

Université d'Evry Val d'Essonne



Ecole doctorale Des Génomes Aux Organismes

## THESE

pour l'obtention du grade de

**Docteur de l'université d'Evry Val d'Essonne**

mention

biologie cellulaire et moléculaire

# **Modélisation pathologique de l'amaurose congénitale de Leber fondée sur l'utilisation de cellules souches pluripotentes induites**

**LUSTREMANT Céline**

**Soutenue le 17/12/2012 devant les membres du jury :**

**FISSON Sylvain  
BOHL Delphine  
HAMEL Christian  
PERRAULT Isabelle  
MONVILLE Christelle**

**Président  
Rapporteur  
Rapporteur  
Examineur  
Directeur de thèse**





## *Remerciements*

Je tiens tout d'abord à remercier l'ensemble des membres du jury qui ont bien voulu juger les travaux de ma thèse à savoir, Sylvain Fisson pour en être le président, Delphine Bohl et Christian Hamel pour avoir accepté d'être mes rapporteurs et Isabelle Perrault pour en être l'examineur.

Mes remerciements s'adressent également à Marc Peschanski pour m'avoir permis de réaliser tout d'abord mon stage M1 dans l'équipe « Cardio » puis cette thèse au sein de son institut et à ma directrice de thèse, Christelle Monville, qui a accepté de reprendre le flambeau après le départ de Fabrice, qui a su me remotiver après le changement de sujet survenu en fin de 1<sup>ère</sup> année et qui a accepté ma maternité de 3<sup>ème</sup> année. Entre nous, il y a eu des hauts et des bas, j'ai peu à peu appris à te connaître, à entrer dans ton monde. Tu m'as laissé gérer ce projet en toute autonomie en étant toujours très humaine face aux multiples phases de crises que j'ai pu rencontrer. Tu me permets aujourd'hui de clore, dix ans après le baccalauréat, mon parcours scolaire, enfin !

Parcours fait de rencontres d'enseignants tout à fait exceptionnels qu'il me faut citer : Mme Zhao, sa guitare et ses chansons qui m'a très tôt donné le goût de l'école (maternelle), M Bouillé directeur qui suit toujours mon devenir et qui a su me cadrer (CM2), Mmes Humbert pour ses récitations théâtrales (français, 6<sup>ème</sup>) et Parmentier pour des cours vivants ! (histoire-géo, 3<sup>ème</sup>), M Niemeskern un nounours en or (chimie, 2<sup>nde</sup>), Mme Leite-Lopez et ses « j'te prépare pour l'après bac, le bac tu l'auras ! » (chimie, T), mes profs de l'IUT avec notamment Mrs Bernard, le cardinal, Schontz, le végétal, Lopez, de là haut vous voyez j'y suis arrivée ! et M Vierling pour des TP de chimie, aux pains au chocolat et sucreries, finissants rarement avant 21h30. Enfin mes profs d'IUP Mme Chaudru si gentille et disponible et M Prum, mon père Noël des mathématiques.

Ces années ont également été jalonnées de stages et je remercie particulièrement Jean Bérubé (IUT, Canada) qui m'a fait découvrir la Belle Province et qui m'a orientée vers la bioinformatique ainsi que Vincent Frouin (stage M2 CEA) qui m'a permis d'entrer en contact très pratique avec la bioinfo. Deux univers se rencontraient, tu as été extrêmement patient ! Tu m'as montré que l'info et moi ça pouvait coller, encore merci !

Merci aux enfants « GM03852 » et « GM05300 » dont les parents ont accepté le don de tissus. Travailler sur vos cellules, en obtenir des hiPSCs a été un beau défi.

De sincères remerciements aux différentes personnes croisées lors de cette thèse, qui m'ont permis de m'évader, de respirer et de reprendre confiance dans les moments de doutes :

- ☺ Aux Florence, de l'université, pour la gestion administrative, le bon déroulement des TPs et pour les discussions informelles lors de mon monitorat.
- ☺ A Claire Rochette de l'Ecole de l'ADN pour le DVD, la bonne humeur et l'après-thèse !!

Ⓢ A mon mentor, du Nouveau Chapitre de la Thèse®, Barbara Filler. Qu'aurais-je fais en janvier 2012 si vous n'aviez été là ? Quelles bouffées d'oxygène de vous rencontrer, d'échanger ! Vous m'avez tant appris sur moi ! Dire qu'il a fallu attendre la fin de ma thèse pour que vous croisiez mon chemin. Je ne suis pas prête de vous oublier !

Aux membres de l'équipe :

- Ⓢ Walter et tes « laisse p@ » qui m'ont tant fait sourire, ton petit accent italien va me manquer ;
- Ⓢ Alex, l'oreille fine istémienne, commerciale hors catégorie et tes éclats de rires qui résonnent au loin dans les couloirs :o)
- Ⓢ A Lydie, la discrète, qui a assuré les manips de marquage des photorécepteurs durant mon congé mater.

Au bureau du fond bureau des #+\*/ : Anne-Laure, Manue, Johana, Benji, Benjamin, Benoîte, Caro et Alex. Merci pour la machine à café *what else*, les multiples ravitaillements de gourmandises en tout genre, les Loto® (hélas perdus), les discussions (animées) RERD... votre sympathie, vos râleries et pour tous ces moments de détente qui sont d'une importance capitale. Cette ambiance de bureau, parfois agitée lorsque l'on rédige une thèse ;o) va également me manquer !

Merci à Catherine, Arnaud et Patrice pour les sorties magasins et les commandes de dernières minutes toujours plus urgentes les unes que les autres.

A celles à qui j'ai pu me confier d'avantages, Aurélie, Catherine, Caro, Nelly, Pauline et Véro.

Aux collègues devenues amies :

- Ⓢ Lina, ma chère Louchat pour les soirées/nuits interminables entre filles chez toi à refaire le monde avec des douceurs libanaises
- Ⓢ Lulu, qui même éloignée reste à mes côtés au moins par la pensée !
- Ⓢ Yoyo, ma partenaire du 402, on en a passé des heures à attendre les 91-04... maintenant que tu vis près de chez moi, faut pas qu'on se perde de vue ! surtout que Nini adore tes Mrs Patate ;o)
- Ⓢ Claire, que dire... miss M&M's rencontrée aux ateliers d'arts plastiques de l'université, je t'ai retrouvée à mon arrivée en thèse. Toujours le sourire, la bonne humeur, tu es la gentillesse et la générosité incarnées. Mille mercis ! pour les dépannages de bus, nos discussions et bien plus encore...

Nos chemins professionnels vont s'éloigner mais mon chez moi vous sera toujours ouvert !! Alors n'hésitez pas ! sonnez et entrez ! car je suis vraiment triste de devoir vous quitter.

Enfin, mes poulettes d'IUP, Audrey, Isa, LN et Mhâéva, nos restos mensuels se sont peu à peu espacés, vous me manquez ! Je sais que vous êtes toujours là si besoin, même pour un déménagement sous la pluie :o), j'espère vous rendre un jour la pareille.

**Grâce à vous toutes** les filles je suis allée au bout !



Ma plus grande gratitude pour les membres de ma famille :

- Ⓢ A mes oncles, tantes et cousins pour leur suivi à distance ;
- Ⓢ A mes grands-parents : Pierre, Ginette partie deux mois trop tôt pour me savoir Dr mais qui ailleurs veille sur moi, Italo et Irène : vous avez su rester dans le coup, faut dire qu'avec nos tempêtes et nos joies vous n'avez pas trop eu le choix. Vous m'avez toujours encouragée même si vous saviez que je ne choisissais pas la facilité avec d'abord, un double cursus bio/info, puis une thèse dans un domaine saturé et l'arrivée de Corentin en 2011. Je vais enfin pouvoir me poser... mais toujours pas dans la facilité... ce ne doit pas être dans mon caractère ;o)
- Ⓢ Et tout particulièrement à mes parents et à ma sœur, le meilleur frère qu'il soit :o). Par où commencer... comment s'exprimer... ? La vie n'a pas été un long fleuve tranquille, je vous en ai fait voir de toutes les couleurs. Niveau scolarité, vous m'avez toujours laissée faire ce que je voulais et vous m'avez (sup)portée durant toutes ces années. Vous avez su m'aider à avancer dans les galères et les difficultés. Merci et encore merci car je sais que jamais je ne pourrais vous rendre ce que vous m'avez donné ! Une spéciale dédicace à toi, maman, pour avoir pris le temps de lire, relire et re-relire ce manuscrit, afin d'éliminer un maximum de fautes même si je suis certaine qu'il en restera quelques unes, cachées, par-ci par-là ;o)

Je suis loin de vous tous mais j'espère dès à présent retrouver une activité (plus) normale !

Mes ultimes remerciements s'adressent à Laurent qui a accepté de fonder une famille dans ces conditions particulières. Je sais que passer cette année à mes côtés n'a pas été des plus agréables... je te remercie pour ton calme, ta patience et la gestion du déménagement cet octobre.

Un dernier petit mot pour Corentin, Nini, mon minimoyzz, une première année de vie mouvementée... espérons que les suivantes soient plus calmes. Petit Monsieur, te voir grandir et progresser chaque jour est un privilège et tu as été durant toute cette dernière année, sans le savoir, mon vrai petit moteur !

## *Résumé et mots clés*

L'amaurose congénitale de Leber (ACL) est une maladie génétique touchant la rétine. Les premiers symptômes apparaissent dès les premiers mois de la vie et mènent en quelques années à la cécité. A ce jour, des mutations dans 18 gènes ont été associées à la maladie. Cette hétérogénéité génétique rend difficile l'étude des mécanismes conduisant aux différents symptômes. Les modèles animaux utilisés en laboratoire, notamment les rongeurs, permettent d'étudier certains de ces mécanismes mais présentent des limites liées à l'espèce.

Les cellules souches pluripotentes induites (iPSCs), qui proviennent de la reprogrammation de cellules somatiques issues de patients, constituent un nouvel outil pour étudier une maladie génétique dans un contexte humain naturel. Elles permettent d'obtenir tous les phénotypes cellulaires désirés sans limite quantitative ce qui ouvre la porte à des approches d'analyse à large échelle telle que l'analyse transcriptomique qui vise à explorer de manière systématique la modulation des gènes dans une maladie.

L'objectif de mon projet de recherche a été de développer un modèle cellulaire humain naturellement porteur de l'ACL. Après avoir produit les iPSCs à partir de fibroblastes de patients, mes travaux ont consisté à les différencier en populations cellulaires homogènes et facilement amplifiables, les cellules souches neurales et les cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien.

Ces populations ont servi à mener des analyses transcriptomiques à large échelle qui ont permis d'identifier plusieurs gènes candidats, potentiellement impliqués dans le développement de la pathologie, parmi lesquels *GSTT1* qui pourrait avoir un rôle dans le stress oxydatif.

Mots clés : amaurose congénitale de Leber, cellules souches pluripotentes induites, cellules souches neurales, cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien, analyse transcriptomique.

## *Abstract and key words*

Leber congenital amaurosis (LCA) is a genetic disease affecting the retina. The first symptoms appear in the first months of life and lead in few years to blindness. To date, mutations in 18 genes have been associated with the disease. This genetic heterogeneity makes it difficult to study mechanisms leading to different symptoms. Animal models, including rodents, are used to study some of these mechanisms but have limitations mostly related to the species.

The induced pluripotent stem cells (iPSCs), which are reprogrammed somatic cells of patients, constitute a new tool for studying genetic diseases in a natural human context. They achieve all desired cell phenotypes without quantitative limits which opens the door to large-scale analysis approaches such as transcriptomic analysis that aims to systematically explore the modulation of genes in a disease.

The aim of my research project was to develop a human cell model naturally carries the LCA. After producing the iPSCs from fibroblasts of patients, my work had consisted to differentiate them into homogeneous and easily amplifiable cell populations, neural stem cells and retinal pigment epithelial cells.

These populations have served to conduct large-scale transcriptomic analyzes which have identified several candidate genes potentially involved in the development of the disease, including *GSTT1* which might have a role in oxidative stress.

Key words: Leber congenital amaurosis, induced pluripotent stem cells, neural stem cells, retinal pigment epithelial cells, transcriptomic analysis.



## *Liste des abréviations*

ΔBMPR	dominant-negative BMP receptor
11cRAL	11-cis-rétinal
11cRE	11-cis-rétinyl ester
11cREH	11-cis rétinyl ester hydrolase
11cROL	11-cis-rétinol
5'GMP	5' guanosine monophosphate
A17	cellules amacrines de type 17
A2E	N-rétinyl-N-rétinylidène éthanolamine
AAV	adeno-associated virus
ABCA4	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 4
ABCR	ATP-binding cassette transporter
ACAID	Anterior Chamber-Associated Immune Deviation
ACL	amaurose congénitale de Leber
ADN	acide désoxyribonucléique
ADN	acide désoxyribonucléique
aGSK-3?	active glycogen synthase kinase-3b
AII	cellules amacrines de type II
AIPL1	aryl hydrocarbon receptor interacting protein-like 1
AMDE	absorption-métabolisme-distribution-excrétion
AMPA	amino-3-hydroxy-5-méthylisoazol-4-propionateamino-3-hydroxy-5-méthylisoazol-4-propionate
ANSM	Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé
ARAT	rétinol acyltransférase
ARR1	arrestine
ATP	adénosine-tri-phosphate
AtRAL	tout-trans-rétinal
AtRE	tout-trans-rétinyl ester
AtROL	tout-trans-rétinol
AV	acuité visuelle
Ax	axones
B	bâtonnets
B OFF	cellules bipolaires des cônes OFF
B ON	cellules bipolaires des cônes ON
BB	cellules bipolaires des bâtonnets
BDNF	Brain-Derived Neurotrophic Factor
BEST1	bestrophin 1
BFU	burst forming unit
bHLH	basic helix-loop-helix
BMPs	bone morphogenetic proteins
BPF	bonnes pratiques de fabrication
BPFM	bonnes pratiques de fabrication des médicaments
BPL	bonnes pratiques de laboratoire
C	cônes
CABP4	calcium binding protein 4
CaM	calmodulines
CC	corps ciliaires
CCL5	chemokine (C-C motif) ligand 5
CC-NP	corps ciliaires non pigmentés
CC-P	corps ciliaires pigmentés
CD	capacité de compter ses doigts
cdx2	caudal-type homeobox protein 2
CEP290	centrosomal protein 290kDa

CFU	colony forming unit
CGH	comparative genomic hybridization ou hybridation génomique comparée
CGL	corps géniculés latéraux
CHX10	ceh-10 homeo domain containing homolog (C. elegans)
CMH	complexe majeur d'histocompatibilité
CMV	cytomégalovirus
c-Myc ou Myc	myelocytomatosis oncogene
c-MYC ou MYC	v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)
CNS	système nerveux central
CNV	copy number variations
cônes L	long wavelenghts
cônes M	middle wavelenghts
cônes S	small wavelenghts
CPA	cellules présentatrices d'antigènes
CQ	contrôle qualité
CRALBP	cellular retinal binding protein
CRB1	crumbs homolog 1 (Drosophila)
CRBP	cellular retinol binding protein, type I
CRX	cone-rod homeobox
CS	cellules souches
CSC	cellules souches cancéreuses
CSE	cellules souches embryonnaires
CSEh	cellules souches embryonnaires humaines
CSH	cellules souches hématopoïétiques
CSM	cellules souches mésenchymateuses
CSP	cellules souches pluripotentes
CSPh	cellules souches pluripotentes humaines
dac	dachshund
DC	domaine catalytique
DD	domaine de dimérisation
DEC	domaine extra-cellulaire
DHA	acide gras docosahexaénoïque
DHK	domaine d'homologie kinase
DM1	dystrophie myotonique de type 1
DMD	dystrophie myotonique de Duchenne
DMLA	dégénérescence maculaire liée à l'âge
DP	muscles dilatateurs de pupille
DPI	diagnostic préimplantatoire
Dpp	Decapentaplegic
DTM	domaine trans-membranaire
EBs	embryoid bodies ou corps embryoïdes
EC	embryonal carcinoma cells
ECM	matrice extra-cellulaire
EF	épaisseur fovéale
EFTFs	eye field transcription factors ou facteurs de transcription du territoire présomptif de l'œil
EGF	Epidermal Growth Factor
EGFP	Enhanced Green Fluorescence Protein
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
ELM	membrane limitante externe
EOG	électro-oculogramme
EP	ectoderme primitif
EPI	épiblaste
EPR	épithélium pigmentaire rétinien
ERG	électrorétinogramme

ERO	espèces réactives à l'oxygène
ESC	embryonic stem cells
ETDRS	Early Treatment Diabetic Retinopathy Study
ey	eyeless
eya	eyes absent
eyg	eye gone
EZH2	enhancer of zeste homologue 2
FADH	fibroblastes adultes du derme humain
FAK	kinase d'adhésion focale
FC	fibrose cystique
FDA	Food and Drug Administration ou agence fédérale américaines des produits alimentaires et médicamenteux
FGF	fibroblast growth factors
FGF2	fibroblast growth factor 2
FITC	fluorescein isothiocyanate
FIV	fécondation in vitro
FOXD3	Forkhead box D3
FT	facteurs de transcription
G OFF	cellules Ganglionnaires des cônes OFF
G ON	cellules Ganglionnaires des cônes ON
GA	atrophie gyrée chorio-rétinienne
GABA	acide $\gamma$ -aminobutyrique
Gas6	growth-arrest-specific protein 6
gata6	GATA-binding factor 6
GBB5	G protein beta 5
GC	guanylate cyclases
GC1	guanylate cyclase 1
GCAPs	Ca <sup>2+</sup> binding proteins
GCL	couche de cellules ganglionnaires
GCm	guanylate cyclase membranaire
GCs	guanylate cyclase soluble
GDFs	Growth Differentiation Factors
GDP	guanosine di-phosphate
GK	guanylate kinase
GMP	Good Manufacture Practice
GMPc	Guanosine Mono-Phosphate cyclique
GRK's	protéines G couplées aux récepteurs kinases
Gt	transducines
Gt*	transducines activées
GTP	guanosine tri-phosphate
GUCY2D	guanylate cyclase 2D, membrane (retina -spécific)
H1	cellules horizontales de type 1
HD	maladie ou chorée de Huntington
Hh	hedgehog
hiPSCs	human induced Pluripotent Stem Cells ou cellules souches pluripotentes induites humaines
HLA	Human Leucocyte Antigen
HPRT1	hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1
HT	haute titration
HTS	High Throughput screening ou criblage haut débit
hv	photons ou énergie lumineuse
I	iris
IF	instructions fournisseurs
IGF2	Insulin-like Growth Factor
IL-10	interleukine 10

INL	couche granulaire interne
I-NP	iris non pigmenté
InsP3	inositol 1,4,5-triphosphate
I-P	iris pigmenté
IPL	couche plexiforme interne
iPSCs	induced Pluripotent Stem Cells ou cellules souches pluripotentes induites
IQCB1	IQ motif containing B1
IRBP	interstitial retinal binding protein
ISLET-1	ISL LIM homéobox 1
IVG	interruption volontaire de grossesse
K	koniocellulaires
KCNJ13	potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 13
Klf4 ou KLF4	Krueppel-like factor 4
KSR	Knock-out Serum Replacement
LCA5	Leber congenital amaurosis 5
LIF	Leukemia Inhibitory Factor
LIN28	lin-28 homolog A (C. elegans)
LRAT	lecithin retinol acyltransferase (phosphatidylcholine-retinol O-acyltransferase)
M	magnocellulaires
M CSEh	milieu de culture des cellules souches embryonnaires humaines
M DR	milieu de différenciation rétinienne
M IN	milieu d'induction neurale
MAPK	mitogen activated protein kinase
MCI	masse cellulaire interne
MEFs	Mouse Embryonic Fibroblasts
MerTK	c-mer Tyrosine Kinase
MFG-E8	glycoprotein milk fat globule-EGF 8
mFISH	multiplex Fluorescent In Situ Hybridization ou peinture chromosomique
miARNs	ou miR : micros acides ribonucléiques
MIP2	ou CXCL2 : chemokine (C-X-C motif) ligand 2
MITF	microphthalmia transcription factor
MP	membrane plasmique
MSI1	musashi homolog 1 Drosophila
MT	lobe temporal moyen
MV	microvillosités
MZBs	cellules B de la zone marginale
Nanog / NANOG	Nanog homeobox
NAPDH	nicotinamide adénine nucléotide phosphate
NDPK	nucléoside diphosphate kinase
NEPs	Neuro-Epithelial cells
NFL	couche de fibres nerveuses
NKT	Natural Killer T
NMDA	N-méthyl-D-aspartate
NMNAT1	nicotinamide nucleotide adenylyltransferase 1
NRG1	neuroréguline 1
NRL	neural retina leucine zipper
NSC	Neural Stem Cells ou CS Neurales
OAT	ornithine-δ-transférase
oct3/4 ou OCT4	octamer binding transcription factor 3/4 ou pou5f1/POU5F1 : POU class 5 homeobox 1
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man
ONL	couche granulaire externe
OPL	couche plexiforme externe
Otx2	orthodenticle homolog 2 (Drosophila)



P	parvocellulaires
p53	ou TP53 : tumor protein p53
Pax6	paired box gene 6
PC	pas de changement
PCR1	Polycomb Repressor Complex 1
PCR2	Polycomb Repressor Complex 2
PDE	phosphodiesterases
PDE*	phosphodiesterases activées
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor
PE	épithélium pigmentaire
PEDF	pigment epithelium-derived growth factor
PEM	Paired-End Mapping
Ph	photopique
PI(3)K	phosphatidylinositol-3-OH kinase
PKC	protéine kinase C
PL	perception de la lumière
PLC	phospholipase C
PNS	système nerveux périphérique
pou5f1	POU domain, class 5, transcription factor 1
PRM	progéniteurs rétiniens multipotents
PRPH2	peripherin 2 (retinal degeneration, slow)
PS	phosphatidylsérine
qPCR	quantitative Polymerase Chain Reaction
R	rhodopsine
R banding	Reverse G banding
R&D	recherche et développement
R*	rhodopsine activée
R9AP	regulator of signaling 9 anchor protein
RBP	retinol-binding protein
RCS	Royal College of Surgeons
RD3	retinal degeneration 3
RDH	rétinol déhydrogénases
RDH12	retinol dehydrogenase 12 (all-trans/9-cis/11-cis)
RDH5	déshydrogénase du 11-cis-rétinol
REX1	RNA exonuclease 1
RGS9-1	regulator of G protein Signalling, 9th family member, first splice variant
RHO	rhodopsin
RIR	Rhode-Island Red
RN	rétine neurale
RP	rétinite pigmentaire
RP1	retinis pigmentosa 1 (autosomal dominant)
RP9	retinis pigmentosa 9 (autosomal dominant)
RPE	Retinal Pigment Epithelium
RPE65	retinal pigment epithelium-specific protein 65 kDa
RPGRIP1	retinitis pigmentosa GTPase regulator interacting protein 1
RS	rétine subtemporale
RSN	rétine superonasale
RT	rétine temporale
S1P	sphingosine-1-phosphate
Sc	scotopique
SDIA	Stromal Differentiation Inducing Activity
SE ou OS	segment externe
SEB	segment externe du bâtonnet
SEP	segment externe des photorécepteurs
Sey	small eye

Shh	sonic hedgehog
SI ou IS	segment interne
SMA	Spinal Muscular Atrophy ou atrophie musculaire spinale
SMADs	Small Mothers Against Decapentaplegic
SMD	Stargardt's Macular Dystrophy ou dystrophie maculaire de Strargardt
SNAI2	snail homolog 2 Drosophila
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
so	sine oculis
SOA	service-oriented architecture ou architecture orientée services
SOPs	standard operating procedure ou procédure d'exploitation standard
Sox2 / SOX2	SRY-box containing gene 2 / SRY (sex determining region Y)-box2
SP	sphincters
SPATA7	spermatogenesis associated 7
SSEA3/4	stage-specific embryonic antigens 3/4
STO	fibroblastes de souris SIM résistants à la 6-thioguanine et l'ouabaine
TCR	récepteurs aux cellules T
TE	trophectoderme
TGF $\beta$	Transforming Growth Factor beta
TM	trou maculaire
toy	twin of eyeless
TPO	territoire présomptif de l'oeil
Tra	Tumour Rejection Antigen
TRPM1	type 1 melastatin-related transient receptor potential (TRP)
TTR	transthyretin
Tuj1/TUJ1 ou TUBB3	tubuline beta 3 class III
TULP1	tubby like protein 1
TYRP1	tyrosinase-related protein 1
VEGF	vascular epithelium growth factor
Wg	wingless
Wnt	wingless integration site
X-fragile	syndrome du X-fragile
ZO-1	zona occludens 1 ou TJP1 : tight junction protein 1

# Sommaire

AVANT PROPOS .....	18
<b>I L'ŒIL : STRUCTURE, FONCTION ET DEVELOPPEMENT .....</b>	<b>20</b>
I.1 STRUCTURES.....	22
I.1.1 La sclérotique .....	23
I.1.2 L'uvée .....	23
I.1.3 La rétine .....	24
I.1.3.1 Des capteurs rétinien au nerf optique .....	25
I.1.3.1.1 La rétine neurale.....	25
I.1.3.1.1.1 Premier niveau : les photorécepteurs .....	26
I.1.3.1.1.2 Deuxième niveau : les cellules bipolaires, horizontales et amacrines .....	29
I.1.3.1.1.3 Troisième niveau : les cellules ganglionnaires .....	33
I.1.3.1.1.4 Résumé de la complexité de la RN .....	33
I.1.3.1.2 L'épithélium pigmentaire rétinien .....	35
I.1.3.1.2.1 Fonctions.....	35
I.1.3.1.2.2 La phagocytose.....	36
I.1.3.1.2.3 Le stress oxydatif.....	40
I.1.3.2 De la fovéa à la périphérie .....	41
I.2 FONCTION.....	43
I.2.1 Voies de médiation du signal lumineux.....	43
I.2.1.1 Généralité .....	43
I.2.1.2 Les niveaux scotopique et photopique .....	44
I.2.1.2.1 Le niveau scotopique .....	45
I.2.1.2.2 Le niveau photopique.....	46
I.2.2 La vision.....	48
I.2.2.1 Le courant d'obscurité .....	48
I.2.2.2 La phototransduction .....	49
I.2.2.2.1 Activation .....	49
I.2.2.2.2 Amplification .....	50
I.2.2.2.3 Terminaison.....	51
I.2.2.2.3.1 Inactivation de R*.....	51
I.2.2.2.3.2 Inactivation de G $\alpha^*$ et de PDE* .....	51
I.2.2.2.3.3 Rôle des ions Ca $^{2+}$ .....	52
I.2.2.3 Régénération des photopigments.....	53
I.2.2.3.1 Description du cycle visuel pour les bâtonnets .....	54
I.2.2.3.2 Description du cycle visuel pour les cônes .....	56
I.3 ORIGINE EMBRYONNAIRE.....	58
I.3.1 De l'œuf à l'œil .....	58
I.3.1.1 Embryogénèse .....	58
I.3.1.1.1 La segmentation .....	58
I.3.1.1.2 L'implantation.....	60
I.3.1.1.3 Mise en place du disque tri-dermique .....	61
I.3.1.1.3.1 La gastrulation .....	61
I.3.1.1.3.2 Mise en place de la corde .....	62
I.3.1.1.3.3 La neurulation.....	63
I.3.1.1.4 Délimitation de l'embryon.....	64
I.3.1.1.4.1 Apparition des vésicules optiques et placodes cristalliniennes.....	65
I.3.1.2 Organogénèse.....	66
I.3.1.3 Phase fœtale.....	68
I.3.1.3.1 La cornée .....	69
I.3.1.3.2 Les corps ciliaires et l'iris .....	69
I.3.1.3.3 La rétine.....	70
I.3.1.3.4 Le cristallin.....	72
I.3.1.3.5 Artère hyaloïde et système vasculaire .....	72
I.3.1.3.6 Le nerf optique .....	73
I.3.2 Génétique et voies de signalisation.....	73
I.3.2.1 L'engagement cellulaire au stade morula puis blastocyste.....	73
I.3.2.2 L'engagement neuro-ectodermique .....	76
I.3.2.3 Régionalisations de la plaque neurale et du tube neural .....	78
I.3.2.4 Spécification neuronale de l'œil .....	79

I.3.2.4.1	Le territoire présomptif de l'œil .....	79
I.3.2.4.2	Formation des vésicules optiques .....	83
I.3.2.4.3	Formation de l'EPR et de la RN .....	84

## **II LES CELLULES SOUCHES : OUTILS POUR ETUDIER LE DEVELOPPEMENT RETINIEN ET L'AMAUROSE CONGENITALE DE LEBER..... 88**

II.1	ORIGINE ET DEFINITION DES CELLULES SOUCHES .....	90
II.1.1	Sous-types de cellules souches .....	92
II.1.2	Les cellules souches pluripotentes.....	94
II.1.2.1	Origine.....	94
II.1.2.2	Les cellules souches embryonnaires.....	95
II.1.2.2.1	Obtention .....	95
II.1.2.2.2	Éthique et CSEh .....	97
II.1.2.2.3	Maintien des deux propriétés fondamentales .....	98
II.1.2.2.3.1	Voies de régulation intrinsèques .....	98
II.1.2.2.3.2	Voies de régulation extrinsèques .....	101
II.1.2.2.4	Maintien en condition <i>in vitro</i> .....	103
II.1.2.2.4.1	Culture à l'état indifférencié .....	103
II.1.2.2.4.2	Amplification .....	104
II.1.2.2.4.3	Caractérisation .....	104
II.1.2.2.4.4	Capacités de différenciation .....	106
II.1.2.3	Induction de la pluripotence .....	107
II.1.2.3.1	Le transfert nucléaire somatique.....	107
II.1.2.3.2	La fusion cellulaire.....	110
II.1.2.3.3	La reprogrammation directe .....	111
II.1.2.3.3.1	Obtention .....	111
II.1.2.3.3.2	Espoir .....	112
II.1.2.3.3.3	Limitations .....	113
II.1.2.3.3.4	Facteurs de reprogrammation.....	114
II.1.2.3.3.5	Amélioration des méthodes de transduction.....	114
II.1.2.3.3.6	Origines des cellules somatiques reprogrammables.....	115
II.2	CHAMP D'APPLICATIONS.....	116
II.2.1	L'étude du développement .....	116
II.2.1.1	Généralité .....	116
II.2.1.2	Le développement rétinien.....	117
II.2.1.2.1	Obtention et caractérisation de l'EPR .....	117
II.2.1.2.2	Obtention des photorécepteurs et de l'EPR .....	118
II.2.1.2.3	Obtention des structures des vésicules et coupes optiques .....	120
II.2.2	La thérapie cellulaire .....	123
II.2.2.1	Principe.....	123
II.2.2.2	Utilisation des CSEh.....	124
II.2.2.2.1	Essais chez l'animal .....	124
II.2.2.2.1.1	Transplantation de cellules de l'EPR .....	124
II.2.2.2.1.2	Transplantation de progéniteurs rétiens .....	125
II.2.2.2.2	Essais cliniques menés chez l'Homme.....	125
II.2.2.3	Utilisation des iPSCs.....	129
II.2.2.3.1	Essais chez l'animal .....	129
II.2.2.3.2	Perspective chez l'Homme .....	130
II.2.3	La modélisation pathologique .....	131
II.2.3.1	Principe.....	131
II.2.3.2	Découverte de molécules médicaments .....	132
II.2.3.2.1	Avantages des CSPh .....	134
II.2.3.2.2	Obtention de types cellulaires d'intérêt.....	134
II.2.3.3	Utilisation des CSEh.....	134
II.2.3.3.1	Les CSEh saines génétiquement modifiées.....	134
II.2.3.3.2	Les CSEh naturellement porteuses de mutation .....	135
II.2.3.4	Utilisation des hiPSCs.....	136
II.2.3.4.1	État de l'art .....	136
II.2.3.4.2	Maladies rétinienne .....	139
II.2.3.4.2.1	L'atrophie gyrée chorio-rétinienne .....	139
II.2.3.4.2.2	La rétinite pigmentaire .....	140
II.3	L'AMAUROSE CONGENITALE DE LEBER .....	141
II.3.1	Découverte et description.....	141
II.3.2	Les différentes formes d'ACL.....	142

II.3.3	Mécanismes moléculaires de la maladie.....	145
II.3.3.1	Phototransduction.....	145
II.3.3.2	Cycle de l'acide rétinol.....	147
II.3.4	Modèles animaux.....	148
II.3.4.1	Historique.....	148
II.3.4.2	L'ACL de type 1.....	149
II.3.4.3	L'ACL de type 2.....	149
II.3.4.4	Limites des modèles animaux.....	150
II.3.5	Stratégies thérapeutiques.....	151
II.3.5.1	La thérapie génique.....	151
II.3.5.1.1	Accessibilité de l'œil.....	151
II.3.5.1.2	Immunologie de l'œil.....	151
II.3.5.1.3	L'ACL de type 1.....	152
II.3.5.1.3.1	Études précliniques.....	152
II.3.5.1.4	L'ACL de type 2.....	155
II.3.5.1.4.1	Études précliniques.....	155
II.3.5.1.4.2	Thérapie génique chez l'Homme.....	155
II.3.5.1.5	Succès et limites de la thérapie génique.....	159
II.3.5.2	Thérapies alternatives.....	159
II.3.5.3	La modélisation pathologique.....	160
II.3.5.3.1	Ressources cellulaires.....	160
II.3.5.3.2	Recherche de biomarqueurs.....	160
<b>III</b>	<b>RESULTATS.....</b>	<b>164</b>
III.1	PREAMBULE.....	166
III.1.1	Contexte.....	166
III.1.2	Objectifs.....	167
III.2	PRINCIPAUX RESULTATS OBTENUS.....	168
III.2.1	Recherche de la mutation causale de l'ACL.....	168
III.2.1.1	Fibroblastes naturellement porteurs de l'ACL.....	168
III.2.1.2	Test diagnostique.....	169
III.2.2	Obtention des ressources biologiques.....	169
III.2.2.1	Obtention et caractérisation des hiPSCs.....	169
III.2.2.1.1	Reprogrammation des fibroblastes ACL.....	170
III.2.2.1.2	Émergence des clones.....	170
III.2.2.1.3	Culture d'une population homogène d'hiPSCs.....	171
III.2.2.1.4	Caractérisation des hiPSCs.....	171
III.2.2.2	Obtention et caractérisation des NSC.....	172
III.2.2.2.1	Obtention des NSC.....	172
III.2.2.2.2	Caractérisation des NSC.....	174
III.2.2.3	Obtention et caractérisation des cellules de l'EPR.....	175
III.2.2.3.1	Obtention des cellules de l'EPR.....	175
III.2.2.3.2	Caractérisation des cellules de l'EPR.....	176
III.2.3	Recherche de biomarqueurs.....	178
III.2.3.1.1	Choix des échantillons à analyser.....	178
III.2.3.1.2	Analyse transcriptomique des NSC.....	178
III.2.3.1.3	Analyse transcriptomique des cellules de l'EPR.....	179
III.2.3.1.4	Choix des gènes biomarqueurs candidats.....	179
III.2.3.1.5	Validation des dérégulations issues des analyses transcriptomiques.....	180
III.3	ARTICLE EN COURS DE SOUMISSION.....	183
III.4	CONCLUSION.....	209
III.4.1	Obtention de populations cellulaires naturellement porteuses de l'ACL.....	209
III.4.2	Identification de gènes modulés dans les populations ACL.....	209
<b>IV</b>	<b>DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....</b>	<b>210</b>
IV.1	COMPLEXITE DE LA RECHERCHE SUR L'ACL.....	213
IV.2	RECHERCHE DE LA MUTATION CAUSALE DE L'ACL.....	213
IV.3	METHODOLOGIE DE REPROGRAMMATION DES FIBROBLASTES.....	214
IV.3.1	Amélioration des techniques de reprogrammation.....	214
IV.3.2	Reprogrammation directe des fibroblastes en cellules différenciées.....	215
IV.3.3	Une alternative à la reprogrammation, le génie génétique.....	216
IV.4	CHOIX DES POPULATIONS CELLULAIRES ETUDIEES.....	216

IV.4.1	Les NSC et cellules de l'EPR : types cellulaires pertinents ?.....	216
IV.4.2	Comment générer des photorécepteurs ?.....	217
IV.4.3	Adaptation du protocole de dérivation des cellules souches neurales.....	218
IV.5	LES ANALYSES TRANSCRIPTOMIQUES .....	219
IV.5.1	Nouvelles pistes d'investigations .....	219
IV.5.2	Difficultés de relier les dérégulations géniques observées à un défaut fonctionnel.....	221
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>		<b>224</b>

# Avant propos

L'amaurose congénitale de Leber (ACL) est une maladie génétique touchant la rétine. Les premiers symptômes apparaissent dès la naissance ou dans l'enfance et mènent en quelques années à la cécité. Les enfants atteints présentent, entre autres, une activité électro-rétinographique faible voire nulle, un nystagmus et une difficulté à suivre du regard des objets. Depuis sa description en 1869, une forte hétérogénéité génétique a été mise à jour. A l'heure actuelle de nombreuses mutations ont été identifiées dans 18 gènes associés à la maladie. Cette hétérogénéité rend difficile l'étude des mécanismes moléculaires et cellulaires conduisant aux différents symptômes. Ces mécanismes défectueux sont rencontrés dans les deux processus majeurs qui permettent la vision à savoir la phototransduction et le cycle visuel. Le manque de modèles cellulaires et animaux renforce cette difficulté. La rétine humaine permet à la fois une vision diurne et une vision nocturne car elle contient différents types de photorécepteurs. Ainsi, les modèles animaux utilisés en laboratoire, notamment les rongeurs, permettent d'étudier certains mécanismes mais présentent des limites liées à l'espèce. Enfin, à ce jour, il n'existe pas de traitement curatif de l'ensemble des formes de l'ACL même si les premiers essais de thérapie génique menés chez des patients atteints d'ACL de type 2 ont montré une faible restauration de la fonction visuelle.

Les cellules souches pluripotentes humaines (CSPh) telles que les cellules souches embryonnaires humaines (CSEh) ou les cellules souches pluripotentes induites (iPSCs pour *induced Pluripotent Stem Cells*) qui proviennent de la reprogrammation de cellules somatiques issues de patients, représentent aujourd'hui un réel espoir thérapeutique. Les propriétés fondamentales des CSPh, à savoir l'auto-renouvellement et la pluripotence, permettent de disposer d'une quantité illimitée de types cellulaires d'intérêt, ce qui permet d'envisager le traitement d'une pathologie telle que l'ACL. Par ailleurs, en disposant de CSPh porteuses de mutation, les mécanismes moléculaires pathologiques se mettant en place au cours du développement peuvent être décryptés. On nomme cette approche la modélisation pathologique. La modélisation permet également de développer des criblages à haut débit de molécules potentiellement thérapeutiques qui peuvent avoir une influence sur les mécanismes moléculaires et cellulaires conséquents à la présence de la mutation. Les CSPh permettent à la fois d'évaluer la toxicité de ces molécules *in vitro* et d'étudier les mécanismes d'action de ces molécules en vue d'une application thérapeutique.

Pour les maladies monogéniques, les ressources biologiques humaines font souvent défaut car ces maladies concernent peu de patients et la biopsie des tissus lésés peut être impossible à réaliser notamment dans le cadre de pathologies neurologiques. Ainsi, les CSPh peuvent permettre de pallier aux difficultés d'obtention de ressources biologiques humaines porteuses de pathologies.

C'est dans ce contexte que j'ai intégré I-Stem pour effectuer mes travaux de doctorat portant sur la modélisation pathologique de l'ACL. L'objectif général de mon projet a été de développer un modèle cellulaire humain, naturellement porteur de l'ACL, à partir d'iPSCs provenant de fibroblastes de patients malades. Les CSEh porteuses d'ACL n'existent pas car pour être recherchée dans le cadre d'un diagnostic préimplantatoire, il faut que les deux parents soient atteints par la même mutation causale de l'ACL ce qui est un événement extrêmement rare au vu de l'hétérogénéité génétique de cette pathologie.

La première partie du projet a consisté à produire des iPSCs à partir de fibroblastes de patients pour disposer de cellules souches pluripotentes que nous avons pu différencier en deux populations cellulaires homogènes et facilement amplifiables, les cellules souches neurales (ou NSC pour *Neural Stem Cell*) et les cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien (EPR ou RPE pour *Retinal Pigment Epithelium*). Ces populations ont permis, dans un deuxième temps, de mener une analyse transcriptomique à grande échelle, sans *a priori* (dite « *ressource driven* ») afin d'identifier des gènes potentiellement impliqués dans le développement de la pathologie. L'un d'entre eux, *GSTT1* pourrait être impliqué dans le stress oxydatif (article Lustremant et al, en cours de soumission).

En conclusion, ce projet de thèse m'a offert l'opportunité de pouvoir créer et manipuler un nouveau type de cellules souches pluripotentes, les iPSCs, pour modéliser l'ACL. Cet outil m'a permis d'évaluer tout au long du projet, ses intérêts mais aussi ses limitations pour la modélisation pathologique.



## **L'œil : structure, fonction et développement**



## I.1 Structures

L'œil est l'organe sensoriel récepteur de la vision qui permet à l'Homme de percevoir le monde qui l'environne pour interagir avec lui. L'œil humain (**Figure 1**), situé dans la cavité orbitaire, est composé d'un globe oculaire formé de 3 tuniques :

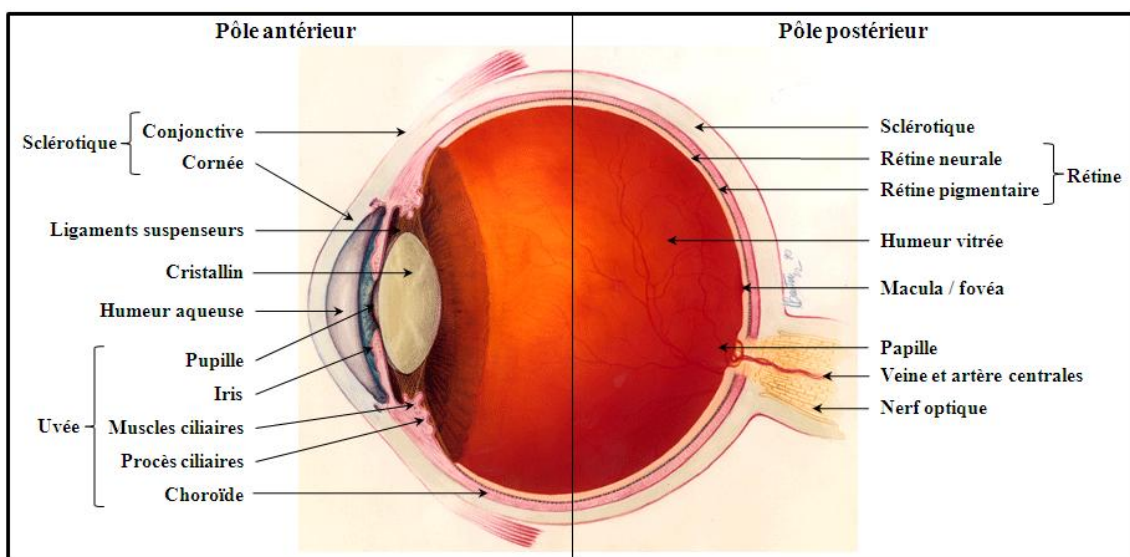
- 1) la tunique externe nommée la sclérotique ;
- 2) la tunique intermédiaire, comprenant la choroïde, le corps ciliaire et l'iris, que l'on appelle l'uvée ;
- 3) la tunique la plus interne, la rétine, qui est la tunique nerveuse et sensorielle.

L'œil contient également une structure particulière nommée le cristallin. Ce dernier est composé, en périphérie, d'un épithélium qui se divise pour donner ses fibres qui sont organisées en couches. Ces fibres ne comportent ni noyau, ni organite. Leur contenu se renouvelle en permanence pour maintenir la transparence. Il constitue la lentille biconvexe de l'œil qui permet son accommodation c'est-à-dire son aptitude à faire la mise au point sur des objets situés à différentes distances dans notre environnement.

Enfin, deux types de fluides séparés par le cristallin permettent à l'œil de maintenir sa forme et d'assurer sa fonction :

- ♦ l'humeur aqueuse est un liquide transparent qui occupe la chambre antérieure de l'œil délimitée à l'avant par la cornée et à l'arrière par le cristallin ;
- ♦ l'humeur vitrée ou corps vitré est une substance gélatineuse qui remplit l'espace compris entre le cristallin et la rétine.

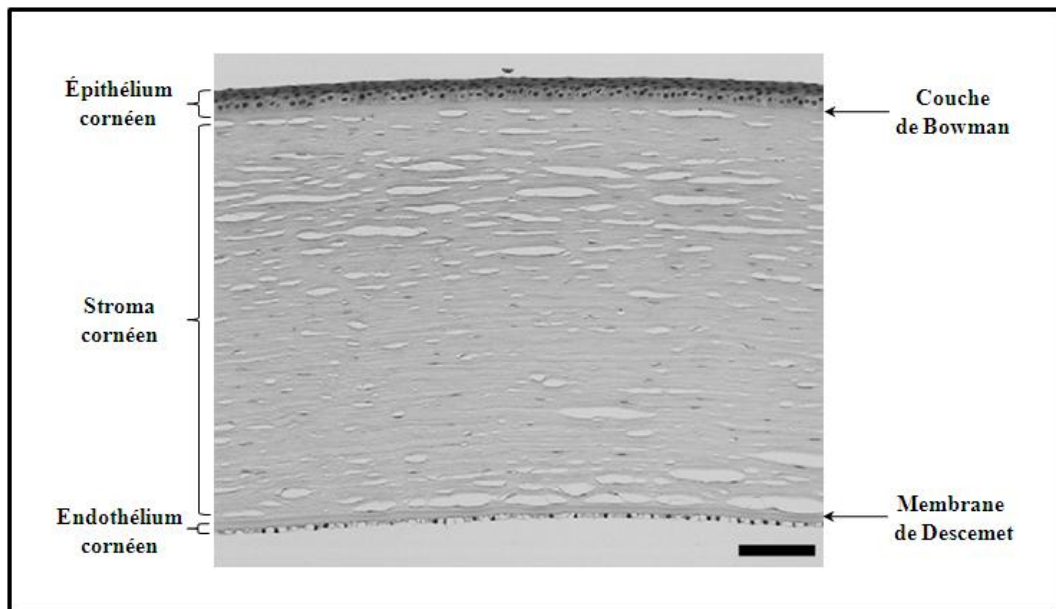
C'est le nerf optique situé à l'arrière de l'œil qui permettra le transfert de l'information visuelle, perçue sous forme de photons, au cerveau (Forrester, 2002).



**Figure 1 :** représentation schématique du globe oculaire de l'être humain. Annoté depuis <http://www.nei.nih.gov/health/eyediagram/eyeimages4.asp>.

### I.1.1 La sclérotique

La sclérotique, qui constitue le blanc de l'œil, est entourée d'une fine membrane, la conjonctive (Marieb and Hoehn, 2010). C'est une couche fibreuse qui protège les différents éléments de l'œil. Du côté antérieur la sclérotique devient la cornée. Cette dernière est elle-même constituée de plusieurs couches cellulaires et de membranes avec, du plus antérieur au postérieur : l'épithélium cornéen, la membrane de Bowman, le stroma, la membrane de Descemet et l'endothélium cornéen (**Figure 2**) (Almubrad and Akhtar, 2011; Archer et al., 1999; Hogan et al., 1971; Jakus, 1956, 1962; Knupp et al., 2009; Maurice, 1957).

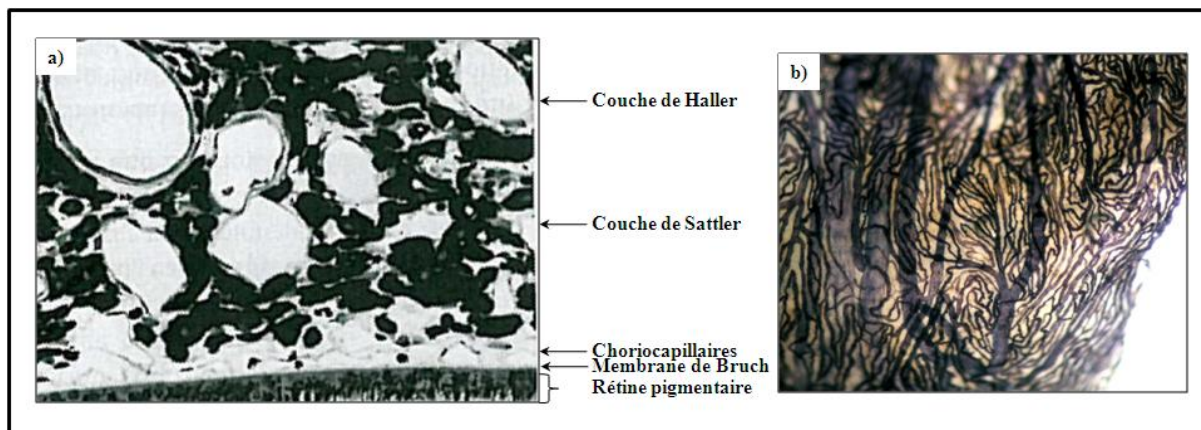


**Figure 2** : section histologique d'une cornée humaine colorée à l'hématoxyline et à l'éosine. Barre d'échelle : 1mm. Modifié de Knupp et al., 2009.

La cornée n'est pas vascularisée pour pouvoir garder toute sa transparence et laisser ainsi passer les photons ( $h\nu$ ) de la lumière à travers la pupille de l'iris située dans l'uvée (Maurice, 1957). Sa nutrition est assurée par l'humeur aqueuse.

### I.1.2 L'uvée

L'uvée est la couche nourricière et vasculaire de l'œil. Elle comprend à l'extérieur la choroïde, qui est une mince couche de tissu conjonctif lâche contenant de nombreux vaisseaux, dont les choriocapillaires (Henkind, 1967; Hogan et al., 1971; McLeod and Luttly, 1994; Nickla and Wallman, 2010), et les nerfs ainsi que des mélanocytes qui empêchent la diffusion de la lumière dans l'œil grâce aux grains de mélanine qu'ils contiennent. Cette couche très vascularisée permet de nourrir et d'oxygéner la rétine à travers la membrane de Bruch (**Figure 3**).



**Figure 3 : différentes représentations de la choroïde.** a) section de résine semi-fine de la rétine externe et de la choroïde de primate non-humain présentant la couche externe pigmentée de la choroïde (couche de Haller) qui contient de gros vaisseaux, la couche pigmentée de Sattler qui contient des vaisseaux sanguins de diamètre intermédiaire, les choriocapillaires qui sont de diamètre encore inférieur et la membrane de Bruch qui est la couche la plus interne en contact avec la rétine pigmentaire. Modifié de Nickla and Wallman, 2010 ; b) choroïde périphérique humaine colorée en pourpre grâce à l'activité phosphatase alcaline endogène révélée par le substrat NBT / BCIP. Les vaisseaux sanguins sont ici clairement visibles en violet/noir. Image du Dr Mullins : <http://webeye.ophth.uiowa.edu/dept/images/mullins/>.

Les corps ciliaires situés à l'avant contiennent les muscles ciliaires. Ces muscles sont reliés au cristallin par des ligaments suspenseurs qui vont permettre de modifier la forme du cristallin en s'étirant et en se rétractant. Les corps ciliaires sécrètent également l'humeur aqueuse par les procès ciliaires qui les constituent.

Enfin, l'iris pourvu de pigments, principalement la mélanine, donne sa couleur à l'œil. C'est une membrane circulaire percée en son centre par la pupille. Les muscles pupillaires permettent de régler l'ouverture et la fermeture de la pupille en fonction de quantité de lumière présente dans l'environnement (Forrester, 2002).

### I.1.3 La rétine

La rétine tapisse la face interne de l'œil. C'est la couche photosensible de l'œil qui permet de détecter la lumière grâce à des éléments récepteurs qui vont la transformer en signaux nerveux qui seront amenés au cerveau par le nerf optique. La répartition des cellules rétinienne varie en fonction de la profondeur et selon l'axe tangentiel (centre, périphérie). La complexité est accentuée par la superposition de cellules morphologiquement et fonctionnellement différentes ainsi que par la diversité des connexions entre ces cellules.

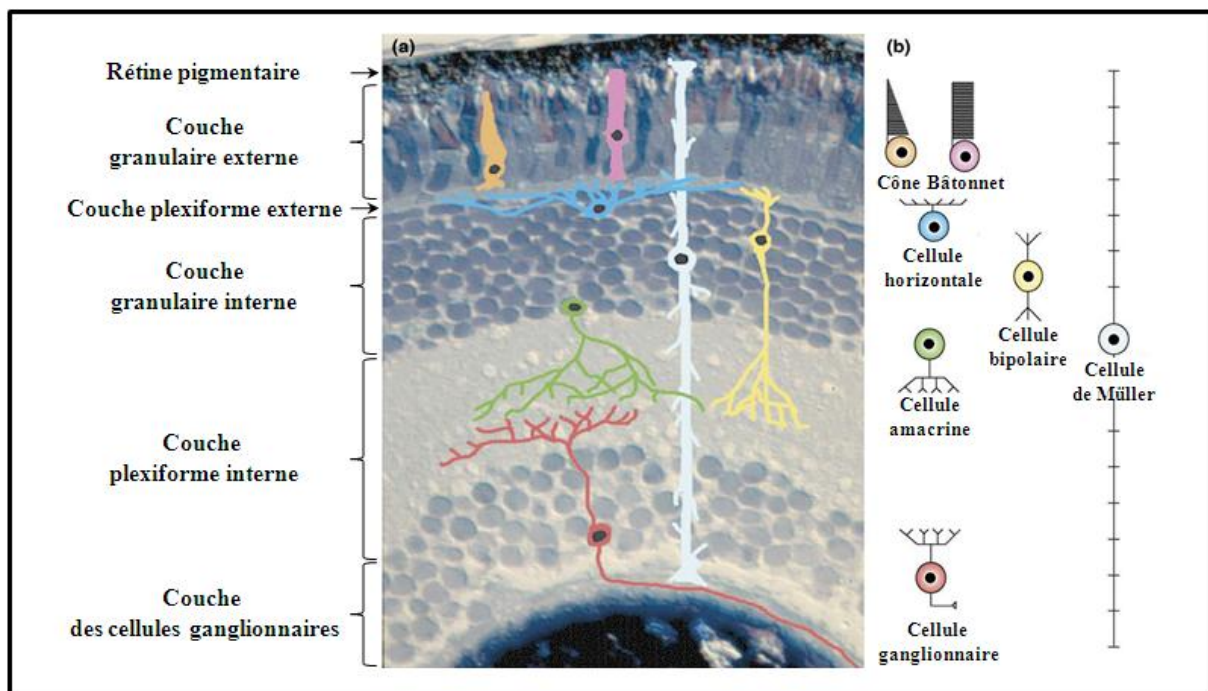
### I.1.3.1 Des capteurs rétiniens au nerf optique

Dans la profondeur, la rétine est une superposition de deux feuillets cellulaires :

- ♦ le feuillet interne nommé rétine neurale (RN) ou neuroépithélium qui sépare le vitré de la deuxième couche ;
- ♦ le feuillet externe appelé rétine pigmentaire ou épithélium pigmentaire rétinien (EPR ou RPE pour *retinal pigment epithelium*) qui sépare la rétine neurale de la choroïde.

#### I.1.3.1.1 La rétine neurale

La RN permet de conduire l'information visuelle au cerveau grâce à une chaîne de six neurones particuliers et de cellules gliales de soutien nommées cellules de Müller. Leurs corps cellulaires sont placés dans trois couches granulaires (ou nucléaires) tandis que les synapses se trouvent dans deux zones synaptiques (**Figure 4**) (Cayouette et al., 2006; Dowling, 1970; Palczewski, 2012; Walls, 1942).

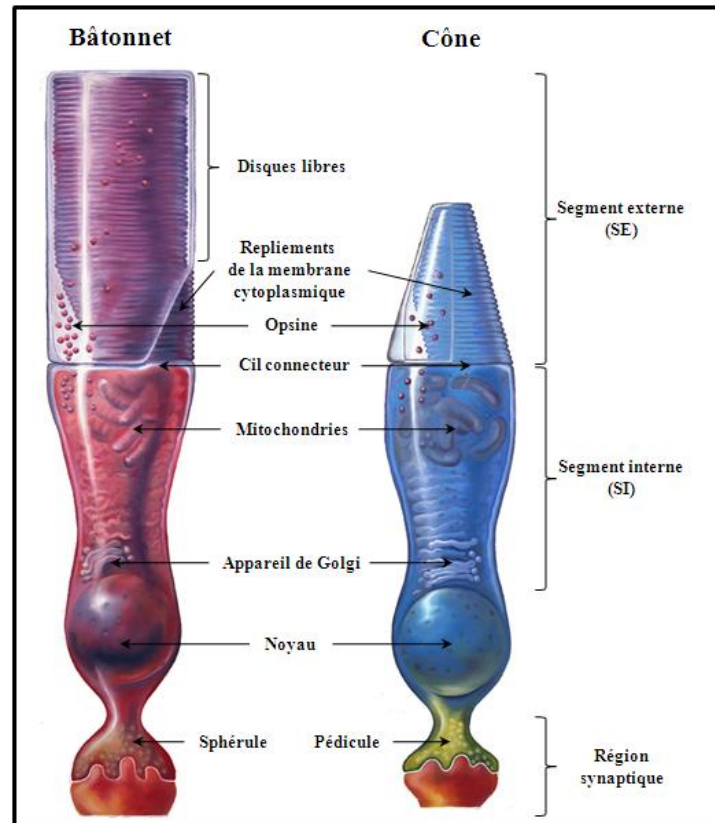


**Figure 4** : représentation schématique de la rétine neurale. a) section transverse d'une rétine de poisson zèbre âgé de 7 jours avec les différentes couches cellulaires décrites par Dowling, 1970 et les principaux types cellulaires surlignés en couleurs ; b) représentation schématique des sept principaux types de cellules rétiniennes, les couleurs utilisées correspondent au a). Modifié de Cayouette et al., 2006.

Chacun de ces types de neurones peut être subdivisé en plusieurs sous groupes selon différents critères tels que les propriétés fonctionnelles, la forme de l'arborisation synaptique (dendrite et axone), le niveau de terminaison de cette arborisation et le type de récepteur aux neurotransmetteurs.

#### I.1.3.1.1.1 **Premier niveau : les photorécepteurs**

Au premier niveau de la RN se trouvent les neurones sensibles à la lumière nommés les photorécepteurs (Walls, 1942). De par leurs caractéristiques morphologiques et fonctionnelles ils ont été classés en deux catégories : les bâtonnets et les cônes (**Figures 5**).



**Figure 5 :** représentation schématique d'un bâtonnet et d'un cône. Annoté depuis [www.martin-missfeldt.com](http://www.martin-missfeldt.com).

Ils partagent cependant les mêmes éléments structuraux (Young, 1971) :

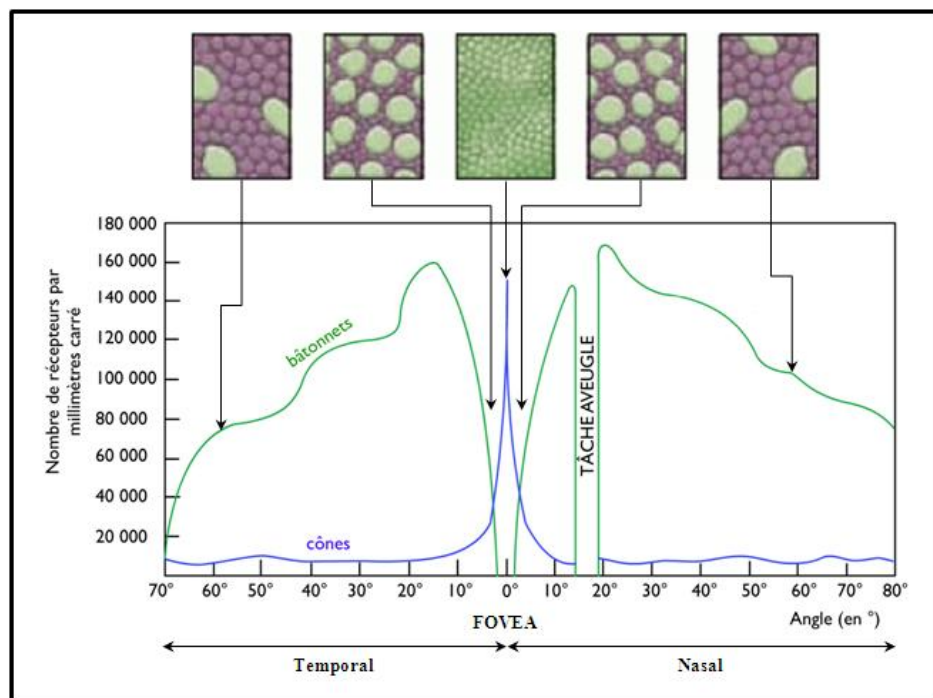
- ♦ leur dendrite, également nommé segment externe (SE) est la partie sensible à la lumière et s'encre dans le pôle apical de l'EPR ;
- ♦ leur corps cellulaire nommé segment interne (SI) se trouve dans la couche granulaire externe. Il est relié au SE par le cil connecteur. Il contient de nombreuses mitochondries et l'appareil de Golgi qui permettent la production d'énergie et la synthèse des protéines ;
- ♦ leur axone est situé à l'extrémité interne du photorécepteur et forme un élargissement qui sera en contact avec les cellules bipolaires et horizontales au niveau de la couche plexiforme externe (De Robertis and Franchi, 1956). Nommé pédicule pour le cône, il est plus large que la sphérule du bâtonnet (Ahnelt, 1998; Ahnelt and Kolb, 2000; Dowling and Boycott, 1966; Kolb, 1970).

La distinction morphologique provient des terminaisons synaptiques à savoir des SE et des axones. Le rôle des photorécepteurs est de permettre la captation puis la conversion du signal lumineux en



signal compréhensible par le système nerveux, c'est la transduction du signal. Les cônes et les bâtonnets diffèrent par la nature du pigment photosensible qu'ils contiennent.

Les bâtonnets sont 20 fois plus nombreux que les cônes (92 millions, Curcio et al., 1990). Ils sont très sensibles à la quantité et à l'intensité de la lumière. Ils permettent ainsi une bonne adaptation à la vision en faible lumière (vision nocturne) (Walls, 1942; Young, 1971). Situés majoritairement en périphérie de la rétine (**Figure 6**), ils ne fournissent pas une image nette des objets observés mais participent à notre champ visuel qui correspond à l'espace total perçu lorsque l'on regarde droit devant soi (Osterberg, 1935).



**Figure 6 : distribution spatiale des cônes et des bâtonnets dans la rétine humaine.** Le graphique montre que les cônes sont présents à faible densité tout au long de la rétine hormis au niveau de la rétine centrale nommée fovéa où leur présence est exclusive. *A contrario*, les bâtonnets sont présents à plus haute densité que les cônes au niveau de la rétine périphérique et sont absents de la fovéa. Les images en haut du graphique illustrent la morphologie des SE des photorécepteurs aux différents degrés d'excentricité. La forte densité des cônes au niveau de la fovéa s'accompagne par une forte diminution du diamètre de leur SE. Modifié de Purves et al., 2001a.

Toute perception périphérique floue retient l'attention alors que la zone n'est pas à proprement regardée. Si besoin, un mouvement des yeux ou de la tête peut la ramener dans la zone centrale de la vision rendant ainsi l'image nette. Les bâtonnets entrent donc pleinement en jeu dans la vision périphérique et ont un rôle de détection de l'information.

Leur SE, de forme cylindrique, se compose d'une membrane plasmique et d'un empilement de disques libres à l'intérieur du cytoplasme. Ces disques contiennent au niveau de leur membrane la rhodopsine qui est le photopigment des bâtonnets directement en contact avec le milieu extracellulaire.



La membrane plasmique contient par ailleurs de nombreux canaux luminodépendants spécifiques des ions sodium et calcium (Molday and Molday, 1998).

Les cônes sont en moyenne 4,6 millions (Curcio et al., 1990). Ils se situent majoritairement au niveau de la rétine dite centrale. Leur présence est exclusive au niveau de la fovéa (Figure 6) (Osterberg, 1935). Ils ont une faible sensibilité et ne fonctionnent que si la luminosité est élevée. Ils permettent une vision nette et colorée des objets (vision diurne) grâce aux différents types d'iodopsines qu'ils contiennent (Figure 7) (Bowmaker and Dartnall, 1980; Nathans et al., 1986a, 1986b; Neitz and Neitz, 2011; Stockman et al., 1993; Stockman and Sharpe, 2000) :

- ♦ les cônes S (pour *small wavelengths*) sont sensibles aux longueurs d'ondes courtes et permettent de détecter le bleu avec une absorption maximale aux environs de 420nm ;
- ♦ les cônes M (pour *middle wavelengths*) sont sensibles aux longueurs d'ondes moyennes qui permettent de distinguer le vert avec une absorption maximale aux environs de 530nm ;
- ♦ les cônes L (pour *long wavelengths*) sont sensibles aux grandes longueurs d'ondes qui permettent de percevoir du jaune au rouge avec une absorption maximale du pigment aux environs de 560nm.

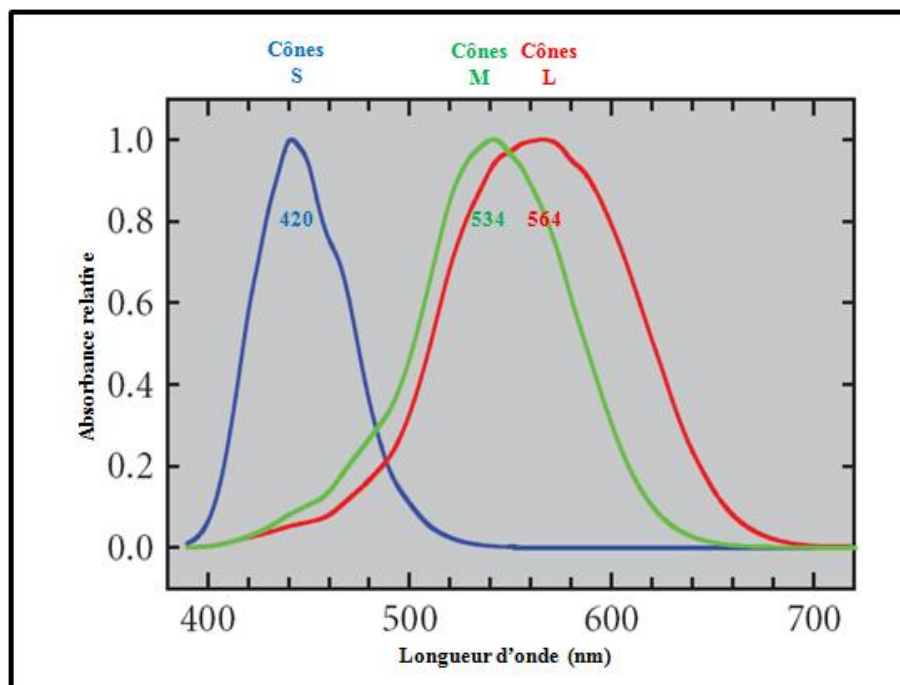


Figure 7 : sensibilité spectrale théorique des cônes S, M et L. Modifié de Stockman and Sharpe, 2000.

Leur SE, de forme conique, est constitué d'une membrane présentant de nombreuses circonvolutions qui exposent les pigments au milieu extracellulaire. Cette membrane cytoplasmique est en continuité avec le SI. Ces plis contiennent également de nombreux canaux spécifiques au sodium et au calcium mais leur densité est inférieure à celle que l'on trouve dans les bâtonnets (Yau, 1994a). Un objet dont la couleur se situe dans le spectre visible va exciter à divers degrés les 3 types de cônes.

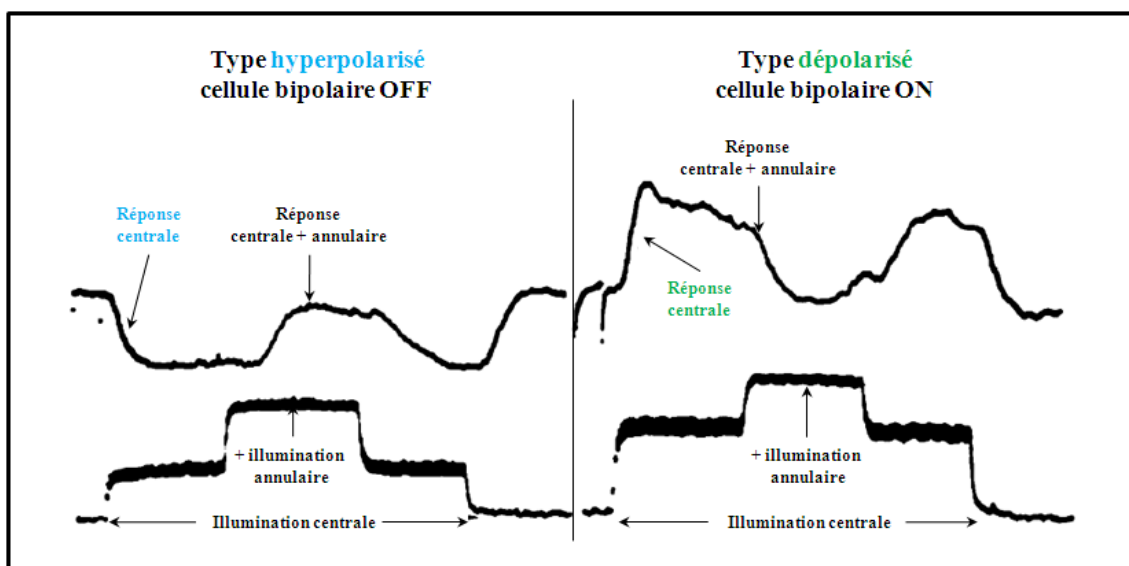
Notre perception des couleurs dépend de la superposition des différents spectres d'absorption de ces trois types de cônes et par la suite, de la complexité des interactions neuronales dans la rétine (Jacobs, 1996).

#### I.1.3.1.1.2 Deuxième niveau : les cellules bipolaires, horizontales et amacrines

La couche granulaire interne est composée de cellules bipolaires, horizontales et amacrines.

Les cellules bipolaires sont les premiers neurones de transmission du signal (Andres-Barquin, 2001; Dowling, 1970; Ishida et al., 1980; Kolb et al., 1981; Wan and Heidelberger, 2011). Ils comportent deux fibres nerveuses ramifiées. Ils diffèrent les uns des autres par leurs profils dendritiques qui entrent en communication avec les photorécepteurs au niveau de la couche plexiforme externe et par leur axone qui communique avec les cellules ganglionnaires, par des synapses placées à différents niveaux dans la couche plexiforme interne.

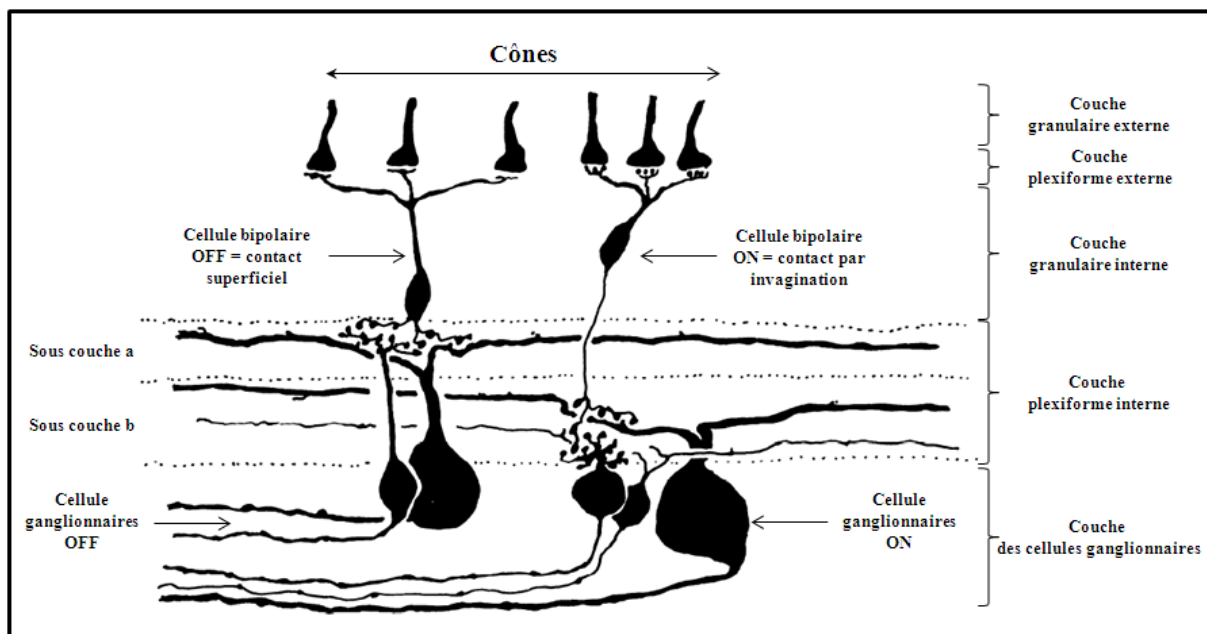
Les photorécepteurs libèrent uniquement du glutamate (Ayoub and Copenhagen, 1991; Dacheux and Miller, 1976) qui va produire deux effets inverses sur les cellules bipolaires. Les Drs Dowling et Werblin sont les premiers à avoir étudié la réponse des cellules bipolaires à la lumière (**Figure 8**) (Werblin and Dowling, 1969).



**Figure 8** : effet antagoniste de l'illumination annulaire sur la réponse des cellules bipolaires. Dans chaque expérience, l'illumination du centre du champ récepteur de la cellule bipolaire a été maintenue jusqu'à ce que la zone annulaire (à 250µm) soit éclairée. Pour les cellules bipolaires de type OFF (à gauche) et de type ON (à droite), la polarisation produite par l'illumination centrale a été antagonisée par l'illumination annulaire. Modifié de Werblin and Dowling, 1969.

Selon leur propriété fonctionnelle, les cellules bipolaires peuvent être classées en deux catégories (**Figure 9**) (Boycott and Wässle, 1991; Bloomfield and Miller, 1986; DeVries and Schwartz, 1999; Euler and Wässle, 1995; Famiglietti and Kolb, 1976; Ishii et al., 2009; Kolb et al., 1992; Nelson et al., 1978) :

- ♦ la cellule OFF est hyperpolarisée lorsqu'il y a présence de lumière au niveau du cône. Elle entre en contact superficiel avec le photorécepteur par son dendrite, son axone se situe dans la sous-couche a (la plus superficielle) de la couche plexiforme interne ;
- ♦ la cellule ON est dépolarisée lorsqu'il y a présence de lumière au niveau du cône ou du bâtonnet. Son dendrite s'invagine au niveau du pédicule du cône et son axone se situe dans la sous-couche b (la plus profonde) de la couche plexiforme interne.

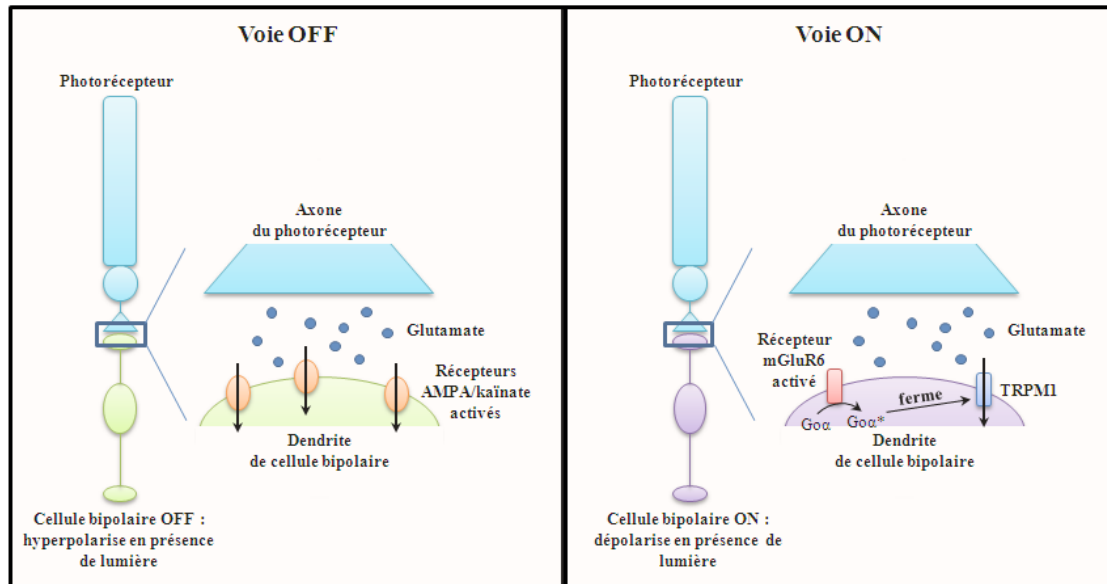


**Figure 9** : organisation des cellules bipolaires des cônes et des cellules ganglionnaires dans la couche plexiforme interne de la rétine de chat. Les axones des cellules bipolaires OFF (contact superficiel avec les cônes) entrent en contact avec les dendrites des cellules ganglionnaires OFF au niveau de la sous-couche a de la couche plexiforme interne alors que les cellules bipolaires ON (contact par invagination avec les cônes) entrent en contact avec les cellules ganglionnaires OFF au niveau de la sous-couche b. Modifié de Nelson et al., 1978.

Cette dichotomie est due aux différents types de récepteurs au glutamate portés par les cellules bipolaires (Ribelayga, 2010). Les récepteurs au glutamate peuvent être classés en deux catégories :

- ♦ les récepteurs métabotropes divisés en trois sous groupes (Pin and Duvoisin, 1995) ;
- ♦ les récepteurs ionotropes (Nakanishi, 1992) de type NMDA (pour *N-méthyl-D-aspartate*) (Shen et al., 2006), kaïnate (Pinheiro and Mulle, 2006) ou AMPA (pour amino-3-hydroxy-5-méthylisozazol-4-propionate) (Greger and Esteban, 2007).

Les cellules bipolaires OFF portent des récepteurs ionotropes de type kaïnate/AMPA (DeVries, 2000; Haverkamp et al., 2001; Slaughter and Miller, 1981; Strettoi et al., 2010) alors que les cellules bipolaires ON sont porteuses du récepteur métabotrope de type III, mGluR6 (Awatramani and Slaughter, 2001; Hirasawa et al., 2002; Nomura et al., 1994; Slaughter and Miller, 1981; Snellman et al., 2008; Tian and Slaughter, 1995; Vardi, 1998) (**Figure 10**).



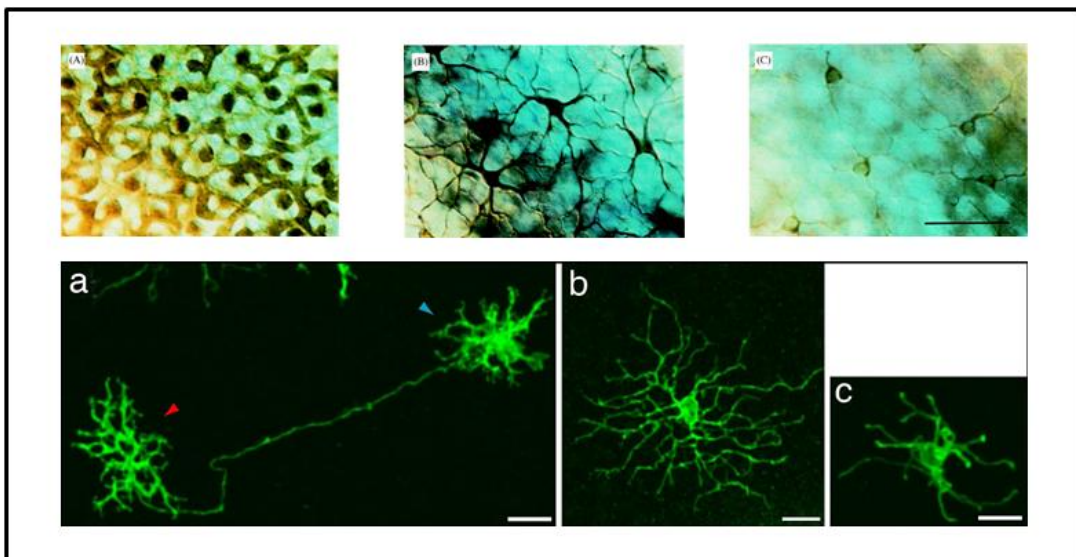
**Figure 10** : séparation des voies ON et OFF au niveau des synapses entre le photorécepteur et les cellules bipolaires. Dans l'obscurité, le glutamate est libéré au niveau de l'axone du photorécepteur. Il active les récepteurs AMPA/kaïnate des cellules bipolaires OFF (à gauche) et les récepteurs mGluR6 des cellules bipolaires ON (à droite). Cette fixation au niveau des mGluR6 active le second messager qui est une protéine G ( $Go\alpha \rightarrow Go\alpha^*$ ) qui va à son tour maintenir fermé le canal à cations mGluR6-dépendant nommé TRPM1 (pour *type 1 melastatin-related transient receptor potential (TRP)*) ce qui a pour conséquence d'hyperpolariser les cellules bipolaires ON. Lors de l'arrivée de la lumière, le taux de glutamate libéré chute, ce qui ferme les récepteurs AMPA/kaïnate et hyperpolarise les cellules bipolaires OFF. A l'inverse, cette diminution du glutamate permet l'ouverture du canal TRPM1 ce qui provoque la dépolarisation des cellules bipolaires ON par l'entrée de cations. Adapté de Ribelayga, 2010.

Les neuf types de cellules bipolaires identifiés chez l'Homme se répartissent en quatre groupes selon le type de jonction réalisé (Boycott and Wässle, 1991; Klug et al., 2003; Kolb et al., 1992) :

- ♦ les « naines » n'entrent en contact qu'avec un seul type de cônes M ou L ;
- ♦ les « diffuses » entrent en contact avec plusieurs cônes à la fois et ne font pas de distinction entre les types de cônes ;
- ♦ les cellules bipolaires de cônes de type S ;
- ♦ les cellules bipolaires de bâtonnets.

Les cellules nommées horizontales, de par leur morphologie, agissent latéralement au niveau de leurs synapses situées dans la couche plexiforme externe. Trois types de cellules horizontales ont été répertoriés (**Figure 11**) (Ahnelt and Kolb, 1994; Kolb et al., 1980, 1994; Li et al., 2009; Polyak, 1941; Stell and Lightfoot, 1975) :

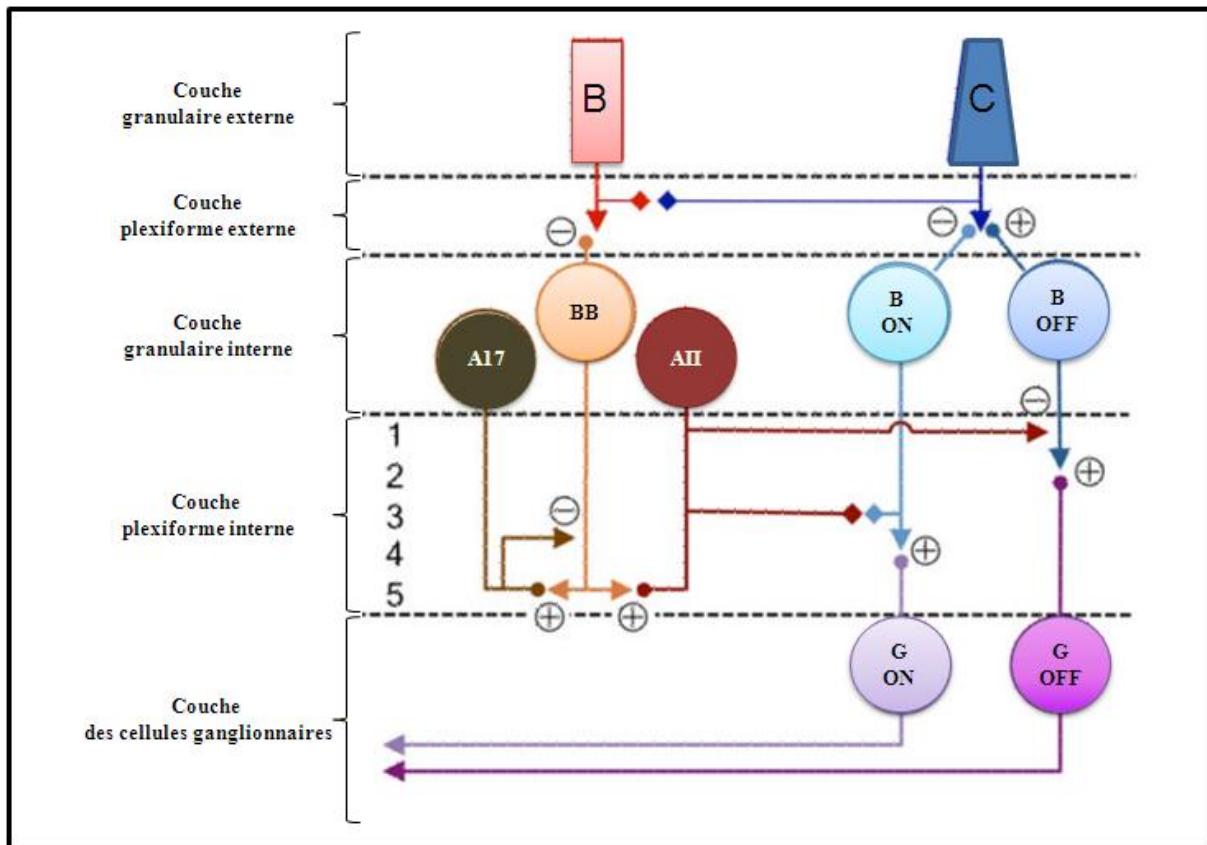
- ♦ le sous-type HI entre en contact, par son dendrite, avec les cônes de type S, M et L alors que son axone entre en contact avec les bâtonnets ;
- ♦ le sous-type HII entre en contact, par son axone, exclusivement avec les cônes de type S. Son dendrite innerve plus les cellules de type S que les cônes de types M et L ;
- ♦ Le sous-type HIII a le même comportement que le sous type HI mais n'entre pas en contact avec les cônes de type S.



**Figure 11** : les différents types de cellules horizontales. En haut, coloration par la neurobiotine des cellules horizontales H1 (a), H2 (b) et H3 (c) de la tortue *Pseudemys scripta elegans*. Source : Twig et al., 2003. En bas, cellules H1 (a, flèche rouge : axone, flèche bleue : dendrite), H2 (b) et H3 (c) du poulet. Source : Rompani and Cepko, 2008.

Les cellules amacrines dont les synapses se trouvent dans la couche plexiforme interne, entrent en contact avec les cellules ganglionnaires (**Figure 12**) (Andres-Barquin, 2001; Kolb et al., 1992; Mariani, 1990; Masland, 1988). Il existe de nombreux types de cellules amacrines (MacNeil and Masland, 1998) dont les types A17 et AII qui sont les plus étudiés (Bloomfield, 1992; Dong and Hare, 2003; Grünert and Hughes, 1993; Hartveit, 1999; Masland, 2012; Menger and Wässle, 2000; Nelson and Kolb, 1984, 1985; Vaney et al., 1991).

Les A17 régulent négativement le taux de glutamate libéré par les cellules bipolaires en sécrétant du GABA (pour acide  $\gamma$ -aminobutyrique) (Chávez et al., 2010; Grimes et al., 2010; Zhang et al., 2002). Les AII participent à la fois à la conduction du signal reçu par les bâtonnets et à la conduction du signal des cellules bipolaires de cônes aux cellules ganglionnaires (Strettoi et al., 1992, 2010).



**Figure 12 :** schéma de la diversité post-synaptique des synapses rétiniennes de mammifère. Dans l'obscurité, les bâtonnets (B) émettent un signal aux cellules bipolaires des bâtonnets (BB) qui va, par l'intermédiaire des cellules amacrines II (AII), emprunter le chemin d'un message issu des cônes (C) en passant par les cellules bipolaires des cônes ON (B ON) et OFF (B OFF) pour arriver au niveau des cellules ganglionnaires ON (G ON) et OFF (G OFF). Exposées à la lumière, les AII empruntent le chemin des B ON par des jonctions gap. Les cellules amacrines 17 (A17) régulent négativement les terminaisons axonales des BB. Pour une plus grande clarté les cellules horizontales, les autres types de cellules amacrines et les cellules de Müller ont été omises. Modifié de Oesch et al., 2011.

#### **I.1.3.1.1.3 Troisième niveau : les cellules ganglionnaires**

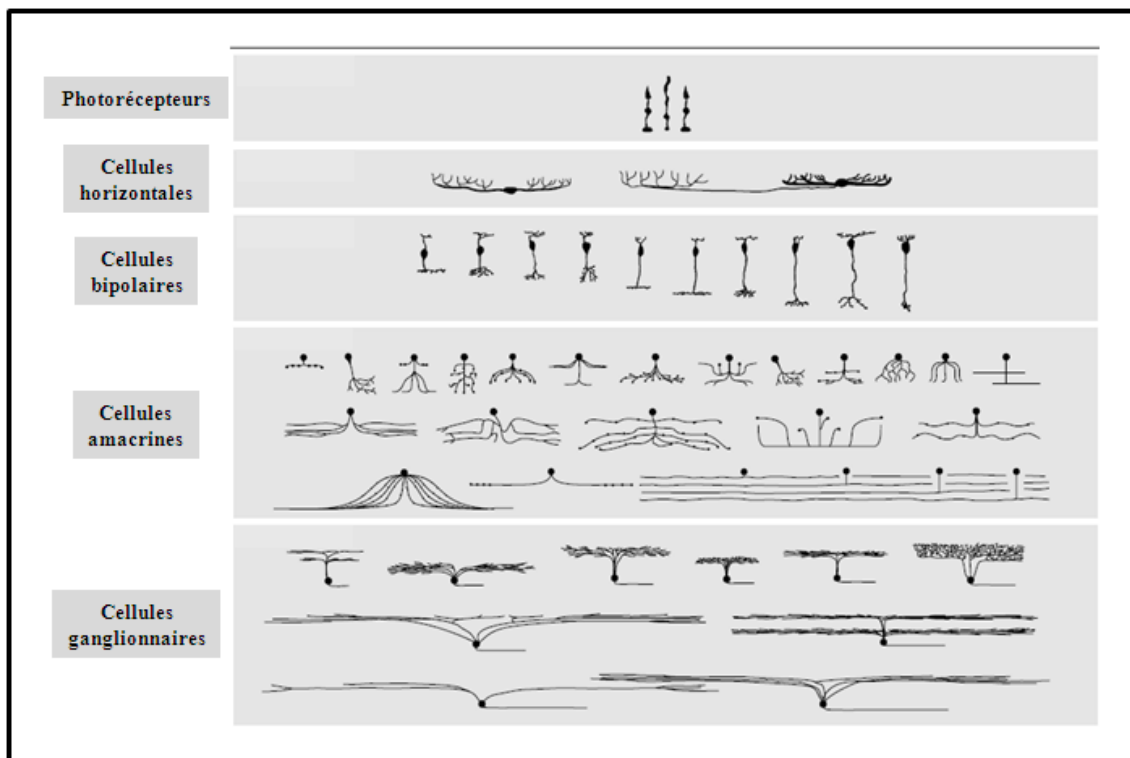
Au troisième niveau se trouvent les cellules ganglionnaires (Barlow et al., 1964; Kuffler, 1953; Marc and Jones, 2002) dans la couche qui porte leur nom. Elles forment la barrière entre la rétine et l'humeur vitrée. Elles sont en contact par leurs synapses avec les cellules bipolaires ON (sous-couche b), OFF (sous-couche a) et les cellules amacrines dans la couche plexiforme interne (**Figure 9, Figure 12**). Les cellules ganglionnaires présentent des fibres nerveuses qui se prolongent le long de la rétine pour se diriger vers la papille. Les fibres réunies émettent des potentiels d'action. Elles forment le nerf optique qui véhicule l'information le long des voies visuelles.

#### **I.1.3.1.1.4 Résumé de la complexité de la RN**

Les photorécepteurs transmettent le signal lumineux aux cellules bipolaires qui vont à leur tour le transmettre aux cellules ganglionnaires qui vont le communiquer au cerveau. Les connexions latérales



établies par les cellules horizontales et amacrines vont également propager le signal. Cette représentation de la RN est simplifiée car des études menées sur des rétines de différentes espèces ont permis de dénombrer plus de 55 types distincts de neurones dont 49 sont communs chez les vertébrés (**Figure 13**) (Kolb et al., 1992; MacNeil and Masland, 1998; Masland, 2001, 2001).



**Figure 13** : représentation des principales populations génériques neuronales des rétines de mammifères.

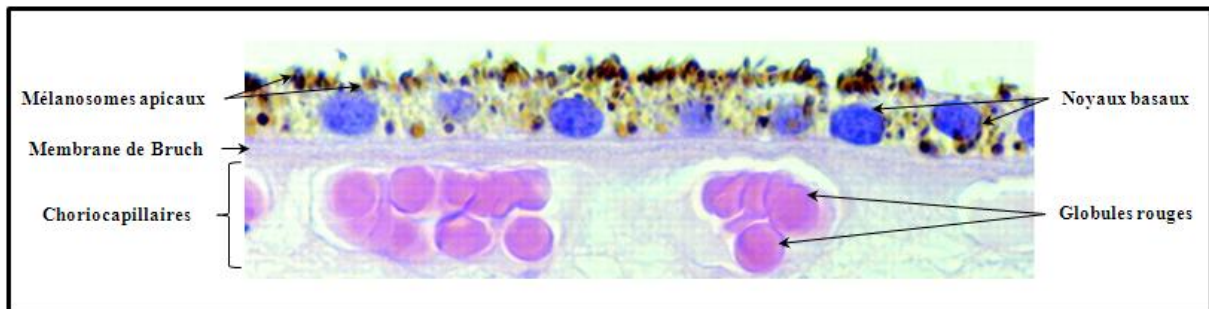
Pour des raisons d'encombrement, seuls des sous-ensembles des cellules amacrines et ganglionnaires sont représentés. Le nombre de cellules représentées ici est de 49. Les différences entre les mammifères sont les suivantes : les primates possèdent un type de cônes supplémentaire ainsi qu'une cellule bipolaire de type « naine » et une cellule ganglionnaire « naine ». Cependant, la fovéa des primates est peu étudiée alors qu'elle contient ces cellules très spécialisées et cela à cause de raisons pratiques. De ce fait les études sont menées de 5 à 10 degrés en périphérie de la fovéa. Excepté en ce point, le nombre de cellules est réparti uniformément dans l'ensemble des classes. Enfin, les cellules à grand champ d'action sont moins nombreuses que les cellules à champ d'action étroit. Modifié de Masland, 2001.

La complexité cellulaire est très importante et compte selon l'espèce considérée :

- ◆ 3 à 4 types de photorécepteurs ;
- ◆ 2 à 3 types de cellules horizontales ;
- ◆ 9 à 11 types de cellules bipolaires ;
- ◆ 29 types de cellules amacrines ;
- ◆ 10 à 15 types de cellules ganglionnaires.

### I.1.3.1.2 L'épithélium pigmentaire rétinien

L'EPR est une monocouche cellulaire faite de cellules hexagonales, jointives, synthétisant de la mélanine et de la lipofuscine tout au long de la vie (Feeney, 1978; Flood et al., 1980; Friedman and Ts'o, 1968; Strauss, 2005; Walls, 1942). Cet épithélium se poursuit sur la face antérieure de l'œil par l'iris. Les cellules de l'épithélium sont orientées avec un noyau situé au pôle basal et les grains de mélanine au pôle apical (**Figure 14**) (Parsons et al., 2005). Le pôle apical contient des villosités qui entrent en contact avec les photorécepteurs présents dans la rétine neurale alors que le pôle basal des cellules repose sur la membrane de Bruch.



**Figure 14** : coloration à l'hématoxyline et à l'éosine de cellules normales de l'EPR d'une femme âgée de 62 ans, x330. Modifié de Parsons et al., 2005.

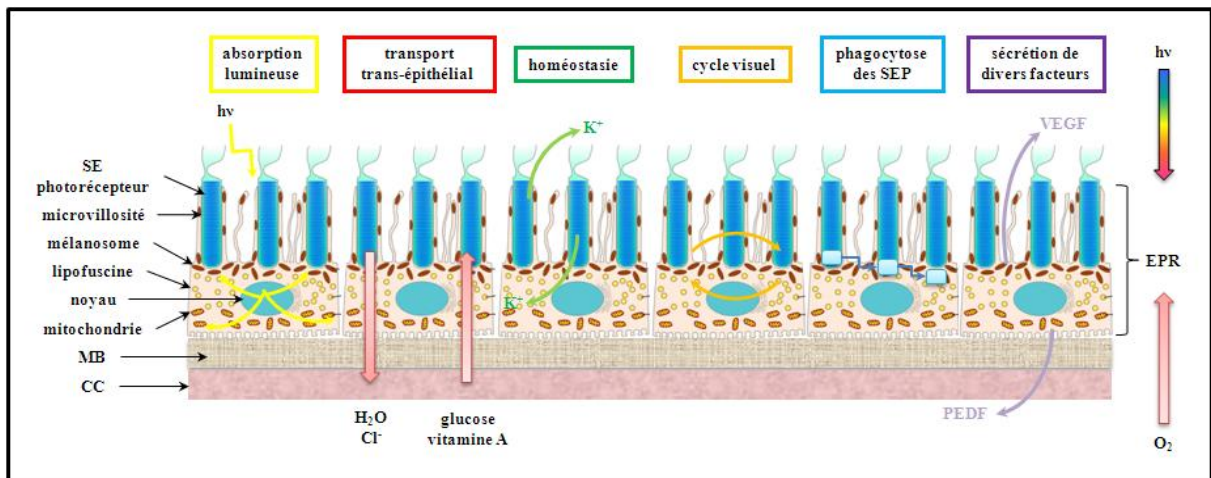
Ses membranes apicale et basale sont le lieu de flux ioniques à l'origine de ses propriétés. Ces flux peuvent être suivis en réalisant, *in vivo*, un électro-oculogramme (ou EOG) qui mesure les changements de potentiel électrique entre la cornée et le fond de l'œil (Brown et al., 2006). Une longue stimulation lumineuse est délivrée ce qui maintient les bâtonnets activés. En conséquence, les canaux  $Cl^-$  (chlore) de la membrane basale des cellules de l'EPR s'ouvrent, il y a dépolarisation transitoire de cette membrane. Ainsi, le suivi de ces flux permet d'évaluer le fonctionnement des cellules de l'EPR à condition que le fonctionnement des bâtonnets soit normal ce qui nécessite d'enregistrer en parallèle un électrorétinogramme (ou ERG flash). L'ERG-flash permet d'hyperpolariser transitoirement les photorécepteurs, les cellules bipolaires OFF et dépolarise les cellules bipolaires ON. Ces différences de polarisation sont traduites par les ondes a et b au niveau de l'ERG-flash selon les cellules stimulées. Si l'on ne stimule que les bâtonnets, l'onde b qui est la réponse à l'hyperpolarisation des bâtonnets et à la dépolarisation des cellules bipolaires ON va être mesurée par l'ERG-flash (Rigaudière and Le Gargasson, 2007).

