congenital amaurosis. *N Engl J Med*. 358(21): 2240-2248.
 - Maguire, A.M., High, K.A., Auricchio, A., Wright, J.F., Pierce, E.A., Testa, F., Mingozzi, F., Bencicelli, J.L., Ying, G.S., Rossi, S. *et al.* 2009. Age-dependent effects of RPE65 gene therapy for Leber's congenital amaurosis: a phase 1 dose-escalation trial. *Lancet*, 374 (9701): 1597-1605.
 - Marc, R.E., Jones, B.W., Watt, C.B., Strettoi, E. 2003. Neural remodeling in retinal degeneration. *Prog Retin Eye Res*. 22(5): 607-655.
 - McGill, T.J., Prusky, G.T., Douglas, R.M., Yasumura, D., Matthes, M.T., Nune, G., Donohue-Rolfe, K., Yang, H., Niculescu, D., Hauswirth, W.W. 2007. Intraocular CNTF reduces vision in normal rats in a dose-dependent manner. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 48(12): 5756-5766.
 - Mohand-Said, S., Deudon-Combe, A., Hicks, D., Simonutti, M., Forster, V., Fintz, A.C., Lèveillard, T., Dreyfus, H., Sahel, J.A. 1998.

- Normal retina releases a diffusible factor stimulating cone survival in the retinal degeneration mouse. *Proc Natl Acad Sci USA*. 95(14): 8357–8362.
- Mohand-Said, S., Hicks, D., Dreyfus, H., Sahel, J.A. 2000. Selective transplantation of rods delays cone loss in a retinitis pigmentosa model. *Arch Ophthalmol*. 118(6): 807–811.
 - Mori, K., Gehlbach, P., Yamamoto, S., Duh, E., Zack, D.J., Li, Q., Berns, K.I., Raisler, B.J., Hauswirth, W.W., Campochiaro, P.A. 2002. AAV-mediated gene transfer of pigment epithelium-derived factor inhibits choroidal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 43(6): 1994–2000.
 - Ohguro, H., Ogawa, K., Maeda, T., Maruyama, I., Maeda, A., Takano, Y., Nakazawa, M. 2001. Retinal dysfunction in cancer-associated retinopathy is improved by Ca(2+) antagonist administration and dark adaptation. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 42(11): 2589–2595.
 - Pang, J. J., Dai, X., Boye, S.E., Barone, I., Boye, S.L., Mao, S., Everhart, D., Dinculescu, A., Liu, L., Umino, Y. *et al.* 2011. Long-term Retinal Function and Structure Rescue Using Capsid Mutant AAV8 Vector in the rd10 Mouse, a Model of Recessive Retinitis Pigmentosa. *Mol Ther*. 19 (2): 234–242.
 - Pasantes-Morales, H., Quiroz, H., Quesada, O. 2002. Treatment with taurine, diltiazem, and vitamin E retards the progressive visual field reduction in retinitis pigmentosa: a 3-year follow-up study. *Metab Brain Dis*. 17(3): 1831–1897.
 - Pearce-Kelling, S.E., Aleman, T.S., Nickle, A., Laties, A.M., Aguirre, G.D., Jacobson, S.G., Acland, G.M. 2001. Calcium channel blocker D-cis-diltiazem does not slow retinal degeneration in the PDE6B mutant rcd1 canine model of retinitis pigmentosa. *Mol Vis*. 7: 42–47.
 - Perry, J., Du, J., Kjeldbye, H., Gouras, P. 1995. The effects of bFGF on RCS rat eyes. *Curr Eye Res*. 14(7): 585–592.
 - Read, D.S., McCall, M.A., Gregg, R.G. 2002. Absence of voltage-dependent calcium channels delays photoreceptor degeneration in rd mice. *Exp Eye Res*. 75(4): 415–420.
 - Rhee, K.D., Ruiz, A., Duncan, J.L., Hauswirth, W.W., Lavail, M.M., Bok, D., Yang, X.J. 2007. Molecular and cellular alterations induced by sustained expression of ciliary neurotrophic factor in a mouse model of retinitis pigmentosa. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 48(3): 1389–1400.
 - Ryan, S.J. 1982. Subretinal neovascularization. Natural history of an experimental model. *Arch Ophthalmol*. 100(11): 1804–1809.
 - Sahel, J.A., Mohand-Said, S., Léveillard, T., Hicks, D., Picaud, S., Dreyfus, H. 2001. Rod-cone interdependence: implications for therapy of photoreceptor cell diseases. *Prog Brain Res*. 131: 649–661.
 - Salzmann, J., Linderholm, O.P., Guyomard, J.L., Paques, M., Simonutti, M., Lecchi, M., Sommerhalder, J., Dubus, E., Pelizzone, M., Bertrand, D. *et al.* 2006. Subretinal electrode implantation in the P23H rat for chronic stimulations. *Br J Ophthalmol*. 90(9): 1183–1187.
 - Sommerhalder, J., Rappaz, B., de Haller, R., Fornos, A.P., Safran, A.B., Pelizzone, M. 2004. Simulation of artificial vision: II. Eccentric reading of full-page text and the learning of this task. *Vision Res*. 44(14): 1693–1706.
 - Stett, A., Barth, W., Weiss, S., Haemmerle, H., Zrenner, E. 2000. Electrical multisite stimulation of the isolated chicken retina. *Vision Res*. 40(13): 1785–1795.
 - Takano, Y., Ohguro, H., Dezawa, M., Ishikawa, H., Yamazaki, H., Ohguro, I., Mamiya, K., Metoki, T., Ishikawa, F., Nakazawa, M. 2004. Study of drug effects of calcium channel blockers on retinal degeneration of rd mouse. *Biochem Biophys Res Commun*. 313(4): 1015–1022.
 - Tao, W., Wen, R., Goddard, M.B., Sherman, S.D., O'Rourke, P.J., Stabila, P.F., Bell, W.J., Dean, B.J., Kauper, K.A., Budz, V.A. 2002. Encapsulated cell-based delivery of CNTF reduces photoreceptor degeneration in animal models of retinitis pigmentosa. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 43(10): 3292–3298.
 - Vallazza-Deschamps, G., Fuchs, C., Cia, D., Tessier, L.H., Sahel, J.A., Dreyfus, H., Picaud, S. 2005. Diltiazem-induced neuroprotection in glutamate excitotoxicity and ischemic insult of retinal neurons. *Doc Ophthalmol*. 110(1): 25–35.
 - Woodford, B.J., Liu, Y., Fletcher, R.T., Chader, G.J., Farber, D.B., Santos-Anderson, R., Tso, M.O. 1982. Cyclic nucleotide metabolism in inherited retinopathy in collies: a biochemical and histochemical study. *Exp Eye Res*. 34(5): 703–714.
 - Yamazaki, H., Ohguro, H., Maeda, T., Maruyama, I., Takano, Y., Metoki, T., Nakazawa, M., Sawada, H., Dezawa, M. 2002. Preservation of retinal morphology and functions in royal college surgeons rat by nilvadipine, a Ca(2+) antagonist. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 43(4): 919–926.
 - Yang, Y., Mohand-Said, S., Léveillard, T., Fontaine, V., Simonutti, M., Sahel, J.A. 2010. Transplantation of photoreceptor and total neural retina preserves cone function in P23H rhodopsin transgenic rat. *PLoS One*; 5(10): e13469.
 - Zrenner, E. Will retinal implants restore vision? 2002. *Science* 295(5557): 1022–1025.