#### I.1.3.1.2.1 Fonctions

Situé entre la membrane perméable de Bruch et la RN, l'EPR participe étroitement au fonctionnement de cette dernière en occupant six fonctions qui sont vitales pour la vision (**Figure 15**) (Strauss, 2005) :



- ♦ l'absorption d' $h\nu$  et la protection de la photo-oxydation grâce notamment à sa pigmentation qui empêche la diffusion de la lumière dans l'œil ;
- ♦ le transport trans-épithélial de nutriments et d'ions, entre les choriocapillaires et les photorécepteurs, par des phénomènes passifs ou actifs ;
- ♦ le maintien de l'homéostasie, tout comme les cellules de Müller, en tamponnant les ions dans l'espace sous-rétinien ce qui permet de maintenir l'excitabilité des photorécepteurs et qui peut se mesurer avec l'ERG ;
- ♦ la réalisation du cycle visuel en re-isomérisant le tout-*trans*-rétinal (*AtRAL*) en 11-*cis*-rétinal (11*cRAL*) et en le rendant au photorécepteur pour maintenir une excitabilité constante ;
- ♦ la phagocytose des SE des photorécepteurs (SEP) permettant ainsi leur régénération ;
- ♦ la sécrétion de divers facteurs de croissance comme le PEDF (pour *pigment epithelium-derived growth factor*) au pôle apical et le VEGF (pour *vascular epithelium growth factor*) au pôle basal et de facteurs nécessaires au maintien de l'intégrité de la RN et des choriocapillaires.



**Figure 15 : résumé des six fonctions de l'EPR.** Avec SE : segment externe, MB : membrane de Bruch, CC : choriocapillaires,  $h\nu$  : photon,  $H_2O$  : eau ,  $Cl^-$  : ion chlore,  $K^+$  : ion potassium, SEP : segment externe des photorécepteurs, PEDF : *pigment epithelium-derived growth factor*, VEGF : *vascular epithelium growth factor*. Modifié de Jarrett et al., 2008; Strauss, 2005.

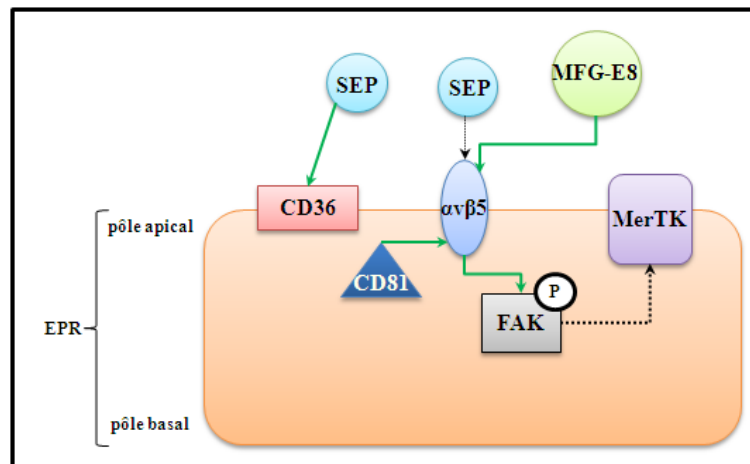
#### **I.1.3.1.2.2 La phagocytose**

Pour maintenir une transduction du signal efficace, les photorécepteurs ne doivent pas être touchés dans leur intégrité. Exposés continuellement à la lumière, ils s'altèrent et accumulent des substances toxiques au niveau des SE. Pour maintenir une excitabilité maximale les SEP ont besoin d'être renouvelés en permanence. Ce renouvellement s'opère, en 10 jours, au cours de la phagocytose qui est réalisée par les cellules de l'EPR (Bosch et al., 1993; Kevany and Palczewski, 2010; LaVail, 1973; Spitznas and Hogan, 1970; Strauss, 2005; Young, 1967; Young and Bok, 1969).

La phagocytose est composée de plusieurs étapes, la reconnaissance et la fixation des SEP, leur internalisation puis leur dégradation qui va permettre le retour des éléments les plus importants, en

leur sein, comme le rétinol et l'acide gras docosahexaénoïque (ou DHA) qui entrera dans la constitution de leur membrane (Bazan, 2006; Mukherjee et al., 2007). Leur régénération est assurée par les cils situés à la base des SE (Boesze-Battaglia and Goldberg, 2002; Steinberg et al., 1980).

La reconnaissance et la fixation des SEP s'opèrent par deux voies distinctes (Figure 16) (Finnemann and Silverstein, 2001).



**Figure 16 : reconnaissance et fixation du SEP à une cellule de l'EPR.** Avec CD36 : récepteur de type macrophagique, CD81 : la tétraspanine CD81,  $\alpha\beta5$  : récepteur à l'intégrine  $\alpha\beta5$ , FAK : kinase d'adhésion focale, MFG-E8 : *glycoprotein milk fat globule-EGF 8* et MerTK : récepteur *c-mer Tyrosine Kinase*. Les flèches vertes indiquent une liaison directe, les flèches en pointillé indiquent une action connue mais non complètement élucidée. Enfin, le P cerclé de noir indique la phosphorylation. Adapté de Strauss, 2005.

La première voie implique le récepteur macrophagique CD36, une glycoprotéine transmembranaire qui va se lier directement aux SEP par l'intermédiaire de phospholipides anioniques présents à leur surface tels que le phosphatidylsérine (PS) et le phosphatidylinositol (Ryeom et al., 1996a, 1996b).

La deuxième voie implique le récepteur à l'intégrine  $\alpha\beta5$  situé au pôle apical de l'EPR (Finnemann et al., 1997). Avant même la fixation d'un SEP à la surface du récepteur, le récepteur à l'intégrine va à la fois se complexer à la kinase d'adhésion focale (FAK) et l'activer en la phosphorylant. Le récepteur MerTK (pour *c-mer Tyrosine Kinase*) va ensuite être la cible directe ou indirecte de la FAK (Finnemann, 2003; Nandrot et al., 2004). D'autres protéines entrent en jeu, comme :

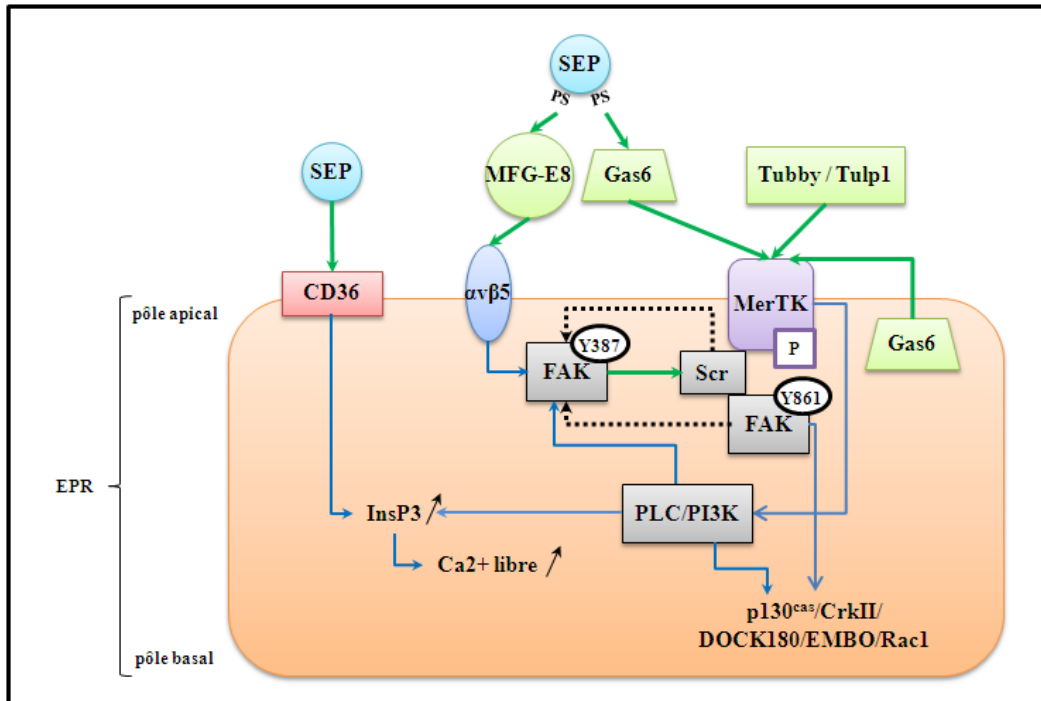
- ♦ la protéine extracellulaire MFG-E8 (pour *glycoprotein milk fat globule-EGF 8*) qui est nécessaire au bon rythme de la phagocytose en se fixant directement au récepteur de l'intégrine  $\alpha\beta5$ . Cette fixation régule le bon fonctionnement de la voie passant par le récepteur MerTK (Nandrot et al., 2004, 2007) ;
- ♦ la tétraspanine CD81 qui en se fixant au récepteur à l'intégrine  $\alpha\beta5$  facilite la reconnaissance entre le récepteur à l'intégrine  $\alpha\beta5$  et le SEP (Chang and Finnemann, 2007).

L'internalisation des SEP va emprunter les deux voies décrites précédemment. La fixation du SEP au récepteur CD36 va entraîner son internalisation ce qui va augmenter la concentration du second messager, l'inositol 1,4,5-triphosphate (InsP<sub>3</sub>) (Strauss, 2005).

En ce qui concerne la deuxième voie, une fois le SEP fixé au récepteur à l'intégrine  $\alpha\beta5$ , par l'intermédiaire de MFG-E8 qui a reconnu les résidus PS, le complexe récepteur à l' $\alpha\beta5$ -FAK va se dissocier et la FAK, phosphorylée au résidu tyrosine 397 (FAK-Y397), va aller se fixer à la kinase de la famille Scr et phosphoryler le récepteur MerTK (Akakura et al., 2004; Finnemann, 2003). Ce récepteur possède un ligand naturel extracellulaire spécifique à savoir la protéine Gas6 (pour *growth-arrest-specific protein 6*) (Hall et al., 2001, 2002) qui est également capable de reconnaître les résidus PS du SEP (Wu et al., 2005). Ce ligand, également exprimé de façon endogène dans les cellules de l'EPR, peut réguler la phagocytose en se fixant directement à MerTK (Karl et al., 2008). Plus récemment, il a été montré que les protéines Tubby et Tulp1 (pour *tubby-like protein 1*) pouvaient se lier au récepteur MerTK et l'activer facilitant ainsi la phagocytose médiée par MerTK (Caberoy et al., 2010).

MerTK phosphorylé, peut à son tour agir sur FAK grâce à une kinase de la famille Scr ce qui phosphoryle le résidu tyrosine 861 de FAK (FAK-Y861). La FAK-Y861 va alors passer par le chemin p130<sup>cas</sup>/Crk/DOCK180/ELMO/Rac1 pour conduire à l'internalisation du SEP (**Figure 17**) (Wu et al., 2005, 2006). FAK-Y861 engendre son propre recyclage en s'associant au récepteur à l'intégrine  $\alpha\beta5$ . En effet, au niveau du récepteur à l'intégrine, elle peut être re-phosphorylée en FAK-Y387 pour réactiver MerTK.

Le récepteur MerTK active également la phospholipase C (PLC) et la kinase PI3K (pour *phosphatidylinositol 3'-OH kinase*) qui vont activer la protéine kinase C (PKC). PKC va agir sur la phosphorylation de p130<sup>cas</sup> et FAK-Y397 (Finnemann and Rodriguez-Boulant, 1999). PLC va, tout comme pour la voie passant par CD36, augmenter la production d'InsP<sub>3</sub>. Cette augmentation du taux d'InsP<sub>3</sub> au niveau intracellulaire conduit à l'augmentation simultanée de la concentration en ions Ca<sup>2+</sup> libres. La forte concentration en InsP<sub>3</sub>/Ca<sup>2+</sup> et la PLC vont permettre de déclencher la phagocytose qui aboutira à l'ingestion du SEP (**Figure 17**) (Strauss, 2005).



**Figure 17 : internalisation du SEP en vue de sa destruction.** Avec CD36 : récepteur de type macrophagique,  $\alpha\beta 5$  : récepteur à l'intégrine  $\alpha\beta 5$ , MerTK : récepteur *c-mer Tyrosine Kinase*, MFG-E8 : *glycoprotein milk fat globule-EGF 8*, Gas6 : *growth-arrest-specific protein 6*, Tulp1 : *tubby-like protein 1*, FAK : kinase d'adhésion focale, PLC : phospholipase C, InsP3 : inositol 1,4,5-triphosphate. Les flèches vertes indiquent une liaison directe, les flèches en pointillé indiquent des hypothèses non complètement élucidée et les flèches bleues montrent une cascade d'évènements. Enfin, le P encadré indiquent la phosphorylation de l'élément. Adapté de Strauss, 2005; Wu et al., 2006.

La dégradation des SEP a lieu après l'internalisation de ces derniers. Les phagosomes contenant les morceaux de SEP vont peu à peu rejoindre la membrane basale des cellules de l'EPR tout en migrant au pôle opposé, les phagosomes vont s'acidifier et fusionner avec des lysosomes formant ainsi des phagolysosomes (Bosch et al., 1993; Deguchi et al., 1994; Herman and Steinberg, 1982; Gibbs et al., 2003). Les produits de dégradation des SEP vont être stockés entre la membrane de Bruch et les choriocapillaires lorsque les lysosomes sont défaillants (Peters et al., 2006). Au cours du vieillissement, cette dégradation va engendrer une augmentation des granules de lipofuscine dans les cellules de l'EPR (Finnemann et al., 2002; Gouras et al., 2011).

Comme les bâtonnets perdent davantage de disques lors du passage de l'obscurité à la lumière et les cônes davantage après passage de la lumière à l'obscurité, la phagocytose adopte un rythme circadien (Baba et al., 2010; Imamura et al., 1995).

Enfin, lorsque l'une des étapes de la phagocytose est dysfonctionnelle ou absente, cela engendre des grandes perturbations qui mènent par exemple au syndrome de Usher qui associe surdité et rétinopathie.

pigmentaire. Dans ce syndrome, la mutation du gène codant la myosine VIIa, empêche le transport du phagosome de la membrane apicale à la membrane basale ce qui bloque la phagocytose des SEP (Boughman et al., 1983; Gibbs et al., 2003, 2010).

#### **I.1.3.1.2.3 Le stress oxydatif**

Les cellules de l'EPR contiennent des pigments de mélanine qui absorbent l'excès d'énergie lumineuse et protègent la RN de la phototoxicité et du stress oxydatif (Boulton et al., 2001). Les sources de ce stress sont multiples, elles peuvent provenir :

- ♦ de la combinaison de l'important débit sanguin au niveau de l'EPR et du fort taux d'oxygène apporté par les choriocapillaires ;
- ♦ de la photo-oxydation des biomolécules des cellules de l'EPR ;
- ♦ d'accumulation d'espèces réactives à l'oxygène (ou ERO) suite à l'importante activité mitochondriale (Jarrett et al., 2008b) ;
- ♦ d'accumulation de lipofusine auto-fluorescente due à la phagocytose des SEP qui va peu à peu conduire à l'apparition de radicaux libres et à sa propre photo-oxydation toxique pour les cellules de l'EPR (Sparrow et al., 2012).

Ces cellules comportent également des antioxydants tels que la superoxide dismutase (Imamura et al., 2006), la glutathione (Cai et al., 2000; Gosbell et al., 2006; Güven et al., 2011) ou encore l' $\alpha$ -tocophérol (Hogg and Chakravarthy, 2004) qui vont neutraliser les espèces susceptibles de réagir avec l'oxygène avant qu'elles ne causent de dommages cellulaires. Cependant, il y a tout de même formation de radicaux libres qui vont être reconnus et éliminés par les cellules (Boulton et al., 2001).

Au cours du temps, le nombre de mélanosomes va diminuer. Ils vont peu à peu se transformer en deux types de mélano-lysosomes. Les premiers sont de type autophagique alors que les seconds sont à la fois hétérophagiques en digérant les phagosomes et autophagiques pour ce qui est de la digestion des mélanosomes.

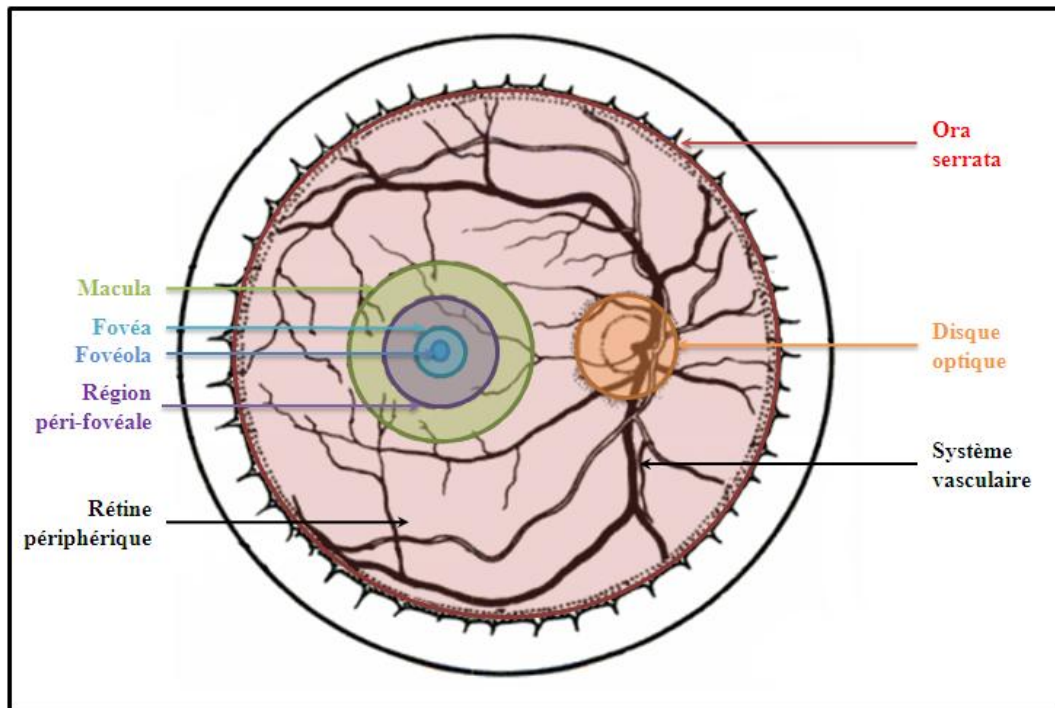
Les mélano-lysosomes contiennent de la lipofuscine issue de la dégradation des phagosomes (Gouras et al., 2011; Sarangarajan and Apte, 2005). La photo-oxydation des composants lipofuscine mène, entre autre, à la formation de l'A2E (pour N-rétinyl-N-rétinylidène éthanolamine) qui résulte de la réaction de l'A/RAL et de l'éthanolamide. Ces bisrétinoïdes causent des dommages par la production d'ERO ou de stress oxydatif (Boulton et al., 2001; Libby and Gould, 2010; Pawlak et al., 2002, 2003).

Lorsque les cellules de l'EPR meurent sous l'effet de ce stress oxydatif, le développement de maladies rétiniennes neurodégénératives telles que la dégénérescence maculaire liée à l'âge (ou DMLA) peut apparaître (Imamura et al., 2006). Dans la forme de type sèche qui représente près de 85% de la maladie (Cook et al., 2008; Zarbin, 2004), les patients présentent des drüsens. Ces dépôts blancs jaunâtres sont dus à l'accumulation de résidus issus de la phagocytose des SEP. Ils apparaissent

au niveau de la membrane de Bruch, entre l'EPR et les choriocapillaires et peuvent à terme provoquer des déchirements (Sauer et al., 2008).

### **I.1.3.2 De la fovéa à la périphérie**

Selon le sens tangentiel, la rétine possède quatre zones distinctes (**Figure 18**) (Andres-Barquin, 2001; Curcio et al., 1990; Khurana, 2005; Polyak, 1941; William and Krause, 2005).

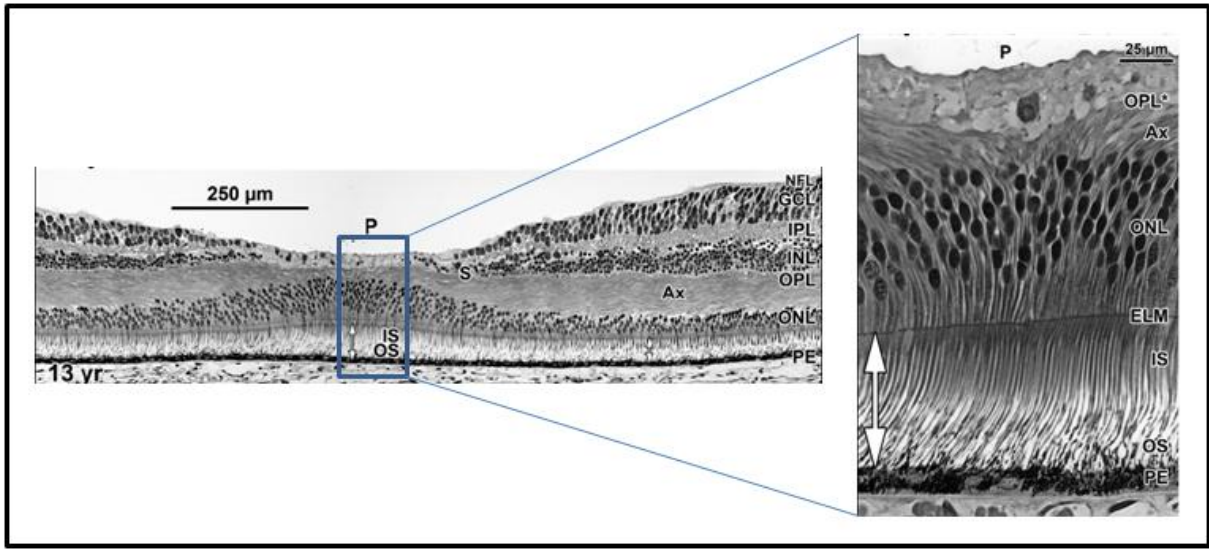


**Figure 18 : anatomie de la rétine.** D'après Khurana, 2005.

- ♦ Le disque optique ou papille, encore appelé tache aveugle, se situe dans la partie nasale inférieure. Il est totalement dépourvu de récepteurs visuels. C'est la zone de sortie des fibres optiques de la rétine qui forment à cet endroit le nerf optique. Cette papille laisse également passer l'artère centrale de la rétine qui se divise en 4 branches, accompagnées des veines qui se réunissent ici en veine centrale. La rétine est donc doublement vascularisée, d'une part par les vaisseaux choroïdiens et d'autre part par les artérioles et veines rétinienne (Ducasse et al., 1988; Sivakamasundari et al., 2012; Tan et al., 2012) ;
- ♦ La *macula lutea* qui signifie tache jaune, se trouve dans l'axe de la pupille. Sa couleur jaune provient des pigments de lutéine et de zéaxanthine qu'elle contient (Bernstein et al., 1997; Krinsky et al., 2003). C'est une zone de 6 mm de diamètre qui est la plus épaisse de la rétine (500 µm). Elle possède une concentration élevée en cellules ganglionnaires et est irriguée par les vaisseaux choroïdiens. Elle comprend essentiellement les cônes de types M et L qui sont répartis de façon irrégulière alors que les cônes de type S sont répartis de façon plus homogène (Roorda et al., 2001) ;



- ♦ La fovéa est une légère dépression de 1,5 mm de diamètre située au centre de la macula (Yamada, 1969). Cette zone très spécialisée est avascularisée et contient en son centre la fovéola qui est uniquement constituée de récepteurs visuels sur 500µm de diamètre. Cette zone, la plus fine de la rétine, est le lieu de l'acuité visuelle maximale en raison de sa très grande concentration en récepteurs visuels. Elle n'est pas totalement développée avant l'âge de 10 ans et la densité des cônes augmentera jusqu'à l'âge adulte (**Figure 19**) (Hendrickson and Yuodelis, 1984; Hendrickson et al., 2012) ;



**Figure 19** : histologie et couches de la rétine humaine à l'âge de 13 ans. Le centre de la fovéa est agrandi à droite. La fosse fovéale est large et peu profonde. Elle est composée de longs et fins SE (ici OS) et SI (ici IS) de cônes. Sa profondeur est de 8 à 12 corps cellulaires de cônes (double flèche blanche à droite). La couche plexiforme externe (OPL) contient une couche épaisse d'axones (Ax). Avec, NFL : couche de fibres nerveuses, GCL : couche de cellules ganglionnaires, IPL : couche plexiforme interne, INL : couche granulaire interne, ONL : couche granulaire externe, PE : épithélium pigmentaire, ELM : membrane limitante externe. Modifié de Hendrickson et al., 2012.

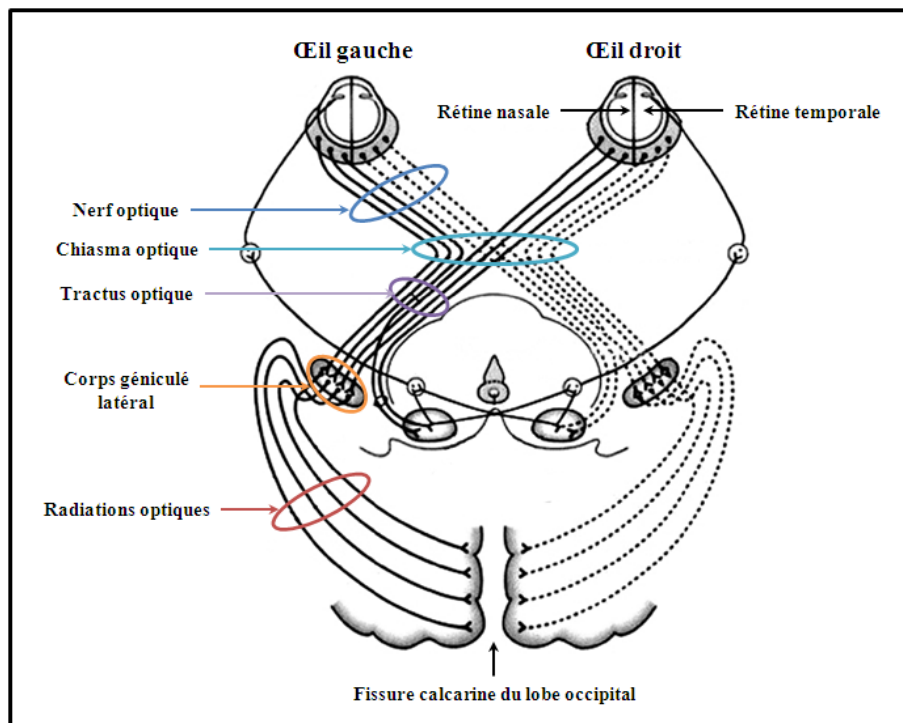
- ♦ La rétine périphérique entoure la macula et se finit à l'*ora serrata*. Son épaisseur est constante et son organisation morphologique reste homogène hormis à l'*ora serrata* où elle se désorganise en s'attachant fortement à la choroïde et au vitré.

## I.2 Fonction

### I.2.1 Voies de médiation du signal lumineux

#### I.2.1.1 Généralité

La majorité des photons lumineux doit traverser toute la rétine pour atteindre les photorécepteurs situés à l'étage le plus externe, dans la couche granulaire externe, sauf au niveau de la fovéa où les cônes peuvent être atteints pratiquement directement. L'influx lumineux va ensuite se propager aux différentes couches de la RN avant de quitter l'œil par le nerf optique. Les axones des nerfs optiques se myélinisent et traversent la boîte crânienne par les trous optiques pour atteindre le chiasma. C'est à cet endroit que se produit la réunion des nerfs optiques provenant de chaque œil. Les fibres issues des rétines temporales vont continuer leur chemin par le tractus optique et les radiations optiques situés du même côté de l'œil dont elles sont issues, alors que les fibres issues des rétines nasales, vont rejoindre le tractus optique et les radiations optiques de l'hémisphère cérébral opposé (Figure 20) (Guillery et al., 1975, 1995; Hofer et al., 2010; Kupfer et al., 1967; Sergueef, 2009).



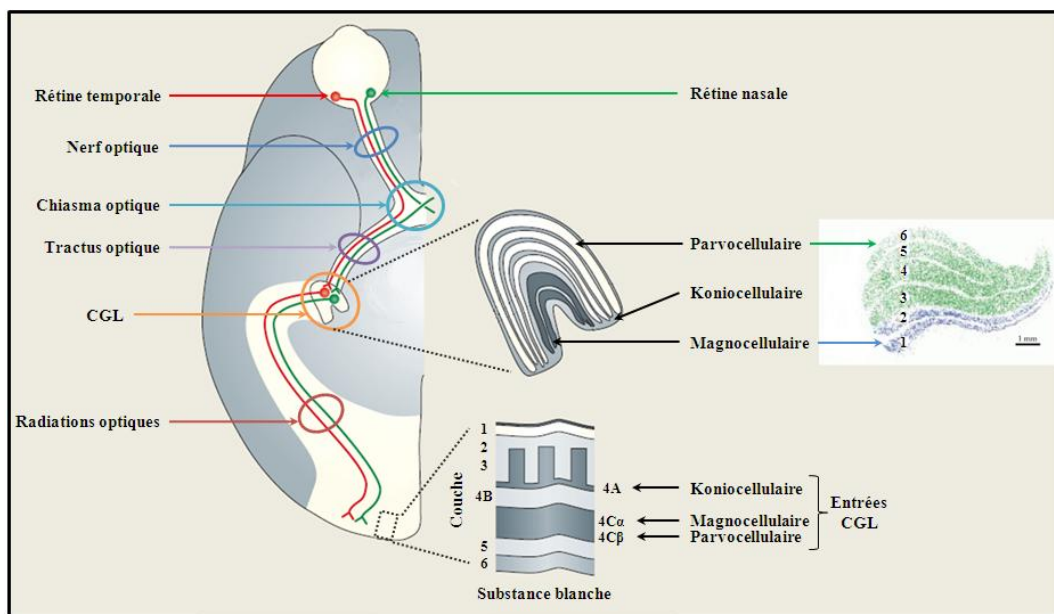
**Figure 20 : diagramme schématique du chemin visuel.** Au niveau du chiasma optique les informations provenant de la rétine temporale poursuivent leur chemin par le tractus optique situé du même côté de l'œil dont elles proviennent alors que les informations venues de la rétine nasale vont emprunter le tractus optique de l'œil opposé. Adapté de Zhang et al., 2012b.



Ainsi, la moitié du champ visuel de chaque œil est traitée par l'hémisphère cérébral opposé. Les tractus optiques se terminent en deux racines :

- ♦ la racine latérale conduit les fibres jusqu'aux corps géniculés latéraux (CGL) situés au niveau du thalamus ;
- ♦ la racine médiane constitue les voies optiques secondaires.

Les CGL du thalamus sont des relais synaptiques organisés en couches cellulaires nommées parvocellulaires (P), koniocellulaires (K) et magnocellulaires (M) qui mènent l'information aux aires visuelles primaires via les radiations optiques. L'information aboutit par projections au niveau de la substance blanche du cortex situé en dessous et au dessus de la fissure calcarine du lobe occipital (**Figure 21**) (Aoki and Siekevitz, 1988; Callaway, 2005; Purves et al., 2001c; Solomon and Lennie, 2007; Zhang et al., 2012b).



**Figure 21 : chemin visuel dominant chez les primates.** Au niveau des CGL, les axones des cellules ganglionnaires se retrouvent dans six couches de neurones dont quatre couches parvocellulaires (P) et deux couches magnocellulaires (M). Les couches koniocellulaires (K) s'intercalent entre les couches P et M. Les axones des neurones CGL projettent au niveau du cortex visuel primaire. Les neurones P majoritairement dans la couche 4Cβ, les neurones M dans la couche 4Cα et les neurones K dans la couche 4A et en bas de la couche 3. Adapté de Purves et al., 2001c; Solomon and Lennie, 2007.

### **I.2.1.2 Les niveaux scotopique et photopique**

Différents systèmes entrent en jeu pour conduire le message lumineux jusqu'au cerveau en fonction de l'intensité lumineuse. Le système photopique (Ph) va faire intervenir les cônes alors que le système scotopique (Sc) utilise les bâtonnets (Purves et al., 2001b).

### I.2.1.2.1 Le niveau scotopique

Lorsque la luminance, c'est-à-dire la sensation visuelle qu'on a de la lumière, est faible, le système Sc est actif (Figure 22). Il ne contient pas de cellules ganglionnaires qui lui sont propres. Cela implique qu'il va utiliser celles du système Ph pour véhiculer l'information.

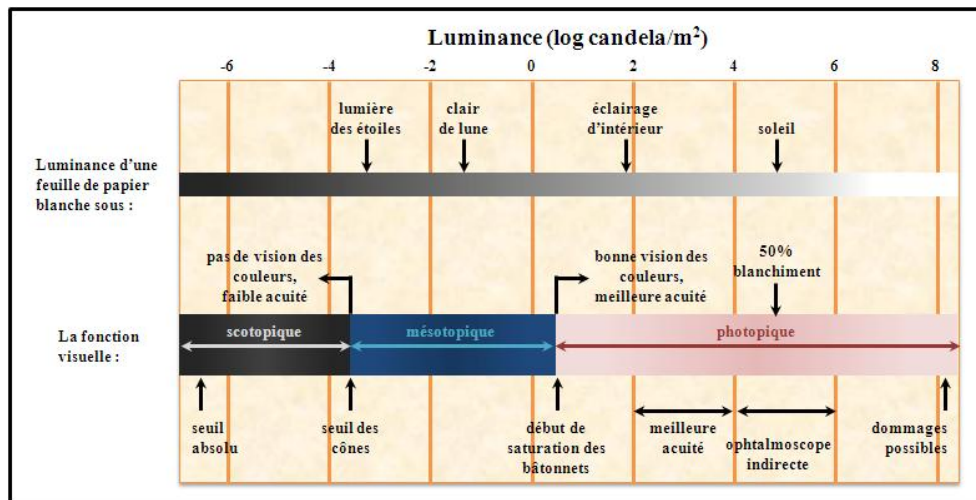


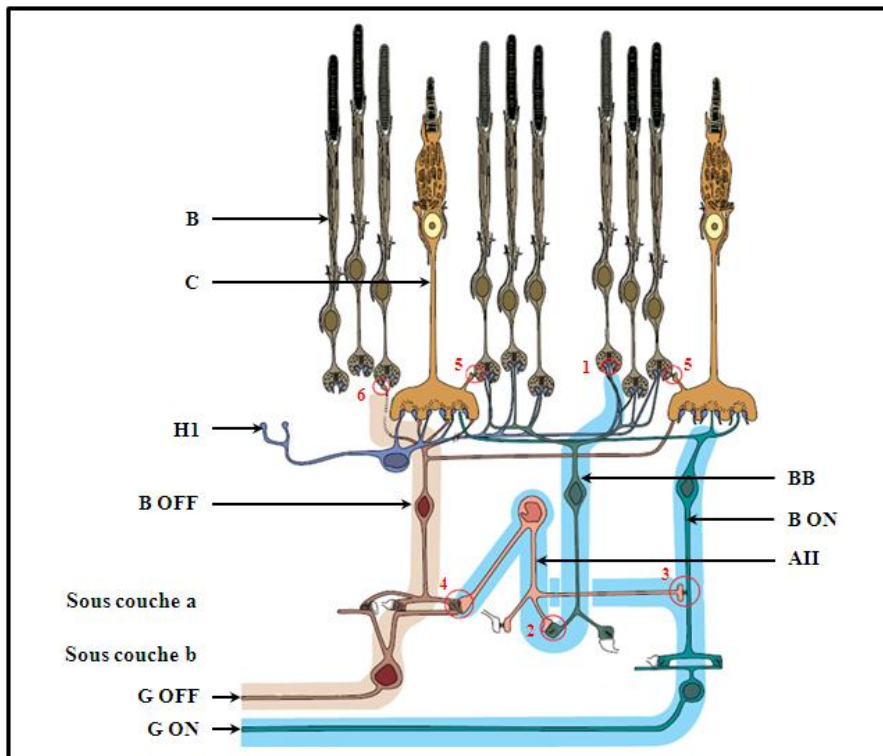
Figure 22 : représentation de la gamme des valeurs de luminance sur laquelle les systèmes visuels opèrent.

Aux plus bas niveaux lumineux (niveaux scotopiques), seuls les bâtonnets sont activés. Les cônes commencent à percevoir lorsque le niveau lumineux atteint la lumière des étoiles (début du niveau mésotopique). Ils sont seuls à fonctionner lorsque la lumière est relativement vive (niveaux photopiques). Modifié de Purves et al., 2001b.

Différents chemins impliquant les bâtonnets ont été mis à jour (Figure 23) (Bloomfield and Miller, 1986; Bloomfield and Dacheux, 2001; Callaway, 2005; Deans et al., 2002; Sharpe and Stockman, 1999; Strettoi et al., 1992, 2010; Vardi and Smith, 1996; Völgyi et al., 2004) :

- ♦ pour la principale voie de transmission du signal, le message reçu par les bâtonnets passe chez les cellules bipolaires de bâtonnets (BB). Puis, à l'étage inférieur, les AII conduisent l'information aux cellules ganglionnaires du système Ph qui est à l'arrêt faute d'intensité lumineuse suffisante pour stimuler les cônes. Les AII conservent le sens du signal électrique lorsqu'elles entrent en contact avec des cellules bipolaires de cônes ON (B ON) et inversent le sens du signal lorsqu'elles entrent en contact avec des cellules bipolaires de cônes OFF (B OFF). A leur tour les cellules ganglionnaires ON (G ON) et OFF (G OFF) vont propager le message au cerveau en respectant les modes ON et OFF ;
- ♦ la seconde voie de conduction du signal entre en jeu lorsque la luminosité augmente. Cette voie passe par les jonctions qui existent entre les cônes et les bâtonnets. Le signal est, dans ce cas, directement transmis des bâtonnets aux cônes par l'intermédiaire de jonctions gap. Le signal est ensuite relayé aux cellules B ON et B OFF qui portent le signal aux cellules G ON et G OFF ;

- ♦ la troisième voie n'implique que des liaisons entre les bâtonnets. Elle intervient pour conduire l'information OFF. Les bâtonnets entrent en contact direct avec des B OFF qui vont à leur tour transmettre le signal aux cellules G OFF. Cette voie n'a pas d'équivalent dans la voie ON.



**Figure 23 : chemins du signal lumineux des bâtonnets et des cônes dans la rétine de mammifères.** Avec B : bâtonnet, C : cône, H1 : cellule horizontale type 1, B OFF et B ON : cellule bipolaire de cône OFF et ON, BB : cellule bipolaire de bâtonnet, AII : cellules amacriennes II, G OFF et G ON : cellules ganglionnaires OFF et ON. 1 : synapse B/BB glutamatergique à récepteur métabotrope (inverse le signe), 2 : synapse B/AII glutamatergique (conserve le signe), 3 : jonction gap AII/B ON (conserve le signe), 4 : synapse glycinergique AII/B OFF (inverse le signe), 5 : jonctions gap B/C (conserve le signe) pour le chemin OFF (à gauche) et le chemin ON (à droite), 6 : synapse B/B OFF glutamatergique à récepteur ionotrope (conserve le signe). Modifié de Sharpe and Stockman, 1999.

#### I.2.1.2.2 Le niveau photopique

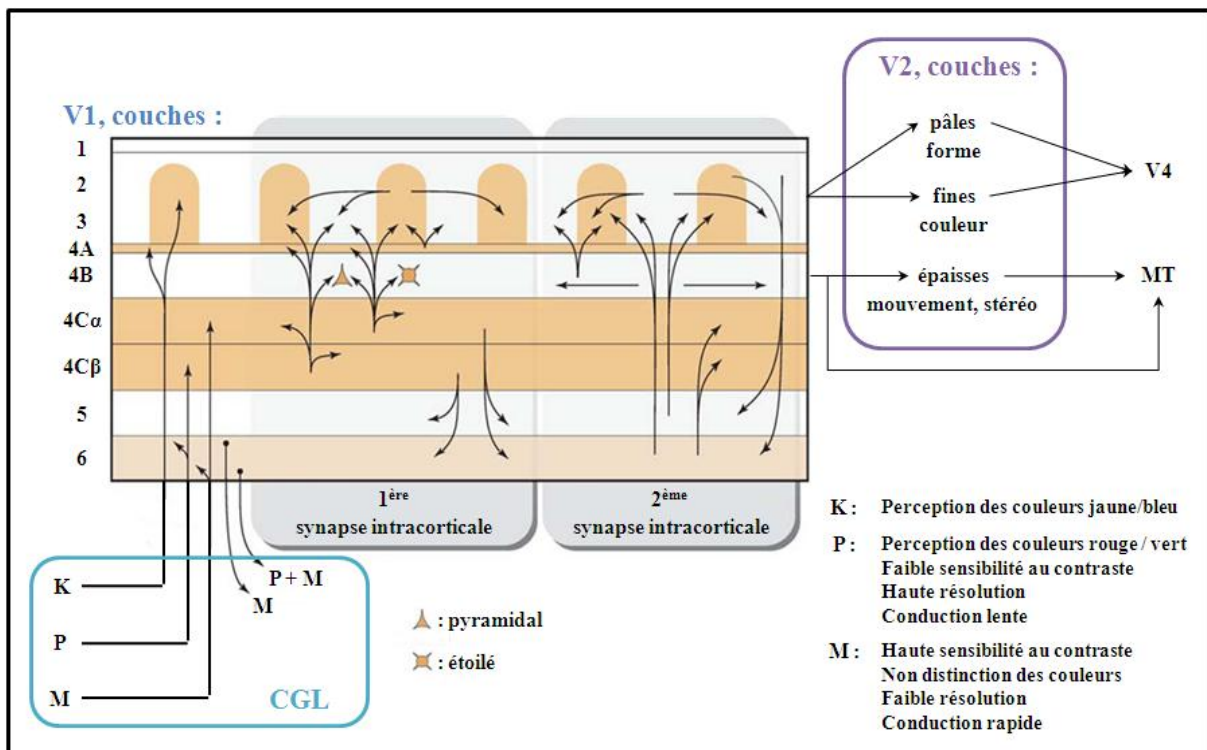
Lorsque la lumière atteint des niveaux dits photopiques, aux alentours d'une luminance de  $2 \log \text{ candela/m}^2$ , le système Ph entre en action (**Figure 22**). Dans ce système, le message lumineux est véhiculé par les cônes jusqu'aux aires visuelles supérieures. Il se décompose en trois voies (Sincich and Horton, 2005; Yoonessi and Yoonessi, 2011) :

- ♦ la voie P ou Parvo transmet parallèlement les informations issues des cônes M et L en utilisant les B ON et OFF puis les G ON et G OFF en respectant la séparation des voies ON et OFF (Bloomfield and Miller, 1986; Famiglietti and Kolb, 1976; Nelson et al., 1978). Elle code le vert et le rouge qui permettent de visualiser les forts contrastes et ainsi de voir les détails fins (Shapley and Victor, 1981). C'est la voie majoritaire de la transduction du signal et le premier

canal de vision des couleurs. Elle est empruntée par le système Sc lorsque la luminance est trop faible pour stimuler les cônes ;

- ♦ la voie M ou Magno transmet les informations des cônes M et L sans faire de distinction. Contrairement à la voie P, elle code le faible contraste et les fréquences temporelles élevées et donc le mouvement (Livingstone and Hubel, 1988) ;
- ♦ la voie K ou Konio reçoit les informations des cônes S et code le bleu et le jaune. C'est la deuxième voie permettant la vision des couleurs (Hendry and Calkins, 1998; Hendry and Reid, 2000).

Les signaux provenant de ces voies projettent dans les CGL puis dans les aires visuelles primaires (V1), en conservant leurs deux modes de réponse ON et OFF (Callaway, 2005), puis dans les aires visuelles secondaires (V2) et enfin dans les aires supérieures telles que le lobe temporal moyen (MT) et l'aire V4. Les connexions entre les CGL et V1 sont bien décrites mais la transmission du signal à V1 à V2 et aux aires supérieures sont toujours à l'étude car les résultats divergent selon les modèles animaux et les techniques utilisées (Figure 24) (Sincich and Horton, 2005).



**Figure 24 : schéma synthétique du système visuel.** Les voies Konio (K), Parvo (P) et Magno (M) des corps géniculés latéraux (CGL) projettent au niveau de l'aire visuelle primaire (V1). Puis au niveau des 1<sup>ères</sup> et 2<sup>èmes</sup> synapses intracorticales, les neurones, dont les pyramidaux et les étoilés, vont projeter à leur tour au sein des couches de V1. Le passage de V1 à l'aire visuelle secondaire (V2) est à l'heure actuelle toujours à l'étude. Il est admis que les couches 2/3 se projettent sur les couches pâles et fines de V2 qui sont responsables de la détection des formes et des couleurs alors que la couche 4B diffuse à la fois sur les couches épaisses responsables de la

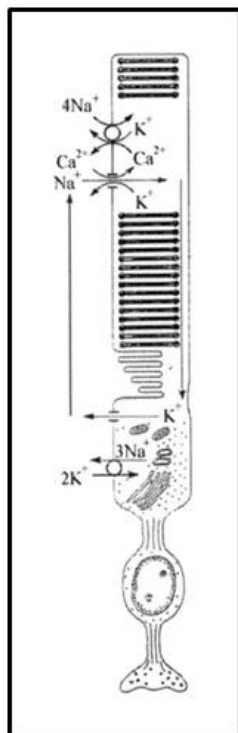
perception du mouvement, de la profondeur, de l'orientation et sur le lobe temporal moyen (MT). Les couches pâles et fines de V2 projettent à leur tour sur l'aire supérieure visuelle (V4). Modifié de Sincich and Horton, 2005.

## I.2.2 La vision

Pour voir, notre organisme met en jeu une cascade de réactions qui modifient l'état de l'ensemble de la RN et de l'EPR afin que l'influx visuel formé puisse se propager le long des voies visuelles pour atteindre les aires visuelles corticales.

### I.2.2.1 Le courant d'obscurité

Lorsque nos yeux sont fermés ou que nous nous trouvons dans l'obscurité, la RN n'est pas stimulée pourtant les bâtonnets et les cônes sont dans un état fonctionnel de base. Les canaux sodiques et calciques qu'ils contiennent au niveau des SE sont maintenus ouverts par des molécules de guanosine monophosphate cyclique (GMPc) qui conduisent à une forte concentration intracellulaire en ions  $\text{Na}^+$  et  $\text{Ca}^{2+}$  (Bauer, 1996; Yau, 1994a). Ce flux cationique ressort au niveau du SI grâce à un système de transport actif d'ions  $\text{K}^+$ . Il correspond à un état dépolarisé des photorécepteurs, dans lequel le glutamate est relâché de façon continue (Nawy and Jahr, 1991). Cet état de dépolérisation permet la circulation des ions, connue sous le nom de courant d'obscurité (Figure 25) (Arshavsky et al., 2002; Hagins et al., 1970; Kolesnikov and Kefalov, 2012; Korenbrot and Cone, 1972; Pepe, 2001).



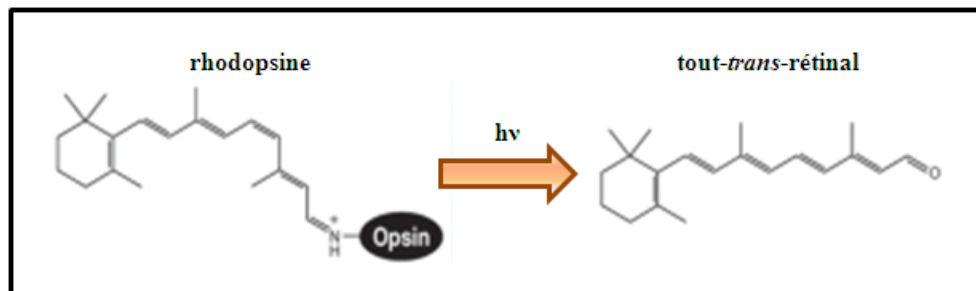
**Figure 25 : schéma d'un bâtonnet de rétine de vertébré avec le diagramme de circulation du courant d'obscurité.** Un échangeur d'ions fait entrer les ions  $\text{Na}^+$  et  $\text{Ca}^{2+}$  au niveau des segments externes. Ces ions diffusent dans la cellule et ressortent au niveau du segment interne, principalement sous forme d'ions  $\text{K}^+$ . Les gradients d'ions  $\text{Na}^+$  et  $\text{K}^+$  sont maintenus grâce à une pompe adénosine-tri-phosphate (ATP)-dépendante, échangeant  $3\text{Na}^+$  contre  $2\text{K}^+$ , située au niveau du SI alors que le  $\text{Ca}^{2+}$  est éjecté par un échangeur  $4\text{Na}^+ / 1\text{Ca}^{2+}, 1\text{K}^+$ , dont l'énergie dépend du gradient sodium transmembranaire. De Pepe, 2001.

### **I.2.2.2 La phototransduction**

Lorsque nos yeux sont ouverts, ou que la luminosité augmente, l'état de base va être modifié car la lumière traverse alors la cornée (translucide), l'humeur aqueuse, la pupille de l'iris (qui s'ouvre et se ferme pour moduler l'intensité lumineuse), le cristallin (qui focalise la lumière) et l'humeur vitrée avant d'atteindre la rétine qui transformera l'énergie lumineuse en activité nerveuse. C'est la phototransduction du signal effectuée par les photorécepteurs qui vont convertir la lumière qu'ils reçoivent en un signal interprétable par le système nerveux. Ces mécanismes sont mieux connus pour les bâtonnets que pour les cônes car les modèles animaux utilisés sont des rongeurs tels que la souris qui possède une rétine majoritairement constituée de bâtonnets (Burns and Pugh, 2010; Fu and Yau, 2007; Jastrzebska et al., 2010; Korenbrot, 2012; Ridge et al., 2003; Palczewski, 2012).

#### **I.2.2.2.1 Activation**

Pour détecter les photons composant la lumière, les bâtonnets et les cônes utilisent les propriétés du 11cRAL, qui est un dérivé photosensible de la vitamine A (Saari, 2012), lié de façon covalente aux molécules d'opsine portées par les SEP (Maeda et al., 2008; Morris et al., 2009; Pitt et al., 1955). En présence de l'énergie des photons ( $h\nu$ ), le rétinale va être isomérisé passant de la forme 11-*cis* à sa forme isomère tout-*trans* (Figure 26) (Choe et al., 2011; Saari, 2012).



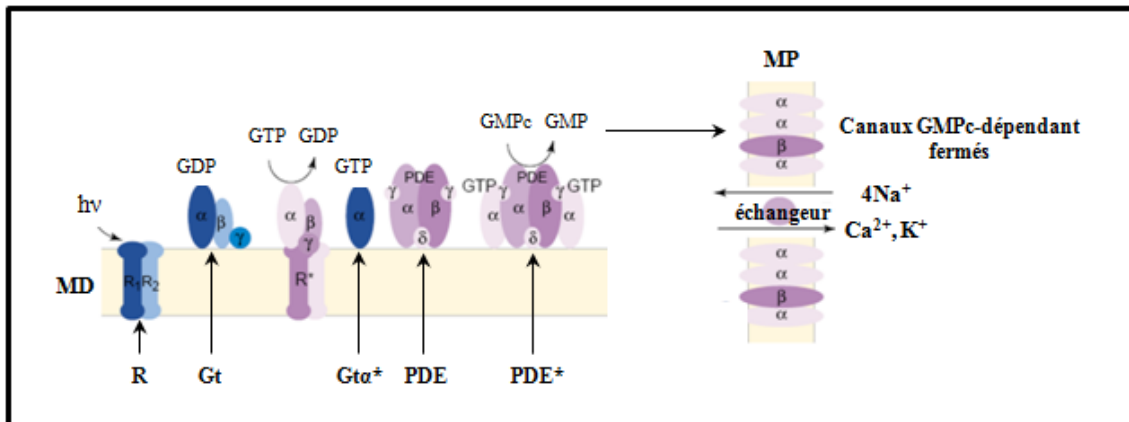
**Figure 26 : isomérisation du 11-*cis*-rétinal.** Le 11-*cis*-rétinal lié de façon covalente à l'opsine forme la rhodopsine. L'arrivée de l'énergie lumineuse  $h\nu$  va l'isomériser en tout-*trans*-rétinal au niveau des disques des SE des bâtonnets. Adapté de Maeda et al., 2009.

La rhodopsine (R) peut être activée par seulement deux photons arrivant sur un bâtonnet (Baylor et al., 1979). Il faut que l'intensité lumineuse soit 1000 fois supérieure pour que les cônes puissent être excités (Donner, 1992). Après l'isomérisation, R change de conformation, elle est dite activée (R\*). Elle va alors agir avec plusieurs transducines (Gt) qui sont des protéines G présentes au côté de R au niveau de la membrane des disques. Les transducines sont composées de trois sous unités :  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  (Bubis, 1995; Fung et al., 1981). R\* va catalyser l'échange de la guanosine di-phosphate (GDP) fixée à la sous unité  $\alpha$  en guanosine tri-phosphate (GTP) ce qui va activer cette sous unité (Gt $\alpha^*$ ).

Les sous unités Gt $\alpha^*$  vont aller se fixer aux 2 sous unités inhibitrices  $\gamma$  de la phosphodiesterase (PDE) qui est une protéine tétramérique associée à la membrane des disques des SE (Wensel and



Stryer, 1986). Ainsi les deux autres sous unités  $\alpha$  et  $\beta$  de la PDE activée (PDE\*) vont pouvoir hydrolyser le GMPc en 5'GMP inactif (Figure 27) (Leskov et al., 2000) . Cette inactivation conduit à une chute du taux de GMPc intracellulaire ce qui va fermer les récepteurs dépendant au GMPc situés au niveau de la membrane plasmique des bâtonnets. Cette fermeture empêche l'entrée des ions  $\text{Na}^+$  et  $\text{Ca}^{2+}$ .



**Figure 27** : schéma de la propagation du signal lumineux lors de la phototransduction chez les vertébrés. Avec MD : membrane d'un disque de bâtonnet,  $h\nu$  : photon, R : rhodopsine, Gt : transducine, R\* : R activée, Gt $\alpha^*$  : Gt activée, PDE : phosphodiésterase, PDE\* : PDE activée, GDP : guanosine di-phosphate, GTP : guanosine tri-phosphate, GMPc : guanosine mono-phosphate cyclique, GMP : guanosine mono-phosphate, MP : membrane plasmique du bâtonnet. Modifié de Ridge et al., 2003.

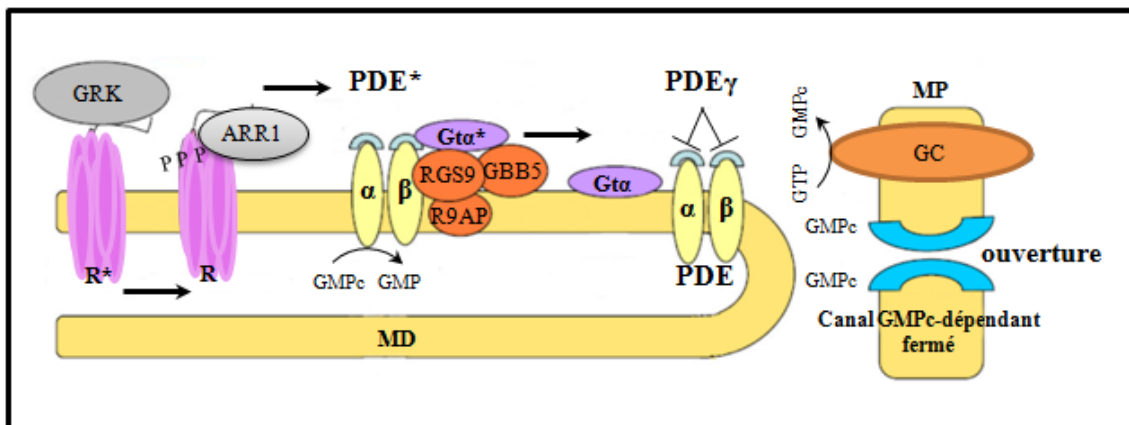
En parallèle, l'échangeur d'ions présents au niveau du SE (Figure 25) continue de fonctionner ce qui fait chuter le taux de  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire. Ainsi, en présence de lumière, il y a une hyperpolarisation de la membrane plasmique des bâtonnets (Burns and Baylor, 2001; Pepe, 2001; Ridge et al., 2003) et une chute de la sécrétion du glutamate au niveau des synapses. Ceci va conduire le message de photoactivation au niveau des seconds neurones en dépolarisant les cellules BB et les B ON alors que les B OFF s'hyperpolarisent.

#### 1.2.2.2.2 Amplification

Durant cette activation de la phototransduction, un phénomène d'amplification du signal a lieu en parallèle. R\* est capable d'activer plusieurs centaines de molécules Gt $\alpha$  et les Gt $\alpha^*$  peuvent, à leur tour, activer une centaine de PDE $\gamma$ . Enfin un dimère de PDE $\alpha\beta$  est capable d'hydrolyser 2200 molécules de GMPc par seconde (Arshavsky et al., 2002; Leskov et al., 2000; Stryer, 1983).

### I.2.2.2.3 Terminaison

Pour que les photorécepteurs puissent à nouveau percevoir le signal lumineux ou signaler des modifications rapides de luminosité (adaptation à la lumière), il faut qu'ils retournent rapidement à un état basal, celui du courant d'obscurité. Ce retour à la normale implique l'inactivation de R\*, Gtα\* et PDE\* ainsi qu'une restauration du taux de GMPc intracellulaire (Figure 28) (Hajkova et al., 2010; Ridge et al., 2003; Teller et al., 2003).



**Figure 28 : schéma de la terminaison de la phototransduction.** Avec GRK : protéine G couplée aux récepteurs kinases, R\* : rhodopsine activée, ARR1 : arrestine1, R : rhodopsine, PDE\* : phosphodiésterase activée, GMPc : guanosine mono-phosphate cyclique, GMP : guanosine mono-phosphate, MD : membrane d'un disque de bâtonnet, Gtα\* : transducine activée, RGS9-1 : *regulator of G protein Signalling, 9th family member, first splice variant*, GBB5 : *G protein beta 5*, R9AP : *regulator of signaling 9 anchor protein*, Gtα : transducine inactive, PDEγ : sous-unité γ de la phosphodiésterase inhibe les sous-unités α et β, PDE : phosphodiésterase, MP : membrane plasmique du bâtonnet, GC : guanylate cyclase, GTP : guanosine tri-phosphate. Adapté de Hajkova et al., 2010.

#### I.2.2.2.3.1 Inactivation de R\*

La R\* va être désactivée dans un processus à deux étapes. Tout d'abord, les protéines G couplées aux récepteurs kinases (GRK's) vont phosphoryler R\*. Lorsque le nombre de phosphorylation atteint un seuil de 3 (Vishnivetskiy et al., 2007), l'arrestine (ARR1) va venir se fixer sur ces sites phosphorylés pour bloquer l'activation de Gt par exclusion stérique (Krupnick et al., 1997). Les protéines GRK's chez les mammifères sont au nombre de sept. Chez L'Homme, les GRK 1 à 3, et les GRK 5 à 7 sont exprimées au niveau de la rétine, la GRK1 étant spécifiquement exprimée au niveau des cônes (Maeda et al., 2003; Palczewski, 1997). La R devenue inactive peut à nouveau capter les photons.

#### I.2.2.2.3.2 Inactivation de Gtα\* et de PDE\*

L'inactivation de la transducine va se faire par sa propre activité GTPase qui va transformer le GTP en GDP. Cette inactivation est accélérée par la protéine RGS9-1 (pour *regulator of G protein Signalling, 9th family member, first splice variant*) qui se complexe aux protéines GBB5 (pour *G*



*protein beta 5*) et R9AP (pour *regulator of signaling 9 anchor protein*) et les deux sous-unités inhibitrices  $\gamma$  de la PDE. Dans les bâtonnets, la protéine régulatrice RGS9-1 va hydrolyser le GTP de la sous-unité  $G\alpha^*$  en GDP ce qui va inactiver la transducine (Arshavsky et al., 2002; Cowan et al., 2001).  $G\alpha$  se dissocie des PDE $\gamma$  qui vont reprendre leur activité inhibitrice des sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  (Makino et al., 2003). Les  $G\alpha$  et les PDE peuvent être réactivées lors de l'absorption de nouveaux photons par les molécules d'opsine ou rhodopsine.

#### **I.2.2.2.3.3 Rôle des ions $Ca^{2+}$**

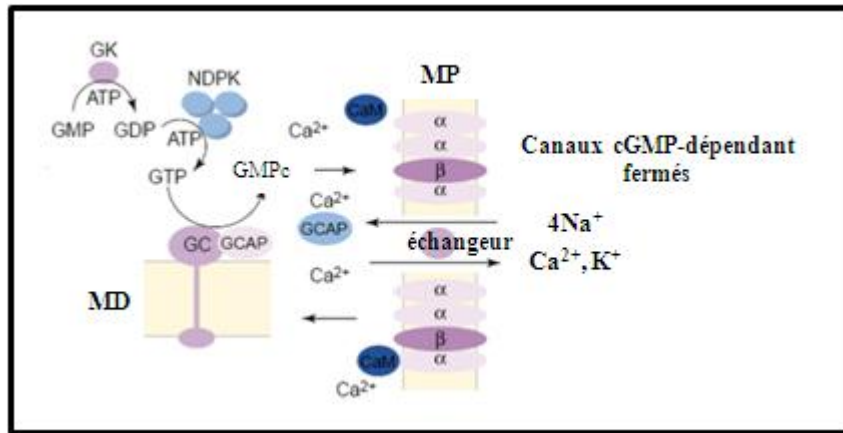
En absence de lumière, la concentration intracellulaire en ions  $Ca^{2+}$  est forte. Ces ions ont trois cibles distinctes sur lesquelles ils exercent une rétroaction négative en empêchant la synthèse de GMPc. Ils se fixent aux protéines GCAPs (pour *Ca<sup>2+</sup> binding proteins*) qui vont inhiber la synthèse de GMPc par les *guanylate cyclases* (GC). Ils vont stimuler la fixation des calmodulines (CaM) sur les canaux GMPc-dépendants ce qui réduit l'affinité de ces canaux pour le GMPc. Enfin, ils se fixent à la recoverine et inhibent l'action GRK's (Burns and Baylor, 2001; Cornwall and Ala-Laurila, 2007; Yau, 1994b).

Comme vu précédemment, en présence de lumière, la fermeture des canaux GMPc-dépendants entraîne une chute de la concentration intracellulaire des ions  $Ca^{2+}$ . Cette chute va permettre aux ions  $Ca^{2+}$  de stopper la rétroaction négative en permettant la synthèse de GMPc. En effet, la concentration du GMPc est déterminée non seulement par l'hydrolyse du GMPc en 5'GMP sous l'action de PDE\* mais aussi par sa synthèse par les GC (Baehr and Palczewski, 2007; Garbers, 1999; Garbers et al., 2006; Pannbacker, 1973; Pugh et al., 1997).

La régulation des GC est sous le contrôle des GCAP qui vont être activées suite à la fixation de  $Mg^{2+}$  à la place des ions  $Ca^{2+}$  (Dizhoor et al., 2010). Le GMPc va pouvoir être synthétisé à partir du GTP cytoplasmique. Ce GTP a été précédemment produit par les GK (pour *guanylate kinase*) et les NDPK (pour *nucleoside diphosphate kinase*) à partir du 5'GMP inactif issu de l'activité des PDE\* (**Figure 29**). GC2 semble être spécifique aux bâtonnets alors que GC1 est présente à la fois dans les cônes et les bâtonnets (Koch et al., 2002).

En parallèle, les CaM endogènes, fixées à la sous-unité  $\beta$  des canaux GMPc-dépendants, grâce à la forte concentration en ions  $Ca^{2+}$ , vont, suite au manque d'ions  $Ca^{2+}$ , se dissocier des canaux GMPc-dépendants ce qui augmente l'affinité entre les canaux et le GMPc (**Figure 29**). Enfin, l'absence des ions  $Ca^{2+}$  permet aux GRK de fonctionner et ainsi d'inactiver les R\*.

Ainsi, l'augmentation du taux de GMPc au niveau des SEP va induire une réouverture possible des canaux sodiques et calciques ce qui va conduire à un retour au courant d'obscurité et à un état de sensibilité maximal des photorécepteurs.



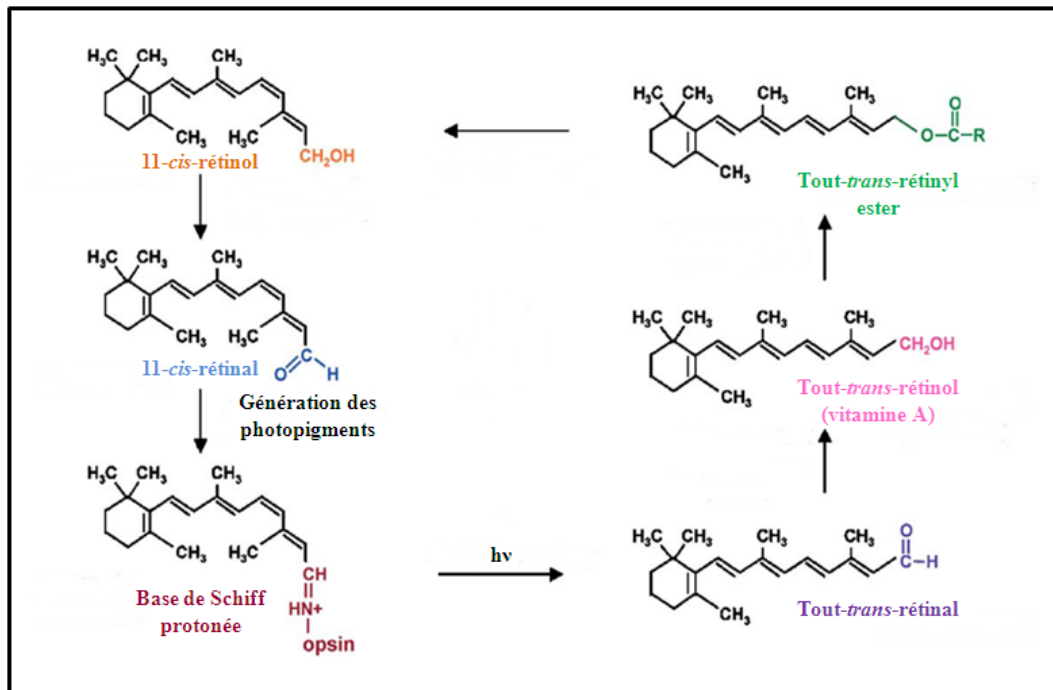
**Figure 29 : conséquence de la chute du taux de  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire chez les vertébrés.** Avec MD : membrane d'un disque de bâtonnet, GK : *guanylate kinase*, ATP : adénosine tri-phosphate, GMP : guanosine mono-phosphate, GDP : guanosine di-phosphate, NDPK : *nucleoside diphosphate kinase*, GTP : guanosine tri-phosphate, GC : guanylate cyclase, GCAP : *Ca<sup>2+</sup> binding proteins*, CaM : calmoduline, MP : membrane plasmique du bâtonnet. Modifié de Ridge et al., 2003.

### **I.2.2.3 Régénération des photopigments**

Lorsque la stimulation lumineuse est trop élevée, le passage de la forme *AtRAL* en *11cRAL* n'est plus possible car il se produit un phénomène de blanchiment (ou *bleaching*) de l'opsine qui se détache de l'*AtRAL*. Ce dernier va être transformé en tout-*trans* rétinol (*AtROL*) par les *rétinol déhydrogénases* (RDH) (Alpern et al., 1972; Cornwall et al., 1990; Fain et al., 2001; Parker and Crouch, 2010).

L'épuisement du *11cRAL* au niveau des bâtonnets est évident lorsqu'après avoir vu une lumière vive l'œil est incapable de distinguer les formes dans l'obscurité. Pour les cônes, après une très forte exposition à la lumière qui causent le blanchiment des pigments, leur régénération est ralentie peut être en raison de l'épuisement du stock de rétinol (Mahroo and Lamb, 2012).

Les photopigments vont devoir être régénérés, c'est-à-dire que les molécules d'opsine vont devoir à nouveau se lier à des molécules de *11cRAL*. La régénération métabolique de la rhodopsine a lieu au niveau de l'EPR (Lamb and Pugh, 2006) alors que la régénération des trois photopigments des cônes implique les cellules de Müller (Wang and Kefalov, 2009, 2011). Ces régénérations s'effectuent selon le cycle visuel décrit dès 1968 par George Wald (**Figure 30**) (Wald, 1968).



**Figure 30** : représentation schématique des réactions du cycle visuel impliquant les conversions de la vitamine A et du 11-cis-rétinal. Avec  $h\nu$  : photon. D'après Thompson and Gal, 2003.

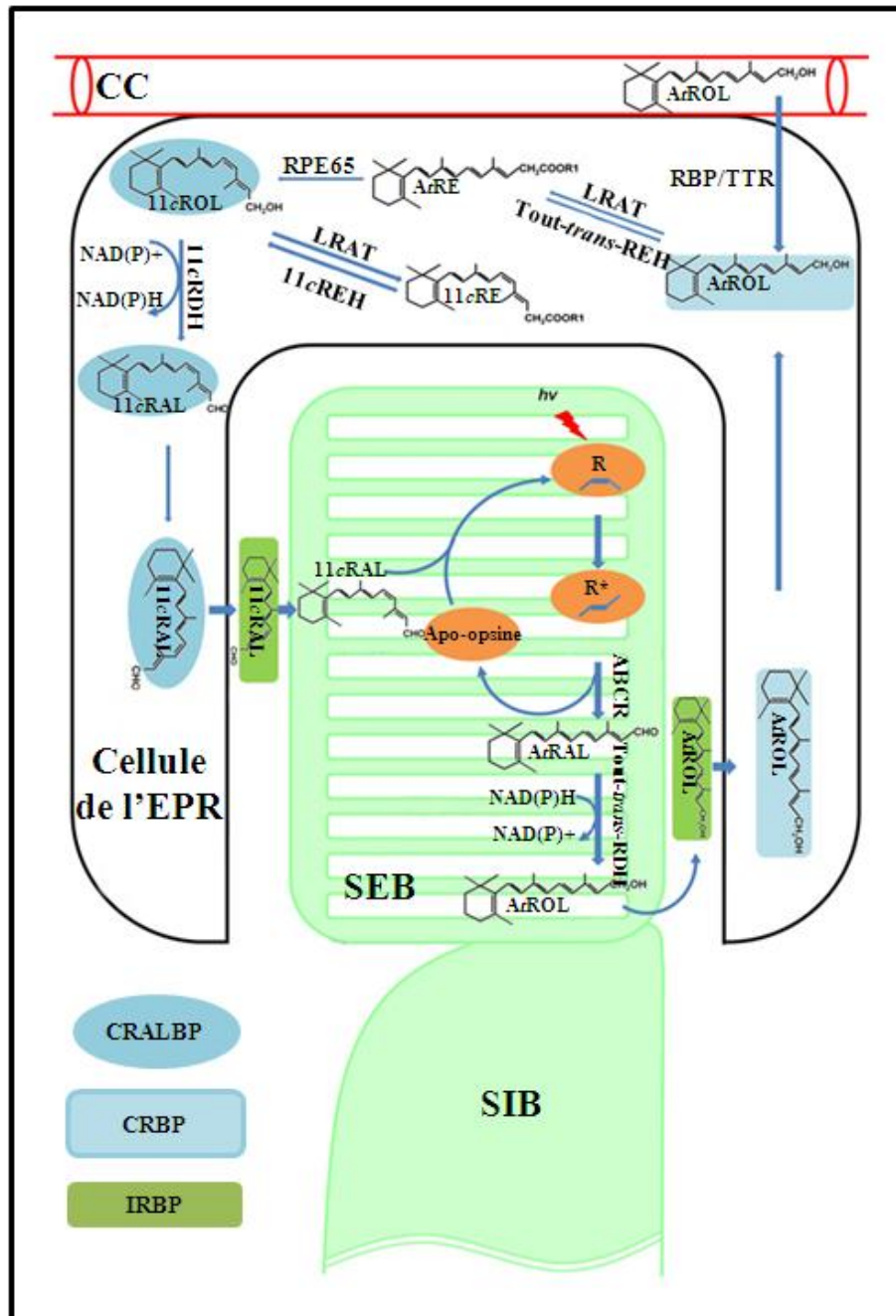
#### I.2.2.3.1 Description du cycle visuel pour les bâtonnets

Comme décrit précédemment, l'absorption d' $h\nu$  par la R induit une isomérisation du rétinol de sa forme 11cRAL lié à l'opsine (11-cis-RAL + opsine) à la forme AtRAL au niveau des disques du SE des bâtonnets. L'AtRAL va être amené au niveau du cytoplasme sous l'action d'une ABCR (pour *ATP-binding cassette transporter*) spécifique de la rétine. Sous l'action d'une déshydrogénase (*trans*-RDH) dépendante de la nicotinamide adenine dinucléotide phosphate (NAPDH), l'AtRAL va être réduit en AtROL aussi nommé vitamine A. L'AtROL peut également provenir du système vasculaire choroïdien par l'intermédiaire du complexe RBP/TTR (pour réciproquement *retinol-binding protein* et *transthyretin*). La vitamine A va être captée par l'EPR dans lequel elle va se complexer à la protéine CRBP (pour *cellular retinol binding protein, Type I*).

La première enzyme de modification de la vitamine A, la lécithine rétinol acyltransférase (LRAT) va alors la *trans*-estérifier en tout-*trans*-retinyl ester (AtRE). Puis une isoméro-hydrolase (Isomerase I/REH) va hydrolyser AtRE en AtROL en libérant de l'énergie et utiliser cette énergie pour isomériser AtROL en 11cROL. RPE65 (pour *retinal pigment epithelium-specific protein 65 kDa*) qui est une protéine spécifique du réticulum endoplasmique lisse de l'EPR, est requise pour cette isomérisation alors que son activité isomérase intrinsèque n'a pour l'heure pas été montrée.

LRAT peut alors estérifier le 11cROL reformant ainsi du 11-cis-retinyl ester (11cRE) qui reste stocké dans l'EPR. Si besoin, il pourra être relâché sous forme de 11cROL sous l'action d'une 11-cis

retinyl ester hydrolase (11cREH). Une troisième enzyme, une déshydrogénase spécifique du 11cROL, RDH5 (ou 11cRDH) va pouvoir oxyder le 11cROL en 11cRAL. Cette forme oxydée, fixée à la protéine CRALBP (pour *cellular retinal binding protein*), va alors regagner le SE du bâtonnet (SEB) selon des mécanismes non élucidés mais qui impliqueraient une protéine de l'espace subrétinien, l'IRBP (pour *intersticial retinal binding protein*). Elle va à nouveau pouvoir se lier à l'opsine pour former la rhodopsine (**Figure 31**) (Miyazono et al., 2008; Muniz et al., 2007; Tang et al., 2011; Thompson and Gal, 2003).



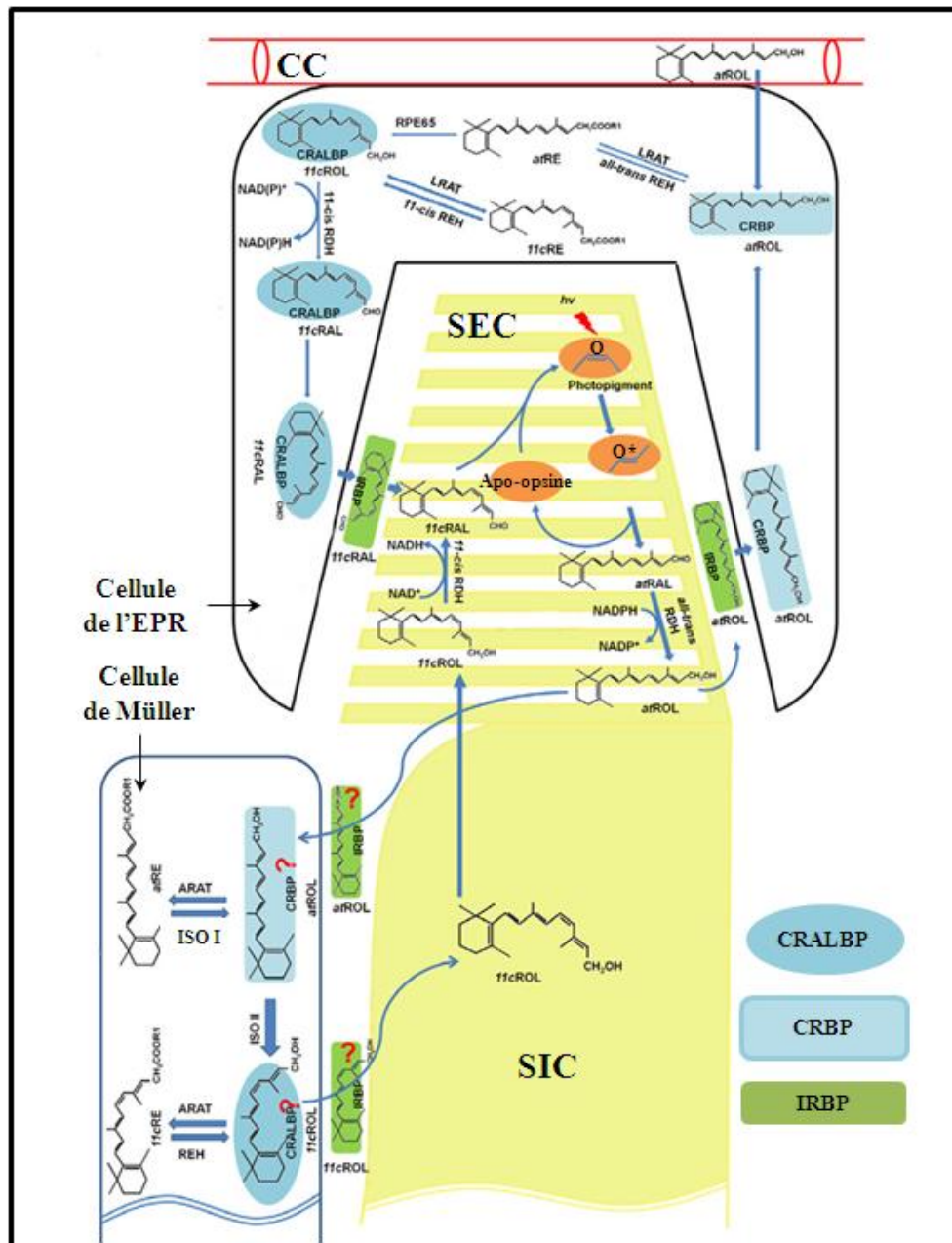
**Figure 31 :** représentation schématique du cycle visuel des bâtonnets intégrant l'EPR. Lors de la régénération de la rhodopsine (R), deux sources de AtROL existent. L'une d'elles est les choriocapillaires de la choroïde (CC), l'autre provient des SE des bâtonnets (SEB) après qu'ils aient été exposés à la lumière (hv). Le

*AtRAL* situé au niveau des disques des bâtonnets va passer dans le cytoplasme du SEB grâce à ABCR où il va être réduit en *AtROL* par une tout-*trans*-RDH. L'IRBP va faciliter son transport dans le pôle apical de l'EPR où il va se fixer à une seconde protéine, CRBP. Il va alors être transféré vers le pôle basal de l'EPR où LRAT va l'estérifier en *AtRE*. Cet ester va être hydrolysé et isomérisé en *11cROL* par une isoméro-hydrolase et RPE65. Le *11cROL* fixé à CRALBP est oxydé en *11cRAL* par une *11cRDH* et migre au niveau du pôle apical de l'EPR où, une fois pris en charge par IRBP, il va rejoindre le SEB pour pouvoir se recombinaison à l'apo-opsine pour former à nouveau de la R. Adapté de Wang and Kefalov, 2009.

#### **I.2.2.3.2 Description du cycle visuel pour les cônes**

De façon analogue à la régénération de la rhodopsine, la régénération des photopigments des cônes se fait suite à l'absorption d'un photon qui induit une isomérisation du rétinol de sa forme *11cRAL* lié à l'opsine (*11-cis-RAL* + opsine) à la forme *AtRAL* au niveau des SE des cônes. Sa réduction en vitamine A se produit sous l'action d'une déshydrogénase (RDH) non identifiée. Grâce à l'IRBP cette forme réduite gagnerait les cellules de Müller où elle va se fixer à CRBP. L'isomérase II va alors la transformer en *11cROL*.

La vitamine A (*AtROL*) peut également être estérifiée en *AtRE* grâce à l'action d'une rétinol acyltransférase (ARAT) puis être à nouveau isomérohydrolysée en *11cROL* sous l'action de l'Isomérase I. Ce *11cROL* peut être stocké dans les cellules de Müller grâce à l'action d'ARAT qui va le convertir en *11cRE*. Il pourra être utilisé au besoin suite à sa reconversion en *11cROL* par une rétinyl ester hydrolase. S'il n'est pas stocké, le *11cROL* peut se fixer à CRALBP puis gagner les cônes où une *11cRDH* va l'oxyder en *11cRAL*. Le *11cRAL* pourra alors se combiner avec les différentes opsines afin de former les photopigments des cônes (**Figure 32**) (Mata et al., 2002; Wang and Kefalov, 2009).



**Figure 32** : représentation schématique du cycle visuel des cônes intégrant l'EPR et les cellules de Müller. Après l'arrivée de photons, le A1RAL est réduit en A1ROL par une RDH au niveau du SE du cône (SEC). Deux possibilités interviennent, cet A1ROL peut être transporté au niveau de l'EPR et emprunter le cycle décrit à la **Figure 31** où il peut être transporté dans les cellules de Müller par l'intermédiaire de sa fixation à l'IRBP. Il va se fixer à CRALBP et être converti en 11cROL par l'isomérase II puis regagne le SI du cône (SIC) par la fixation à IRBP. Il va alors atteindre le SEC où il sera oxydé en 11cRAL par une 11cRDH. Il pourra alors se recombinaisonner à l'apo-opsine pour former à nouveau l'iodopsine du cône. L'A1ROL, une fois dans les cellules de Müller, peut être stocké sous forme de A1RE grâce à son estérification par ARAT. Le 11cROL peut également être stocké sous forme de 11cRE toujours grâce à l'action d'ARAT. Les principales enzymes de ce cycle à savoir l'isomérase II et les RDH n'ont pas été identifiées à l'heure actuelle tout comme le rôle exact de CRALBP, CRBP et IRBP. Adapté de Wang and Kefalov, 2009.



## I.3 Origine embryonnaire

Comme décrit précédemment la lumière doit traverser l'ensemble des couches de la rétine neurale avant de pouvoir atteindre les photorécepteurs. Cette situation semble paradoxale mais s'explique par l'origine embryonnaire de l'œil qui provient d'une invagination du diencéphale qui donnera également une partie du futur cerveau. L'œil est donc un prolongement céphalique.

### I.3.1 De l'œuf à l'œil

Comme pour la plupart des organes trois grandes phases peuvent résumer la formation de l'œil *in utero*. La cellule œuf (ou zygote) fruit de la fécondation du spermatozoïde et de l'ovule va subir de nombreux événements cellulaires et moléculaires afin de donner naissance à un organisme adulte (Jones and López, 2006; Gilbert, 2000; Müller, 1997; Railliet, 1895). La période embryonnaire se découpe en deux phases :

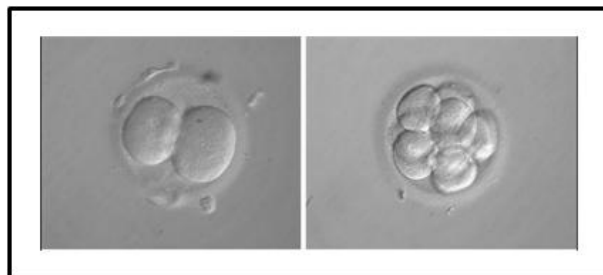
- ♦ l'embryogénèse débute par la formation de l'œuf et se termine par l'individualisation et la plicature de l'embryon nommée délimitation qui intervient lors de la 4<sup>ème</sup> semaine de développement ;
- ♦ l'organogénèse va jusqu'à la huitième semaine de développement et comme son nom l'indique permet la constitution des organes.

Enfin la phase fœtale débute au 3<sup>ème</sup> mois du développement, elle correspond à la maturation de ces organes et mène à la naissance (Stiles and Jernigan, 2010).

#### I.3.1.1 Embryogénèse

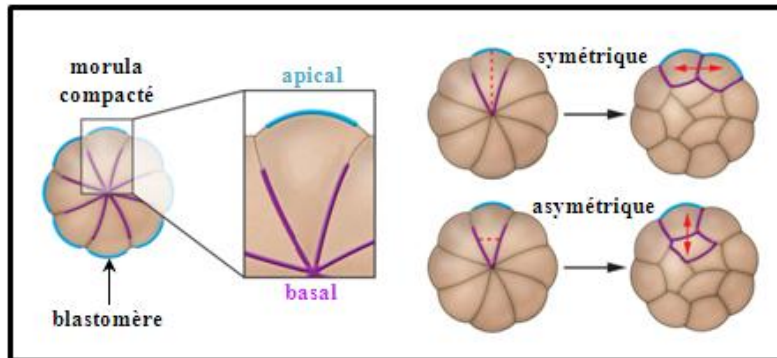
##### I.3.1.1.1 La segmentation

La segmentation est une étape de divisions cellulaires de la cellule œuf par mitose qui va aboutir à la formation de la morula (stade 16 à 32 cellules ou blastomères) quatre jours après la fécondation (**Figure 33**).



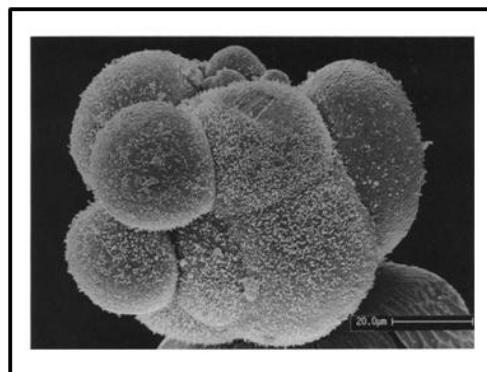
**Figure 33** : différentes étapes de formation de l'embryon humain après fécondation. Avec, à gauche, le premier clivage de l'œuf qui aboutit à la formation de deux cellules deux jours après fécondation et à droite, l'embryon qui comporte huit cellules dès le troisième jour. D'après Mercader et al., 2006.

Ces divisions mitotiques se produisent selon un plan équatorial établi par les globules polaires de façons symétrique ou asymétrique (**Figure 34**) (Chen et al., 2010; Cockburn and Rossant, 2010).



**Figure 34 : polarité chez l'embryon de souris durant la pré-implantation.** Dans la morula compactée, les blastomères se polarisent selon l'axe du contact entre les cellules formant à l'extérieur le pôle apical et à l'intérieur le pôle basal (à gauche). Lorsque l'embryon passe de 8 à 16 cellules, les blastomères se divisant parallèlement à l'axe apical/basal (symétrie), produisent deux cellules polaires externes alors que les blastomères se divisant perpendiculairement (asymétrie), produisent une cellule externe polaire et une cellule interne non polaire. Ces divisions se poursuivent lors du passage de 16 à 32 cellules. Modifié de Cockburn and Rossant, 2010.

Parallèlement, la morula, toujours entourée de la zone pellucide, va subir un phénomène de compaction cela signifie que les blastomères qui la constituent vont entrer en contacts étroits les uns avec les autres (**Figure 35**) (Ducibella et al., 1975; Mercader et al., 2006; Nikas et al., 1996).

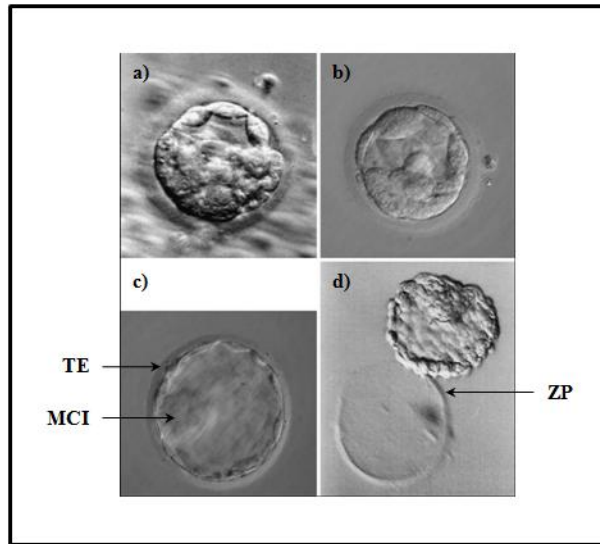


**Figure 35 : photographie au microscope électronique d'une morula humaine, sans zone pellucide, de 10 cellules fixée 4 jours après fécondation.** La compaction n'a pas atteint le même degré chez l'ensemble des blastomères, certains ne présentent plus de séparation alors que d'autres sont clairement identifiables. Enfin leur taille et la densité des microvillosités présentes à leur surface divergent. Barre d'échelle : 20µm. De Nikas et al., 1996.

Les cellules centrales, apolaires, qui se compactent vont donner la masse cellulaire interne (MCI) qui aboutira à la formation de l'embryon lui-même alors que les cellules polaires qui migrent à la



périphérie forment le trophoctoderme (TE) qui donnera naissance aux annexes de l'embryon telles que le placenta. Cette nouvelle structure est nommée blastocyste (**Figure 36**).



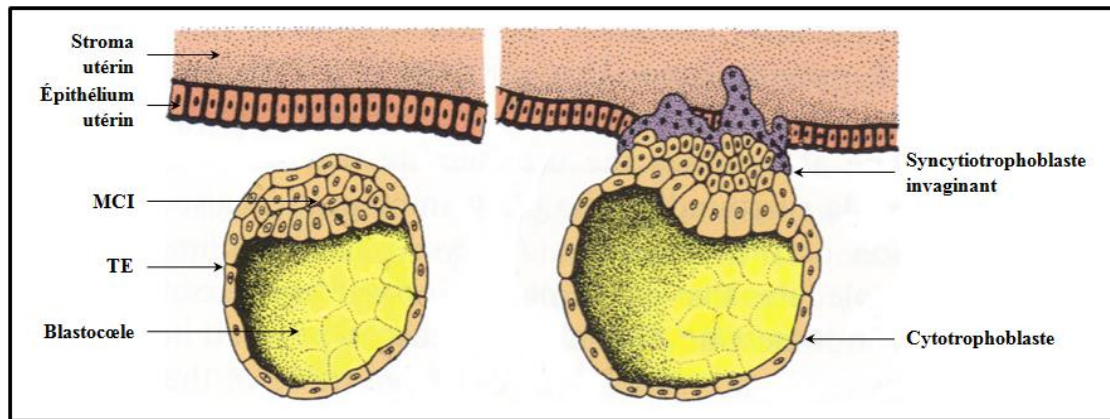
**Figure 36 : différents états du blastocyste humain.** a) un blastocyste primaire lorsque la compaction débute ; b) un blastocyste à cavité lorsque le volume du blastocœle est supérieur à 50% du volume total ; c) un blastocyste étendu qui signifie que le trophoctoderme (TE) et la masse cellulaire interne (MCI) sont visibles ; d) un blastocyste libre de la zone pellucide (ZP). Issu de Mercader et al., 2006.

Durant cette compaction, l'entrée de liquide extérieur, va peu à peu créer une cavité, nommée le blastocœle, entre la MCI et le TE ce qui va entraîner le déchirement de la zone pellucide qui entourait la morula. Le blastocyste libre peut dès lors s'implanter dans l'endomètre utérin (Cockburn and Rossant, 2010; Hamilton and Boyd, 1960; Hannan et al., 2010; Mercader et al., 2006).

#### **I.3.1.1.2 L'implantation**

L'implantation ou nidation a lieu au cours du 8<sup>ème</sup> jour de développement. Le blastocyste entre en contact avec l'endomètre utérin par le pôle contenant la MCI. Le TE va alors fortement proliférer et se diviser en deux couches (**Figure 37**) :

- ♦ le syncytiotrophoblaste qui va permettre l'implantation de l'embryon ;
- ♦ le cytotrophoblaste qui entoure le blastocyste et donnera les membranes extra-embryonnaires.

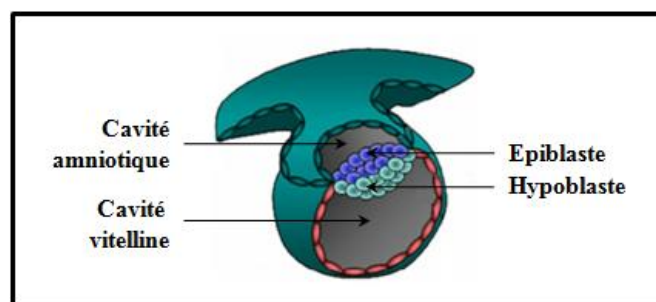


**Figure 37** : schéma de l'implantation du blastocyste. Avec, à gauche : un schéma du blastocyste avant l'implantation et à droite : formation du syncytiotrophoblaste et du cytotrophoblaste à partir du TE qui entre en contact avec la paroi utérine. D'après Jones and López, 2006.

Parallèlement, certaines cellules de la MCI, au contact du blastocœle, vont commencer à se différencier pour former deux couches cellulaires (**Figure 38**) (Docherty et al., 2007; Lawson et al., 1991; Pelton et al., 1998; Tam and Steiner, 1999) :

- ♦ l'épiblaste ou ectoderme primaire se situe en position dorsale ;
- ♦ l'hypoblaste ou endoderme primaire se situe en position ventrale.

Le bourgeon embryonnaire est alors appelé disque di-dermique c'est le début de la gastrulation. D'autres cellules de la MCI vont mourir ce qui va creuser une poche à l'arrière de l'épiblaste qui est la cavité amniotique. Derrière l'hypoblaste se situe une seconde cavité qui est la vésicule vitelline primitive.



**Figure 38** : schéma du gastrula en début de formation. Adapté de Docherty et al., 2007.

### I.3.1.1.3 Mise en place du disque tri-dermique

#### I.3.1.1.3.1 La gastrulation

Au début de la troisième semaine de développement il y a apparition de la ligne primitive (Rivera-Perez, 2007). Elle est due à un épaissement de la face dorsale de l'épiblaste selon l'axe crânio-caudal. Elle va rapidement se creuser pour former une dépression dont l'extrémité proche du centre du disque embryonnaire se renfle circulairement et se creuse en son centre pour former le nœud de Hensen qui est un centre organisateur comme l'est le nœud de Spemann chez les amphibiens (De

Robertis, 2006; Docherty et al., 2007; Harland and Gerhart, 1997; Psychoyos and Stern, 1996; Vieira et al., 2010). Elle établit ainsi l'axe longitudinal de l'embryon et ainsi son plan de symétrie. Il va alors se produire de nombreuses migrations cellulaires notamment induites par ce centre organisateur (**Figure 39a**) :

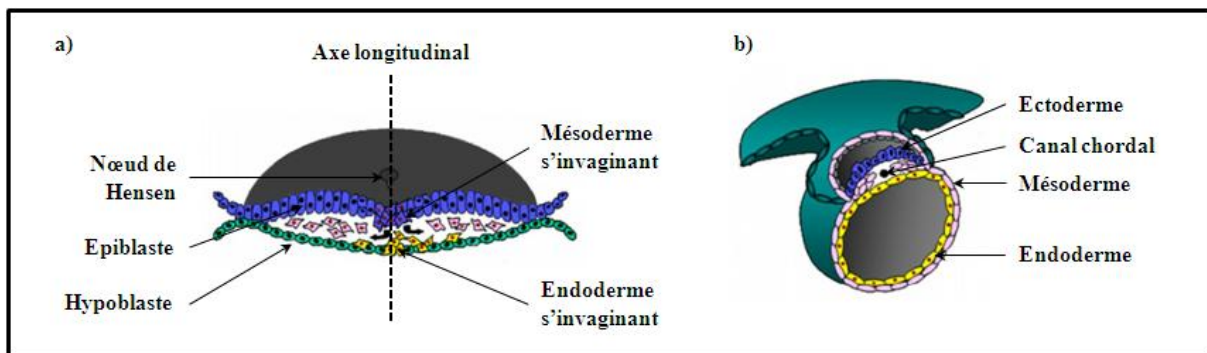
- ♦ des cellules vont s'invaginer sur la face ventrale formant l'endoderme définitif qui remplace l'hypoblaste ;
- ♦ des cellules vont se placer entre l'ectoderme primitif et l'endoderme définitif de façon latérale, crâniale et caudale pour former le mésoblaste.

Ces migrations se terminent en partie caudale par la membrane cloacale et en partie rostrale par la membrane pharyngienne. Ces membranes lient l'ectoderme à l'endoderme. Enfin, les cellules de l'épiblaste n'ayant pas migrées constituent l'ectoderme définitif.

#### **I.3.1.1.3.2 Mise en place de la chorde**

Toujours lors de la troisième semaine, à partir du nœud de Hensen, des cellules de l'épiblaste vont s'invaginer selon l'axe crânio-caudal, vers la membrane pharyngienne. Ce cordon de cellules, encore appelé canal chordal, va se creuser et continuer à s'étendre vers l'avant et vers l'endoderme avec lequel il va fusionner par sa paroi ventrale. La paroi dorsale va s'épaissir pour former la plaque chordale. A la fin de ce processus, le canal chordal relie la cavité amniotique à la vésicule vitelline primitive. La plaque chordale va à son tour s'épaissir et s'étendre dans le sens caudal en repoussant le nœud de Hensen vers la membrane cloacale. Le disque embryonnaire est ainsi formé de 3 feuillets (**Figure 39b**) :

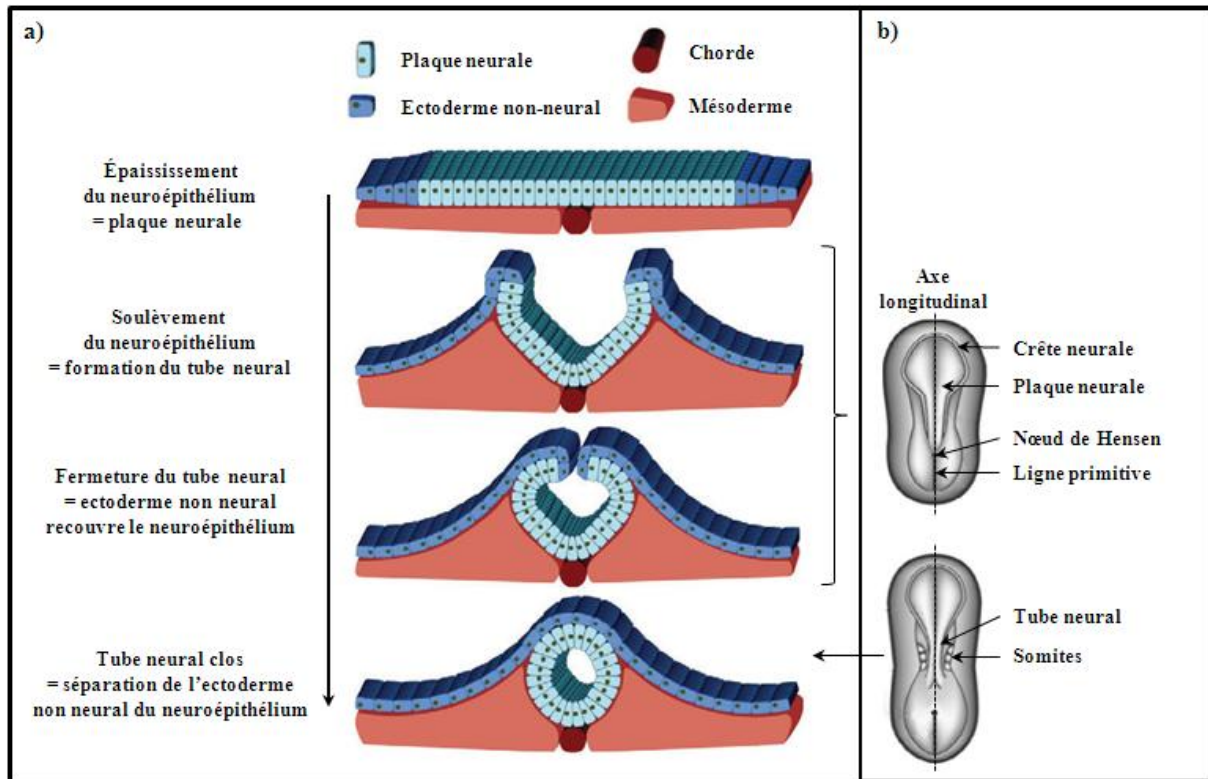
- ♦ le feuillet dorsal avec l'épiblaste devenu l'ectoderme primitif ;
- ♦ le feuillet médian avec la chorde dans l'axe crânio-caudal et le mésoblaste l'entourant ;
- ♦ le feuillet ventral qui est l'endoderme définitif.



**Figure 39** : schémas du passage du disque di-dermique en disque tri-dermique. a) les cellules de l'épiblaste et l'hypoblaste migrent pour former le disque tri-dermique ; b) le disque tri-dermique avec le canal chordal, l'ectoderme, le mésoderme et l'endoderme. Adapté de Docherty et al., 2007.

### I.3.1.1.3.3 **La neurulation**

Avec la formation du feuillet médian apparaît une nouvelle étape cruciale dans le développement embryonnaire qui est la mise en place du système nerveux ou neurulation (**Figure 40**). La corde va induire un épaissement de l'ectoderme en un tissu nerveux primitif, la plaque neurale ou neuroépithélium (**Figure 40a**).



**Figure 40 : la neurulation.** a) représentation schématique du développement et de la fusion du tube neural. Adapté de Ray and Niswander, 2012 ; b) en haut, l'émergence des crêtes neurales est visible sur la plaque neurale d'un embryon de souris E19, en bas, les crêtes neurales remontent pour former le tube neural. Modifié de Stiles and Jernigan, 2010.

Cette plaque neurale est en forme de raquette c'est-à-dire plus large dans sa partie crâniale que caudale. La différenciation de ce tissu va se faire selon l'axe antéro-postérieur et sera plus précoce au niveau de la tête (face rostrale) que du bassin (face caudale). Dès lors l'ectoderme primitif est devenu le neuroépithélium et l'ectoderme non neural (**Figure 40a**).

Vers le 20<sup>ème</sup> jour, les bords de la plaque neurale, nommés crêtes neurales, se relèvent vers la cavité amniotique pour former la gouttière neurale qui va peu à peu se fermer dans sa partie médiane en tube neural (Patthey and Gunhaga, 2011). Les crêtes vont s'internaliser et se segmenter en amas cellulaires, qui donneront, entre autre, les ganglions spinaux, selon le même plan que le mésoblaste sous jacent qui est lui-même entré dans une phase active de différenciation. Les cellules du mésoblaste para-axial se regroupent en amas nommés somites selon l'axe crânio-caudal et soulèvent l'épiblaste de part et d'autre de la fermeture du tube neural (**Figure 40b**) (Ray and Niswander, 2012).

A la fin de la troisième semaine de développement les principaux tissus différenciés sont en place :

- ♦ le feuillet dorsal avec l'ectoderme définitif, le tube neural et les crêtes neurales ;
- ♦ le feuillet médian avec la corde individualisée et le mésoblaste qui s'est notamment spécialisé en somites ;
- ♦ le feuillet ventral qui est l'endoderme définitif.

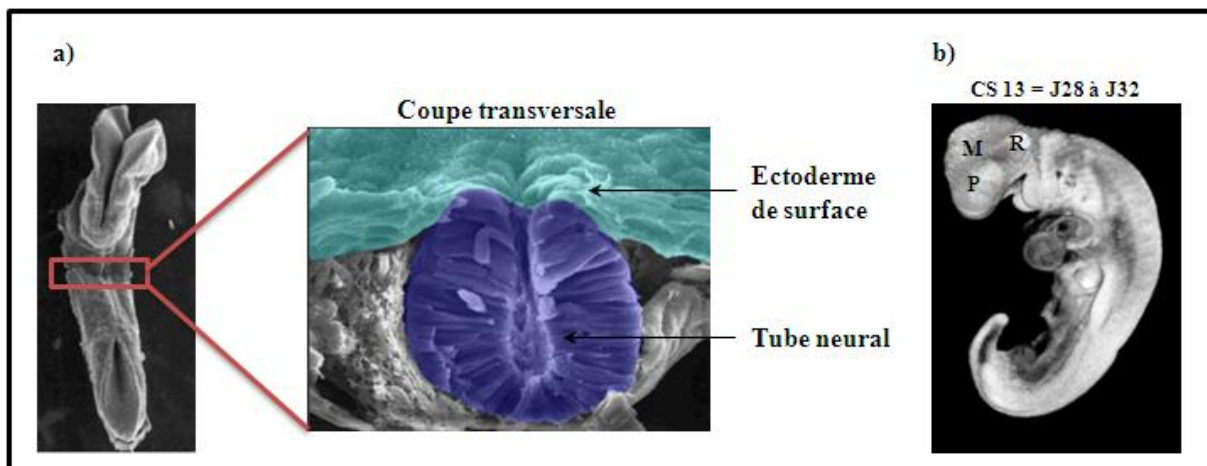
#### I.3.1.1.4 Délimitation de l'embryon

Au cours de la quatrième semaine de développement, la délimitation de l'embryon va se faire dans le sens transversal et longitudinal. En effet, la prolifération rapide du neurectoderme dans la partie crâniale de l'embryon fait pression sur la cavité amniotique qui augmente elle-même de volume. Il en résulte :

- ♦ un repliement de l'ectoderme qui va se souder sur la face ventrale de l'embryon le recouvrant ainsi complètement (sens transversal) ;
- ♦ un basculement des parties crâniale et caudale de l'embryon sur la face ventrale qui lui donne une forme de haricot (sens longitudinal).

Le tube neural est toujours ouvert dans ses parties crâniale et dorsale (**Figure 41a**). La partie crâniale va se segmenter en 3 vésicules (**Figure 41b**) :

- ♦ le prosencéphale à l'avant ;
- ♦ le mésencéphale au milieu ;
- ♦ le rhombencéphale à l'arrière.



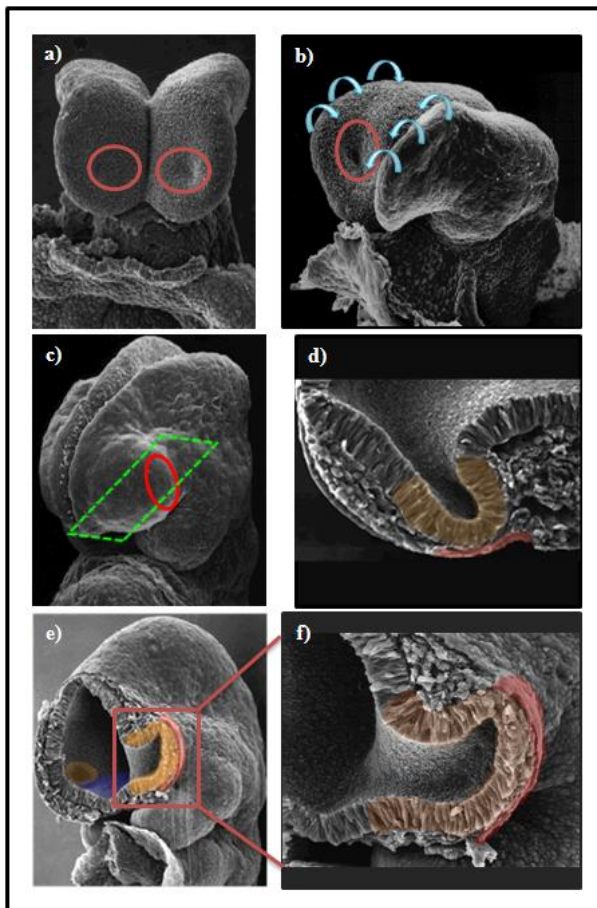
**Figure 41 : délimitation de l'embryon.** a) embryon de souris équivalent à un embryon humain à 23 jours de développement. A gauche, une vue dorsale montrant que les extrémités du tube neural ne sont pas encore fermées, à droite, la coupe transversale au niveau du tube neural fermé. Modifié de [http://syllabus.med.unc.edu/courseware/embryo\\_images/](http://syllabus.med.unc.edu/courseware/embryo_images/), collection du Dr Sulik ; b) reconstruction 3D par image à résonance magnétique d'un embryon humain au stade de Carnégie 13 ce qui équivaut à 28 à 35 jours de développement présentant la délimitation de l'embryon (forme de haricot), le prosencéphale (P), le mésencéphale (M) et le rhombencéphale (R). Adapté de Yamada et al., 2010.



#### I.3.1.1.4.1 Apparition des vésicules optiques et placodes cristalliniennes

Au niveau du prosencéphale, des cellules dites du territoire présomptif de l'œil (Esteve and Bovolenta, 2006; Moore et al., 2004; Zuber et al., 2003) vont s'évagner pour former les sillons optiques (**Figure 42a et 42b**) (Adler and Canto-Soler, 2007; Bovolenta et al., 2010; Chow and Lang, 2001; Graw, 2010; O'Rahilly, 1983; Pearson, 1980). Ces placodes auditives, olfactives et optiques constituent des zones de différenciation qui sont l'ébauche des organes des sens (Bhattacharyya and Bronner-Fraser, 2004). Ces sillons optiques vont continuer à s'invaginer à l'intérieur du prosencéphale. Avec la fermeture du tube neural dans sa partie crâniale, ils vont peu à peu entrer en contact étroit avec l'ectoderme de surface (**Figure 42c et 42d**). Cette invagination des sillons va aboutir à leur transformation en 2 entités distinctes à savoir les vésicules optiques et la tige optique qui donnera à terme le nerf optique.

Par ailleurs, cette proximité des vésicules optiques avec l'ectoderme va entraîner un épaissement de ce dernier. Les placodes cristalliniennes sont ainsi formées (**Figure 42e et 42f**) (Grainger et al., 1988).



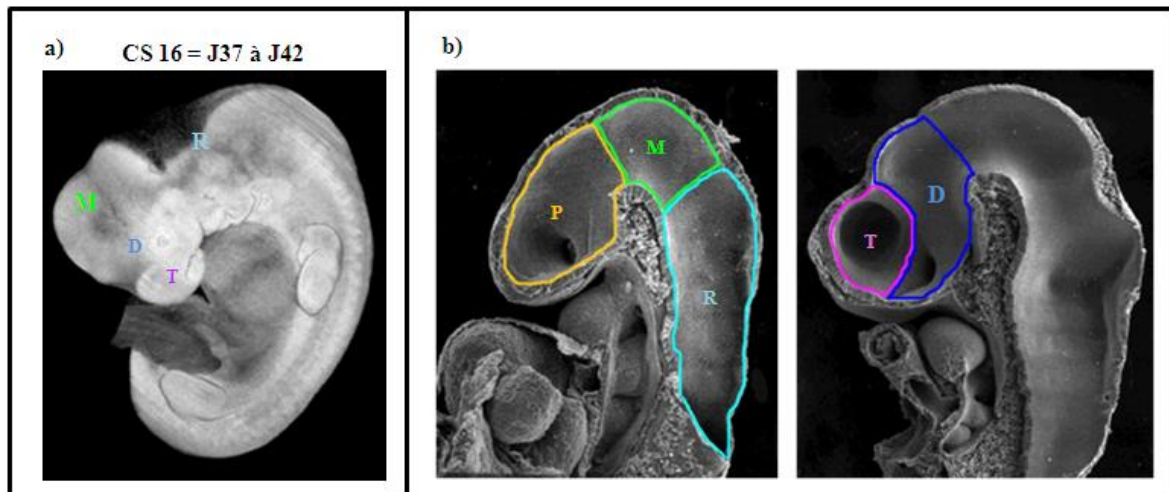
**Figure 42** : embryons de souris équivalents à un embryon humain à 22 jours (a), 24 jours (b), 25 jours (c-d) et 28 jours (e-f) de développement. a) vue frontale avec les sillons optiques (rouge) ; b) vue fronto-latérale avec les sillons optiques (rouge) et la fermeture du prosencéphale qui débute (flèches bleues) ; c) vue fronto-latérale avec l'ectoderme de surface (rouge) et le lieu de la coupe (pointillés verts) représentée en d) vésicules optiques (orange) et l'ectoderme de surface (rouge) ; e) apparition des vésicules optiques (orange), de la tige optique (bleu) et des placodes cristalliniennes (rouge) ; f) agrandissement de e). Modifié de [http://syllabus.med.unc.edu/courseware/embryo\\_images/](http://syllabus.med.unc.edu/courseware/embryo_images/), collection du Dr Sulik.

La fin de cette quatrième semaine de développement marque l'arrêt de l'embryogénèse et le début de l'organogénèse. En effet, l'embryon possède sa forme définitive et l'ébauche de l'ensemble des organes est constituée.

### **I.3.1.2 Organogénèse**

Dès la cinquième semaine de développement, le cerveau à 3 vésicules va se diviser et donner 5 vésicules qui à la fin de l'organogénèse vont continuer à se transformer pendant la vie fœtale et même au-delà de la naissance (**Figure 43**) (Cobos et al., 2001; O'Rahilly and Müller, 2008; Stiles and Jernigan, 2010; Yamada et al., 2010) :

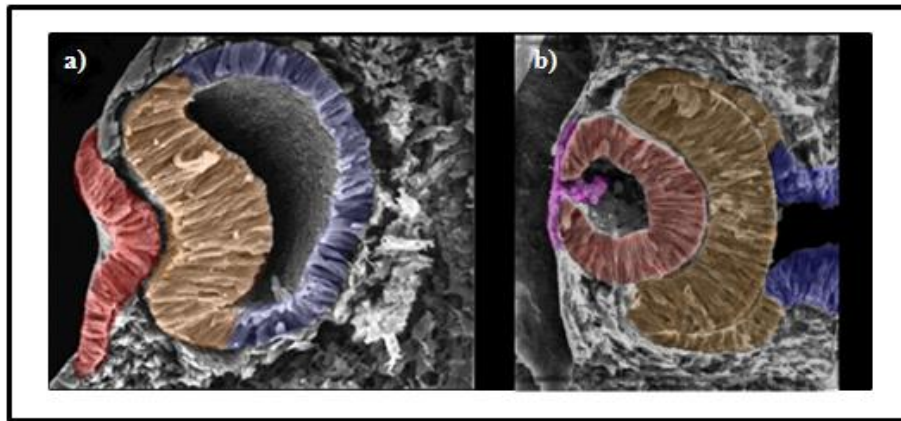
- ♦ le diencephale issu du prosencéphale donnera les rétines, l'épiphyse, l'hypothalamus, le thalamus et la neurohypophyse ;
- ♦ le télencéphale également issu du prosencéphale donnera le cortex, le système limbique et le striatum. Le cortex va se dédoubler en 2 vésicules entourant le diencephale qui donneront les hémisphères cérébraux ;
- ♦ le mésencéphale qui ne s'est pas divisé formera des structures qui seront les relais de certaines informations ;
- ♦ le métencéphale issu du rhombencéphale se transformera entre autre en cervelet ;
- ♦ le myélocéphale également issu du rhombencéphale donnera entre autre le bulbe rachidien.



**Figure 43 : cerveau avec passage de 3 vésicules à 5 vésicules.** a) reconstruction 3D par image à résonance magnétique d'un embryon humain au stade de Carnegie 16 ce qui équivaut à 37 à 42 jours de développement présentant le diencephale (D), le télencéphale (T), le mésencéphale (M) et le rhombencéphale (R). Adapté de Yamada et al., 2010 ; b) coupes sagittales d'embryons de souris équivalents à un embryon humain à 5 semaines de développement avec, à gauche, les P, M et R et à droite, le P spécifié en D et T. Adapté de [http://syllabus.med.unc.edu/courseware/embryo\\_images/](http://syllabus.med.unc.edu/courseware/embryo_images/), collection du Dr Sulik.

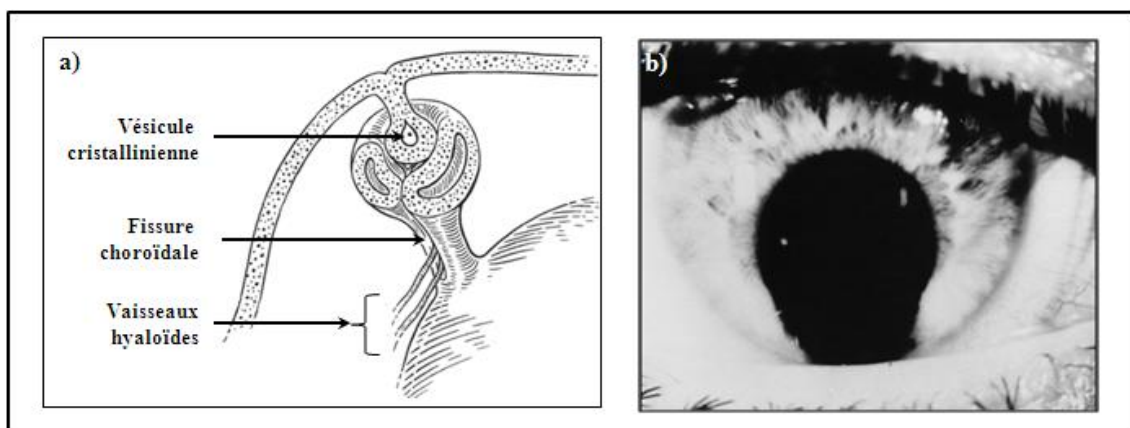
En parallèle, le contact des vésicules optiques et des placodes cristalliniennes va mener, du 29<sup>ème</sup> jour au 35<sup>ème</sup> jour de développement, à l'invagination simultanée de ces deux structures qui se transforment respectivement (**Figure 44**) :

- ♦ en coupes optiques situées dans la partie rostrale du diencephale ;
- ♦ en vésicules cristalliniennes qui vont alors se détacher de l'ectoderme.



**Figure 44 : formation des coupes optiques et vésicules cristalliniennes.** a) coupe coronale au niveau de l'œil d'un embryon de souris équivalent à un embryon humain à 29 jours de développement présentant une placode cristalliniennne (rouge), une vésicule optique (orange) et la tige optique (bleu) ; b) coupe coronale au niveau de l'œil d'un embryon de souris équivalent à un embryon humain à 35 jours de développement présentant l'ectoderme de surface (rose), une vésicule cristalliniennne (rouge), une coupe optique (orange) avec la tige optique (bleu) la reliant au diencéphale. Modifié de [http://syllabus.med.unc.edu/courseware/embryo\\_images/](http://syllabus.med.unc.edu/courseware/embryo_images/), collection du Dr Sulik.

Au début de la sixième semaine de développement, les cellules des coupes optiques et les tiges optiques se referment pour former les fissures choroïdes où sont retenues les artères hyaloïdes (Adler and Canto-Soler, 2007; Bovolenta et al., 2010; Chow and Lang, 2001). Ces artères permettent d'irriguer les vésicules cristalliniennes et ainsi de nourrir les différentes structures intraoculaires en cours de développement (Cvekl and Tamm, 2004; Hamming et al., 1977; Saint-Geniez and D'Amore, 2004; Strek et al., 1993). Un défaut de fermeture de ces fissures est à l'origine du colobome qui est une malformation de l'œil pouvant conduire, selon la forme, à une anomalie esthétique (colobome de l'iris) (**Figure 45**) et/ou à une vision altérée (colobome chorio-rétinien) (Gregory-Evans et al., 2004; Lloyd, 1940; Onwochei et al., 2000; Rosenbaum, 1929).



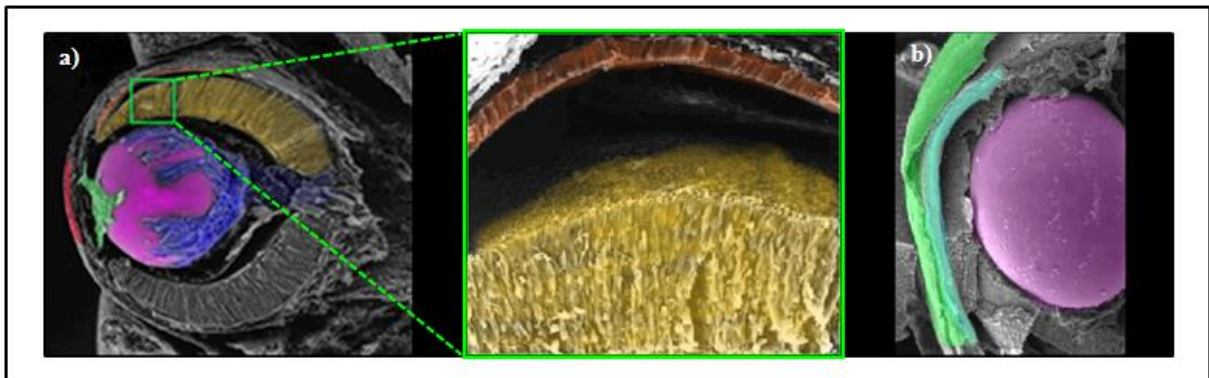
**Figure 45 : le colobome.** a) représentation de la fissure choroïde à 4 semaines de développement normal ; b) colobome complet de l'iris. Issu de (Onwochei et al., 2000).



Les cellules invaginées des coupes optiques vont donner la RN et les cellules qui ne se sont pas invaginées vont former l'EPR (**Figure 46**). Aux points de jonctions entre la RN et l'EPR, des cellules du mésenchyme apparaissent et vont donner les composants des corps ciliaires et des stromas des iris (Bharti et al., 2006; Bovolenta et al., 2010; Chow and Lang, 2001; Cvekl and Tamm, 2004; Fuhrmann, 2010; Graw, 2010; Streit, 2004).

Dès la septième semaine, les vésicules cristalliniennes sphériques et creuses vont commencer à se différencier. Au 44<sup>ème</sup> jour de développement, les cellules des pôles postérieurs vont s'allonger jusqu'aux cellules épithéliales des pôles antérieurs pour remplir les vésicules (**Figure 46a**) (Cvekl and Tamm, 2004; Graw, 2010).

Lors de la huitième semaine de développement qui marque la fin de l'organogénèse, les cornées vont se former à partir de l'ectoderme de surface et du mésenchyme provenant des crêtes neurales selon plusieurs étapes (**Figure 46b**) (Graw, 2010; Hay, 1980).



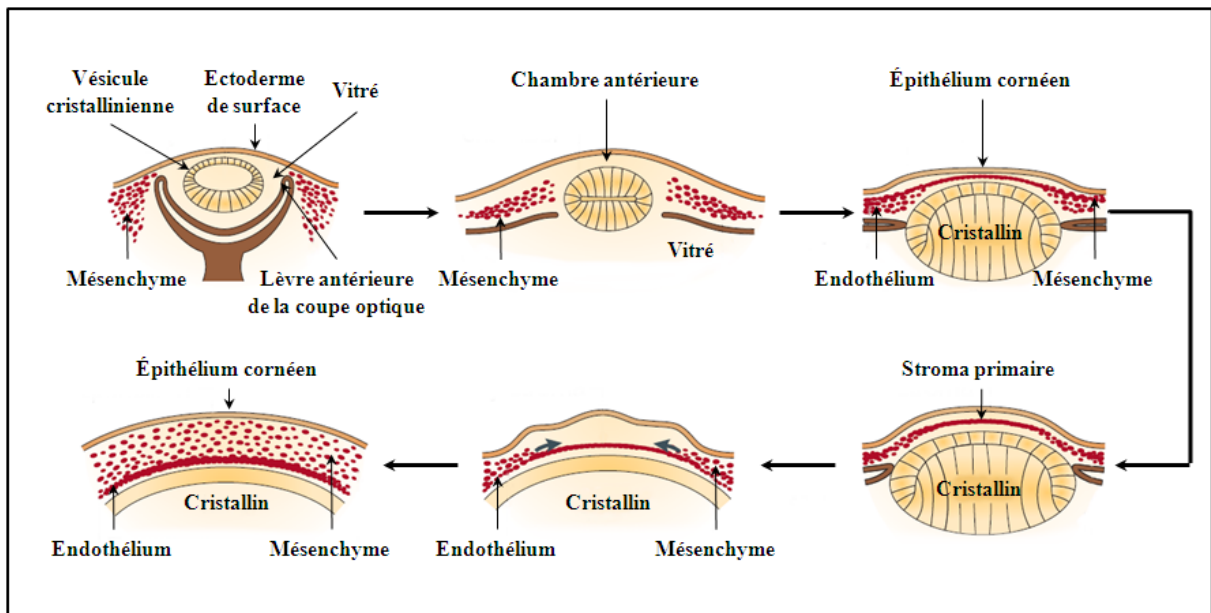
**Figure 46** : formation de la RN, de l'EPR, du cristallin, de l'iris et de la cornée. a) à gauche, coupe coronale au niveau de l'œil d'un embryon de souris équivalent à un embryon humain à 7 semaines de développement présentant la future cornée (rouge), le futur iris (vert), la vésicule cristallinienne (rose), l'apparition de la chambre intérieure qui contiendra l'humeur aqueuse est visible entre la future cornée et le futur iris, l'artère hyaloïde qui irrigue la vésicule cristallinienne (bleu), la RN (jaune) et l'EPR (orange), à droite, agrandissement de la zone encadrée en vert à gauche ; b) coupe parasagittale au niveau de l'œil d'un embryon de souris équivalent à un embryon humain à 8 semaines de développement avec la couche épithéliale externe provenant de l'ectoderme de surface (vert), les couches internes qui dérivent des crêtes neurales (turquoise) et le cristallin (rose) . Adapté de [http://syllabus.med.unc.edu/courseware/embryo\\_images/](http://syllabus.med.unc.edu/courseware/embryo_images/), collection du Dr Sulik.

### **I.3.1.3 Phase fœtale**

La phase fœtale débute au troisième mois de grossesse et verra la maturation des différentes structures de l'œil.

### I.3.1.3.1 La cornée

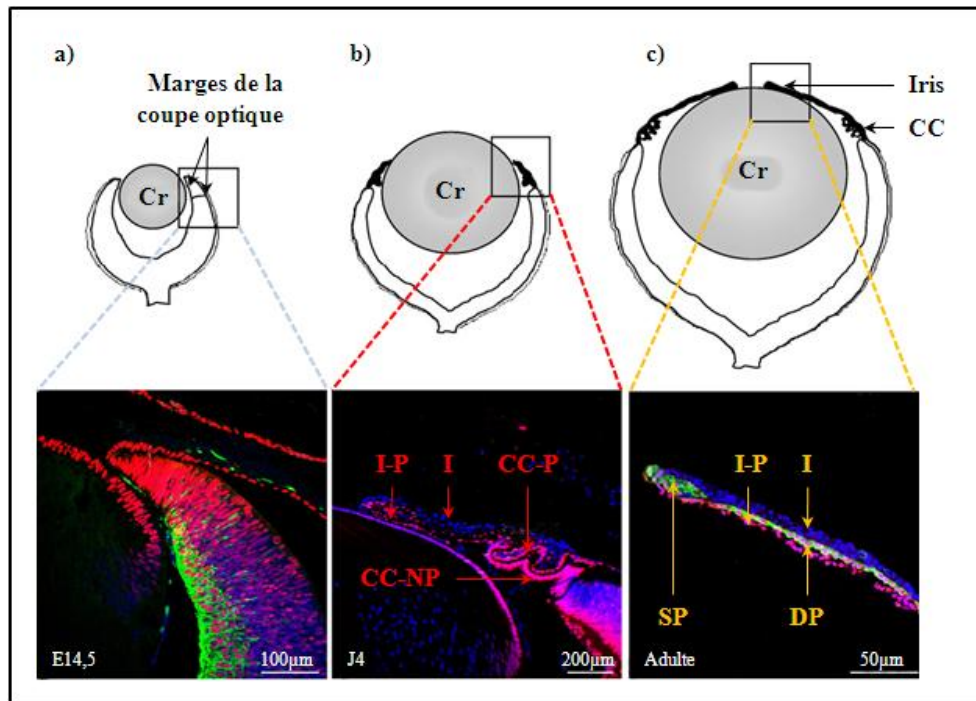
La mise en place de la cornée va se faire selon plusieurs inductions successives (Hay, 1980; Lwigale and Bronner-Fraser, 2009). Les cellules des crêtes neurales vont venir se placer entre l'ectoderme de surface libre et les vésicules cristalliniennes. Elles deviennent le mésenchyme péri-oculaire et vont former avec l'ectoderme de surface, les endothéliums et les stromas des cornées (Figure 47) (Hay and Revel, 1969; Hay, 1980; Lwigale et al., 2005).



**Figure 47 : représentation schématique du développement de la cornée.** La cornée commence à se différencier lorsque l'ectoderme de surface se referme après qu'il se soit détaché de la vésicule cristallinienne. Deux vagues de cellules mésenchymateuses issues des crêtes neurales vont envahir la cornée et former le stroma cornéen après condensation. Modifié de Graw, 2003.

### I.3.1.3.2 Les corps ciliaires et l'iris

La différenciation de l'iris (Davis-Silberman and Ashery-Padan, 2008) et des corps ciliaires (Beebe, 1986; Tamm and Lütjen-Drecoll, 1996) nécessite la présence du cristallin. En effet, son ablation empêche la formation de ces structures (Beebe and Coats, 2000; Harrington et al., 1991). Leur développement relève d'interactions complexes entre le neurectoderme et le mésenchyme péri-oculaire (Figure 48).



**Figure 48 : morphogénèse de l'iris.** a) progéniteurs de l'iris (I) et des corps ciliaires (CC) localisés dans la marge de la coupe optique chez l'embryon murin à E14,5 ; b) développement 4 jours après la naissance avec l'iris pigmenté (I-P), le stroma de l'iris (I), les CC pigmentés (CC-P) et les CC non pigmentés (CC-NP) ; c) chez l'iris adulte, les muscles dilatateurs de la pupille (DP) et ces sphincters (SP) apparaissent (vert). Adapté de Davis-Silberman and Ashery-Padan, 2008.

La variation de couleur de l'iris est attribuée aux pigments de mélanine qu'il contient. Chez les albinos les pigments sont absents, pour les yeux bleus les pigments sont confinés à l'épithélium pigmenté de l'iris, enfin pour les yeux de couleurs foncées les pigments gagnent également le stroma (Davis-Silberman and Ashery-Padan, 2008).

### I.3.1.3.3 La rétine

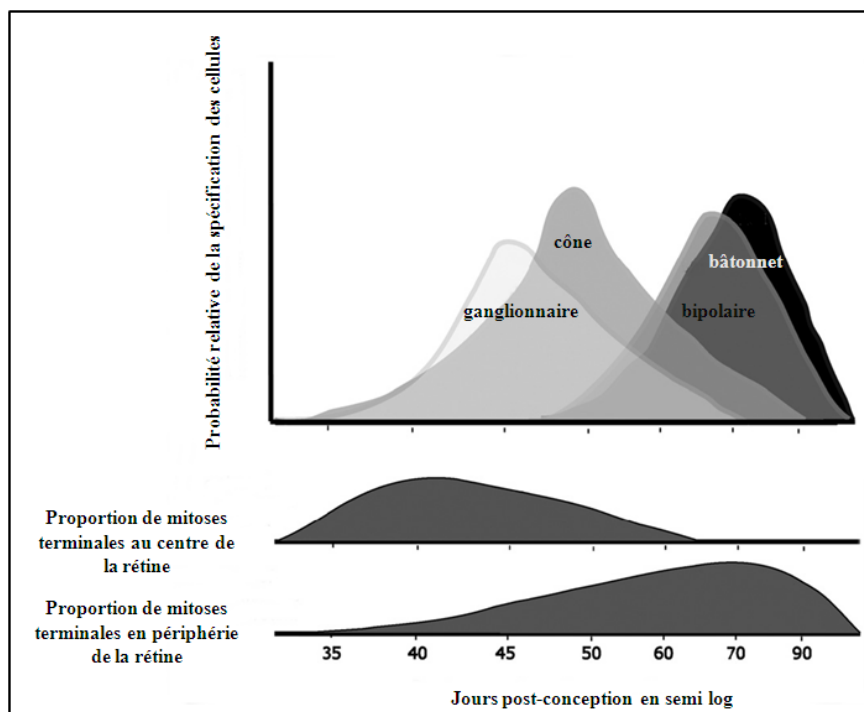
La maturation des différentes couches de la rétine va se faire progressivement durant la phase fœtale. Elle prendra fin après la naissance avec la fonctionnalité de la fovéa (Hendrickson and Yuodelis, 1984; Hendrickson et al., 2008).

De nombreuses études d'embryologie descriptive ont tenté de mettre à jour les différentes étapes menant à la formation de l'EPR et de la RN, cependant aucune n'a permis de mettre en évidence les progéniteurs des cellules de l'EPR. Toutefois des expériences menées chez le poulet tendraient à penser que ces progéniteurs puissent entourer les cellules à l'origine de la RN au moment de l'ébauche des yeux (Martínez-Morales et al., 2004). L'EPR provient ensuite des cellules situées à l'arrière des coupes optiques. L'origine de ces cellules pigmentées est toujours, comme l'origine de l'œil, controversée (Arendt and Wittbrodt, 2001).

L'arrivée d'une nouvelle technologie telle que les cellules souches pluripotentes humaines (CSPH) et leurs capacités de prolifération et de différenciation, vont permettre de mettre en évidence un progéniteur commun entre les cellules de la RN et l'EPR. Cette notion sera abordée dans le deuxième chapitre du manuscrit.

Durant la 10<sup>ème</sup> semaine de développement chez le poulet, les fibres de collagène de la future membrane de Bruch se déposent sous la lame basale de l'EPR (Booij et al., 2010). La maturation de cette membrane dure pendant plusieurs années (Olson, 1979; Roberts and Forrester, 1990). Chez la souris, son développement suit la mise en place de la membrane basale de l'EPR et le développement de la choroïde (Hirabayashi et al., 2003). Par analogie, chez l'Homme, la membrane de Bruch serait formée par l'action simultanée de l'EPR et de la choroïde (Booij et al., 2010).

La différenciation de la rétine neurale débutée au 47<sup>ème</sup> jour de développement se poursuit pendant la phase fœtale (Graw, 2003). Par analogie avec la souris (Graw, 2010) et le singe rhésus (Finlay, 2008; Rapaport et al., 1996), les cellules ganglionnaires seraient les premières à apparaître suivies par les cellules horizontales, les cônes, les cellules amacrines et les cellules de Müller. Viendraient ensuite les différenciations des cellules bipolaires et enfin des bâtonnets (**Figure 49**).



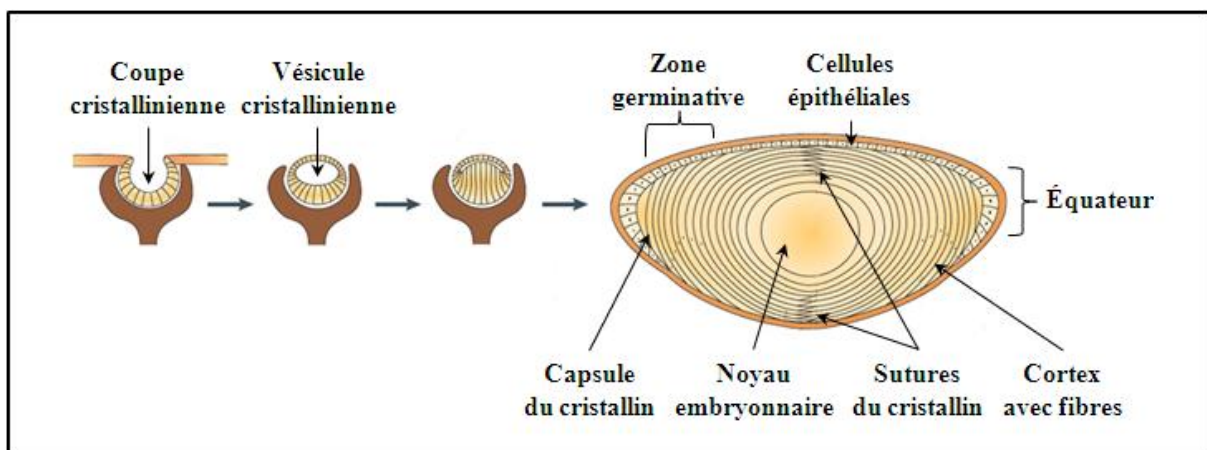
**Figure 49 : ordre d'apparition des cellules rétiniennes chez le singe rhésus.** En haut, les cellules horizontales apparaissent en même temps que les cônes alors que les cellules amacrines sont très proches des bâtonnets. En bas, le gradient spatial de différenciation des précurseurs dans la rétine centrale, ou en rétine périphérique. Modifié de Finlay, 2008.

Les premiers photorécepteurs sont visibles chez l'Homme dès la 10<sup>ème</sup> semaine de développement (Graw, 2010). Le développement et la maturation continuent jusqu'au 8<sup>ème</sup> mois où apparaît la fovéa qui ne sera fonctionnelle qu'après la naissance.

#### I.3.1.3.4 Le cristallin

A l'issue de l'organogénèse, les vésicules cristalliniennes sont remplies par les fibres primaires. Les cellules de la région centrale vont se diriger vers le pôle équatorial du cristallin en s'allongeant pour former les fibres secondaires. Ces couches concentriques de cellules entourent le noyau du cristallin et se rejoignent au niveau des sutures antérieures et postérieures du cristallin. Elles migrent vers le cortex du cristallin au fur et à mesure de l'apparition de nouvelles fibres secondaires. Le centre du cristallin est donc composé des cellules les premières formées (**Figure 50**) (Gunhaga, 2011; Ogino and Yasuda, 2000). Puis lors de la différenciation terminale, l'ensemble des fibres, primaires et secondaires, va perdre son noyau et ses mitochondries. Chez la souris ce processus se finit après la naissance (Vrensen et al., 1991) alors que chez l'Homme, il se ralentit après l'âge de 20 ans mais ne s'arrête jamais totalement.

L'opacification du cristallin au cours du temps est nommée cataracte. Elle est due, entre autres, à l'accumulation de déchets dans les cellules et à l'altération des protéines cristallines qui finissent par précipiter (Graw, 2010; Gunhaga, 2011).



**Figure 50** : représentation schématique du développement du cristallin. Lorsque la vésicule cristallinienne est formée, les fibres primaires s'allongent depuis l'épithélium postérieur du cristallin pour remplir l'ensemble de la vésicule. Puis, dans la région de l'équateur (ou arc du cristallin), les fibres secondaires apparaissent ; les fibres des côtés opposés se rencontrant au niveau des pôles antérieur et postérieur et donnent lieu aux sutures du cristallin. Enfin, au moment de la naissance chez la souris, les noyaux et les mitochondries vont être dégradés. Modifié de Graw, 2003.

#### I.3.1.3.5 Artère hyaloïde et système vasculaire

Concernant la vascularisation, la portion vitrée de l'artère hyaloïde s'atrophie laissant un canal déshabité, ou canal de Cloquet, qui relie la papille à la face postérieure du cristallin (Clark, 1930; Lloyd, 1940). Ainsi, le vitré définitif est avasculaire. A partir du 4<sup>ème</sup> mois de gestation, les vaisseaux de la tunique vasculaire postérieure du cristallin vont régresser puis disparaître et le système vasculaire de la rétine va le remplacer. Dès lors, le réseau qui débute autour de la papille va peu à peu s'étendre et

gagner la rétine périphérique. Il atteindra le secteur nasal au 8<sup>ème</sup> mois et le secteur temporal au 9<sup>ème</sup> mois. Sa formation sera achevée après la naissance (Saint-Geniez and D'Amore, 2004).

#### **I.3.1.3.6 Le nerf optique**

Durant le 7<sup>ème</sup> mois de gestation les axones du nerf optique se myélinisent au niveau des tractus optiques. Le diamètre du nerf optique de 3 mm à la naissance augmentera jusqu'à 8 années après la naissance (Magoon and Robb, 1981; Spalton, 1996).

### **I.3.2 Génétique et voies de signalisation**

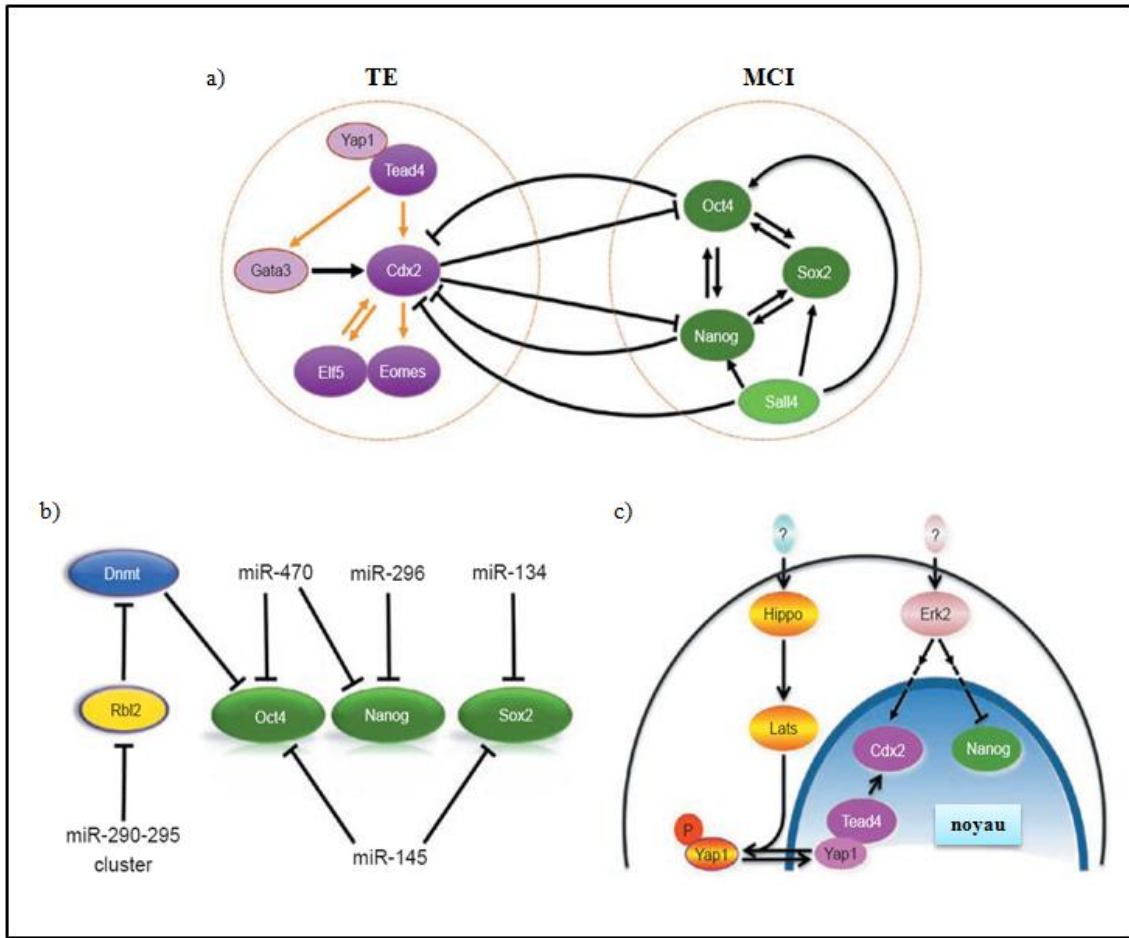
Suite aux premières analyses du développement de l'œil menées par de Dr Spemann (De Robertis, 2006; Harland, 2008; Saxén, 1994) de nombreuses équipes ont tenté de mettre à jour le réseau génétique et les facteurs impliqués dans le développement de l'œil chez l'Homme grâce à des études menées chez la mouche du fruit (*Drosophila melanogaster*), le poisson zèbre (*Danio rerio*), la grenouille (*Xenopus laevis*), le poulet (*Gallus gallus*) et la souris (*Mus musculus*).

#### **I.3.2.1 L'engagement cellulaire au stade morula puis blastocyste**

Le passage du stade morula au stade blastocyste composé de la MCI et du TE va s'opérer sous l'action de différents gènes. Chez la souris, il a été montré que le facteur de transcription oct3/4 (pour octamer binding transcription factor 3/4, également nommé pou5f1 pour POU domain, class 5, transcription factor 1) ainsi que la protéine cdx2 (pour caudal-type homeobox protein 2) sont à l'origine de ces structures. Oct3/4 est plus exprimé dans la MCI alors que cdx2 est restreinte aux cellules du TE (Arnold and Robertson, 2009; Chen et al., 2010; Gasperowicz and Natale, 2011; Niwa et al., 2005).

D'autres éléments de régulation, les miARNs (pour micros acides ribonucléiques) vont inhiber les facteurs de transcription oct3/4, nanog (pour Nanog homeobox) et sox2 (pour SRY-box containing gene 2). Ces facteurs vont empêcher l'auto-renouvellement des cellules de la morula qui se différencie pour former le blastocyste. D'autres voies de signalisation telles que la voie Hippo et la voie MAPK (pour *Mitogen activated protein kinase*) peuvent agir sur le destin des cellules de la morula. L'activité de la voie Hippo conduit à la formation de cellules de la MCI car cdx2 n'est pas activée, alors que son inactivité va mener à l'activation de la voie des MAPK qui va activer cdx2 et inhiber Nanog ce qui facilite la formation du TE (**Figure 51**) (Chen et al., 2010; Cockburn and Rossant, 2010).





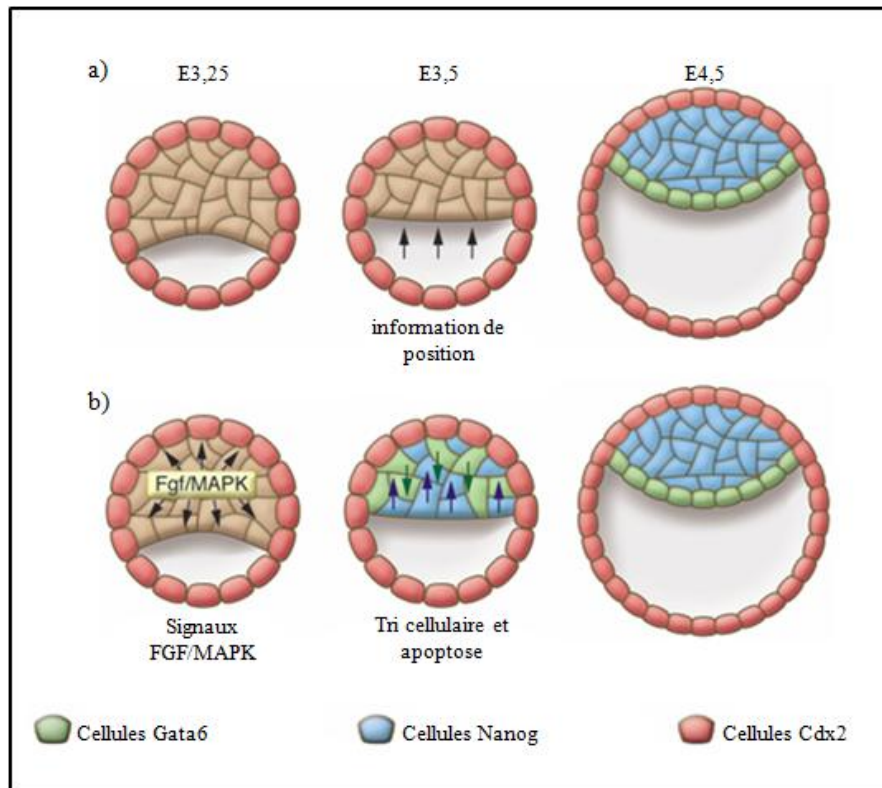
**Figure 51 : mécanismes moléculaires de ségrégation de la MCI et du TE.** a) le réseau de régulation des facteurs de transcription clés dans la spécification de la MCI et du TE. Les facteurs de transcriptions majeurs du TE sont représentés en violet, il s'agit de Cdx2, Tead4, Eomes et Elf5. Pour le moment aucune étude ne prouve qu'ils se fixent les uns aux autres c'est pourquoi les interactions sont indiquées en orange. Tead4 coopère avec Yap1 pour activer Cdx2. En parallèle, GATA3 se fixe directement sur l'intron 1 de Cdx2 et l'active. Les facteurs de transcriptions majeurs de la MCI sont représentés en vert, et sont Oct4, Nanog et Sox2. Le facteur Sall4 active ces facteurs et inhibe à la fois l'expression de Cdx2. La régulation croisée des facteurs de la MCI et du TE vont fixer le sort de chacun des blastomères ; b) les miARNs régulent l'expression des facteurs de pluripotence Oct4, Nanog et Sox2. Seules les interactions de régulation expérimentalement identifiées sont montrées ; c) les deux voies de régulation Hippo et MAPK impliquées dans la détermination de la MCI et du TE. Dans les cellules les plus internes, la voie Hippo phosphoryle Yap1 qui migre dans le cytoplasme. En l'absence de Yap1 nucléaire, Tead4 est incapable d'activer Cdx2. Ainsi, les cellules donneront la MCI. *A contrario*, dans les cellules externes, Yap1, non phosphorylée est localisée dans le noyau et coopère avec Tead4 pour activer Cdx2 ce qui engage les cellules en TE. Erk2, de la voie des MAPK active Cdx2 et abolit l'activité de Nanog ce qui facilite la formation du TE. Pour l'heure, les mécanismes par lesquels Erk2 régule Cdx2 et Nanog ainsi que les évènements en amont de la voie Hippo et Erk2 demeurent inconnus. De Chen et al., 2010.

Des études menées chez la souris démontrent une deuxième ségrégation en ectoderme primitif (EP) et en épiblaste (EPI) des cellules de la MCI. Trois modèles sont proposés pour expliciter cette ségrégation. Dans le premier, c'est la position des cellules au sein de la MCI qui détermine leur destin

alors que pour le second modèle c'est l'expression de certains facteurs de transcription qui influence le destin des cellules. Enfin, pour le troisième modèle, ce sont les voies de signalisation du FGF (pour *fibroblast growth factors*) et des MAPK qui influenceraient leur devenir (Chen et al., 2010; Cockburn and Rossant, 2010).

Dans le premier modèle, les cellules situées à l'extérieur donneraient l'EP alors que les cellules à l'intérieur donneraient l'EPI. Dans le second modèle, dans la MCI de souris à E3,5 ce qui équivaut au stade 32 cellules chez l'Homme, l'expression des facteurs de transcription *gata6* (pour GATA-binding factor 6) et *nanog* sont exclusifs chez les cellules qui se répartissent aléatoirement au niveau de la MCI, *gata6* étant restreint aux cellules qui donneront l'EP et *nanog* étant restreint aux cellules qui formeront l'EPI.

Cependant des mouvements des cellules de l'intérieur vers l'extérieur et réciproquement ont été démontrés ce qui tend à prouver que le premier modèle peut également jouer un rôle. Enfin, dans le modèle dépendant des signaux FGF/MAPK, les cellules initialement bi-potentielles, vont devenir *gata6* ou *nanog* en fonction des signaux reçus et seront distinguées en EP et en EPI dès E4,5 (Figure 52) (Arnold and Robertson, 2009; Cockburn and Rossant, 2010).



**Figure 52 : modèles de ségrégation EP/EPI chez l'embryon de souris.** a) dans le modèle dépendant de la position, la MCI à E3,5 est composée d'une population uniforme de cellules bi-potentielles, celles de l'extérieur donneront l'EP en raison des informations de position qu'elles reçoivent ; b) dans le modèle dépendant aux signaux FGF/MAPK, les cellules initialement bi-potentielles vont être influencées par les signaux FGF qui vont les mener en deux populations distinctes, les cellules *Gata6* et les cellules *Nanog*. Le tri cellulaire couplé au phénomène d'apoptose va conduire à l'apparition de l'EP et de l'EPI. Modifié de Cockburn and Rossant, 2010.



Enfin, des études montrent que les cellules issues de la MCI de blastocystes de souris et celles provenant de la MCI de blastocystes humains ne sont pas équivalentes, les cellules souches embryonnaires (CSE) humaines issues de la MCI ressemblant aux cellules de l'épiblaste murin (Brons et al., 2007; Cockburn and Rossant, 2010; Tesar et al., 2007; Nichols and Smith, 2012; Vallier et al., 2009). Cela peut expliquer les différences de résultats obtenus entre les CSE humaines et les CSE murines.

### **I.3.2.2 L'engagement neuro-ectodermique**

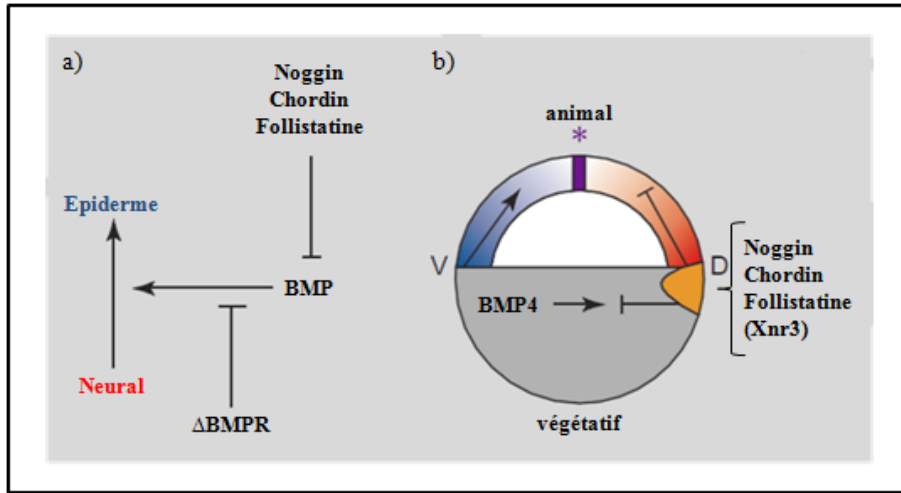
Comme décrits précédemment les tissus de l'œil proviennent de différents feuilletts embryonnaires : le cristallin et la cornée sont issus de l'ectoderme, alors que la rétine neurale, l'épithélium pigmentaire rétinien, l'iris et les corps ciliaires dérivent de la plaque neurale. Les constituants de l'œil sont donc principalement issus du neurectoderme (Cvekl and Duncan, 2007).

Les équipes des Drs De Robertis, Harland, Hemmati-Brivanlou et Melton ont commencé à montrer que les cellules ectodermiques de l'embryon avaient par défaut un destin neural en fonction des signaux reçus par l'environnement dans lequel elles se trouvaient (De Robertis, 2006; Harland and Gerhart, 1997; Harland, 2000; Hemmati-Brivanlou and Melton, 1997). Le centre organisateur de Spemann, chez les amphibiens, est à l'origine des signaux permettant l'induction neurale au niveau des cellules ectodermiques (Stewart and Gerhart, 1990). Au moment de la neurulation, les somites (centre ventral) sécrètent les protéines morphogénétiques osseuses ou BMPs (pour *bone morphogenetic proteins*) qui inhibent ce destin en engageant les cellules du côté ventral de l'embryon vers l'épiderme.

En parallèle, la chorde (centre dorsal) synthétise et sécrète leurs antagonistes tels que la noggin, la chordin et la follistatine (**Figure 53**) (Hemmati-Brivanlou and Melton, 1997; Smith and Harland, 1992). L'exposition à ce gradient de concentration médio-latéral va engager les cellules ectodermiques et permettre le développement de la polarité de l'embryon. Les cellules situées le long de la ligne primitive vont donner naissance à la plaque neurale puis au tube neural et aux crêtes neurales alors que les cellules situées de part et d'autre de cette ligne formeront les cellules de l'ectoderme définitif. L'engagement des cellules est principalement régulé par les facteurs sécrétés par les somites et la chorde, cependant d'autres voies de signalisation impliquées dans l'induction neurale et la régionalisation du système nerveux ont été identifiées (Harland and Gerhart, 1997; Meulemans and Bronner-Fraser, 2004; Wilson and Edlund, 2001).

Il s'agit de la voie :

- ♦ du TGF $\beta$  (pour *Transforming Growth Factor beta*) / activine / nodal incluant les BMPs (Kitisin et al., 2007) ;
  - ♦ des FGFs (Delaune et al., 2005; Lamb and Harland, 1995) ;
  - ♦ canonique des Wnt (pour *wingless integration site*) /  $\beta$ -caténine qui joue un rôle dans la polarité dorso-ventrale de l'embryon (Linker and Stern, 2004; Thomas and Erickson, 2008) ;
- Notch (Gaiano and Fishell, 2002).



**Figure 53 :** le modèle de l'engagement neuro-ectodermique chez *Xenopus laevis*. a) les cellules de l'ectoderme ont une tendance naturelle à se différencier en tissu neural mais sont inhibées par les BMPs. Les antagonistes endogènes des BMPs, la noggin, la chordin, la follistatine tout comme l' $\Delta$ BMPR (pour *dominant-negative BMP receptor*) vont lever cette inhibition et induire la différenciation neurale ; b) la noggin, la chordin, la follistatine et Xnr3 sont exprimées par l'organisateur (orange) mais seules les trois premières se fixent directement au BMP4. Avec V : ventral, D : dorsal, \* : bord antérieur de la plaque neurale, tissu neural présomptif : bleu, territoire présomptif de l'épiderme : rouge et région frontalière entre les deux territoires : violet. Modifié de Streit and Stern, 1999.

Si le rôle des BMPs fait consensus dans la communauté scientifique, celui des autres voies de signalisation est bien plus discuté (Wilson and Edlund, 2001). Bien que la voie Wnt/ $\beta$ -caténine semble être importante au stade blastula pour induire l'expression des antagonistes des BMPs, son inhibition serait également nécessaire à un stade plus tardif pour permettre l'induction neurale. Par ailleurs, les voies FGFs et Notch sembleraient avoir une activité pro-neurale. Enfin, certains facteurs tels que les gènes *sox1*, *sox2* et *sox3* (pour Sex determining region Y-box 1, 2 et 3) peuvent également être importants au cours du développement du SNC. Ils permettent aux cellules neurales de rester indifférenciées en contrecarrant l'activité des protéines pro-neurales (Bylund et al., 2003). Sox1 peut, entre autre, se fixer aux  $\beta$ -caténines atténuant l'action des Wnt et grâce à différentes voies il promeut la détermination puis la différenciation neuronales (Kan et al., 2004).

### **I.3.2.3 Régionalisations de la plaque neurale et du tube neural**

La mise en place de la plaque neurale et du tube neural implique des processus similaires chez les vertébrés (Cobos et al., 2001; Rubenstein and Beachy, 1998).

Comme nous venons de le voir, l'organisateur de Spemann chez l'amphibien est à l'origine de la première induction neurale avec la régionalisation dorso-ventrale (ou antéro-postérieure) du tube neural. Au cours du développement, sous l'influence de cascades moléculaires complexes, impliquant de nombreux morphogènes, les cellules du tube neural subissent en parallèle une multiplication intense ainsi qu'une spécification régionale. Des organisateurs secondaires du neuroépithélium, les crêtes neurales antérieures situées dans la partie la plus rostrale de la plaque neurale, la zone limitante intrathalamique située dans le diencephale et l'organisateur isthmique placé à mi-rhombencéphale vont non seulement permettre d'affiner la spécification antéro-postérieure du prosencéphale, du mésencéphale et du rhombencéphale mais aussi de contrôler la polarité et la sous-division de ces trois régions. Les concentrations en gradient des différents morphogènes confèrent une identité de position aux cellules ce qui va déclencher des cascades génétiques dépendantes de ces concentrations (Vieira et al., 2010).

A ce stade, deux gènes sont particulièrement caractéristiques du développement de l'œil :

- ♦ Le gène *Otx2* (pour orthodenticle homolog 2 (*Drosophila*)) code un facteur de transcription à homéodomaine membre de la famille Otx. Chez la souris, son expression dans l'ectoderme précède la gastrulation et précède également l'expression des autres facteurs de transcription du territoire présomptif de l'œil (ou EFTFs pour *eye-field transcription factors*) (Simeone et al., 1993; Zuber et al., 2003). *Otx2* est nécessaire à la mise en place des territoires du prosencéphale et du mésencéphale (Kablar et al., 1996). Chez des souris *otx2*<sup>-/-</sup> (génotype létal), *in utero*, le tube neural est normal au niveau de la moelle épinière alors qu'au niveau antérieur, il est interrompu et les yeux sont totalement absents (Acampora et al., 1995). *Otx2* est exprimé, chez la souris, dans la totalité du neuroépithélium présomptif antérieur, mais entre la fin de la gastrulation et le début de la neurulation son expression est fortement diminuée ce qui correspond à la localisation du territoire présomptif des yeux. Le rôle précis d'*otx2* est difficile à déterminer mais il semble qu'il ne soit pas l'inducteur direct des EFTFs et qu'il fournisse un environnement propice au développement du champ oculaire au pôle antérieur de la plaque neurale (Rhinn et al., 1998, 1999; Zuber et al., 2003).
- ♦ Le gène *Pax6* (pour paired box gene 6) code un facteur de transcription membre de la famille des gènes *Pax* (pour Paired Box). La protéine Pax6 se fixe à l'ADN (acide désoxyribonucléique) par le motif hélice tour hélice contenu dans son domaine paired (Noll, 1993; Treisman et al., 1991). Il s'exprime dès la fin de la gastrulation au niveau du pôle antérieur de la plaque neurale (Li et al., 1997). Pendant la neurulation, son expression se

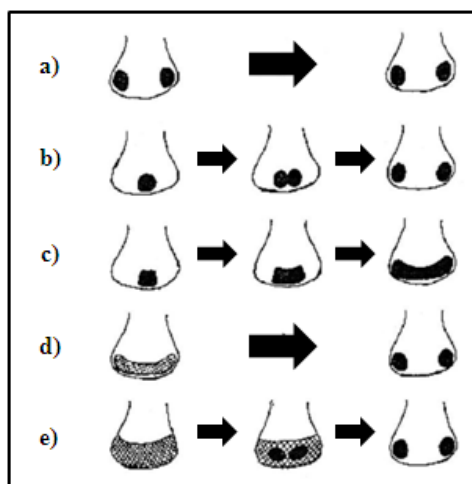
restreint non seulement au niveau du pôle antérieur de la plaque neurale qui va donner naissance aux futures vésicules optiques mais aussi aux territoires présomptifs des cristallins (Grindley et al., 1995; Turque et al., 1994).

### **I.3.2.4 Spécification neuronale de l'œil**

Comme nous l'avons vu dans ce manuscrit, l'œil est un organe d'une très grande complexité de par les cellules qui le composent et de par leurs fonctionnalités. La rétine adulte exprime à elle seule plus de 25000 transcrits provenant de plus de 2000 gènes (Sharon et al., 2002; Williams and Moody, 2003), c'est pourquoi, dans les paragraphes suivants, seuls seront décrits les voies de signalisation et les gènes principaux entrant dans le processus de formation de la RN et de l'EPR.

#### **I.3.2.4.1 Le territoire présomptif de l'œil**

Comme vu précédemment (cf. [Apparition des vésicules optiques et placodes cristalliniennes](#)), l'ébauche des yeux débute par l'apparition des cellules du territoire présomptif de l'œil (TPO) au niveau du prosencéphale. Différentes hypothèses ont longtemps été débattues pour connaître l'origine de la bilatéralité symétrique des yeux. Des études menées chez des embryons de grenouilles et de poulets ont permis de montrer que le territoire à l'origine de l'œil serait situé tout au long du pôle antérieur de la plaque neurale renforçant ainsi la théorie d'Adelmann qui stipulait qu'un TPO unique situé au niveau de la plaque neurale antérieure allait former petit à petit les deux yeux. (**Figure 54**) (Li et al., 1997).



**Figure 54 : modèles de formation du territoire présomptif de l'œil (TPO) chez les embryons de vertébrés. Les schémas illustrent le bord de la plaque neurale et les cercles le TPO. a) pour Spemann, les deux TPO sont séparés dès le début du développement ; b) *A contrario*, dans le modèle de Stockard, un seul TPO situé dans la région médiane de la plaque neurale antérieure va se propager latéralement et donner naissance à deux TPO, un pour chaque œil futur ; c) le modèle illustré par LePlat arrive aux mêmes conclusions que Stockard indiquant un seul TPO s'allongeant pour former un TPO occupant l'ensemble de la plaque neurale antérieure, ce territoire donnant à la fois les yeux et les chiasma optiques ; d) dans le modèle d'Adelmann, le TPO**

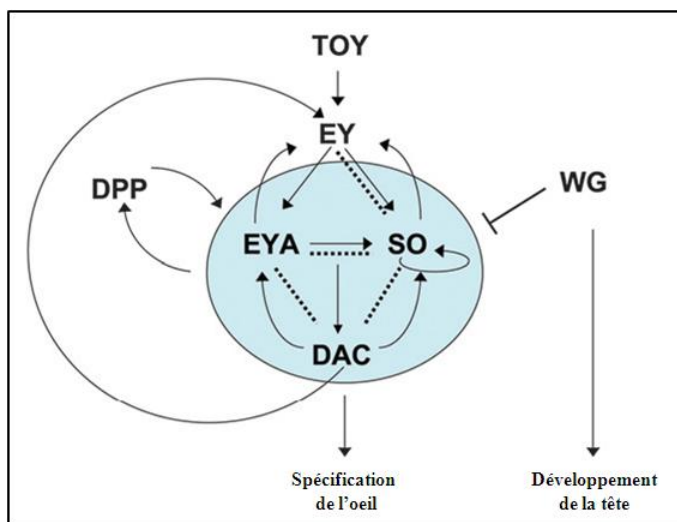
équipotentiel occupe toute la face antérieure de la plaque neurale et forme petit à petit les deux yeux. Adelmann n'a pas su dire si les cellules situées sur la ligne médiane pouvaient migrer latéralement ; e) modèle du champ du cerveau antérieur comprenant le télencéphale, les yeux et d'autres régions du diencéphale. Les yeux sont présumés être issus par défaut de ce champ ce qui rend difficile de distinguer l'origine des yeux ou de savoir si Adelmann a juste évoqué une partie des propriétés du cerveau antérieur. De Li et al., 1997.

Pour la détermination du territoire rétinien, la molécule Shh (pour *Sonic hedgehog*) déjà connue comme étant impliquée dans la structuration du tube neural (Echelard et al., 1993) est une candidate potentielle. Son expression au milieu du pôle antérieur de la plaque neurale ainsi que dans le mésoderme pré-chordial intervient dans la structuration des tiges optiques et de la rétine en régulant l'expression des gènes *Pax2* et *Pax6* à partir de la plaque neurale. Elle n'influe pas directement sur le guidage axonal des cellules ganglionnaires, elle permet simplement la mise en place des tiges optiques (Macdonald et al., 1995; Martí et al., 1995; Stacher Hörndli and Chien, 2012).

Pour connaître les facteurs influençant la formation de ce territoire, le Dr Gehring et son équipe ont étudié la génétique du développement embryonnaire grâce à la drosophile. Ils ont ainsi pu découvrir les gènes *ey* (également nommé *eyeless*) et *toy* (pour twin of eyeless) (Halder et al., 1998; Quiring et al., 1994). Puis le gène *so* (pour sine oculis) a été mis en évidence, son absence entraînant une non invagination des cellules de l'ectoderme primitif (Cheyette et al., 1994). Enfin, les gènes *eya* (pour eyes absent), *dac* (pour dachshund) (Mardon et al., 1994) et *eyg* (pour eye gone) (Jang et al., 2003) complètent le réseau.

Le gène *eya* conduirait les précurseurs rétiens soit vers la mort soit vers la différenciation (Bonini et al., 1993). La protéine Dac peut, à elle seule (Shen and Mardon, 1997) ou en combinaison avec les protéines So et Eya (Chen et al., 1997a), induire la formation d'yeux ectopiques.

Les voies de signalisation Notch et de l'EGFR (pour *Epidermal Growth Factor Receptor*) ainsi que les molécules morphogènes Hh (pour *Hedgehog*), Dpp (pour *Decapentaplegic*) et Wg (pour *Wingless*) réguleraient ce réseau génétique, Dpp étant requise pour les stades larvaires 2 et 3 (2 jours après la fécondation), Wg permettant le développement de la tête (Figure 55) (Braid and Verheyen, 2008; Dominguez et al., 2004; Kumar and Moses, 2001).

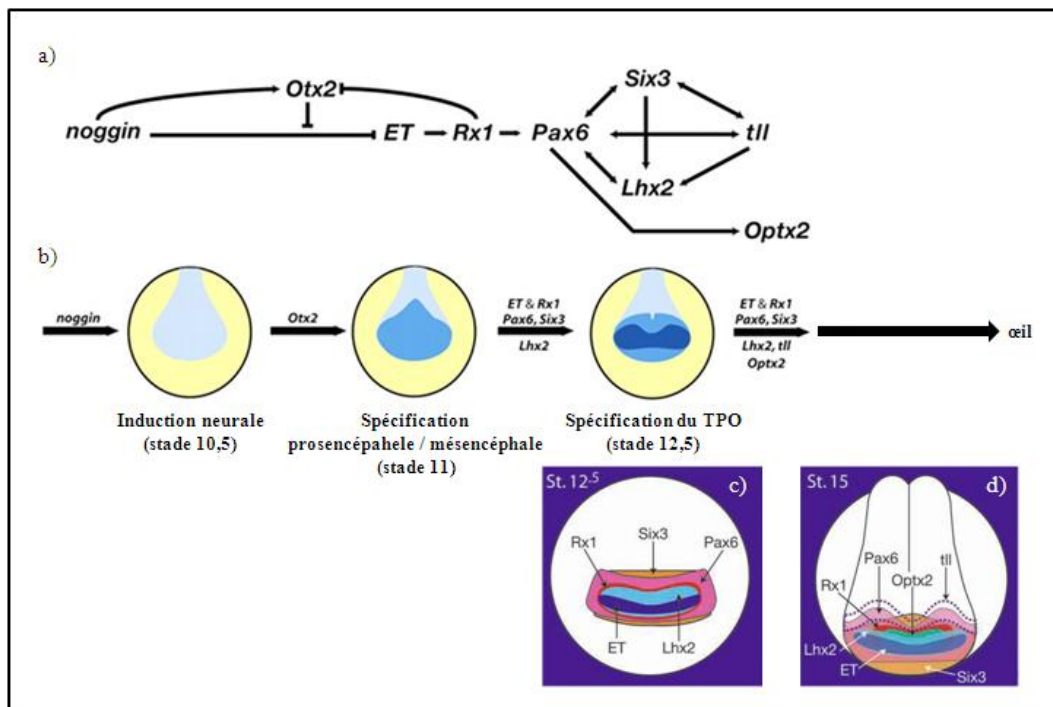


**Figure 55** : le réseau génétique de détermination de la rétine chez *Drosophila melanogaster*. Les flèches en trait plein indiquent les régulations transcriptionnelles directes, les flèches arquées représentent les boucles de rétroaction, et les pointillés marquent les interactions physiques. Les gènes *so*, *eya* et *dac* ne sont pas requis pour l'expression du gène *ey* dans le développement normal de l'œil mais peuvent activer son expression dans la formation d'œil ectopique. Adapté de Braid and Verheyen, 2008.

Plusieurs EFTFs ont été découverts depuis en cherchant les homologues de ces gènes notamment chez la grenouille. Ils sont conservés chez la souris et l'Homme (Massé et al., 2007; Zuber et al., 2003). Il s'agit de *ET*, *Rx1*, *Pax6* (homologue de *eya* et *toy*, Quiring et al., 1994), *Six3*, *Optx2* (également nommé *Six6*) (homologues de *so*, Oliver et al., 1995), *Lhx2*, et *tll*. En utilisant différentes combinaisons de ces facteurs chez la grenouille, Michael Zuber et ses collègues ont montré que la disparition de la formation d'œil ectopique est tout d'abord gouvernée par le gène *Pax6* suivi des gènes *Otx2*, *Six3* and *ET* (Zuber et al., 2003). Ils ont également étudié l'effet d'inducteurs neuraux tels que *noggin* et *chordin* pour établir le réseau génétique gouvernant la spécification de l'œil chez les vertébrés (Figure 56).

Cette combinatoire d'EFTFs est modulée en réponse à une modification de l'environnement cellulaire. Les agents capables d'induire une telle modification sont très nombreux et présentent des activités biochimiques distinctes. Il s'agit des :

- ♦ protéines de la famille Hh qui permettent la séparation du champ oculaire en deux hémisphères rétiniens (Macdonald et al., 1995) ;
- ♦ protéines FGF8 et BMP4 membres des familles FGFs et TGFβ (Crossley et al., 2001).

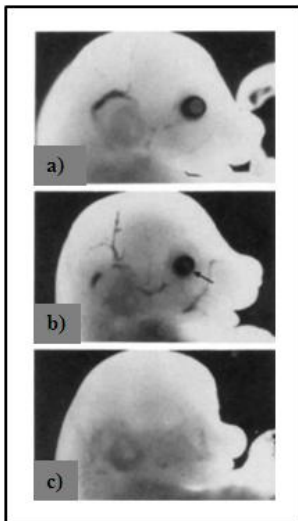


**Figure 56 : étude du territoire présomptif de l'œil (TPO) chez *Xenopus laevis*.** a) représentation du réseau de gènes régulant l'induction neurale, la spécification pro-mésencéphale et la spécification du TPO jusqu'au stade 12,5 ; b) un résumé du modèle d'induction du territoire présomptif de l'œil dans la plaque neurale antérieure. Avec la plaque neurale (bleu clair), l'expression d'*Otx2* (bleu moyen) et le TPO (bleu foncé) ; c : stade 12,5/13 ; b) stade 15. Avec les zones d'expression des gènes *Rx1*, *Six3*, *Pax6*, *ET*, *Lhx2*, *Optx2*, *tll*. Modifié de Zuber et al., 2003.

Il faut rester vigilant quant aux résultats trouvés chez la mouche et les vertébrés car les expériences montrent que l'ensemble des gènes impliqués dans la formation de l'œil ne sont pas forcément conservés par l'ensemble des espèces. L'analogie avec le développement de l'œil humain ne peut donc pas être faite de façon systématique.

Cependant, le gène *PAX6* est retrouvé chez de nombreuses espèces et pourrait être à l'origine de l'œil ancestral commun (Gehring and Ikeya, 1999). Il est considéré comme le gène maître (ou *Master Gene*) du contrôle de la morphogénèse de l'œil. En effet, chez :

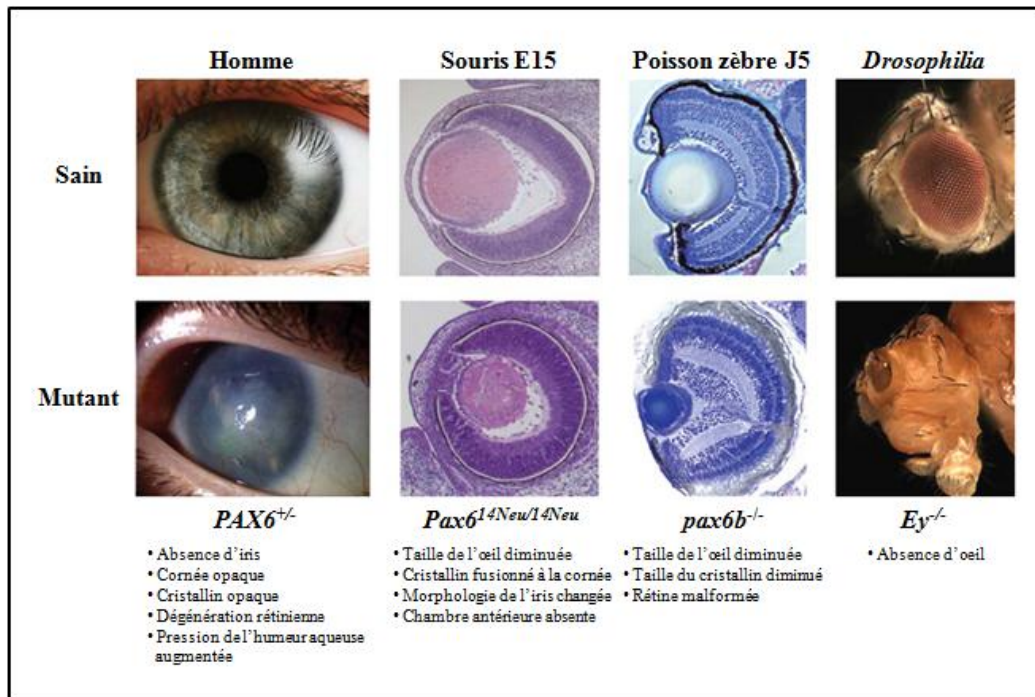
- ♦ la souris *Sey* (pour *Small eye*), les mutations hétérozygotes entraînent une microphthalmie et un retard de fermeture de la coupe optique alors que les mutations homozygotes présentent une absence complète de développement de l'œil et des cavités nasales *in utero* et meurent rapidement après la naissance (**Figure 57**) (Hill et al., 1991) ;



**Figure 57** : phénotype de la souris mutante *Sey* à 15 jours de développement *in utero*. a) phénotype sain ; b) embryon hétérozygote *Sey/+* présentant un œil de taille réduite et la région de fermeture de la coupe optique autour du cristallin (flèche noire) ; c) embryon homozygote *Sey/Sey* n'ayant plus de trace de formation de l'œil à ce stade de développement et un museau raccourci. Les embryons mutants sont également plus petits que l'embryon sain. De Hill et al., 1991.

- ♦ la drosophile, des mutations du gène *ey* empêchent la formation des yeux (**Figure 58**) (Quiring et al., 1994) ;
- ♦ la grenouille, sa surexpression induit la formation des yeux ectopiques (Chow et al., 1999) ;
- ♦ l'Homme, les mutations induisent un large spectre de malformations oculaires telles que l'aniridie qui est une malformation plus ou moins sévère de l'iris (**Figure 58**) (Glaser et al., 1992; Jordan et al., 1992; Quiring et al., 1994), la cataracte congénitale (Glaser et al., 1994), l'anomalie de Peter (Hanson et al., 1994), la dysplasia fovéale familiale (Azuma et al., 1996) ou encore la kératite autosomique dominante (Mirzayans et al., 1995).





**Figure 58** : représentations de différents phénotypes dus à la mutation du gène *PAX6* chez diverses espèces. Les phénotypes sains sont représentés en haut, les phénotypes mutants chez l'Homme, et les orthologues de *PAX6* chez la souris, le poisson zèbre et la mouche, sont présentés en bas. La photographie du phénotype *PAX6*<sup>+/-</sup> provient de <http://www.abdn.ac.uk/ims/staff/details.php?id=m.collinson>. Pour la mutation *Pax6*<sup>14Neu/14Neu</sup> chez la souris au stade E15, l'expression du gène est inférieure à 50% (Favor et al., 2008). Les photographies du poisson zèbre à 5 jours après la fertilisation proviennent de (Kleinjan et al., 2008). Modifié de Washington et al., 2009.

Le niveau d'expression de *PAX6* est très important pour la morphogénèse de l'œil, un déséquilibre, dans un sens ou dans l'autre, menant à des malformations. L'intégration d'une copie du gène humain *PAX6* chez des souris *Sey* suffit à restaurer un phénotype normal. Cependant, un excès du nombre de copies du gène *PAX6* intégrées conduit à une microphthalmie sévère (Schedl et al., 1996). Toutes ces données montrent à quel point la fine régulation de l'expression de *PAX6* est importante.

#### 1.3.2.4.2 Formation des vésicules optiques

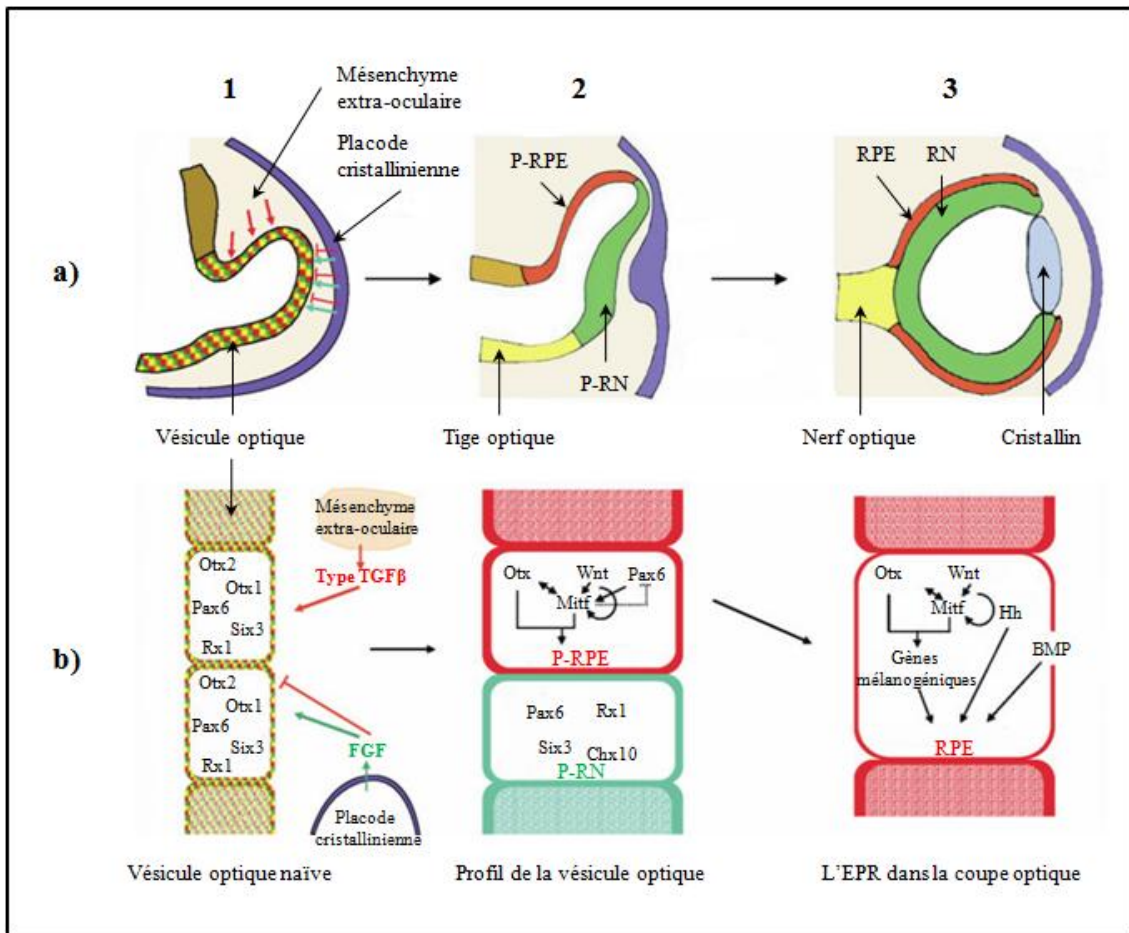
La croissance des vésicules optiques a largement été étudiée d'un point de vue moléculaire et génétique. Ruben Adler et Valeria M Canto-Soler ont regroupé l'ensemble de ces travaux dans une revue parue en 2007 (Adler and Canto-Soler, 2007). Ainsi, les voies de signalisation impliquées dans la structuration des vésicules sont Shh, FGFs, Activin, BMP7 et l'acide rétinoïque (ou RA pour *retinoic acid*) alors que les gènes impliqués sont principalement les EFTF. Durant cette étape de développement, de nouveaux facteurs de transcription vont avoir un rôle majeur pour la formation de la RN et de l'EPR. Il s'agit respectivement de *CHX10* (ou *VSX2*) et *MITF* (Bora et al., 1998; Chow et al., 1999; Liu et al., 1994; Martínez-Morales et al., 2004; Nguyen and Arnheiter, 2000) :



- ♦ Le gène *CHX10* (pour *ceh-10 homeo domain containing homolog (C. elegans)*) est un facteur de transcription contenant un domaine homéo. Il régule négativement l'expression du gène *MITF* ce qui permet d'engager les cellules des vésicules optiques vers la RN (Horsford et al., 2005; Rowan et al., 2004) ;
- ♦ Le gène *MITF* (pour *Microphthalmia Transcription Factor*) est nécessaire pour la différenciation correcte de l'EPR. Les souris *Mitf<sup>mi/mi</sup>*, découvertes il y a plus de 60 ans par le Dr Hertwig (Denat and Larue, 2007), présentent une absence totale de mélanocytes dérivés des crêtes neurales, une hyperprolifération et un dysfonctionnement de l'EPR, une déficience en cellules mastocytaires et une ostéoporose (Hodgkinson et al., 1993; Hughes et al., 1994; Tassabehji et al., 1995). L'EPR pluristratifié (Nakayama et al., 1998) se transdifférencie localement en RN (Bumsted and Barnstable, 2000; Nguyen and Arnheiter, 2000). Les premières cellules qui expriment *Mitf* au cours du développement sont les cellules des vésicules optiques (Nakayama et al., 1998).

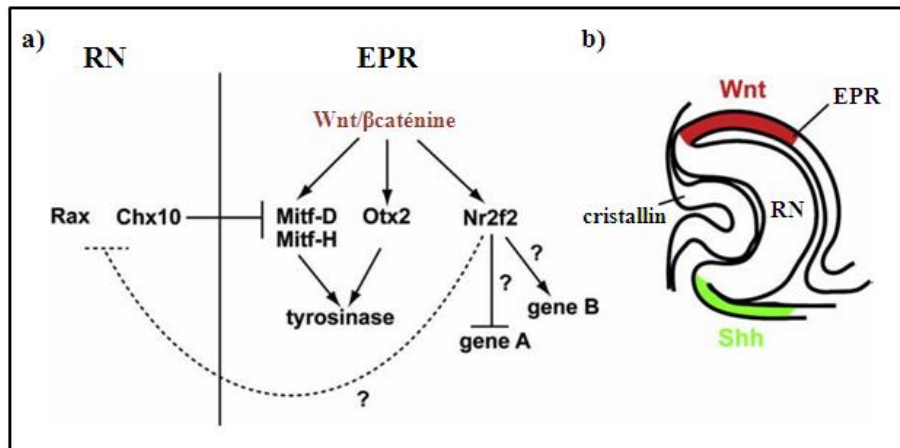
#### **I.3.2.4.3 Formation de l'EPR et de la RN**

La spécification de l'EPR est nécessaire pour la mise en place des couches de la RN et la différenciation des photorécepteurs (Bharti et al., 2006; Martínez-Morales et al., 2004; Strauss, 2005). Ce sont les premières cellules différenciées présentes à l'arrière des coupes optiques (Müller et al., 2007). Les gènes *MITF*, *OTX2* et *PAX2* permettent cette spécialisation. Le gène *PAX2* est un autre gène de la famille *Pax*. Il est exprimé dans les cellules des vésicules optiques qui donneront le pédoncule du nerf optique ainsi qu'en bordure des vésicules de part et d'autre de la fissure du nerf optique (Nornes et al., 1990). Les molécules de la famille des BMPs et Shh jouent également un rôle important en favorisant la différenciation de l'EPR (**Figure 59**) (Martínez-Morales et al., 2004).



**Figure 59 : réseau moléculaire impliqué dans la structuration de la vésicule optique et la spécification de l'EPR.** a) 1 : représentation schématique de la vésicule optique non structurée, 2 : la vésicule structurée, 3 : la coupe optique ; b) les composants moléculaires de l'ensemble des processus, 1 : les cellules neuroépithéliales sont mélangées et expriment un ensemble de facteurs de transcription. Les signaux de type TGF $\beta$ , émis par le mésenchyme extra-oculaire, favorisent la formation des cellules de l'EPR (flèche rouge) alors que les signaux de type FGF, émis par les placodes cristalliniennes répriment cette différenciation (ligne rouge) et activent la formation de la RN (flèche verte), 2 : dans la vésicule optique, les différents régulateurs de transcription se restreignent aux territoires présomptifs de l'EPR (rouge) et de la RN (vert), 3 : l'activité et les interactions d'Otx, Pax6, et Mitf ainsi que les molécules Wnt, BMP et Hh consolident et maintiennent l'identité de l'EPR. Adapté de Martínez-Morales et al., 2004.

Enfin, les voies Wnt/ $\beta$ caténine et Shh vont réguler les faces dorsales et ventrales de l'EPR (**Figure 60**) (Fujimura et al., 2009). Les cellules de l'EPR encore immatures ne vont pas se modifier avant que les photorécepteurs ne commencent à apparaître (Marmorstein et al., 1998).



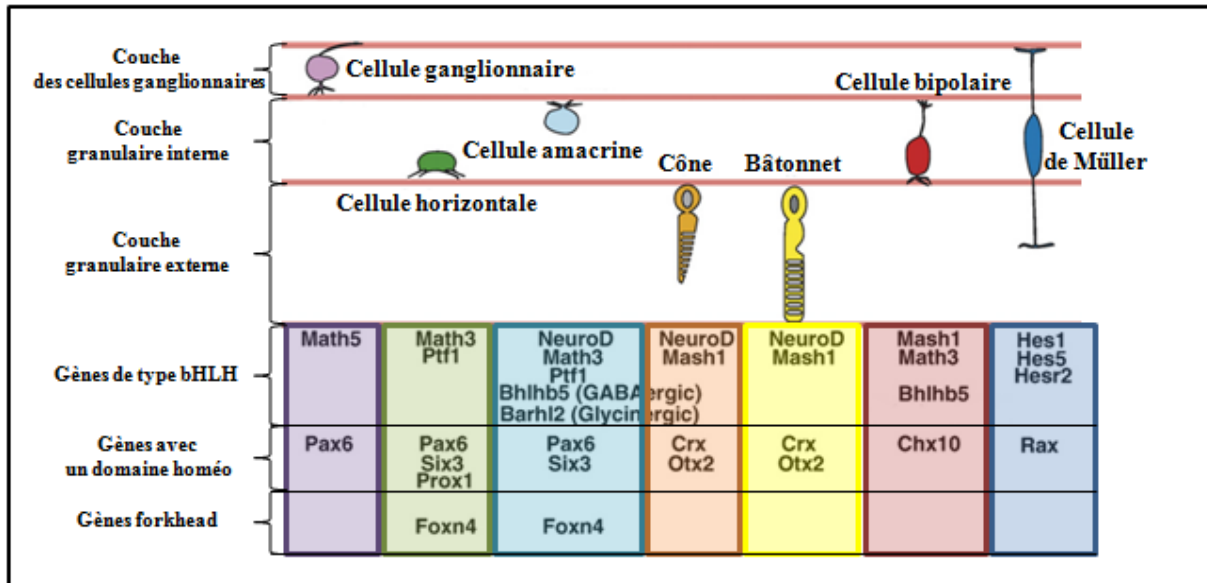
**Figure 60** : rôle de la régulation par les Wnt/ $\beta$ caténine chez la souris. a) les signaux des Wnt/ $\beta$ caténine, émis par l'EPR, induisent l'expression des gènes *MitfD*, *MitfH*, *Otx2* et *Nr2f2*. Les gènes *MitfD*, *MitfH* et *Otx2* régulent l'expression des gènes mélanogéniques tels que *tyrosinase* alors que *Nr2f2* peut à la fois réguler négativement les gènes spécifiques de la RN (gène A) et positivement l'expression de gènes qui sont impliqués dans le développement de l'EPR (gène B). Dans la RN, l'expression de *Chx10* et *Rax* est maintenue, *Chx10* inhibant l'expression de *MitfD* et *MitfH*. Les pointillés indiquent les régulations indirectes alors que les traits pleins représentent la régulation directe ; b) les voies de signalisation dans l'EPR montrent que la voie Wnt/ $\beta$ caténine régule la face dorsale alors que *Shh* régule la face ventrale. Adapté de Fujimura et al., 2009.

Les cellules de la RN ne se divisent pas toutes au même rythme (Finlay, 2008). Plusieurs études font mention d'une population des progéniteurs rétiniens multipotents (PRM) présents au niveau des cellules qui se sont invaginées lors de la formation de la coupe optique. Ces PRM expriment les gènes *Pax6*, *Six3*, *Rx1*, *Chx10* et *Hes1* (López et al., 2005; Marquardt and Gruss, 2002; Prada et al., 1991). Les cellules ganglionnaires sont les premières à apparaître. Le gène *PAX6* est fortement exprimé au niveau des cellules ganglionnaires, horizontales et amacines (Figure 61) (Belecky-Adams et al., 1997). Les travaux de Dyer et al., 2003; Ohsawa and Kageyama, 2008 et Westheimer, 2007, ont permis d'étudier de manière plus approfondie les différenciations des cellules amacines, horizontales et bipolaires.

La différenciation des photorécepteurs est gouvernée par les gènes *OTX2* et *CRX* (Figure 61). Des mutations du gène *CRX* (pour cone-rod homeobox) (Chen et al., 1997b), qui appartient tout comme le gène *OTX2* à la famille *Otx*, causent la dégénérescence des photorécepteurs chez la souris et l'Homme (Freund et al., 1997; Furukawa et al., 1999; Swain et al., 1997). Le gène *NRL* (pour neural retina leucine zipper) permet de modifier la voie de différenciation naturelle qui guide les progéniteurs des photorécepteurs vers la différenciation en cônes permettant ainsi la formation des bâtonnets (Ohsawa and Kageyama, 2008). Chez l'Homme des mutations de ce gène sont associées à une dystrophie rétinienne (Bessant et al., 1999). Cette neurogénèse serait médiée par la voie des FGFs (De Jongh and McAvoy, 1993; Pittack et al., 1997; Vogel-Höpker et al., 2000).

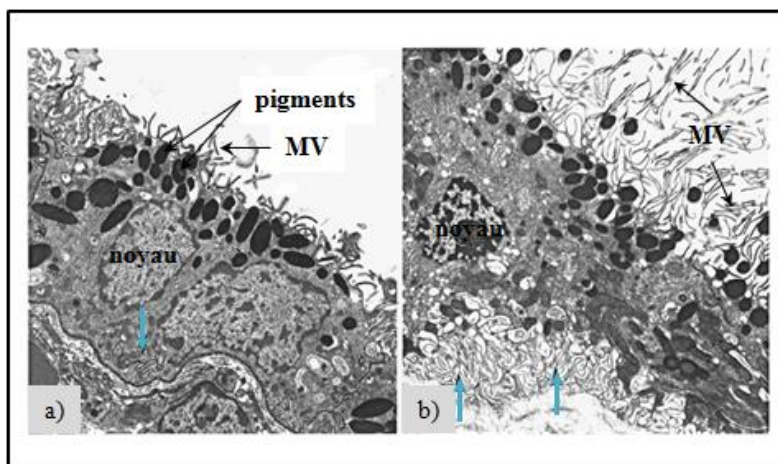
Après la neurogénèse, les PRM restés à un stade indifférencié vont donner naissance aux cellules de Müller, les gènes *Hes* promouvant la gliogénèse (Figure 61) (Kageyama et al., 2008). A l'heure

actuelle, les mécanismes qui conduisent les PRM à passer d'un état à un autre et l'horloge qui régit ces changements, ne sont pas connus.



**Figure 61** : Les multiples facteurs de transcription régulant le développement de la RN. La combinaison des facteurs de type bHLH (pour *basic helix-loop-helix*) ou à domaine homéo sont requis pour la spécification des types cellulaires rétiens. Modifié d'Ohsawa and Kageyama, 2008.

Lorsque les photorécepteurs vont commencer à être matures avec l'apparition de leur SE, les cellules de l'EPR vont entrer dans les derniers stades de différenciation. Les cellules pavimenteuses se pigmentent, forment des jonctions serrées, se polarisent avec l'apparition de microvillosités à la surface apicale et l'invagination de la membrane basale sous forme de tubules (Figure 62) (Burke and Hjelmeland, 2005; Finnemann, 2003; Marmorstein et al., 1998; Marmorstein, 2001; Rizzolo, 2007; Strauss, 2005).



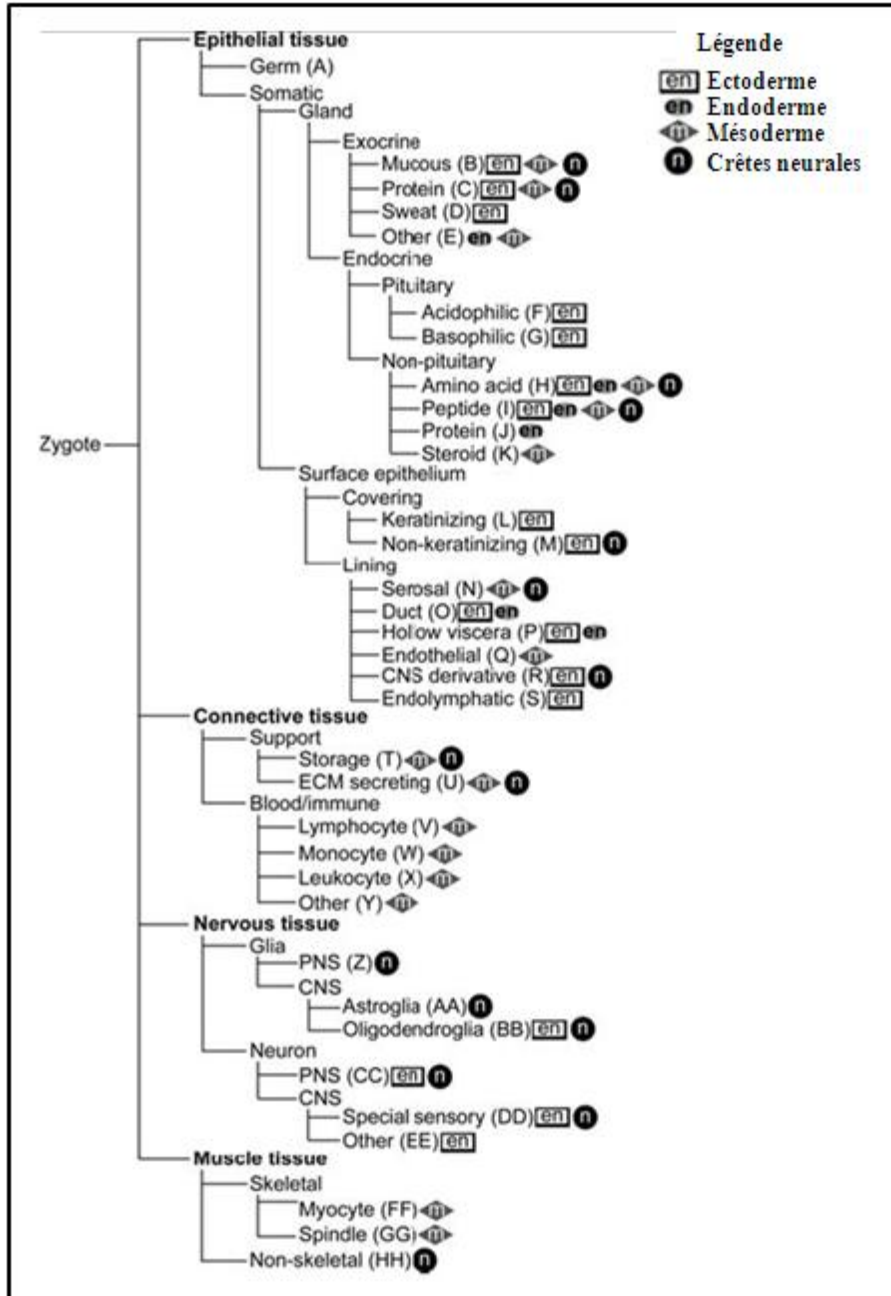
**Figure 62** : changements morphologiques durant le dernier stade de différenciation. a) cellules de l'EPR de rat 2 jours après la naissance ; b) cellules de l'EPR d'un rat adulte montrant l'élongation des microvillosités (MV) au pôle apical et la formation des tubules (flèches bleues) au pôle basal. Modifié de Marmorstein et al., 1998.

## **II Les cellules souches : outils pour étudier le développement rétinien et l'amaurose congénitale de Leber**



## II.1 Origine et définition des cellules souches

L'observation du monde animal a montré aux scientifiques que l'anémone, l'étoile de mer, l'hydre, le lézard ou encore des urodèles tels que la salamandre et le triton peuvent régénérer des parties de leur corps (Gardiner and Bryant, 2007). L'organisme humain constitué de 411 types cellulaires est également capable dans une moindre mesure de se régénérer (Figure 63) (Vickaryous and Hall, 2006).



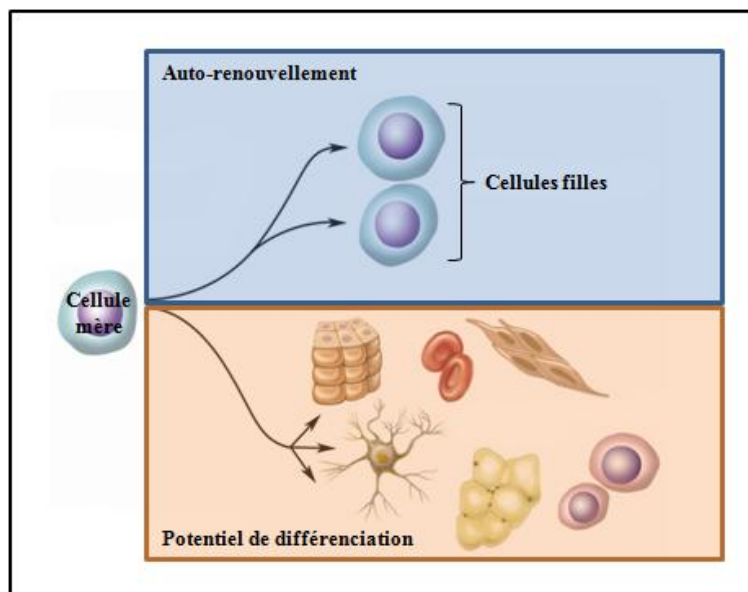
**Figure 63 : le système de classification artificiel des types cellulaires.** Les 411 types cellulaires ont été regroupés en sous ensembles plus spécifiques en se basant sur des critères histologiques et cytologiques, en ayant pour origine l'un des quatre tissus de base : l'ectoderme, l'endoderme, le mésoderme et les crêtes neurales. Au total, 34 sous ensembles ont été définis allant de A à HH. Les quatre tissus à l'origine de ces sous ensembles sont désignés par des symboles. Avec PNS : système nerveux périphérique, CNS : système nerveux central et ECM : matrice extracellulaire. Issu de Vickaryous and Hall, 2006.

Le corps humain régénère constamment les cellules endommagées ou sénescents de notre sang, peau, intestin, nos os et bien d'autres tissus (Alonso and Fuchs, 2003; Hall and Eubank, 1896; Harada and Rodan, 2003; Morgan, 1901; Radtke and Clevers, 2005) afin de maintenir ces derniers en bon état de fonctionnement. Une mauvaise homéostasie cellulaire peut mener à certains cancers ou être à



l'origine de maladies dégénératives. Ce renouvellement s'opère à partir de cellules dites souches (CS) qui sont des cellules immatures. Auguste Weissman (1834-1929) est le premier à avoir introduit le terme de *Stammzellen* (ou *stem cell* pour CS) en 1883 alors qu'il travaillait sur la migration de précurseurs de cellules germinales chez l'*Hydractinia echinata* (Frank et al., 2009; Plickert et al., 2012; Rey, 2003). Puis, Alexandre A Maximov (1874-1928) a fondé le concept de CS hématopoïétiques (ou CSH) dès 1909 (Papayannopoulou and Scadden, 2008). Ces CS ont 2 propriétés fondamentales qui permettent de maintenir cette homéostasie (**Figure 64**) :

- ♦ l'auto-renouvellement (ou *self-renewal*) est la capacité qu'a une CS dite mère de générer deux cellules filles identiques dites progénitrices par division symétrique et de manière théoriquement illimitée (Zeng and Rao, 2007) ;
- ♦ le degré de plasticité (ou *potency*) est le potentiel de différenciation qu'a une CS à donner une cellule spécialisée. Lors d'une division asymétrique, la cellule mère donne deux cellules filles qui ont des propriétés différentes (Hall and Watt, 1989). L'une d'elle est totalement identique à la CS mère ce qui maintient le réservoir de CS, rapidement mobilisable en cas de contraintes tissulaires, la seconde est qualifiée de cellule transitoire (ou progéniteur), elle est déterminée, c'est-à-dire qu'elle possède un potentiel de prolifération limité mais qu'elle est capable de donner naissance à des cellules spécialisées.



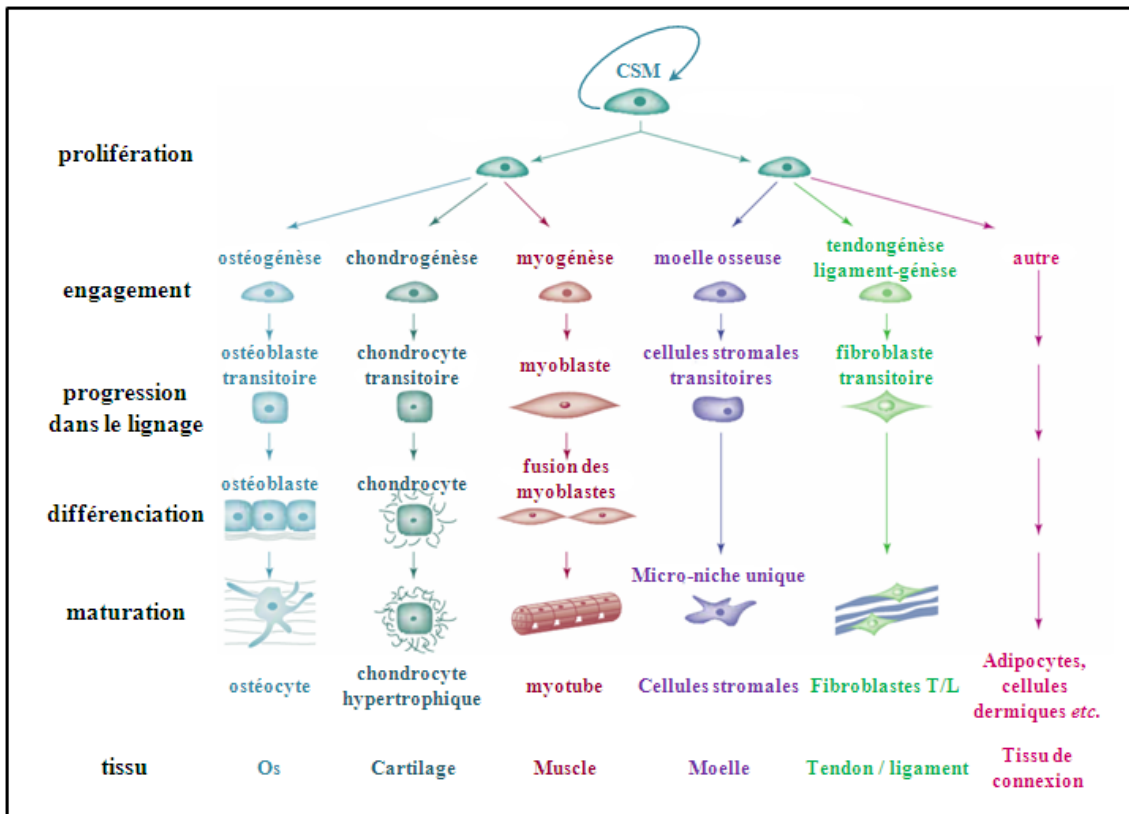
**Figure 64 : propriétés fondamentales des cellules souches.** L'auto-renouvellement permet à une cellule mère de donner naissance à deux cellules filles identiques (bleu) alors que le degré de plasticité est le potentiel de différenciation de cette cellule mère en cellules spécialisées (orange). Adapté de <http://dels-old.nas.edu/bls/stemcells/what-is-a-stem-cell.shtml>.



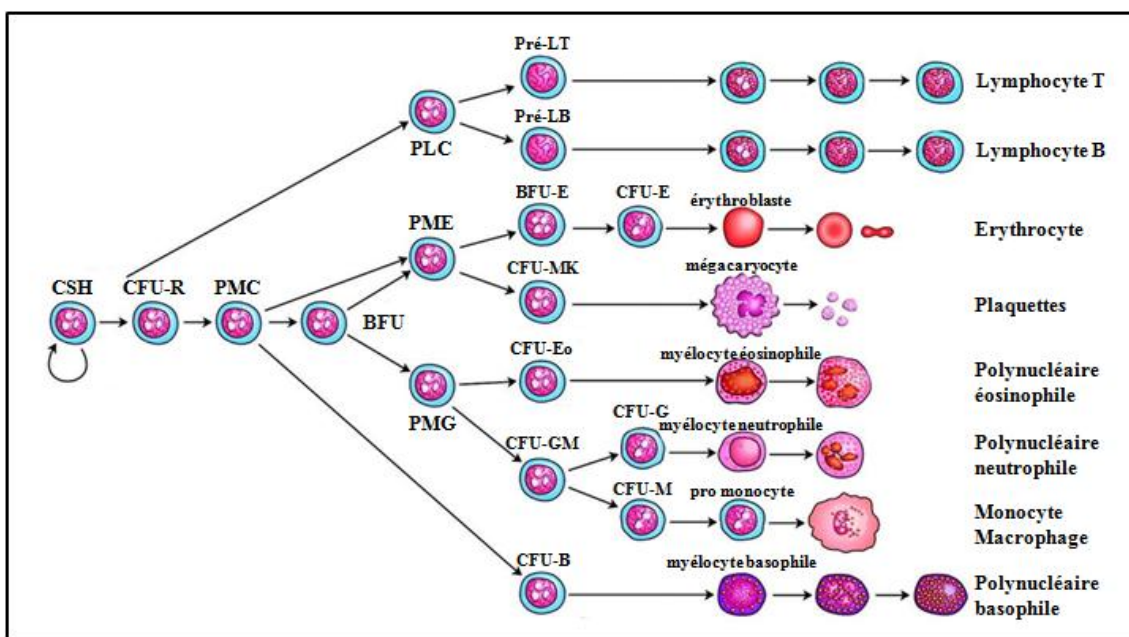
## II.1.1 Sous-types de cellules souches

Sur la base de cette définition, il existe différentes catégories de CS (Kumar et al., 2010) :

- ♦ Issu de la fusion du spermatozoïde et de l'ovule, le zygote est composé de CS totipotentes ou omnipotentes et le sera jusqu'au stade morula. Ces cellules ont la particularité de pouvoir donner naissance à un individu dans sa globalité car elles peuvent former l'ensemble des tissus embryonnaires et extra-embryonnaires.
- ♦ Les CS pluripotentes (CSP) sont les descendantes des CS totipotentes. Elles se trouvent au sein du blastocyste et ne peuvent plus donner naissance à un organisme vivant car elles ne sont pas capables de former les annexes extra-embryonnaires. Elles conduisent par différenciation à l'ensemble des cellules des 3 feuillets embryonnaires : l'ectoderme, le mésoderme et l'endoderme (Pera et al., 2000). Ces cellules peuvent avoir plusieurs origines (voir : [Origine](#)) ;
- ♦ Une fois le stade blastocyste passé, les CS présentes chez l'embryon, le fœtus ou l'adulte sont qualifiées de cellules souches adultes. Leur capacité de différenciation est restreinte dans la mesure où elles sont uniquement capables de donner les cellules d'un même lignage cellulaire. On les qualifie de multipotentes. Chez l'adulte, elles sont impliquées dans le renouvellement tissulaire alors que chez l'embryon et le fœtus, elles permettent le bon fonctionnement des organes. A titre d'exemple, les CS mésenchymateuses (CSM) conduisent à la formation des futures cellules adipeuses, cartilagineuses, osseuses et musculaires (**Figure 65**) (Caplan and Bruder, 2001; Delorme et al., 2009; Dominici et al., 2006; Kaltz et al., 2008; Peister et al., 2004). Les CSH sont, quant à elles, à l'origine de l'ensemble des cellules sanguines (**Figure 66**) (Chute et al., 2010; Gangaraju and Lin, 2009; Gerrits et al., 2008; Cabrita et al., 2003; Metcalf, 2007; Larsson and Karlsson, 2005) ;



**Figure 65 :** représentation schématique simplifiée du potentiel de différenciation des cellules souches mésenchymateuses (CSM). Pour plus de simplicité, ce schéma ne représente ni l'ensemble des transitions, ni la totalité de la complexité d'une voie, ni les mouvements de cellules d'une voie à l'autre (plasticité). Les lignages sont représentés de gauche à droite selon la connaissance de la voie, de la mieux décrite à la moins connue. Traduit de Caplan and Bruder, 2001.



**Figure 66 :** représentation schématique simplifiée de l'hématopoïèse. Les CS multipotentes sont auto-produites et produisent aussi des précurseurs qui vont être restreints dans un lignage. Au sein de chaque

lignage, plus la maturité cellulaire croît, plus le nombre de cellules augmente. Pour minimiser la complexité, les cellules dendritiques et les cellules T tueuses n'ont pas été représentées. Les CSH de la moelle sont hétérogènes, cette dernière contient également des CSM. Avec CFU : *colony forming unit*, CFU-R : CFU de la rate, PMC : Progéniteurs Myéloïdes Communs, BFU : *burst forming unit*, PLC : Progéniteurs Lymphoïdes Communs, PME : Progéniteurs Mégacaryo-Erythrocytes, PMG : Progéniteurs Macrophages-Granulocytes ; Pré-LT : pré-lymphocytes T, Pré-LB : pré-lymphocytes B, E : érythrocytes, MK : mégacaryocytes, Eo : éosinophiles ; GM : granulo-macrophagiques, B : basophiles, G : granuleuses, M : macrophagiques. Traduit de Metcalf, 2007.

- ♦ Certaines cellules ont un potentiel de différenciation encore plus restreint, il s'agit de CS tri/bipotentes telles que les CS chondro-ostéo adipogéniques de la moelle osseuse (Beresford, 1989; Caplan et al., 1997; Owen, 1988; Owen and Friedenstein, 1988; Pittenger et al., 1999; Prockop, 1997) ou encore les CS du follicule pileux (Jaks et al., 2008, 2010; Ohyama, 2007) ;
- ♦ Enfin, il existe des cellules unipotentes c'est-à-dire qu'elles ne forment qu'un seul type cellulaire comme pour les cellules de l'épithélium basal de la muqueuse intestinale qui sont responsables de l'auto-renouvellement rapide du tissu tapissant le tube digestif (Barker et al., 2008; Bjerknes and Cheng, 2002; Vanuytsel et al., 2012).

Les CS existent au sein de « niches » qui leur permettent de conserver leur identité et leur capacité de prolifération grâce aux microenvironnements physique et chimique. Ces niches constituent des réservoirs de CS (Wong et al., 2012) et ont été identifiées dans de nombreux organes (Decimo et al., 2012; Kim et al., 2005b; Moore and Lemischka, 2006; Nakamura-Ishizu and Suda, 2012; Wong et al., 2012).

D'autres cellules peuvent acquérir les propriétés des CS au cours d'un processus pathologique, il s'agit des CS cancéreuses (CSC). Ces CSC seraient à l'origine de la propagation des tumeurs dans de nombreux types de cancers (Reya et al., 2001) et constituent des cibles potentielles pour le développement de thérapies anticancéreuses (Fabián et al., 2012; Natarajan et al., 2010).

Dans la suite de ce manuscrit, je discuterai des cellules souches pluripotentes qui ont constitué l'outil de base de mes travaux de recherche.

## **II.1.2 Les cellules souches pluripotentes**

### **II.1.2.1 Origine**

Historiquement, la preuve de l'existence de CSP provient d'études de tératocarcinomes testiculaires murins spontanés qui sont le résultat d'une accumulation de cellules d'origines diverses (cartilage, muscle, cellules neurales etc.) (Evans, 2011; Stevens and Little, 1954). C'est en 1964 que l'équipe de Barry Pierce les nomme cellules embryonnaires carcinomateuses (EC pour *embryonal carcinoma cell*) (KLEINSMITH and PIERCE, 1964). Elles ont ensuite fait l'objet de nombreuses études et en 1981,

les Drs Kaufman et Evans ont prouvé qu'il était possible d'obtenir des CSP à partir de blastocystes murins et que ces cellules avaient les mêmes propriétés que les EC (Evans and Kaufman, 1981). Cette même année, de Dr Martin présente une méthode permettant la culture de cellules pluripotentes murines et utilise le terme de CS embryonnaires (CSE ou ESC pour *embryonic stem cell*) (Martin, 1981). Quelques années plus tard, cette technique de dérivation des CSE a été utilisée avec succès chez les primates non-humains comme le singe rhésus (la lignée R278.5, Thomson et al., 1995) et chez l'Homme (3 lignées mâles et 2 lignées femelles Thomson et al., 1998, Itskovitz-Eldor et al., 2000; Reubinoff et al., 2000).

La source physiologique principale de CSP humaines (ou CSPh) est la CSE humaine (CSEh) issue de la MCI du blastocyste (Klimanskaya et al., 2006; Zhang et al., 2006). Cependant, la possibilité récente d'obtenir des CSPh par réexpression forcée de certains facteurs de transcription introduits dans des cellules somatiques a ouvert de nouvelles perspectives d'investigation en rendant possible *a priori* l'étude de n'importe quelle pathologie (Takahashi et al., 2007b).

## **II.1.2.2 Les cellules souches embryonnaires**

### **II.1.2.2.1 Obtention**

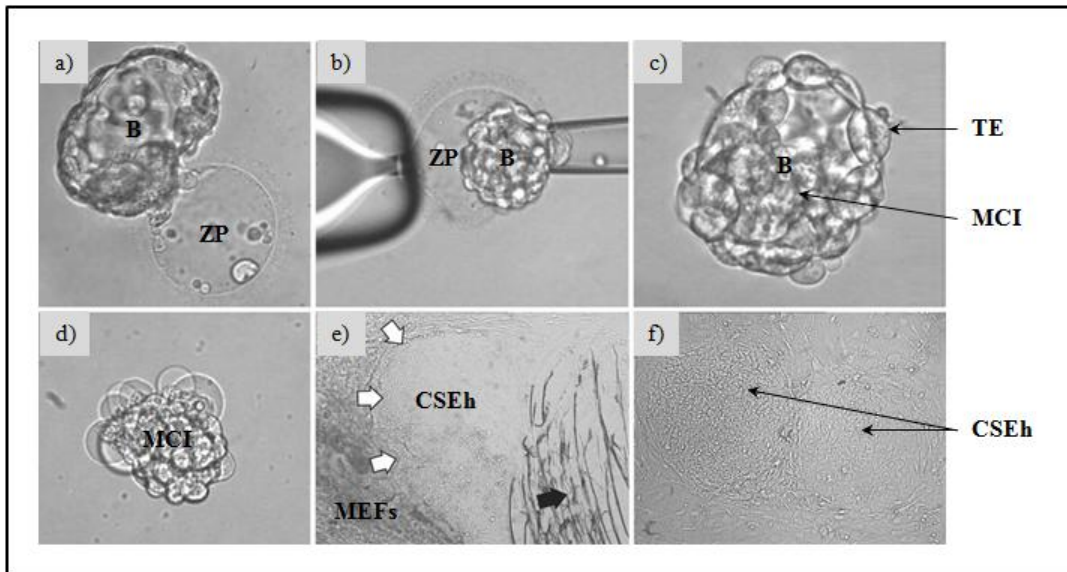
Pour l'Homme, les CSE proviennent de la MCI de blastocystes (Semb, 2005) d'embryons surnuméraires, dont le projet parental a été abandonné, obtenus suite à des fécondations *in vitro* (FIV) (Trousnon, 2001) effectuées dans le cadre d'assistance médicale à la procréation. Ces embryons peuvent être utilisés pour la recherche scientifique, après consentements éclairés des parents, accords des comités d'éthique locaux et selon la réglementation en vigueur.

Il est également possible de dériver des CSEh porteuses de mutation causale d'une pathologie à partir de morula d'embryons écartés lors d'une FIV pour laquelle un diagnostic préimplantatoire (DPI) a été réalisé afin de détecter la présence éventuelle d'anomalie(s) génétique(s) grave(s) (**Figure 67**) (Eiges et al., 2007; Geens et al., 2009; Keymolen et al., 2007; Mateizel et al., 2006; Verlinsky et al., 2005).

L'isolation du blastocyste du reste de l'embryon peut s'opérer selon différentes méthodes dites de dérivation :

- ♦ L'immunochirurgie est la méthode la plus couramment employée. Le trophoctoderme entourant le blastocyste va être lysé par des réactions anticorps-complément après digestion enzymatique de la zone pellucide (**Figure 67**) (Thomson et al., 1998). Cette technique utilise à de multiples reprises des composants d'origine animale ce qui peut entraîner des contaminations par des pathogènes ;
- ♦ La séparation mécanique consiste à placer des embryons entiers ou partiels sur des cellules nourricières. Elle permet de s'adapter à la qualité du blastocyste et présente l'avantage de

diminuer le risque de contaminations animales (Amit and Itskovitz-Eldor, 2002; Heins et al., 2004; Kim et al., 2005a; Oh et al., 2005). Cette technique présente un risque de développement des cellules issues du trophoctoderme, risque qui peut être diminué en détruisant ce dernier par un laser (Cortes et al., 2008; Turetsky et al., 2008).



**Figure 67 : blastocystes et CSEh dérivées d'embryons issus d'un DPI.** a) jour 7, le blastocyste (B) éclot à travers le trou effectué dans la zone pellucide (ZP) 4 jours plus tôt pour tester la présence de la dystrophie myotonique de Duchenne (ou DMD) sur l'un des blastomères de l'embryon ; b) la ZP est ôtée d'un B porteur de la fibrose kystique à 6 jours d'expansion ; c) le B présenté en b) s'expand à nouveau et l'on peut voir le trophoctoderme (TE) et la masse cellulaire interne (MCI) ; d) lyse du TE par immunochirurgie d'un B porteur de l'amyotrophie spinale ; e) les cellules de la MCI d'un B porteur du syndrome du X-fragile prolifèrent (flèches blanches) sur des cellules nourricières nommées MEFs (pour *mouse embryonic fibroblasts*), le passage mécanique a laissé des rayures sur le support de culture (flèche noire) ; f) deux colonies de CSEh porteuses du syndrome de Gaucher, 5 jours après le deuxième passage mécanique. Adapté de Frumkin et al., 2010.

Une fois dérivées, les CSEh porteuses ou non de mutation, sont cultivées dans des conditions permettant le maintien des propriétés d'auto-renouvellement et de pluripotence. Depuis 1998, environ 690 lignées de CSEh porteuses ou non de mutation ont pu être dérivées et établies à travers le monde dont 29 en France. Elles peuvent être retrouvées sur la base de données hESCreg<sup>1</sup> (Borstlap et al., 2008; Sermon et al., 2009).

Cependant l'utilisation de telles cellules posent des questions d'ordre éthique du fait de leur dérivation qui nécessite la destruction d'un embryon.

<sup>1</sup> [www.hesreg.eu](http://www.hesreg.eu)

#### II.1.2.2.2 Éthique et CSEh

Depuis l'instauration du Code Civil en 1804 (Cole, 1996), il existe en France deux statuts juridiques : les personnes (l'être) et les biens (l'avoir) mais l'embryon ne se situe dans aucune de ces catégories. En effet, il n'est pas considéré comme une personne vivante, car il n'est pas encore né. La question de son statut juridique est apparue avec la loi Veil du 17 janvier 1975 portant sur l'interruption volontaire de grossesse (ou IVG)<sup>2</sup>. Les premières lois de bioéthique, parue le 29 juillet 1994 interdisaient les expérimentations sur l'embryon mais autorisaient les études ne lui portant pas atteinte (Butler, 1994).

Dix ans plus tard, suite à la découverte des CSEh et aux perspectives thérapeutiques qu'elles offrent, les lois de bioéthique de 1994 ont été révisées par l'Assemblée Nationale du 9 au 11 juillet 2003 (Chneiweiss, 2004) et une deuxième loi (n° 2004-800) a pu être adoptée le 6 août 2004. La loi a rappelait qu'il est interdit de concevoir des embryons à des fins de recherche scientifique. Ainsi, trois types d'embryons ont été décrits :

- ♦ les embryons surnuméraires ne faisant plus l'objet d'un projet parental ;
- ♦ les embryons dont l'état ne permet pas la réimplantation ou la conservation à des fins de grossesse ;
- ♦ les embryons porteurs d'une anomalie recherchée dans le cadre d'un DPI.

La recherche sur l'embryon, quelque soit son type, demeurait interdite mais était rendue possible à titre dérogatoire pendant une période de 5 ans à compter de la publication du décret d'application (n°2006-121) le 7 février 2006. Ces autorisations de recherche ont été délivrées par l'Agence de la Biomédecine, au cas par cas, selon le projet présenté et les avis émis par un comité multidisciplinaire (philosophes, médecins, juristes etc.). Les recherches devaient être « susceptibles de permettre des progrès thérapeutiques majeurs (article R. 2151-1) » et il ne devait pas exister de « méthode alternative d'efficacité comparable, en l'état des connaissances scientifiques ». L'embryon devait avoir été conçu lors d'une FIV et ne plus faire l'objet d'un projet parental. Il devait y avoir un consentement écrit, éclairé, préalable des parents qui devait être confirmé à l'issue d'un délai de réflexion de trois mois. La décision finale d'autorisation appartenait toujours au ministère de la santé et de la recherche.

C'est dans ces conditions que l'Agence de la Biomédecine a pu autoriser l'importation de lignées de CSEh porteuses de mutations à l'origine de maladies monogéniques dès 2005. Les premières autorisations de dérivation de CSEh porteuses de mutations génétiques ont été délivrées le 19 juin 2006, au Dr Peschanski et au Pr Viville (Tropel et al., 2010).

Comme le prévoyait la loi de bioéthique de 2004, la période de dérogation de 5 ans s'est achevée en 2009. Les états généraux de la bioéthique ont été mis en œuvre de février à juin 2009 pour définir les nouvelles directives pour les années à venir. La loi n°2011-814 a finalement été adoptée le 23 juin 2011 et est parue au journal officiel le 7 juillet 2011<sup>3</sup>. Le cadre législatif de la recherche sur l'embryon

---

<sup>2</sup> <http://www.assemblee-nationale.fr/histoire/interruption/sommaire.asp>

<sup>3</sup> <http://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000024323102>



a très peu changé. L'article 41 stipule que « La recherche sur l'embryon humain, les cellules souches embryonnaires et les lignées de cellules souches est interdite », la recherche étant autorisée, comme pour la loi de 2004, à titre dérogatoire, toujours accordé par l'Agence de la Biomédecine.

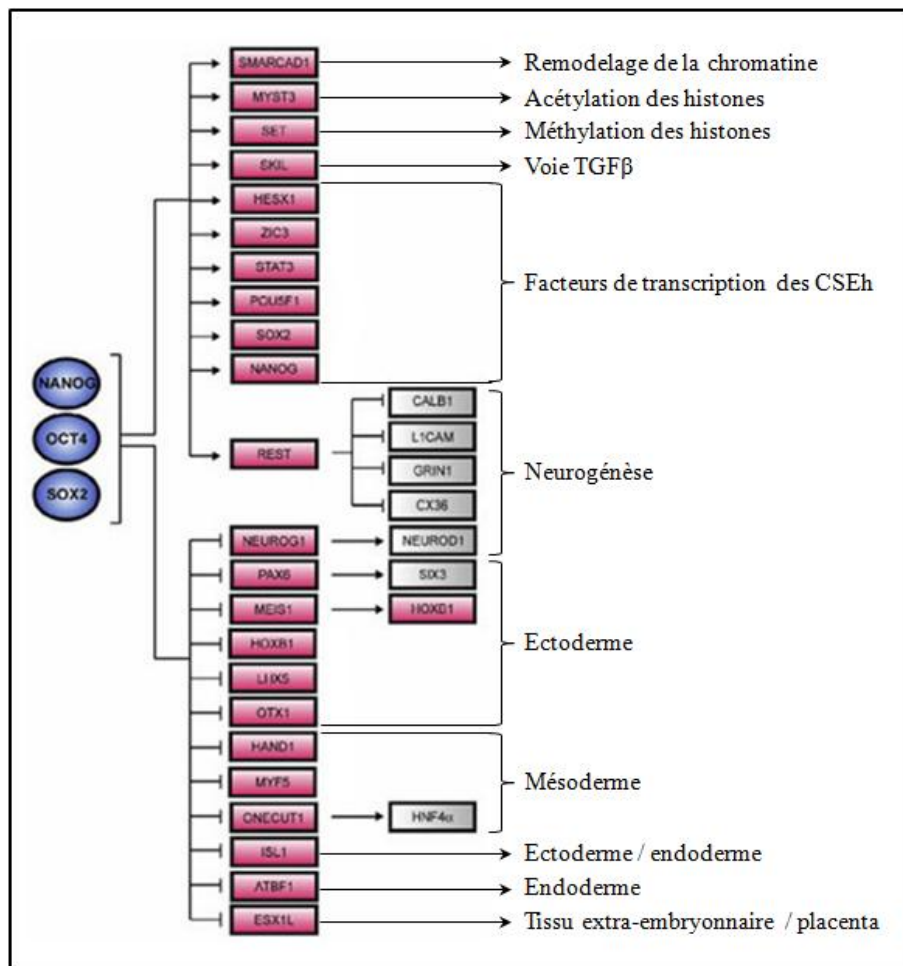
### II.1.2.2.3 Maintien des deux propriétés fondamentales

Les mécanismes permettant la régulation de l'auto-renouvellement et le maintien de la pluripotence sont très étudiés et peuvent différer d'une espèce à l'autre (Rao and Stice, 2004). C'est pourquoi seule la régulation chez les CSEh sera détaillée dans les paragraphes suivants.

#### II.1.2.2.3.1 Voies de régulation intrinsèques

Il existe trois grandes voies de régulation intrinsèques :

- ♦ le réseau génique est formé par trois facteurs de transcription marqueurs caractéristiques de l'état d'indifférenciation des CSEh (**Figure 68**) (Boyer et al., 2005). Il s'agit de *NANOG*, *OCT4* et *SOX2* (Chambers et al., 2003; Kuroda et al., 2005; Nichols et al., 1998; Okumura-Nakanishi et al., 2005) ;

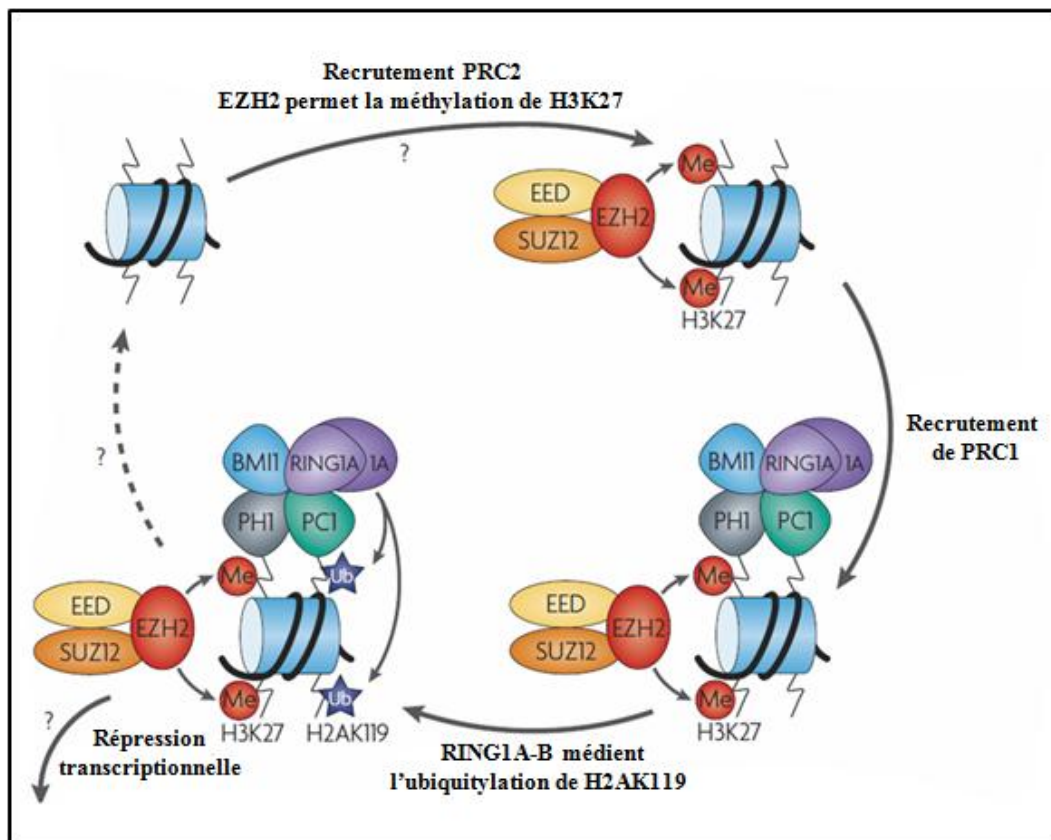


**Figure 68** : cœur du réseau de régulation transcriptionnelle dans les CSEh. Ce modèle de réseau a été construit en identifiant les gènes cibles des facteurs de transcription NANOG, OCT4 et SOX2. Ces gènes codent pour des facteurs de transcription ou des régulateurs de la chromatine. Les connaissances des fonctions de ces



régulateurs proviennent de la littérature et de jeu de données d'expression multiple. Un ensemble de gènes activés (haut) et inhibés (bas) par ces trois facteurs est présenté ici. La régulation positive a été établie si le gène cible est exprimé alors que la régulation négative est supposée lorsque le gène cible n'est pas transcrit. Modifié de Boyer et al., 2005.

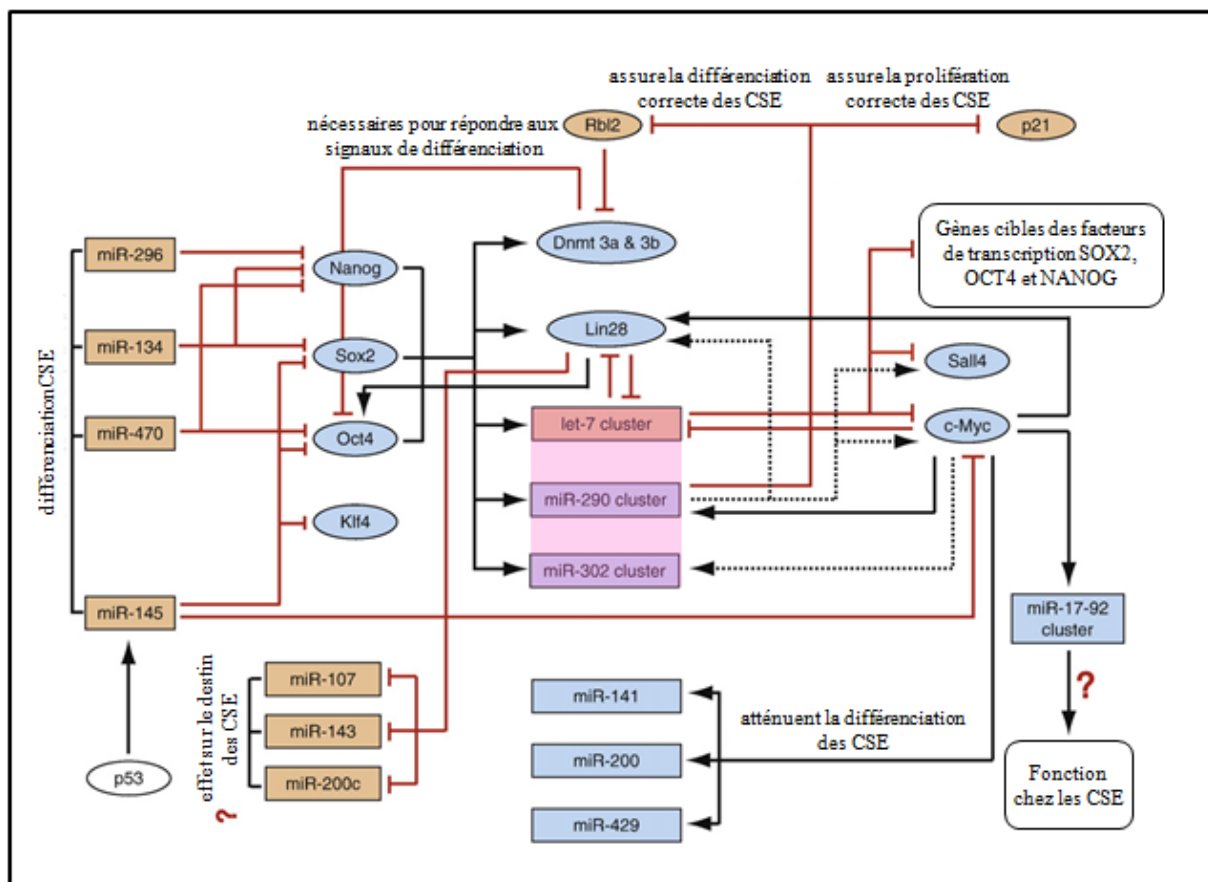
- ♦ les modifications épigénétiques qui peuvent toucher les histones (phosphorylation, acétylation etc.) et/ou le degré de méthylation de l'acide désoxyribonucléique (ADN) comme l'hyperméthylation qui empêche la transcription du gène (Geiman and Robertson, 2002). Des protéines appartenant à la famille des Polycomb, qui peuvent remodeler la chromatine, vont former des complexes qui répriment de façon stable l'expression des gènes cibles. Ces complexes, contenant PRC1 et PRC2 (pour *Polycomb repressor complex 1, 2*), peuvent tri-méthylter l'histone 3 sur son résidu lysine 27 (H3K27). Une fois méthylée, l'histone va avoir un effet répresseur en favorisant la compaction de la chromatine (Figure 69). (Jacobs and Van Lohuizen, 2002; Scheres, 2007; Spivakov and Fisher, 2007) ;



**Figure 69 : complexes répresseurs Polycomb.** Le recrutement du complexe polycomb répresseur 2 (PRC2) s'opère selon un mécanisme mal compris pour l'heure mais qui semble impliquer NANOG, OCT4 et SOX2. La protéine EZH2 (*enhancer of zeste homologue 2*), va méthylter le résidu lysine 27 de l'histone 3 (H3K27) ce qui va permettre de recruter PRC1 (*Polycomb repressor complex 1*). Les protéines RING1A et RING1B contenues dans ce complexe vont ubiquitinyler le résidu lysine 119 de l'histone H2A (H2AK119). Les histones méthylées et ubiquitinyllées vont avoir un effet répresseur. Les mécanismes qui régissent cette répression sont inconnus

mais ces complexes ou les modifications qu'ils induisent pourraient interférer avec la dynamique des nucléosomes ou l'initiation de la transcription. Durant la différenciation, les méthylations d'H3K27 et la fixation du complexe PCR2 sur ses gènes cibles peuvent être perdus (flèche pointillée). Adapté de Spivakov and Fisher, 2007.

- ♦ les micro acides ribonucléiques (miARNs) peuvent réguler de façon directe ou indirecte l'expression des 3 facteurs de transcription, perturber ou induire les mécanismes de différenciation (**Figure 70**) (Gangaraju and Lin, 2009; Garg, 2012; Houbaviy et al., 2003; Mallanna and Rizzino, 2010; Marson et al., 2008; Pfaff et al., 2012).



**Figure 70** : réseaux de régulation des miARNs (miR) et des protéines impliqués dans l'auto-renouvellement et la différenciation des CSEh et murines. La fixation directe et/ou l'activation du miR/ expression de la protéine est représentée par une flèche noire ; l'activation indirecte du miR/ expression de la protéine est indiquée par une flèche en pointillé ; les lignes rouges avec un taquet représentent l'inhibition directe de miR/ expression de la protéine ou des preuves d'une inhibition directe comme suggérée par la liaison de la protéine à la région promotrice ; les ellipses (protéines/gènes codant les protéines) et les rectangles (miR/ gènes codant les miR) bleus sont les éléments exprimés uniquement ou abondamment dans les CSE par rapport aux cellules différenciées ; les ellipses et les rectangles oranges symbolisent les éléments exprimés uniquement ou abondamment dans les cellules différenciées par rapport aux CSE. Nanog, Sox2 et Oct4 régulent l'expression des groupes de miR-290 et miR-302 alors que les miR-296, miR-134, miR-470 et miR-145 inhibent leur expression dans les CSE. Les miARN-ESCC (rectangle rose) sont les régulateurs majeurs du devenir des CS. A

ce titre, les miR-290 sont responsables de la prolifération mais aussi de la différenciation des CSE lorsqu'ils reçoivent les signaux appropriés ; les miR de la famille let-7 sont impliqués dans une boucle de rétroaction négative de Lin28 et c-Myc. Lin28 inhibe let-7 et les processus des miR-107,143 et 200c dans les CSE. Lin28 facilite également la traduction d'Oct4 dans les CSE. C-Myc est, quant à lui, impliqué dans une boucle de rétroaction positive des miARN-ESCC. Il induit l'expression des miR-141, 200 et 429 qui atténuent la différenciation des CSE murines lors du retrait du LIF (pour Leukemia Inhibitory Factor). Enfin, il active la transcription du groupe de miR-17-92 dans les cellules tumorales. De Mallanna and Rizzino, 2010.

#### **II.1.2.2.3.2 Voies de régulation extrinsèques**

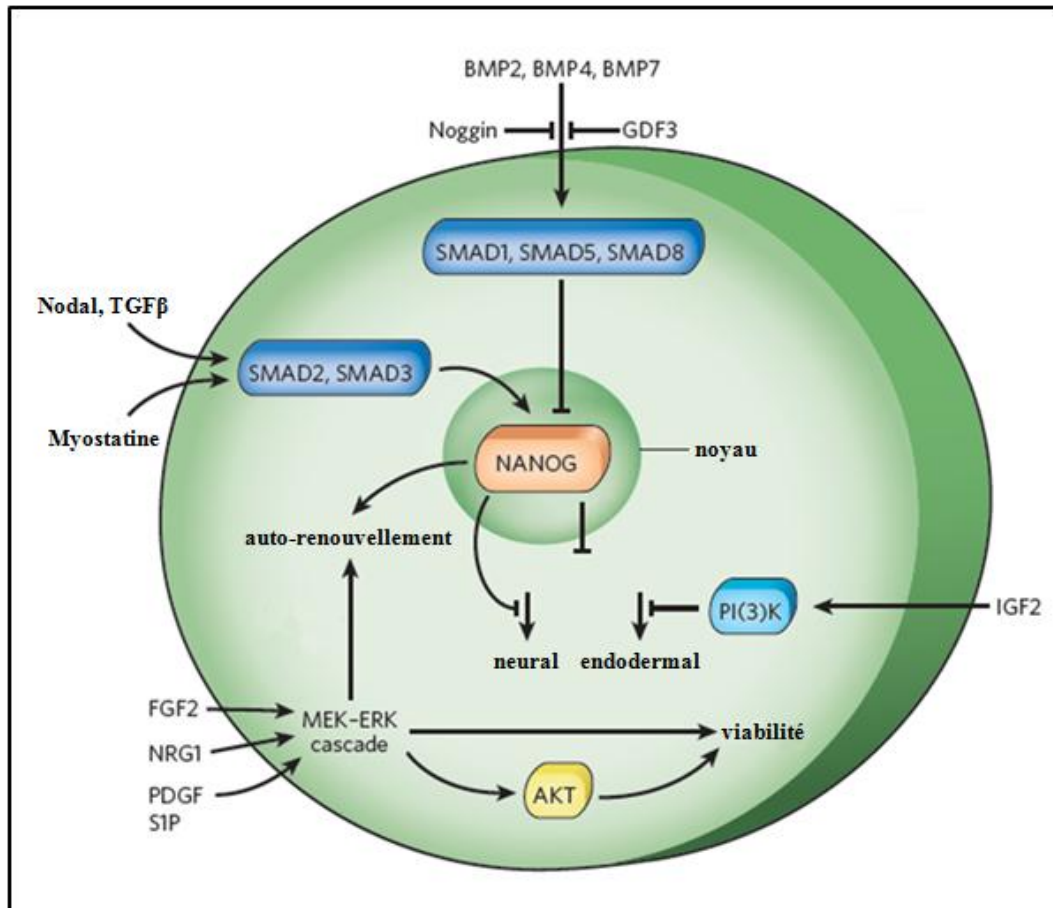
Plusieurs voies de signalisation ont été décrites comme étant impliquées dans le maintien des deux propriétés fondamentales des CSEh (**Figure 71**) (Pera and Tam, 2010; Stewart et al., 2006) :

- ♦ la voie canonique des Wnt /  $\beta$ -caténine agit dans les CSEh par l'intermédiaire de ligands qui se fixent sur les récepteurs de la famille Frizzled. Leur fixation va activer une cascade d'évènements qui vont aboutir à l'inhibition de la phosphorylation de la  $\beta$ -caténine. Cette dernière va alors s'accumuler, entrer dans le noyau et agir comme coactivateur de la transcription de *NANOG* ou *POU5F1*. Cette voie interviendrait plutôt dans le maintien de l'auto-renouvellement (Stewart et al., 2006) ;
- ♦ la voie du FGF2 (pour *fibroblast growth factor 2* ou *basic FGF*) permet de maintenir l'auto-renouvellement des CSEh en condition *in vitro* (Dvorak and Hampl, 2005; Levenstein et al., 2006; Wang et al., 2005; Xu et al., 2005). Ce facteur de croissance agirait en aval de l'activine A en stimulant la voie MEK-ERK et se comporterait comme un facteur de compétence pour Nodal (Greber et al., 2007; Li et al., 2007; Vallier et al., 2005). Il pourrait également agir en inhibant la voie des BMPs et en particulier BMP4 (Aubin et al., 2004; Greber et al., 2007).
- ♦ Les voies du TGF $\beta$  / activine A / Nodal / BMPs activent les récepteurs de type sérine/thréonine kinase ce qui conduit à la phosphorylation des facteurs de transcription libres, les SMADs (pour *small mothers against decapentaplegic*) qui vont pouvoir intégrer le noyau, afin d'activer ou inhiber certaines gènes (James et al., 2005; Watabe et al., 2006).

La voie des SMADs 2 et 3 dépend de l'activation effectuée par TGF $\beta$ , activine A ou Nodal. Elle intervient dans la maintenance de l'état indifférencié par l'activation du gène codant *NANOG* (Pera and Tam, 2010). L'inhibition de Nodal par des molécules telles que Lefty ou l'inhibition de la voie par le SB431542, entraînent une différenciation vers le lignage ectodermique (Chambers et al., 2009; Patani et al., 2009; Smith et al., 2008). L'activine A peut, à court terme, à elle seule suffire à maintenir l'état indifférencié des CSEh en culture, cette protéine agissant sur les facteurs de transcription *NANOG* et *POU5F1* ainsi que sur les voies de signalisation des Wnt et du FGF2 (Xiao et al., 2006). Cependant, elle n'est pas suffisante pour maintenir une culture à long terme, l'ajout de FGF2 dans les

cultures étant nécessaire (Vallier et al., 2005; Xiao et al., 2006). Plus récemment, des connections entre la voie de l'activine A et des miARNs ont été identifiées dans les CSEh (Tsai et al., 2010).

La voie des SMADs 1, 5 et 8 dépend des BMPs qui semblent être impliquées dans la différenciation précoce comme BMP2 (Leschik et al., 2008) et BMP4 (Guenou et al., 2009). Leur inhibition par des molécules de Noggin et de chordine concourt au maintien de la pluripotence. En présence des BMPs, les SMAD 1, 5 et 8 vont se lier au promoteur de *NANOG* et l'inhiber (Figure 71) (Pera and Tam, 2010).



**Figure 71 : signaux extrinsèques qui influencent l'auto-renouvellement, la différenciation et la viabilité des CSE.** Les membres de la famille du TGFβ – tels que TGFβ, activine, nodal, les facteurs GDFs (pour *growth differentiation factors*) dont la myostatine et enfin les BMPs convergent principalement sur le gène *NANOG* qui maintient les CSE dans un état indifférencié avec la capacité d'auto-renouvellement. Les signaux passant par la voie MEK-ERK permettent également l'auto-renouvellement et la viabilité par inhibition de l'apoptose et de l'anoïkis. En outre, le facteur de croissance IGF2 (pour *insulin-like growth factor 2*) passant par la kinase PI(3)K (pour *phosphatidylinositol-3-OH kinase*) inhibe la différenciation dans le lignage endodermale. La signalisation médiée par la voie des Wnt peut affecter le destin cellulaire mais son rôle est controversé à l'heure actuelle. Avec NRG1 : neuréguline 1, PDGF : *platelet-derived growth factor* et S1P : sphingosine 1-phosphate. Adapté de Pera and Tam, 2010.

Enfin, l'inhibition continue de SMAD4 rend instable les CSEh qui ont une tendance à se différencier plus facilement dans le lignage neural. Ainsi, SMAD4 serait nécessaire dans la stabilisation de l'état de pluripotence plus que dans son maintien (Avery et al., 2010).

#### **II.1.2.2.4      Maintien en condition *in vitro***

##### **II.1.2.2.4.1      Culture à l'état indifférencié**

Il est possible de maintenir les lignées de CSEh en culture à l'état indifférencié. Elles peuvent être cultivées sur une monocouche de cellules nourricières (ou *feeders*) dont le cycle cellulaire a été préalablement interrompu par irradiation ou en utilisant de la mitomycine C afin qu'elles ne prolifèrent plus. Elles vont maintenir l'état indifférencié des CSEh tout en permettant leur prolifération. Différents types de cellules sont utilisées :

- ♦ les fibroblastes embryonnaires murins primaires (ou MEFs pour *mouse embryonic fibroblasts*) ;
- ♦ la lignée de fibroblastes embryonnaires murins immortalisés STO (pour fibroblastes de souris SIM résistants à la 6-thioguanine et l'ouabaïne).

Une alternative d'efficacité comparable consiste à cultiver les CSEh en présence de milieu conditionné par ces mêmes cellules nourricières (Xu et al., 2001). En tant normal, les CSEh sont cultivées dans un milieu riche en facteurs de croissance grâce à l'emploi du sérum de veau fœtal (Thomson et al., 1998). Ce protocole largement utilisé dans la communauté scientifique (Amit et al., 2000; Moon et al., 2006) contient un inconvénient majeur : l'utilisation de composants d'origine animale (cellules nourricières, sérum). Dans la perspective d'une utilisation de ces cellules dans le cadre de thérapie cellulaire, il faut s'affranchir de ces composants qui peuvent être vecteurs de pathogènes animaux. Ainsi, plusieurs équipes ont tenté de trouver des composants de substitution aux cellules nourricières :

- ♦ du matrigel, de la fibronectine, de la laminine, de la vitonectine, du collagène ou de l'E-cadhérine (Amit et al., 2003; Braam et al., 2008; Furue et al., 2008; Ludwig et al., 2006; Miyazaki et al., 2008; Nagaoka et al., 2010; Xu et al., 2001; Yoon et al., 2010) ;
- ♦ un complexe protéique sans facteurs étrangers (ou *xenofree*) (Peiffer et al., 2010) ;
- ♦ des fibroblastes humains provenant de prépuces (ou *foreskin*) (Amit et al., 2003; Mallon et al., 2006) ;
- ♦ des fibroblastes embryonnaires issus des CSEh elles-mêmes (Stojkovic et al., 2005) ;
- ♦ la matrice CELLStart™ d'Invitrogen qui est totalement *xenofree* (Yoon et al., 2010)

Pour remplacer le sérum de veau fœtal, le KSR (pour *Knock-out Serum Replacement*), dont la composition est définie, a été utilisé mais il contient toujours des éléments d'origine animale (albumine et transférine bovine) (Amit et al., 2000; Koivisto et al., 2004; Stojkovic et al., 2005;

Strelchenko et al., 2004). Le sérum humain a été employé avec une efficacité moindre (Rajala et al., 2007; Richards et al., 2002) et des milieux chimiquement définis ont pu être développés (Li et al., 2005b; Peiffer et al., 2008, 2010) par les fournisseurs de produits de laboratoire, tels que le mTeSR™ de Stemcell technologies™ (Ludwig et al., 2006) ou encore le milieu StemPro® d'Invitrogen (Wang et al., 2007).

Enfin, le FGF2 doit être renouvelé quotidiennement afin de ne pas induire de différenciation. Ce dernier, combiné à l'activine A et Nodal, suffit à cultiver les CSEh en l'absence de cellules nourricières ou de milieu conditionné (Levenstein et al., 2006).

#### II.1.2.2.4.2 **Amplification**

L'amplification de ces cellules appelée couramment « passage » peut être effectuée selon deux méthodes (Hoffman and Carpenter, 2005) présentant chacune des avantages et des inconvénients (**Tableau 1**) :

- ♦ la dissociation mécanique qui consiste à découper des morceaux de colonies à l'aide d'une aiguille montée sur une seringue sous le contrôle d'une loupe binoculaire ;
- ♦ la dissociation enzymatique qui est réalisée à l'aide, par exemple, de dispase, de collagénase ou encore de trypsine.

**Tableau 1** : avantages et inconvénients des modes de passage des CSEh. D'après Lefort et al., 2009; Moon et al., 2006.

	Passage mécanique	Passage enzymatique
Avantages	<ul style="list-style-type: none"> <li>♦ Sélection des colonies de CSEh</li> <li>♦ Homogénéité des fragments de colonies découpés = idéal pour le maintien des CSEh</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>♦ Rapide et simple</li> <li>♦ Pour amplification avec de nombreuses lignées</li> </ul>
Inconvénients	<ul style="list-style-type: none"> <li>♦ Nécessite de posséder une loupe</li> <li>♦ D'autant plus long que le nombre de boîtes à passer l'est</li> <li>♦ Risques d'anomalies chromosomiques localisées</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>♦ Aucune sélection des cellules</li> <li>♦ Hétérogénéité des fragments passés</li> <li>♦ Risque d'anomalies chromosomiques de type aneuploïdie</li> </ul>

#### II.1.2.2.4.3 **Caractérisation**

Sur le plan morphologique, les CSEh sont reconnaissables par leur petite taille (2 à 3 µm) et leur rapport nucléo-cytoplasmique élevé. Elles prolifèrent sous la forme d'amas circulaires compacts et plats nommés colonies (Heins et al., 2004). Leur observation quotidienne permet de détecter rapidement les zones de différenciation spontanée qui peuvent alors être éliminées pour permettre la prolifération à l'état indifférencié des CSEh.

Au niveau moléculaire, les CSEh sont caractérisées par l'expression de marqueurs nucléaires de pluripotence tels que *NANOG*, *POU5F1*, *SOX2*, *FOXD3* (pour forkhead box D3) et *REX1* (pour RNA exonuclease 1) (Pera and Trounson, 2004; Stojkovic et al., 2004). La diminution de leur expression

marque l'entrée des cellules en différenciation (Jaenisch and Young, 2008; Stewart et al., 2006). Des marqueurs membranaires permettent de confirmer cette pluripotence. Il s'agit de SSEA3/4 (pour stage-specific embryonic antigens 3 and 4), Tra-1-60 (pour Tumour Rejection Antigen) et Tra-1-81 (Pera and Tam, 2010).

Elles peuvent également être caractérisées par l'expression de l'alkaline phosphatase (Berstine et al., 1973) ou l'activité télomérase (Greider and Blackburn, 1985). En effet, le fort caractère prolifératif de ces cellules est attribué à leur forte expression de la télomérase qui empêche l'entrée des cellules en sénescence en sauvegardant la longueur des télomères (Morrison et al., 1996).

Ces cellules présentent, *a priori*, un caryotype normal au cours de leurs multiples passages (Rosler et al., 2004; Xie et al., 2011) mais celui-ci peut être altéré selon les conditions de culture dans lesquelles les CSEh sont placées. Ainsi, la dissociation enzymatique à la trypsine et la culture sans cellules nourricières favoriseraient les aneuploïdies telles que les trisomies 12 ou 17 (Brimble et al., 2004; Hoffman and Carpenter, 2005; Lefort et al., 2009; Moon et al., 2006), la dissociation mécanique entraînant quant à elle des changements plus limités (Lefort et al., 2008). Différentes méthodes d'analyses permettent de contrôler la présence ou non d'anomalie(s) caryotypique(s) à savoir :

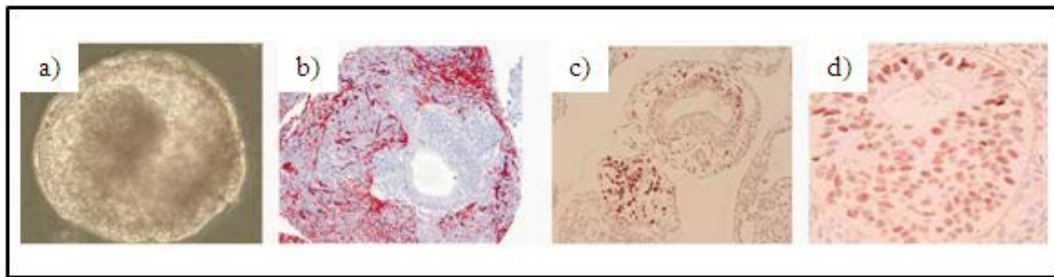
- ♦ le *chromosome banding*, caractérisé par des niveaux de compaction et des compositions nucléotidiques différentes, permet de distinguer les différentes parties des chromosomes sous forme de bandes en utilisant le colorant Giemsa. Pour les bandes dites G (pour Giemsa), les sombres sont riches en A et T, elles seront claires si la représentation est en *R banding* (pour *reverse G banding*) (Drets and Shaw, 1971) ;
- ♦ la peinture chromosomique utilise la technique de mFISH (pour *multiplex Fluorescent In Situ Hybridization*). Des sondes fluorescentes s'hybrident sur les séquences complémentaires des chromosomes cibles, une couleur correspondant à un chromosome. Ainsi les réarrangements chromosomiques sont rapidement identifiables (Le Beau, 1996; Speicher et al., 1996; Speicher and Ward, 1996) ;
- ♦ l'hybridation génomique comparée (ou CGH pour *Comparative Genomic Hybridization*) permet d'identifier précisément des duplications et des délétions mais n'est pas capable de détecter des inversions ou des translocations. Cette méthode utilise l'avancée de la biologie moléculaire, en particulier les puces à ADN, qui contiennent des sondes permettant de couvrir l'ensemble du génome (Bruder et al., 2001; Kraus et al., 1997) ;
- ♦ les puces à SNP (pour *Single Nucleotide Polymorphism*) permettent de détecter une variation sur un site unique de l'ADN (Gentzen and Chee, 1999; Sapolsky et al., 1999) ;
- ♦ le PEM (pour *Paired-End Mapping*) est une technique qui permet d'identifier les réarrangements à grande échelle et en haute résolution (Korbel et al., 2007).



#### II.1.2.2.4.4 Capacités de différenciation

Les CSEh maintenues à l'état indifférencié doivent pouvoir se différencier dans n'importe quel type cellulaire aussi bien *in vitro*, de façon spontanée ou non, qu'*in vivo* :

- ♦ lors de la différenciation spontanée en conditions *in vitro*, les CSEh sont mises en culture en suspension sans FGF2 (Bratt-Leal et al., 2009). Elles vont s'agglomérer en amas pour former des corps embryoides (ou EBs pour *embryoid bodies*). Ces EBs sont des structures tridimensionnelles qui regroupent des cellules qui vont peu à peu se différencier dans les 3 feuilletts embryonnaires (**Figure 72**) (Mikkola et al., 2006) ;



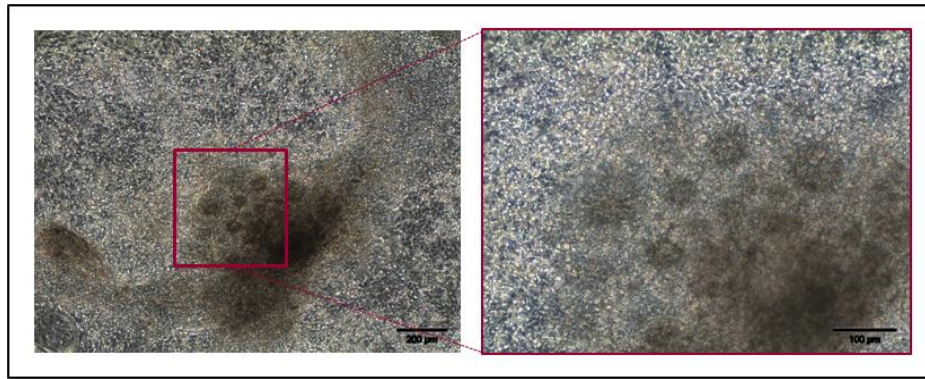
**Figure 72 : analyses des corps embryoides (EBs) issus de CSEh.** a) un EB en contraste de phase ; b) immunomarquage du neuroectoderme par les neurofilaments ; c) expression de brachyury pour le mésoderme ; d) différenciation en endoderme par révélation de HNF3β. Grossissements : a) x10, b)-d) x20. De Mikkola et al., 2006.

- ♦ la différenciation guidée, *in vitro*, consiste à engager les CSEh dans le lignage d'intérêt (ectodermique, mésodermique ou endodermique) en utilisant les conditions de culture appropriées.

A titre d'exemple, pour l'engagement neural, la première étape consiste à produire des progéniteurs neuroectodermiques multipotents (ou NEPs pour *Neuro-EPithelial cells*) qui sont présents *in vivo* au moment de la transformation de la plaque neurale en tube neural (Curchoe et al., 2012). Cette induction peut se faire selon 3 méthodes :

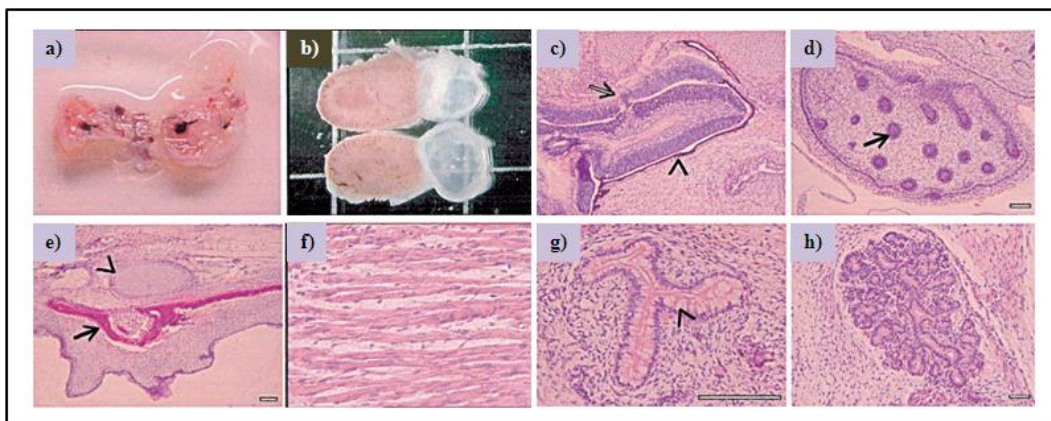
- la culture en suspension sous forme de neurosphères (Reubinoff et al., 2001) ;
- la co-culture sur des cellules nourricières stromales (SDIA pour *Stromal Differentiation Inducing Activity*) (Kawasaki et al., 2000; Perrier et al., 2004) ;
- grâce à l'utilisation de petites molécules telles que la protéine Noggin et le SB431542 qui agissent en synergie pour bloquer certaines voies de signalisation (TGFβ, BMPs) et augmenter la formation des NEPs (Chambers et al., 2009).

Lors de l'induction neurale, les CSEh, devenant des NEPs, adoptent une morphologie bien particulière qui se caractérise par la formation d'un épithélium cylindrique organisé radialement appelé rosette neurale. Ces structures reproduisent l'aspect du tube neural coupé transversalement et contiennent des NEPs (**Figure 73**) ;



**Figure 73** : rosettes neurales, au microscope à contraste de phase après 6 jours de différenciation, obtenues par ajout de Noggin et de SB431542 au milieu. A gauche, les rosettes sont clairement identifiables dans le rectangle rouge, x40, barre d'échelle : 200μm, à droite, agrandissement de la zone encadrée en rouge à gauche, x100, barre d'échelle : 100μm.

- ♦ *In vivo*, l'injection de CSEh est fréquemment réalisée au niveau de la capsule rénale ou testiculaire de rongeurs immunosupprimés. Elle conduit à l'apparition de tératomes composés des cellules des 3 feuillets embryonnaires (**Figure 74**) (Heins et al., 2004).

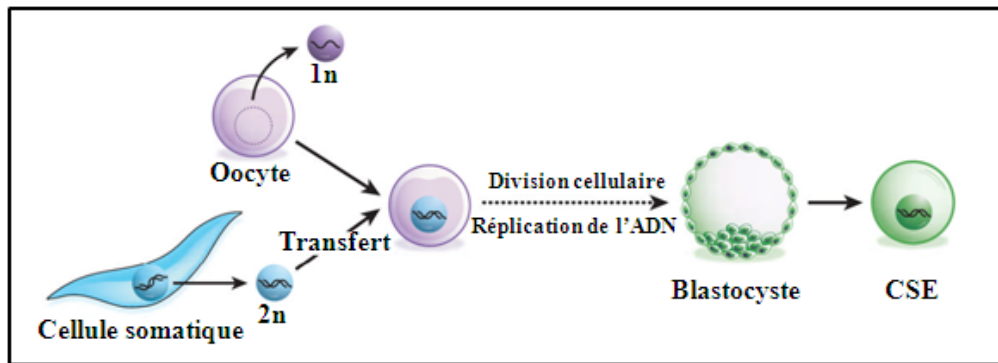


**Figure 74** : analyses de tératomes. a) vue à faible grossissement d'une tumeur solide issue de la lignée SA121 ; b) vue d'un kyste, rempli de liquide, établi à partir de la lignée FC018 ; c) épithélium pigmenté (pointe de flèche) et neuroépithélium (flèche) ; d) follicule de cheveux (flèche) ; e) cartilage (pointe de flèche) et os (flèche) ; f) muscle squelettique ; g) épithélium contenant des cellules à mucus (pointe de flèche) ; h) épithélium glandulaire. Barres d'échelle 100μm. De Heins et al., 2004.

### II.1.2.3 Induction de la pluripotence

#### II.1.2.3.1 Le transfert nucléaire somatique

La technique de transfert nucléaire somatique (ou SCNT pour *somatic cell nuclear transfer*) consiste à collecter un oocyte, à l'énucléer puis à introduire un noyau provenant d'une cellule somatique. Ce dernier se reprogramme et engage peu à peu l'oocyte vers le stade blastocyste. Il est alors possible d'isoler des CSE à partir de la MCI (**Figure 75**).



**Figure 75 : le transfert nucléaire.** Le noyau de la cellule somatique qui est diploïde (2n) est transplanté dans un oocyte (1n) énucléé. Dans cet environnement, le noyau de la cellule somatique se reprogramme pour former le blastocyste. Si le développement se poursuit *in utero*, un organisme entier cloné est généré. Modifié de Yamanaka and Blau, 2010.

Cette technique a permis, chez l'animal, après réimplantation du blastocyste dans l'utérus d'une brebis, de donner naissance à la brebis 6LL3 plus connue sous le nom de Dolly (Wilmut et al., 1997). Un vieillissement prématuré a pu être observé dû à la longueur réduite des télomères « hérités » du noyau de la cellule somatique (Shiels et al., 1999). Cette méthode d'induction de la pluripotence est couramment nommée clonage « thérapeutique ». De nombreux clones de différentes espèces ont pu voir le jour (**Tableau 2**).

Le transfert nucléaire somatique a permis de dériver des CSP chez le primate (Byrne et al., 2007). En 2005, l'équipe du Dr Hwang affirmait avoir dérivé des CSEh grâce à cette technique (Hwang et al., 2005) cependant, les résultats de l'étude ont été mis en cause et en 2006 l'article a été retiré de la publication (Kennedy, 2006). Suite à cette affaire, une équipe indépendante a voulu vérifier la véracité de l'étude relatant la naissance de chiots, par la même équipe (Lee et al., 2005). Les résultats n'ont pas été remis en cause (Parker et al., 2006). En 2008, un blastocyste humain a pu être cloné avec succès mais l'équipe n'a pas tenté d'en dériver des CSEh (French et al., 2008). Plus récemment, une seconde équipe a pu augmenter l'efficacité de reprogrammation de la cellule somatique en activant l'embryon humain par un traitement à l'ionomycine et au 6-diméthylaminopurine (Yu et al., 2012).

**Tableau 2 : animaux issus de transfert nucléaire somatique.**

Espèces	Références
Agneaux	Wells et al., 1997; Wilmut et al., 1997
Chevreaux	Baguisi et al., 1999
Souriceaux	Wakayama et al., 1998
Ratons	Zhou et al., 2003
Lapineaux	Chesné et al., 2002
Furetons	Li et al., 2006
Veaux	Cibelli et al., 1998a, 1998b; Kato et al., 1998
Porcelets	Polejaeva et al., 2000
Mules	Woods et al., 2003
Chatons	Shin et al., 2002
Chiots	Lee et al., 2005
Louveteaux	Kim et al., 2007
Singe rhésus	Meng et al., 1997

D'un point de vue éthique, le clonage humain est, en France, formellement interdit. Ainsi, la loi n°2004-800 du 6 août 2004 relative à la bioéthique modifiait dans l'article 21 les dispositions prises dans l'article 16.4, troisième alinéa, du code civil, reprises dans l'article L2151-1 du code de la santé publique<sup>4</sup> :

- ♦ article L2151-1 : « *est interdite toute intervention ayant pour but de faire naître un enfant génétiquement identique à une autre personne vivante ou décédée* ».

Elle modifie également l'article L2151-2 : « *la conception in vitro d'embryon ou la constitution par clonage d'embryon humain à des fins de recherche est interdite* ». Enfin, elle crée 2 nouveaux articles du code de la santé publique :

- ♦ article L2151-3 : « *un embryon humain ne peut être ni conçu, ni constitué par clonage, ni utilisé, à des fins commerciales ou industrielles* » ;
- ♦ article L2151-4 : « *est également interdite toute constitution par clonage d'un embryon humain à des fins thérapeutiques* ».

La loi n° 2011-814 du 7 juillet 2011 relative à la bioéthique a modifié dans l'article 40 du Titre VII : Recherche sur l'embryon et les cellules souches embryonnaires, l'article L2151-2 du code de la santé.

Il en résulte que « *la conception in vitro d'embryon ou la constitution par clonage d'embryon humain à des fins de recherche est interdite* » et que « *la création d'embryons transgéniques ou chimériques est interdite* ».

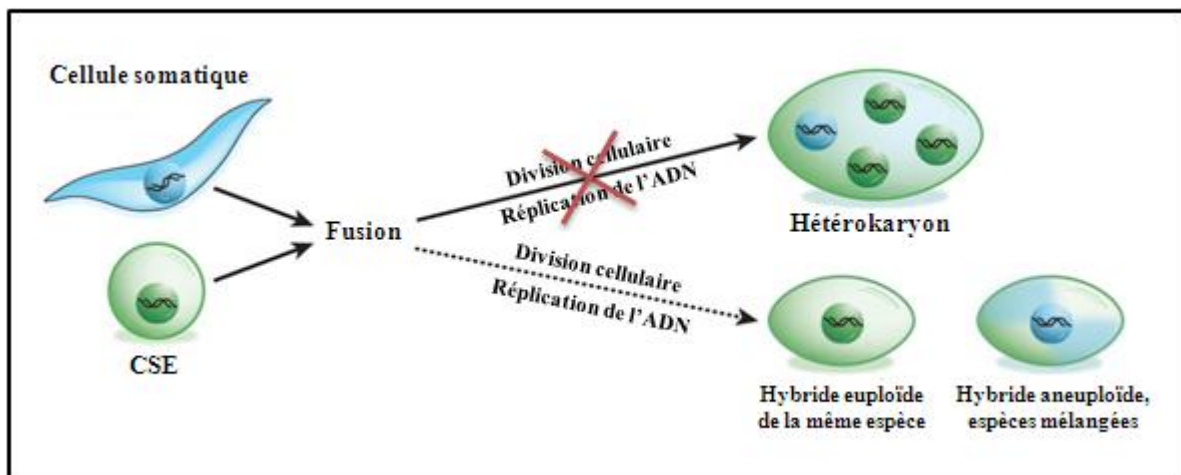
---

<sup>4</sup>[http://www.legifrance.gouv.fr/affichTexteArticle.do;jsessionid=66D2C0CF46EA9D3B9EB90225768D9C17.tp\\_djo05v\\_2?idArticle=JORFARTI000001670603&cidTexte=JORFTEXT000000441469&dateTexte=29990101&categorieLien=id](http://www.legifrance.gouv.fr/affichTexteArticle.do;jsessionid=66D2C0CF46EA9D3B9EB90225768D9C17.tp_djo05v_2?idArticle=JORFARTI000001670603&cidTexte=JORFTEXT000000441469&dateTexte=29990101&categorieLien=id)

### II.1.2.3.2 La fusion cellulaire

La fusion cellulaire est un évènement naturel puisque l'embryon est issu de la fusion d'un spermatozoïde et d'un ovule. Au cours du développement ce processus devient vital en permettant par exemples la fusion des cellules du trophoblaste en placenta (Castellucci et al., 2000), des myoblastes en fibres musculaires (Taylor, 2000) et des macrophages en ostéoclastes (Vignery, 2000).

La fusion de cellules somatiques, réalisée dès les années 60 par les Drs Harris et Ringertz, a été utilisée pour étudier les processus cellulaires impliquant les interactions noyau-cytoplasme (Bolund et al., 1969b, 1969a; Harris, 1965). Plus récemment, en fusionnant une cellule souche neurale avec un blastocyste de poulet ou murin, la reprogrammation a permis de générer des cellules somatiques des 3 feuilletts embryonnaires (Rideout et al., 2001). Enfin, la fusion d'une cellule somatique avec une CSE (**Figure 76**) a permis d'induire la pluripotence chez la souris (Tada et al., 2001) et chez l'Homme (Cowan et al., 2005; Surani, 2005; Yu et al., 2006). Les hybrides obtenus, appelés hétérokaryons, sont tétraploïdes mais ce modèle est cependant intéressant pour étudier les mécanismes moléculaires qui dirigent la reprogrammation (Do and Schöler, 2010).



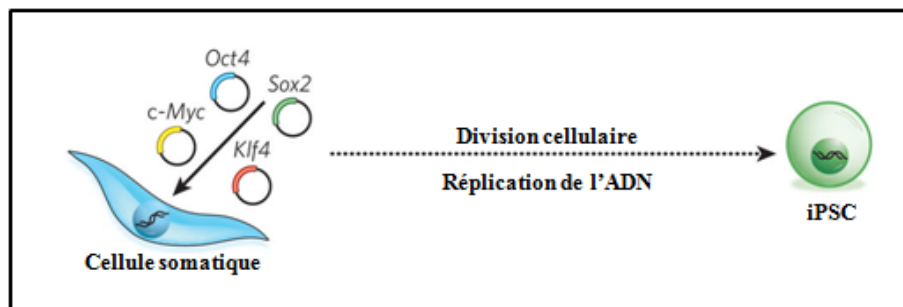
**Figure 76 : la fusion cellulaire d'une cellule somatique et d'une CSE.** Le résultat de la fusion peut être soit un hétérokaryon soit des hybrides. Si les cellules issues de la fusion prolifèrent, elles deviennent hybrides et le noyau devient  $4n$  ou plus. Si les cellules proviennent de la même espèce, le caryotype reste euploïde alors que si les espèces sont différentes, le caryotype est aneuploïde avec une perte et un réarrangement des chromosomes. Les hétérokaryons, eux, ont une faible durée de vie et ne se divisent pas. Ils sont multi-nucléés : le noyau d'origine est intact et l'influence de l'un des génotypes sur l'autre peut être étudiée dans ce système stable où aucun chromosome n'est perdu. Si le ratio nucléaire des deux cellules originelles diffère, la stœchiométrie s'en trouve perturbée, il est ainsi possible de produire des hétérokaryons du type majoritaire. Avec, en pointillé, le processus le plus lent qui impliquent de nombreuses divisions cellulaires. Modifié de Yamanaka and Blau, 2010.



### II.1.2.3.3 La reprogrammation directe

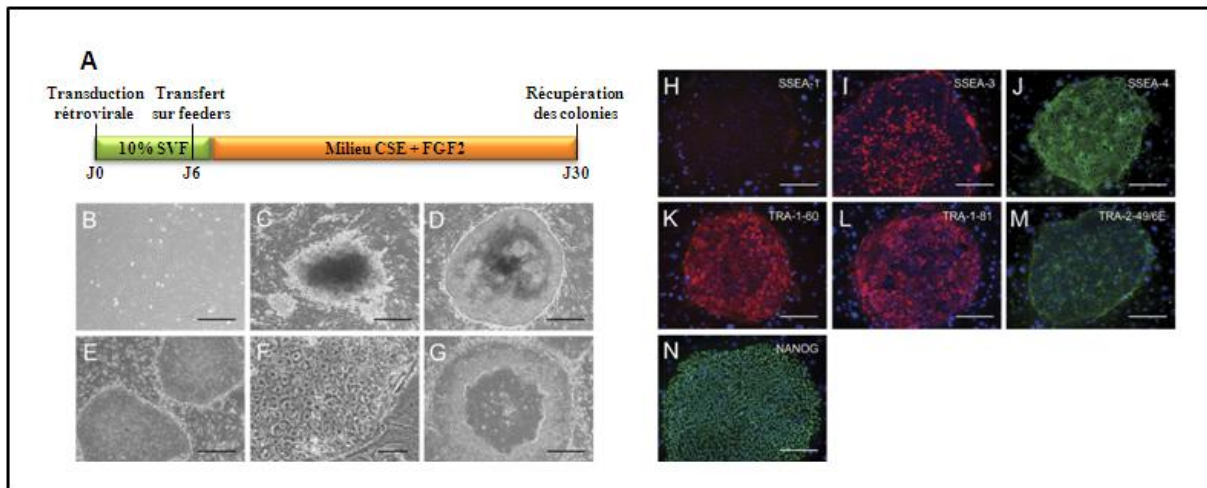
#### II.1.2.3.3.1 Obtention

Les cellules souches pluripotentes induites ou iPSCs (pour *induced Pluripotent Stem Cells*) sont obtenues suite à différentes méthodes dites de reprogrammation. En 2006, l'équipe du Dr Yamanaka a réalisé différentes combinaisons de 24 facteurs de transcription connus pour leur rôle dans la prolifération cellulaire ou dans le maintien de l'état d'indifférenciation. Ils ont introduit ces facteurs dans des cellules somatiques murines (fibroblastes) et ont pu identifier 4 facteurs de transcription, Oct4 (ou Pou5f1), Sox2 (Avilion et al., 2003; Nichols et al., 1998), Klf4 (pour Krueppel-like factor 4) et c-Myc (ou Myc pour myelocytomatosis oncogene) (Figure 77) (Cartwright et al., 2005; Li et al., 2005a) qui, combinés, permettaient la transformation la plus efficace de ces cellules adultes. Cette population cellulaire présentait les mêmes caractéristiques que les CSEh aux niveaux morphologique, prolifératif, d'expression de marqueurs spécifiques et de formation de tératomes (Takahashi and Yamanaka, 2006).



**Figure 77 : la transduction de facteurs de transcription.** Cette approche peut être utilisée pour produire les iPSCs qui peuvent être générées, *a priori*, à partir de n'importe quelle cellule somatique ayant un noyau, grâce à l'introduction de 4 gènes *Oct4*, *Sox2*, *Klf4* et *c-Myc* en utilisant des rétrovirus. L'état de pluripotence se transmet à la descendance et un vaste nombre de cellules peuvent être produites rendant cette approche avantageuse pour des applications thérapeutiques. Adapté de Yamanaka and Blau, 2010.

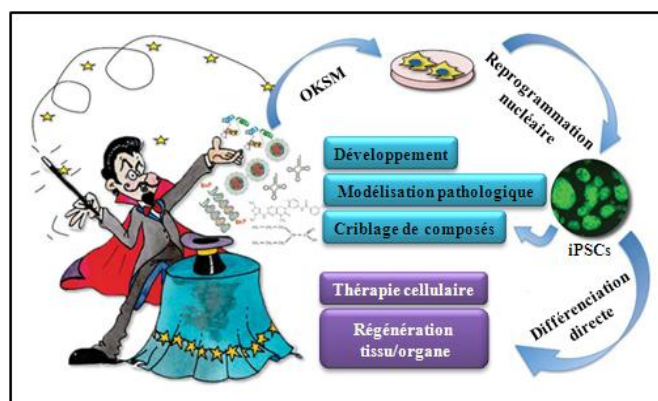
Cette découverte vaut aujourd'hui à Shinya Yamanaka le prix Nobel de médecine 2012. Dès 2007, ce procédé a été appliqué avec succès chez l'Homme par deux équipes. Le groupe du Dr Yamanaka utilisait quatre vecteurs rétroviraux exprimant les facteurs de transcription humains cités ci-dessus, POU5F1, SOX2, KLF4 et c-MYC (ou MYC pour v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)) (Figure 78) (Takahashi et al., 2007b) alors que celui du Dr Thomson, qui faisait partie de l'équipe ayant dérivé les premières CSEh (Thomson et al., 1998), a utilisé les facteurs OCT4, SOX2, NANOG, et LIN28 (pour lin-28 homolog A (*C. elegans*)) (Yu et al., 2007). D'autres équipes viendront ensuite confirmer ces résultats (Lowry et al., 2008; Park et al., 2008b).



**Figure 78 : induction des iPSCs à partir de fibroblastes adultes du derme humain (FADH).** A) Temps d'apparition des colonies d'iPSCs ; B) morphologie des FADH ; C) morphologie typique d'une colonie non-CSEh ; D) morphologie typique d'une colonie de CSEh ; E) morphologie de la lignée d'iPSCs au passage 6 (clone 201B7) ; F) iPSCs à plus fort grossissement ; G) différenciation spontanée au centre d'une colonie humaine d'iPSCs ; immunocytochimies pour H) SSEA-1 ; I) SSEA-3 ; J) SSEA-4 ; K) TRA-1-60 ; L) TRA-1-81 ; M) TRA-2-49/6E ; N) Nanog. Les noyaux sont marqués en bleu au Hoechst 33342. Barres d'échelle : B-E, G 200µm ; F 20µm ; H-N 100µm. D'après Takahashi et al., 2007a.

### II.1.2.3.3.2 Espoir

Depuis leur découverte en 2006, les iPSCs suscitent un nouvel espoir pour la médecine régénérative de demain car elles permettent de dériver des CSpH spécifiques d'un patient. Il est alors possible d'envisager de les différencier dans le type cellulaire d'intérêt puis de les greffer au patient limitant ainsi le risque de rejet. Le champ d'investigations est vaste puisqu'il englobe la modélisation d'*a priori* n'importe quelle pathologie, le DPI n'étant plus une limite. Ces cellules permettent de produire *in vitro*, un large éventail de cellules normales et pathologiques permettant d'étudier les caractéristiques physiologiques et biologiques des maladies (**Figure 79**) (Mostoslavsky, 2012; Park et al., 2008a).



**Figure 79 : l'acte magique de la reprogrammation nucléaire.** Une boîte à outils pleine d'astuces est maintenant disponible pour les scientifiques afin qu'ils puissent générer des iPSCs normales et spécifiques d'une



maladie à partir de cellules somatiques. Cela ouvre de nouvelles pistes de recherche comme la modélisation de pathologie humaine, la découverte de composés à potentiel thérapeutique ou encore la thérapie cellulaire. Avec OKSM : Oct3/4, Klf4, Sox2, et cMyc. Modifié de Mostoslavsky, 2012.

#### **II.1.2.3.3.3 Limitations**

Initialement la reprogrammation s'effectuait à l'aide de rétrovirus (Takahashi et al., 2007b) ou de lentivirus (Yu et al., 2007) qui sont des vecteurs intégratifs. Les rétrovirus peuvent s'insérer dans les cellules en division et les lentivirus ont la capacité de pouvoir pénétrer dans un noyau en interphase. Ces intégrations génomiques des transgènes qui peuvent se réactiver sont susceptibles de conduire, à plus ou moins long terme, à l'apparition de mutations ce qui restreint les applications de ces iPSCs en thérapie cellulaire (Maherali and Hochedlinger, 2008). Par ailleurs, les facteurs Klf4 et c-Myc utilisés sont oncogéniques (Cartwright et al., 2005; Li et al., 2005a).

La reprogrammation est un processus lent et de faible efficacité. La diminution de l'efficacité au cours de ce processus pouvant être le signe d'une reprogrammation incomplète (Mikkelsen et al., 2008; Okita et al., 2007; Silva et al., 2008).

Ainsi, depuis leur découverte en 2006, de très nombreuses équipes ont travaillé et travaillent sur les iPSCs pour améliorer l'efficacité de reprogrammation et pour trouver des méthodes plus sûres d'induction de la pluripotence (**Figure 80**) (Liu et al., 2011b; Oh et al., 2012).

Alors que l'étude de l'équipe Dr Jaenisch montrait les similarités entre les iPSCs et les CSE notamment en terme de méthylation de l'ADN et des histones (Hanna et al., 2010), plusieurs études récentes ont révélé des différences épigénétiques et génomiques complexes entre ces populations cellulaires (Gore et al., 2011; Hussein et al., 2011; Laurent et al., 2011; Lister et al., 2011; Mayshar et al., 2010).

L'information épigénétique est contenue au sein de la chromatine. Elle fournit à la cellule une mémoire de son histoire au cours du développement et contribue à la robustesse des mécanismes lui permettant d'acquérir et de maintenir son identité (Kundu and Peterson, 2009; Probst et al., 2009). Ainsi, une méthylation aberrante de l'ADN d'iPSCs peut se maintenir dans les progéniteurs dérivés de ces iPSCs, affecter leur capacité à se différencier et affecter la stabilité des cellules matures (Lister et al., 2011). Les modifications épigénétiques et génétiques dues à la reprogrammation et à la culture en laboratoire des iPSCs, peuvent conduire à l'accumulation d'anomalies au niveau des chromosomes, au niveau sub-chromosomal par des changements de CNV (pour *Copy Number Variations*), à l'apparition de points de mutations, et enfin à des modifications au niveau d'une base particulière (ou SNP). Cependant les changements de cet ordre sont également retrouvés dans les CSE étudiées (Gore et al., 2011; Hussein et al., 2011; Laurent et al., 2011; Lister et al., 2011; Mayshar et al., 2010).

Ainsi, il faut envisager d'étudier le profil épigénétique et génétique des iPSCs pour assurer la sécurité de ces lignées d'iPSCs avant leur utilisation en clinique (Hewitt and Garlick, 2012). Enfin, les iPSCs sont encore le meilleur modèle existant pour étudier l'influence des modifications qu'elles

subissent, sur leur croissance, leur différenciation, leur tumorigénicité et leur fonctionnalité (Pera, 2011).

#### **II.1.2.3.3.4 Facteurs de reprogrammation**

Le processus de reprogrammation a pu être modifié en utilisant une combinaison de facteurs sans l'oncogène MYC car sa réactivation augmente le potentiel de tumorigénicité ce qui freine le développement d'applications thérapeutiques (Nakagawa et al., 2008; Wernig et al., 2008). Cependant l'efficacité de reprogrammation s'en trouve diminuée de près de 40%. Pour contourner ce problème, il a été possible de supprimer l'activité de p53 (ou TP53 pour tumor protein p53) qui inhibe la formation des iPSCs (Hong et al., 2009; Zhao et al., 2008). Il ne faut cependant pas oublier qu'inhiber p53 peut également conduire à la formation de tumeurs. Une étude est allée encore plus loin en utilisant seulement les deux facteurs de transcription OCT4 et SOX2 couplés à des petites molécules comme l'acide valproïque qui est capable de modifier le statut épigénétique des cellules (inhibiteur des histones désacétylases) (Huangfu et al., 2008a, 2008b).

Enfin, plus récemment, des miARNs spécifiques des CSE murines ont montré qu'ils pouvaient augmenter l'efficacité de reprogrammation fondée sur les facteurs Oct4, Sox2 et Klf4 dans des MEFs (Judson et al., 2009).

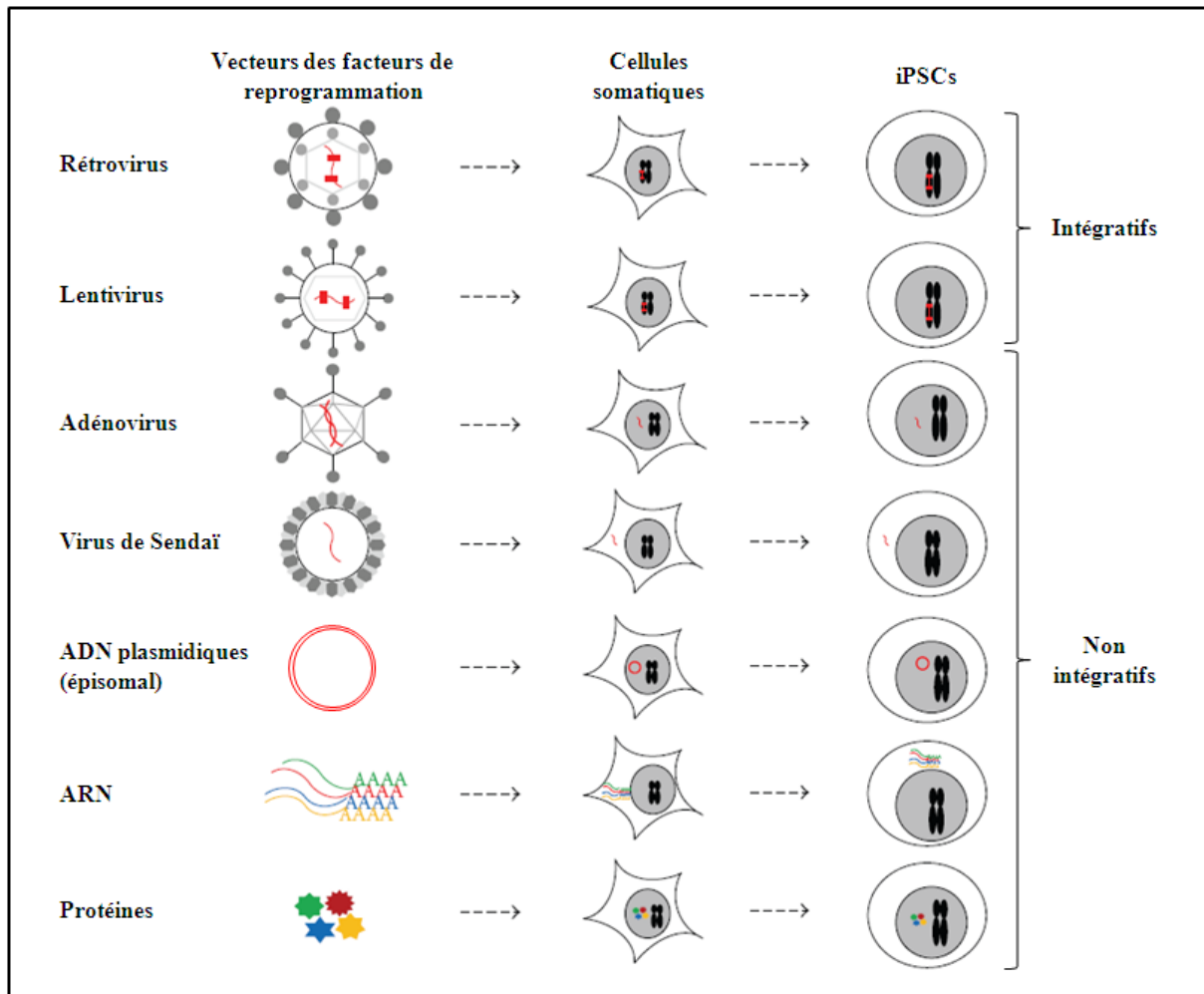
#### **II.1.2.3.3.5 Amélioration des méthodes de transduction**

Dès 2008, l'utilisation de vecteurs de type non-intégratif (**Figure 80**) a permis à deux équipes de produire des iPSCs sans intégration génomique. Ainsi, l'équipe du Dr Hochedlinger a utilisé des vecteurs adénoviraux pour obtenir des adéno-iPSCs à partir de fibroblastes et de cellules du foie murins (Stadtfeld et al., 2008) alors que Shinya Yamanaka et son groupe ont effectué des transfections transitoires répétées de deux plasmides (épisomes) pour obtenir leurs iPSCs à partir de MEFs (Okita et al., 2008).

En 2009, d'autres méthodes sont apparues pour générer des iPSCs grâce à une expression transitoire des facteurs de reprogrammation (**Figure 80**). Il s'agit :

- ♦ des vecteurs épisomaux (Yu et al., 2009) ;
- ♦ d'un vecteur basé sur le virus de Sendai (Fusaki et al., 2009; Li et al., 2000) ;
- ♦ d'un vecteur lentiviral possédant une « cassette cellule souche » (appelée STEMCCA) qui n'engendre qu'un nombre minime d'insertions génomiques grâce au système loxP/Cre (Rohlmann et al., 1996; Sommer et al., 2009) ;
- ♦ des *piggyBAC* (Kaji et al., 2009; Woltjen et al., 2009) qui, avec les recombinaisons homologues fondées sur le système de sélection loxP/Cre, permettent l'élimination des transgènes insérés dans le génome après la reprogrammation ;
- ♦ des protéines POU5F1, SOX2, KLF4 et c-MYC associées à des séquences de poly-arginine qui permettent de pénétrer les cellules ont été introduites dans des fibroblastes murins. Ces cellules

souches pluripotentes induites par des protéines sont nommées piPSCs (Thier et al., 2012; Zhou et al., 2009).



**Figure 80** : stratégies de génération d'iPSCs à partir de cellules somatiques en utilisant divers vecteurs des facteurs de reprogrammation. Modifié de Oh et al., 2012.

Plus récemment, des molécules d'ADN surenroulées (Narsinh et al., 2011), ou encore des ARN messagers synthétiques ou des miARNs (Anokye-Danso et al., 2011; Miyoshi et al., 2011; Underbayev et al., 2012) ont permis de créer des iPSCs. En associant des petites molécules aux vecteurs épisomaux, l'efficacité de la reprogrammation a été améliorée et les iPSCs ont pu être générées sans utiliser de cellules nourricières (Yu et al., 2011). Enfin, cette année, des iPSCs humaines (ou hiPSCs) ont pu être produites avec le virus non intégratif de Sendai sans cellules nourricières et sans facteurs étrangers (Macarthur et al., 2012).

#### II.1.2.3.3.6 Origines des cellules somatiques reprogrammables

Les premières cellules à avoir été reprogrammées étaient des fibroblastes murins. Chez l'Homme, par analogie avec la souris, les fibroblastes ont tout d'abord été utilisés (Takahashi et al., 2007b; Yu et al., 2007). Pour une utilisation facilitée et en vue d'applications thérapeutiques, les cellules doivent

être accessibles par biopsie avec le minimum de risques, être disponibles en grande quantité et permettre une reprogrammation efficace et rapide. La plupart des cellules somatiques ayant été reprogrammées avec succès proviennent ainsi de l'ectoderme et du mésoderme (**Tableau 3**).

**Tableau 3 : exemples de cellules humaines ayant été reprogrammées.**

Sources cellulaires	Références
cellules du sang périphériques CD34+	Loh et al., 2009
cellules de sang cordon ombilical	Ye et al., 2009
cellules souches de la moelle osseuse	Ye et al., 2009
cellules souches adipeuses	Aoki et al., 2010; Narsinh et al., 2011; Sugii et al., 2010
hépatocytes	Liu et al., 2010
kératinocytes	Aasen et al., 2008
mélanocytes	Utikal et al., 2009
cellules souches neurales (fœtales)	Kim et al., 2009

## II.2 Champ d'applications

Les propriétés fondamentales des CSPh confèrent à ces dernières un champ d'applications variées comme (Chun et al., 2010; Deng, 2010; Durnaoglu et al., 2011; Kiskinis and Eggan, 2010; Stadtfeld and Hochedlinger, 2010) :

- ♦ l'étude des étapes précoces du développement sain ou pathologique humain ;
- ♦ la thérapie cellulaire qui vise à utiliser les cellules comme un médicament à proprement parlé en les greffant directement chez l'Homme afin de prévenir ou traiter les pathologies humaines par l'administration de cellules vivantes ;
- ♦ la modélisation pathologique qui peut permettre à la fois d'étudier *in vitro* les processus moléculaires et cellulaires de mise en place d'une pathologie particulière et de rechercher des molécules à potentiel thérapeutique en testant leur efficacité et leur toxicité, pour à terme, les utiliser en tant que médicaments ;
- ♦ la recherche pharmacologique qui peut tester l'efficacité et la toxicité (cardiotoxicité, hépatotoxicité etc.) de composés chimiques sur des modèles cellulaires humains.

### II.2.1 L'étude du développement

#### II.2.1.1 Généralité

Comme nous l'avons vu dans la première partie de cette thèse, le développement embryonnaire peut être étudié grâce aux modèles animaux. En engageant des CSEh et des iPSCs dans le lignage d'intérêt, ces cellules sont des outils performants puisqu'elles permettent de s'affranchir de la variabilité des espèces en travaillant directement sur l'Homme. Ainsi, la formation d'EBs humains à

partir de CSEh suit la différenciation dans l'espace et dans le temps qui se produit naturellement *in vivo* chez l'Homme (Dvash and Benvenisty, 2004).

Par ailleurs, l'étude des profils d'expression génique par transcriptome sur puces à ADN a contribué à l'identification de groupes de gènes impliqués dans la différenciation des CSEh. En utilisant cette stratégie, l'équipe du Dr Piétu a pu identifier des profils d'expression génique et étudier la modulation des voies de signalisation chez deux populations de progéniteurs dérivés de CSEh qui sont les cellules souches neurales (ou NSC pour *Neural Stem Cell*) et les CSM (Denis et al., 2011).

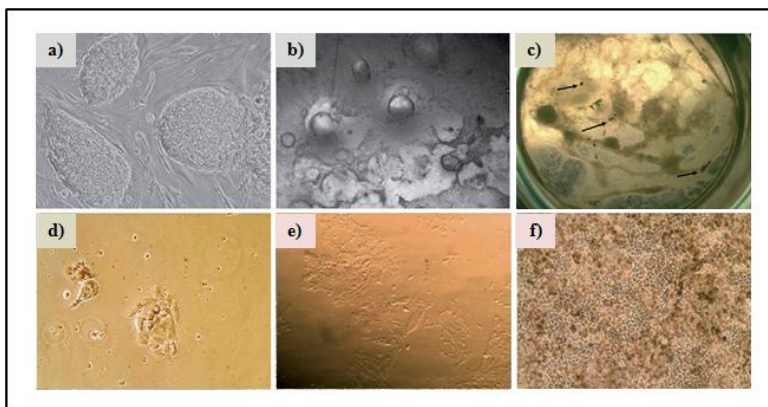
### II.2.1.2 Le développement rétinien

Plusieurs groupes ont démontré que les CSEh et les iPSCs peuvent se différencier en suivant les étapes du développement rétinien qui se produisent *in vivo*.

#### II.2.1.2.1 **Obtention et caractérisation de l'EPR**

Les cellules de l'EPR peuvent être dérivées selon deux méthodes principales :

- ♦ la première méthode est une différenciation spontanée qui consiste à laisser les CSEh arriver à très forte confluence puis à supprimer le FGF2 du milieu de culture (**Figure 81**) (Carr et al., 2009a; Klimanskaya et al., 2004; Liao et al., 2010; Lund et al., 2006; Vugler et al., 2008) ;



**Figure 81** : photographies au microscope à contraste de phase représentant les morphologies caractéristiques de la différenciation des CSEh en EPR. a) colonies de CSEh indifférenciées ; b) différenciation de structures en trois dimensions et de divers types cellulaires à partir des CSEh ;

c) apparition d'ensemble de cellules pigmentées (flèches) après une longue différenciation des CSEh ; d)-e) prolifération des cellules de l'EPR non encore pigmentées ; d) une journée après l'isolement e) 5 jours post isolement ; f) culture mature de cellules de l'EPR arrivées à confluence présentant une morphologie pavimenteuse plus ou moins pigmentée. Grossissements : a), d) et f) 200X, b) et e) 50X, c) 7,5X. Adapté de Klimanskaya et al., 2006.

- ♦ la seconde méthode passe par un stade de culture non-adhérente en EBs ou en neurosphères et a été utilisée pour produire des cellules de l'EPR à partir des iPSCs (Klimanskaya et al., 2004; Meyer et al., 2009; Osakada et al., 2009a, 2009b; Idelson et al., 2009; Nistor et al., 2010).

Les cellules de l'EPR sont caractérisées en se basant sur leur pigmentation, leur morphologie (polygonale, pavimenteuse), les marqueurs caractéristiques détectés par immunocytochimie et/ou qPCR (pour *qualitative Polymerase Chain Reaction*). Ces marqueurs sont soit des marqueurs de l'EPR immature tels que PAX6 et MITF soit des marqueurs de maturité comme la protéine associée à la membrane BEST1 (pour bestrophin 1), les protéines du cycle visuel CRALBP (pour cellular retinal-binding protein) et RPE65, la protéine de synthèse des pigments TYRP1 (pour tyrosinase-related protein 1) et le marqueur des jonctions serrées ZO-1 (pour zona occludens 1 ou TJP1 pour tight junction protein 1) (Bakall et al., 2003; Haruta et al., 2004; Hirano et al., 2003; Meyer et al., 2009).

Leur fonctionnalité est principalement évaluée au travers de la phagocytose de SEP qui peut être mesurée grâce à la phagocytose de SEP fluorescents par les cellules de l'EPR (Bosch et al., 1993; Buchholz et al., 2009; Carr et al., 2009a, 2009b; Kevany and Palczewski, 2010; Strauss, 2005).

De façon générale, l'expression du marqueur PAX6 s'éteint dans l'EPR mature ce qui suggère que les cellules de l'EPR dérivées de CSEh ou d'iPSCs sont similaires à l'EPR immature qui correspondrait *in vivo* à de l'EPR fœtal (Buchholz et al., 2009; Martínez-Morales et al., 2004).

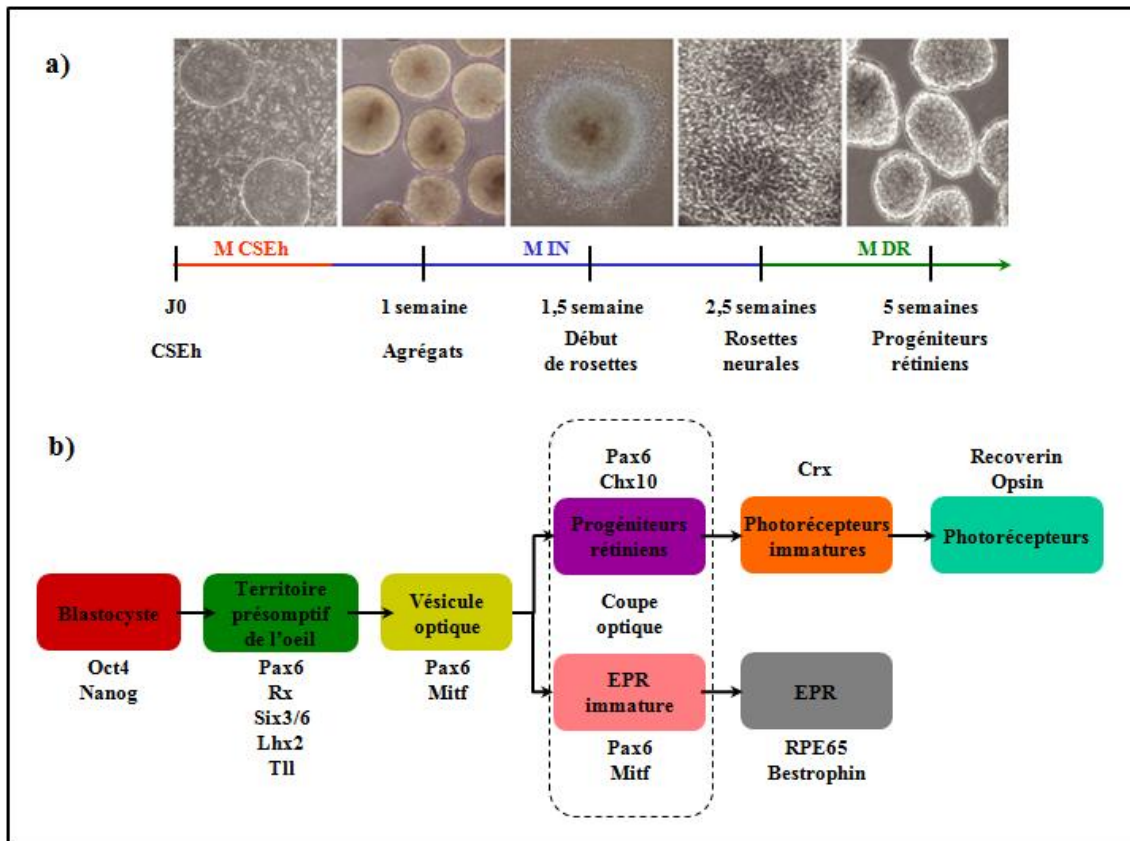
#### **II.2.1.2.2 Obtention des photorécepteurs et de l'EPR**

Dans les premières études, des antagonistes, de la voie des BMPs et des Wnt, connus pour induire l'engagement neural puis rétinien, ont été utilisés (Lamba et al., 2006; Osakada et al., 2008). Le protocole n'utilisant pas d'antagonistes a tout de même conduit, par sécrétions endogènes, à la production de progéniteurs rétiniens multipotents (PRM), à partir de CSEh et d'iPSCs, qui se différencient et expriment les marqueurs caractéristiques des photorécepteurs et des cellules de l'EPR d'une façon imitant la rétinogénèse humaine normale (**Figure 82**) (Meyer et al., 2009). Avec ce dernier protocole, l'équipe du Dr Gamm a montré que durant la différenciation, les CSEh perdent l'expression des gènes de pluripotence *OCT4* et *NANOG* et acquièrent l'expression des facteurs de transcription associés à la spécification du territoire oculaire (*RX*, *SIX3/6*, *LHX2*, *TLL*) et le marqueur de l'induction neurale (*PAX6*). Après 16 jours de différenciation, lorsque les rosettes neurales sont mises en culture en neurosphères, elles expriment la protéine MITF ( $14,7\% \pm 2,1\%$ ) dès 30 jours de différenciation ce qui correspond *in vivo* à l'apparition des vésicules optiques. Jusqu'à 50 jours de différenciation, l'expression de MITF va diminuer au fur et à mesure que l'expression de CHX10 va augmenter. Ainsi à 40 jours de différenciation, seules  $18\% \pm 3,3\%$  des neurosphères expriment CHX10, cette expression atteignant  $90,7\% \pm 5,2\%$  à 50 jours de différenciation et correspondant au stade de progéniteurs rétiniens immatures. En maintenant en culture ces neurosphères, à 80 jours de différenciation,  $19,4\% \pm 3,1\%$  expriment le marqueur des photorécepteurs immatures CRX. Parmi les  $63,0\% \pm 7,6\%$  de cellules exprimant CRX dans ces neurosphères,  $46,4\% \pm 7,9\%$  expriment également les marqueurs des photorécepteurs à savoir la recoverine et l'opsine.

Pour la production de cellules de l'EPR, le maintien des rosettes neurales en adhérence permet dès 30 jours d'obtenir des zones pigmentées. A 30 jours de différenciation, 100% des cellules semblent



exprimer les protéines MITF et ZO-1 et dès 40 jours de différenciation, 77% des cellules expriment PAX6 et 25% des cellules expriment MITF ce qui semblent démontrer le caractère immature des cellules qui à 60 jours de différenciation expriment les marqueurs de l'EPR mature, RPE65 et BEST1.



**Figure 82 : obtention de populations cellulaires rétinienne à partir de CSEh et d'iPSCs.** a) représentation schématique du protocole de différenciation utilisé pour générer les cellules du lignage rétinien. Pour obtenir les rosettes neurales, les CSEh, cultivées avec du milieu de culture des CSEh (M CSEh), sont mises en culture en suspension durant 1 semaine en milieu d'induction neurale (M IN). Les agrégats sont alors mis à cultiver en adhérence sur un revêtement de laminine afin de permettre la formation des rosettes neurales. Après 16 jours de différenciation, les colonies contenant les rosettes sont mécaniquement détachées pour croître sous forme de neurosphères dans du milieu de différenciation rétinienne (M DR) ; b) chaque étape majeure de la rétino-génèse (rectangles arrondis colorés) peut être reconnue par l'expression de facteurs de transcription particuliers. Modifié de Meyer et al., 2009.

Les études menées sur les iPSCs ont montré qu'elles étaient capables de se différencier comme les CSEh lorsque les protocoles précédemment établis sont utilisés (Buchholz et al., 2009; Carr et al., 2009a; Hiram et al., 2009; Lamba et al., 2006, 2010; Meyer et al., 2009; Torrez et al., 2012). Cependant la proportion de cellules rétinienne obtenue peut différer selon les iPSCs considérées et n'atteint pas celle des CSEh (Hiram et al., 2009; Meyer et al., 2009). Dans l'étude du Dr Gamm, même si d'un point de vue morphologique il n'y a aucune différence entre les colonies, les agrégats, les rosettes neurales et les neurosphères obtenues à partir de CSEh et d'iPSCs, après 10 jours de



différenciation de quatre lignées d'iPSCs, la capacité à produire une population neuroectodermale exprimant PAX6 varie avec une efficacité allant de 5% à 56% du nombre total de cellules. Utiliser des iPSCs ayant une forte expression précoce de PAX6 favorise l'obtention de populations cellulaires rétiniennes car PAX6 est nécessaire au développement rétinien (Meyer et al., 2009).

Par ailleurs, il semble que des cellules de l'EPR reprogrammées en iPSCs conservent une mémoire de leur identité précédente favorisant leur différenciation dans ce type cellulaire (Hu et al., 2010). Enfin, il n'est pas possible en suivant ces protocoles de sélectionner et de suivre le destin des PRM dans des cultures vivantes (Meyer et al., 2011).

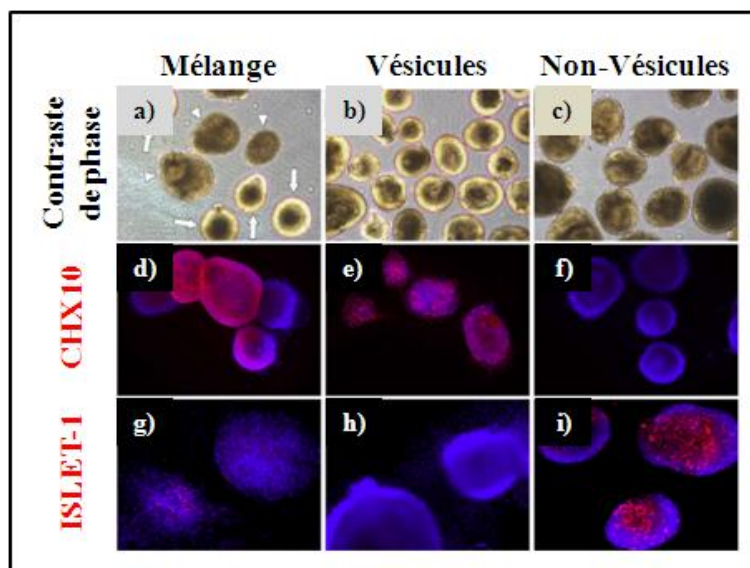
#### **II.2.1.2.3 Obtention des structures des vésicules et coupes optiques**

Les équipes des Drs Gamm et Sasai ont obtenu des cellules des vésicules optiques à partir de CSEh et d'hiPSCs (Meyer et al., 2011) et des coupes optiques à partir des CSE murines (Eiraku et al., 2011; Eiraku and Sasai, 2012) et humaines (Nakano et al., 2012).

Dans cette étude, l'équipe du Dr Gamm a voulu déterminer les caractéristiques qui pourraient être utilisées pour séparer les PRM des populations cellulaires du cerveau antérieur, dès les premières étapes de culture et sans avoir besoin de recourir à des manipulations génétiques.

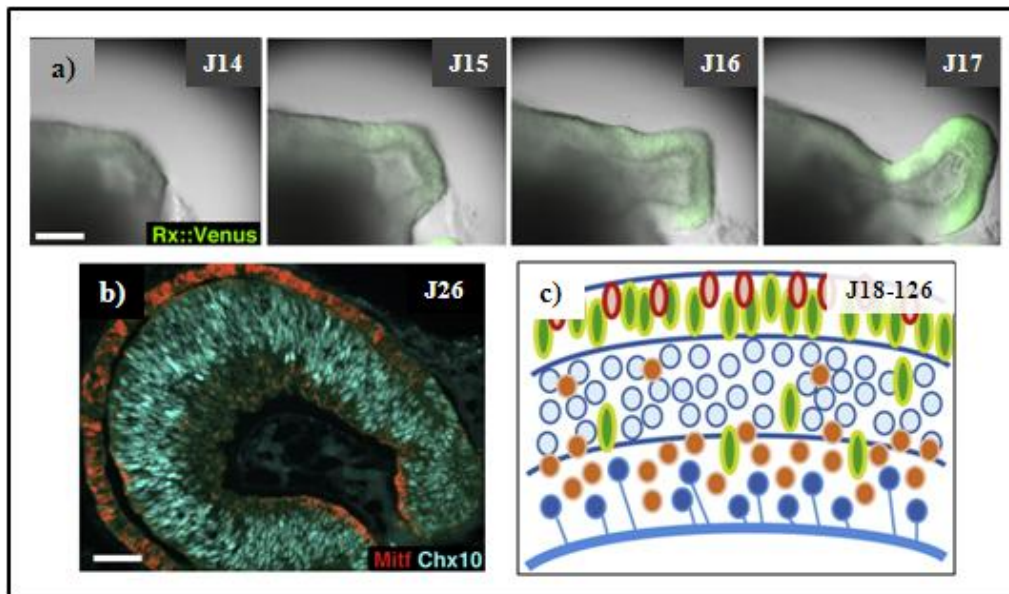
Pour ce faire l'équipe a tout d'abord cultivé les CSPH sous forme d'agrégats en suspension dans du milieu de différenciation en EBs et les a placés après 4 jours dans du milieu d'induction neurale. Après un total d'une semaine, les agrégats ont été déposés sur des supports couverts de laminine pour permettre la différenciation en rosettes neurales. A 16 jours de différenciation, les parties centrales des colonies contenant les rosettes ont été mécaniquement détachées et mises en culture en présence de milieu de différenciation rétinienne sous forme d'agrégats. Après 20 à 25 jours de différenciation, deux types de structure apparaissent, les vésicules et les structures qualifiées de non vésiculaires (**Figure 83**) (Meyer et al., 2011).

En se basant sur les structures vésiculaires qui ressemblent aux vésicules optiques, les étapes précoces du développement rétinien humain ainsi que la genèse des cellules neuro-rétinienne dans l'espace et dans le temps ont été étudiées, enfin, ce protocole a permis d'optimiser la production de PRM et de cellules de l'EPR à partir des lignées d'hiPSCs difficiles à dériver. Cependant, les vésicules ne présentent pas l'évagination existante *in vivo* lorsqu'elles sont cultivées de façon isolée et l'ajout d'activine A est nécessaire au développement de cellules de l'EPR ce qui suggère la présence d'un biais intrinsèque qui oriente les cellules des vésicules vers un destin neuro-rétinien.



**Figure 83** : obtention de structure de type vésicules optiques à partir de CSEh. a)-c) entre 20 à 25 jours de différenciation, les CSEh s'agrègent pour former deux types de structures, l'une avec un halo transparent externe est considérée comme une vésicule optique contenant les PRM (b), l'autre sous forme de sphères foncées contenant des rosettes est considérée comme la population du prosencéphale (c) ; d)-f) le marqueur des progéniteurs rétiniens, CHX10, est exclusivement exprimé dans les structures de types et atteint  $90,88\% \pm 4,23\%$  du nombre total de cellules testées (e) alors que g)-i) ISLET-1 (pour ISL LIM homeobox 1), marqueur du développement du prosencéphale, est restreint à la population non vésiculaire (i). Modifié de Meyer et al., 2011.

Dans l'étude du Dr Sasai menée à partir de CSEh, la formation des vésicules puis des coupes optiques a pu se dérouler par évagination puis invagination grâce au contrôle de la voie Wnt. Ainsi, son inhibition dès le début de la différenciation a permis la rostralisation des CSEh qui ont pu donner l'épithélium rétinien qui s'est évaginé (**Figure 84a**). La formation des coupes optiques requiert à la fois les tissus de la RN et de l'EPR de façon équilibrée. Le traitement par un agoniste de la voie Wnt a permis d'augmenter l'expression du marqueur de l'EPR Mitf sans supprimer l'expression du marqueur des progéniteurs de la RN, Chx10. La présence de ces deux tissus a conduit à l'invagination des vésicules optiques en coupes optiques (**Figure 84b**). Enfin, en maintenant les coupes optiques en culture durant près de 126 jours, l'épithélium neuro-rétinien a pu spontanément entrer en différenciation et se stratifier comme la RN fœtale. Cette RN dérivée de CSEh contient, à 126 jours de différenciation, des types cellulaires différenciés comme les cônes et les bâtonnets localisés au pôle apical mais aussi, plus proches du pôle basal, des précurseurs des photorécepteurs et des interneurons qui donneront par la suite les cellules amacrines et horizontales (**Figure 84c**).



**Figure 84 : formations auto-organisées des vésicules et coupes optiques à partir de CSEh et auto-formation de la RN pluristratifiée.** a) formation auto-organisée d'une vésicule optique par évagination des cellules de l'épithélium rétinien dérivées de CSEh (vert). Barre d'échelle : 200 $\mu$ m ; b) formation auto-organisée d'une coupe optique après 26 jours de culture montrant l'expression du marqueur des progéniteurs de la RN, Chx10 (bleu ciel) au niveau de la paroi interne et l'expression du marqueur de l'EPR, Mitf (rouge) au niveau de la paroi externe ; c) représentation schématique de la stratification de RN, à partir de CSEh, établie grâce à l'étude de l'apparition, la migration et l'organisation des cellules rétiniennes de 18 jours à 126 jours de différenciation. Avec, les bâtonnets (vert), les cônes (rouge), les progéniteurs (bleu clair), les interneurons (précurseurs des cellules amacrines et horizontales, orange) et les cellules ganglionnaires (bleu foncé). Adapté de Nakano et al., 2012.

Les résultats divergent en fonction des CSE utilisées mais les différences de temps nécessaire à l'obtention des coupes optiques, de taille de ces coupes optiques et d'épaisseur de la RN sont cohérentes avec les données récoltées *in vivo* chez l'Homme et la souris.

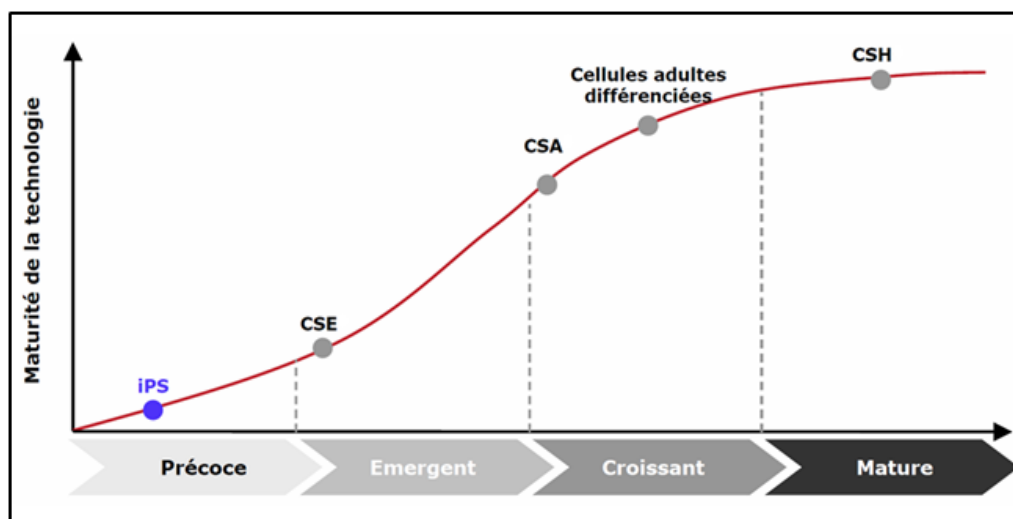
La différence principale réside dans le processus de déformation de l'épithélium neuro-rétinien. Avant invagination, il est concave au pôle apical de la vésicule optique, après, il devient convexe au pôle apical de la coupe optique (Eiraku et al., 2011; Nakano et al., 2012). Le sens de la courbure est déterminé à ce stade. Cette éversion (concave à convexe) nécessite pour les CSE murines, la présence de l'EPR. En effet, l'isolement de l'épithélium neuro-rétinien avant l'invagination empêche cette éversion (Eiraku et al., 2011). *A contrario*, avec les CSEh, lorsque l'épithélium est isolé, ce processus d'éversion a lieu ce qui tend à prouver que l'épithélium neuro-rétinien dispose d'une tendance intrinsèque à se plier de cette manière contribuant ainsi au repliement de ce tissu épais pendant l'invagination. En effet, l'épithélium neuro-rétinien dérivé des CSEh est plus épais que celui provenant des CSE murines ce qui peut expliquer que le mécanisme d'invagination soit plus complexe chez l'Homme que chez la souris (Nakano et al., 2012).

Ces nouveaux protocoles permettent d'étudier le développement rétinien en se basant non seulement sur les marqueurs exprimés par les différents types cellulaires mais surtout en se basant sur la morphologie observée sur des populations vivantes *in vitro*.

## II.2.2 La thérapie cellulaire

### II.2.2.1 Principe

La thérapie cellulaire régénérative prévient ou traite les pathologies humaines par l'administration de cellules vivantes. Elle consiste à transférer des cellules vivantes pour reconstruire un tissu défaillant ou à reconstituer des organes endommagés en appliquant par exemple des matrices contenant les cellules. Les cellules utilisées peuvent être autologues, allogéniques, xénogéniques ou être issues de lignées utilisées en laboratoire. A titre d'exemples, les myoblastes ont été utilisés dans le traitement des ischémies cardiaques sévères (Menasché, 2008a, 2008b), les neuroblastes fœtaux ont été testés dans certaines maladies neurodégénératives (Flax et al., 1998; Peschanski et al., 2000; Peschanski, 2001), notamment dans la maladie de Parkinson (Lindvall et al., 1990a, 1990b) ou la maladie d'Huntington (Bachoud-Lévi, 2009). Selon la provenance des cellules, les applications thérapeutiques sont plus ou moins avancées et restent très limitées en ce qui concerne les CSPh aussi bien les CSEh que les hiPSCs<sup>5</sup> (Figure 85).



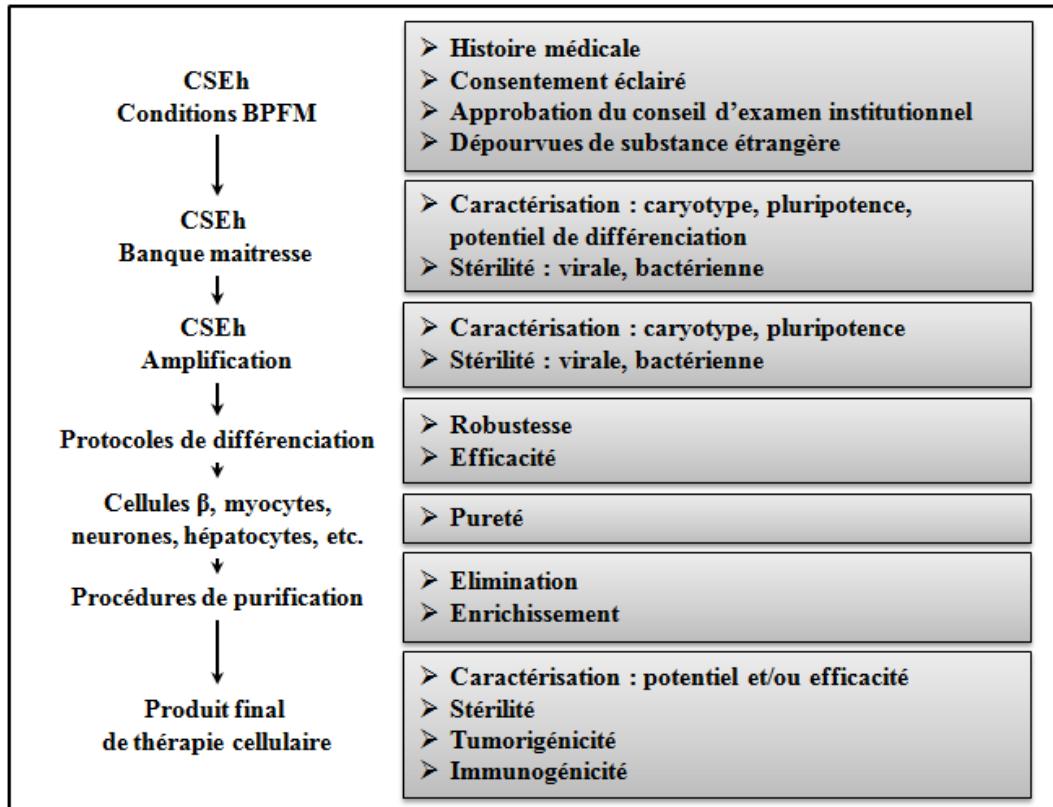
**Figure 85 : maturité de la technologie en termes de thérapie cellulaire.** Avec iPS : cellules souches pluripotentes induites, CSE : Cellules Souches Embryonnaires, CSA : Cellules Souches Adultes, CSH : Cellules Souches Hématopoïétiques. Source : <http://www.leem.org/etude-therapie-cellulaire-edition-2010>.

<sup>5</sup> <http://www.leem.org/etude-therapie-cellulaire-edition-2010>

### II.2.2.2 Utilisation des CSEh

Permettre le passage des CSEh du domaine de la recherche à celui de la clinique est un défi qui doit tenir compte des préoccupations de sécurité incluant (Figure 86) (Hentze et al., 2007) :

- ♦ l'immunogénicité de greffes de cellules non autologues ;
- ♦ la présence d'agents infectieux provenant de la greffe ;
- ♦ l'instabilité génomique des CSEh à long terme en culture ;
- ♦ les potentiels de migration et de tumorigénicité des cellules transplantées.



**Figure 86** : esquisse d'une stratégie générale visant à générer un produit de thérapie cellulaire basé sur les CSEh cliniquement compatibles. Chaque étape de la procédure est décrite à gauche et les questions essentielles à poser sont mises en évidence à droite. Avec BPFM : Bonnes Pratiques de Fabrication des Médicaments. Adapté de Hentze et al., 2007.

#### II.2.2.2.1 Essais chez l'animal

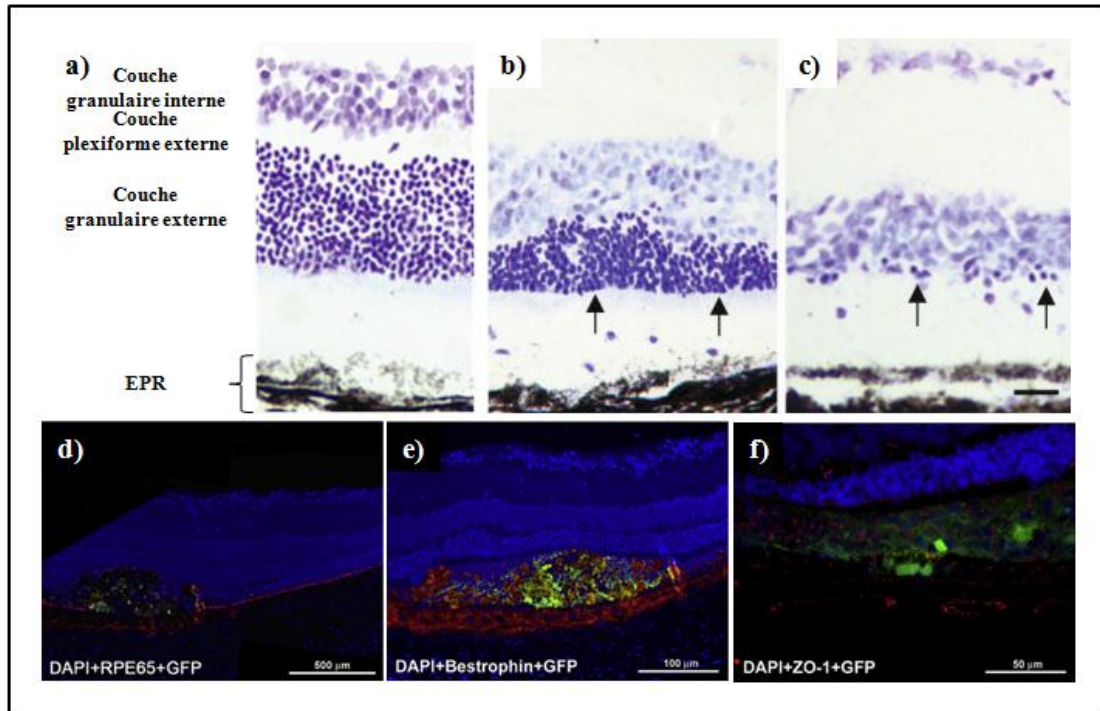
Concernant les maladies rétiniennes, la thérapie cellulaire vise à remplacer les cellules endommagées à savoir les cellules de l'EPR et/ou les photorécepteurs par des cellules saines.

##### II.2.2.2.1.1 Transplantation de cellules de l'EPR

Les cellules de l'EPR dérivées des CSEh ont permis de restaurer une fonction visuelle chez les rats RCS (pour *Royal College of Surgeons*) (Figure 87) (Idelson et al., 2009; Lu et al., 2009; Lund et al., 2006; Vugler et al., 2008), modèles de la dystrophie rétinienne, présentant un défaut de l'EPR du à une



mutation du gène *Mertk* (Gal et al., 2000) qui cause une cécité dès les premiers mois de vie et chez la souris *Elov14* modèle de la dystrophie maculaire de Stargardt (Lu et al., 2009).



**Figure 87** : greffes de cellules de l'EPR dérivées de CSEh chez les rats RCS. a)-c) examens histologiques 90 jours après la naissance montrant les photorécepteurs dans un œil sain a), dans un œil greffé, 70 jours après la transplantation b) et dans un œil atteint non greffé c). Les flèches indiquent les photorécepteurs préservés b) et les photorécepteurs restants c). Barre d'échelle : 25μm. Adapté de Lu et al., 2009 ; d)-f) immunomarquages montrant que les cellules transplantées (vert) survivent, s'intègrent et co-expriment les marqueurs des cellules de l'EPR matures, RPE65 d), Bestrophine e) et ZO-1 f) 5 à 6 semaines après la transplantation. Les noyaux sont colorés en bleu par le DAPI. Barre d'échelle : d) 500μm, e) 100μm, f) 50μm. De Idelson et al., 2009.

#### II.2.2.2.1.2 Transplantation de progéniteurs rétiniens

L'essai de transplantation de progéniteurs rétiniens dérivés de CSEh chez les souris *Crx*<sup>-/-</sup>, dont les photorécepteurs ne peuvent se connecter aux cellules bipolaires, a montré que les progéniteurs s'intègrent uniquement à la couche granulaire externe, qui contient les photorécepteurs, et qu'ils expriment les marqueurs des photorécepteurs matures à savoir la recoverine et la rhodopsine caractéristiques respectivement des cônes et des bâtonnets. Les souris ont retrouvé une sensibilité à la lumière et n'ont pas présenté de formation de tératomes 4 à 6 semaines après la transplantation (Lamba et al., 2009).

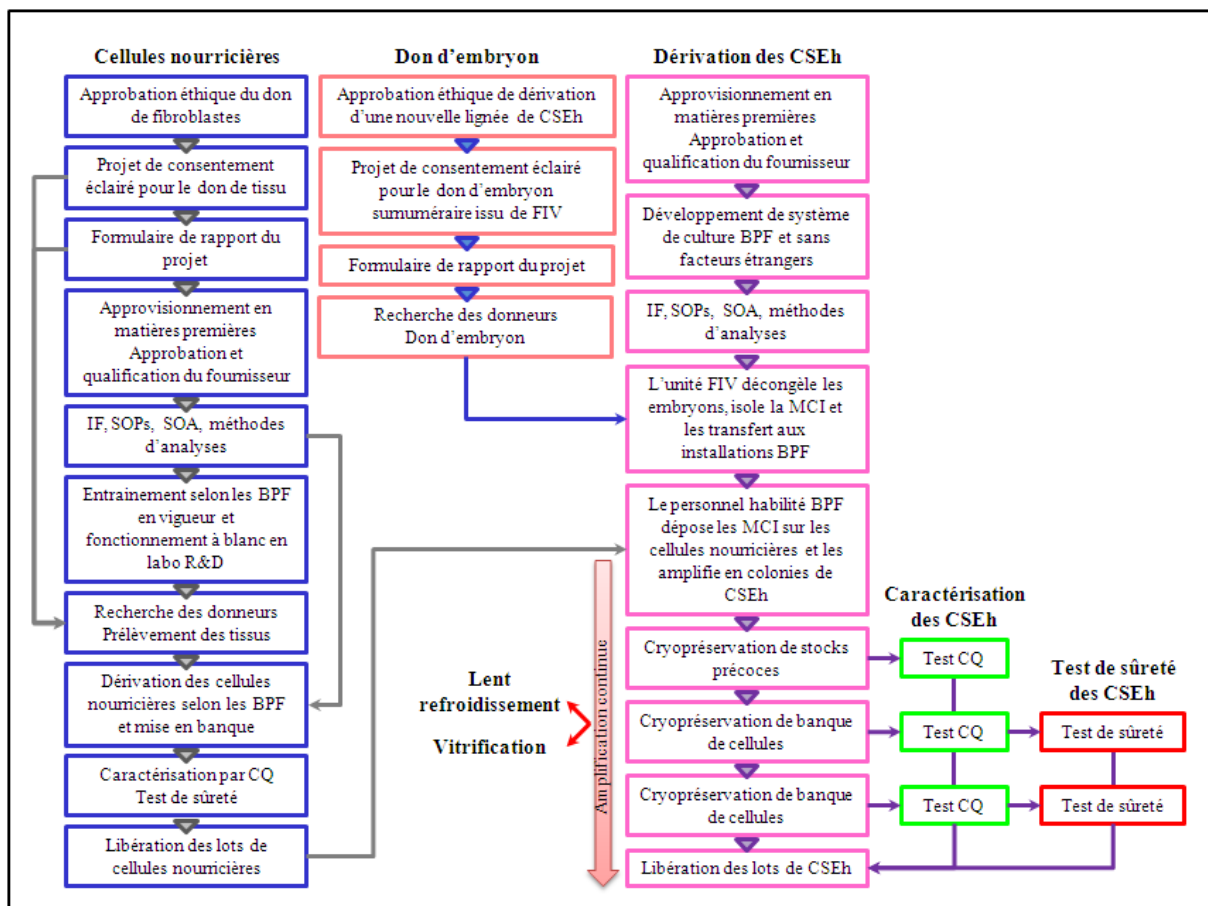
#### II.2.2.2.2 Essais cliniques menés chez l'Homme

Dans le cadre de thérapies cellulaires chez l'Homme impliquant les CSEh, plusieurs conditions doivent être respectées (Daley, 2012). Les cellules doivent être les plus sûres possibles et être

fonctionnelles. Le passage en phase clinique nécessite de suivre les Bonnes Pratiques de Fabrication (ou BPF) des Médicaments à usage humain éditées en France par l'Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé (ou ANSM) ou les GMP (pour *Good Manufacture Practice*) dictées aux États-Unis par l'agence fédérale américaine des produits alimentaires et médicamenteux (ou FDA pour *Food and Drug Administration*).

Dans ce contexte rappelons que les éléments d'origine animale autre qu'humaine doivent être éliminés des protocoles ou doivent pouvoir être tracés.

Dès 2005, une lignée nommée ACT-14 a pu être dérivée avec succès sans utilisation de cellules nourricières et de sérum (Klimanskaya et al., 2005). La société Roslin cells<sup>6</sup> dispose également de la lignée RC9 qui est une lignée de CSEh de grade clinique. Cette année, l'équipe de Benjamin Reubinoff a développé un protocole de dérivation de cellules de grade clinique sans usage de facteurs animaux (**Figure 88**) (Tannenbaum et al., 2012) ouvrant un peu plus la voie du passage de la recherche à la clinique.



**Figure 88 : Diagramme des processus adoptés pour dériver des cellules nourricières et des CSEh de grade clinique et sans facteurs étrangers.** Le schéma indique les différentes étapes éthiques, scientifiques et de régulation franchies pour dériver les fibroblastes et les CSEh de grade clinique. Avec IF : instructions fournisseurs, SOPs : *standard operating procedure* (ou procédure d'exploitation standard), SOA :

<sup>6</sup> <http://roslincells.com/our-cell-lines/>



*service-oriented architecture* (ou architecture orientée services), BPF : Bonnes Pratiques de Fabrication, R&D : Recherche et Développement, CQ : contrôle qualité, FIV : fécondation *in vitro*, MCI : masse cellulaire interne. Adapté de Tannenbaum et al., 2012.

Par ailleurs différentes équipes travaillent à l'élimination des tératomes grâce à une meilleure sélection des cellules à greffer (Fukuda et al., 2006) ou à l'utilisation de gènes suicides (Hara et al., 2008; Jung et al., 2007; Naujok et al., 2010) alors qu'il est également possible d'améliorer la survie du greffon (Deuse et al., 2011).

Les essais menés chez l'Homme sont au nombre de trois, le premier concerne les lésions de la moelle épinière (**Tableau 4**) alors que les deux autres visent des maladies affectant la macula (Trounson et al., 2011).

**Tableau 4 : étapes clés du premier essai de thérapie cellulaire basé sur des dérivés de CSEh mené chez l'Homme.**

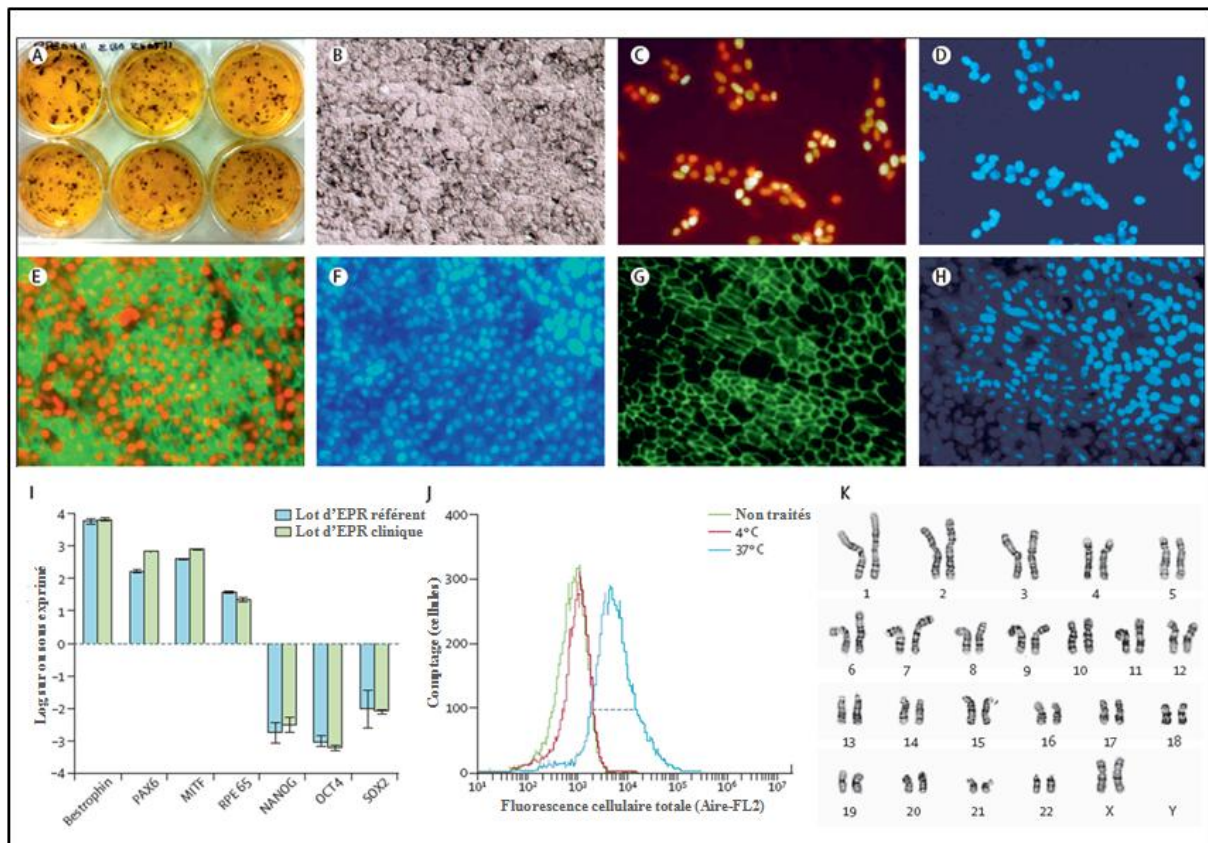
Société	Date	Objectifs	Résultats obtenus	Références
Geron Corporation	2005	Greffe oligodendrocytes dérivés de CSEh H7 chez l'animal	Ré-myélinisation et restauration de la fonction motrice chez des animaux greffés 7 mois après lésion de la moelle	Keirstead et al., 2005
	Janvier 2009	Utiliser des précurseurs oligodendrocytaires (GRNOPC1) dérivés de la lignée de CSEh H1 dans le cadre de lésions totales de la moelle épinière au niveau thoracique chez l'Homme	Autorisation de la FDA	Alper, 2009; Couzin, 2009
	2009-2011	Sécurité de la greffe	Pas d'événements indésirables graves	Geron Corporation, 2009, 2011
	Novembre 2011	Arrêt de l'essai pour se concentrer à la lutte contre le cancer		Ichim et al., 2011

La société Advanced Cell Technology a obtenu, en avril 2011, l'autorisation de greffer des cellules de l'EPR dérivées de la lignée de CSEh MA09 ([www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov), n<sup>os</sup> : NCT01345006 et NCT01344993) dans le cadre de 2 maladies affectant la macula :

- ♦ la dystrophie maculaire de Stargardt (ou SMD pour *Stargardt's Macular Dystrophy*) est une maladie génétique héréditaire due au gène *ABCA4* (pour ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 4), qui touche les enfants dès l'âge de 6 ans et qui les conduit très rapidement à une baisse d'acuité visuelle (AV) atteignant 1/10<sup>ème</sup> à 1/20<sup>ème</sup> ;
- ♦ la dégénérescence maculaire liée à l'âge (ou DMLA) est une maladie dégénérative qui débute couramment après l'âge de 50ans. Elle atteint la vision centrale tout en gardant intacte la vision

périphérique. Il existe deux formes, l'humide et la sèche, c'est cette dernière, la plus fréquente, qui est concernée par l'essai clinique.

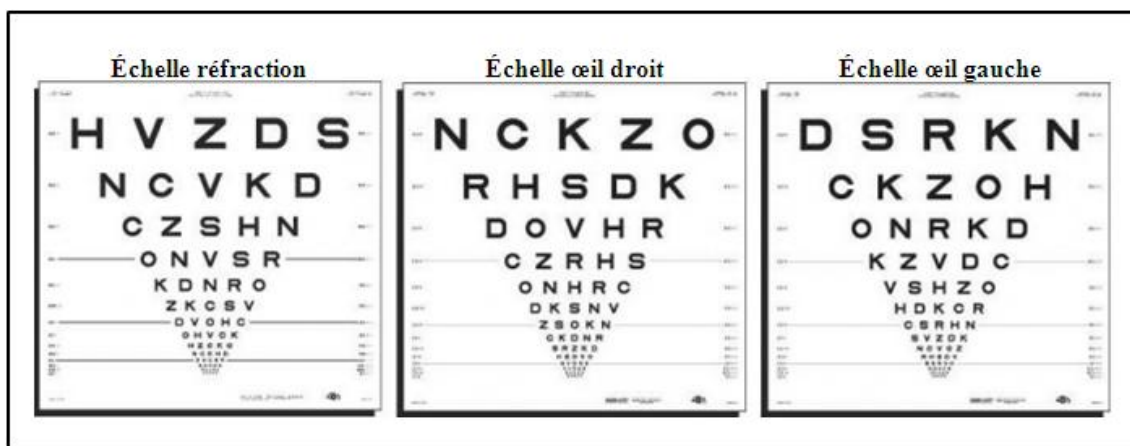
Ces essais concernent l'innocuité et la tolérance des greffes de cellules qui se font par injection des cellules de l'EPR (**Figure 89**) dans l'espace sous-rétinien. L'essai sur la DMLA de forme sèche va plus loin car il vise également à évaluer des critères d'efficacité qui pourront par la suite être réutilisés dans d'autres études de thérapie cellulaire de l'EPR.



**Figure 89** : caractérisation des cellules de l'EPR mature générées à partir des CSEh MA09. A) plaque six puits avec les zones d'EPR formées à partir de culture d'EBs ; B) microscopie à modulation de contraste d'Hoffman après 3 semaines de culture des cellules de l'EPR montrant une monocouche de cellules pavimenteuses, confluite, présentant une pigmentation moyenne. C-H) évaluation des marqueurs moléculaires dans les cellules de l'EPR natives ou décongelées, près de 100% des cellules expriment les marqueurs recherchés. C) marquages de MITF (rouge) et PAX6 (vert) sur des cellules décongelées et préparées pour la transplantation, PAX6 disparaît dans des cultures encore plus matures ; D) marquage des noyaux de C par le DAPI ; E) marquages de la bestrophine (rouge) et PAX6 (vert) ; F) marquage des noyaux de E par le DAPI ; G) marquage de ZO-1 (vert) ; H) marquage des noyaux de G par le DAPI. B-H, grossissement 400X ; I) PCR quantitative montrant la sur-expression des marqueurs de l'EPR et la sous-expression des marqueurs des CSEh dans les cellules de l'EPR de grade clinique décongelées comparées au lot de référence de cellules de l'EPR ; J) histogramme de cytométrie de flux montrant la phagocytose des bioparticules PhRodo par les cellules de l'EPR dérivées des CSEh à 4°C et 37°C. K) caryotype normal femelle (46 XX) du lot clinique de cellules de l'EPR. Adapté de Schwartz et al., 2012.

Un premier rapport montre que 4 mois après la greffe, il n'y a pas de signes d'hyperprolifération, de tumorigénéicité, de formation ectopique de tissu, ou de rejet (Schwartz et al., 2012).

Chez les deux patientes étudiées, l'une atteinte par la SMD, l'autre par la DMLA, la fonction visuelle a été améliorée suite à cette greffe. L'AV a été mesurée de façon standardisée grâce au test de l'ETDRS (pour *Early Treatment Diabetic Retinopathy Stud*) (Camparini et al., 2001; Ferris et al., 1982). Ce test comporte trois échelles (**Figure 90**) qui sont lues, avec un éclairage standardisé, à une distance de 4m par le patient, cette distance étant ramenée à 1m pour les personnes ayant une vision basse.



**Figure 90** : les 3 échelles du test ETDRS. A gauche, l'échelle qui permet de mesurer la réfraction du patient, au milieu, l'échelle qui permet de tester son œil droit et à droite, l'échelle qui permet de tester son œil gauche. Source : <http://www.mc2medical.com/index.php?page=refraction&cat=echelles-plastiques-vl&fiche=echelle-etdrs>.

Le score global est déterminé en fonction des lettres correctement lues, lettre à lettre, ligne par ligne de haut en bas, sur ces 3 échelles, plus il est haut, meilleur et l'AV (Bailey et al., 1991). Dans l'essai clinique :

- ♦ la patiente atteinte par la DMLA est passée d'une AV de 20/500, qui correspond à un score de 21 au test de l'ETDRS à une AV de 20/320 (score = 28) six semaines après la greffe ;
- ♦ la patiente atteinte par la SMD est passée d'une fonction visuelle qui se limitait à une détection d'un mouvement de la main, à une acuité visuelle de 20/800 (score = 5) trois mois après la greffe.

### **II.2.2.3 Utilisation des iPSCs**

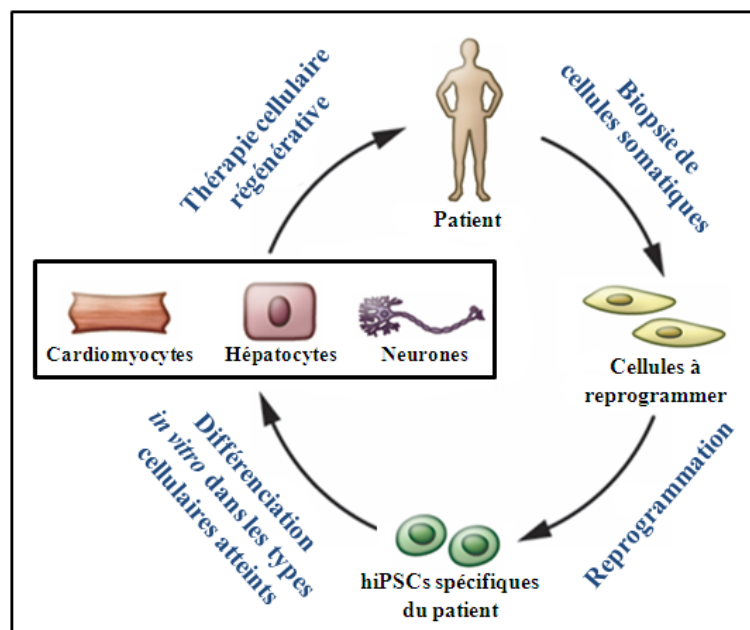
#### **II.2.2.3.1 Essais chez l'animal**

Concernant les maladies de l'œil, l'équipe du Dr Coffey montrait en 2009 que des cellules de l'EPR dérivées d'iPSCs issues de fibroblastes humains, greffées chez des rats RCS, ayant une dystrophie rétinienne, pouvaient préserver les couches de la RN permettant une fonction visuelle.

Cette étude suggère que des cellules rétinienne fonctionnelles peuvent être dérivées d'hiPSCs saines (Carr et al., 2009b).

### II.2.2.3.2 Perspective chez l'Homme

Théoriquement, les hiPSCs pourraient être utilisées en thérapie cellulaire comme le sont les CESH. Il faut pour cela maîtriser leur différenciation dans le phénotype d'intérêt souhaité, tout en respectant les BPFM à usage humain émis par l'ANSM. Enfin, il faut pouvoir administrer ces cellules de façon pertinente, par simple transfusion pour les maladies hématologiques, par injection dans l'organe lésé pour les maladies cardiaques ou neurologiques. Il est possible d'envisager de dériver des hiPSCs d'un patient, de les différencier dans le type cellulaire d'intérêt, de corriger ces cellules puis de les greffer au patient limitant ainsi les risques de rejet (**Figure 91**) (Kiskinis and Eggan, 2010).



**Figure 91** : thérapie cellulaire chez l'Homme basée sur les hiPSCs. La thérapie cellulaire régénérative avec des dérivés cellulaires d'hiPSCs saines peut avoir lieu après que les cellules malades aient été corrigées par des approches de thérapies géniques avant ou après la reprogrammation. Modifié de Kiskinis and Eggan, 2010.

Cette année l'équipe du Dr Gamm est la première à avoir réussi à dériver des hiPSCs de lymphocytes T sanguins et à avoir différencié ces hiPSCs en structure de type vésicules optiques (Phillips et al., 2012). Cette étude montre qu'une source de cellules somatiques aussi accessible que le sang peut permettre des études sur la rétine.

En conclusion, les hiPSCs ne sont pas prêtes à être utilisées immédiatement chez l'Homme pour la thérapie cellulaire (cf. [Limites de la reprogrammation directe](#)) cependant un groupe japonais de

l'institut RIKEN prévoit de débiter un premier essai clinique chez l'Homme, dès l'année 2013, analogue à ceux menés par Advanced Cell Technology avec les CSEh<sup>7</sup>.

D'importants efforts sont portés par la communauté scientifique pour minimiser l'impact de la reprogrammation (Gore et al., 2011; Hussein et al., 2011; Laurent et al., 2011; Lister et al., 2011; Mayshar et al., 2010) sur les cellules somatiques ainsi que pour caractériser ces cellules. L'utilisation de séquenceurs à ADN permettant de rechercher les éléments intégratifs dans plusieurs clones d'iPSCs en quelques heures pourrait permettre d'écarter les clones présentant des mutations insérées (Nakayama, 2009). Une autre équipe a récemment réussi à prévenir la formation de tératomes *in vitro* et *in vivo* en utilisant deux systèmes de gènes/drogues suicides (Zhong et al., 2011).

Enfin, la connaissance des génotypes des hiPSCs et le développement de banques nationales et internationales d'hiPSCs exprimant un large éventail de types d'HLA représentatifs de différentes populations ethniques devraient permettre une correspondance élevée entre les cellules des donneurs et les hôtes (Gourraud et al., 2012; Taylor et al., 2011).

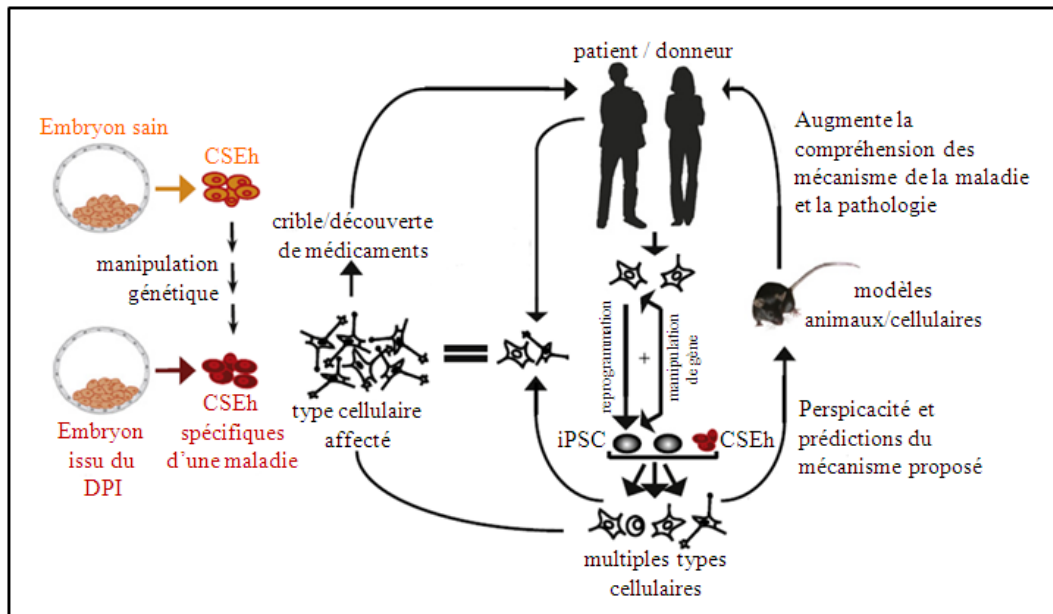
## **II.2.3 La modélisation pathologique**

### **II.2.3.1 Principe**

La modélisation pathologique consiste à étudier les mécanismes moléculaires et cellulaires physiopathologiques d'une maladie d'intérêt afin d'identifier une/des cible(s) thérapeutique(s). L'étude des maladies monogéniques peut se faire en utilisant des CSEh saines dans lesquelles on introduit une mutation par modification génétique, des CSEh porteuses de mutation causale d'une pathologie identifiée dans le cadre d'un DPI (Friedrich Ben-Nun and Benvenisty, 2006) ou encore par reprogrammation en hiPSCs de cellules somatiques de patients (**Figure 92**) (Colman and Dreesen, 2009).

---

<sup>7</sup> [www.blindness.org/blog/index.php/japanese-group-plans-induced-pluripotent-stem-cell-clinical-trial](http://www.blindness.org/blog/index.php/japanese-group-plans-induced-pluripotent-stem-cell-clinical-trial)



**Figure 92 : utilisation des hiPSCs et CSEh pour la modélisation pathologique et le développement de médicaments.** Les cellules pluripotentes porteuses d'une mutation liée à une maladie peuvent être des hiPSCs dérivées d'un échantillon tissulaire d'un patient, des CSEh isolées lors d'un diagnostic préimplantatoire (DPI) ou encore des CSEh, des hiPSCs ou des progéniteurs somatiques génétiquement modifiés. La différenciation de ces cellules pluripotentes peut être utilisée pour étudier l'apparition d'un phénotype pathologique *in vitro* ou pour cribler et développer de nouveaux médicaments. Modifié de Colman and Dreesen, 2009.

### II.2.3.2 Découverte de molécules médicaments

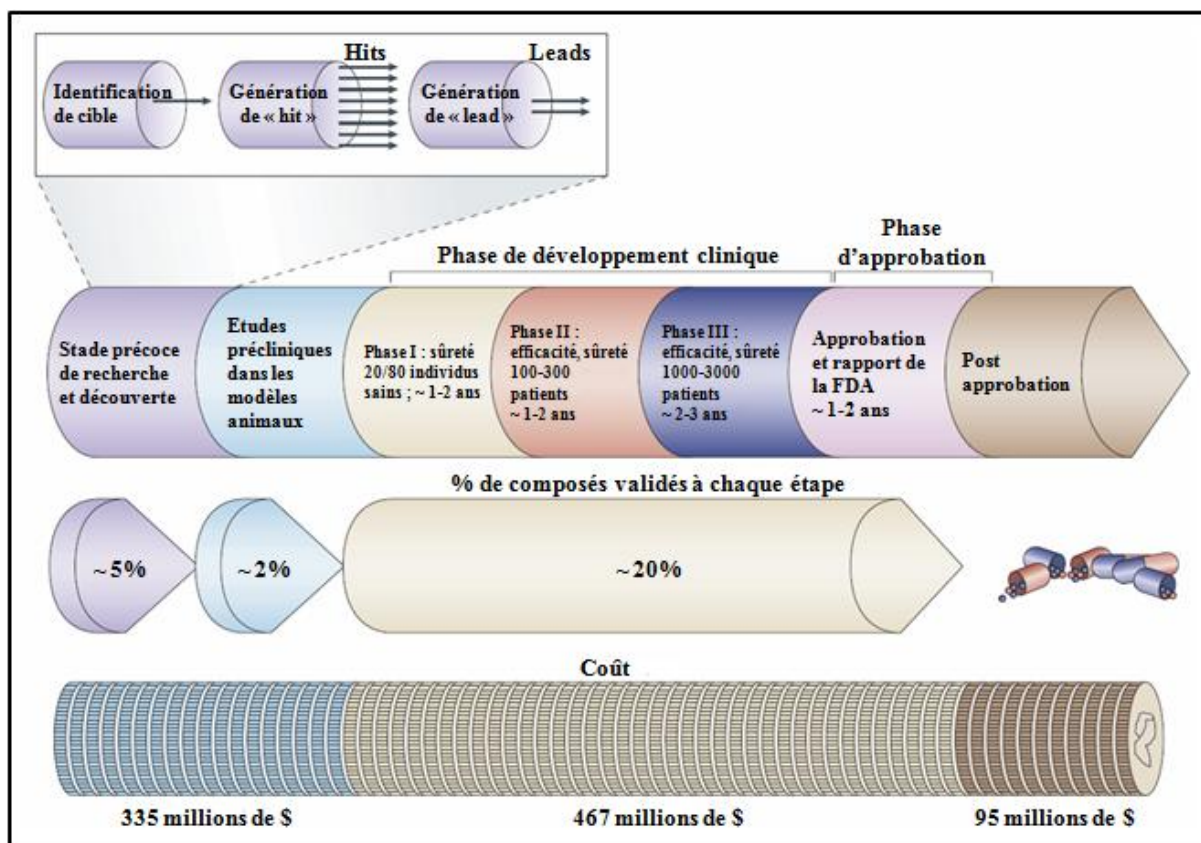
L'objectif principal de la recherche pharmacologique est de découvrir des molécules capables d'interagir avec la cible d'intérêt (protéines, autres molécules etc.) afin de mettre sur le marché de nouveaux médicaments. Ce processus est lent puisqu'il peut prendre jusqu'à 15 ans et est très onéreux. Différentes estimations existent (Figure 93) (DiMasi et al., 2003; Gilbert et al., 2003; Kola and Landis, 2004; O'Driscoll, 2004) :

- ♦ 1 million de dollars si l'on considère la période allant de 1983 à 2000 ;
- ♦ 2 milliards de dollars si l'on considère la période allant de 1997 à 2001.

Historiquement les industries pharmaceutiques ont ignoré le développement de médicaments pour les maladies rares en raison du faible retour sur investissement car on estime à 7000 le nombre de maladies rares dont 80% seraient d'origines génétiques ce qui concerne 30 millions de patients en Europe<sup>8</sup>. Les laboratoires de types académiques ont joué et jouent un grand rôle dans le développement de stratégies visant à découvrir des médicaments pour les maladies orphelines (Coles and Cloyd, 2012).

<sup>8</sup> <http://www.eurordis.org/about-rare-diseases>





**Figure 93 : pipeline du développement et de la découverte de médicaments.** Le parcours du concept initial au marché du médicament est long et il a statistiquement plus de chance d'aboutir à un échec qu'à un succès. Le temps moyen de mise sur le marché se situe autour de 12-15 ans et seulement 1 composé sur les 5000 du stade initial arrivera sur le marché. Ces chiffres varient selon le domaine de la maladie considérée. La plupart des échecs se produisent au niveau précoce (violet) ou préclinique (bleu ciel) mais étant donné que seulement 20% des composés testés chez l'Homme sont finalement validés, et que le coût moyen de développement d'un composé au stade clinique atteint plusieurs centaines de millions de dollars (\$), ces potentiels échecs doivent être détectés le plus précocement possible. Le point clé du début du pipeline est le processus de découverte du « hit » au « lead ». Le criblage haut débit (ou HTS pour *High-throughput screening*) couplé à des méthodes informatiques, peuvent permettre de rechercher, *in silico*, dans des bases de données de grande taille des composés candidats à tester. Les composés qui sont actifs contre les cibles visées sont appelés « hits ». Ils vont être évalués pour certaines propriétés biologiques et médicamenteuses comme l'intégrité chimique, le comportement fonctionnel et les relations structure/activité. Les nouvelles entités chimiques identifiées, possédant l'activité biologique désirée sont connues sous le nom de « lead ». Les coûts sont exprimés en \$ américains de l'année 2000. Traduit de O'Driscoll, 2004.

Les modèles les plus couramment utilisés *in vitro* sont des cellules primaires issues de patients, ou des lignées de cellules transformées ou immortalisées (Laustriat et al., 2010). Le premier modèle à l'avantage de représenter la pathologie mais n'est pas facile d'accès et les cellules primaires ne peuvent être maintenues à long terme en culture ce qui rend leur utilisation difficilement applicable aux rétinopathies comme l'ACL. Le deuxième modèle permet d'obtenir une grande quantité de



cellules mais qui présentent des modifications intrinsèques pouvant interférer avec les résultats obtenus. De ce fait ces modèles cellulaires permettent de découvrir des molécules potentiellement thérapeutiques qui sont par la suite abandonnées à cause de leur inefficacité et/ou de leur toxicité.

#### **II.2.3.2.1 Avantages des CSPh**

Les grands groupes pharmaceutiques sont à la recherche de modèles cellulaires plus proches de la réalité biologique qui permettent de mieux comprendre les mécanismes biologiques liés à l'action des molécules actives. Les CSPh, permettent de créer ce type de modèles qui présentent un double intérêt puisqu'ils sont stables, robustes et qu'ils permettent de ne recourir aux modèles animaux qu'en seconde intention (Cezar, 2007; Laustriat et al., 2009, 2010; McNeish, 2004). En effet, de par leurs propriétés fondamentales, les CSPh sont considérées comme une source cellulaire inépuisable permettant *a priori* d'être cultivée dans n'importe quel lignage quelque soit le stade de différenciation requis. Ces modèles permettent de tester des molécules pharmaceutiques nouvelles ou déjà commercialisées pour d'autres pathologies : test d'efficacité, d'hépatotoxicité et de cardiotoxicité etc. (Desbordes et al., 2008; Inoue and Yamanaka, 2011; Keller et al., 2012; Laustriat et al., 2010; McNeish et al., 2010; Seiler et al., 2011; Rubin and Haston, 2011; Zanella et al., 2010). Pour preuve le partenariat conclu en 2009 entre I-Stem et la société Roche pour le criblage des molécules de la firme sur les modèles cellulaires neuronaux développés à I-Stem<sup>9</sup>.

#### **II.2.3.2.2 Obtention de types cellulaires d'intérêt**

L'arrivée de la culture en trois dimensions permettrait de mimer des conditions *in vivo* ce qui pourrait mener à une meilleure différenciation des cellules dans les phénotypes d'intérêt comme pour les progéniteurs rétiniens (Nakano et al., 2012; Nistor et al., 2010), les CSM (Hosseinkhani et al., 2012), les hépatocytes (Zhang et al., 2012a) ou encore les neurones (Soman et al., 2012).

### **II.2.3.3 Utilisation des CSEh**

#### **II.2.3.3.1 Les CSEh saines génétiquement modifiées**

Modifier génétiquement des CSEh saines, permet de reproduire *in vitro* des lignées de CSEh porteuses d'une anomalie génétique qui aboutit à la maladie (Friedrich Ben-Nun and Benvenisty, 2006). Il est possible de produire une mutation dominante du type gain de fonction en introduisant une seule copie du gène malade, alors que pour une mutation récessive du type perte de fonction, il faut atteindre les 2 allèles du gène. Différentes méthodes sont utilisées pour créer ces modèles à savoir la recombinaison homologe (Urbach et al., 2004) et littéralement « le piège de gène » (ou *gene trap*) qui vont permettre d'insérer une mutation ou encore l'ARN interférence qui va au contraire éteindre l'expression d'un gène (Tenzen et al., 2010).

---

<sup>9</sup> [http://www.istem.eu/e\\_upload/pdf/i-stem\\_roche\\_press\\_release\\_290609.pdf](http://www.istem.eu/e_upload/pdf/i-stem_roche_press_release_290609.pdf)

Par recombinaison homologue il a ainsi été possible de créer un modèle cellulaire du syndrome de Lesch Nyhan en introduisant une mutation dans le gène *HPRT1* (pour hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1) (Urbach et al., 2004).

### II.2.3.3.2 Les CSEh naturellement porteuses de mutation

Les CSEh naturellement pathologiques proviennent de blastocystes écartés lors de FIV pour laquelle un DPI a été effectué (Aran et al., 2012). Le DPI est un acte encadré par la loi de bioéthique et autorisé par l'Agence de la Biomédecine. Ainsi, la loi n° 2011-814 du 7 juillet 2011 a modifié le Titre III : Diagnostic prénatal, DPI et échographie obstétricale et fœtale, au Chapitre Ier : Diagnostics anténataux : diagnostic prénatal et diagnostic préimplantatoire du code de la santé publique<sup>10</sup>. Il en résulte que « *Le diagnostic préimplantatoire n'est autorisé qu'à titre exceptionnel dans les conditions suivantes* » :

- ♦ « *... le couple, du fait de sa situation familiale, a une forte probabilité de donner naissance à un enfant atteint d'une maladie génétique d'une particulière gravité reconnue comme incurable au moment du diagnostic* » ;
- ♦ « *le diagnostic ne peut être effectué que lorsqu'a été préalablement et précisément identifiée, chez l'un des parents ou l'un de ses ascendants immédiats dans le cas d'une maladie gravement invalidante, à révélation tardive et mettant prématurément en jeu le pronostic vital, l'anomalie ou les anomalies responsables d'une telle maladie* » ;
- ♦ « *en cas de diagnostic sur un embryon de l'anomalie ou des anomalies responsables d'une des maladies mentionnées ... les deux membres du couple, s'ils confirment leur intention de ne pas poursuivre leur projet parental en ce qui concerne cet embryon, peuvent consentir à ce que celui-ci fasse l'objet d'une recherche...* ».

La loi du 7 juillet 2011 va plus loin puisqu'elle autorise à titre dérogatoire à l'article L2131-4-1<sup>11</sup> d'effectuer un DPI lorsque :

- ♦ « *le couple a donné naissance à un enfant atteint d'une maladie génétique entraînant la mort dès les premières années de la vie et reconnue comme incurable au moment du diagnostic* » ;
- ♦ « *le pronostic vital de cet enfant peut être amélioré, de façon décisive, par l'application sur celui-ci d'une thérapeutique ne portant pas atteinte à l'intégrité du corps de l'enfant né du transfert de l'embryon in utero...* » ;
- ♦ « *le diagnostic mentionné au premier alinéa a pour seuls objets de rechercher la maladie génétique ainsi que les moyens de la prévenir et de la traiter, d'une part, et de permettre l'application de la thérapeutique mentionnée ... d'autre part* ».

<sup>10</sup> [www.legifrance.gouv.fr/affichCodeArticle.do?cidTexte=LEGITEXT000006072665&idArticle=LEGIARTI000006687397&dateTexte=&categorieLien=cid](http://www.legifrance.gouv.fr/affichCodeArticle.do?cidTexte=LEGITEXT000006072665&idArticle=LEGIARTI000006687397&dateTexte=&categorieLien=cid)

<sup>11</sup> [www.legifrance.gouv.fr/affichCodeArticle.do?jsessionid=C4F53D64100783FC733A08A6972BB456.tpdjo17v\\_2?cidTexte=LEGITEXT000006072665&idArticle=LEGIARTI000006687399&dateTexte=20121018&categorieLien=cid#LEGIARTI000006687399](http://www.legifrance.gouv.fr/affichCodeArticle.do?jsessionid=C4F53D64100783FC733A08A6972BB456.tpdjo17v_2?cidTexte=LEGITEXT000006072665&idArticle=LEGIARTI000006687399&dateTexte=20121018&categorieLien=cid#LEGIARTI000006687399)

Le DPI, de par ses restrictions, concerne un nombre limité de pathologies. Il a permis de dériver notamment des CSEh porteuses de mutation causale de syndromes ou maladies rares (**Tableau 5**). Ces modèles cellulaires sont impliqués dans divers projets visant à explorer les mécanismes moléculaires menant à une pathologie particulière comme pour le syndrome du X-fragile (Eiges et al., 2007), la dystrophie myotonique de type 1 (ou DM1) ou la chorée de Huntington (ou HD) (Marteyn et al., 2011; Seriola et al., 2011; Sermon et al., 2009).

**Tableau 5 : exemples de CSEh issues de DPI.**

Pathologies	Références
Maladie de Huntington (HD)	Bradley et al., 2011
Syndrome du X fragile (X-fragile)	Eiges et al., 2007
Dystonie de torsion, Dystrophie musculaire de Duchenne (DMD), Dystrophie myotonique de type 1 (DM1), Insensibilité aux androgènes, Maladie de Gaucher, Syndromes d'Alport et de Saethre-Chotzen, X-fragile,	Frumkin et al., 2010
HD, DM1, Fibrose cystique (FC)	Mateizel et al., 2006
FC	Pickering et al., 2005
Ataxie spinocérébelleuse de type 2, Autoplasie endocrinienne multiple de type 2, FC, HD, Myopathie myotubulaire lié à l'X, Syndrome de Fabri, X-fragile,	Tropel et al., 2010
Adrenoleucodystrophie, Anémie de Fanconi, Complémentation du groupe A, Dystrophie musculaire de Becker, DMD, DM1, HD, Neurofibromatose de type I, Syndrome de Marfan, Thalassémie, X-fragile	Verlinsky et al., 2005

## II.2.3.4 Utilisation des hiPSCs

### II.2.3.4.1 État de l'art

Les hiPSCs de par leur origine permettent de s'affranchir des considérations éthiques concernant l'embryon et ouvrent le champ des maladies à modéliser (Saha and Jaenisch, 2009) qui ne peuvent pas être diagnostiquées lors d'un DPI ou qui sont d'origine génétique complexe comme la schizophrénie (Brennand et al., 2011; Chiang et al., 2011) ou la maladie d'Alzheimer (Israel et al., 2012; Yagi et al., 2011).

En effet, depuis leur découverte en 2007, de nombreuses équipes ont réussi à établir des lignées humaines porteuses de mutation génétique en reprogrammant principalement des fibroblastes humains. La première est celle du Dr Daley, qui a réalisée une banque d'hiPSCs de 10 maladies génétiques en utilisant des lentivirus porteurs des facteurs de transcription POU5F1, SOX2, KLF4 et c-MYC. Cette étude ne visait ni à différencier ces hiPSCs ni à identifier de corrélation phénotype/génotype mais simplement à établir la preuve de concept qu'il était possible de dériver des hiPSCs spécifiques d'une maladie donnée (Park et al., 2008a).

Globalement, les recherches ont consisté dans un premier temps à modéliser des maladies monogéniques se développant précocement chez l'enfant avant de se tourner vers des maladies à apparition plus tardive et d'origine génétique complexe (Mitchell, 2011). Concernant l'étude de pathologies neurologiques, certaines équipes ont pu établir des lignées d'hiPSCs porteuses de maladies neurodégénératives comme, par exemples, la sclérose latérale amyotrophique (ou ALS pour *Amyotrophic Lateral Sclerosis*) (Dimos et al., 2008), l'atrophie musculaire spinale (ou SMA pour *Spinal Muscular Atrophy*) (Ebert et al., 2009) et la dysautonomie familiale (Lee et al., 2009) ou de pathologies neuro-développementales telles que le syndrome de Rett (Hotta et al., 2009) et la schizophrénie quelle soit d'origine monogénique (Chiang et al., 2011) ou sporadique (Brennand et al., 2011) (**Tableau 6**).

**Tableau 6 : maladies neurologiques modélisées à partir d'hiPSCs.** Les phénotypes non décrits sont indiqués en gris. D'après Kunkanjanawan et al., 2011; Marchetto et al., 2011; Onder and Daley, 2012.

Pathologies	Mutations	Cellules générées	Phénotypes observés	Références
<b>APPARITION PRECOCE</b>				
Dysautonomie familiale	<i>IKBKAP</i> (autosomique récessive)	Cellules des crêtes neurales	Défaut de différenciation et de migration des cellules des crêtes neurales	Lee et al., 2009
Atrophie musculaire spinale	<i>SMN1</i> (autosomique récessive)	Neurones moteurs	Nombre et taille réduits des neurones moteurs, réduction de l'expression du gène <i>SMN</i>	Ebert et al., 2009
Ataxie de Friedreich	Expansion du nombre de motifs du trinuécléotide GAA-TTC dans le gène <i>FXN</i> (autosomique récessive)	Neurones périphériques et cardiomyocytes	Repression du gène <i>FXN</i> , Expression réduite de l'ARNm de <i>FXN</i>	Ku et al., 2010; Liu et al., 2011a
Syndrome de Rett	<i>MECP2</i> (sporadique, gonosomique dominante)	Neurones	Perte de synapses, densité spinale réduite, taille du soma plus petite	Cheung et al., 2011; Marchetto et al., 2010
Syndrome du X fragile	Expansion du nombre de motifs du trinuécléotide CGG dans le gène <i>FMR1</i> (prémuation, Billuart et al., 2005)	Neurones post-mitotiques et glie	Perte d'expression du gène <i>FMR1</i> , différenciation neuronale aberrante	Sheridan et al., 2011; Urbach et al., 2010

- suite du **tableau 6** -

Pathologies	Mutations	Cellules générées	Phénotypes observés	Références
<b>APPARITION TARDIVE</b>				
Slérose latérale amyotrophique	<i>SOD1</i> (autosomique dominante)	Neurones moteurs		Dimos et al., 2008
	<i>VAPB</i> (autosomique dominante)		Niveau d'expression de la protéine VAPB réduit dans les neurones moteurs mais pas d'agrégats	Mitne-Neto et al., 2011
Maladie de Huntington	Expansion du nombre de motifs du trinuécléotide CAG dans le gène <i>HTT</i> (autosomique récessive)	Neurones striataux		An et al., 2012; Park et al., 2008a
Maladie de Parkinson	Sporadique (inconnue)	Neurones dopaminergiques		Hargus et al., 2010; Park et al., 2008a; Soldner et al., 2009; Swistowski et al., 2010
	<i>LRRK2</i> (Lesage et al., 2006) (familiale, autosomique dominante)		Neurones sensibles au stress oxydatif	Nguyen et al., 2011
	<i>PINK1</i> (familiale, autosomique récessive)		Altération de la fonction mitochondriale dans les neurones dopaminergiques	Seibler et al., 2011
	triplication de <i>SNCA</i> (familiale, autosomique dominante)		Augmentation de la protéine $\alpha$ -synucléine dans les neurones	Devine et al., 2011
Maladie d'Alzheimers	Sporadique (inconnue)	Neurones	Une des 2 lignées présente les phénotypes des malades	Israel et al., 2012
	<i>PS1 / PS2</i> ou duplication d' <i>APP</i> (familiale, autosomique dominante)		Augmentation de la sécrétion A $\beta$ 42, hauts niveaux des marqueurs pathologiques A $\beta$ 40, phosphau-tau (Thr 231) et aGSK-3 $\beta$ (pour <i>active glycogen synthase kinase-3b</i> )	Israel et al., 2012; Yagi et al., 2011
Schizophrénie	Sporadique (inconnue)	Neurones	Diminutions de la connectivité neuronale, du nombre de neurites, de la protéine PSD95 et des récepteurs au glutamate	Brennand et al., 2011
	<i>DISC1</i> (susceptibilité)			Chiang et al., 2011

Ce domaine en plein essor permet de disposer, à l'heure actuelle, d'hiPSCs spécifiques de près d'une soixantaine de maladies héréditaires ou sporadiques (Onder and Daley, 2012; Tanaka et al.,

2012) qui peuvent désormais être étudiées *in vitro*. Cependant, pour nombre d'entre elles, un phénotype associé à la pathologie n'a pu être observé (Onder and Daley, 2012).

#### II.2.3.4.2 Maladies rétinienne

##### II.2.3.4.2.1 L'atrophie gyrée chorio-rétinienne

L'équipe du Dr Gamm est la première à avoir réalisé de la modélisation pathologique d'une pathologie rétinienne à partir d'hiPSCs dérivées d'un patient atteint d'atrophie gyrée chorio-rétinienne (ou GA) (Figure 94) (Meyer et al., 2011). Cette maladie, à transmission autosomique récessive, est associée à une anomalie métabolique générale consistant en un déficit congénital en ornithine- $\delta$ -transférase (ou OAT) (Heinänen et al., 1998). Cette enzyme est dépendante de la vitamine B6 c'est pourquoi un des traitements envisagés pour les patients est une alimentation supplémentée en vitamine B6 et en proline (Hayasaka et al., 1985). Par ailleurs, elle est fortement exprimée au niveau des cellules de l'EPR (Ueda et al., 1998).

Les cellules de l'EPR établies à partir de ces hiPSCs pathologiques ont une activité OAT particulièrement réduite (Figure 94a) qui peut être restaurée suite à l'application d'une forte dose de vitamine B6 (600 $\mu$ M) (Figure 94b) bien que les informations recueillies auprès du patient indiquaient qu'il n'était pas sensible au traitement par cette même vitamine. Le résultat principal de cette étude montre donc que cet effet bénéfique de la vitamine B6, présent au niveau de l'EPR, a pu être considéré comme inefficace en raison de méthodes d'évaluation non appropriées. En effet, les tests directs d'efficacité de la vitamine B6 sur des cellules de l'EPR provenant de patients atteints de GA ont jusqu'ici été impossibles à réaliser. Enfin, la correction du gène *OAT* dans ces hiPSCs par recombinaison homologe sans introduire de nouvelles mutations chez ces hiPSCs (Howden et al., 2011) permet également de restaurer la fonction de l'enzyme sans qu'il y ait besoin d'un ajout de vitamine B6 (Figure 94c).

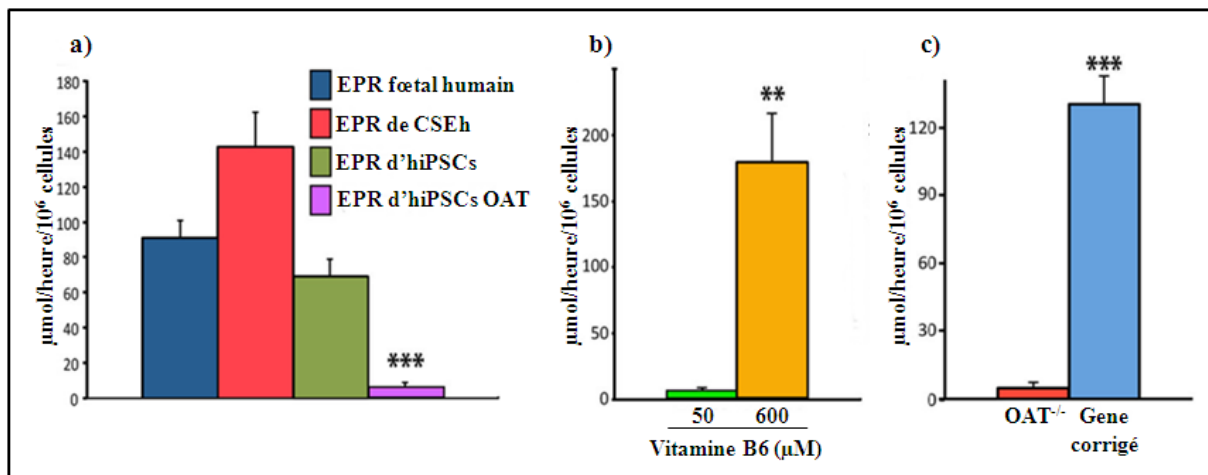


Figure 94 : test des hiPSCs dérivées d'un patient atteint de GA. a) l'activité OAT chez les cellules de l'EPR dérivées d'hiPSCs pathologiques (hiPSCs OAT) est significativement plus faible que dans les cellules de l'EPR

prénatal, les cellules de l'EPR dérivées de CSEh ou d'hiPSCs saines ; b) l'activité enzymatique de l'OAT chez les hiPSCs OAT peut être restaurée en présence de 600µM de vitamine B6 ou c) suivant la réparation du gène par recombinaison homologue. Avec \*\* : p<0,05% et \*\*\* : p<0,01%. Les résultats présentés sont représentatifs de trois expériences indépendantes. Adapté de (Meyer et al., 2011).

Enfin pour tester la fonctionnalité des cellules de l'EPR d'une nouvelle manière, les cellules ont été exposées à de l'ATP qui permet de réguler les flux à travers l'EPR en permettant notamment la production de Ca<sup>2+</sup> intracellulaire. Les résultats obtenus à partir de cellules de l'EPR dérivées de CSEh ou d'hiPSCs montrent que la réponse de ces cellules est analogue aux réponses émises par les cellules de l'EPR prénatales humaines mises en culture, ce qui tend à prouver le caractère immature des cellules de l'EPR.

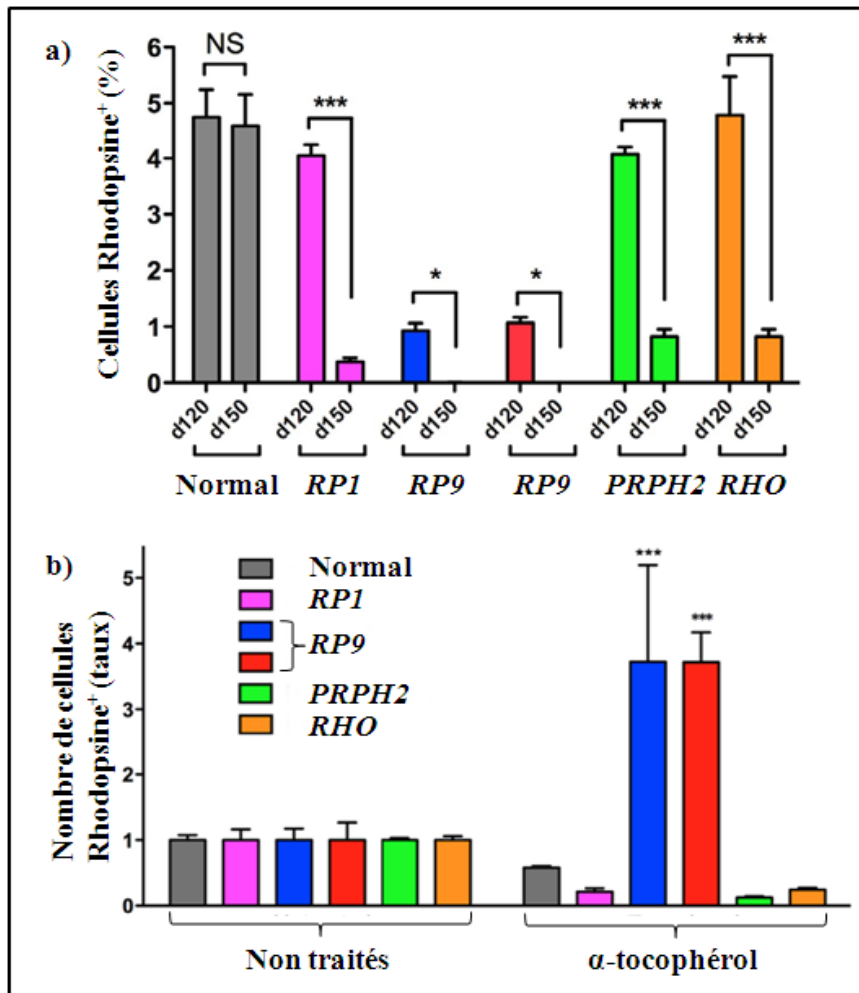
Cette étude établit la preuve que des hiPSCs pathologiques peuvent être employées pour corriger des défauts fonctionnels grâce des approches pharmacologiques et génétiques.

#### **II.2.3.4.2.2 La rétinite pigmentaire**

En dérivant des photorécepteurs d'hiPSCs issues de fibroblastes de 5 patients ayant des mutations des gènes *RPI* (pour retinitis pigmentosa 1 (autosomal dominant)), *RP9* (pour retinitis pigmentosa 9 (autosomal dominant)), *PRPH2* (pour peripherin 2 (retinal degeneration, slow)) ou *RHO* (pour rhodopsin), une dégénérescence des photorécepteurs exprimant la rhodopsine, caractéristique des cellules de type bâtonnets, a pu être observée après 120 à 150 jours de différenciation (**Figure 95a**). Cette dégénérescence des bâtonnets est retrouvée chez les patients ce qui prouve que ces hiPSCs spécifiques de certaines formes de RP sont capables d'exprimer un phénotype présent chez les malades (Jin et al., 2011). Par ailleurs, le traitement par l' $\alpha$ -tocophérol, l'acide ascorbique ou le  $\beta$ -carotène dès 120 jours de différenciation a montré que l' $\alpha$ -tocophérol est le plus efficace des ces trois antioxydants pour préserver les bâtonnets chez les patients ayant une mutation du gène *RP9* (**Figure 95b**) (Jin et al., 2011).

Cette découverte confirme que les hiPSCs peuvent permettre de tester des médicaments candidats afin de trouver des thérapeutiques pertinentes et qu'elles peuvent également permettre d'étudier une maladie causée par différentes mutations.





**Figure 95 : modélisation pathologique de certaines formes de rétinopathie pigmentaire (RP) basée sur les hiPSCs porteuses de mutation.** a) les bâtonnets (cellules Rhodopsine<sup>+</sup>) dérivés de patients atteints par la RP subissent une dégénérescence *in vitro*. Le pourcentage de cellules Rhodopsin<sup>+</sup> a été évalué à 120 et 150 jours de différenciation. Les données proviennent de trois lignées indépendantes d’hiPSCs dérivées des patients ; b) Le traitement par l’ $\alpha$ -tocophérol a produit un effet bénéfique dans les cellules mutantes RP9. Les données représentent 1 à 2 lignées d’hiPSCs sélectionnées pour chaque patient. Modifié de Jin et al., 2011.

## II.3 L’amaurose congénitale de Leber

### II.3.1 Découverte et description

L’amaurose congénitale de Leber (ou ACL, MIM 204000/204100) a été décrite pour la première fois en 1869 par Théodor Leber. Cette description classait l’ACL dans le groupe des RP, présentant une forme sévère avec une perte pratiquement complète de la vision ainsi qu’une composante héréditaire. L’ACL est une maladie rétinienne cliniquement hétérogène (Camuzat et al., 1996a) qui est responsable de cécité ou de malvoyance profonde néonatale ou périnatale qui s’accompagne d’une perte visuelle profonde, de mouvements involontaires des yeux (nystagmus), de réflexes pupillaires pauvres et soit d’une rétine normale soit de divers degrés d’atrophie et des changements pigmentaires

(Leber, 1869b). Il a fallu attendre 1954 pour que les Drs Franceschetti et Ditterle mesurent une activité électrorétinographique profondément altérée ou inexistante pour faire de ce critère la distinction entre l'ACL et les autres RP (FRANCESCHETTI and DIETERLE, 1954).

L'ACL est une maladie rare puisqu'elle touche au niveau mondial 1 naissance sur 30 000 à 1 naissance sur 81000 (Den Hollander et al., 2008; den Hollander et al., 2010; Stone, 2007). Elle représente plus de 5% des dystrophies rétiniennes héréditaires (Kaplan et al., 1990) et se retrouve à hauteur de 20% chez les enfants fréquentant les écoles d'aveugles à travers le monde (Jay, 1987; Phillips et al., 1987).

### II.3.2 Les différentes formes d'ACL

Avec l'avènement de la génétique, il a été possible de rechercher précisément les gènes à l'origine de cette pathologie. Il en résulte que l'ACL est une maladie génétique généralement transmise selon le mode autosomique récessif même si quelques cas de transmission dominante ont été répertoriés pour les gènes *CRX*, *IMPDH1* (LCA11, mutation sur le chromosome 7q32.1) et *OTX2* (Henderson et al., 2009; Jordan et al., 1993; Nichols et al., 2010; Sohocki et al., 2001). Les 15 gènes impliqués dans le mode de transmission récessif sont regroupés sur le site Internet de référence OMIM<sup>12</sup> (**Tableau 7**) (pour *Online Mendelian Inheritance in Man*). Deux gènes, également à transmission récessive, ont été recensés dernièrement sur le site du réseau d'informations rétiniennes RetNet<sup>TM</sup><sup>13</sup> (**Tableau 7**).

Les génotypages ont lieu dans des familles indépendantes généralement à forte consanguinité et montre que cette consanguinité favorise la transmission conjointe d'allèle muté (Hanein et al., 2005; Mataftsi et al., 2007; Preising et al., 2012; Rezaie et al., 2007; Wang et al., 2011). Les mutations sont sporadiques même si un effet fondateur, remontant à 150 générations, a pu être décrit en Finlande pour le gène *GUCY2D*. En effet, une mutation identique de ce gène a été retrouvée dans trois familles non apparentées et non consanguines (Hanein et al., 2002).

L'ACL est une pathologie isolée (non syndromique) c'est-à-dire qu'elle atteint uniquement l'œil et non d'autres organes et/ou fonctions cependant des mutations des gènes *LCA5*, *CEP290* et *IQCB1* peuvent entraîner une grande variété de phénotypes qui vont de la dégénérescence rétinienne non syndromique, l'ACL, à des désordres pléiotropiques comme, par exemples, les syndrômes de Senior-Loken (néphrophtise, Ronquillo et al., 2012), Bardet-Bield (obésité, polydactylie, anomalies rénales pouvant conduire à la mort de l'individu, Waters and Beales, 2003) et de Meckel-Grüber (anomalies du système nerveux central, polydactylie, létal, Frank et al., 2008) (Coppieters et al., 2010; Perrault et al., 2010).

---

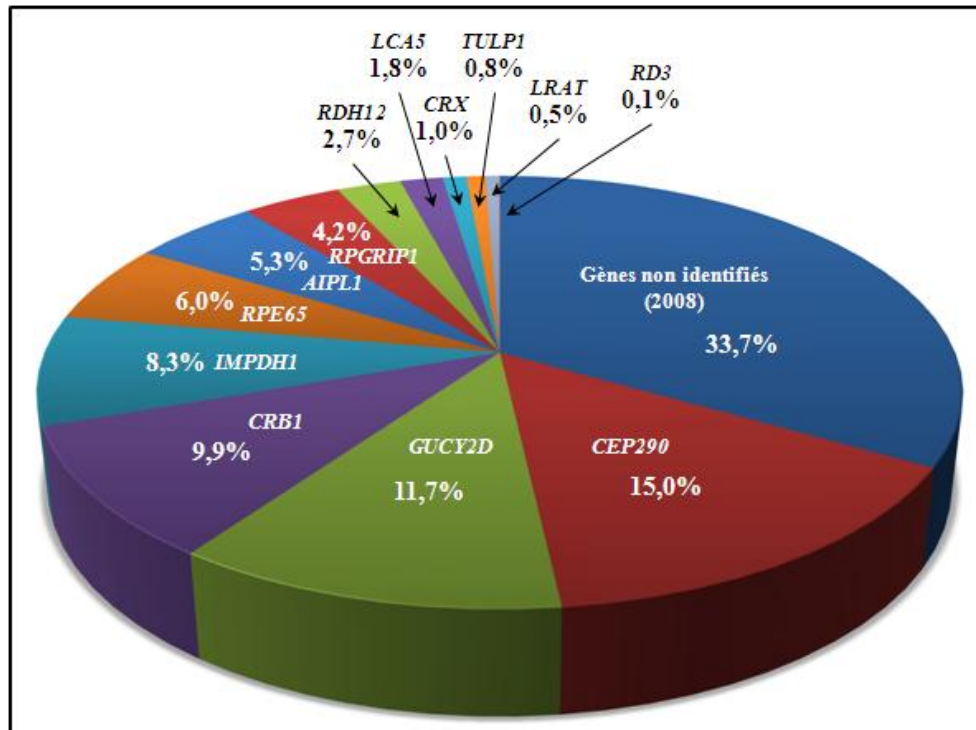
<sup>12</sup> <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/>

<sup>13</sup> <https://sph.uth.tmc.edu/retnet/home.htm>

**Tableau 7 : les formes d'ACL ayant un mode de transmission récessif.**

Symbole	Gène muté	Chromosome	Rôle	Références
LCA1	<i>GUCY2D</i>	17p13.1	Cascade phototransduction : GTP→GMPc	Camuzat et al., 1995, 1996a; Lotery et al., 2000; Perrault et al., 1996
LCA2	<i>RPE65</i>	1p31.2	Régénération vitamine A, concours : ArRE→11cROL	Lotery et al., 2000; Marlhens et al., 1997; Morimura et al., 1998
LCA3	<i>SPATA7</i>	14q31.3	Impliqué dans le fonctionnement normal de la rétine plutôt que dans son développement	Perrault et al., 2010; Stockton et al., 1998; Wang et al., 2009
LCA4	<i>AIPL1</i>	17p13.2	Chaperonne les protéines farnesylées ( <b>Den Hollander et al., 2010</b> ), développement des photorécepteurs (P) ( <b>Van der Spuy et al., 2003</b> )	Hameed et al., 2000; Sohocki et al., 1999, 2000
LCA5	<i>LCA5</i>	6q14.1	La lebercilline agit au niveau du cil connecteur des P ( <b>Den Hollander et al., 2010</b> )	Dharmaraj et al., 2000a; den Hollander et al., 2007
LCA6	<i>RPGRIP1</i>	14q11.2	Inconnu, au niveau du cil connecteur des P ( <b>Den Hollander et al., 2010</b> ) et morphogénèse des disques des P (Zhao et al., 2003)	Dryja et al., 2001; Hanein et al., 2004
LCA7	<i>CRX</i>	19q13.32	Développement embryonnaire : élongation SEP + phototransduction	Freund et al., 1998; Hanein et al., 2004; Swaroop et al., 1999
LCA8	<i>CRB1</i>	1q31.3	Détermination et maintien de l'architecture des P (Izaddoost et al., 2002; Pellikka et al., 2002)	Den Hollander et al., 1999; den Hollander et al., 2001; Lotery et al., 2001
LCA9	<i>NMNAT1</i>	1p36	Inconnu, au niveau du cil connecteur des P ( <b>Den Hollander et al., 2010</b> ), enzyme limitant le taux de NAD <sup>+</sup> = neuroprotection (Verghese et al., 2011; Zhao et al., 2011)	Chiang et al., 2012; Falk et al., 2012; Keen et al., 2003; Koenekoop et al., 2012; Perrault et al., 2012
LCA10	<i>CEP290</i>	12q21.32	Inconnu au niveau du cil connecteur des P ( <b>Den Hollander et al., 2010</b> )	den Hollander et al., 2006
LCA12	<i>RD3</i>	1q32.3	Protéine impliquée dans la transcription et l'épissage	Chang et al., 1993; Friedman et al., 2006
LCA13	<i>RDH12</i>	14q24.1	Régénération vitamine A : ArRAL→ArROL, 11cROL→11cRAL (Haeseleer et al., 2002; McBee et al., 2001)	Janecke et al., 2004; Perrault et al., 2004
LCA14	<i>LRAT</i>	4q32.1	Régénération vitamine A : ArROL→ArRE, 11cROL→11cRE	Thompson et al., 2001; Ruiz et al., 2001
LCA15	<i>TULP1</i>	6p21.31	Transport rhodopsine du SI au SE (Haeseleer et al., 2002; Hagstrom et al., 2012)	Banerjee et al., 1998; Knowles et al., 1994; Gu et al., 1998
LCA16	<i>KCNJ13</i>	2q37.1	Développement et maintien de la rétine grâce aux canaux potassiques	Sergouniotis et al., 2011
?	<i>CABP4</i>	11q13.1	Fonction synaptique probablement par la régulation du Ca <sup>2+</sup> entrant et le relâchement du glutamate par les P (Haeseleer et al., 2004)	Aldahmesh et al., 2010; Littink et al., 2009; Zeitz et al., 2006
?	<i>IQCB1</i>	3q13.33	Régule le transport de molécules du cil au SE du P	Estrada-Cuzcano et al., 2011

L'ensemble des gènes identifiés, en 2008, ne couvrent que 70% des patients atteints d'ACL (**Figure 96**). Depuis cet état des lieux, d'autres mutations sur les gènes *SPATA7*, *NMNAT1*, *KCNJ13*, *CABP4*, et *IQCBI* ont été identifiées. Ces mutations représentent une fraction des 30% des mutations alors inconnues en 2008 cependant de nouvelles investigations sont nécessaires pour découvrir les autres mutations liées à l'ACL pour pouvoir étudier les mécanismes moléculaires sous-tendant la maladie afin de mettre au point des thérapeutiques pertinentes (Den Hollander et al., 2008; den Hollander et al., 2010).



**Figure 96** : prévalence des gènes associés à l'ACL en 2008. Les gènes *CEP290* (15%), *GUCY2D* (11,7%) et *CRB1* (9,9%) sont les gènes les plus fréquemment mutés alors que 30% des mutations sont inconnues. D'après Den Hollander et al., 2008.

Il est possible depuis quelques années de détecter la mutation spécifique affectant une personne en utilisant des puces qui contiennent les variants répertoriés. En 2005, une puce qui contenait plus de 300 variants de la maladie a été mise au point (Yzer et al., 2006; Zernant et al., 2005). Plus récemment, la société Asper Biotech, qui est une compagnie réalisant du diagnostic génétique, a proposé une puce contenant, au début de la réalisation de ces travaux de thèse, 641 variants identifiés dans les formes d'ACL suivantes : LCA1 à LCA8, LCA10, LCA13 à LCA15 ; ou dans les RP précoces. A l'heure actuelle, la puce contient 780 variants<sup>14</sup> des ACL 1 à 8, 10 et 12 à 15 et du gène *IQCBI*.

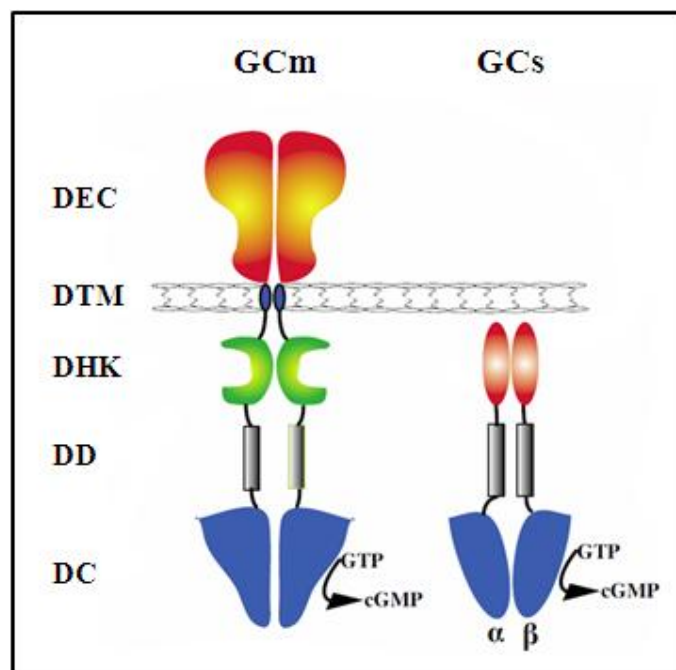
<sup>14</sup> <http://www.asperbio.com/genetic-tests/panel-of-genetic-tests/leber-congenital-amaurosis-lca>

### II.3.3 Mécanismes moléculaires de la maladie

De part la forte hétérogénéité génétique à l'origine de l'ACL, seules seront détaillées dans la suite de ce manuscrit, les formes 1 et 2 qui concernent respectivement les mutations des gènes *GUCY2D* et *RPE65* pour lesquelles des corrélations avec la sévérité de la maladie ont été établies (Dharmaraj et al., 2000a, 2000b; Perrault et al., 1999b, 1999a).

#### II.3.3.1 Phototransduction

Comme nous l'avons vu précédemment, les GC catalysent la production de GMPc à partir du GTP (Dizhoor, 2000). Elles peuvent être membranaires ou solubles (**Figure 97**).

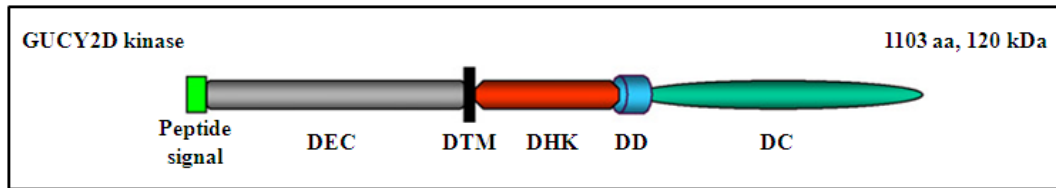


**Figure 97** : structures générales des guanylates cyclases membranaire (GCm) et soluble (GCs). Avec, DEC : domaine extra-cellulaire, DTM : domaine trans-membranaire, DHK : domaine d'homologie kinase, DD : domaine de dimérisation, DC : domaine catalytique. Modifié de Fitzpatrick et al., 2006.

Les GC membranaires sont des récepteurs de surface qui ont une structure commune composée d'un site de fixation au ligand extracellulaire, d'une unique partie traversant la membrane, d'une région intracellulaire comprenant un domaine de type protéine kinase et un domaine catalytique (Fitzpatrick et al., 2006; Garbers and Lowe, 1994, 1994; Karan et al., 2010).

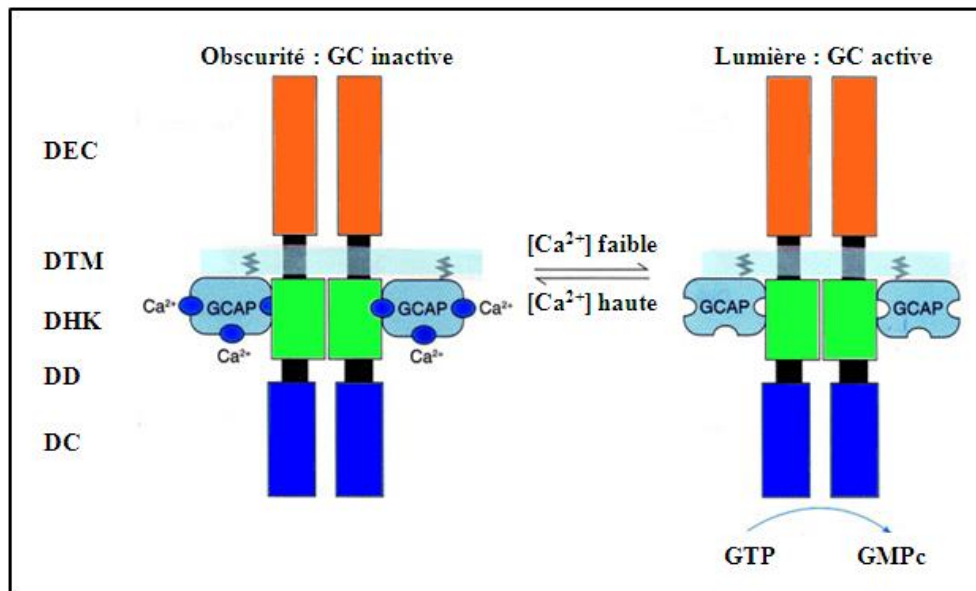
Les GC membranaires, spécifiques de l'œil, sont codées par les gènes *GUCY2D* (ou *RETGC-1*) et *GUCY2E* (ou *RETGC-2*) qui ont été localisés respectivement sur les chromosomes 17p13.1 et 11q13.5 (Camuzat et al., 1995, 1996b; Lowe et al., 1995; Oliveira et al., 1994; Shyjan et al., 1992). Ces gènes sont homologues aux gènes *Gucy2e* et *Gucy2f* du rat et de la souris (Yang et al., 1995; Yang and Garbers, 1997).

Le gène *GUCY2D* (pour guanylate cyclase 2D, membrane (retina-specific)) comme son nom l'indique est exprimé spécifiquement au niveau de la rétine. Il code une protéine de 1103 acides aminés (120kDa) (**Figure 98**) dont l'absence équivaut à une exposition continue à la lumière durant le développement des photorécepteurs (Perrault et al., 2000).



**Figure 98 : structure de la protéine GUCY2D.** Avec, DEC : domaine extra-cellulaire, DTM : domaine trans-membranaire, DHK : domaine d'homologie kinase, DD : domaine de dimérisation, DC : domaine catalytique. Modifié de den Hollander et al., 2008.

Ainsi, il n'est pas possible de revenir au niveau basal du GMPc dans les cônes et les bâtonnets ce qui empêche la cascade de phototransduction de fonctionner (**Figure 99**).



**Figure 99 : rôle de la GUCY2D.** Avec DEC : domaine extra-cellulaire, DTM : domaine trans-membranaire, DHK : domaine d'homologie kinase, DD : domaine de dimérisation, DC : domaine catalytique. Dans l'obscurité, les ions  $Ca^{2+}$  fixés au GCAP vont inhiber la synthèse de GMPc par les GUCY2D. En présence de lumière, le taux d'ions  $Ca^{2+}$  chute ce qui lève l'inhibition, le GMPc peut être synthétisé par la GUCY2D à partir du GTP. Modifié de Polans et al., 1996.

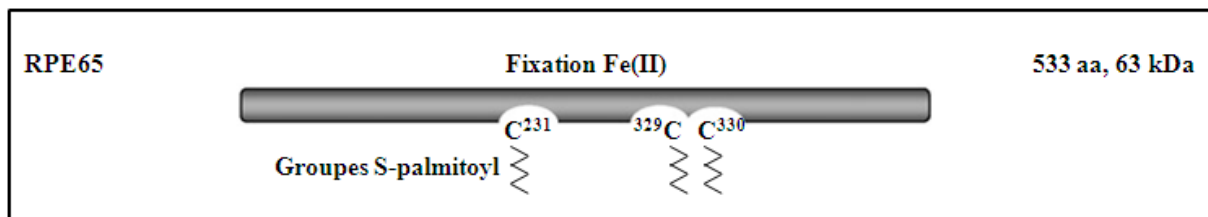
Les mutations du gène *GUCY2D*, recensées au nombre de 130 sur le site Internet The Human Gene Mutation Database<sup>15</sup>, causent les formes les plus sévères d'ACL (Perrault et al., 1999b). Elles peuvent même conduire à une absence complète des SE des photorécepteurs (Milam et al., 2003).

<sup>15</sup> <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>

### II.3.3.2 Cycle de l'acide rétinoïque

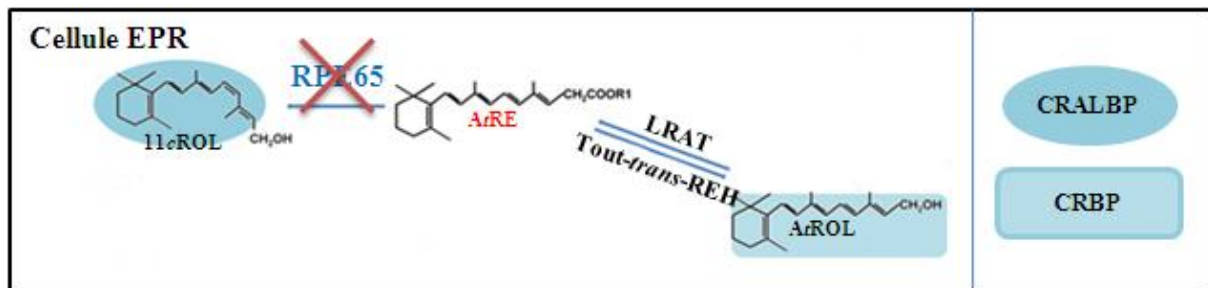
Le gène *RPE65* a été découvert grâce à la protéine qu'il code qui se trouve très présente au niveau de l'EPR et qui est responsable du métabolisme de la vitamine A (Redmond et al., 1998). Des études divergent à ce sujet (Hemati et al., 2005), mais RPE65 pourrait également être exprimée au niveau des cônes de la RN (Wenzel et al., 2007; Znoiko et al., 2002). Elle se retrouve par ailleurs majoritairement exprimée au niveau de la rétine centrale de macaques (Jacobson et al., 2007).

C'est une protéine de 553 acides aminés (63kD) (**Figure 100**) (Jin et al., 2005; Moiseyev et al., 2005, 2006; Redmond et al., 2005) qui partage 4 résidus histidine en commun avec les membres de la famille des caroténoïdes désoxygénases (Poliakov et al., 2005).



**Figure 100** : structure de la protéine RPE65. De (Den Hollander et al., 2008).

Son absence va empêcher l'isomérisation de l'AtROL en 11cROL et provoquer l'accumulation de AtROL sous forme d'esters AtRE (**Figure 101**).

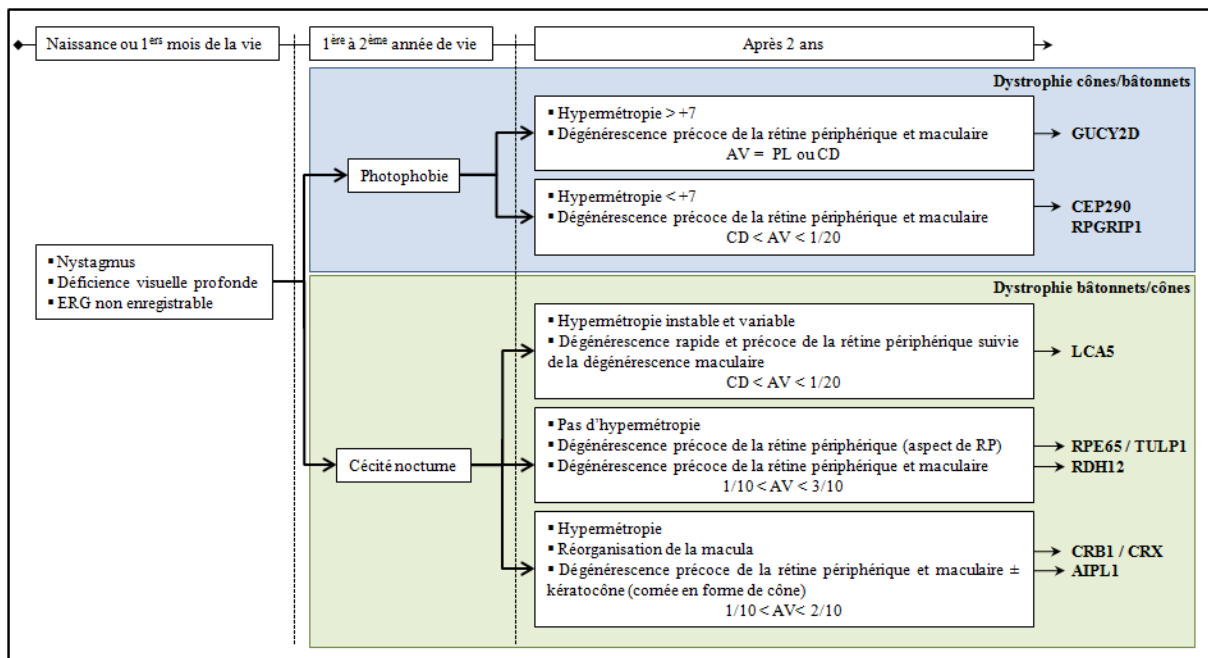


**Figure 101** : rôle de RPE65 dans la régénération de la vitamine A. L'absence de la protéine RPE65 empêche la transformation de l'AtROL en 11cROL. Modifié de Wang and Kefalov, 2009.

L'opsine non liée au 11cRAL provoque une cascade de phototransduction constitutivement active ce qui se traduit par la production massive de GMPc qui va être hydrolysé par les PDE, ce qui va entraîner la même pénurie de GMPc que chez les patients atteints de mutations du gène *GUCY2D*.

Les mutations du gène *RPE65* entraînent un phénotype moins sévère que celles du gène *GUCY2D*. La progression de la maladie se fait en atteignant tout d'abord l'EPR puis les cônes. Il subsiste une vision résiduelle par les bâtonnets ce qui peut permettre de mettre en place des thérapeutiques (Seeliger et al., 2001). Enfin, malgré un état équivalent à une exposition continue à la lumière chez les patients atteints de mutations des gènes *GUCY2D* ou *RPE65*, les phénotypes observés chez les patients divergent sans que l'on connaisse à ce jour pourquoi (**Figure 102**) (Kaplan, 2008).





**Figure 102 : corrélations genotype-phénotype de l'ACL.** L'ACL peut être divisée en une dystrophie congénitale stationnaire des cônes/bâtonnets (bleu) et une rétinite pigmentaire sévère d'apparition précoce (vert) en fonction du comportement à la lumière, des données de réfraction, de l'aspect de la rétine et de l'acuité visuelle (AV). Avec, PL : perception de la lumière, CD : capacité de compter ses doigts, RP : rétinite pigmentaire. Adapté de Kaplan, 2008.

## II.3.4 Modèles animaux

### II.3.4.1 Historique

Le domaine de la modélisation animale a connu un plein essor dès les années 80 avec l'avènement de la génétique (Gachelin, 2008). La notion d'« animal expérimental » a peu à peu laissé place au « modèle animal de maladies humaines » grâce à la transgénèse animale et à la recombinaison homologe chez la souris qui ont permis de créer des animaux modèles de pathologies humaines (Gayon, 2006). Selon l'*American National Research Council*, les animaux doivent permettre (Committee on New and Emerging Models in Biomedical and Behavioral Research, Institute for Laboratory Animal Research, Commission on Life Sciences, National Research Council, 1998) :

- ♦ l'étude des données de référence sur la biologie ou le comportement ;
- ♦ d'étudier un processus pathologique spontané ou induit, celui-ci ayant un ou plusieurs aspects communs avec un phénomène équivalent chez l'humain ou d'autres espèces animales.

Ces modèles répondent au besoin d'investigations poussées dans des conditions de laboratoires contrôlées afin de rechercher des mécanismes physiopathologiques et d'étudier de nouvelles méthodes de diagnostics ou thérapeutiques.

Pour les approches thérapeutiques des maladies rétinienne, ils vont permettre d'évaluer :

- ♦ le remplacement d'un gène ou l'introduction d'une molécule médicament (Smith et al., 2009) ;
- ♦ de nouvelles approches génétiques telles que les petits ARN interférents (ou siARN) (Gorbatyuk et al., 2007) ;
- ♦ la thérapie cellulaire par l'utilisation de CS (Comyn et al., 2010) ;
- ♦ l'intervention chirurgicale telle que la mise en place d'implants (Aramant and Seiler, 2004) ;
- ♦ les prothèses oculaires/rétiniennes (Dowling, 2009).

#### **II.3.4.2      L'ACL de type 1**

Le modèle murin de l'ACL de type 1 a été créé par knockout en recombinaison homologue du gène *Gucy2e* (ou *GUCY2D* chez l'Homme) cependant il ne récapitule pas complètement le phénotype humain puisque les cônes disparaissent 5 semaines après la naissance alors que les bâtonnets restent capables de répondre aux stimuli lumineux sous forme d'ERG. Ce modèle est donc plus proche d'une dystrophie des cônes que de l'ACL de type 1 (Yang et al., 1999b).

Le second modèle animal de l'ACL de type 1 est le poulet rd. Son gène *GUCY1B* est orthologue au gène *GUCY2D* humain. Une délétion naturelle de 22 kilobases (ou kb) chez le poulet rouge Rhode-Island cause une forme de dégénérescence rétinienne (Semple-Rowland et al., 1998). La dystrophie rétinienne débute dans la région centrale et se propage peu à peu en périphérie et il n'y pas de réponse enregistrée à l'ERG (Ulshafer et al., 1984; Ulshafer and Allen, 1985a, 1985b). Ces poulets ont un faible taux de GMPc reproduisant une exposition continue à la lumière tout comme chez l'Homme et peuvent de ce fait être un bon modèle de l'ACL de type 1.

#### **II.3.4.3      L'ACL de type 2**

Pour l'ACL de type 2, il existe un modèle de souris créé par knockout en recombinaison homologue du gène *Rpe65* qui mime la pathologie humaine puisqu'il présente une perte sévère des bâtonnets et une survie des cônes (Redmond et al., 1998). Un second modèle naturel de la maladie a été décrit en 2005, le gène muté se nomme *Rpe65<sup>rd12</sup>*. Ce modèle permet de voir l'accumulation des esters au niveau de l'EPR (Pang et al., 2006).

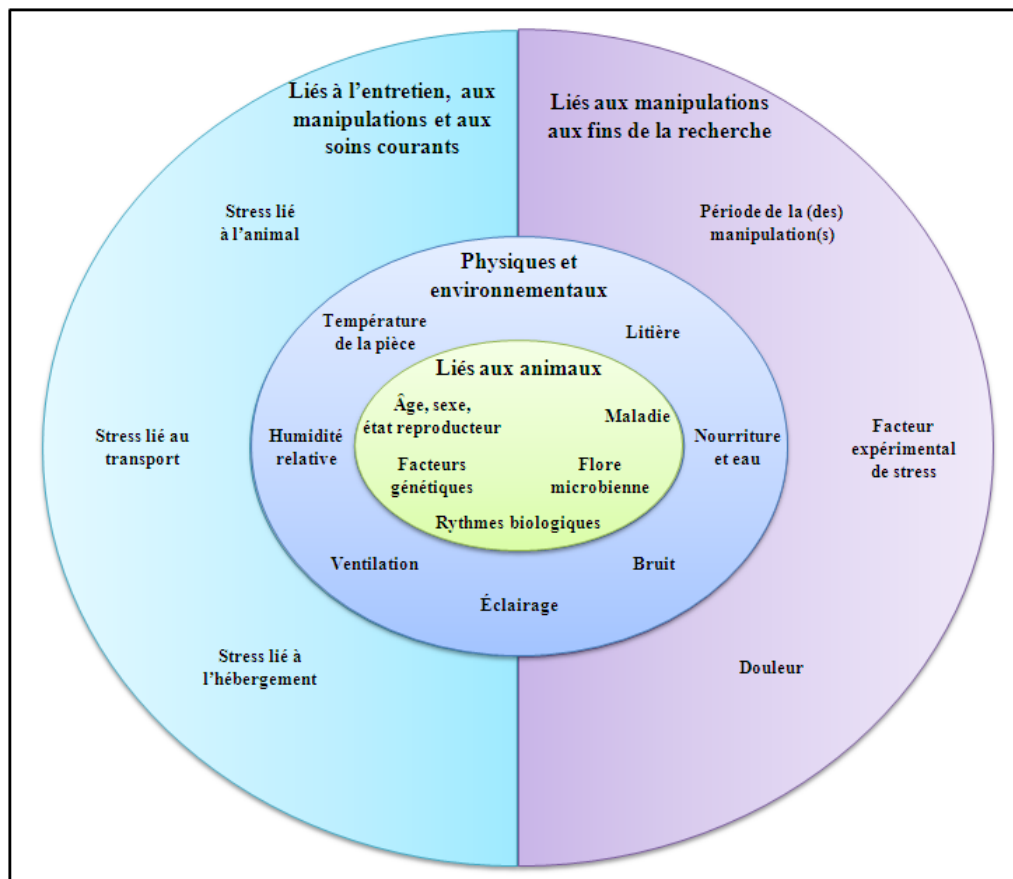
Chez le gros animal, les chiens briards peuvent présenter naturellement une délétion homozygote de 4 paires de bases qui conduit à la formation précoce d'un codon stop qui va aboutir à la formation d'une protéine tronquée. Ces animaux présentent très tôt une morphologie anormale des bâtonnets suivie d'une dégénérescence lente des photorécepteurs (Aguirre et al., 1998).

### II.3.4.4 Limites des modèles animaux

Le site du conseil canadien de protection des animaux<sup>16</sup> décrit précisément l'utilisation qui doit être faite des animaux en recherche biomédicale. Il montre que de nombreux facteurs peuvent influencer les résultats obtenus sur les modèles animaux (**Figure 103**).

De plus, avant tout usage d'un animal en recherche, il faut envisager des solutions de rechange à l'emploi d'animaux vivants qui suivent le principe des Trois R :

- ◆ remplacement : solutions autres que l'emploi d'animaux ou utilisation d'animaux ayant une sensibilité moindre ;
- ◆ réduction : utilisation de modèles animaux appropriés en quantités suffisantes afin de réduire les variations et le nombre d'animaux requis ;
- ◆ raffinement : modification des procédés d'entretien ou d'expérimentation pour diminuer la douleur et la détresse et améliorer le bien-être de l'animal.



**Figure 103 : facteurs non expérimentaux influençant les résultats de la recherche faisant appel à l'utilisation des animaux.** Lorsqu'ils effectuent une recherche, les chercheurs ont besoin de groupes expérimentaux et contrôlés en tous points identiques. Toutefois, de nombreux facteurs non expérimentaux regroupés comme suit : les facteurs liés aux animaux (vert), les facteurs physiques et environnementaux (bleu foncé), les facteurs liés à l'entretien, aux manipulations et aux soins courants (bleu ciel) et les facteurs liés aux

<sup>16</sup> <http://ccac.ca/>

manipulations aux fins de la recherche (violet) ; peuvent influencer la réaction du modèle animal. Source : <http://www.ccac.ca/fr /education/pnfiua/animaux-vivariums/am-questions>.

Pour l'étude de l'ACL, la comparaison des événements se produisant au cours du développement humain et animal n'est pas évidente car, par exemple, la souris ne possède pas de fovéa avec une région riche en cônes. Ainsi, les mutations qui impliquent des gènes exprimés au niveau des cônes, comme le gène *GUCY2D*, semblent être difficiles à modéliser chez l'animal. De plus, la connaissance des mécanismes à l'origine de l'ACL n'étant pas clairement établie, la comparaison avec l'animal est délicate et l'analogie difficile à établir.

## **II.3.5 Stratégies thérapeutiques**

### **II.3.5.1 La thérapie génique**

La thérapie génique consiste à remplacer l'expression déficiente ou anormale d'un gène en insérant un ADN exogène normal capable d'être transcrit puis traduit en une protéine fonctionnelle.

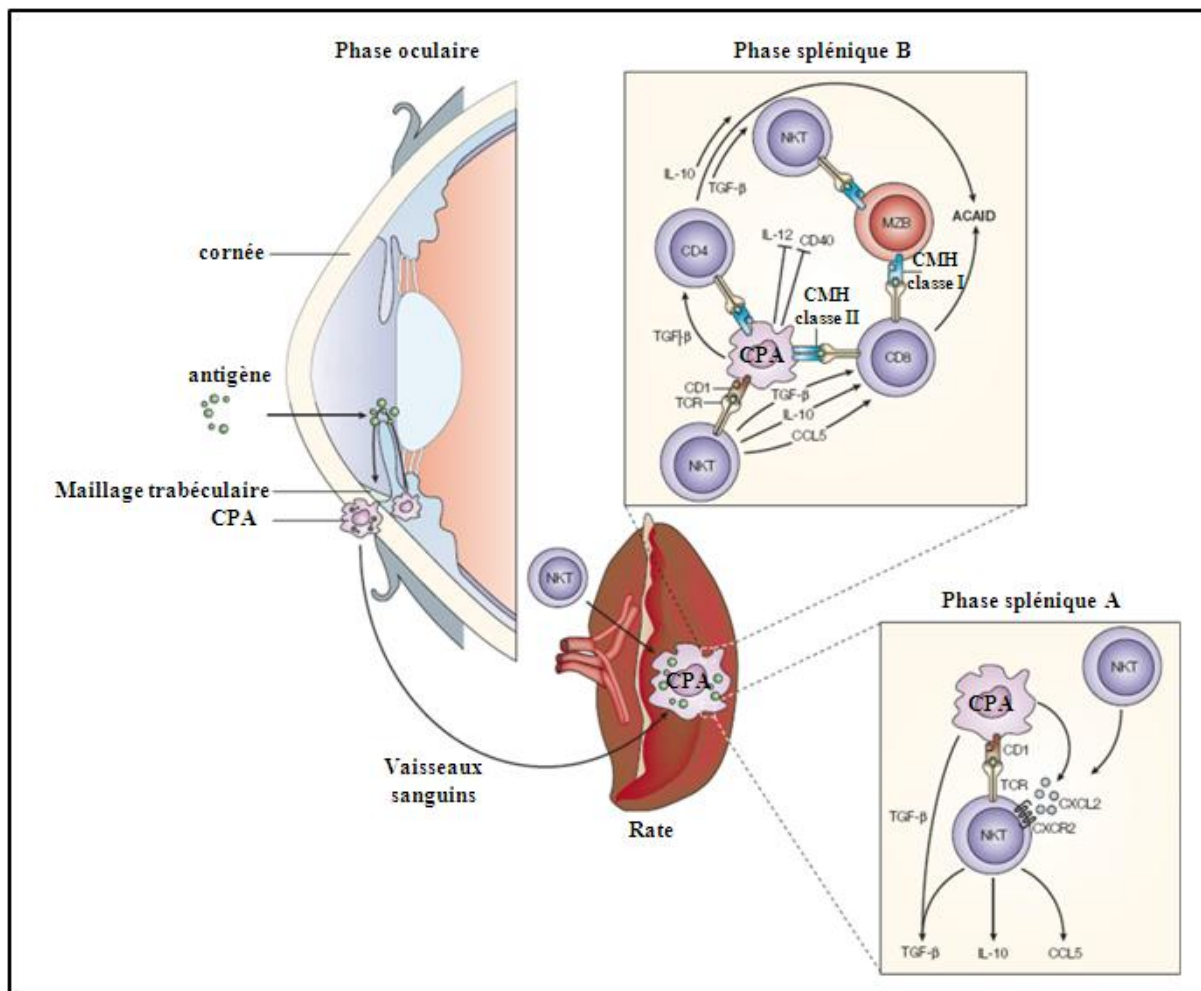
#### **II.3.5.1.1 Accessibilité de l'œil**

L'œil est un organe du système nerveux central, d'accès aisé et qui possède naturellement un espace sous-rétinien. Il représente un organe très intéressant pour la thérapie génique car la solution thérapeutique peut être injectée sans risque de fuite dans la circulation systémique. Enfin, l'œil peut facilement être surveillé ce qui permet d'évaluer les effets d'une telle thérapie par une mesure simple de l'acuité visuelle, par l'autofluorescence du fond de l'œil (ou FAF) ou encore par mesure de l'ERG (Beck et al., 2007).

#### **II.3.5.1.2 Immunologie de l'œil**

L'œil est considéré comme un organe immunoprivilégié dans la mesure où la greffe de tissus étrangers peut y survivre pendant de longues périodes voire indéfiniment alors qu'une greffe similaire placée sur un tissu non privilégié va être fortement rejetée (MEDAWAR, 1948).

Quatre espaces possèdent cette particularité, la cornée, la chambre antérieure, l'espace intra-vitréen et l'espace sous rétinien (Jiang and Streilein, 1991; Wenkel et al., 1999). Ce mécanisme longtemps considéré comme passif est maintenant bien connu sous le nom d'ACAID (pour *anterior chamber-associated immune deviation*) qui est une tolérance active de l'antigène étranger (**Figure 104**) (Streilein et al., 1980; Streilein, 2003).



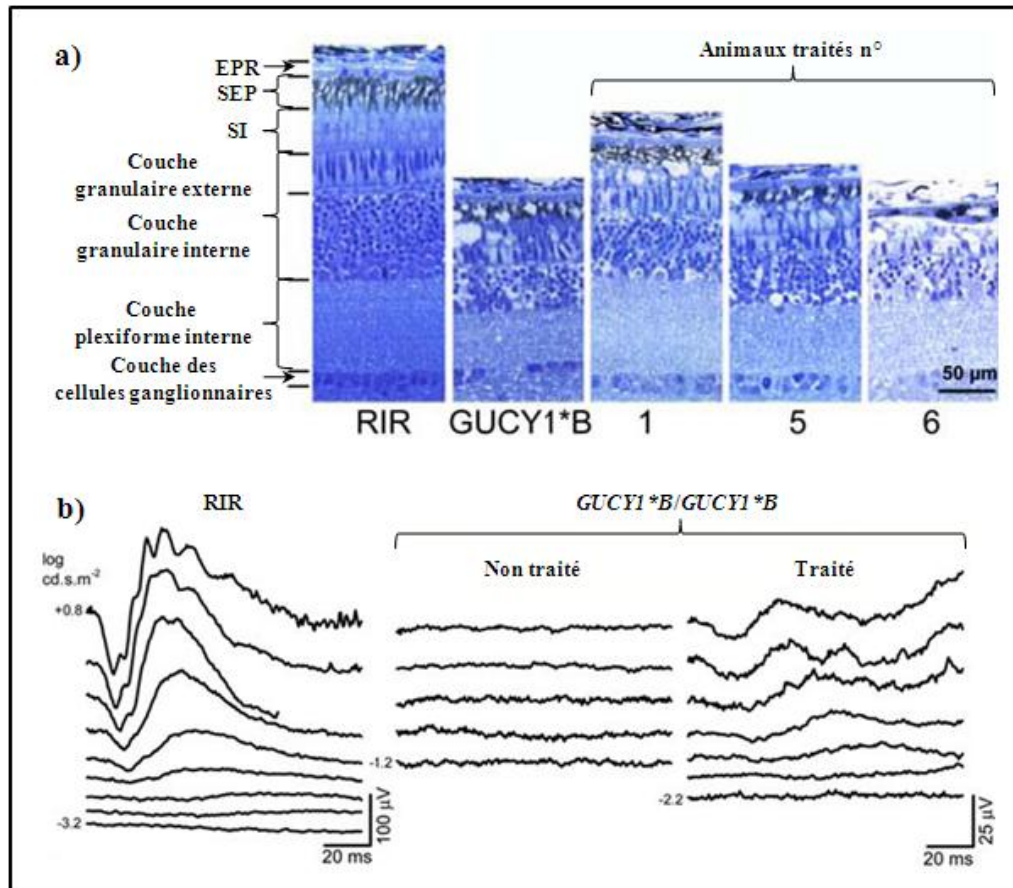
**Figure 104** : l'axe « camérulo-splénique » et les origines cellulaires de l'ACAID. Phase oculaire) l'antigène placé au niveau de la chambre antérieure est capturé par les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) endogènes qui migrent hors de l'œil, par le maillage trabéculaire, dans le système veineux puis dans la zone marginale de la rate ; Phase splénique A) les CPA CD1<sup>+</sup> arrivent dans la zone marginale de la rate où elles sécrètent du TGFβ et les protéines inflammatoires macrophagiques 2 (MIP2 ou CXCL2 pour *chemokine (C-X-C motif) ligand 2*) qui attirent les cellules NKT (pour *natural killer T*) sur le site. Les groupes multicellulaires se forment incluant les CPA, les NKT et les cellules B ; Phase splénique B) les groupes multicellulaires, incluant les cellules B de la zone marginale (MZBs), créent des microenvironnements immuno-modulés qui sont riches en TGFβ, interleukine 10 (IL-10) et CCL5 (pour *chemokine (C-C motif) ligand 5*), qui vont attirer et activer les cellules T spécifiques aux antigènes CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>. Ces cellules vont se différencier en cellules T régulatrices spécifiques d'antigènes qui réalisent l'ACAID. Avec TCR : récepteurs aux cellules T, CMH : complexe majeur d'histocompatibilité. Adapté de Streilein, 2003.

### II.3.5.1.3 L'ACL de type 1

#### II.3.5.1.3.1 Études précliniques

En 2006, l'équipe du Dr Semple-Rowland a pu restaurer la vision chez le poulet rouge Rhode-Island, en injectant dans l'espace ventriculaire du tube neural, au stade embryonnaire E2, des vecteurs lentiviraux porteurs de la GC bovine GC1 sous contrôle du promoteur CMV (pour

cytomégalo virus). La mesure de la restauration de la vision s'est faite par l'enregistrement d'ERG. Des analyses immunologiques et histologiques ont également été réalisées. Cette étude constitue une preuve de concept pour la thérapie cellulaire de l'ACL de type 1. Le traitement a eu lieu *in ovo*, il a permis un ralentissement de la dégénérescence mais ne l'a pas empêchée (**Figure 105**) (Williams et al., 2006).



**Figure 105 : la cécité associée à la perte de fonction du gène retGC1 chez le poulet GUCY1\*B, modèle de la LCA1, peut être réversée en utilisant la thérapie génique.** a) comparaison de la morphologie de rétine de poulets sauvages (RIR), GUCY1\*B non traité et GUCY1\*B traité. La morphologie de la rétine des animaux traités (1, 5 et 6) a été examinée pour déterminer si le traitement viral a modifié la dégénérescence rétinienne. Les régions ont été analysées tout au long du méridien vertical des yeux droits des poulets. Avec, EPR : épithélium pigmentaire rétinien, SEP : segments externes des photorécepteurs, SI : segments internes, RIR : *Rhode Island Red* ; b) électrophysiologie rétinienne restaurée dans les yeux traités. Le résultat de l'ERG d'un animal sauvage (RIR) est présenté à gauche. A droite, comparaison d'ERG en réponse à une augmentation d'intensité lumineuse entre un poulet *GUCY1\*B/GUCY1\*B* injecté par la construction portant le gène bovin GC1 (pour guanylate cyclase 1) et un poulet non traité. Chez l'animal non traité l'ERG n'est pas enregistrable comparativement à l'animal traité. Modifié de Williams et al., 2006.

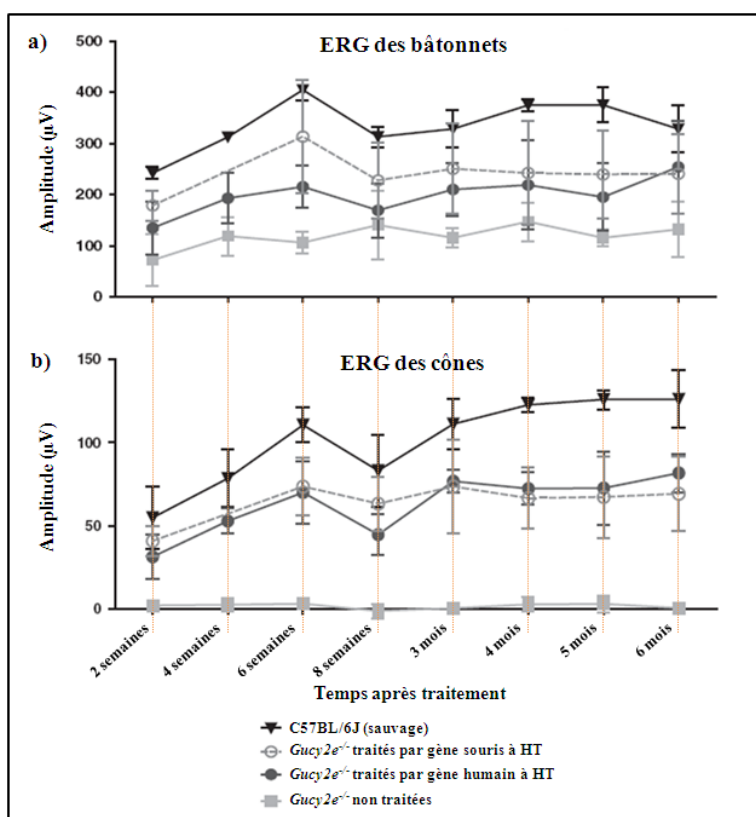
En parallèle, l'équipe a injecté dans l'espace sous-rétinien de souris GC1-KO âgées de trois semaines, un vecteur dérivé des AAV (pour *Adeno-associated virus*) porteur du gène *GCI* (Haire et



al., 2006). Ces souris, modèle de la LCA1, présentent une dégénérescence exclusive des cônes (Yang et al., 1999b). La présence du gène bovin *GCI* a conduit à une translocation de l'arrestine des cônes mais la mesure de l'ERG spécifique des cônes n'a pu être enregistrée et les cônes ont dégénéré (Haire et al., 2006). Ces études révèlent que l'origine du gène transféré peut avoir une influence sur la restauration de la fonction visuelle chez l'animal hôte.

En 2010, une seconde équipe a utilisé un vecteur dérivé des AAV, porteur, cette fois-ci du gène murin *GCI* chez des souris GC1-KO ce qui a permis de préserver les cônes jusqu'à 3 mois après la greffe améliorant l'acuité visuelle et la vision des contrastes. Cependant il n'a pas été démontré de restauration des bâtonnets (Boye et al., 2010).

Enfin, l'équipe de Robin Ali a montré la restauration visuelle la plus efficace à ce jour en intégrant cette fois-ci le gène humain *GUCY2D* au moyen d'AAV chez des souris *Gucy2e*<sup>-/-</sup> (Mihelec et al., 2011). Ces souris, modèle de la LCA1, présentent une activité diminuée des bâtonnets alors que chez l'homme cette fonction est abolie (Baehr et al., 2007). La préservation des cônes est visible jusqu'à 6 mois après la greffe par l'enregistrement d'ERG spécifiques aux cônes et aux bâtonnets (Figure 106) (Mihelec et al., 2011).



**Figure 106 : comparaison de la restauration fonctionnelle des photorécepteurs après le transfert des transgènes humain *GUCY2D* et murin *Gucy2e* chez des souris *Gucy2e*<sup>-/-</sup>.** a) une amélioration de l'ERG des bâtonnets a été observée dans les yeux traités par chacun des vecteurs humain et murin. Il n'y a pas de différence significative observée entre ces deux vecteurs concernant l'efficacité de la restauration ; b) les ondes b de l'ERG des cônes chez les yeux traités par *Gucy2e* ne diffèrent pas de celles issues des yeux sains (C57BL/6J). Avec, HT : haute titration virale. Adapté de Mihelec et al., 2011.



En conclusion les recherches avancent pour espérer un jour passer à la thérapie génique chez l'Homme mais la LCA1 apparaît *in utero* ce qui nécessiterait de traiter très tôt les enfants (Porto et al., 2003). Pourtant, une étude plus récente montre, chez des patients âgés de 20 à 53 ans, que les structures rétiniennes sont peu touchées au cours des années malgré une acuité visuelle affectée. Ces patients pourraient donc être traités tout comme le sont ceux qui sont atteints de l'ACL de type 2 et qui eux présentent une détérioration rétinienne bien plus importante (Pasadhika et al., 2010).

#### **II.3.5.1.4 L'ACL de type 2**

##### **II.3.5.1.4.1 Études précliniques**

Pour cette forme d'ACL, la preuve de concept est venue de l'étude menée chez les chiens briards. L'injection de particules virales AAV porteuses du gène *RPE65* a été faite de façon sous-rétinienne. Des mesures d'ERG et de vision photopique ont pu être obtenues pour les yeux traités (Acland et al., 2001).

Une seconde étude publiée en 2005, visait à étudier la longévité de l'effet du traitement, sa sécurité et sa répétabilité chez 26 yeux traités. Les principaux résultats obtenus ont été que (Acland et al., 2005) :

- ♦ les injections intra-vitréennes n'ont pas fonctionné ;
- ♦ 3 ans après l'injection, la récupération est stable ;
- ♦ l'immunoréactivité intra-oculaire a augmenté chez un petit nombre de chiens mais n'est pas spécifique à l'expression de la protéine RPE65 ;
- ♦ la protéine RPE65 n'est pas exprimée dans le cerveau, le rein ou la moelle épinière ;
- ♦ l'utilisation de vecteurs viraux dérivés d'AAV4, qui ciblent spécifiquement l'EPR (Rolling et al., 2006), à la place d'AAV2 qui sont capables, dans la rétine, de transduire à la fois les photorécepteurs et l'EPR (Rolling, 2004), a permis une réponse plus rapide à l'ERG, dès 15 jours après l'injection ;
- ♦ les chiens greffés après l'âge de 30 mois ne montrent pas de restauration visuelle ce qui suggère de traiter le plus tôt possible.

En 2006, une troisième équipe a confirmé la restauration visuelle suite à la thérapie génique de RPE65 cette fois-ci à l'aide de lentivirus chez des souris *Rpe65<sup>-/-</sup>* modèle de la LCA2 (Bemelmans et al., 2006; Redmond et al., 1998).

##### **II.3.5.1.4.2 Thérapie génique chez l'Homme**

Pour passer à la thérapie génique chez l'Homme, l'innocuité et l'efficacité du transfert de gène réalisé par les virus ont du être étudiées. Les AAV ont prouvé leur efficacité dans le transfert de gène aux niveaux des photorécepteurs et de l'EPR incluant une capacité à transduire des cellules post-mitotiques de façon stable, une immunogénicité minimale ainsi qu'une absence de pathogénicité (Dinculescu et al., 2005; Flannery et al., 1997; Rolling, 2004; Sullivan et al., 1996).

Ils pourraient être utilisés pour la thérapie génique de la LCA2 chez l'Homme (Jacobson et al., 2005). Les lentivirus présentent également un espoir pour véhiculer les gènes (Sinn et al., 2005; Wong et al., 2006) car une étude menée chez des souris modèles de l'ACL de type 2, *Rpe65<sup>rd12/rd12</sup>*, en 2006 a montré que des vecteurs lentiviraux non intégratifs injectés dans l'espace sous-rétinien étaient capables de restaurer la fonction rétinienne chez ces souris (Yáñez-Muñoz et al., 2006).

Forts de ces études, trois groupes se sont lancés dans la thérapie génique chez l'Homme donnant les premiers résultats en 2008 :

- ♦ le premier essai vise à déterminer si la thérapie génique chez l'Homme est associée à des effets indésirables même si l'efficacité en termes de restauration visuelle peut être démontrée chez l'humain. Pour ce faire, une injection sous-rétinienne de vecteurs viraux dérivés d'AAV2 porteurs du gène RPE65 a été effectuée chez 3 patients âgés de 17 à 23 ans ([www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov), n° : NCT00643747). Avant et jusqu'à 1 an après la greffe, de l'imagerie rétinienne visant à évaluer l'épaisseur et l'intégrité de la rétine a été effectuée ainsi que des mesures de l'acuité visuelle, de la vision des couleurs, des contrastes, du champ visuel ou encore la capacité à se déplacer dans une scène remplie d'obstacles. Les résultats obtenus montrent une amélioration visuelle dans la périphérie de la macula pour un seul patient et ne permettent pas de savoir si cette amélioration est due à la présence de RPE65 dans la rétine car on ne sait pas si cette restauration est médiée par les cônes ou par les bâtonnets. Au niveau de la fovéa, il n'y pas de restauration visible ce qui peut s'expliquer par un trop faible niveau d'expression de *RPE65* à ce niveau (Bainbridge et al., 2008).
- ♦ le deuxième essai paru dans le même journal, à la suite du précédent, concerne l'innocuité de l'injection de vecteurs AAV2 porteurs de *RPE65* au niveau de l'espace sous-rétinien de trois patients, âgés de 19 à 26 ans, atteints d'ACL de type 2 ([www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov), n° : NCT00516477). L'efficacité a été mesurée par des critères objectifs tels que le réflexe pupillaire à la lumière (Melillo et al., 2012), le nystagmus et des critères subjectifs comme l'acuité visuelle, le parcours d'obstacle et l'examen du champ visuel. Les trois patients ont montré des signes d'amélioration dans la fonction rétinienne mais comme les vecteurs AAV2 vides n'ont pas été injectés, il n'est pas certain que l'amélioration perçue soit le signe directe de l'expression normale de la protéine RPE65. Par ailleurs, des mesures d'ERG n'ont pas été effectuées et seuls trois patients ont été greffés et suivis durant 6 mois. Il faudrait une étude à plus long terme comprenant plus de patients pour définir les mesures d'innocuité et d'efficacité à employer lors de thérapie génique de l'œil pour obtenir la meilleure restauration visuelle possible (Maguire et al., 2008) ;
- ♦ un troisième essai ([www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov), n° : NCT00481546) concerne l'innocuité de l'injection de vecteurs AAV2 porteurs de *RPE65* au niveau de l'espace sous-rétinien chez des

cohortes de patients âgés dans un premier temps de 18 ans et plus. Dans un seconde phase, lorsque la sureté de l'injection aura été démontrée, des cohortes comprenant des patients âgés de 8 à 17 ans seront recrutées. Les premiers résultats obtenus chez trois patients, âgés de 21 à 24 ans, ayant été évalués avant et jusqu'à 90 jours après l'essai, montrent que la sensibilité à la lumière de l'œil traité a été améliorée (Cideciyan et al., 2008, 2009; Hauswirth et al., 2008). Des résultats plus complets ont été publiés cette année et concernent 15 patients, répartis en 5 cohortes, chez qui quatre doses distinctes de vecteurs viraux ont été injectées en un site unique ou double dans l'espace sous-rétinien. Ces derniers résultats ne montrent pas de dissémination des vecteurs viraux tout comme pour les deux autres essais. L'amélioration de la fonction visuelle est présente chez l'ensemble des patients mais à différents degrés. Enfin, tout comme les autres essais, peu de patients ont été traités ce qui rend difficile l'interprétation générale des résultats à une classe d'individus (Jacobson et al., 2011).

Ces trois essais cliniques (**Tableau 8**) ont prouvé qu'il n'y a pas de dissémination des vecteurs viraux en dehors de l'œil et montrent que l'efficacité obtenue en termes de restauration de la fonction visuelle est mineure. Les auteurs suggèrent qu'à l'avenir des doses plus fortes de RPE65 soient utilisées, ainsi qu'une greffe sur des patients plus jeunes soit effectuée afin que la maladie soit le moins avancée possible (Bainbridge et al., 2008; Bainbridge and Ali, 2008; Maguire et al., 2008). En effet, les atteintes des différentes couches de la RN débutent *in utero* pour les ACL de type 1 et 2 (Porto et al., 2002, 2003) et il faut veiller à ce qu'elles restent intactes pour espérer une récupération visuelle (Jacobson et al., 2005).

Par ailleurs, l'étude de la sécurité d'une telle thérapie s'est faite à court terme, un an maximum (Bainbridge et al., 2008), il faudrait mener des essais à plus long terme pour connaître l'innocuité réelle de doses plus fortes de RPE65. Enfin, la restauration de l'acuité visuelle est surtout due à une amélioration de la fonction des photorécepteurs mais les réponses à l'ERG restent non mesurables contrairement aux modèles animaux.

**Tableau 8 : comparaison des résultats des essais cliniques de la LCA de type 2 (gène *RPE65* muté).** Avec M : masculin, F : féminin, L : locale, G : générale, Ma : macula, RS : rétine subtemporale, RT : rétine temporale, RSN : rétine superonasale, EF : épaisseur fovéale, TM : trou maculaire, AV : acuité visuelle, PC : pas de changement, a : moyenne de 2 mesures, b : jumeaux. Traduit de Hauswirth et al., 2008.

	Âge (année) / genre	Mutation de <i>RPE65</i>	Durée du suivi (mois)	Type d'anesthésie	Dose de vecteur	Volume délivré (mL)	Lieu d'injection	Immunosuppression systémique	Rapports de complications oculaires	AV de départ (étude de l'œil)	AV post-traitement	Changement significatif de l'AV	Vision du patient dans la pénombre (auto-analyse)
<b>Etude actuelle</b>													
Patient 1	24/M	E417Q/E417Q	3	L	5,96.10 <sup>10</sup>	0,15	Ma	Non	EF	20/240 <sup>a</sup>	20/317	Non	+
Patient 2	23/F	R44Q/R91W					RS		Non	20/195 <sup>a</sup>	20/138		
Patient 3	21/M	Y368H/Y368H					RT		Non	20/283 <sup>a</sup>	20/191		
<b>Bainbridge et al., 2008</b>													
Patient 1	23/M	Y368H/Y368H	12	G	1.10 <sup>11</sup>	1	Ma	Oui	Non	20/286	20/145	Non	PC
Patient 2	17/F	IVS1+5G>A/G40S								20/662			
Patient 3	18/M	E6X/D167Y								6	20/115		
<b>Maguire et al., 2008</b>													
Patient 1 <sup>b</sup>	26/F	E102K/E102K	4,75	G	1,5.10 <sup>10</sup>	0,15	RSN	Oui	Non	<20/200	20/1050	Oui	+
Patient 2 <sup>b</sup>	26/M		2,75				Ma		Non	0	20/710		
Patient 3	19/F		1,25				Ma		Non	20/640	20/290		

#### **II.3.5.1.5 Succès et limites de la thérapie génique**

Ces études ouvrent la voie de la thérapie génique applicable aux différentes formes de l'ACL. Cependant l'ensemble des mutations n'est, à l'heure actuelle, pas connu ce qui exclut les patients pour lesquels l'origine génétique n'est pas établie. Par ailleurs comme nous l'avons vu, il faut que les cellules ciblées soient intactes ce qui n'est souvent pas le cas des patients adultes atteints d'ACL. Il faut donc déterminer les patients habilités à subir une thérapie génique selon des critères précis ce qui ferme la porte à de nombreux malades (Hufnagel et al., 2012).

Il reste de nombreuses questions en suspend comprenant la nécessité d'injections unilatérales ou bilatérales ou encore la nécessité de subir plusieurs injections. A ce propos, l'absence de réponse immunitaire après la ré-administration de vecteurs de thérapies géniques dans l'œil initialement non greffé chez des patients âgés de 27 à 47 ans a été démontrée ([www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov), n° : NCT01208389) (Bennett et al., 2012).

Concernant l'âge des patients à traiter (Maguire et al., 2009), les résultats de l'ensemble de ces études tendent à prouver qu'il ne faut pas faire de généralité entre les individus et que ce critère n'est que l'un des nombreux paramètres à prendre en compte (Jacobson et al., 2011). Il faut également pouvoir déterminer le lieu où l'injection sera la plus efficace et si la restauration visuelle se fait par l'atteinte des cônes par les vecteurs viraux (Jacobson et al., 2011).

Enfin, les résultats positifs de la thérapie génique pour l'ACL de type 2 fournissent une base pour étendre cette technologie aux autres formes. Cependant, les traitements efficaces et sûrs de l'ACL ne sont possibles qu'avec une connaissance approfondie du rôle des protéines affectées. Il faut pouvoir connaître les effets moléculaires et cellulaires de cette surexpression de la protéine qui pourraient également avoir des effets secondaires néfastes. Grâce aux progrès technologiques et scientifiques ces analyses peuvent désormais se faire au niveau du réseau de gènes et des protéines impliqués dans les voies conduisant à l'ACL.

#### **II.3.5.2 Thérapies alternatives**

En parallèle de la thérapie génique des méthodes de transplantation de progéniteurs neuroblastiques ou de cellules de l'EPR se sont développées avec succès chez l'animal (Seiler et al., 2010b). Les transplants sous forme de feuilles peuvent reconstruire la rétine endommagée et restaurer la sensibilité rétinienne (Seiler et al., 2010a). Cependant, chez des chats modèles de l'ACL de type 10 impliquant le gène *CEP290*, les implants allogéniques de tissus fœtaux n'ont pas montré de restauration et peuvent présenter des risques de complications dus à la taille de l'implant (Seiler et al., 2009). Ces difficultés ne permettent pas le passage, à l'heure actuelle, de cette thérapie chez l'Homme.

Les essais cliniques de thérapie cellulaire débutés dans le cadre de la SMD et de la DMLA chez l'Homme permettent d'espérer pouvoir greffer, dans un délai plus raisonnable, des cellules de l'EPR saines pour traiter certaines formes d'ACL. Cependant la forte hétérogénéité génétique et clinique de cette pathologie représente un obstacle majeur car il faut également pouvoir, dans le cadre de certaines formes d'ACL et selon l'âge des patients, restaurer les cellules de la RN.

### **II.3.5.3 La modélisation pathologique**

#### **II.3.5.3.1 Ressources cellulaires**

Obtenir des CSEh naturellement porteuses d'une forme d'ACL semble presque impossible car il faudrait que 2 parents porteurs d'une même mutation, diagnostiqués, aient le projet de concevoir un enfant. L'alternative pourrait être de créer des CSEh porteuses de l'anomalie génétique voulue en modifiant génétiquement des CSEh saines mais cela nécessiterait un temps considérable si l'on tient compte de la très forte hétérogénéité génétique et clinique de cette pathologie (Camuzat et al., 1996b; Waardenburg and Schappert-Kimmijser, 1963). De ce fait il n'existe pour l'heure aucun modèle de CSEh de l'ACL.

Au début de la réalisation de ce projet, il n'existait pas d'hiPSCs porteuses d'ACL mais cette année, une équipe iranienne a publié une étude relatant l'usage d'hiPSCs ACL dans le cadre de la mise au point d'un protocole de dérivation de ces hiPSCs en cellules de l'EPR (Zahabi et al., 2012). Par ailleurs, il est maintenant possible d'avoir accès à des banques privées ou publiques de fibroblastes de patients ce qui permet d'envisager de créer des hiPSCs porteuses d'une mutation spécifique conduisant à une forme particulière d'ACL.

Une fois les hiPSCs LCA obtenues, il faut pouvoir les engager dans les lignages désirés et les différencier dans les phénotypes d'intérêt grâce aux protocoles préalablement établis lors de l'étude *in vitro* du développement à partir de CSpH (voir : [Le développement rétinien](#)).

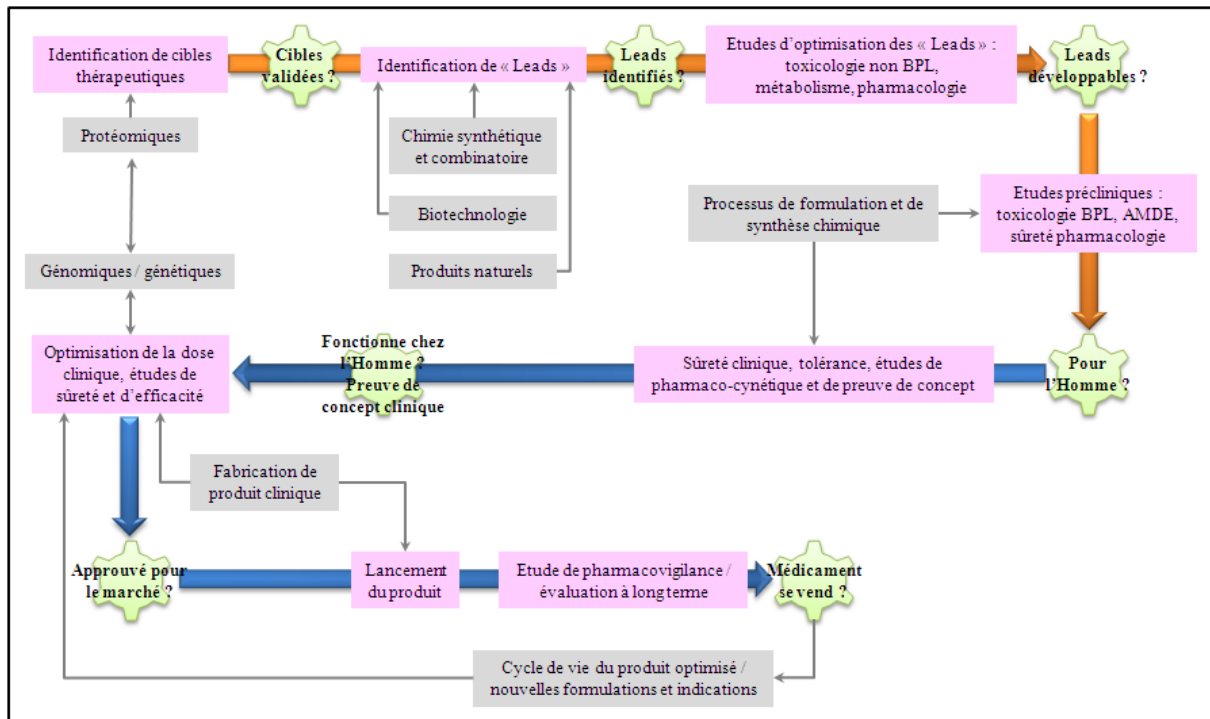
#### **II.3.5.3.2 Recherche de biomarqueurs**

Les premières recherches considéraient les biomarqueurs comme outils diagnostics par exemple dans le cadre de cancers (Fishman et al., 1975; Warnes and Smith, 1987; Taube, 2009; Taube et al., 2009). Le biomarqueur est, de nos jours, décrit sur le site Internet de l'ANSM<sup>17</sup> selon la définition établie par le *National Institute of Health* comme « une caractéristique mesurable, indicatrice de processus biologiques normaux ou pathologiques, ou de réponses pharmacologiques à une intervention thérapeutique ». Les biomarqueurs peuvent être d'origines génomique, protéomique ou encore métabolomique (Bowser et al., 2006; Ganesalingam and Bowser, 2010) et être utilisés pour le dépistage, le diagnostic, l'évaluation de la réponse ou de la tolérance à un traitement. Les approches de génomique, de protéomique et l'HTS (pour *High Throughput screening* ou criblage haut débit), ont

---

<sup>17</sup> <http://ansm.sante.fr/L-ANSM2/Biomarqueurs/Biomarqueurs-et-produits-de-sante/%28offset%29/0>

accéléré le nombre de molécules nommées *Leads* pouvant entrer dans le pipeline de découverte d'un médicament (**Figure 107**) (Biomarkers Definitions Working Group., 2001; Pritchard et al., 2003).



**Figure 107 : points de décision clés dans le développement de médicaments.** Les engrenages (vert) représentent les clés de décision, CONTINUE / STOP, pour le développement d'un produit pharmaceutique. Les rectangles représentent les activités clés (rose) ou les disciplines (gris) nécessairement impliquées pour répondre aux questions (vert). Poser les bonnes questions aux bons moments est la clé stratégique de la planification de développement d'un médicament. Avec, BPL : Bonnes Pratiques de Laboratoire, AMDE : Absorption-Métabolisme-Distribution-Excrétion. Traduit de Pritchard et al., 2003.

Dans la modélisation pathologique de l'ACL, l'enjeu est d'identifier un ou des biomarqueurs de la pathologie dans des dérivés d'hiPSCs porteuses d'une forme d'ACL afin d'étudier les mécanismes conduisant à la maladie. La connaissance d'un biomarqueur permet également d'envisager le développement de test pour le criblage à haut débit de molécules à potentiel thérapeutique (**Figure 107**) (Laustriat et al., 2010) pour identifier des composés ayant un effet sur les phénotypes de la maladie. Posséder un modèle cellulaire standard, des hiPSCs porteuses d'une forme d'ACL, peut améliorer l'efficacité de la découverte de médicaments dans le sens où les médicaments candidats seraient spécifiques à une population particulière de patients (Lian et al., 2010; Yamanaka, 2009). Enfin, il faut également disposer d'un modèle équivalent sain afin de pouvoir réaliser des études comparatives.



Ainsi les biomarqueurs peuvent servir à sélectionner des *Leads* (molécules potentiellement thérapeutiques) mais aussi à évaluer leur efficacité et / ou leur toxicité sur les phénotypes à traiter (Figure 108).

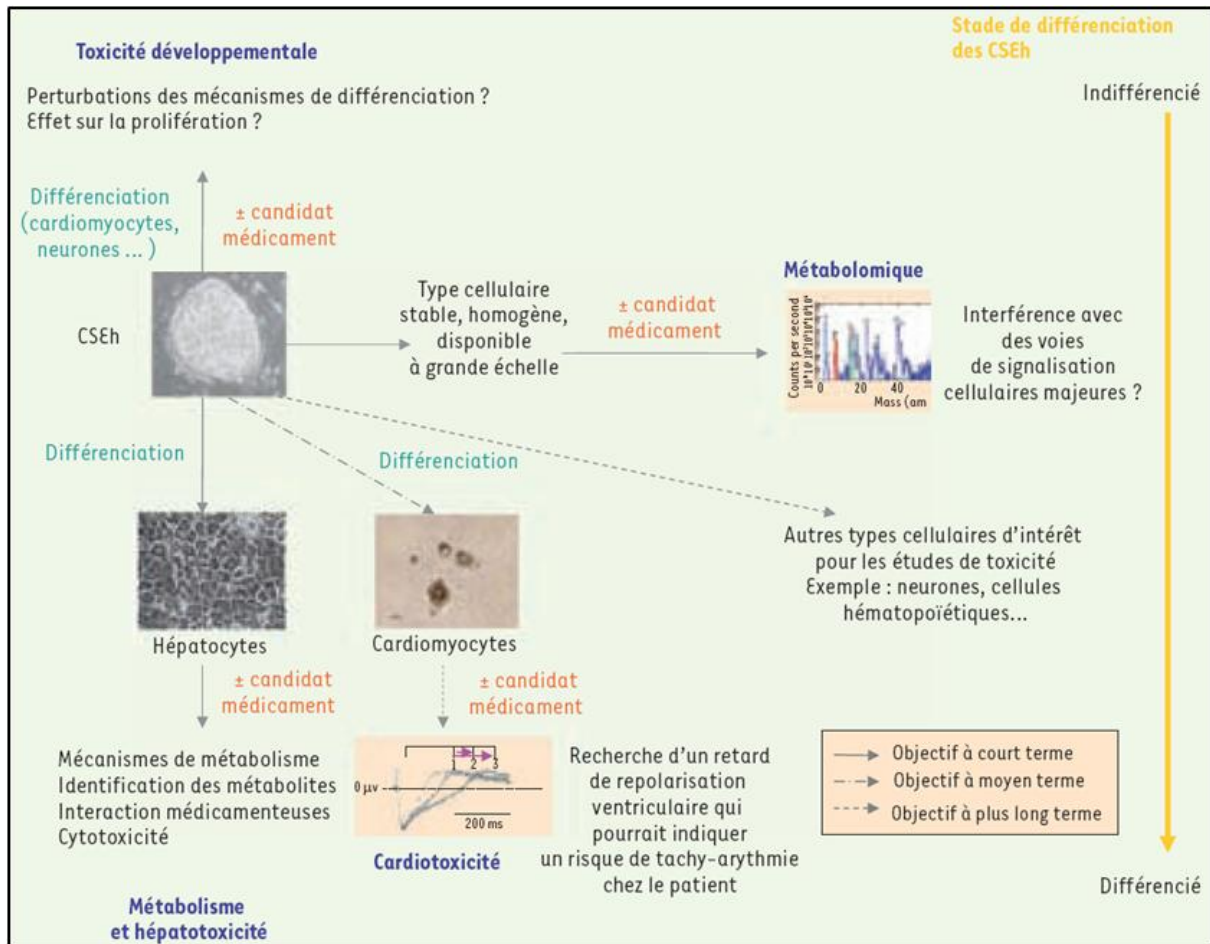


Figure 108 : CSEh et toxicologie prédictive. De Laustriat et al., 2009.



### **III Résultats**



## III.1 Préambule

### III.1.1 Contexte

L'Institut des cellules Souches pour le Traitement et l'Etude des maladies Monogéniques (I-STEM) a pour objectifs :

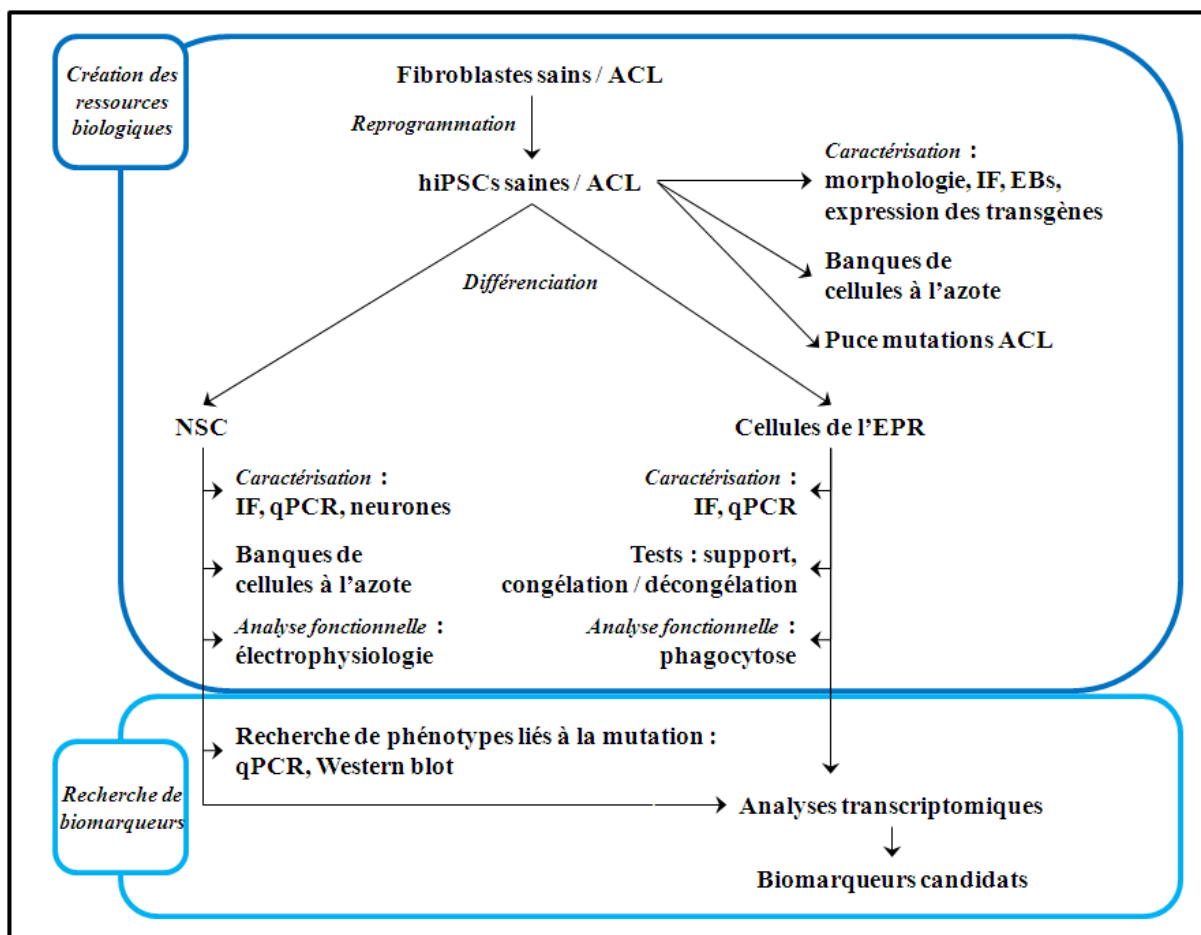
- ♦ d'utiliser les CSpH pour la thérapie cellulaire ;
- ♦ de modéliser ces maladies rares à l'aide de CSpH ;
- ♦ d'utiliser les modèles mis en place pour effectuer des criblages de composés à potentiel thérapeutique.

La première modélisation pathologique a concerné, dès 2005, une maladie monogénique neuromusculaire, la Dystrophie Myotonique de type 1 (DM1) ou maladie de Steinert. La preuve de concept a été réalisée au sein de l'institut par les équipes des Drs Piétu et Martinat, en utilisant des CSEh porteuses de la mutation responsable de la DM1.

L'équipe du Dr Piétu a retrouvé des caractéristiques de la DM1 aux niveaux de progéniteurs neuraux et mésenchymateux dérivés de CSEh porteuses de la mutation causale de DM1. Elle a par la suite réalisé une analyse transcriptomique (« *ressource driven* ») de ces populations saines et mutantes pour identifier des gènes dérégulés et des voies de signalisation spécifiques à chacune de ces populations (Denis et al., 2011). Dès lors plusieurs équipes ont pu travailler et travaillent encore actuellement sur différents aspects de la pathologie afin de découvrir des médicaments candidats tout en ayant une meilleure compréhension des mécanismes conduisant à la DM1. L'équipe du Dr Martinat a d'ores et déjà pu relier les gènes *SLITRK2* et *SLITRK4* avec des défauts de formation des synapses et des neurites (hyper-arborisation) en utilisant des dérivés neuraux issus de CSEh porteuses de la DM1 (Marteyn et al., 2011).

Mes travaux de doctorat, dirigés par le Dr Monville, ont porté sur le développement de la modélisation pathologique de l'ACL en utilisant, cette fois, des iPSCs humaines naturellement porteuses de la mutation causale d'une forme d'ACL.

Ce projet débuté mi-2009 était le premier, à l'institut, à utiliser des hiPSCs pour modéliser une maladie monogénique. Il n'existait par ailleurs aucune publication scientifique mentionnant la dérivation d'hiPSCs porteuses d'ACL. Par analogie avec la modélisation pathologique de la DM1, mon projet de modélisation pathologique de l'ACL a suivi la stratégie présentée ci-après (**Figure 109**). L'objectif principal était de disposer de types cellulaires que nous jugions pertinents pour la modélisation, à savoir les cellules souches neurales (NSC) et les cellules de l'EPR dont les protocoles d'obtention étaient par ailleurs connus, afin de rechercher des biomarqueurs de la pathologie, ces biomarqueurs permettant par la suite d'étudier et décrypter les mécanismes de la maladie et/ou de mettre ou point un crible de molécules à potentiel thérapeutique.



**Figure 109** : stratégie générale de la modélisation de l'amaurose congénitale de Leber menée durant ce projet de doctorat. Avec IF : immunofluorescence, EBs : corps embryoides, qPCR : *quantitative Polymerase Chain Reaction*.

### III.1.2 Objectifs

L'ACL est une maladie génétique rare, 1 naissance sur 30 000 à 1 naissance sur 81 000, qui affecte la rétine. Les premiers symptômes apparaissent dès les premiers mois de la vie et mènent en quelques années à la cécité. Cette pathologie présente une haute hétérogénéité génétique puisqu'à ce jour des mutations dans 18 gènes ont pu être associées à la maladie. Ces gènes ne permettent pas de couvrir l'ensemble des patients ce qui tend à prouver que d'autres gènes, non encore identifiés, peuvent être à l'origine d'autres formes d'ACL.

Les types cellulaires affectés par la maladie concernent principalement les récepteurs visuels de la RN et les cellules de l'EPR. Ainsi, les cellules idéales pour créer un modèle humain de cette pathologie sont les photorécepteurs et les cellules de l'EPR. Comme nous l'avons vu dans l'introduction de ce manuscrit, les hiPSCs sont, tout comme les CSEh, capables de donner naissance à n'importe quel type cellulaire de l'organisme grâce à leur propriété de pluripotence à condition toutefois d'élaborer et maîtriser les protocoles de culture afin d'aboutir aux populations cellulaires souhaitées. Cependant, en 2009, au démarrage de ce projet, l'obtention des photorécepteurs en culture

à partir de CSEh était un processus long et qui ne conduisait pas à des populations suffisamment homogènes pour pouvoir mener à bien des analyses transcriptomiques et/ou mettre en place un crible de molécules à potentiel thérapeutique. En effet, pour envisager ce type d'analyses, il est nécessaire de posséder des modèles cellulaires standards, stables et homogènes si l'on veut pouvoir obtenir des résultats fiables. Par ailleurs, ces populations cellulaires doivent être facilement amplifiables pour être disponibles en grande quantité.

Ainsi, l'effort a principalement porté sur la culture cellulaire pour posséder des outils pertinents pour mimer l'ACL *in vitro*. La première partie du projet a consisté à produire et caractériser des lignées d'hiPSCs saines et porteuses de l'ACL puis à les engager dans les lignages souhaités pour obtenir les phénotypes d'intérêt à savoir une population homogène de progéniteurs du système neural, les NSC, qui se cultivent en adhérence, sans cellules nourricières et peuvent être amplifiées en grande quantité grâce à des passages enzymatiques ainsi qu'une population homogène de cellules de l'EPR qui se cultivent, tout comme les NSC, en adhérence, sans cellules nourricières et sont également enzymatiquement amplifiables.

L'hétérogénéité génétique de l'ACL rend difficile l'étude des mécanismes, qui sont très peu décrits dans la littérature, conduisant aux différents symptômes. Les modèles animaux utilisés en laboratoire, notamment les rongeurs, permettent d'étudier certains de ces mécanismes mais présentent des limites liées à l'espèce. Pour tenter d'identifier un ou des biomarqueurs de la pathologie dans les dérivés cellulaires d'hiPSCs ACL, une fois les ressources biologiques obtenues, une recherche sans *a priori* a été effectuée en réalisant des analyses transcriptomiques différentielles à grande échelle sur les dérivés d'hiPSCs sains et mutants. L'identification de ce(s) biomarqueur(s) peut permettre d'étudier les mécanismes conduisant à la maladie. La connaissance d'un biomarqueur permet également d'envisager le développement de test pour le criblage à haut débit de molécules à potentiel thérapeutique pour identifier des composés ayant un effet sur les phénotypes de la maladie.

## **III.2 Principaux résultats obtenus**

### **III.2.1 Recherche de la mutation causale de l'ACL**

#### **III.2.1.1 Fibroblastes naturellement porteurs de l'ACL**

Les lignées de fibroblastes GM03852 et GM05300 ont été obtenues auprès de la société Coriell. La lignée GM03852 provient d'un sujet féminin de type caucasien âgé de 2 ans présentant une vision pauvre avec une hypermétropie mesurée à 7 dioptries et un nystagmus. La lignée GM05300 provient quant à elle d'un sujet masculin de type caucasien âgé de 9 ans présentant des troubles de la vision dès l'âge de trois mois, avec une incapacité à fixer ou à suivre normalement de petits objets à l'âge de 5



mois. Cet enfant présente également un nystagmus, des changements de pigmentation du fond d'œil de type poivre et sel, une hypermétropie forte mesurée à 8 dioptries, un ERG non mesurable dans les deux yeux que l'enfant soit placé en conditions scotopique ou photopique.

Ces deux enfants ne sont pas apparentés et les lignées fibroblastiques commercialisées sont décrites, au vu des symptômes présentés, comme porteuses de l'ACL de type 1 (MIM 204000) ou 2 (MIM 204100). Aucun génotypage des échantillons n'est fourni car lorsque les fibroblastes ont été commercialisés seul le diagnostic clinique était pris en compte pour les identifier (source Coriell).

### **III.2.1.2 Test diagnostique**

Dans le cadre de la modélisation pathologique, quelque soit la maladie à étudier, le génotypage est crucial si l'on veut développer des thérapeutiques appropriées. En effet, les thérapeutiques envisagées sont dépendantes du gène muté. Les tests génétiques confirment un diagnostic au niveau moléculaire ce qui permet par la suite d'estimer l'évolution des symptômes de la pathologie. Dans ce contexte, les puces à ADN de la société Asper Biotech ont été utilisées pour diagnostiquer les lignées de fibroblastes commerciaux. Ces puces permettaient au début de la réalisation de ce projet de tester en parallèle 641 variants identifiés au moins une fois dans 12 gènes à l'origine de l'ACL à savoir *GUCY2D*, *RPE65*, *SPATA7*, *AIPL1*, *LCA5*, *RPGRIP1*, *CRX*, *CRB1*, *CEP290*, *RDH12*, *LRAT* et *TULP1* ainsi que dans le gène *MERTK* responsable de RP d'apparition précoce.

L'analyse des ADN génomiques issus des deux lignées fibroblastiques n'a pas montré de mutation directement associée à l'ACL. Un polymorphisme commun, que l'on retrouve chez 40% de la population non porteuses d'ACL<sup>18</sup>, consistant en un changement hétérozygote de la base G en la base T à la position 154 de l'exon 2 du gène codant la *GUCY2D* a été identifié chez les deux patients.

## **III.2.2 Obtention des ressources biologiques**

Comme les résultats obtenus sont similaires pour les cellules saines et les cellules mutées, seuls ceux concernant les cellules mutées sont présentés.

### **III.2.2.1 Obtention et caractérisation des hiPSCs**

La première étape du projet a été de produire des CSPh, les hiPSCs à partir de fibroblastes humains mutants et sains. En effet, la culture de ces fibroblastes dits primaires, en condition de laboratoire, ne peut être maintenue à long terme, leur capacité d'auto-renouvellement étant limitée. Par ailleurs, les fibroblastes ne constituent pas une population cellulaire atteinte par la pathologie. Enfin, il est difficile d'accéder à des populations cellulaires rétiniennes humaines porteuses d'ACL.

---

<sup>18</sup> <http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgc?hgsid=307407363&c=chr17&o=7906518&t=7906519&g=snp135&i=rs61749665>

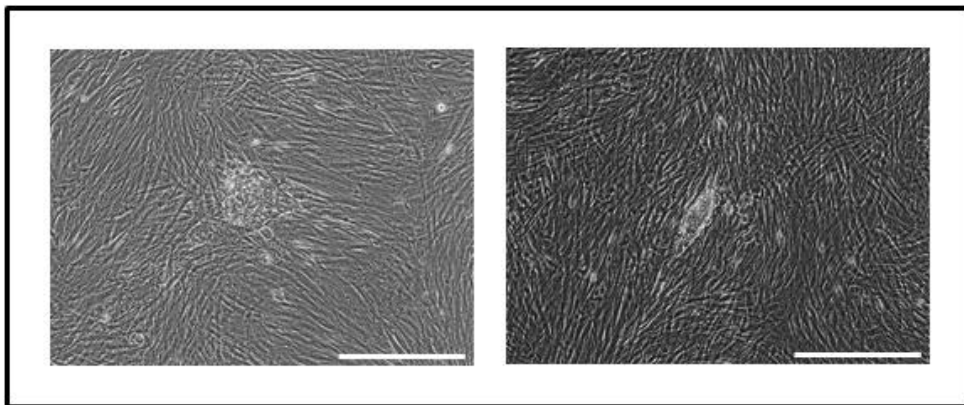
Le protocole d'obtention des hiPSCs comporte plusieurs étapes successives telles que la production des rétrovirus, la reprogrammation des fibroblastes, l'émergence des clones hiPSCs et leur établissement en colonies homogènes.

#### III.2.2.1.1 Reprogrammation des fibroblastes ACL

Pour la reprogrammation des fibroblastes porteurs de l'ACL, nous avons choisi d'utiliser la méthode développée en 2007 par l'équipe du docteur Yamanaka qui utilisait des rétrovirus amphotropes, produits par les cellules PLAT-A, comme vecteurs des quatre facteurs de transcription humain POU5F1, SOX2, KLF4, MYC sous le contrôle du promoteur GFP (Takahashi et al., 2007a) car ce protocole avait déjà permis au laboratoire de générer des hiPSCs saines. N'ayant pas l'habilitation à manipuler les virus amphotropes, le Dr Girard a effectué la reprogrammation. Quatre clones sains ayant été reprogrammés dans les mêmes conditions et servant de contrôle nous ont été fournis par d'autres équipes du laboratoire.

#### III.2.2.1.2 Émergence des clones

Trois semaines après l'infection virale, les premiers clones d'hiPSCs émergent au milieu de la population de fibroblastes ACL reprogrammés (**Figure 110**).



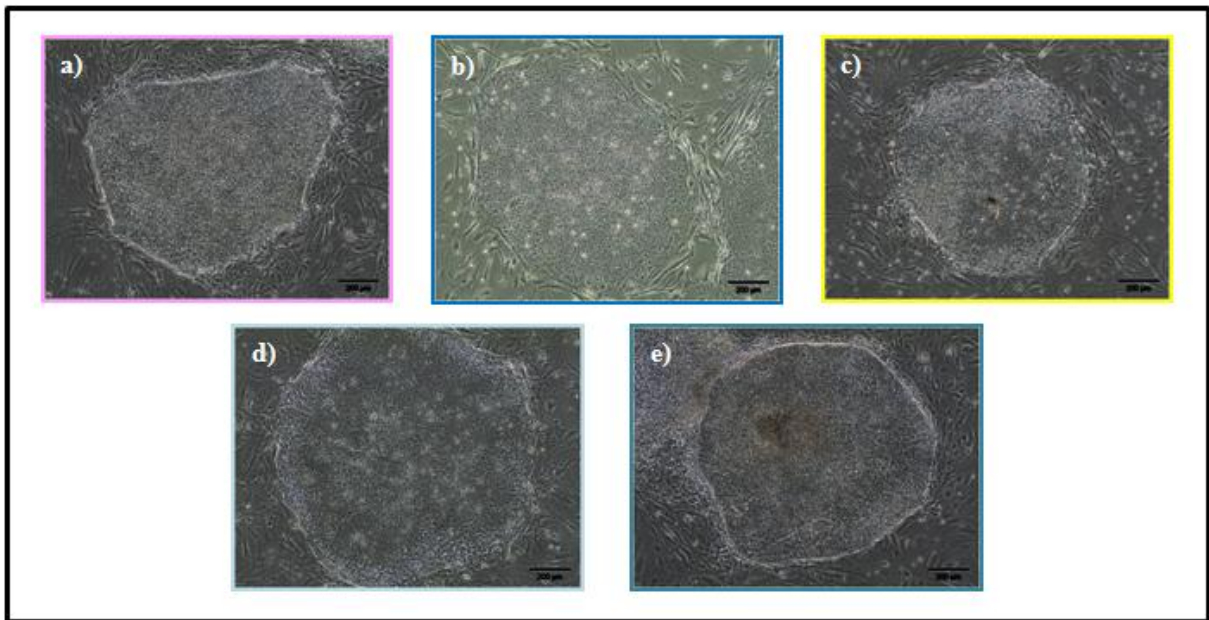
**Figure 110** : photographies au microscope à contraste de phase de l'émergence des clones hiPSCs ACL au milieu de la population de fibroblastes ACL. A gauche : émergence d'un clone 19 jours après la reprogrammation des cellules GM03852 (femelle) ; à droite : émergence d'un clone 21 jours après la reprogrammation des cellules GM05300 (mâle). Barre d'échelle 100 $\mu$ m.

Les clones sont reconnaissables car ils forment des colonies plates qui ressemblent aux colonies de CSEh. Les clones ont été laissés en culture afin d'être assez volumineux pour pouvoir être prélevés mécaniquement sous le contrôle d'une loupe et déposés en petits morceaux, sur les cellules nourricières, des MEFs préalablement inactivés par de la mitomycine C. Le repiquage manuel des clones sur les MEFs n'aboutit pas forcément à l'obtention d'une lignée cellulaire d'hiPSCs, certains dégénèrent car ils ne sont pas de réelles hiPSCs.

A l'issue de 50 jours de culture, 5 clones potentiels ont été repiqués sur des MEFs inactivés pour la lignée GM03852 et 12 clones potentiels pour la lignée GM05300.

### III.2.2.1.3 Culture d'une population homogène d'hiPSCs

Après plusieurs repiquages mécaniques (ou passages) sur MEFs, sous le contrôle d'une loupe binoculaire, seul un clone a pu s'établir durablement pour la lignée femelle GM03852 alors que pour la lignée mâle GM05300, quatre clones ont pu se maintenir en culture (**Figure 111**). La nature cellulaire de ceux n'ayant pas survécu n'a pas été étudiée.

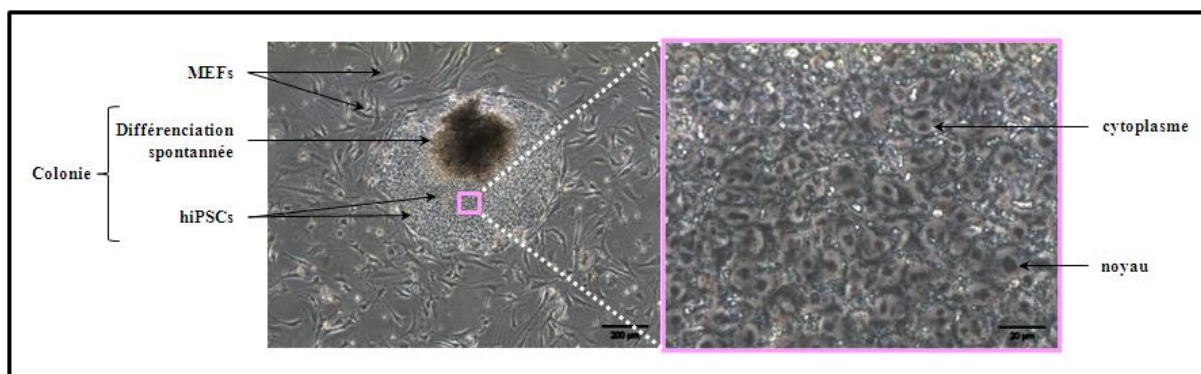


**Figure 111** : photographies au microscope à contraste de phase des colonies d'hiPSCs ACL établies sur MEFs. a) GM03852 clone 1 à P6 ; b) GM05300 clone 1 à P11 ; c) GM05300 clone 2 à P7 ; d) GM05300 clone 4 à P4 et e) GM05300 clone 5 à P5. Barres d'échelle 200µm.

Il m'a ensuite fallu caractériser ces cellules pour posséder des populations homogènes présentant les propriétés caractéristiques des CSPh à savoir l'auto-renouvellement et la pluripotence.

### III.2.2.1.4 Caractérisation des hiPSCs

Les cellules cultivées avec le milieu usuel des CSEh en présence de FGF2 se développent comme le ferait les CSEh. Elles forment des colonies plates et compactes caractérisées par un gros noyau et peu de cytoplasme. Tout comme chez les colonies de CSEh, des zones de différenciation spontanée peuvent apparaître au centre ou en périphérie des colonies (**Figure 112**).



**Figure 112** : photographies au microscope à contraste de phase d'une colonie d'hiPSCs établie sur des MEFs. A gauche) colonie d'hiPSCs du clone 1 GM03852 un jour après passage sur MEFS présentant des CSPh et une zone de différenciation spontanée, barre d'échelle 200 $\mu$ m ; à droite) agrandissement de la zone encadrée en rose à gauche, d'hiPSCs non différenciées, présentant un gros noyau et peu de cytoplasme, barre d'échelle : 20 $\mu$ m.

La caractérisation s'est poursuivie en vérifiant l'état indifférencié de ces cellules par l'expression du marqueur de pluripotence OCT4 en immunofluorescence (Figure 1SD, Lustremant et *al.*) et par l'activité de la phosphatase alcaline (Figure 1SE, Lustremant et *al.*). Leur intégrité génomique nécessaire avant d'envisager de poursuivre les travaux a été vérifiée par G-banding et par mFISH (Figure 1SF, Lustremant et *al.*). Pour étudier leur capacité à se différencier dans les 3 feuillet, nous avons réalisé trois différenciations indépendantes en EB pour chacune des lignées (Figure 1SE, Lustremant et *al.*). Enfin, nous avons voulu savoir si les transgènes introduits lors de la reprogrammation étaient toujours présents dans ces lignées après plusieurs semaines de culture. Les transgènes ne sont pas totalement éteints mais sont présents à un niveau moindre que dans les fibroblastes tout juste reprogrammés (Figure 1SF, Lustremant et *al.*).

L'ensemble de ces caractérisations suggèrent que la reprogrammation des fibroblastes en hiPSCs s'est déroulée correctement.

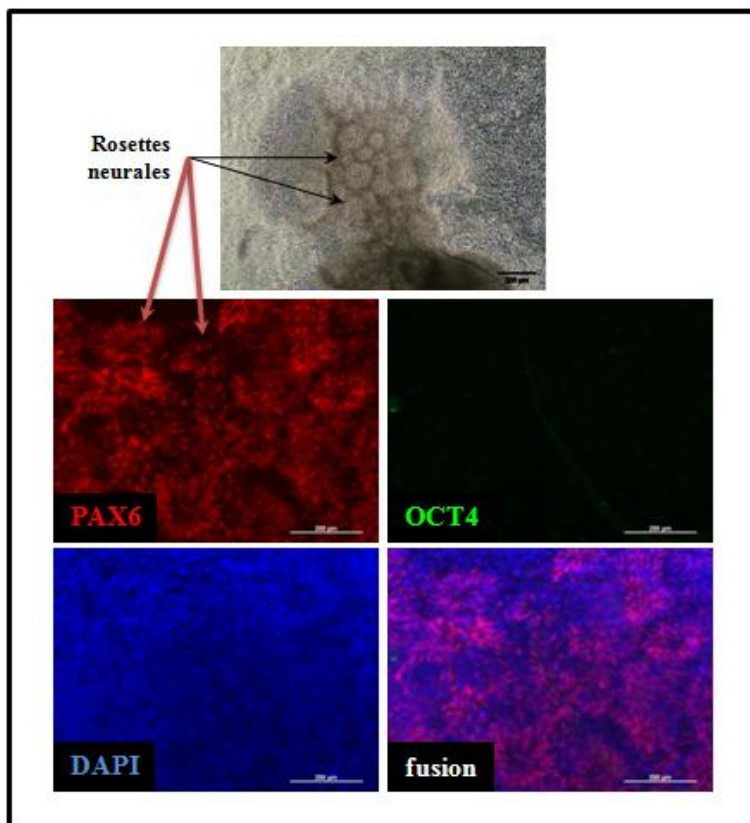
### **III.2.2.2 Obtention et caractérisation des NSC**

#### **III.2.2.2.1 Obtention des NSC**

A mon arrivée au laboratoire, il existait différents protocoles pour obtenir des NSC à partir de CSEh. Comme décrit dans le chapitre sur les cellules souches, le premier consistait en la co-culture des CSEh sur des cellules stromales (Perrier et al., 2004) alors que le second basé sur l'utilisation de petites molécules telles que la protéine Noggin et le SB431542, qui vont inhiber les voies du BMP et du TGF $\beta$  favorisant ainsi l'apparition du lignage neuroectodermique (Chambers et al., 2009), permettait de s'affranchir de la co-culture. Nous avons choisi ce deuxième protocole qui se déroule en deux étapes distinctes. La première consiste à obtenir des rosettes neurales à partir des hiPSCs, c'est l'induction neurale alors que la deuxième étape concerne la différenciation de ces rosettes en NSC.

En pratique, les hiPSCs sont découpées en petits agrégats sous une loupe binoculaire. Ces agrégats sont alors placés en suspension durant 6 heures en présence du milieu d'induction neurale contenant du N2B27, la Noggin (inhibiteur des BMPs) et le SB431542 (inhibiteur du TGF $\beta$ ) afin d'éliminer les facteurs sécrétés par les MEFs. A l'issue de cette phase de culture en suspension, les agrégats sont transférés dans des boîtes de Pétri dont le fond en plastique a été recouvert successivement par de la poly-L-ornithine et de la laminine qui permettent leur adhésion. Les agrégats vont être cultivés dans ce même milieu, complémenté en FGF2 jusqu'à l'apparition des rosettes neurales qui reproduisent l'aspect du tube neural coupé transversalement dès 5 jours de mise en différenciation (Figure 2B, Lustremant et *al.*).

A ce stade, les rosettes neurales sont classiquement dissociées grâce à la trypsine puis placées dans des boîtes recouvertes successivement par de la poly-L-ornithine et de la laminine. Le milieu d'induction neurale est alors remplacé par du milieu de différenciation neurale contenant du N2B27, de l'EGF (pour *Epidermal Growth Factor*) et du FGF2 ainsi que du BDNF (pour *Brain-Derived Neurotrophic Factor*) qui favorise la survie des cellules. Ces facteurs permettent la transition des cellules organisées en rosettes neurales en NSC. Cependant, l'application de cette partie du protocole aux rosettes neurales issues hiPSCs a mené à des populations cellulaires hétérogènes qui finissaient par ne plus adhérer au support et mouraient alors que les rosettes neurales de départ étaient homogènes, présentaient une morphologie classique et exprimaient PAX6 (Figure 113).



**Figure 113 : caractérisation des rosettes neurales issues d'hiPSCs.** En haut) photographie au microscope à contraste de phase montrant les rosettes neurales à 5 jours de différenciation ; en bas) immunomarquages à 8 jours de différenciation de PAX6 (rouge), OCT4 (vert), les noyaux sont marqués par le DAPI (bleu). Barres d'échelle : 200 $\mu$ m.

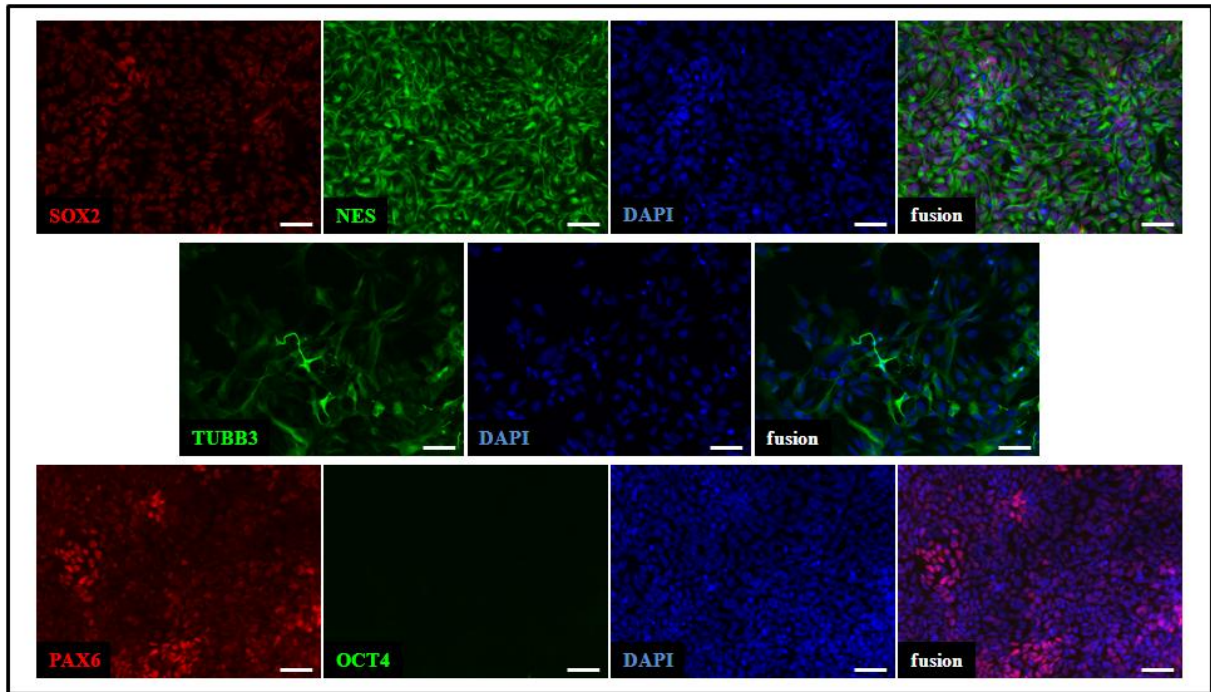


La phase du protocole concernant la différenciation des rosettes neurales en NSC a alors été adaptée en ajoutant une étape de sélection mécanique des rosettes sous le contrôle d'une loupe binoculaire. Après sélection, les rosettes neurales sont placées, sans dissociation afin de maintenir leur structure intacte, sur des boîtes recouvertes successivement par de la poly-L-ornithine et de la laminine en présence du milieu de différenciation en NSC. Les futures NSC colonisent jour après jour le support en émergeant peu à peu des rosettes sélectionnées. Lorsque la confluence est maximale, un passage enzymatique à l'aide de trypsine est réalisé afin d'obtenir un tapis homogène de NSC (Figure 2C, Lustremant *et al.*). Les NSC sont capables de se différencier à leur tour en neurones en supprimant du milieu les facteurs EGF et FGF2 tout en maintenant la présence de BDNF qui va favoriser leur survie. Ainsi, les NSC ont été capables de former des réseaux neuronaux dès 7 jours de mise en différenciation (Figure 2D, Lustremant *et al.*).

Cette adaptation du protocole m'a permis de générer trois différenciations de NSC pour chacune des 9 lignées (5 ACL et 4 sauvages) soit un total de 27 lignées d'NSC. Ces lignées ont pu être congelées et sont actuellement stockées dans de l'azote.

#### **III.2.2.2.2 Caractérisation des NSC**

Les lignées de NSC ont été caractérisées en se basant sur les critères de qualité propres à l'institut qui rejoignent ce qui est décrit dans la littérature. Ainsi, l'analyse de l'expression protéique réalisée par immunocytochimie a révélé la présence du marqueur nucléaire d'auto-renouvellement SOX2 et des marqueurs neuraux spécifiques : NES, PAX6, la faible expression du marqueur des neurones post-mitotiques TUBB3 et l'absence du marqueur de pluripotence OCT4 (Figure 114). Ces données suggèrent qu'il est possible d'obtenir des populations homogènes de NSC sans contamination neuronale majeure.



**Figure 114 : caractérisation par immunocytochimie des NSC issues d’hiPSCs.** En haut) forte expression des marqueurs SOX2 nucléaire (rouge) et NES cytoplasmique (vert) ; au milieu) faible expression du marqueur TUBB3 (vert) ; en bas) expression du marqueur nucléaire PAX6 (rouge) et absence du marqueur de pluripotence OCT4 (vert). Pour l’ensemble des immunomarquages, les noyaux sont marqués par le DAPI (bleu). Barres d’échelle : 50µm.

L’analyse du profil d’expression génique par qPCR (pour *quantitative Polymerase Chain Reaction*) montre la présence du marqueur neurectodermique *SOX1* et des marqueurs neuronaux, *PAX6*, *NES* ainsi que des marqueurs des crêtes neurales *SNAI2* et *MSI1* (Figure 2F, Lustremant et *al.*).

Enfin, la caractérisation du réseau neural a été réalisée par immunocytochimie et a révélé une expression normale de la protéine neuronale HuC/HuD (>30-50% des cellules), du marqueur nucléaire d’auto-renouvellement SOX2 (<40-60%) et une forte expression du marqueur des neurones post-mitotiques TUBB3 (≈100%) (Figures 2G et 2H, Lustremant et *al.*).

L’ensemble de ces caractérisations, indiquent que nous disposons de différentes lignées de NSC homogènes.

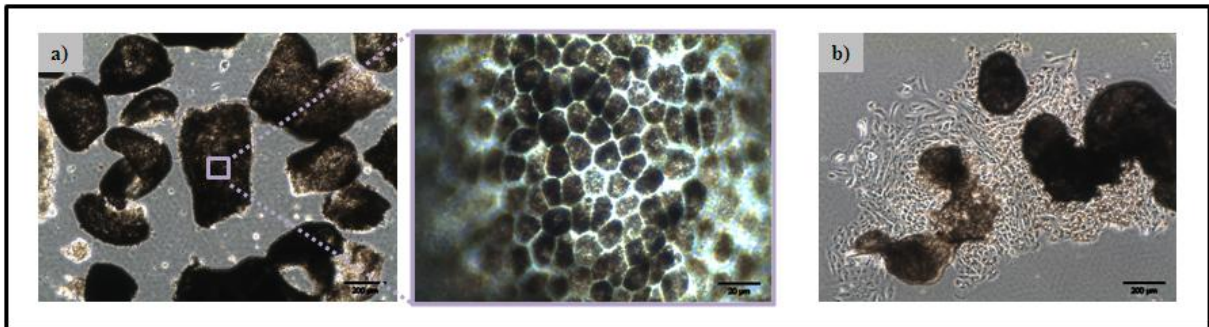
### III.2.2.3 Obtention et caractérisation des cellules de l’EPR

#### III.2.2.3.1 Obtention des cellules de l’EPR

Tout comme décrit dans la littérature, les cellules de l’EPR ont été générées en soustrayant le FGF2 des cultures d’hiPSCs arrivées à très forte confluence et en complétant le milieu en sérum. Après deux semaines de mise en différenciation, les premières zones pigmentées contenant les cellules de l’EPR apparaissent (Figure 3B, Lustremant et *al.*). Lorsque ces zones atteignent une taille suffisante pour être découpées mécaniquement, sous le contrôle d’une loupe binoculaire, elles sont placées sous



forme de petits morceaux sur Matrigel. Les cellules de l'EPR prolifèrent alors à partir de ces agrégats (**Figure 115**) et forment peu à peu une monocouche de cellules pigmentées (Figure 3C, Lustremant et *al.*).



**Figure 115** : passage mécanique des zones pigmentées contenant les cellules de l'EPR dérivées d'hiPSCs. a) à gauche, fragments de zones pigmentées sélectionnés mécaniquement placés sur Matrigel, barre d'échelle : 200µm, à droite, agrandissement d'un fragment de zone pigmentée présentant les cellules de l'EPR pavimenteuses et pigmentées, barre d'échelle 20µm ; b) prolifération des cellules de l'EPR en adhérence sur Matrigel 3 jours après le passage mécanique, barre d'échelle 200µm.

Pour permettre l'amplification des cellules de l'EPR nous avons utilisé du Matrigel comme support des cellules. Pour le développement de cribles à haut débit de molécules à potentiel thérapeutiques, le Matrigel peut représenter un handicap car c'est un milieu non défini dont les composants peuvent entrer en interactions avec les molécules chimiques à tester. Par ailleurs, il crée un support, en relief, inhomogène qui peut lui aussi affecter les résultats obtenus. Nous avons utilisé de la laminine comme substituant du Matrigel, cependant les cellules de l'EPR n'ont pas montré d'adhérence et de prolifération quelque soit la concentration cellulaire utilisée et la concentration de la laminine.

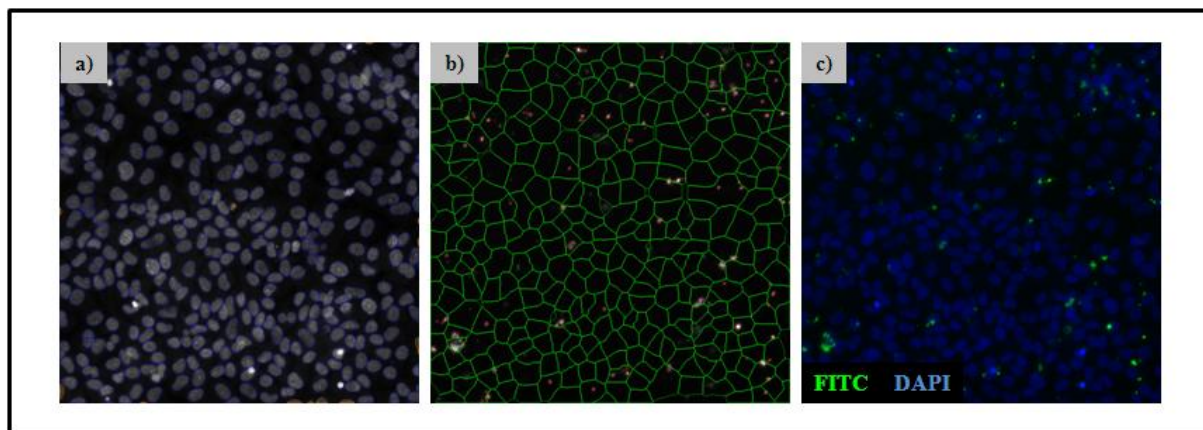
### III.2.2.3.2 Caractérisation des cellules de l'EPR

Les cellules de l'EPR ont été caractérisées par des analyses protéique, génique et fonctionnelle. Ainsi, l'analyse de l'expression protéique réalisée par immunocytochimie a révélé la présence de protéines des jonctions serrées grâce à ZO-1 et le marquage nucléaire du facteur de transcription MITF caractéristique des mélanocytes et de l'EPR (Figure 3D, Lustremant et *al.*). Cette coexpression est caractéristique des cellules de l'EPR.

L'analyse du profil d'expression génique par qPCR montre la perte des marqueurs de pluripotence *POU5F1* et *NANOG*, l'expression du marqueur neural *PAX6*, et une plus forte expression des marqueurs spécifiques de l'EPR à savoir *RPE65*, *BEST1* (pour bestrophin 1) et *MITF* (Figure 3E, Lustremant et *al.*).

Enfin, l'analyse fonctionnelle des cellules a été réalisée en testant leur propriété de phagocytose après 1 heure et 3 heures de mise en contact des cellules de l'EPR avec des segments externes des

photorécepteurs (SEP) porcins fluorescents. Pour ce test, les cellules de l'EPR sont placées en adhérence dans des plaques 96 puits dont le fond est recouvert de Matrigel. Le lendemain, les SEP fluorescents sont mis en suspension au contact des cellules. Après 1 heure et 3 heures, les SEP non phagocytés sont éliminés par simple rinçage des plaques. Deux mesures de fluorescence sont effectuées : la première permet de délimiter les contours des noyaux qui sont visualisés grâce au DAPI, la seconde permet d'identifier la présence des SEP par la mesure de FITC (pour *fluorescein isothiocyanate*) (**Figure 116**).



**Figure 116** : mesure de l'activité de phagocytose par l'Arrayscan VTI HCS Reader. a) délimitation des contours des noyaux grâce au marquage par le DAPI ; b) identification des SEP fluorescents par des paramètres de segmentation autour des noyaux ; c) photographie illustrant la fluorescence simultanée des noyaux (bleu) et des SEP (vert). Objectif x20.

L'index phagocytaire est calculé en comptabilisant le nombre de cellules possédant au moins un SEP par rapport au nombre de cellules total. Il en résulte que les capacités de phagocytose des cellules de l'EPR dérivées d'hiPSCs ACL sont similaires à celles dérivées d'hiPSCs saines, toutes deux différant de la lignée contrôle d'ARPE-19 (Figure 3F, Lustremant et *al.*). Cette différence d'index phagocytaire est également retrouvée, dans la même proportion, dans les cellules de l'EPR dérivées de CSEh.

L'ensemble de ces caractérisations suggèrent que nous disposons de cellules de l'EPR fonctionnelles.

Les cellules de l'EPR dérivées d'hiPSCs saines et mutées ont été congelées cependant, ne disposant pas du protocole de congélation adéquat, leur décongélation s'est avérée infructueuse, la mortalité dépassant les 50%.

### III.2.3 Recherche de biomarqueurs

Nous avons entrepris de rechercher la présence de la GUCY2D dans les NSC en détectant son ARN messager par qPCR ou la protéine par Western Blot. Ces études se sont révélées infructueuses en terme de détection, nous avons alors choisi d'effectuer une analyse basée sur les ressources cellulaires dont nous disposons (dite *ressource driven*). Cette recherche s'effectue sans *a priori* et permet d'identifier des différences entre les cellules saines et mutées par une méthode exhaustive comme le transcriptome dans le but d'identifier des gènes dérégulés pouvant refléter l'action pathologique ou compensatrice de la mutation sur des voies métaboliques.

Nous avons réalisé deux analyses transcriptomiques afin de générer des profils d'expression différentielle entre les cellules ACL et les cellules saines, contrôles, pour les NSC et les cellules de l'EPR. Ces études se sont basées sur l'utilisation de puces Affymetrix GeneChip® Human Exon 1.0 ST Array qui contiennent quatre sondes par exon et environ 40 sondes par gène. Ces puces permettent de tester simultanément l'expression de 32 778 gènes humains.

#### III.2.3.1.1 Choix des échantillons à analyser

Concernant les échantillons à analyser, nous disposons en termes d'hiPSCs, d'un clone de la lignée GM03852 (femelle ACL), des 4 clones de la lignée GM05300 (mâle ACL), de 3 clones de la lignée GM04603 (mâle sain) et d'un clone de la lignée CRL2097 (mâle sain). Pour obtenir des résultats fiables (résultats statistiques robustes), la logique aurait voulu que l'ensemble des clones soient testés afin d'avoir le plus grand nombre d'échantillons possible sachant par ailleurs que, pour une lignée donnée, un triplicat biologique doit être analysé. Ainsi, nous avons choisi d'analyser l'ensemble des lignées soit GM03852, GM05300, GM04603 et CRL2097 en restreignant le nombre de clones.

#### III.2.3.1.2 Analyse transcriptomique des NSC

Concernant la première analyse menée sur les NSC, nous avons choisi d'analyser les profils d'expression différentielle de trois lignées de NSC porteuses de l'ACL contre quatre lignées de NSC saines. Ainsi, ont été comparés les profils génétiques de trois réplicats biologiques de NSC provenant du clone 1 de la lignée GM03852 (femelle ACL), des clones 4 et 5 de la lignée GM05300 (mâle ACL), des clones 1, 27 et 28 de la lignée GM04603 (mâle sain) et du clone 3 de la lignée CRL2097 (mâle sain) soit un total de 9 échantillons ACL et 12 échantillons sains. Les tests qualité propres à la société prestataire ont amené à écarter un échantillon sain de l'analyse.

La recherche d'expression génique différentielle a d'abord été réalisée de manière indépendante en testant les 3 échantillons NSC GM03852 contre les 11 échantillons sains et les 6 échantillons NSC GM05300 contre les 11 échantillons sains. Cependant, les listes de gènes différentiellement exprimés dans ces populations n'étaient pas spécifiques des fonctions visuelles et par ailleurs la robustesse des tests statistiques était mise à mal en raison du faible nombre d'échantillons ACL. Nous avons alors

entrepris de tester les 9 échantillons ACL contre les 11 échantillons sains. L'analyse a révélé 413 gènes modulés dans les NSC ACL dont 50 sont sur-exprimés et 363 sous-exprimés (Figure 117).

### III.2.3.1.3 Analyse transcriptomique des cellules de l'EPR

Concernant l'analyse des cellules de l'EPR nous avons voulu nous placer dans les mêmes conditions que pour celle des NSC. Nous voulions comparer les mêmes échantillons cependant l'obtention de cellules de l'EPR à partir des clones 1 de la lignée GM04603 (mâle sain) et 3 de la lignée CRL2097 (mâle sain) s'est avérée être un échec. En effet, l'apparition de la pigmentation était aléatoire et très longue (supérieure à 1 mois). Par ailleurs, après sélection de mécaniques de ces zones et repiquage sur Matrigel, la lenteur de l'amplification ne nous a pas permis d'obtenir dans les temps trois réplicats biologiques caractérisés pour l'analyse transcriptomique. Ne disposant pas d'autres fibroblastes sains ayant été reprogrammés dans les mêmes conditions que les fibroblastes ACL (rétrovirus, 4 facteurs OKSM, culture sur MEFs), l'analyse a été effectuée sur les cellules de l'EPR provenant du clone 1 de la lignée GM03852 (femelle ACL), des clones 4 et 5 de la lignée GM05300 (mâle ACL) et des clones 27 et 28 de la lignée GM04603 (mâle sain). Cette étude a conduit à identifier 188 gènes dérégulés dans les RPE ACL dont 113 sont sur-exprimés et 75 sous-exprimés (Figure 117).

### III.2.3.1.4 Choix des gènes biomarqueurs candidats

Chacun des gènes différemment exprimés dans les populations ACL, peut, *a priori*, être considéré comme un candidat biomarqueur de l'ACL associé à l'expression de la mutation causale. Sur l'ensemble de ces gènes, aucun d'eux n'ayant été relié directement à la fonction visuelle, nous nous sommes alors focalisés sur les gènes les plus fortement dérégulés, communs aux deux populations cellulaires, les NSC et les cellules de l'EPR (Figure 117).

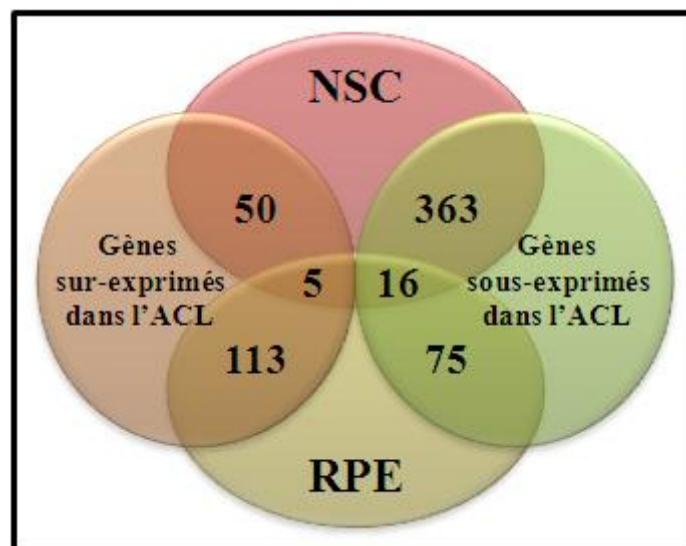
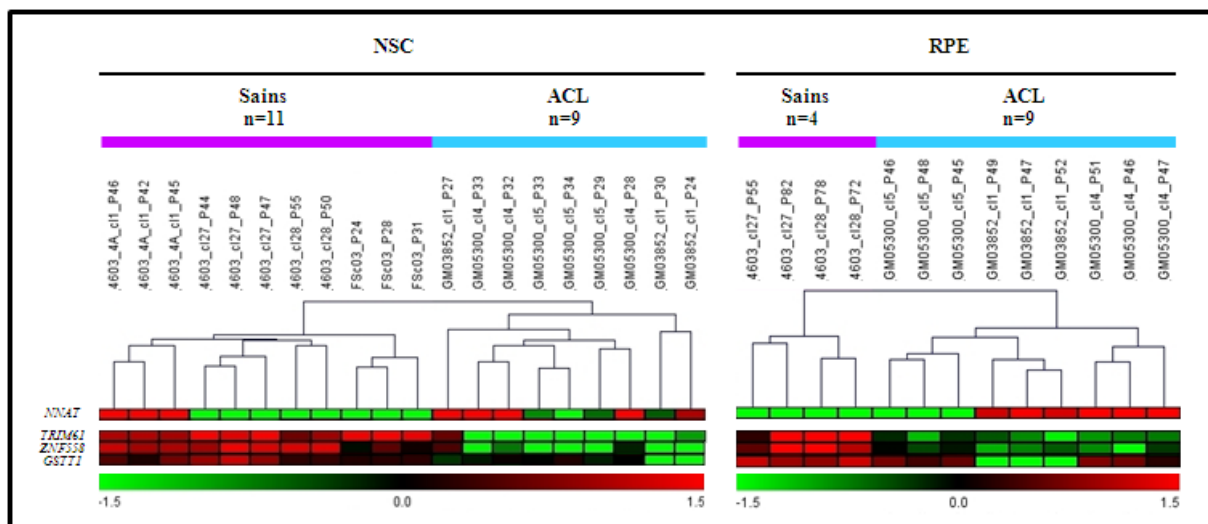


Figure 117 : représentation sous forme de diagramme de Venn des gènes dérégulés dans les populations de NSC et de cellules de l'EPR porteuses de l'ACL comparativement aux populations saines. Les NSC ACL

(rouge) comptent 50 gènes sur-exprimés (orange) et 363 sous-exprimés (vert). Les RPE ACL (kaki) comptent 113 gènes sur-exprimés (orange) et 75 sous-exprimés (vert). Enfin, 5 gènes sont communément sur-exprimés (orange) et 16 gènes sont communément sous-exprimés (vert).

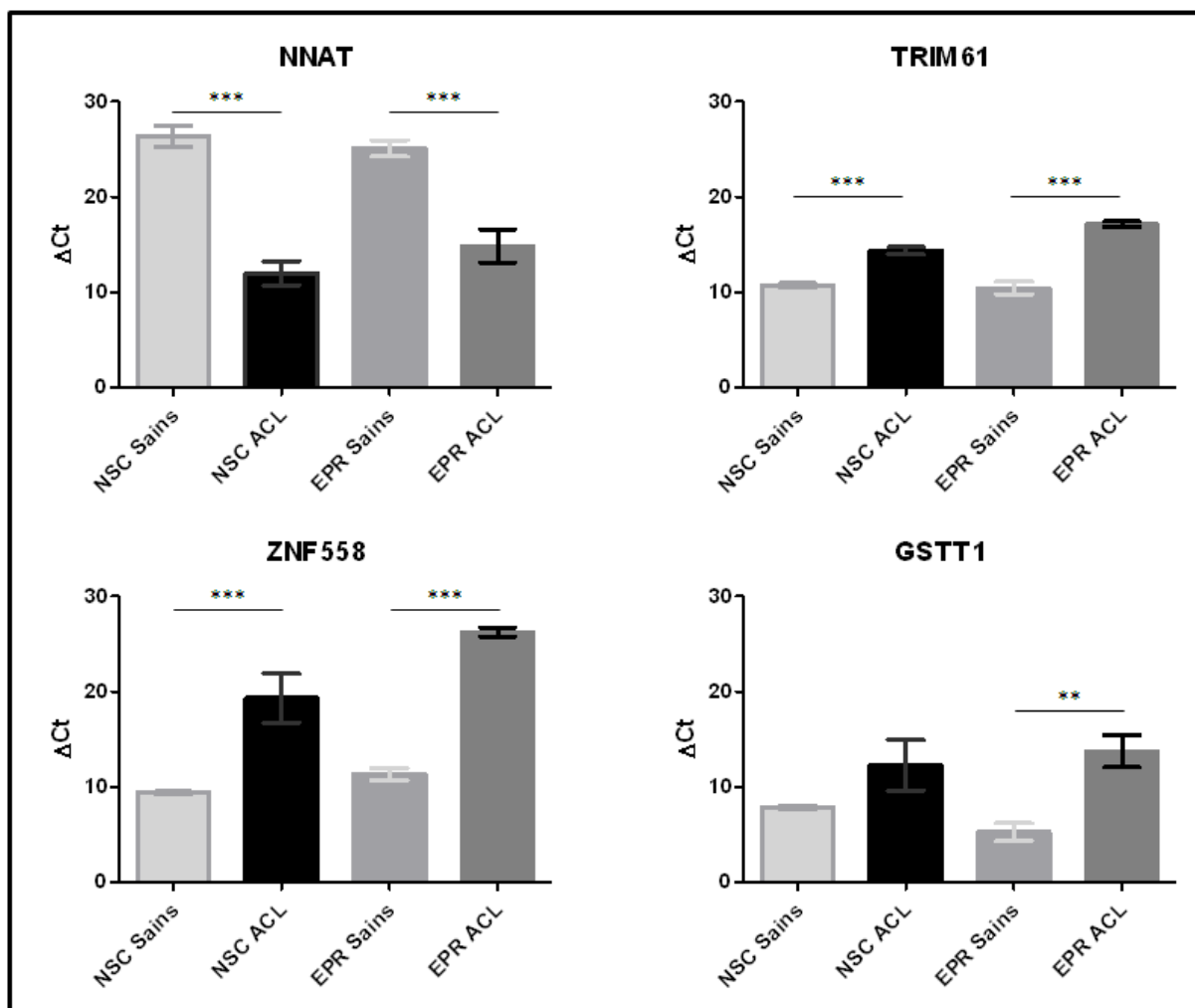
Ainsi, parmi les 21 gènes qui voient leur expression modulée dans les deux populations ACL comparativement aux lignées contrôles nous avons choisi d'orienter nos recherches sur 4 gènes fortement dérégulés à savoir *NNAT* (pour Neuronatin) qui est sur-exprimé alors que les trois autres gènes, *GSTT1* (pour glutathione S-transferase theta 1), *TRIM61* (pour tripartite motif containing 61) et *ZNF558* (pour zinc finger protein 558) sont sous-exprimés dans les cellules ACL comparativement aux populations saines (Table 2, Lustremant et al.). Pour les gènes *NNAT* et *GSTT1*, des variations d'expression entre les échantillons d'une même population cellulaire (NSC/cellule de l'EPR) existent (Figure 118).



**Figure 118** : analyses transcriptomiques des gènes *NNAT*, *TRIM61*, *ZNF558* et *GSTT1* dans les NSC et les cellules de l'EPR, saines et porteuses d'ACL. Cette représentation montre les regroupements hiérarchiques, dans chacune des populations (NSC/EPR), des échantillons sains d'une part et porteurs de l'ACL d'autre part selon leur profil d'expression génique. La couleur verte indique la sous-expression du gène, la couleur rouge indique la sur-expression du gène pour l'échantillon considéré. Pour le gène *NNAT*, globalement sur-exprimé dans les populations ACL, les profils d'expression diffèrent au sein du groupe « sains » et du groupe « ACL » pour chaque population cellulaire alors que pour le gène *GSTT1*, qui est lui globalement sous-exprimé dans les populations ACL, ce sont les échantillons issus de la lignée GM03852 qui semblent les plus fortement sous-exprimés (vert fluo).

### III.2.3.1.5 Validation des dérégulations issues des analyses transcriptomiques

Pour valider les données issues du transcriptome, nous avons recherché la présence des ARNm de ces 4 gènes dans les échantillons de NSC et de cellules de l'EPR ACL et saines par qPCR (Figure 119).

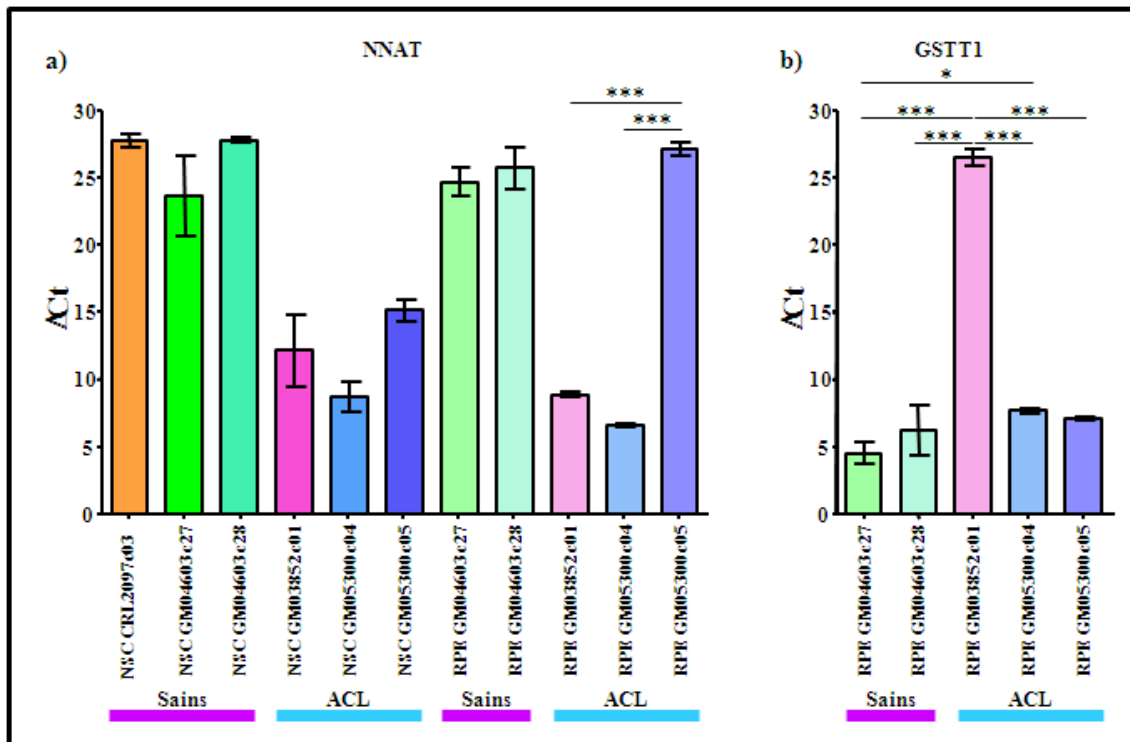


**Figure 119** : analyses en qPCR des ARNm des gènes *NNAT*, *TRIM61*, *ZNF558* et *GSTT1* dans les NSC et les cellules de l'EPR, normalisés par rapport au 18S. Représentation de la moyenne des  $\Delta$ Ct de 9 échantillons de NSC sains, 9 échantillons de NSC ACL, 14 échantillons de cellules de l'EPR sains et 30 échantillons de cellules de l'EPR ACL. Moins il y a d'ARNm détecté dans l'échantillon, plus le Ct est grand, ainsi les valeurs de  $\Delta$ Ct sont inversement proportionnelles à la quantité de l'ARNm. *NNAT* est sur-exprimé dans les populations de NSC et de cellules de l'EPR ACL alors que les gènes *TRIM61* et *ZNF558* sont sous-exprimés dans ces populations. Concernant le gène *GSTT1*, la confirmation de cette sous-expression dans la population ACL est uniquement significative pour les cellules de l'EPR. La significativité statistique des données de  $\Delta$ Ct obtenues pour chaque population cellulaire a été évaluée par une analyse de la variance à un facteur de variabilité (one-way ANOVA) suivi d'un test de comparaison multiple de Bonferonni pour réaliser la comparaison entre les groupes. Les valeurs de probabilité inférieures à 5% ont été considérées comme significatives. Avec \*\*\* p-value  $\leq 0,1\%$  et \*\* p-value  $\leq 1\%$ .

Ces analyses valident, en partie, les résultats obtenus par les analyses transcriptomiques. Ainsi, *NNAT* est sur-exprimé dans les populations de NSC et de cellules de l'EPR ACL alors que les gènes *TRIM61* et *ZNF558* sont sous-exprimés dans ces populations. Concernant le gène *GSTT1*, la confirmation de cette sous-expression dans la population ACL est uniquement significative pour les cellules de l'EPR.



Puis nous avons étudié plus précisément les variations d'expression entre les échantillons (les différents clones) d'une même population cellulaire (NSC/ cellules de l'EPR) (**Figure 120**) pour les gènes *NNAT* et *GSTT1* dont les profils d'expression inter-clone diffèrent (**Figure 118**).



**Figure 120** : analyses clone par clone des résultats obtenus par analyses qPCR des ARNm des gènes *NNAT* et *GSTT1* dans les NSC et les cellules de l'EPR, normalisés par rapport au 18S. Représentation de la moyenne des  $\Delta C_t$  de NSC CRL2097c03 (n=3), GM04603c27 (n=3), GM04603c28 (n=3), GM03852c01 (n=3), GM05300c04 (n=3), GM05300c05 (n=3), de cellules de l'EPR GM04603c27 (n=8), GM04603c28 (n=6), GM03852c01 (n=10), GM05300c04 (n=9), GM05300c05 (n=11). a) pour le gène *NNAT*, il n'y a pas de différence significative inter-clone entre les échantillons de NSC sains, entre les échantillons de NSC ACL et entre les échantillons d'EPR sains cependant le profil d'expression des échantillons de cellules de l'EPR issus du clone 5 de la lignée GM05300 diffère significativement des profils d'expressions des échantillons issus des clones 1 de la lignée GM03852 et 4 de la lignée GM05300. Ce profil n'est pas significativement différent des profils des échantillons de l'EPR sains ; b) pour le gène *GSTT1*, les profils d'expression des échantillons issus du clone 1 de la lignée GM03852 diffèrent significativement des profils d'expressions des autres échantillons. La significativité statistique des données de  $\Delta C_t$  obtenues a été évaluée par une analyse de la variance à deux facteurs de variabilité (two-way ANOVA) suivi d'un test de comparaison multiple de Bonferroni pour réaliser la comparaison entre les groupes. Les valeurs de probabilité inférieures à 5% ont été considérées comme significatives. Avec \*\*\* p-value  $\leq 0,1\%$  et \* p-value  $\leq 5\%$ .

Les résultats obtenus suite à cette analyse confirment que, pour le gène *NNAT* et plus spécifiquement pour les cellules de l'EPR, les échantillons issus de la lignée GM05300 clone 5 diffèrent significativement des autres échantillons porteurs de l'ACL, leurs profils ne différant pas des



échantillons sains. Ainsi, le gène *NNAT* est significativement sous-exprimé dans les échantillons de cellules de l'EPR issus de la lignée GM05300 clone 5. Pour le gène *GSTT1*, la confirmation de la sous-expression dans la population ACL est uniquement significative pour les cellules de l'EPR (**Figure 119**). L'analyse, entre les différents échantillons, confirme les résultats de l'analyse transcriptomique, à savoir que, pour les cellules de l'EPR, le gène *GSTT1* est significativement sous-exprimé dans les échantillons issus de la lignée GM03852 clone 1 (**Figure 120**).

L'ensemble des matériels, méthodes et résultats de ces travaux de recherche sont détaillés ci-après et dans l'article en cours de soumission (23/10/2012 au journal Cell Reprogramming).

### III.3 Article en cours de soumission

#### **Human induced pluripotent stem cells reveal early developmental molecular correlates with a probable Leber congenital amaurosis type I**

Céline Lustremant<sup>1,2</sup>, Walter Habeler<sup>1,2,3</sup>, Alexandra Plancheron<sup>1,2,3</sup>, Olivier Goureau<sup>4A,B,C</sup>, Lydie Grenot<sup>1,2,3</sup>, Pierre de la Grange<sup>5</sup>, Isabelle Audo<sup>4A,B,C,6</sup>, Emeline F. Nandrot<sup>4A,B,C</sup> Christelle Monville<sup>1,2</sup>.

<sup>1</sup>INSERM U861, I-STEM, AFM, Evry 91030 cedex France ; <sup>2</sup>UEVE U861, I-STEM, AFM, Evry 91030 cedex, France ; <sup>3</sup>CECS, I-Stem, AFM, Evry 91030 cedex, France ; <sup>4A</sup> Institut de la Vision, INSERM, U968, <sup>4B</sup>UPMC Univ Paris 06, UMR\_S968, <sup>4C</sup>CNRS, UMR\_7210, 17 rue Moreau, Paris, F-75012, France ; <sup>5</sup>GenoSplice Technology, Paris, France ; <sup>6</sup>Centre Hospitalier National d'Ophthalmologie des Quinze-Vingts, INSERM-DHOS CIC 503, Paris, F-75012, France.

Correspondence should be addressed to Christelle Monville, [cmonville@istem.fr](mailto:cmonville@istem.fr)

Grants : This work was supported by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), University Evry Val d'Essonne (UEVE), Association Française contre les Myopathies (AFM), and Genopole. None of the authors of this manuscript have a financial interest related to this work.

#### **Abstract**

Our purpose was to investigate genes and molecular mechanisms involved in patients with Leber congenital amaurosis (LCA) and to model this type of LCA for drug screening. Fibroblasts from two unrelated clinically-identified patients with yet undetermined gene mutation were reprogrammed to pluripotency by retroviral transduction. These human induced Pluripotent Stem Cells (hiPSCs) were

differentiated into neural stem cells (NSC) that mimicked the neural tube stage and retinal pigmented epithelial (RPE) cells that could be targeted by the disease. A genome wide transcriptome analysis was performed with Affymetrix Exon Array GeneChip®, comparing LCA-hiPSCs derivatives to controls. Genomic search for alteration in all genes known to be involved in LCA revealed a G to T switch at position 154 on exon 2 of the *GUCY2D* gene, which appeared as a candidate for a disease related mutation. The hiPSCs expressed the key pluripotency factors, and formed embryoid bodies *in vitro* containing cells originating from all three germ layers. They were successfully differentiated into NSC and RPE cells. One gene up-regulated in LCA cell populations, *NNAT* and three genes down-regulated, *GSTT1*, *TRIM61* and *ZNF558* were identified, with potential correlates for molecular mechanisms of this type of LCA, in particular for protein degradation and oxidative stress. The two LCA-patient-specific iPSC lines will contribute to model LCA phenotypes and screening candidate drugs.

## **Introduction**

Retinitis pigmentosa (RP) is the most common form of inherited retinal dystrophies. RP is genetically heterogeneous leading to a wide physiopathological variety (Rivolta et al., 2002; Hims et al., 2003). Characterized by a progressive loss of rod photoreceptors then cones and retinal pigmented epithelial (RPE) cells, RP encompasses many diseases. Among those, Leber congenital amaurosis (LCA) is the most severe retinal dystrophy causing blindness or severe visual impairment before the age of 1 year (den Hollander et al., 2008). LCA represents a group of hereditary retinal diseases characterized and unified by the following constellation of four clinical features: severe and early visual loss, sensory nystagmus, amaurotic pupils, and absent or defective electrical signals on electroretinogram (ERG) (Leber, 1869; FRANCESCHETTI and DIETERLE, 1954). In most cases, LCA is an autosomal recessive disease associated with mutations that have been already reported in 18 different genes (Banerjee et al., 1998; Chiang et al., 2012; Dryja et al., 2001; Estrada-Cuzcano et al., 2011; Falk et al., 2012; Freund et al., 1998; Friedman et al., 2006; Gerber et al., 2001; den Hollander et al., 2001, 2006, 2007; Jordan et al., 1993; Keen et al., 2003; Koenekoop et al., 2012; Lotery et al., 2001; Marlhens et al., 1997; Morimura et al., 1998; Perrault et al., 1996, 2004, 2012; Sergouniotis et al., 2011; Sohocki et al., 2000; Stockton et al., 1998; Thompson et al., 2001; Wang et al., 2009; Zeitz et al., 2006). These genes participate in a wide variety of retinal functions including, *e.g.*, phototransduction (*GUCY2D*), retinoid metabolism (*RPE65*), or photoreceptor differentiation (*CRX*). This wide genetic heterogeneity explains only 70% of the LCA cases and identification of the remaining genes is the focus of intensive research, and no safe therapy or cure (Baehr and Frederick, 2009), although therapeutic gene replacement clinical trials have commenced (Ali et al., 2000; Acland et al., 2001; Bainbridge et al., 2008; Cideciyan et al., 2008; Hauswirth et al., 2008; Maguire et al., 2008, 2009; Simonelli et al., 2010; Stieger et al., 2011).

In most cases, there is only rudimentary understanding of the molecular mechanisms leading to retinal degeneration in LCA. While animal models are available for a few mutations (chicken (Perrault et al., 2000), mouse (Batten et al., 2004; Dyer et al., 2004; Ramamurthy, 2004; Redmond et al., 1998; Rolling, 2004; Yang et al., 1999), dog (Aguirre et al., 1998) and zebrafish (Stiebel-Kalish et al., 2012)), there is clearly a need for *in vitro* models that would allow exploring pathological mechanisms in a dish, and may be used in a search for treatment. Induced pluripotent stem cells (iPSCs) may be a unique tool to meet those challenges. Produced by genetic reprogramming of somatic cells from human donor that could be of interest, because of a clinical phenotype or an identified disease-related mutation (Takahashi et al., 2007), iPSCs have been proposed as an inexhaustible source of cells (Stadtfeld and Hochedlinger, 2010; González et al., 2011) because of their similarities in capacity of self-renewal and pluripotency to embryonic stem cells (Thomson et al., 1998).

Patient-specific iPSCs have been derived as sources for drug screening, toxicology, cell replacement therapy as well as generating disease models (Chun et al., 2011). These cells could provide a valuable tool for exploring LCA as, cells of interest for the pathology, like neural stem cells (NSC) and RPE cells can be generated. Quite particularly, hiPSCs derivatives that are obtained after only a few weeks of differentiation may open the possibility to study early developmental defects associated with LCA that occur well before the retina is functional, *i.e.* allow us to identify initial mechanisms that may eventually lead over time to cell dysfunction and death.

Accordingly, the present study has been undertaken in order to establish a human patient-specific model of LCA that could be harnessed for exploring molecular mechanisms associated with the disease. We report the generation of disease-specific iPSCs from clinically affected LCA patients with a yet unknown mutation. Genomic analysis points to *GUCY2D* as a candidate causal gene, referenced as the LCA type I (OMIM \*600179 and #204000). Human iPSCs differentiation into NSC and RPE cells at near-homogeneity has allowed us to perform a whole-genome transcriptomic analysis that revealed differential expression of 4 genes, the dysfunction of which may be associated with early developmental defects in LCA type I.

## **Material and methods**

### Human cell sources

Two LCA fibroblast lines and one normal fibroblast line were purchased from Coriell Institute (Camden, NJ, USA). The mutated GM03852 line was established from a two year-old Caucasian female and the mutated GM05300 from a nine year-old Caucasian male. The wild-type cells GM04603 were derived from an adult Caucasian male. The other normal adult fibroblastic CRL2097 (46, XY) and normal adult RPE, ARPE-19, cell lines were purchased from the American Type Culture Collection (ATCC, France).

### Mutation detection

The two LCA fibroblast lines GM03852 and GM05300 were sent to Asper Ophthalmics (Asper Biotech, Tartu, Estonia) to determine which mutations are expressed in those cells. LCA microarray chips containing 641 disease-associated sequence variants associated with LCA or early-onset retinitis pigmentosa genes were used.

### Production of retroviral vectors using Platinum-A cells

The Platinum-A Retroviral Packaging Cell Line, Amphotropic (Plat-A cells, Cell Biolabs, San Diego, CA, USA) were maintained in “Plat-A medium” consisting of DMEM + GlutamaxII (High Glucose) supplied with 10% FBS, 1 mM Sodium Pyruvate, 50  $\mu$ M 2-mercaptoethanol (all from Invitrogen, France). The Platinum-A cells were seeded (150,000 cells/cm<sup>2</sup>) on 0.1% gelatin (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) coated cell culture dishes (TPP, St. Louis, MO, USA). Ten microgram of pMIG-OCT4, pMIG-KLF4, pMIG-c-Myc, pMIG-SOX2 (Addgene, Cambridge, MA, USA) were transfected into viral packaging Plat-A cells using Fugene (Roche, France). Supernatants were collected 48h post transfection and filtered through a 0.45  $\mu$ m pore size filter and supplemented with 4  $\mu$ g.ml<sup>-1</sup> of polybrene (Sigma Aldrich). The “retroviral mix” contained the four transcription factors in equal quantities.

### Reprogramming of human fibroblasts

All Fibroblast lines were cultured using DMEM High Glucose supplemented with 10% FBS (both from Thermo Fisher Scientific, France), 1 mM Sodium Pyruvate, 1X MEM non-essential amino acids, 2 mM L-Glutamine, 100 Units.ml<sup>-1</sup> Penicillin and 100  $\mu$ g.ml<sup>-1</sup> Streptomycin (all from Invitrogen). This medium was called “fibroblast medium”. The day before reprogramming, fibroblasts were seeded at 5,000 cells/cm<sup>2</sup>. “Fibroblast medium” was replaced by 1ml/well of the retroviral mix. Four days after transduction, cells were trypsinized (0.05% Trypsin-EDTA, Invitrogen) and plated (5,000 cells/cm<sup>2</sup>) on 0.1% gelatin coated plates. Twenty four hours after, the medium was removed and cells were cultured using DMEM/F12 (1:1) Glutamax medium supplemented with 20% KnockOut™ SR, 1X MEM non-essential amino acids, 0.05 mM 2-mercaptoethanol (all from Invitrogen) and 10 ng.ml<sup>-1</sup> FGF2 (PeproTech, Rocky Hill, NJ, USA). This medium was called “iPS medium”. To improve the efficiency of reprogramming, during the first ten days, medium was supplemented with 500  $\mu$ M valproic acid (Sigma Aldrich). Cells were cultured at 37°C in 5% CO<sub>2</sub> and the medium was changed every day. The cells were observed daily by microscopy until the emergence of hiPSC colonies.

### Culture of hiPSCs

The hiPSC colonies were picked under a stereomicroscope (Vision Engineering Ltd., France) according to their hESC-like colony morphology. They were expanded on-to mitomycin-C inactivated Zenith Mouse Embryonic Fibroblast (MEF) layer feeders (IVFonline.com) seeded at 25,000/cm<sup>2</sup>.

They were fed daily with “iPS medium”. Cells were manually passaged once a week under the stereomicroscope increasing the passage by one every week.

#### Differentiation protocols

##### *Embryoid bodies (EB)*

In order to form EB, hiPSC colonies were mechanically detached from the MEF layer under a stereomicroscope (Vision Engineering Ltd.) then cultured in suspension into ultra low-attachment culture dishes (Corning, France) in DMEM/F12 (1:1) Glutamax medium (Invitrogen) supplemented with 20% FBS (Thermo Fisher Scientific), 1X MEM non-essential amino acids, 0.05 mM 2-mercaptoethanol (both from Invitrogen). Medium was changed every 2-3 days and EB were cultured for 3 weeks.

##### *Neural Stem Cells (NSC)*

To establish NSC, hiPSC colonies were mechanically harvested from the MEF layer under a stereomicroscope then resuspended into small clumps in low attachment culture dishes and cultured using DMEM/F12 (1:1) Glutamax medium containing Neurobasal medium (1:1) supplemented with 2% B27 supplement without vitamin A, 1% N2 supplement and 0.05 mM 2-mercaptoethanol (all from Invitrogen) during 6h at 37°C, 5% CO<sub>2</sub> to remove feeder's factors. This medium was called “N2B27 medium”. To induce Neuro EPithelial cells (NEP) formation, clumps were seeded on 0.0015% poly-L-ornithine (PO, Sigma Aldrich)/2 µg.ml<sup>-1</sup> laminin (Invitrogen) coated culture dishes and cultured using “N2B27 medium” supplemented during one day by 5 ng.ml<sup>-1</sup> FGF2, 300 ng.ml<sup>-1</sup> human Noggin (both from PeproTech), 20 µM SB431542 (Tocris Bioscience, Bristol, United Kingdom) and 10 µM Y-27632 (ROCK inhibitor, Calbiochem, Philadelphia, PA, USA). After neural induction, medium was changed every 2 days by complete “N2B27 medium” without ROCK inhibitor until appearance of NEP (8 days of differentiation). This medium was called “NEP medium”. These NEP contained neuro-epithelial rosette architectures in the center of differentiating areas. Neural rosettes resembling the early neural tube were cut under the stereomicroscope and replated on PO/laminin-coated culture dishes to have a better homogeneous population. To obtain NSC, neural rosettes were cultured using “N2B27 medium” supplemented by 10 ng.ml<sup>-1</sup> human EGF (Epidermal Growth Factor), 20 ng.ml<sup>-1</sup> human BDNF (Brain-Derived Neurotrophic Factor) (both from R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) and 10 ng.ml<sup>-1</sup> FGF2. This medium called “NSC medium” was changed every 2 days. After one week, cells were dissociated in 0.05% Trypsin-EDTA and seeded on PO/laminin-coated culture dishes at 50,000 cells/cm<sup>2</sup>. Medium was changed every 2 days and cells were enzymatically dissociated when they reached the confluence until the phenotype begun to stabilize and permitted to obtain a homogeneous population of NSC (after 5-6 passages). Final differentiation into neurons was done using “Neuron medium” consisting on “NSC medium” without EGF and FGF2. NSC were

enzymatically dissociated and seeded at 50 000 cells/cm<sup>2</sup> on PO/laminin coated plates and medium was changed every 2 days until the neuron network appeared (after 7 days).

#### *Retinal Pigmented Epithelial (RPE) cells*

To establish RPE cells, hiPSCs on feeders were cultured for one week until they reached confluence, after which medium was removed and cells were cultured with DMEM + GlutamaxII (High Glucose) containing 20% KnockOut™ SR (all from Invitrogen) without FGF2. This medium was called “RPE medium”. Pigmented areas began to appear within 2 weeks and allowed to expand until they reached a few millimetres (one more week), with medium changes twice a week. Pigmented areas were mechanically cut under a stereomicroscope using a needle and then placed on 1:30 Matrigel (BD Matrigel™ Basement Membrane Matrix, BD Biosciences, France) coated plate. This first passage was called P0. Medium was changed twice a week until 100% confluence was reached. Then cells were dissociated in 0.05% Trypsin-EDTA and seeded on Matrigel at a density of 100,000 cells/cm<sup>2</sup>. This passage was called P1. They were cultured in DMEM + GlutamaxII (High Glucose) containing 4% KnockOut™ SR. The normal adult RPE line ARPE-19 was used as positive control in phagocytosis assays. It was cultured with DMEM/F12 (1:1) Glutamax medium supplemented with 10% FBS, 0.02 mM L-Glutamine, 1X MEM non-essential amino acids and 0.05 mM 2-mercaptoethanol (all from Invitrogen).

#### Alkaline Phosphatase (AP) Staining

AP staining was performed using SIGMA FAST™ BCIP/NBT (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/Nitro blue tetrazolium) Tablets (Sigma Aldrich) according to manufacturer’s protocol.

#### Karyotype analysis

Actively growing hiPSC colonies (80% confluency) were treated with colchicine (20mg.ml<sup>-1</sup>, Eurobio, France) for 90 min at 37°C. Cells were dissociated with 0.05% Trypsin-EDTA then incubated in 0.075 M KCl (Sigma Aldrich) for 10-14 min at 37°C, followed by fixation with 3:1 methyl alcohol/glacial acetic acid. For mFISH karyotyping, fixed cells were hybridized overnight at 37°C with a denatured “cocktail painting mFISH” probe (MetaSystems, Altusheim, Germany). Slides were washed in successive baths of 1X SSC and 0.4X SSC, and nuclei were stained with 2.5 ng of DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, 250 ng.ml<sup>-1</sup>, MetaSystems). Biotinylated probes were revealed using Cy5 MetaSystems B-tect detection kit (MetaSystems). Ten to twenty metaphases were captured using a Zeiss Z1 fluorescence microscope equipped with a UV HBO 100-W lamp coupled to an AxioCam camera (both from Carl Zeiss, France) and ×20 and ×63 objectives. All the analyzed metaphases were karyotyped using the MetaSystems Isis software (MetaSystems).

### Immunocytochemistry analysis

Cells were fixed for 20 min at room temperature with 4% paraformaldehyde (Euromedex, France). After 3 PBS (Sigma Aldrich) washes, cells on dishes were blocked with a saturating solution consisting of PBS/0.6% Triton X-100/1% Bovine Serum Albumin (all from Sigma Aldrich) and incubated overnight at 4°C with the primary antibodies. The mouse monoclonal anti-Oct3/4 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA) was used at 1:500 to determinate the pluripotency state. In order to characterize NSC and neuron-derived NSC these primary antibodies were used at 1:500: mouse monoclonal anti-Nestin (clone 10C2, Millipore, Billerica, MA, USA), rabbit polyclonal anti-Sox2 (Millipore), 1:200 mouse monoclonal anti-human HuC/HuD neuronal protein (clone 16A11, Invitrogen) which recognized the expressed product of the *ELAVL3/ ELAVL4* genes, 1:2000 mouse monoclonal anti-Neuronal Class III  $\beta$ -tubulin (TUJ1 also known as TUBB3, Eurogentec, Belgium). Finally the following primary antibodies: rabbit polyclonal ZO-1 (Invitrogen) 1:50, a tight junction marker and mouse monoclonal anti-microphthalmia-associated transcription factor MITF (clone D5, Dako France S.A.S, France) 1:200 were used to characterize the RPE cells. Secondary antibodies were goat anti-mouse or goat anti-rabbit Alexa-Fluor-488 and Alexa-Fluor-555 used at 1:500. Nuclei were visualized with 1:10,000 DAPI (all from Invitrogen). Specificity of staining was tested by omission of the primary antibodies. Immunofluorescence analysis was performed using an inverted phase-contrast fluorescence microscope Axiovert 40 CFL and images processed using the Axio-vision software (Zeiss, France).

### Functional testing of RPE cells by phagocytic activity detection

One day before the phagocytic activity detection, RPE cells were seeded at 100,000 cells/cm<sup>2</sup> on 1:30 matrigel-coated plates and cultured into “RPE medium”. The day after, the medium was removed and the RPE cells were incubated for 1 to 3 hours with Photoreceptor Outer Segments (POS). Adapted from (Molday et al., 1987), porcine POS were isolated and coupled with the Fluorescein isothiocyanate (FITC). After washing to remove unbound porcine POS, cells were fixed for 20 min at room temperature with 4% paraformaldehyde and nuclei were visualized with DAPI staining. The ARPE-19 cell line was used as a positive control of phagocytic activity and RPE cells in the absence of POS were used as negative control. Phagocytosis of FITC-POS was measured on Arrayscan VTI HCS Reader (Thermo Scientific Cellomics, France). Data were collected with vHCS Scan software package, version 6.6.1.4 (Thermo Scientific Cellomics). Pictures were acquired with a 20X objective in high-resolution camera mode and were analyzed based on the “Colocalization” bioapplication. The first channel was used for nucleus identification (DAPI staining) and the second channel was used to identify FITC-POS (based on intensity thresholds and segmentation parameters). The detection of total phagocytic activity was done by measuring, on 3000 cells in a well, detected by DAPI staining, the number of cells having at least one FITC-POS. In order to quantify total phagocytic activity, this number was divided by the number of cells. This gave us the phagocytic index.



## Molecular characterization techniques

### *Total RNA extraction and Reverse Transcription (RT)*

Total RNAs were extracted from cells of interest using RNeasy Protect Mini Kit (Qiagen, France) according to the manufacturer's protocol. An on-column DNase I digestion was performed to avoid genomic DNA amplification. RNA yields and quality were checked with a NanoDrop spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA). Complementary DNAs (cDNA) were synthesized from 500 ng of total RNA using SuperScript® III reverse transcription kit (Invitrogen) following manufacturer's recommendations. cDNAs synthesized were then diluted at 1/10 in DNase free water before performing Real-time quantitative PCR.

### *Real-time quantitative PCR (qPCR) by SYBR Green detection*

qPCR analyses for transgene expression and RPE cell characterization were performed on P96 well plates using a LightCycler® 480 SYBR Green I Master and SYBR Green PCR Master Mix (both from Roche, Basel, Switzerland) following manufacturer's instructions. qPCR analyses for NSC characterization and transcriptome analysis validation were performed on P384 well plates using Power SYBR® Green PCR Master Mix and the Applied Biosystems 7900HT Fast Real-Time PCR System (both from Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). It began with an initial denaturation step at 95°C for 5 min, followed by 50 cycles of denaturation at 95°C for 15 sec, annealing at 60°C for 15 sec, and extension at 72°C for 15 sec. Quantification of gene expression was based on the  $\Delta$ -cycle threshold ( $\Delta$ Ct) method and normalized to 18S expression. Melting curve analysis was used to determine the specificity of PCR products. For the transcriptome analysis validation when a Ct was undetermined the Ct value was fixed at 45. Primers used are listed in Table 1.

### *qPCR by TaqMan® Low Density Array (TLDA) card*

qPCR analysis was performed using TaqMan® Human Stem Cell Pluripotency Arrays, TaqMan® Gene expression Master Mix and the Applied Biosystems 7900HT Fast Real-Time PCR System (all from Applied Biosystems) following manufacturer's instructions. qPCR were run in similar conditions as described above. The distance from the gene signal in a given sample to the corresponding average in all the samples was calculated for each regulated gene. Ct value for a referred gene is reversely related to its RNA level we chose to display  $-\Delta$ Ct values using dChip software from Cheng Li Lab of Computational Genomics (Harvard School of Public Health & Dana-Farber Cancer Institute, Boston, MA, USA) to have on the heat map in green the down-regulated genes and in red the up-regulated genes for the sample considered.

## Transcriptome analysis

### *Sample quality control, preparation, hybridization and data quality control*

Affymetrix Human Exon 1.0 ST arrays were hybridized by GenoSplice technology ([www.genosplice.com](http://www.genosplice.com)) according to the Ambion WT protocol (Life technologies, France) and Affymetrix (Santa Clara, CA, USA) labelling and hybridization recommendations. Briefly, 100ng of total RNA was first mixed with bacterial transcripts and the mixture was reverse transcribed into cDNA. After synthesis of double-stranded cDNA, an *in vitro* transcription reaction was conducted overnight. Resulting amplified cRNA were reverse transcribed into sense DNA incorporating dUTP. This single stranded DNA was treated with a combination of uracil DNA glycosylase and apurinic/apyrimidinic endonuclease 1. DNA fragments were biotin-labeled by terminal deoxynucleotidyl transferase. Targets were finally prepared according to Affymetrix recommendations for hybridization of exon arrays. Microarrays were hybridized, washed and scanned using Affymetrix instruments. Total RNAs RIN values were between 7.8 and 10 (average: 9.22). Raw data was controlled with Expression Console (Affymetrix).

#### *Data analyses*

Affymetrix Human Exon 1.0 ST Array dataset analysis and visualization were made using EASANA® (GenoSplice technology), which is based on the GenoSplice's FAST DB® annotations (de la Grange et al., 2005, 2007). Exon Array data were normalized using quantile normalization. Background correction was made by using the antigenomic probes and probe selection was made as described previously (de la Grange et al., 2010). Only probes targeting exons annotated from FAST DB® transcripts were selected in order to focus on well-annotated genes, whose mRNA sequences are in public databases (de la Grange et al., 2005, 2007). Among these selected probes, bad-quality probes (*e.g.*, probes labeled by Affymetrix as “cross-hybridizing”) and probes with too low intensity signal compared to antigenomic background probes with the same GC content were removed from the analysis. Only probes with a DABG *P*-value  $\leq 0.05$  in at least half of the arrays were considered for statistical analysis.(de la Grange et al., 2010) Only genes expressed in at least one compared condition were analyzed. To be considered as expressed, the DABG *P*-value had to be  $\leq 0.05$  for at least half of the gene probes. We performed a Student's *t*-test to compare gene intensities in the different biological replicates. Genes were considered significantly regulated when fold-change was  $\geq 1.5$  and *P*-value  $\leq 0.05$ .

#### *Hierarchical clustering*

The distance from the gene signal in a given sample to the corresponding average in all the samples was calculated for each regulated gene. Corresponding values were displayed and clusterized with MeV4.6.2 from The Institute of Genome Research using Pearson's correlation and average linkage clustering.

## Results

### *LCA mutation analysis*

LCA microarray chips containing 641 disease-associated sequence variants associated with LCA or early-onset retinitis pigmentosa genes were used to assay fibroblasts GM03852 and GM05300. No previously identified LCA mutations were detected but a G to T switch was observed in both unrelated samples at position 154 on exon 2 of guanylate cyclase 2D (*GUCY2D*) (Figure 1). Human iPSC lines were generated from the two patients' GM03852 and GM05300 fibroblasts (at passage 7 and 6, respectively), with one and four clones obtained, respectively (Supplementary Figure S1A-C). Control iPSC lines were generated in parallel from CRL2097 and GM04603 wild-type fibroblasts (further notes as WT-hiPSC). Full quality control and characterisation were performed on all the clones, which confirmed successful reprogramming (Supplementary Figure S1D-H).

### *Differentiation of neural derivatives*

All experiments were conducted in at least three independent cultures for each hiPSC clone, WT and LCA hiPSCs being systematically treated in parallel. There was no difference between WT and LCA cells at any time during the process in terms of their morphology, proliferative activity, rate of differentiation or expression of specific markers of the various stages of differentiation.

In order to obtain neural derivatives, hiPSCs were first induced to produce neural rosettes by the combination of human Noggin, SB431542 and FGF2 (Figure 2A-B), that were selected mechanically at one week and replated in order to obtain homogenous populations of NSCs. Cells progressively detached from the rosettes over days and spread out. Homogeneous NSC populations were grown for four passages (Figure 2C). When incubated with BDNF, those NSCs gave rise to neuronal networks (Figures 2D). NSCs were immunoreactive for the early neural markers NES and SOX2 (Figures 2E). RT-qPCR confirmed that they expressed the neural markers SOX1, PAX6, but also revealed the neural crest marker *SNAI2* (*snail homolog 2 Drosophila*, marker of neural crest, also known as SLUG), *MSI1* (*musashi homolog 1 Drosophila* also known as Musashi) and NES during NSC derivation from LCA-hiPSCs (noted LCA-NSC) (Figures 2F). Neurons derived from NSCs were immunopositive for SOX2, Tubulin  $\beta$ 3 and HuC/HuD in a part of neuron population (Figure 2G-H).

### *Differentiation of retinal derivatives*

In order to obtain retinal derivatives, FGF2 was removed from hiPSC cultures (Figure 3A). Pigmented areas appeared spontaneously over the following weeks (Figure 3B) and were mechanically selected and replated at high density (10-15 clumps/cm<sup>2</sup>) on matrigel. They formed a cell monolayer that displayed the classical cobblestone morphology of a RPE cell sheath (Figure 3C). Most cells were immunoreactive for the specific transcription factor for melanogenesis, MITF and cell to cell interfaces were lined by ZO-1, a tight junction marker of the retinal epithelium (Figure 3D). RT-qPCR analysis complemented the phenotypic identification of RPEs by revealing expression of *PAX6*,

*RPE65* (retinal pigment epithelium-specific protein 65kDa), *BEST1* (bestrophin 1) and *MITF* (Figure 3E). The RPE cells were functional, as demonstrated by their capacity at phagocytosing photoreceptor fragments (Figure 3F).

#### *Whole genome differential transcriptomic analysis*

Two transcriptome analyses were performed, the first one between LCA-NSC (n=9) and WT-NSC (n=11), the second one between LCA-RPE (n=9) and WT-RPE (n=4) (Figure 4A). Affymetrix Human Exon 1.0 ST Array dataset analyses (32778 tested genes) revealed 413 genes expressed for LCA-NSC populations and 188 genes expressed for LCA-RPE cells those having a *P*-value  $\leq 0.05$  and a fold-change  $\geq 1.5$ . Among these genes, 21 were expressed in both types of LCA derivatives (Table 2). One up-regulated gene, *neuronatin* (*NNAT*) and three down-regulated genes, *tripartite motif containing 61* (*TRIM61*), *zinc finger protein 558* (*ZNF558*) and *glutathione S-transferase theta 1* (*GSTT1*) were chosen because they exhibited the highest fold-change (between 2.28 and 8.84) (Table 2).

In addition, results obtained by the transcriptome analysis for these four genes were fully validated by RT-qPCR analysis (Figure 4B).

#### **Discussion**

The main objective of this study was to derive human pluripotent stem cell lines that would provide a biological resource for studying molecular mechanisms associated with Leber congenital amaurosis *in vitro*. The reprogramming of fibroblasts from two clinically-affected patients has allowed us to derive relevant neural and retinal cell derivatives and the differential transcriptomic analysis of which relative to wild-type equivalents has revealed a set of four genes that were significantly at variance in the mutant cells. These gene defects might suggest early developmental consequence of LCA, in particular for protein degradation and oxidative stress.

The hiPSC lines explored in the present study were obtained by reprogramming commercially available fibroblasts that originated from two unrelated patients who clearly demonstrated a clinical LCA syndrome, with poor vision, high hyperopia, nystagmus and for the male patient an ERG extinguished in both eyes under both photopic and scotopic conditions. The mutation described in our results had not been associated with LCA previously and was therefore not recovered in the set tested in our study that included only registered mutations. However, both patients exhibited a G to T transition in exon 2 of the membrane, retina-specific, guanylate cyclase 2D, *GUCY2D*, a gene which is responsible for the type I of LCA (OMIM \*600179 and #204000). This G to T transition had already been reported in patients with LCA, but its presence as a rare polymorphism in a control population (2/100 tested) made its causal role in LCA questionable (Perrault et al., 1996). Our data are not conclusive by themselves but contribute to the suggestion that this genomic alteration of *GUCY2D*

may participate in the emergence of the disease, possibly in association with other genetic determinants.

The derivation of human LCA-iPSCs from mutant fibroblasts may represent an ideal *in vitro* model because it permits the production of patient and disease-specific specialized cells in order to correlate gene default to pathological phenotype (Colman, 2008; Yoshida and Yamanaka, 2010). Indeed, it has been reported that patient-specific iPSCs were generated successfully for several genetic disorders and diseases (Wu and Hochedlinger, 2011) with several groups showing disease-specific phenotypes in iPS-derived cells (Ebert et al., 2009; Lee et al., 2009; Marchetto et al., 2010). Moreover, hiPSC derivatives could provide unlimited number of cells needed to examine the pathophysiology of LCA at the cellular and molecular levels and to perform a high-throughput screening to find new drugs and therapeutic regimens. Cells used for such procedures should have a stable phenotype and be easily amplifiable to provide a pool of cells for screening and validation.

We derived LCA and WT hiPSCs into two differentiated derivatives: NSC and RPE cells using protocols previously described (Chambers et al., 2009; Klimanskaya et al., 2004). These two populations are the ones affected in some form of LCA (or their precursors) and have the advantage of forming a homogeneous population suitable for transcriptomic analysis and drug screening. RPE cells have many crucial functions for long-term vision and photoreceptor survival that highlight its central role as guardian or caretaker of the neural retina (Plafker et al., 2012; Strauss, 2005). However, in our study, NSC and RPE cells obtained from LCA hiPSCs did not show any disease-specific functional defect contrary to other studies using hiPSCs from patients with retinal diseases (Jin et al., 2011; Meyer et al., 2011; Zahabi et al., 2012). One limitation could be that these cells are not fully mature and do not reproduce entirely the pathological phenotype. NSC are very immature cells and RPE derived from iPSCs are more closely related to human fetal RPE than adult RPE, even if functional, *i.e.* capable of phagocytosis of fluorescently labeled photoreceptor outer segments (POS) (Klimanskaya et al., 2004). These cells might need to be challenged to some stress to express functional or phenotypical defects (Jin et al., 2011). Moreover, if *GUCY2D* is one of the genes causing the pathology in our model, we may need to differentiate our cells into photoreceptors or at least their progenitors. This was challenging as, most of the protocols described so far, were long and provided a low ratio of photoreceptors (Lamba et al., 2006; Meyer et al., 2009; Osakada et al., 2008). However, recent publications (Meyer et al., 2011; Nakano et al., 2012) have demonstrated that hESC and iPSC could give rise to neural retina formation *in vitro*, giving hope that photoreceptors could be used for cell therapy and pathological modeling.

However, our main objective was to identify differentially expressed genes in early developmental defect before the establishment of mature retinal circuitry. Whole-gene expression profiling performed on the two LCA-hiPSC derivatives revealed 21 genes had changes in expression relative to WT

controls. We focused on 4 genes with no reported link to visual function that showed a high fold change ( $\geq 2$ ) and a significant  $P$ -value  $\leq 0.05$  in NSC and RPE cells: *NNAT*, *TRIM61*, *ZNF558*, and *GSTT1*. First, one gene, (*neuronatin*) *NNAT*, was up-regulated in LCA cells. *NNAT* is a neural-specific developmental gene with  $\alpha$  and  $\beta$  splice forms (Yokota et al., 2004; Siu et al., 2008). It has been shown very recently, that *NNAT* was a key imprinted gene that is deregulated in hiPSCs and, thus, may not be related to the pathology (Teichroeb et al., 2011). We found three genes down-regulated in LCA cells: the *tripartite motif containing 61* (*TRIM61*) gene, the *zinc finger protein 558* (*ZNF558*) gene and the *glutathione S-transferase theta 1* (*GSTT1*) gene. *TRIM61* whose role remains unclear belongs to the TRIM family. TRIM proteins contain RING finger domains that could simultaneously bind ubiquitination enzymes and their substrates and hence function as ligases. Ubiquitination in turn targets the substrate protein for degradation (Napolitano and Meroni, 2012). *ZNF558* belongs to ZNF family of DNA binding proteins acting as transcriptional regulators (Matthews and Sunde, 2002). *GSTT1* encodes an enzyme of the glutathione S-transferase (GST) family that catalyze the conjugation of glutathione (GSH) to wide range of potential toxins as the first step in detoxification (Baars and Breimer, 1980; Hayes et al., 2005). This gene is particularly of interest as a growing body of clinical and experimental data strongly implicate oxidative stress as a threat to the structural and functional integrity of the RPE (Cai et al., 2000; Plafker et al., 2012). GST polymorphisms may be associated with an increased risk for the development of primary open-angle glaucoma, age-related macular degeneration (AMD) and age-related cataract (ARC) (Güven et al., 2011; Jiang et al., 2012; Juronen et al., 2000; Othman et al., 2012). The precise link between *GSTT1* and LCA pathology is unknown but its down-regulation in both LCA-NSC and LCA-RPE cells might suggest it plays a role (along with *TRIM61* and *ZNF558*) in the mechanisms underlying the LCA phenotype through interactions with other unknown proteins and deserve further examination. Providing *ex vivo* gene therapy for *GUCY2D* and looking for reversal of these gene changes would be a next step in the understanding of their involvement in the pathology.

### **Acknowledgments**

We thank M. Gerard, C. Denis for their help on the reprogramming step on LCA fibroblasts; J. Feteira for providing hiPSC clones derived from normal fibroblast lines GM04603 and CRL2097 and C. Varela for performing karyotype analysis.

### **References**

- 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, 92–95.
- Aguirre, G.D., Baldwin, V., Pearce-Kelling, S., Narfström, K., Ray, K., and Acland, G.M. (1998). Congenital stationary night blindness in the dog: common mutation in the RPE65 gene indicates founder effect. *Mol. Vis.* 4, 23.

- Ali, R.R., Sarra, G.M., Stephens, C., Alwis, M.D., Bainbridge, J.W., Munro, P.M., Fauser, S., Reichel, M.B., Kinnon, C., Hunt, D.M., et al. (2000). Restoration of photoreceptor ultrastructure and function in retinal degeneration slow mice by gene therapy. *Nat. Genet.* 25, 306–310.
- Baars, A.J., and Breimer, D.D. (1980). The glutathione S-transferases: their role in detoxification and toxification of xenobiotics. *Ann. Biol. Clin. (Paris)* 38, 49–56.
- Baehr, W., and Frederick, J.M. (2009). Naturally occurring animal models with outer retina phenotypes. *Vision Res.* 49, 2636–2652.
- Bainbridge, J.W.B., 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. *New England Journal of Medicine* 358, 2231–2239.
- Banerjee, P., Kleyn, P.W., Knowles, J.A., Lewis, C.A., Ross, B.M., Parano, E., Kovats, S.G., Lee, J.J., Penchaszadeh, G.K., Ott, J., et al. (1998). TULP1 mutation in two extended Dominican kindreds with autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Nat. Genet.* 18, 177–179.
- Batten, M.L., Imanishi, Y., Maeda, T., Tu, D.C., Moise, A.R., Bronson, D., Possin, D., Van Gelder, R.N., Baehr, W., and Palczewski, K. (2004). 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.
- Cai, J., Nelson, K.C., Wu, M., Sternberg, P., Jr, and Jones, D.P. (2000). Oxidative damage and protection of the RPE. *Prog Retin Eye Res* 19, 205–221.
- Chambers, S.M., Fasano, C.A., Papapetrou, E.P., Tomishima, M., Sadelain, M., and Studer, L. (2009). Highly efficient neural conversion of human ES and iPS cells by dual inhibition of SMAD signaling. *Nat. Biotechnol.* 27, 275–280.
- Chiang, P.-W., Wang, J., Chen, Y., Fu, Q., Zhong, J., Chen, Y., Yi, X., Wu, R., Gan, H., Shi, Y., et al. (2012). Exome sequencing identifies NMNAT1 mutations as a cause of Leber congenital amaurosis. *Nature Genetics*.
- Chun, Y.S., Byun, K., and Lee, B. (2011). Induced pluripotent stem cells and personalized medicine: current progress and future perspectives. *Anat Cell Biol* 44, 245–255.
- Cideciyan, A.V., Aleman, T.S., Boye, S.L., Schwartz, S.B., Kaushal, S., Roman, A.J., Pang, J. -j., Sumaroka, A., Windsor, E.A.M., Wilson, J.M., et al. (2008). Human gene therapy for RPE65 isomerase deficiency activates the retinoid cycle of vision but with slow rod kinetics. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105, 15112–15117.
- Colman, A. (2008). Induced pluripotent stem cells and human disease. *Cell Stem Cell* 3, 236–237.
- Dryja, T.P., Adams, S.M., Grimsby, J.L., McGee, T.L., Hong, D.H., Li, T., Andréasson, S., and Berson, E.L. (2001). Null RPGRIP1 alleles in patients with Leber congenital amaurosis. *Am. J. Hum. Genet.* 68, 1295–1298.
- Dyer, M.A., Donovan, S.L., Zhang, J., Gray, J., Ortiz, A., Tenney, R., Kong, J., Allikmets, R., and Sohocki, M.M. (2004). Retinal degeneration in Aip1l-deficient mice: a new genetic model of Leber congenital amaurosis. *Molecular Brain Research* 132, 208–220.
- Ebert, A.D., Yu, J., Rose, F.F., Jr, Mattis, V.B., Lorson, C.L., Thomson, J.A., and Svendsen, C.N. (2009). Induced pluripotent stem cells from a spinal muscular atrophy patient. *Nature* 457, 277–280.



Estrada-Cuzcano, A., Koenekoop, R.K., Coppieters, F., Kohl, S., Lopez, I., Collin, R.W.J., De Baere, E.B.W., Roeleveld, D., Marek, J., Bernd, A., et al. (2011). IQCB1 mutations in patients with leber congenital amaurosis. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 52, 834–839.

Falk, M.J., Zhang, Q., Nakamaru-Ogiso, E., Kannabiran, C., Fonseca-Kelly, Z., Chakarova, C., Audo, I., Mackay, D.S., Zeitz, C., Borman, A.D., et al. (2012). NMNAT1 mutations cause Leber congenital amaurosis. *Nature Genetics*.

FRANCESCHETTI, A., and DIETERLE, P. (1954). [Diagnostic and prognostic importance of the electroretinogram in tapetoretinal degeneration with reduction of the visual field and hemeralopia]. *Confin Neurol* 14, 184–186.

Freund, C.L., Wang, Q.L., Chen, S., Muskat, B.L., Wiles, C.D., Sheffield, V.C., Jacobson, S.G., McInnes, R.R., Zack, D.J., and Stone, E.M. (1998). De novo mutations in the CRX homeobox gene associated with Leber congenital amaurosis. *Nat. Genet.* 18, 311–312.

Friedman, J.S., Chang, B., Kannabiran, C., Chakarova, C., Singh, H.P., Jalali, S., Hawes, N.L., Branham, K., Othman, M., Filippova, E., et al. (2006). Premature truncation of a novel protein, RD3, exhibiting subnuclear localization is associated with retinal degeneration. *Am. J. Hum. Genet.* 79, 1059–1070.

Gerber, S., Perrault, I., Hanein, S., Barbet, F., Ducroq, D., Ghazi, I., Martin-Coignard, D., Leowski, C., Homfray, T., Dufier, J.L., et al. (2001). Complete exon-intron structure of the RPGR-interacting protein (RPGRIP1) gene allows the identification of mutations underlying Leber congenital amaurosis. *Eur. J. Hum. Genet.* 9, 561–571.

González, F., Boué, S., and Izpisua Belmonte, J.C. (2011). Methods for making induced pluripotent stem cells: reprogramming à la carte. *Nat. Rev. Genet.* 12, 231–242.

de la Grange, P., Dutertre, M., Correa, M., and Auboeuf, D. (2007). A new advance in alternative splicing databases: from catalogue to detailed analysis of regulation of expression and function of human alternative splicing variants. *BMC Bioinformatics* 8, 180.

de la Grange, P., Dutertre, M., Martin, N., and Auboeuf, D. (2005). FAST DB: a website resource for the study of the expression regulation of human gene products. *Nucleic Acids Res.* 33, 4276–4284.

de la Grange, P., Gratadou, L., Delord, M., Dutertre, M., and Auboeuf, D. (2010). Splicing factor and exon profiling across human tissues. *Nucleic Acids Res.* 38, 2825–2838.

Güven, M., Görgün, E., Ünal, M., Yenerel, M., Batar, B., Küçümen, B., Dinç, U.A., Güven, G.S., Ulus, T., and Yüksel, A. (2011). Glutathione S-transferase M1, GSTT1 and GSTP1 genetic polymorphisms and the risk of age-related macular degeneration. *Ophthalmic Res.* 46, 31–37.

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, 979–990.

Hayes, J.D., Flanagan, J.U., and Jowsey, I.R. (2005). Glutathione transferases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 45, 51–88.

Hims, M.M., Diager, S.P., and Inglehearn, C.F. (2003). Retinitis pigmentosa: genes, proteins and prospects. *Dev Ophthalmol* 37, 109–125.

den Hollander, A.I., Heckenlively, J.R., van den Born, L.I., de Kok, Y.J., van der Velde-Visser, S.D., Kellner, U., Jurklics, B., van Schooneveld, M.J., Blankenagel, A., Rohrschneider, K., et al. (2001).

Leber congenital amaurosis and retinitis pigmentosa with Coats-like exudative vasculopathy are associated with mutations in the crumbs homologue 1 (CRB1) gene. *Am. J. Hum. Genet.* 69, 198–203.

den Hollander, A.I., Koenekoop, R.K., Mohamed, M.D., Arts, H.H., Boldt, K., Towns, K.V., Sedmak, T., Beer, M., Nagel-Wolfrum, K., McKibbin, M., et al. (2007). Mutations in LCA5, encoding the ciliary protein lebercilin, cause Leber congenital amaurosis. *Nat. Genet.* 39, 889–895.

den Hollander, A.I., Koenekoop, R.K., Yzer, S., Lopez, I., Arends, M.L., Voesenek, K.E.J., Zonneveld, M.N., Strom, T.M., Meitinger, T., Brunner, H.G., et al. (2006). Mutations in the CEP290 (NPHP6) gene are a frequent cause of Leber congenital amaurosis. *Am. J. Hum. Genet.* 79, 556–561.

den Hollander, A.I., Roepman, R., Koenekoop, R.K., and Cremers, F.P.M. (2008). Leber congenital amaurosis: Genes, proteins and disease mechanisms. *Progress in Retinal and Eye Research* 27, 391–419.

Jiang, Z., Liang, K., Zhang, Q., and Tao, L. (2012). Glutathione S-transferases polymorphisms confer susceptibility to senile cortical cataract in the Han Chinese population. *Mol. Vis.* 18, 1247–1252.

Jin, Z.-B., Okamoto, S., Osakada, F., Homma, K., Assawachananont, J., Hiramami, Y., Iwata, T., and Takahashi, M. (2011). Modeling retinal degeneration using patient-specific induced pluripotent stem cells. *PLoS ONE* 6, e17084.

Jordan, S.A., Farrar, G.J., Kenna, P., Humphries, M.M., Sheils, D.M., Kumar-Singh, R., Sharp, E.M., Soriano, N., Ayuso, C., and Benitez, J. (1993). Localization of an autosomal dominant retinitis pigmentosa gene to chromosome 7q. *Nat. Genet.* 4, 54–58.

Juronen, E., Tasa, G., Veromann, S., Parts, L., Tiidla, A., Pulges, R., Panov, A., Soovere, L., Koka, K., and Mikelsaar, A.V. (2000). Polymorphic glutathione S-transferase M1 is a risk factor of primary open-angle glaucoma among Estonians. *Exp. Eye Res.* 71, 447–452.

Keen, T.J., Mohamed, M.D., McKibbin, M., Rashid, Y., Jafri, H., Maumenee, I.H., and Inglehearn, C.F. (2003). Identification of a locus (LCA9) for Leber's congenital amaurosis on chromosome 1p36. *Eur. J. Hum. Genet.* 11, 420–423.

Klimanskaya, I., Hipp, J., Rezai, K.A., West, M., Atala, A., and Lanza, R. (2004). Derivation and comparative assessment of retinal pigment epithelium from human embryonic stem cells using transcriptomics. *Cloning Stem Cells* 6, 217–245.

Koenekoop, R.K., Wang, H., Majewski, J., Wang, X., Lopez, I., Ren, H., Chen, Y., Li, Y., Fishman, G.A., Genead, M., et al. (2012). Mutations in NMNAT1 cause Leber congenital amaurosis and identify a new disease pathway for retinal degeneration. *Nature Genetics*.

Lamba, D.A., Karl, M.O., Ware, C.B., and Reh, T.A. (2006). Efficient generation of retinal progenitor cells from human embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 12769–12774.

Leber, T. (1869). Uber Retinitis pigmentosa und angeborene Amaurose. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology* 15, 1–25.

Lee, G., Papapetrou, E.P., Kim, H., Chambers, S.M., Tomishima, M.J., Fasano, C.A., Ganat, Y.M., Menon, J., Shimizu, F., Viale, A., et al. (2009). Modelling pathogenesis and treatment of familial dysautonomia using patient-specific iPSCs. *Nature* 461, 402–406.

Lotery, A.J., Jacobson, S.G., Fishman, G.A., Weleber, R.G., Fulton, A.B., Namperumalsamy, P., Héon, E., Levin, A.V., Grover, S., Rosenow, J.R., et al. (2001). Mutations in the CRB1 gene cause Leber congenital amaurosis. *Arch. Ophthalmol.* 119, 415–420.

- Maguire, A.M., High, K.A., Auricchio, A., Wright, J.F., Pierce, E.A., Testa, F., Mingozzi, F., Bencicelli, J.L., Ying, G., 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, 1597–1605.
- 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., et al. (2008). Safety and efficacy of gene transfer for Leber's congenital amaurosis. *N. Engl. J. Med.* 358, 2240–2248.
- Marchetto, M.C.N., Carrameu, C., Acab, A., Yu, D., Yeo, G.W., Mu, Y., Chen, G., Gage, F.H., and Muotri, A.R. (2010). A model for neural development and treatment of Rett syndrome using human induced pluripotent stem cells. *Cell* 143, 527–539.
- Marlhens, F., Bareil, C., Griffoin, J.M., Zrenner, E., Amalric, P., Eliaou, C., Liu, S.Y., Harris, E., Redmond, T.M., Arnaud, B., et al. (1997). Mutations in RPE65 cause Leber's congenital amaurosis. *Nat. Genet.* 17, 139–141.
- Matthews, J.M., and Sunde, M. (2002). Zinc fingers--folds for many occasions. *IUBMB Life* 54, 351–355.
- Meyer, J.S., Howden, S.E., Wallace, K.A., Verhoeven, A.D., Wright, L.S., Capowski, E.E., Pinilla, I., Martin, J.M., Tian, S., Stewart, R., et al. (2011). Optic vesicle-like structures derived from human pluripotent stem cells facilitate a customized approach to retinal disease treatment. *Stem Cells* 29, 1206–1218.
- Meyer, J.S., Shearer, R.L., Capowski, E.E., Wright, L.S., Wallace, K.A., McMillan, E.L., Zhang, S.-C., and Gamm, D.M. (2009). Modeling early retinal development with human embryonic and induced pluripotent stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 16698–16703.
- Molday, R.S., Hicks, D., and Molday, L. (1987). Peripherin. A rim-specific membrane protein of rod outer segment discs. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 28, 50–61.
- Morimura, H., Fishman, G.A., Grover, S.A., Fulton, A.B., Berson, E.L., and Dryja, T.P. (1998). Mutations in the RPE65 gene in patients with autosomal recessive retinitis pigmentosa or leber congenital amaurosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 3088–3093.
- Nakano, T., Ando, S., Takata, N., Kawada, M., Muguruma, K., Sekiguchi, K., Saito, K., Yonemura, S., Eiraku, M., and Sasai, Y. (2012). Self-formation of optic cups and storable stratified neural retina from human ESCs. *Cell Stem Cell* 10, 771–785.
- Napolitano, L.M., and Meroni, G. (2012). TRIM family: Pleiotropy and diversification through homomultimer and heteromultimer formation. *IUBMB Life* 64, 64–71.
- Osakada, F., Ikeda, H., Mandai, M., Wataya, T., Watanabe, K., Yoshimura, N., Akaike, A., Akaike, A., Sasai, Y., and Takahashi, M. (2008). Toward the generation of rod and cone photoreceptors from mouse, monkey and human embryonic stem cells. *Nat. Biotechnol.* 26, 215–224.
- Othman, H., Saadat, I., Farvardin-Jahromi, M., and Saadat, M. (2012). Susceptibility to exudative age-related macular degeneration and three genetic polymorphisms of glutathione S-transferase Z1 (GSTZ1). *Eur J Ophthalmol* 22, 431–435.
- Perrault, I., Hanein, S., Gerber, S., Barbet, F., Ducroq, D., Dollfus, H., Hamel, C., Dufier, J.-L., Munnich, A., Kaplan, J., et al. (2004). Retinal dehydrogenase 12 (RDH12) mutations in leber congenital amaurosis. *Am. J. Hum. Genet.* 75, 639–646.

- Perrault, I., Hanein, S., Zanlonghi, X., Serre, V., Nicouleau, M., Defoort-Delhemmes, S., Delphin, N., Fares-Taie, L., Gerber, S., Xerri, O., et al. (2012). Mutations in *NMNAT1* cause Leber congenital amaurosis with early-onset severe macular and optic atrophy. *Nature Genetics*.
- Perrault, I., Rozet, J.M., Calvas, P., Gerber, S., Camuzat, A., Dollfus, H., Châtelin, S., Souied, E., Ghazi, I., Leowski, C., et al. (1996). Retinal-specific guanylate cyclase gene mutations in Leber's congenital amaurosis. *Nat. Genet.* *14*, 461–464.
- Perrault, I., Rozet, J.M., Gerber, S., Ghazi, I., Ducroq, D., Souied, E., Leowski, C., Bonnemaïson, M., Dufier, J.L., Munnich, A., et al. (2000). Spectrum of *retGC1* mutations in Leber's congenital amaurosis. *Eur. J. Hum. Genet.* *8*, 578–582.
- Plafker, S.M., O'Mealey, G.B., and Szweda, L.I. (2012). Mechanisms for countering oxidative stress and damage in retinal pigment epithelium. *Int Rev Cell Mol Biol* *298*, 135–177.
- Ramamurthy, V. (2004). From the Cover: Leber congenital amaurosis linked to *AIPL1*: A mouse model reveals destabilization of cGMP phosphodiesterase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *101*, 13897–13902.
- Redmond, T.M., Yu, S., Lee, E., Bok, D., Hamasaki, D., Chen, N., Goletz, P., Ma, J.-X., Crouch, R.K., and Pfeifer, K. (1998). *Rpe65* is necessary for production of 11-cis-vitamin A in the retinal visual cycle. *Nature Genetics* *20*, 344–351.
- Rivolta, C., Sharon, D., DeAngelis, M.M., and Dryja, T.P. (2002). Retinitis pigmentosa and allied diseases: numerous diseases, genes, and inheritance patterns. *Hum. Mol. Genet.* *11*, 1219–1227.
- Rolling, F. (2004). Recombinant AAV-mediated gene transfer to the retina: gene therapy perspectives. *Gene Ther.* *11 Suppl 1*, S26–32.
- Sergouniotis, P.I., Davidson, A.E., Mackay, D.S., Li, Z., Yang, X., Plagnol, V., Moore, A.T., and Webster, A.R. (2011). Recessive mutations in *KCNJ13*, encoding an inwardly rectifying potassium channel subunit, cause leber congenital amaurosis. *Am. J. Hum. Genet.* *89*, 183–190.
- Simonelli, F., Maguire, A.M., Testa, F., Pierce, E.A., Mingozzi, F., Bennicelli, J.L., Rossi, S., Marshall, K., Banfi, S., Surace, E.M., et al. (2010). Gene therapy for Leber's congenital amaurosis is safe and effective through 1.5 years after vector administration. *Mol. Ther.* *18*, 643–650.
- Siu, I.-M., Bai, R., Gallia, G.L., Edwards, J.B., Tyler, B.M., Eberhart, C.G., and Riggins, G.J. (2008). Coexpression of neuronatin splice forms promotes medulloblastoma growth. *Neuro-oncology* *10*, 716–724.
- Sohocki, M.M., Bowne, S.J., Sullivan, L.S., Blackshaw, S., Cepko, C.L., Payne, A.M., Bhattacharya, S.S., Khaliq, S., Qasim Mehdi, S., Birch, D.G., et al. (2000). Mutations in a new photoreceptor-pineal gene on 17p cause Leber congenital amaurosis. *Nat. Genet.* *24*, 79–83.
- Stadtfeld, M., and Hochedlinger, K. (2010). Induced pluripotency: history, mechanisms, and applications. *Genes Dev.* *24*, 2239–2263.
- Stiebel-Kalish, H., Reich, E., Rainy, N., Vatine, G., Nisgav, Y., Tovar, A., Gothilf, Y., and Bach, M. (2012). *Gucy2f* zebrafish knockdown - a model for *Gucy2d*-related leber congenital amaurosis. *Eur. J. Hum. Genet.* *20*, 884–889.
- Stieger, K., Cronin, T., Bennett, J., and Rolling, F. (2011). Adeno-associated virus mediated gene therapy for retinal degenerative diseases. *Methods Mol. Biol.* *807*, 179–218.

- Stockton, D.W., Lewis, R.A., Abboud, E.B., Al-Rajhi, A., Jabak, M., Anderson, K.L., and Lupski, J.R. (1998). A novel locus for Leber congenital amaurosis on chromosome 14q24. *Hum. Genet.* *103*, 328–333.
- Strauss, O. (2005). The retinal pigment epithelium in visual function. *Physiol. Rev.* *85*, 845–881.
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., and Yamanaka, S. (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* *131*, 861–872.
- Teichroeb, J.H., Betts, D.H., and Vaziri, H. (2011). Suppression of the imprinted gene NNAT and X-chromosome gene activation in isogenic human iPS cells. *PLoS ONE* *6*, e23436.
- Thompson, D.A., Li, Y., McHenry, C.L., Carlson, T.J., Ding, X., Sieving, P.A., Apfelstedt-Sylla, E., and Gal, A. (2001). Mutations in the gene encoding lecithin retinol acyltransferase are associated with early-onset severe retinal dystrophy. *Nat. Genet.* *28*, 123–124.
- Thomson, J.A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S.S., Waknitz, M.A., Swiergiel, J.J., Marshall, V.S., and Jones, J.M. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* *282*, 1145–1147.
- Wang, H., den Hollander, A.I., Moayed, Y., Abulimiti, A., Li, Y., Collin, R.W.J., Hoyng, C.B., Lopez, I., Abboud, E.B., Al-Rajhi, A.A., et al. (2009). Mutations in SPATA7 cause Leber congenital amaurosis and juvenile retinitis pigmentosa. *Am. J. Hum. Genet.* *84*, 380–387.
- Wu, S.M., and Hochedlinger, K. (2011). Harnessing the potential of induced pluripotent stem cells for regenerative medicine. *Nat. Cell Biol.* *13*, 497–505.
- Yang, R.B., Robinson, S.W., Xiong, W.H., Yau, K.W., Birch, D.G., and Garbers, D.L. (1999). Disruption of a retinal guanylyl cyclase gene leads to cone-specific dystrophy and paradoxical rod behavior. *J. Neurosci.* *19*, 5889–5897.
- Yokota, N., Mainprize, T.G., Taylor, M.D., Kohata, T., Loreto, M., Ueda, S., Dura, W., Grajkowska, W., Kuo, J.S., and Rutka, J.T. (2004). Identification of differentially expressed and developmentally regulated genes in medulloblastoma using suppression subtraction hybridization. *Oncogene* *23*, 3444–3453.
- Yoshida, Y., and Yamanaka, S. (2010). Recent stem cell advances: induced pluripotent stem cells for disease modeling and stem cell-based regeneration. *Circulation* *122*, 80–87.
- Zahabi, A., Shahbazi, E., Ahmadi, H., Hassani, S.-N., Totonchi, M., Taei, A., Masoudi, N., Ebrahimi, M., Aghdami, N., Seifinejad, A., et al. (2012). A New Efficient Protocol for Directed Differentiation of Retinal Pigmented Epithelial Cells from Normal and Retinal Disease Induced Pluripotent Stem Cells. *Stem Cells and Development*.
- Zeit, C., Kloeckener-Gruissem, B., Forster, U., Kohl, S., Magyar, I., Wissinger, B., Mátyás, G., Borruat, F.-X., Schorderet, D.F., Zrenner, E., et al. (2006). Mutations in CABP4, the gene encoding the Ca<sup>2+</sup>-binding protein 4, cause autosomal recessive night blindness. *Am. J. Hum. Genet.* *79*, 657–667.

#### **Author disclosures**

We declare that we have no conflicts of interest.

## Tables and Figures legends

Pour une plus grande clarté, les figures incluses dans l'article sont présentées ci-dessous dans un format plus lisible.

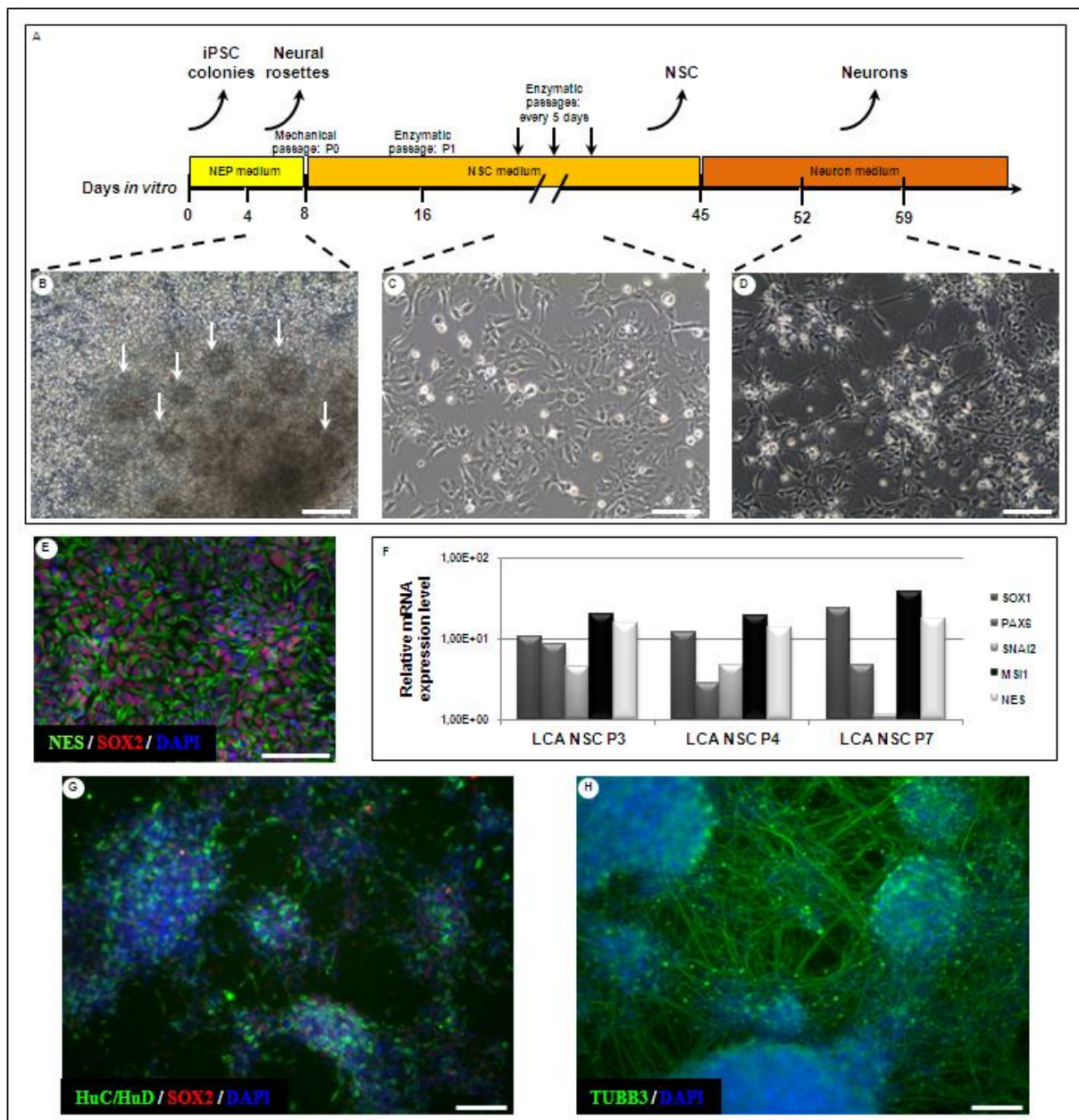
Gene	Exon	Nucleotide change	Amino acid change	GM03852	GM05300
GUCY2D	2	154 G > T	A 52 S	GT / CA	GT / CA

Sample no:	Gene	Exon	Nucleotide change	Amino acid change	Genotyping results	Zyosity	Type of variation	Verified by sequencing
GM03852					N/N			
GM05300					N/N			

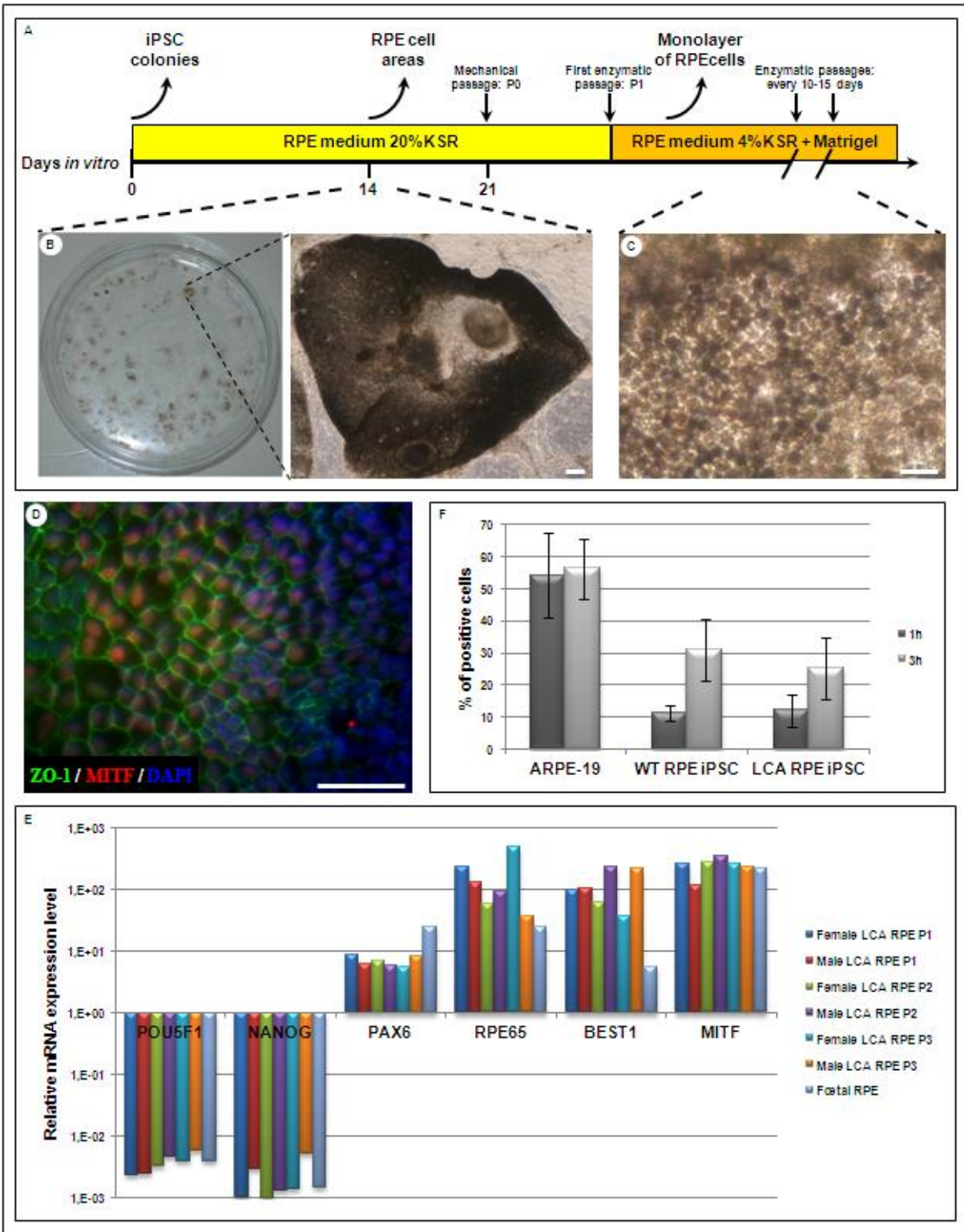
N/N - no mutation findings

**Figure 1: Mutation analysis of LCA fibroblasts.** A G to T switch at position 154 on exon 2 of *guanylate cyclase 2D* (membrane, retina-specific, *GUCY2D*) is present in both LCA fibroblasts showing no specific mutation (N/N).



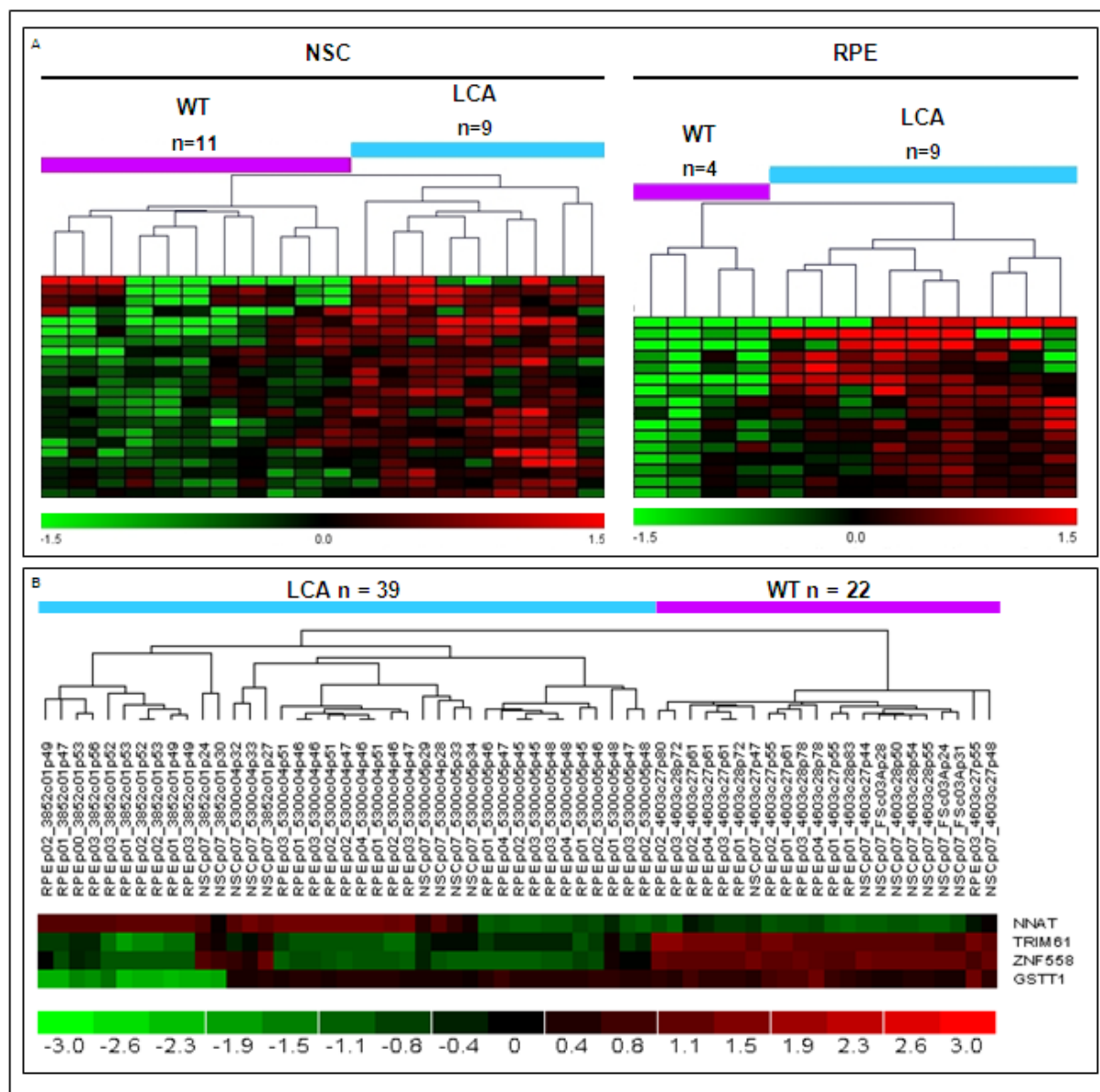
**Figure 2: Generation and characterization of Neural Stem Cells (NSC).** (A) Schematic representation of the protocol designed for hiPSCs differentiation into NSC and neurons. Arrows indicate steps at which particular phenotypes were observed. (B) Neural rosette (white arrows) emergence after 4 days of neural induction. (C) NSC well established after 4 enzymatic passages. (D) Neuron network after 13 days of differentiation. (E) Immunofluorescence analysis of NSC after 4 passages stained with antibodies against NES and SOX2. DAPI labels nuclei. (F) qRT-PCR analysis for neurogenesis-related genes *SOX1*, *PAX6*, *SNAI2*, *MS11* and *NES* in different LCA-NSC passages normalized against *18S* and expressed as a relative expression to universal RNA. (G-H) Immunofluorescence analysis of LCA neuron network after 14 days of differentiation stained with antibodies to HuC/HuD and SOX2 (G) and TUBB3 (H). DAPI labels nuclei. Scale bars, 100 $\mu$ m.





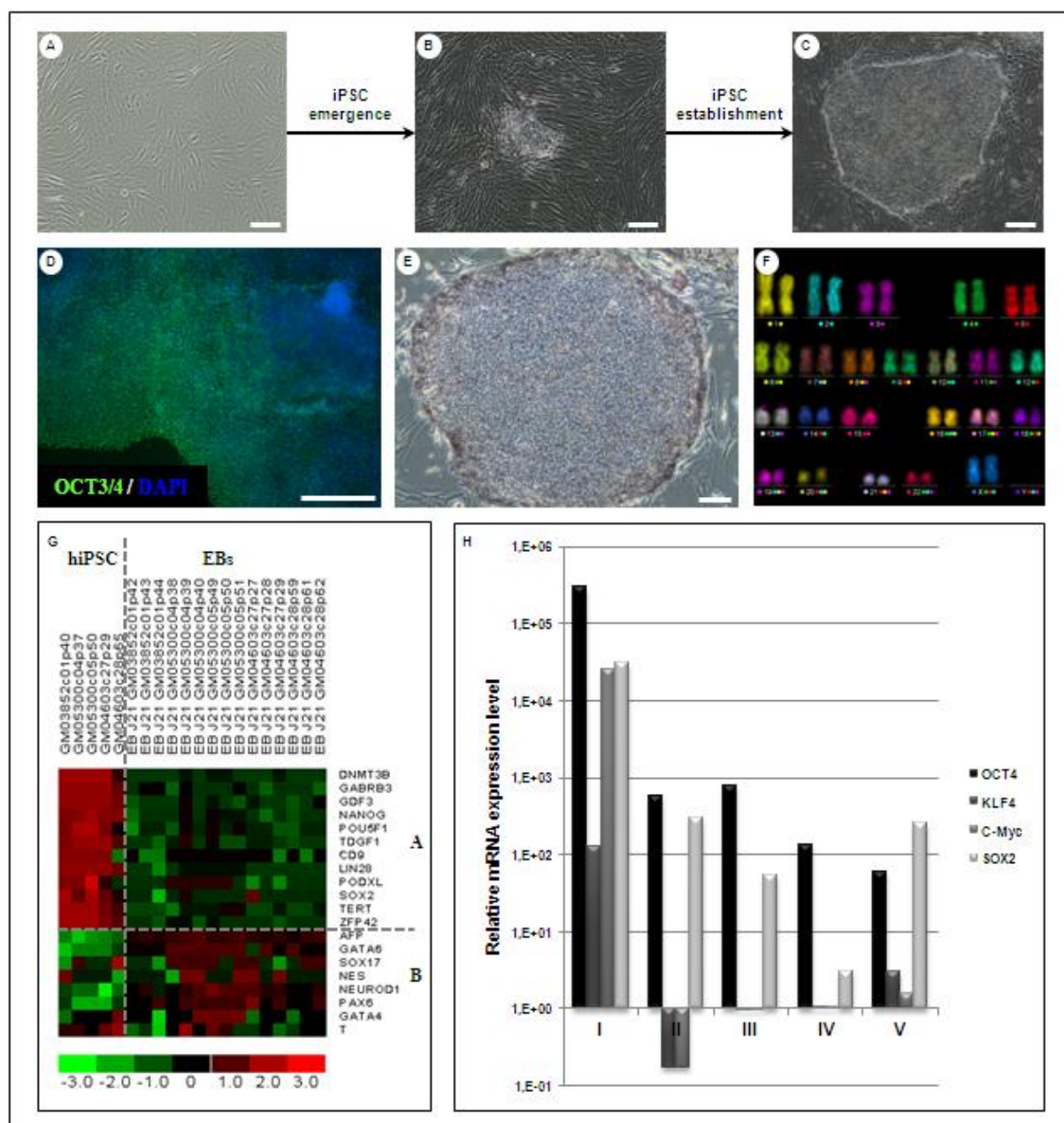
**Figure 3: Generation and characterization of Retinal Pigment Epithelial (RPE) cells.** (A) Schematic representation of the protocol design for differentiation of hiPSCs into homogeneous RPE cells. Arrows indicate steps at which particular phenotypes were observed. (B) Pigmented areas after 25 days of differentiation on a confluent hiPSCs culture dish (left) and magnified (right). Scale bar: 200 $\mu$ m. (C) Establishment of a homogeneous monolayer of RPE cells. Scale bar: 100 $\mu$ m. (D) Immunocytochemistry analysis of RPE after 2 passages stained with antibodies against ZO-1 and MITF. DAPI labels nuclei. Scale bar: 50 $\mu$ m. (E) RT-qPCR analysis of RPE marker genes *PAX6*, *RPE65*, *BEST1* and *MITF* during establishment of LCA-RPE cell lines

normalized to 18S rRNA levels and expressed as a relative expression to LCA-hiPSC RNA. (F) Histograms showing the percentage of total phagocytic index detected in 5 wells for WT and LCA-RPE derived hiPSCs at passage 2. ARPE-19 line was used as positive control line.



**Figure 4: Transcriptome analysis.** (A) Schema showing the hierarchical clustering on the Affymetrix Human Exon 1.0 ST Array of NSC samples (n=20, left) and RPE samples (n=13, right). Genes were selected as differentially expressed on the one hand between LCA-NSC and WT-NSC and on the other hand between LCA-RPE and WT-RPE. After quantile normalization of array data and background correction a Student's *t*-test was performed. Results were considered statistically significant for  $P$ -values  $\leq 0.05$  and fold-changes  $\geq 1.5$ . (B) Heatmap representation of  $-\Delta C_t$  values for transcripts of *NNAT*, *ZNF558*, *TRIM61* and *GSTT1* genes in both LCA and WT hiPSC derivatives normalized to 18S rRNA levels. Green color indicates genes underexpressed and red indicates overexpressed for the sample considered.

## Supplementary data



**Figure 1S: Generation and characterization of hiPSCs.** (A) Human fibroblasts 6 days after reprogramming. (B) Emergence of heterogeneous hiPSC colonies on fibroblasts. (C) Establishment of hiPSC line on MEF feeder layer after 6 mechanical passages resembling hESC-like colony morphology. (D) Immunofluorescence analysis of hiPSC colony at passage 41 showing nuclear localization of Oct3/4 and DAPI stained cell nuclei. (E) Positive alkaline phosphatase staining of well established hiPSC colony at passage 20. (F) Representative karyotype of female hiPSCs showing no abnormalities at passage 12, 46 XX. (G) Heat map representation of  $-\Delta C_t$  values for transcripts of pluripotency and differentiation genes selected in TaqMan® Low Density Array (TLDA) Human Stem Cell Pluripotency Arrays normalized against *18S*, differentially expressed between 5 LCA and WT hiPSC and 15 EBs derived LCA and WT hiPSC. Green color indicates genes underexpressed and red indicates overexpressed. One-way hierarchical clustering was performed and classified samples into two subgroups (vertically) indicated by “hiPSC” and “EBs”. Expression profiles of gene clusters “A” and “B” (horizontally)



correspond well to the classification of the samples into the two subgroups. Cluster A corresponds to overexpression in hiPSCs and cluster B to overexpression in EBs. All hiPSCs had the same genetic profile showing a high expression of pluripotency markers like *NANOG* (*Nanog homeobox*) and *POU5F1* (*POU class 5 homeobox 1*) and a low expression of differentiated markers while among all EBs derived hiPSCs it is the opposite with a higher differentiated gene expression like *AFP* (*alpha-fetoprotein*) and *GATA6* (*GATA binding protein 6*) for the endoderm lineage, *NES* (*Nestin*) and *PAX6* (*paired box 6*) for the ectoderm lineage and finally *GATA4* (*GATA binding protein 4*) and *T* (*brachyury homolog (mouse)*) for the mesoderm lineage. (H) qRT-PCR analysis for transgene *POU5F1*, *KLF4*, *c-Myc* and *SOX2* expression in transfected fibroblasts 4 days after infection (I), LCA-hiPSC at P4 (II), LCA-hiPSC at P37 (III), LCA-NSC at P7 (IV) and LCA-RPE at P3 (V) normalized against *18S* and expressed as a relative expression to untransfected LCA fibroblasts at passage 15. Analysis revealed a down-regulation of all the four transgenes in LCA-hiPSC during their establishment and then during their differentiation on NSC and RPE cells. Scale bars, 200µm.

**Table 1: List of primers used for the study**

Gene name	Gene Nucleotide Sequence	
	Forward	Reverse
<i>POU5F1 transgene</i>	CCTCACTTCACTGCACTGTA	CCTTGAGGTACCAGAGATCT
<i>KLF4 transgene</i>	GATGAACTGACCAGGCACTA	CCTTGAGGTACCAGAGATCT
<i>C-MYC transgene</i>	TGCCTCAAATTGGACTTTGG	CGCTCGAGGTTAACGAATT
<i>SOX2 transgene</i>	CCCAGCAGACTTCACATGT	CCTTGAGGTACCAGAGATCT
<i>SOX1</i>	ATGCACCGCTACGACATGG	CTCATGTAGCCCTGCGAGTTG
<i>PAX6</i>	GCCAGCAACACACCTAGTCA	TGTGAGGGCTGTGTCTGTTC
<i>SNAI2</i>	ATACCACAACCAGAGATCCTCA	GACTCACTCGCCCCAAAGATG
<i>MSI1</i>	GCCCAAGATGGTGACTCG	ATGGCGTCGTCCACCTTC
<i>NES</i>	GGAAGAGAACCTGGGAAAGG	CTTGGTCCTTCTCCACCGTA
<i>POU5F1</i>	CTTGCTGCAGAAGTGGGTGGAGGAA	CTGCAGTGTGGTTTTCGGGCA
<i>NANOG</i>	CAAAGGCAAACAACCCACTT	TCTGCTGGAGGCTGAGGTAT
<i>RPE65</i>	GATGCTTACGTACGGGCAAT	AAAGCACAGGTGCCAAATTC
<i>BEST1</i>	GTCAGAGGCTCCTCCTTCT	TCTGCTCCACCAGTGTCTG
<i>MITF</i>	CCGGGTGCAGAATTGTAAC	GGACAATTTTGGCATTTTGG
<i>GATA6</i>	CCCACAACACAACCTACAGC	GCGAGACTGACGCCTATGTA
<i>NNAT</i>	CTTTCTCGACCACCCACCTA	CAGCTTCTGCAGGGAGTACC
<i>TRIM61</i>	GTCCACTGATCACCAGCATC	CACGGTGCATTGTATTCTC
<i>ZNF558</i>	GTGCTATCAGCAGGGATTCA	CCGCATTTCTGAGTGTGTT
<i>GSTT1</i>	GTTGCTCGAGGACAAGTTCC	GGCTACGAGGTCAGCTAAGG
<i>18S</i>	GAGGATGAGGTGGAACGTGT	TCTTCAGTCGCTCCAGGTCT

**Table 2: Genes with modulation expression in both LCA-hiPSC derivatives**

Gene Name	Gene Symbol	Entrez Gene ID	FAST DB STABLE ID	Regulation	Chromosome number	LCA-NSC		LCA-RPE	
						Fold-Change	P-Value	Fold-Change	P-Value
neuronatin	<i>NNAT</i>	4826	GSHG0018727	up	chr20	4,67	3,53E-02	8,84	5,28E-03
---	---	---	GSHG0017801	up	chr2	4,07	4,50E-05	5,84	2,31E-07
---	---	---	GSHG0010289	up	chr15	2,08	1,12E-03	3,82	2,01E-04
---	---	---	GSHG0017802	up	chr2	2,47	1,04E-03	1,87	2,62E-02
---	---	---	GSHG0010217	up	chr15	1,60	2,04E-04	1,65	2,20E-02
tripartite motif-containing 61	<i>TRIM61</i>	391712	GSHG0023624	down	chr4	4,28	9,84E-07	5,52	1,73E-02
zinc finger protein 558	<i>ZNF558</i>	148156	GSHG0015468	down	chr19	7,2	1,54E-05	4,12	9,61E-05
---	---	---	GSHG0021872	down	chr3	2,27	3,98E-02	2,99	3,17E-02
glutathione S-transferase theta 1	<i>GSTT1</i>	2952	GSHG0020252	down	chr22	2,28	2,00E-02	2,88	2,09E-02
---	---	---	GSHG0003281	down	chr10	2,29	1,03E-04	1,91	1,47E-02
tripartite motif-containing 4	<i>TRIM4</i>	89122	GSHG0028397	down	chr7	1,71	7,86E-03	1,82	1,95E-02
IQ motif containing B1	<i>IQCB1</i>	9657	GSHG0021986	down	chr3	2,04	7,64E-07	1,81	4,98E-02
chromosome 4 open reading frame 39	<i>C4orf39</i>	152756	GSHG0022962	down	chr4	3,89	1,65E-05	1,72	7,10E-03
---	---	---	GSHG0012163	down	chr17	2,03	1,04E-04	1,67	4,94E-03
branched chain keto acid dehydrogenase E1, alpha polypeptide // transmembrane protein 91	<i>BCKDHA // TMEM91</i>	593 // 641649	GSHG0014946	down	chr19	1,5	4,80E-06	1,65	1,81E-04
glutathione S-transferase mu 4	<i>GSTM4</i>	2948	GSHG0000777	down	chr1	3,21	1,71E-05	1,62	1,40E-02
pleckstrin homology domain containing, family G (with RhoGef domain) member 4B	<i>PLEKHG4B</i>	153478	GSHG0023718	down	chr5	1,69	6,43E-05	1,61	3,48E-02
interferon induced transmembrane protein 2 (1-8D)	<i>IFITM2</i>	10581	GSHG0004489	down	chr11	1,67	4,05E-02	1,57	1,70E-02
---	---	---	GSHG0006017	down	chr11	1,52	1,52E-03	1,55	2,59E-02
B-cell CLL/lymphoma 11A (zinc finger protein)	<i>BCL11A</i>	53335	GSHG0017641	down	chr2	1,79	4,17E-02	1,52	2,94E-02
chromosome 7 open reading frame 40	<i>C7orf40</i>	285958	GSHG0028175	down	chr7	1,8	2,14E-03	1,52	4,95E-02

## III.4 Conclusion

Les recherches effectuées au cours de ma thèse ont permis d'évaluer la pertinence de l'utilisation d'hiPSCs et de leurs progénies pour la modélisation pathologique de l'amaurose congénitale de Leber.

Ces travaux démontrent la potentialité des hiPSCs à générer, tout comme les CSEh, des types cellulaires d'intérêt, homogènes et amplifiables, pouvant être affectés par l'ACL : les NSC et les cellules de l'EPR. La démarche de recherche de biomarqueurs de la pathologie a consisté tout d'abord à se baser sur les données de la littérature (ou « *hypothesis driven* ») pour découvrir un phénotype relié à la mutation causale. Ces travaux n'ayant pas abouti, nous avons utilisé une approche sans *a priori*, dite par « *ressource driven* », pour comprendre par quels mécanismes la maladie se met en place au cours du développement en identifiant les défauts d'expression génique dans des cellules progéniteurs ou immatures atteintes dans l'ACL. Nous avons ainsi mis en évidence 4 gènes différenciellement exprimés dans les deux populations porteuses de l'ACL.

### III.4.1 Obtention de populations cellulaires naturellement porteuses de l'ACL

Au cours de ces recherches, nous avons pu générer des iPSCs humaines naturellement porteuses d'ACL puis nous avons adapté les protocoles existants pour dériver des populations homogènes de NSC (en sélectionnant les rosettes) et de cellules de l'EPR fonctionnelles (sans passer par une étape de corps embryoides) à partir de ces hiPSCs. Cette ressource biologique est essentielle car il n'existe pas de modèles humains de l'ACL. Les dérivés des hiPSCs sont homogènes, facilement amplifiables et stables ce qui permet d'étudier la maladie et ses effets sur une population cellulaire humaine.

La possibilité de générer des cellules de l'EPR ouvre également les perspectives de la thérapie cellulaire basée sur l'utilisation de cellules de l'EPR saines dérivées de CSPh saines. En effet, à ce jour, le principal traitement de l'ACL disponible pour les patients atteints par la LCA2 (mutation du gène RPE65) concerne les essais de thérapie génique, qui incluent peu de patients et qui laisse l'ensemble des patients atteints par les autres formes d'ACL sans perspective de guérison.

### III.4.2 Identification de gènes modulés dans les populations ACL

La recherche sans *a priori*, par « *ressource driven* », a pu être réalisée sur les populations homogènes dérivées des hiPSCs. Ces analyses d'expression différentielle ont mis en évidence 21 gènes modulés de façon commune dans les deux types de progénies porteurs de l'ACL. La validation des données issues des analyses transcriptomiques a été effectuée pour 4 gènes choisis pour être les plus fortement dérégulés dans les populations malades. Ces gènes, *NNAT*, *GSTT1*, *TRIM61* et *ZNF558* nécessitent d'être investigués pour connaître leur lien réel avec l'ACL.

## **IV Discussion et perspectives**

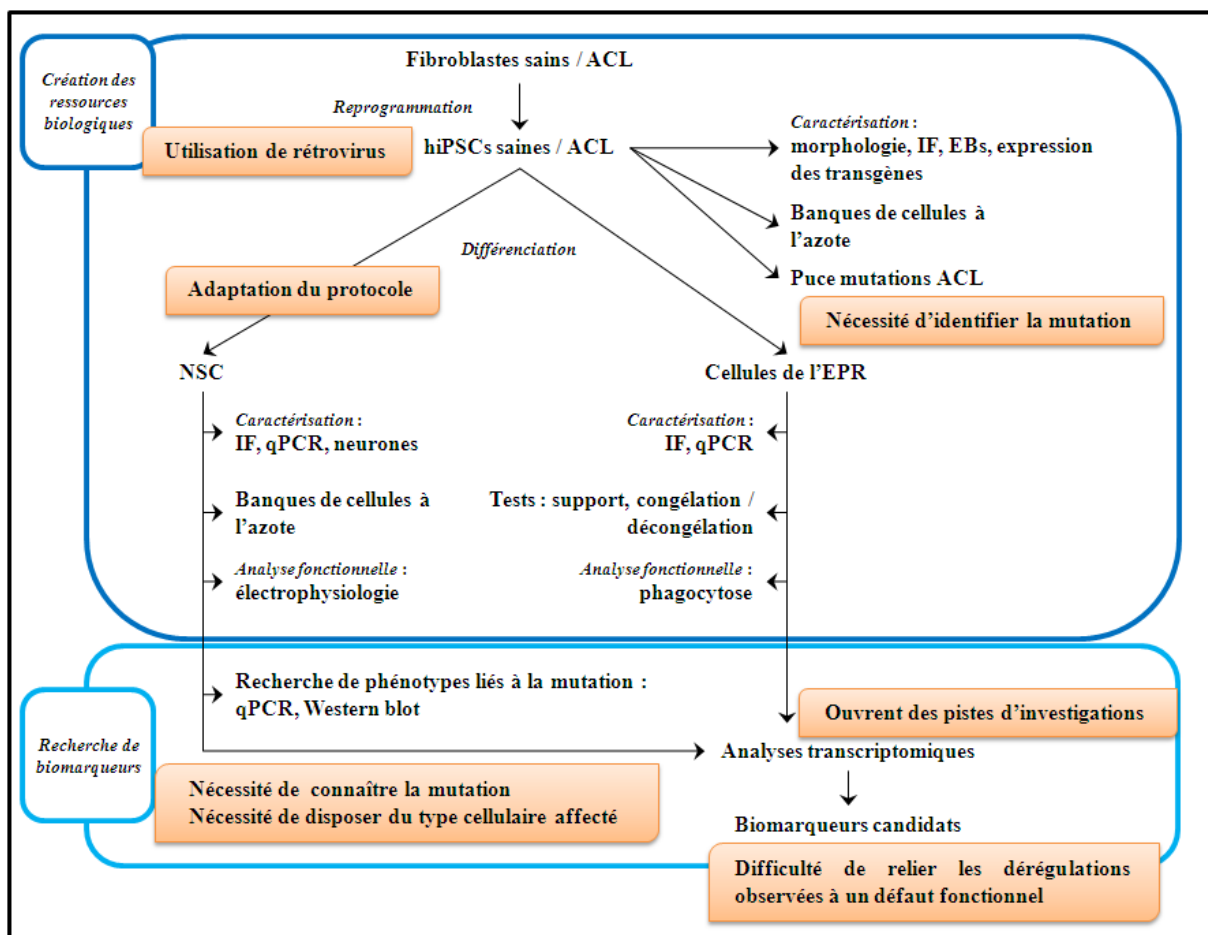




Depuis leur découverte en 2006, les cellules souches pluripotentes induites représentent un domaine en plein développement. Ces nouvelles cellules, qui plus est lorsqu'elles sont d'origine humaine, sont un formidable outil pour les chercheurs qui peuvent désormais accéder et étudier tout type de pathologie.

L'application développée dans ces travaux de recherche est la modélisation pathologique d'une maladie monogénique, l'ACL, qui a permis d'identifier des dérégulations des gènes *NNAT*, *GSTT1*, *TRIM61* et *ZNF558*. Ces gènes constituent une base de recherche pour étudier les mécanismes à l'origine des symptômes présentés par les patients (hypermétropie, nystagmus, ERG non mesurable etc.).

L'expérience acquise durant ces travaux de doctorat permet, en se basant sur la stratégie générale du projet, d'évaluer l'intérêt mais aussi les limites de la modélisation pathologique de l'ACL au travers des réalisations effectuées et des difficultés rencontrées (**Figure 121**).



**Figure 121** : expérience acquise durant le projet de modélisation pathologique de l'ACL.

## IV.1 Complexité de la recherche sur l'ACL

A ce jour, 18 gènes ont été identifiés comme étant à l'origine des diverses formes d'ACL, ces gènes n'expliquant que 70% des cas d'ACL. Les recherches concernant l'ACL visent essentiellement à trouver de nouveaux gènes provoquant la pathologie chez des patients non encore génotypés et à mettre en œuvre la thérapie génique chez l'Homme pour l'ACL de type 2 causée par RPE65. La thérapie génique est également développée dans des modèles murins de l'ACL causée par les gènes *AIPL1*, *GUCY2D* ou *LRAT* (Den Hollander et al., 2010).

Cependant, de par l'hétérogénéité génétique et symptomatique, le manque de modèles animaux représentant l'ensemble des symptômes présents chez l'Homme et la difficulté d'accès à des ressources biologiques humaines atteintes par l'ACL, peu d'études concernent le décryptage des mécanismes moléculaires et cellulaires altérés par la maladie, quelque soit sa forme. En effet, pour les étudier il est essentiel de disposer de modèles pertinents.

Pour une pathologie comme l'ACL, qui touche le système visuel et qui peut être symptomatique *in utero* ou dès la naissance, les ressources biologiques humaines pour étudier la mise en place des symptômes associés à la maladie sont quasiment inaccessibles. Les propriétés fondamentales des hiPSCs, l'auto-renouvellement et la pluripotence, permettent de disposer *a priori* de l'ensemble des types cellulaires d'intérêt en quantité non limitante pour peu que l'on connaisse les protocoles à appliquer ceci tout en conservant le même fond génétique. Les avantages majeurs des hiPSCs porteuses d'ACL sont par ailleurs, de disposer d'un modèle humain, standard, stable, homogène et naturellement porteur de la maladie.

## IV.2 Recherche de la mutation causale de l'ACL

Au début de ce projet nous pensions pouvoir obtenir des fibroblastes génotypés, porteurs de l'ACL, après consentement éclairé des patients mais cela n'a pu être réalisé dans les temps car les tests de diagnostic réalisés sur ces patients sont établis à partir de prélèvements sanguins, les patients n'ont pas l'habitude de subir des traitements invasifs tels que des prélèvements de peau. Les fibroblastes humains que nous avons reprogrammés en hiPSCs sont commerciaux (Coriell) et proviennent de patients qui, au vu des symptômes présentés, sont décrits comme atteints par l'ACL (source : Coriell).

Le génotypage de ces fibroblastes à l'aide de la puce d'Asper Ophthalmics n'a pas permis d'identifier la mutation causale de l'ACL pour ces patients. Le polymorphisme identifié est commun puisque chez des personnes non malades, en position 154 de l'exon 2 du gène *GUCY2D*, la base G est retrouvée à 59.307% (1300 fois sur 2192) et la base T à près de 40.693% (892 fois sur 2192)<sup>19</sup>. Ce polymorphisme peut ne pas être impliqué dans l'ACL mais il peut constituer une mutation de

---

<sup>19</sup> <http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgc?hgsid=307407363&c=chr17&o=7906518&t=7906519&g=snp135&i=rs61749665>

susceptibilité. Pour connaître la véritable mutation causale de l'ACL chez ces patients, il faudrait envisager une analyse plus précise en débutant par du séquençage de Sanger des gènes *GUCY2D* et *RPE65*, soupçonnés d'être à l'origine de la pathologie au vu des symptômes présentés par les patients (source : Coriell). Si ce résultat s'avère à nouveau négatif, un criblage de l'ensemble des gènes actuellement connus comme étant impliqués dans l'ACL devrait être réalisé. Enfin, s'il s'agit d'un gène non encore identifié, un séquençage d'exome entier permettant d'étudier uniquement les zones codantes des gènes, présentant l'avantage de pouvoir découvrir des gènes responsables de maladies rares ou extrêmement hétérogènes devrait être envisagé (Bick and Dimmock, 2011; Najmabadi et al., 2011; Ostrer, 2011; Singleton, 2011).

## **IV.3 Méthodologie de reprogrammation des fibroblastes**

### **IV.3.1 Amélioration des techniques de reprogrammation**

En 2009, date à laquelle les fibroblastes ont été reprogrammés, des rétrovirus, vecteurs des facteurs dits de Yamanaka (Oct4, Klf4, Sox2 et c-Myc : OKSM), ont été utilisés pour générer les hiPSCs, cette méthode basée sur la découverte de l'équipe du Dr Yamanaka ayant déjà permis à l'institut d'établir des lignées d'hiPSCs saines. Ces vecteurs s'intègrent de façon stable dans le génome des cellules de l'hôte ce qui permet l'introduction des facteurs de reprogrammation. L'expression de ces transgènes doit ensuite décroître au fil de la reprogrammation et s'éteindre totalement à la fin du processus. Une inactivation partielle de ces facteurs exogènes peut nuire au potentiel de différenciation des cellules générées et également induire la formation de tumeurs (Okita et al., 2007; Takahashi and Yamanaka, 2006). L'expression des transgènes diminue au cours du temps mais n'est pas complètement éteinte ni dans nos hiPSCs après plusieurs passages, ni dans les populations différenciées ce qui peut avoir à terme un impact sur ces cellules. Durant mes travaux de doctorat nous ne nous sommes pas attachés à améliorer la méthode de reprogrammation des fibroblastes de patients mais il est apparu dans les nombreuses publications scientifiques du domaine, des méthodes de reprogrammation plus efficaces qui permettent de générer des hiPSCs de meilleure qualité.

L'approche la plus efficace et la plus sûre décrite à l'heure actuelle consiste à se passer de vecteurs et utiliser de l'ARN messager (ARNm) pour éviter de générer des empreintes à l'intérieur du génome des futures iPSCs et d'avoir à éliminer, par la suite, les traces de vecteurs. Les iPSCs, produites grâce à l'ARNm, auraient un profil d'expression proche des CSEh (Warren et al., 2010). De cette façon, l'équipe du Dr Warren a pu générer dès 2010 des hiPSCs grâce à des ARNm modifiés par transcription *in vitro* (Warren et al., 2010). Pour améliorer l'efficacité de la traduction et accroître la demi-vie de l'ARNm, une coiffe de guanine a été incorporée en 5', le cadre de lecture des gènes d'intérêt contenait un fort signal d'initiation de la traduction, également en 5', enfin, en 3' se trouvait

une région non traduite d' $\alpha$ -globine terminant par une séquence d'oligo dT permettant d'y ajouter une queue polyA qui est constituée d'une succession de résidus de type adénosine. Pour faciliter l'incorporation des ARN dans la cellule, éviter les risques de rejet et améliorer la survie des cellules, la cytidine a été remplacée par la 5-méthylcytidine, l'uridine a été substituée par la pseudo-uridine et la protéine recombinante B18R, qui est un inhibiteur des interférons de type I, a été ajoutée au milieu de culture. L'efficacité de reprogrammation de 1% avec les facteurs OKSM atteint 4% si l'on ajoute Lin28. Ce protocole hautement efficace nécessitait cependant la présence de cellules nourricières et un grand nombre d'étapes pour préparer les ARN modifiés. Par ailleurs les cellules somatiques devaient être transfectées tous les jours pendant deux semaines. C'est pourquoi, la même équipe a révisé ce protocole pour optimiser la dérivation d'hiPSCs sans cellules nourricières, sans facteurs étrangers et en utilisant une autre combinaison de facteurs (Warren et al., 2012).

Les micros ARNs (miARNs) peuvent également être utilisés pour produire des iPSCs (Anokye-Danso et al., 2011; Miyoshi et al., 2011; Underbayev et al., 2012). Seule l'équipe de Miyoshi a utilisé des doubles brins de miARNs matures, miR-200 et les familles miR-302 et miR-369 pour reprogrammer des cellules somatiques murines sans vecteurs intégratifs, cependant l'efficacité est moindre (Miyoshi et al., 2011).

Un protocole optimal serait de transfecter les cellules somatiques avec une combinaison d'ARNm et de miARNs, dont les doses et les fréquences de transfection sont encore à définir, afin d'allier efficacité, facilité et sûreté pour produire des hiPSCs qui pourraient alors être utilisées pour des applications de type modélisation pathologique mais aussi pour la thérapie cellulaire.

### **IV.3.2 Reprogrammation directe des fibroblastes en cellules différenciées**

Certaines équipes se sont lancées dans la reprogrammation directe en surexprimant certains facteurs pour générer directement les types cellulaires d'intérêt notamment des neurones iN (pour *induced Neuronal cells*) (Vierbuchen et al., 2010), des neurones dopaminergiques (ou iDA pour *induced DopAminergic*), des neurones moteurs spinaux (ou iMNs pour *induced Motor Neurons*) (Caiazzo et al., 2011; Han et al., 2012; Kim et al., 2011; Lujan et al., 2012; Marro et al., 2011; Pang et al., 2011; Pfisterer et al., 2011; Son et al., 2011; Thier et al., 2012; Yoo et al., 2011) ou encore des cardiomyocytes et hépatocytes murins (Efe et al., 2011; Huang et al., 2011; Inagawa and Ieda, 2012) ainsi que des progéniteurs humains des cellules sanguines (Szabo et al., 2010).

Pour le moment, il n'existe pas de protocole permettant de reprogrammer les fibroblastes directement en cellules de l'EPR ou en photorécepteurs. Une étude de l'équipe du Dr Tomita a cependant montré qu'il est possible d'induire la différenciation de fibroblastes murins, en utilisant des conditions définies dont la culture en neurosphères et l'ajout de taurine et d'acide rétinoïque, pour produire après 30 jours de différenciation des progéniteurs des photorécepteurs exprimant à hauteur de

20% la recoverine (marqueur des cônes) et à près de 50% la rhodopsine (marqueur des bâtonnets) (Wang et al., 2011). Enfin, il est possible de reprogrammer, transdifférencier, chez le poulet, des cellules de l'EPR en neurones rétiniens grâce notamment au facteur de transcription Sox2 (Ma et al., 2009; Wang and Yan, 2012).

Cependant quel que soit le mode de génération des hiPSCs, l'inconvénient majeur, comme chez les CSEh, est, qu'elles ne peuvent rendre compte ni de la complexité tissulaire ni de la complexité d'un organisme global car les cellules sont déconnectées de leurs partenaires. Ainsi, seuls peuvent être décryptés les mécanismes propres aux types cellulaires étudiés.

### **IV.3.3 Une alternative à la reprogrammation, le génie génétique**

Une alternative à l'usage de fibroblastes reprogrammés de patients porteurs de l'ACL pourrait être de créer des hiPSCs ou des CSEh porteuses d'une forme d'ACL par thérapie génique afin de créer des modèles cellulaires humains de la maladie. Cette approche avait été utilisée pour le syndrome de Lesch Nyhan (transmission récessive liée à l'X) dont des CSEh saines ont été génétiquement modifiées en introduisant une mutation dans le gène *HPRT1* causal de la maladie par recombinaison homologue (Urbach et al., 2004). Il est tout à fait envisageable de transférer des hiPSCs/CSEh saines ou encore des NSC saines avec des systèmes qui éteindraient le gène souhaité (Liang et al., 2012) ce qui permettrait d'étudier la mise en place des mécanismes pathologiques au cours du développement. L'utilisation de CSEh permettrait de s'affranchir des difficultés éventuelles de la reprogrammation alors que les hiPSCs permettent de s'affranchir des considérations éthiques liées à l'usage de CSEh. Une fois le phénotype pathologique mis à jour dans ces cellules génétiquement modifiées, des essais de restauration de la fonction pourraient être pratiqués en testant, par exemple, des composés potentiellement thérapeutiques.

## **IV.4 Choix des populations cellulaires étudiées**

### **IV.4.1 Les NSC et cellules de l'EPR : types cellulaires pertinents ?**

Pour la modélisation pathologique de l'ACL, nous voulions créer des modèles cellulaires homogènes et stables de la maladie en produisant des types cellulaires d'intérêt afin d'étudier les mécanismes conduisant aux symptômes présentés par les patients.

La logique aurait voulu que nous développions les types cellulaires affectés par la maladie à savoir les photorécepteurs, cônes et bâtonnets, ainsi que les cellules de l'EPR. Cependant, en 2009, au démarrage de ce projet, l'obtention des photorécepteurs en culture à partir de CSEh était un processus long et qui ne conduisait pas à des populations suffisamment homogènes (Lamba et al., 2006; Osakada et al., 2008) pour mener à bien notre projet de modélisation pathologique. Les photorécepteurs

provenant du développement du diencephale notre choix s'est porté sur la production de progéniteurs neuraux, les NSC et de cellules de l'EPR à partir d'hiPSCs naturellement porteuses d'ACL car pour pouvoir mener à bien des analyses transcriptomiques visant à identifier un (ou des) biomarqueur(s) de la maladie et/ou mettre en place un crible de molécules à potentiel thérapeutique il est nécessaire de posséder de modèles cellulaires standards, stables et homogènes si l'on veut pouvoir obtenir des résultats fiables.

Par ailleurs, ces populations cellulaires doivent être facilement amplifiables pour être disponibles en grande quantité afin de mettre au point le test qui sera réalisé lors du criblage, mener la campagne de criblage puis valider les données issues de ce criblage. Par ailleurs, le protocole d'obtention des NSC était bien établi au laboratoire et le protocole d'obtention des cellules de l'EPR était bien décrit dans la littérature. Enfin, ces cellules sont compatibles avec le format miniaturisé (culture adhérente en plaque 384 puits) imposé pour les campagnes de criblages à haut débit car elles se cultivent en adhérence, sans cellules nourricières et peuvent être amplifiées en grande quantité grâce à des passages enzymatiques.

L'obtention des NSC et des cellules de l'EPR s'est effectuée de manière similaire pour les cellules mutées et pour les cellules contrôles, en terme de prolifération évaluée par le temps de doublement, la fréquence des passages, la morphologie des cellules et les marqueurs spécifiques exprimés par chaque population, ce qui tend à prouver que les processus moléculaires et cellulaires liés à l'ACL peuvent se dérouler plus tardivement et/ou se produire dans d'autres types cellulaires tels que les photorécepteurs atteints dans certaines formes d'ACL. Comparativement aux données de la littérature et aux caractérisations effectuées, nos NSC sont bien des progéniteurs neuraux encore immatures et les cellules de l'EPR correspondent à des populations fœtales. Ainsi ces populations peuvent ne pas être suffisamment différenciées et matures pour établir un lien génotype/phénotype cependant elles rendent possible l'étude des mécanismes dysfonctionnant au cours du développement de la maladie grâce à l'engagement des hiPSCs dans ces types cellulaires.

#### **IV.4.2 Comment générer des photorécepteurs ?**

Au début du projet, les protocoles décrits dans la littérature permettaient de générer des progéniteurs des photorécepteurs dès quatre semaines de culture (Lamba et al., 2006; Meyer et al., 2009) mais l'obtention des photorécepteurs était beaucoup plus longue puisqu'elle pouvait prendre de 100 à 170 jours selon le protocole considéré (Hirami et al., 2009; Osakada et al., 2008). Les protocoles parus plus récemment permettent d'obtenir des cellules appartenant aux vésicules et/ou coupes optiques dès 18 jours de culture (Eiraku et al., 2011; Meyer et al., 2011; Nakano et al., 2012).

Une tentative de différenciation d'hiPSCs et de CSEh saines a été entreprise en suivant le protocole établi par l'équipe du Dr Gamm (Meyer et al., 2011) afin de générer les structures de types vésicules optiques qui contiennent entre autres les progéniteurs des photorécepteurs. Les cellules ont été



différenciées en rosettes neurales selon le protocole d'induction neurale du laboratoire puis les rosettes ont été cultivées en suspension dans le milieu utilisé par l'équipe du Dr Gamm. Nous ne sommes pas parvenus à distinguer des structures dites vésiculaires des structures non vésiculaires. Seules des analyses par immunocytochimie ont été réalisées sur les différentes structures non triées après 21 jours et 28 jours de différenciation et montraient l'expression hétérogène et variable d'une lignée à l'autre d'OTX2, LHX2, NES, PAX6, SOX2 et TUBB3, la recherche des protéines MITF et GFAP s'est avérée négative. Pour des raisons techniques, nous n'avons pas étudié de manière approfondie la différenciation des hiPSCs en photorécepteurs mais il serait sans nul doute informatif de comparer la dérivation des hiPSCs saines et mutées pour identifier un phénotype lié à la mutation qui pourrait constituer un biomarqueur de la maladie.

Les protocoles des équipes des Drs Gamm et Sasai, plus rapides et plus simples à mettre en œuvre pourraient permettre non seulement d'étudier de façon très précoce la mise en place des différentes cellules de l'EPR et de la RN mais aussi d'observer la bonne ou mauvaise stratification de cette dernière. Le tour de force serait alors de pouvoir obtenir une grande quantité de photorécepteurs homogènes et fonctionnels à partir de ces progéniteurs car l'obtention de cellules de type photorécepteurs à partir de ces structures est encore longue (près de 120 jours pour Nakano et al., 2012). Posséder des photorécepteurs, cellules atteintes par certaines formes d'ACL, dérivés d'hiPSCs porteurs d'ACL permettrait d'étudier les mécanismes conduisant à l'ACL cependant, la culture en suspension est pour l'heure incompatible avec le développement de crible à haut débit car les robots utilisés pour manipuler les plaque 384 puits procèdent à de multiples aspiration/refoulement de milieu, composés, solutions de rinçage, et risqueraient à terme d'aspirer les photorécepteurs.

#### **IV.4.3 Adaptation du protocole de dérivation des cellules souches neurales**

Pour différencier les hiPSCs saines et mutées en NSC, j'ai dans un premier temps utilisé le protocole d'usage de l'institut qui se décomposait en deux phases, la première consistant à obtenir des rosettes neurales à partir des cellules souches pluripotentes en se basant sur la méthode décrite par l'équipe du Dr Studer (Chambers et al., 2009), la seconde concernant la différenciation de ces rosettes neurales en NSC. Lors des multiples essais réalisés à partir des hiPSCs, le passage de l'induction neurale à la différenciation posait problème. En effet, les cellules obtenues à partir des rosettes neurales finissaient toujours par dégénérer en culture. L'échec à cette étape de différenciation peut avoir plusieurs origines, l'intégration et la non-extinction des transgènes qui altèrent le processus mais aussi la reprogrammation partielle des cellules somatiques et une plus grande fragilité des cellules qui nécessitent des conditions de cultures appropriées, différentes de celles utilisées pour dériver les cellules souches embryonnaires humaines (CSEh).

Comme les hiPSCs avaient été caractérisées, semblaient correctement reprogrammées et que l'induction neurale se déroulait de façon analogue à l'induction neurale de CSEh en rosettes neurales, j'ai tout d'abord pensé que les progéniteurs neuraux n'étaient pas dans un environnement favorable pour se différencier en NSC. J'ai alors modifié les conditions de culture en changeant tout d'abord le revêtement des supports de culture, en augmentant la concentration en laminine mais cela s'est révélé inefficace, les rosettes neurales continuaient à dégénérer. J'ai par la suite voulu préserver la structure des rosettes neurales lors de leur différenciation en NSC. Ainsi, les rosettes neurales ont été sélectionnées mécaniquement sous le contrôle d'une loupe binoculaire puis placées, sans dissociation afin de maintenir leur structure intacte, sur des boîtes recouvertes successivement par de la poly-L-ornithine et de la laminine en présence du milieu de différenciation en NSC. Cette adaptation du protocole a permis d'obtenir des NSC c'est pourquoi des analyses plus complètes concernant les sites d'intégration des transgènes et leur extinction partielle n'ont pas été menées.

## **IV.5 Les analyses transcriptomiques**

### **IV.5.1 Nouvelles pistes d'investigations**

Deux types d'approches complémentaires peuvent être employés pour la modélisation pathologique. L'approche « *resource driven* » est basée sur la ressource et permet, grâce à ses avantages tels que la quantité disponible, la stabilité ou encore sa facilité d'utilisation, de rechercher sans *a priori* les différences protéomiques ou génétiques existantes entre des populations cellulaires choisies grâce à des méthodes exhaustives comme le protéome ou le transcriptome. Les protéines ou des gènes différentiellement modulés peuvent refléter les conséquences de la présence de la mutation. *A contrario*, l'approche « *hypothesis driven* » se fonde sur la connaissance de la maladie et sur les données pertinentes issues de la littérature scientifique pour étudier une pathologie donnée.

Au démarrage du projet, au laboratoire, plusieurs équipes avaient utilisé des approches transcriptomiques lors de projets de modélisation pathologique basés sur les CSEh naturellement porteuses d'une maladie monogénique. L'analyse transcriptomique est très puissante puisqu'elle permet à l'heure actuelle d'étudier la modulation simultanée de près de 32000 gènes humains grâce à des puces à exons et d'en faire uniquement ressortir les gènes potentiellement reliés à la présence de la mutation. Ces gènes peuvent alors être considérés comme des biomarqueurs candidats de la pathologie. En utilisant cette approche pour la modélisation pathologique de DM1, plusieurs gènes dérégulés par la maladie ont été mis en évidence dont *SLITRK4* qui a lui-même permis d'étudier l'arborisation des neurites dans les progénies dérivées des CSEh porteuses de DM1 (Denis et al., 2011; Marteyn et al., 2011). Cette année, trois gènes particulièrement modulés dans des populations neurales issues de CSEh porteuses de HD ont été mis en évidence. Deux d'entre eux présentent les mêmes

dérégulations que chez les patients atteints d'HD ce qui suggère qu'ils puissent être de nouveaux biomarqueurs de la pathologie (Feyeux et al., 2012). Ces nouveaux biomarqueurs candidats doivent être liés à un phénotype dû à la mutation ce qui nécessite d'étudier les mécanismes de la pathologie.

Ne disposant pas de la mutation responsable de l'ACL de nos hiPSCs, NSC et cellules de l'EPR, l'approche « *hypothesis driven* » a été difficile à mettre en œuvre car nous ne savions pas quels mécanismes étudier. Sachant que les deux lignées présentaient un polymorphisme commun sur le gène *GUCY2D*, nous voulions étudier le fonctionnement normal ou anormal de la protéine en détectant le GMPc produit par les guanylates cyclases grâce à un kit de détection du GMPc compatible avec l'analyse à haut débit commercialisé par la société Cisbio<sup>20</sup>. Cependant la recherche de la protéine par Western Blot dans les NSC s'est révélée infructueuse en termes de détection. Parallèlement, nous avons entrepris d'étudier les enzymes impliquées dans le cycle visuel en recherchant les ARNm des gènes *ABCA4*, *CRALBP*, *IRBP*, *LRAT*, *RDH5*, *RDH12*, et *RPE65* par qPCR dans les populations de cellules de l'EPR mais seules les sondes des gènes *IRBP* et *RDH12* ont pu être validées dans les cellules de rétine fœtale et les cellules de l'EPR issues d'hiPSCs.

L'approche « *ressource driven* » a alors été menée sur les populations cellulaires d'intérêt à savoir les NSC et les cellules de l'EPR car ces cellules bien qu'immatures sont engagées dans le lignage neural et rétinien. Nos hiPSCs et donc les NSC et les cellules de l'EPR qui en dérivent, ne représentent ni l'ensemble des formes d'ACL ni l'ensemble des symptômes. Cependant en étudiant les dérégulations géniques des dérivés cellulaires issus des hiPSCs pathologiques, notre objectif était de comprendre ce qui conduisait aux symptômes présentés par les patients et que l'on peut retrouver dans les autres formes de la maladie. Les modulations mises à jour dans ce modèle humain qui permet de s'affranchir de la barrière de l'espèce, sont peut être, *a priori*, plus appropriées que celles découvertes dans les modèles animaux.

Les analyses transcriptomiques ont consisté à analyser la modulation de près de 32000 gènes humains dans les différentes populations cellulaires dérivées d'hiPSCs. Ne connaissant pas la mutation causale de la maladie chez les hiPSCs ACL, il est tout à fait possible, au vu de l'hétérogénéité génétique de la maladie, que les patients ne soient pas porteurs de la même forme d'ACL. Cependant nous avons choisi de grouper les échantillons issus des lignées femelle et mâle ACL en partant du postulat que nous pourrions identifier des défauts précoces de mise en place de la maladie qui peuvent être communs à différentes formes d'ACL.

A l'issue des analyses transcriptomiques, qui ont permis de tester l'expression de 32 000 gènes humains dans chacun des échantillons, 21 gènes ont été identifiés comme étant dérégulés de façon commune dans les NSC et les cellules de l'EPR atteintes par l'ACL. Chacun de ces 21 gènes peut être considéré comme un biomarqueur candidat de la maladie.

---

<sup>20</sup> <http://www.htrf.com/cgmp-assay>

## IV.5.2 Difficultés de relier les dérégulations géniques observées à un défaut fonctionnel

Pour modéliser de façon correcte une pathologie, le biomarqueur candidat doit être validé en reliant sa modulation à un phénotype moléculaire ou cellulaire chez les cellules mutées. La première difficulté à l'issue des analyses transcriptomiques a donc été de lier le défaut de modulation des 21 gènes dérégulés à l'ACL car leur fonction réelle est souvent inconnue ce qui nécessite de mettre en place les outils qui permettent d'étudier leur rôle physiopathologique en utilisant notamment comme contrôles, des modèles animaux ou des cultures primaires. Ces modulations ouvrent le champ des investigations futures :

- Par quel(s) mécanisme(s) la mutation causale de l'ACL entraîne-t-elle une dérégulation de ces 21 gènes dans les populations cellulaires pathologiques ?
- Ces dérégulations ont-elles des conséquences sur le phénotype des patients ?
- Ces différents gènes interagissent-ils ? et si oui, par quelles voies ?
- Ces gènes, ou certains d'entre eux, peuvent-ils être considérés comme des biomarqueurs de la maladie ?

Concernant les quatre gènes les plus fortement dérégulés dans les populations porteuses de l'ACL, *NNAT*, *GSTT1*, *TRIM61* et *ZNF558*, étudier plus finement leur modulation dans ce nouveau modèle humain, permettrait d'évaluer leurs implications possibles dans cette forme d'ACL. Ces hiPSC, NSC et cellules de l'EPR naturellement porteuses d'ACL, complètent les modèles animaux déjà décrits car elles peuvent non seulement participer à la découverte de biomarqueurs moléculaires et pathologiques mais aussi améliorer l'efficacité de la découverte de médicaments dans le sens où ces médicaments seraient spécifiques à une population particulière de patients atteints par l'ACL.

Étudier un gène en particulier nécessite de combiner à l'approche « *ressource driven* », l'approche « *hypothesis driven* ». En se basant sur les données de la littérature, le gène *GSTT1* semble d'autant plus intéressant qu'il pourrait être impliqué dans le stress oxydatif qui touche à l'intégrité de l'EPR (Cai et al., 2000; Plafker et al., 2012). Les analyses par qPCR confirment que ce gène est significativement sous-exprimé dans les cellules de l'EPR ACL et plus particulièrement dans les échantillons issus de la lignée femelle porteuse de l'ACL. Par ailleurs, des polymorphismes des glutathiones ont été décrits comme menant à des pathologies de l'œil telles que la cataracte liée à l'âge, la DMLA, ou encore le glaucome à angle ouvert (Güven et al., 2011; Jiang et al., 2012; Juronen et al., 2000; Othman et al., 2012) mais le rôle précis de *GSTT1* dans l'ACL est pour l'heure inconnu. Travailler sur ce gène nécessite de développer de nouveaux outils permettant de déterminer s'il peut être considéré comme un biomarqueur de la pathologie.

Il faut également pouvoir comparer et valider les résultats obtenus dans différentes lignées de cellules mutées et saines ce qui permet de répliquer les résultats sur des fonds génétiques différents ce qui lisse les variabilités inter-individus. La dérivation de multiples lignées d'hiPSCs saines est possible car l'accès à des tissus de personnes saines est aisé, cependant, pour dériver différentes hiPSCs porteuses de la même forme d'ACL, la collaboration avec un centre de diagnostic de l'ACL est inévitable au vu de l'hétérogénéité génétique de la maladie. Concernant les autres ressources cellulaires possibles, il n'existe pas à l'heure actuelle de lignées de CSEh mutées et accéder à des cultures primaires est quasiment impossible. Ainsi, la grande difficulté du projet a été de ne pas posséder de contrôles cellulaires de la maladie : NSC, cellules de l'EPR fœtales et/ou adultes, photorécepteurs fœtaux et/ou adultes.

Enfin, la validation des résultats passe également par l'utilisation de modèles animaux pertinents. Pour se faire il est essentiel d'identifier la mutation causale de la pathologie et également d'entrer en contact avec des scientifiques ayant des connaissances approfondies de ces modèles pour pouvoir confirmer nos résultats.

En conclusion, ce projet de doctorat mené durant 2 ans m'a permis de travailler sur la modélisation pathologique basée sur le développement d'un nouvel outil cellulaire : les hiPSCs. La création de cet outil, puis la dérivation des différentes lignées de NSC et de cellules de l'EPR, ont occupé la plus grande partie de mes années de thèse. Ces populations cellulaires ont permis d'étudier les modulations génétiques dans ces dérivés cellulaires issus d'hiPSCs pathologiques et saines, afin de tenter d'identifier un ou des biomarqueur(s) de l'amaurose congénitale de Leber. Mener ces travaux m'a permis d'identifier et d'évaluer les avantages et les inconvénients de cet outil dont l'utilisation peut aller de l'étude du développement embryonnaire à la thérapie cellulaire en passant par la modélisation pathologique.

Les différentes banques de cellules disponibles et les résultats préliminaires de ces travaux ouvrent de nouvelles voies de recherche concernant la détection de la mutation chez ces cellules, la mise au point de protocole d'obtention de photorécepteurs et l'investigation plus approfondie des données issues du transcriptome. Ces perspectives de recherche permettent d'espérer pouvoir étudier, connaître et comprendre les mécanismes conduisant à l'ACL afin de développer des thérapies pertinentes.

Enfin, au vu de la littérature scientifique, la tendance actuelle est plutôt de travailler avec les hiPSCs en continuant en parallèle les travaux initiés avec les CSEh qui demeurent le modèle standard de cellules pluripotentes. Les hiPSCs, malgré leur jeune âge, sont déjà parfaitement utilisables pour la modélisation pathologique (Onder and Daley, 2012) en évitant les écueils que nous avons mis à jour dans ces travaux. Elles peuvent également servir à mener des campagnes de criblages qui visent à tester l'effet de molécules médicaments candidats sur les phénotypes (biomarqueurs) présentés par les

modèles cellulaires de la maladie afin d'espérer revenir à un état plus proche de la normale pour le phénotype considéré. A l'avenir, la possibilité de générer des hiPSCs à partir d'un patient, de manière plus sûre, stable épigénétiquement, et plus efficacement éviterait les complications telles que le rejet de la greffe lors de thérapie cellulaire. Cependant des recherches sur les effets de la reprogrammation de ces cellules doivent encore être menées, et l'innocuité d'une telle injection est encore à démontrer.

## **Références bibliographiques**





- Aasen, T., Raya, A., Barrero, M.J., Garreta, E., Consiglio, A., Gonzalez, F., Vassena, R., Bilić, J., Pekarik, V., Tiscornia, G., et al. (2008). Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes. *Nat. Biotechnol.* *26*, 1276–1284.
- Acampora, D., Mazan, S., Lallemand, Y., Avantsaggiato, V., Maury, M., Simeone, A., and Brûlet, P. (1995). Forebrain and midbrain regions are deleted in *Otx2*<sup>-/-</sup> mutants due to a defective anterior neuroectoderm specification during gastrulation. *Development* *121*, 3279–3290.
- Acland, G.M., Aguirre, G.D., Bennett, J., Aleman, T.S., Cideciyan, A.V., Bennicelli, J., Dejneka, N.S., Pearce-Kelling, S.E., Maguire, A.M., Palczewski, K., et al. (2005). Long-term restoration of rod and cone vision by single dose rAAV-mediated gene transfer to the retina in a canine model of childhood blindness. *Mol. Ther.* *12*, 1072–1082.
- 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*, 92–95.
- Adler, R., and Canto-Soler, M.V. (2007). Molecular mechanisms of optic vesicle development: complexities, ambiguities and controversies. *Dev. Biol.* *305*, 1–13.
- Aguirre, G.D., Baldwin, V., Pearce-Kelling, S., Narfström, K., Ray, K., and Acland, G.M. (1998). Congenital stationary night blindness in the dog: common mutation in the RPE65 gene indicates founder effect. *Mol. Vis.* *4*, 23.
- Ahnelt, P., and Kolb, H. (1994). Horizontal cells and cone photoreceptors in human retina: a Golgi-electron microscopic study of spectral connectivity. *J. Comp. Neurol.* *343*, 406–427.
- Ahnelt, P.K. (1998). The photoreceptor mosaic. *Eye (Lond)* *12* ( Pt 3b), 531–540.
- Ahnelt, P.K., and Kolb, H. (2000). The mammalian photoreceptor mosaic-adaptive design. *Prog Retin Eye Res* *19*, 711–777.
- Akakura, S., Singh, S., Spataro, M., Akakura, R., Kim, J.-I., Albert, M.L., and Birge, R.B. (2004). The opsonin MFG-E8 is a ligand for the  $\alpha$ v $\beta$ 5 integrin and triggers DOCK180-dependent Rac1 activation for the phagocytosis of apoptotic cells. *Exp. Cell Res.* *292*, 403–416.
- Aldahmesh, M.A., Al-Owain, M., Alqahtani, F., Hazzaa, S., and Alkuraya, F.S. (2010). A null mutation in CABP4 causes Leber's congenital amaurosis-like phenotype. *Mol. Vis.* *16*, 207–212.
- Almubrad, T., and Akhtar, S. (2011). Structure of corneal layers, collagen fibrils, and proteoglycans of tree shrew cornea. *Molecular Vision* *17*, 2283.
- Alonso, L., and Fuchs, E. (2003). Stem cells of the skin epithelium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *100 Suppl 1*, 11830–11835.
- Alper, J. (2009). Geron gets green light for human trial of ES cell-derived product. *Nat. Biotechnol.* *27*, 213–214.
- Alpern, M., Holland, M.G., and Ohba, N. (1972). Rhodopsin bleaching signals in essential night blindness. *J Physiol* *225*, 457–476.
- Amit, M., Carpenter, M.K., Inokuma, M.S., Chiu, C.P., Harris, C.P., Waknitz, M.A., Itskovitz-Eldor, J., and Thomson, J.A. (2000). Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture. *Dev. Biol.* *227*, 271–278.

- Amit, M., and Itskovitz-Eldor, J. (2002). Derivation and spontaneous differentiation of human embryonic stem cells. *J. Anat.* *200*, 225–232.
- Amit, M., Margulets, V., Segev, H., Shariki, K., Laevsky, I., Coleman, R., and Itskovitz-Eldor, J. (2003). Human feeder layers for human embryonic stem cells. *Biol. Reprod.* *68*, 2150–2156.
- An, M.C., Zhang, N., Scott, G., Montoro, D., Wittkop, T., Mooney, S., Melov, S., and Ellerby, L.M. (2012). Genetic correction of Huntington’s disease phenotypes in induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* *11*, 253–263.
- Andres-Barquin, P.J. (2001). Ramón y Cajal: a century after the publication of his masterpiece. *Endeavour* *25*, 13–17.
- Anokye-Danso, F., Trivedi, C.M., Jühr, D., Gupta, M., Cui, Z., Tian, Y., Zhang, Y., Yang, W., Gruber, P.J., Epstein, J.A., et al. (2011). Highly efficient miRNA-mediated reprogramming of mouse and human somatic cells to pluripotency. *Cell Stem Cell* *8*, 376–388.
- Aoki, C., and Siekevitz, P. (1988). Plasticity in Brain Development. *Scientific American* *259*, 56.
- Aoki, T., Ohnishi, H., Oda, Y., Tadokoro, M., Sasao, M., Kato, H., Hattori, K., and Ohgushi, H. (2010). Generation of induced pluripotent stem cells from human adipose-derived stem cells without c-MYC. *Tissue Eng Part A* *16*, 2197–2206.
- Aramant, R.B., and Seiler, M.J. (2004). Progress in retinal sheet transplantation. *Prog Retin Eye Res* *23*, 475–494.
- Aran, B., Sole, M., Rodriguez-Pizà, I., Parriego, M., Muñoz, Y., Boada, M., Barri, P.N., Izpisúa, J.C., and Veiga, A. (2012). Vitrified blastocysts from Preimplantation Genetic Diagnosis (PGD) as a source for human Embryonic Stem Cell (hESC) derivation. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*.
- Archer, S., Djamgoz, M.B., Loew, E., Partridge, J.C., and Vallergera, S. (1999). *Adaptive Mechanisms in the Ecology of Vision* (Springer).
- Arendt, D., and Wittbrodt, J. (2001). Reconstructing the eyes of Urbilateria. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* *356*, 1545–1563.
- Arnold, S.J., and Robertson, E.J. (2009). Making a commitment: cell lineage allocation and axis patterning in the early mouse embryo. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *10*, 91–103.
- Arshavsky, V.Y., Lamb, T.D., and Pugh, E.N. (2002). G Proteins and Phototransduction. *Annual Review of Physiology* *64*, 153–187.
- Aubin, J., Davy, A., and Soriano, P. (2004). In vivo convergence of BMP and MAPK signaling pathways: impact of differential Smad1 phosphorylation on development and homeostasis. *Genes Dev.* *18*, 1482–1494.
- Avery, S., Zafarana, G., Gokhale, P.J., and Andrews, P.W. (2010). The role of SMAD4 in human embryonic stem cell self-renewal and stem cell fate. *Stem Cells* *28*, 863–873.
- Avilion, A.A., Nicolis, S.K., Pevny, L.H., Perez, L., Vivian, N., and Lovell-Badge, R. (2003). Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes Dev.* *17*, 126–140.
- Awatramani, G.B., and Slaughter, M.M. (2001). Intensity-dependent, rapid activation of presynaptic metabotropic glutamate receptors at a central synapse. *J. Neurosci.* *21*, 741–749.

- Ayoub, G.S., and Copenhagen, D.R. (1991). Application of a fluorometric method to measure glutamate release from single retinal photoreceptors. *J. Neurosci. Methods* 37, 7–14.
- Azuma, N., Nishina, S., Yanagisawa, H., Okuyama, T., and Yamada, M. (1996). PAX6 missense mutation in isolated foveal hypoplasia. *Nat. Genet.* 13, 141–142.
- Baba, K., Sengupta, A., Tosini, M., Contreras-Alcantara, S., and Tosini, G. (2010). Circadian regulation of the PERIOD 2::LUCIFERASE bioluminescence rhythm in the mouse retinal pigment epithelium-choroid. *Mol. Vis.* 16, 2605–2611.
- Bachoud-Lévi, A.-C. (2009). Neural grafts in Huntington’s disease: viability after 10 years. *Lancet Neurol* 8, 979–981.
- Baehr, W., Karan, S., Maeda, T., Luo, D.-G., Li, S., Bronson, J.D., Watt, C.B., Yau, K.-W., Frederick, J.M., and Palczewski, K. (2007). The function of guanylate cyclase 1 and guanylate cyclase 2 in rod and cone photoreceptors. *J. Biol. Chem.* 282, 8837–8847.
- Baehr, W., and Palczewski, K. (2007). Guanylate cyclase-activating proteins and retina disease. *Subcell. Biochem.* 45, 71–91.
- Baguisi, A., Behboodi, E., Melican, D.T., Pollock, J.S., Destrempe, M.M., Cammuso, C., Williams, J.L., Nims, S.D., Porter, C.A., Midura, P., et al. (1999). Production of goats by somatic cell nuclear transfer. *Nat. Biotechnol.* 17, 456–461.
- Bailey, I.L., Bullimore, M.A., Raasch, T.W., and Taylor, H.R. (1991). Clinical grading and the effects of scaling. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 32, 422–432.
- Bainbridge, J.W., and Ali, R.R. (2008). Success in sight: The eyes have it! Ocular gene therapy trials for LCA look promising. *Gene Ther.* 15, 1191–1192.
- Bainbridge, J.W.B., 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. *New England Journal of Medicine* 358, 2231–2239.
- Bakall, B., Marmorstein, L.Y., Hoppe, G., Peachey, N.S., Wadelius, C., and Marmorstein, A.D. (2003). Expression and localization of bestrophin during normal mouse development. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 44, 3622–3628.
- Banerjee, P., Kleyn, P.W., Knowles, J.A., Lewis, C.A., Ross, B.M., Parano, E., Kovats, S.G., Lee, J.J., Penchaszadeh, G.K., Ott, J., et al. (1998). TULP1 mutation in two extended Dominican kindreds with autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Nat. Genet.* 18, 177–179.
- Barker, N., Van de Wetering, M., and Clevers, H. (2008). The intestinal stem cell. *Genes Dev.* 22, 1856–1864.
- Barlow, H.B., Hill, R.M., and Levick, W.R. (1964). RETINAL GANGLION CELLS RESPONDING SELECTIVELY TO DIRECTION AND SPEED OF IMAGE MOTION IN THE RABBIT. *J. Physiol. (Lond.)* 173, 377–407.
- Bauer, P.J. (1996). Cyclic GMP-gated channels of bovine rod photoreceptors: affinity, density and stoichiometry of Ca(2+)-calmodulin binding sites. *J. Physiol. (Lond.)* 494 ( Pt 3), 675–685.
- Baylor, D.A., Lamb, T.D., and Yau, K.W. (1979). Responses of retinal rods to single photons. *J. Physiol. (Lond.)* 288, 613–634.

- Bazan, N.G. (2006). Cell survival matters: docosahexaenoic acid signaling, neuroprotection and photoreceptors. *Trends Neurosci.* 29, 263–271.
- Le Beau, M.M. (1996). One FISH, two FISH, red FISH, blue FISH. *Nat. Genet.* 12, 341–344.
- Beck, R.W., Maguire, M.G., Bressler, N.M., Glassman, A.R., Lindblad, A.S., and Ferris, F.L. (2007). Visual acuity as an outcome measure in clinical trials of retinal diseases. *Ophthalmology* 114, 1804–1809.
- Beebe, D.C. (1986). Development of the ciliary body: a brief review. *Trans Ophthalmol Soc U K* 105 (Pt 2), 123–130.
- Beebe, D.C., and Coats, J.M. (2000). The lens organizes the anterior segment: specification of neural crest cell differentiation in the avian eye. *Dev. Biol.* 220, 424–431.
- Belecky-Adams, T., Tomarev, S., Li, H.S., Ploder, L., McInnes, R.R., Sundin, O., and Adler, R. (1997). Pax-6, Prox 1, and Chx10 homeobox gene expression correlates with phenotypic fate of retinal precursor cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 38, 1293–1303.
- Bemelmans, A.-P., Kostic, C., Crippa, S.V., Hauswirth, W.W., Lem, J., Munier, F.L., Seeliger, M.W., Wenzel, A., and Arsenijevic, Y. (2006). Lentiviral gene transfer of RPE65 rescues survival and function of cones in a mouse model of Leber congenital amaurosis. *PLoS Med.* 3, e347.
- Bennett, J., Ashtari, M., Wellman, J., Marshall, K.A., Cyckowski, L.L., Chung, D.C., McCague, S., Pierce, E.A., Chen, Y., Bennicelli, J.L., et al. (2012). AAV2 gene therapy readministration in three adults with congenital blindness. *Sci Transl Med* 4, 120ra15.
- Beresford, J.N. (1989). Osteogenic stem cells and the stromal system of bone and marrow. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 270–280.
- Bernstein, P.S., Balashov, N.A., Tsong, E.D., and Rando, R.R. (1997). Retinal tubulin binds macular carotenoids. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 38, 167–175.
- Berstine, E.G., Hooper, M.L., Grandchamp, S., and Ephrussi, B. (1973). Alkaline phosphatase activity in mouse teratoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 70, 3899–3903.
- Bessant, D.A., Payne, A.M., Mitton, K.P., Wang, Q.L., Swain, P.K., Plant, C., Bird, A.C., Zack, D.J., Swaroop, A., and Bhattacharya, S.S. (1999). A mutation in NRL is associated with autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Nat. Genet.* 21, 355–356.
- Bharti, K., Nguyen, M.-T.T., Skuntz, S., Bertuzzi, S., and Arnheiter, H. (2006). The other pigment cell: specification and development of the pigmented epithelium of the vertebrate eye. *Pigment Cell Research* 19, 380–394.
- Bhattacharyya, S., and Bronner-Fraser, M. (2004). Hierarchy of regulatory events in sensory placode development. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 14, 520–526.
- Bick, D., and Dimmock, D. (2011). Whole exome and whole genome sequencing. *Curr. Opin. Pediatr.* 23, 594–600.
- Billuart, P., Chelly, J., and Gilgenkrantz, S. (2005). [X-linked mental retardation]. *Med Sci (Paris)* 21, 947–953.
- Biomarkers Definitions Working Group. (2001). Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin. Pharmacol. Ther.* 69, 89–95.

- Bjerknes, M., and Cheng, H. (2002). Multipotential stem cells in adult mouse gastric epithelium. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 283, G767–777.
- Bloomfield, S.A. (1992). Relationship between receptive and dendritic field size of amacrine cells in the rabbit retina. *J. Neurophysiol.* 68, 711–725.
- Bloomfield, S.A., and Dacheux, R.F. (2001). Rod Vision: Pathways and Processing in the Mammalian Retina. *Progress in Retinal and Eye Research* 20, 351–384.
- Bloomfield, S.A., and Miller, R.F. (1986). A functional organization of ON and OFF pathways in the rabbit retina. *J. Neurosci.* 6, 1–13.
- Boesze-Battaglia, K., and Goldberg, A.F.X. (2002). Photoreceptor renewal: a role for peripherin/rds. *Int. Rev. Cytol.* 217, 183–225.
- Bolund, L., Darzynkiewicz, Z., and Ringertz, N.R. (1969a). Growth of hen erythrocyte nuclei undergoing reactivation in heterokaryons. *Exp. Cell Res.* 56, 406–410.
- Bolund, L., Ringertz, N.R., and Harris, H. (1969b). Changes in the cytochemical properties of erythrocyte nuclei reactivated by cell fusion. *J. Cell. Sci.* 4, 71–87.
- Bonini, N.M., Leiserson, W.M., and Benzer, S. (1993). The eyes absent gene: genetic control of cell survival and differentiation in the developing *Drosophila* eye. *Cell* 72, 379–395.
- Booij, J.C., Baas, D.C., Beisekeeva, J., Gorgels, T.G.M.F., and Bergen, A.A.B. (2010). The dynamic nature of Bruch's membrane. *Prog Retin Eye Res* 29, 1–18.
- Bora, N., Conway, S.J., Liang, H., and Smith, S.B. (1998). Transient overexpression of the *Microphthalmia* gene in the eyes of *Microphthalmia vitiligo* mutant mice. *Dev. Dyn.* 213, 283–292.
- Borstlap, J., Kurtz, A., Stacey, G., Elstner, A., Damaschun, A., Arán, B., Gerlach, J.C., Izpisúa, J.C., and Veiga, A. (2008). Development of a European human embryonic stem cell registry. *Regen Med* 3, 945–951.
- Bosch, E., Horwitz, J., and Bok, D. (1993). Phagocytosis of outer segments by retinal pigment epithelium: phagosome-lysosome interaction. *J. Histochem. Cytochem.* 41, 253–263.
- Boughman, J.A., Vernon, M., and Shaver, K.A. (1983). Usher syndrome: definition and estimate of prevalence from two high-risk populations. *J Chronic Dis* 36, 595–603.
- Boulton, M., Rózanowska, M., and Rózanowski, B. (2001). Retinal photodamage. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 64, 144–161.
- Bovolenta, P., Marco-Ferreres, R., and Conte, I. (2010). Embryology and Early Patterning. In *Encyclopedia of the Eye*, (Oxford: Academic Press), pp. 69–75.
- Bowmaker, J.K., and Dartnall, H.J. (1980). Visual pigments of rods and cones in a human retina. *J. Physiol. (Lond.)* 298, 501–511.
- Bowser, R., Cudkowicz, M., and Kaddurah-Daouk, R. (2006). Biomarkers for amyotrophic lateral sclerosis. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 6, 387–398.
- Boycott, B.B., and Wässle, H. (1991). Morphological Classification of Bipolar Cells of the Primate Retina. *Eur. J. Neurosci.* 3, 1069–1088.

- Boye, S.E., Boye, S.L., Pang, J., Ryals, R., Everhart, D., Umino, Y., Neeley, A.W., Besharse, J., Barlow, R., and Hauswirth, W.W. (2010). Functional and behavioral restoration of vision by gene therapy in the guanylate cyclase-1 (GC1) knockout mouse. *PLoS ONE* 5, e11306.
- Boyer, L.A., Lee, T.I., Cole, M.F., Johnstone, S.E., Levine, S.S., Zucker, J.P., Guenther, M.G., Kumar, R.M., Murray, H.L., Jenner, R.G., et al. (2005). Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell* 122, 947–956.
- Braam, S.R., Zeinstra, L., Litjens, S., Ward-van Oostwaard, D., Van den Brink, S., Van Laake, L., Lebrin, F., Kats, P., Hochstenbach, R., Passier, R., et al. (2008). Recombinant vitronectin is a functionally defined substrate that supports human embryonic stem cell self-renewal via  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 integrin. *Stem Cells* 26, 2257–2265.
- Bradley, C.K., Scott, H.A., Chami, O., Peura, T.T., Dumevska, B., Schmidt, U., and Stojanov, T. (2011). Derivation of Huntington's disease-affected human embryonic stem cell lines. *Stem Cells Dev.* 20, 495–502.
- Braid, L.R., and Verheyen, E.M. (2008). *Drosophila* nemo promotes eye specification directed by the retinal determination gene network. *Genetics* 180, 283–299.
- Bratt-Leal, A.M., Carpenedo, R.L., and McDevitt, T.C. (2009). Engineering the embryoid body microenvironment to direct embryonic stem cell differentiation. *Biotechnol. Prog.* 25, 43–51.
- Brennan, K.J., Simone, A., Jou, J., Gelboin-Burkhart, C., Tran, N., Sangar, S., Li, Y., Mu, Y., Chen, G., Yu, D., et al. (2011). Modelling schizophrenia using human induced pluripotent stem cells. *Nature* 473, 221–225.
- Brimble, S.N., Zeng, X., Weiler, D.A., Luo, Y., Liu, Y., Lyons, I.G., Freed, W.J., Robins, A.J., Rao, M.S., and Schulz, T.C. (2004). Karyotypic stability, genotyping, differentiation, feeder-free maintenance, and gene expression sampling in three human embryonic stem cell lines derived prior to August 9, 2001. *Stem Cells Dev.* 13, 585–597.
- Brons, I.G.M., Smithers, L.E., Trotter, M.W.B., Rugg-Gunn, P., Sun, B., Chuva de Sousa Lopes, S.M., Howlett, S.K., Clarkson, A., Ahrlund-Richter, L., Pedersen, R.A., et al. (2007). Derivation of pluripotent epiblast stem cells from mammalian embryos. *Nature* 448, 191–195.
- Brown, M., Marmor, M., Vaegan, Zrenner, E., Brigell, M., and Bach, M. (2006). ISCEV Standard for Clinical Electro-oculography (EOG) 2006. *Doc Ophthalmol* 113, 205–212.
- Bruder, C.E., Hirvelä, C., Tapia-Paez, I., Fransson, I., Segraves, R., Hamilton, G., Zhang, X.X., Evans, D.G., Wallace, A.J., Baser, M.E., et al. (2001). High resolution deletion analysis of constitutional DNA from neurofibromatosis type 2 (NF2) patients using microarray-CGH. *Hum. Mol. Genet.* 10, 271–282.
- Bubis, J. (1995). Improved purification of transducin subunits from bovine retinal rod outer segments. *Biol. Res.* 28, 291–299.
- Buchholz, D.E., Hikita, S.T., Rowland, T.J., Friedrich, A.M., Hinman, C.R., Johnson, L.V., and Clegg, D.O. (2009). Derivation of functional retinal pigmented epithelium from induced pluripotent stem cells. *Stem Cells* 27, 2427–2434.
- Bumsted, K.M., and Barnstable, C.J. (2000). Dorsal retinal pigment epithelium differentiates as neural retina in the microphthalmia (mi/mi) mouse. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 41, 903–908.
- Burke, J.M., and Hjelmeland, L.M. (2005). Mosaicism of the retinal pigment epithelium: seeing the small picture. *Mol. Interv.* 5, 241–249.



- Burns, M.E., and Baylor, D.A. (2001). Activation, deactivation, and adaptation in vertebrate photoreceptor cells. *Annu. Rev. Neurosci.* 24, 779–805.
- Burns, M.E., and Pugh, E.N., Jr (2010). Lessons from photoreceptors: turning off g-protein signaling in living cells. *Physiology (Bethesda)* 25, 72–84.
- Butler, D. (1994). France backs off strict limits on embryo research. *Nature* 368, 787.
- Bylund, M., Andersson, E., Novitch, B.G., and Muhr, J. (2003). Vertebrate neurogenesis is counteracted by Sox1-3 activity. *Nat. Neurosci.* 6, 1162–1168.
- Byrne, J.A., Pedersen, D.A., Clepper, L.L., Nelson, M., Sanger, W.G., Gokhale, S., Wolf, D.P., and Mitalipov, S.M. (2007). Producing primate embryonic stem cells by somatic cell nuclear transfer. *Nature* 450, 497–502.
- Caberoy, N.B., Zhou, Y., and Li, W. (2010). Tubby and tubby-like protein 1 are new MerTK ligands for phagocytosis. *EMBO J.* 29, 3898–3910.
- Cabrita, G.J.M., Ferreira, B.S., Da Silva, C.L., Gonçalves, R., Almeida-Porada, G., and Cabral, J.M.S. (2003). Hematopoietic stem cells: from the bone to the bioreactor. *Trends in Biotechnology* 21, 233–240.
- Cai, J., Nelson, K.C., Wu, M., Sternberg, P., Jr, and Jones, D.P. (2000). Oxidative damage and protection of the RPE. *Prog Retin Eye Res* 19, 205–221.
- Caiazzo, M., Dell’Anno, M.T., Dvoretzkova, E., Lazarevic, D., Taverna, S., Leo, D., Sotnikova, T.D., Menegon, A., Roncaglia, P., Colciago, G., et al. (2011). Direct generation of functional dopaminergic neurons from mouse and human fibroblasts. *Nature* 476, 224–227.
- Callaway, E.M. (2005). Structure and function of parallel pathways in the primate early visual system. *J. Physiol. (Lond.)* 566, 13–19.
- Camparini, M., Cassinari, P., Ferrigno, L., and Macaluso, C. (2001). ETDRS-Fast: Implementing Psychophysical Adaptive Methods to Standardized Visual Acuity Measurement with ETDRS Charts. *IOVS* 42, 1226–1231.
- Camuzat, A., Dollfus, H., Rozet, J.M., Gerber, S., Bonneau, D., Bonnemaïson, M., Briard, M.L., Dufier, J.L., Ghazi, I., and Leowski, C. (1995). A gene for Leber’s congenital amaurosis maps to chromosome 17p. *Hum. Mol. Genet.* 4, 1447–1452.
- Camuzat, A., Rozet, J.M., Dollfus, H., Gerber, S., Perrault, I., Weissenbach, J., Munnich, A., and Kaplan, J. (1996a). Evidence of genetic heterogeneity of Leber’s congenital amaurosis (LCA) and mapping of LCA1 to chromosome 17p13. *Hum. Genet.* 97, 798–801.
- Camuzat, A., Rozet, J.M., Dollfus, H., Gerber, S., Perrault, I., Weissenbach, J., Munnich, A., and Kaplan, J. (1996b). Evidence of genetic heterogeneity of Leber’s congenital amaurosis (LCA) and mapping of LCA1 to chromosome 17p13. *Hum. Genet.* 97, 798–801.
- Caplan, A.I., and Bruder, S.P. (2001). Mesenchymal stem cells: building blocks for molecular medicine in the 21st century. *Trends in Molecular Medicine* 7, 259–264.
- Caplan, A.I., Elyaderani, M., Mochizuki, Y., Wakitani, S., and Goldberg, V.M. (1997). Principles of cartilage repair and regeneration. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 254–269.
- Carr, A.-J., Vugler, A., Lawrence, J., Chen, L.L., Ahmado, A., Chen, F.K., Semo, M., Gias, C., Da Cruz, L., Moore, H.D., et al. (2009a). Molecular characterization and functional analysis of

phagocytosis by human embryonic stem cell-derived RPE cells using a novel human retinal assay. *Mol. Vis.* *15*, 283–295.

Carr, A.-J., Vugler, A.A., Hikita, S.T., Lawrence, J.M., Gias, C., Chen, L.L., Buchholz, D.E., Ahmado, A., Semo, M., Smart, M.J.K., et al. (2009b). Protective effects of human iPS-derived retinal pigment epithelium cell transplantation in the retinal dystrophic rat. *PLoS ONE* *4*, e8152.

Cartwright, P., McLean, C., Sheppard, A., Rivett, D., Jones, K., and Dalton, S. (2005). LIF/STAT3 controls ES cell self-renewal and pluripotency by a Myc-dependent mechanism. *Development* *132*, 885–896.

Castellucci, M., De Matteis, R., Meisser, A., Canello, R., Monsurrò, V., Islami, D., Sarzani, R., Marzioni, D., Cinti, S., and Bischof, P. (2000). Leptin modulates extracellular matrix molecules and metalloproteinases: possible implications for trophoblast invasion. *Mol. Hum. Reprod.* *6*, 951–958.

Cayouette, M., Poggi, L., and Harris, W.A. (2006). Lineage in the vertebrate retina. *Trends Neurosci.* *29*, 563–570.

Cezar, G.G. (2007). Can human embryonic stem cells contribute to the discovery of safer and more effective drugs? *Curr Opin Chem Biol* *11*, 405–409.

Chambers, I., Colby, D., Robertson, M., Nichols, J., Lee, S., Tweedie, S., and Smith, A. (2003). Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell* *113*, 643–655.

Chambers, S.M., Fasano, C.A., Papapetrou, E.P., Tomishima, M., Sadelain, M., and Studer, L. (2009). Highly efficient neural conversion of human ES and iPS cells by dual inhibition of SMAD signaling. *Nat. Biotechnol.* *27*, 275–280.

Chang, B., Heckenlively, J.R., Hawes, N.L., and Roderick, T.H. (1993). New mouse primary retinal degeneration (rd-3). *Genomics* *16*, 45–49.

Chang, Y., and Finnemann, S.C. (2007). Tetraspanin CD81 is required for the alpha v beta5-integrin-dependent particle-binding step of RPE phagocytosis. *J. Cell. Sci.* *120*, 3053–3063.

Chávez, A.E., Grimes, W.N., and Diamond, J.S. (2010). Mechanisms underlying lateral GABAergic feedback onto rod bipolar cells in rat retina. *J. Neurosci.* *30*, 2330–2339.

Chen, L., Wang, D., Wu, Z., Ma, L., and Daley, G.Q. (2010). Molecular basis of the first cell fate determination in mouse embryogenesis. *Cell Res.* *20*, 982–993.

Chen, R., Amoui, M., Zhang, Z., and Mardon, G. (1997a). Dachshund and eyes absent proteins form a complex and function synergistically to induce ectopic eye development in *Drosophila*. *Cell* *91*, 893–903.

Chen, S., Wang, Q.L., Nie, Z., Sun, H., Lennon, G., Copeland, N.G., Gilbert, D.J., Jenkins, N.A., and Zack, D.J. (1997b). Crx, a novel Otx-like paired-homeodomain protein, binds to and transactivates photoreceptor cell-specific genes. *Neuron* *19*, 1017–1030.

Chesné, P., Adenot, P.G., Viglietta, C., Baratte, M., Boulanger, L., and Renard, J.-P. (2002). Cloned rabbits produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nat. Biotechnol.* *20*, 366–369.

Cheung, A.Y.L., Horvath, L.M., Grafodatskaya, D., Pasceri, P., Weksberg, R., Hotta, A., Carrel, L., and Ellis, J. (2011). Isolation of MECP2-null Rett Syndrome patient hiPS cells and isogenic controls through X-chromosome inactivation. *Hum. Mol. Genet.* *20*, 2103–2115.

- Cheyette, B.N., Green, P.J., Martin, K., Garren, H., Hartenstein, V., and Zipursky, S.L. (1994). The *Drosophila sine oculis* locus encodes a homeodomain-containing protein required for the development of the entire visual system. *Neuron* *12*, 977–996.
- Chiang, C.-H., Su, Y., Wen, Z., Yoritomo, N., Ross, C.A., Margolis, R.L., Song, H., and Ming, G.-L. (2011). Integration-free induced pluripotent stem cells derived from schizophrenia patients with a DISC1 mutation. *Mol. Psychiatry* *16*, 358–360.
- Chiang, P.-W., Wang, J., Chen, Y., Fu, Q., Zhong, J., Chen, Y., Yi, X., Wu, R., Gan, H., Shi, Y., et al. (2012). Exome sequencing identifies NMNAT1 mutations as a cause of Leber congenital amaurosis. *Nature Genetics*.
- Chneiweiss, H. (2004). [Revision of bioethics laws: one group can hide another]. *Med Sci (Paris)* *20*, 374–376.
- Choe, H.-W., Kim, Y.J., Park, J.H., Morizumi, T., Pai, E.F., Krauss, N., Hofmann, K.P., Scheerer, P., and Ernst, O.P. (2011). Crystal structure of metarhodopsin II. *Nature* *471*, 651–655.
- Chow, R.L., Altmann, C.R., Lang, R.A., and Hemmati-Brivanlou, A. (1999). Pax6 induces ectopic eyes in a vertebrate. *Development* *126*, 4213–4222.
- Chow, R.L., and Lang, R.A. (2001). Early eye development in vertebrates. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *17*, 255–296.
- Chun, Y.S., Chaudhari, P., and Jang, Y.-Y. (2010). Applications of Patient-Specific Induced Pluripotent Stem Cells; Focused on Disease Modeling, Drug Screening and Therapeutic Potentials for Liver Disease. *International Journal of Biological Sciences* *6*, 796.
- Chute, J.P., Ross, J.R., and McDonnell, D.P. (2010). Minireview: Nuclear Receptors, Hematopoiesis, and Stem Cells. *Molecular Endocrinology* *24*, 1–10.
- Cibelli, J.B., Stice, S.L., Golueke, P.J., Kane, J.J., Jerry, J., Blackwell, C., Ponce de León, F.A., and Robl, J.M. (1998a). Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts. *Science* *280*, 1256–1258.
- Cibelli, J.B., Stice, S.L., Golueke, P.J., Kane, J.J., Jerry, J., Blackwell, C., Ponce de León, F.A., and Robl, J.M. (1998b). Transgenic bovine chimeric offspring produced from somatic cell-derived stem-like cells. *Nat. Biotechnol.* *16*, 642–646.
- Cideciyan, A.V., Aleman, T.S., Boye, S.L., Schwartz, S.B., Kaushal, S., Roman, A.J., Pang, J. -j., Sumaroka, A., Windsor, E.A.M., Wilson, J.M., et al. (2008). Human gene therapy for RPE65 isomerase deficiency activates the retinoid cycle of vision but with slow rod kinetics. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *105*, 15112–15117.
- Cideciyan, A.V., Hauswirth, W.W., Aleman, T.S., Kaushal, S., Schwartz, S.B., Boye, S.L., Windsor, E.A.M., Conlon, T.J., Sumaroka, A., Pang, 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*, 999–1004.
- Clark, L.M. (1930). Persistent Hyaloid Canal (Canal of Cloquet) in Left Eye. *Proc. R. Soc. Med.* *23*, 617–618.
- Cobos, I., Shimamura, K., Rubenstein, J.L., Martínez, S., and Puellas, L. (2001). Fate map of the avian anterior forebrain at the four-somite stage, based on the analysis of quail-chick chimeras. *Dev. Biol.* *239*, 46–67.

- Cockburn, K., and Rossant, J. (2010). Making the blastocyst: lessons from the mouse. *J. Clin. Invest.* 120, 995–1003.
- Cole, J. (1996). “A sudden and terrible revelation”: motherhood and infant mortality in France, 1858-1874. *J Fam Hist* 21, 419–445.
- Coles, L.D., and Cloyd, J.C. (2012). The role of academic institutions in the development of drugs for rare and neglected diseases. *Clin. Pharmacol. Ther.* 92, 193–202.
- Colman, A., and Dreesen, O. (2009). Pluripotent stem cells and disease modeling. *Cell Stem Cell* 5, 244–247.
- Committee on New and Emerging Models in Biomedical and Behavioral Research, Institute for Laboratory Animal Research, Commission on Life Sciences, National Research Council (1998). *Biomedical Models and Resources: Current Needs and Future Opportunities* (Washington, D.C.: The National Academies Press).
- Comyn, O., Lee, E., and MacLaren, R.E. (2010). Induced pluripotent stem cell therapies for retinal disease. *Curr. Opin. Neurol.* 23, 4–9.
- Cook, H.L., Patel, P.J., and Tufail, A. (2008). Age-related macular degeneration: diagnosis and management. *Br. Med. Bull.* 85, 127–149.
- Coppieters, F., Lefever, S., Leroy, B.P., and De Baere, E. (2010). CEP290, a gene with many faces: mutation overview and presentation of CEP290base. *Hum. Mutat.* 31, 1097–1108.
- Cornwall, M.C., and Ala-Laurila, P. (2007). A Perfect Marriage: Molecular Genetics Ties the Knot with Electrophysiology in Studies of Visual Transduction. *The Journal of General Physiology* 130, 7–10.
- Cornwall, M.C., Fein, A., and MacNichol, E.F., Jr (1990). Cellular mechanisms that underlie bleaching and background adaptation. *J. Gen. Physiol.* 96, 345–372.
- Cortes, J.L., Sánchez, L., Catalina, P., Cobo, F., Bueno, C., Martínez-Ramírez, A., Barroso, A., Cabrera, C., Ligeró, G., Montes, R., et al. (2008). Whole-blastocyst culture followed by laser drilling technology enhances the efficiency of inner cell mass isolation and embryonic stem cell derivation from good- and poor-quality mouse embryos: new insights for derivation of human embryonic stem cell lines. *Stem Cells Dev.* 17, 255–267.
- Couzin, J. (2009). Biotechnology. Celebration and concern over U.S. trial of embryonic stem cells. *Science* 323, 568.
- Cowan, C.A., Atienza, J., Melton, D.A., and Eggan, K. (2005). Nuclear reprogramming of somatic cells after fusion with human embryonic stem cells. *Science* 309, 1369–1373.
- Cowan, C.W., He, W., and Wensel, T.G. (2001). RGS proteins: lessons from the RGS9 subfamily. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 65, 341–359.
- Crossley, P.H., Martinez, S., Ohkubo, Y., and Rubenstein, J.L. (2001). Coordinate expression of Fgf8, Otx2, Bmp4, and Shh in the rostral prosencephalon during development of the telencephalic and optic vesicles. *Neuroscience* 108, 183–206.
- Curchoe, C.L., Russo, J., and Terskikh, A.V. (2012). hESC derived neuro-epithelial rosettes recapitulate early mammalian neurulation events; an in vitro model. *Stem Cell Res* 8, 239–246.

- Curcio, C.A., Sloan, K.R., Kalina, R.E., and Hendrickson, A.E. (1990). Human photoreceptor topography. *J. Comp. Neurol.* *292*, 497–523.
- Cvekl, A., and Duncan, M.K. (2007). Genetic and epigenetic mechanisms of gene regulation during lens development. *Progress in Retinal and Eye Research* *26*, 555–597.
- Cvekl, A., and Tamm, E.R. (2004). Anterior eye development and ocular mesenchyme: new insights from mouse models and human diseases. *BioEssays* *26*, 374–386.
- Dacheux, R.F., and Miller, R.F. (1976). Photoreceptor-bipolar cell transmission in the perfused retina eyecup of the mudpuppy. *Science* *191*, 963–964.
- Daley, G.Q. (2012). The promise and perils of stem cell therapeutics. *Cell Stem Cell* *10*, 740–749.
- Davis-Silberman, N., and Ashery-Padan, R. (2008). Iris development in vertebrates; genetic and molecular considerations. *Brain Res.* *1192*, 17–28.
- Deans, M.R., Volgyi, B., Goodenough, D.A., Bloomfield, S.A., and Paul, D.L. (2002). Connexin36 is essential for transmission of rod-mediated visual signals in the mammalian retina. *Neuron* *36*, 703–712.
- Decimo, I., Bifari, F., Krampera, M., and Fumagalli, G. (2012). Neural Stem Cell Niches in Health and Diseases. *Current Pharmaceutical Design* *18*, 1755–1783.
- Deguchi, J., Yamamoto, A., Yoshimori, T., Sugasawa, K., Moriyama, Y., Futai, M., Suzuki, T., Kato, K., Uyama, M., and Tashiro, Y. (1994). Acidification of phagosomes and degradation of rod outer segments in rat retinal pigment epithelium. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* *35*, 568–579.
- Delaune, E., Lemaire, P., and Kodjabachian, L. (2005). Neural induction in *Xenopus* requires early FGF signalling in addition to BMP inhibition. *Development* *132*, 299–310.
- Delorme, B., Ringe, J., Pontikoglou, C., Gaillard, J., Langonné, A., Sensebé, L., Noël, D., Jorgensen, C., Häupl, T., and Charbord, P. (2009). Specific lineage-priming of bone marrow mesenchymal stem cells provides the molecular framework for their plasticity. *Stem Cells* *27*, 1142–1151.
- Denat, L., and Larue, L. (2007). [Malignant melanoma and the role of the paradoxal protein Microphthalmia transcription factor]. *Bull Cancer* *94*, 81–92.
- Deng, W. (2010). Induced pluripotent stem cells: paths to new medicines. *EMBO Reports* *11*, 161–165.
- Denis, J.A., Rochon-Beaucourt, C., Champon, B., and Pietu, G. (2011). Global transcriptional profiling of neural and mesenchymal progenitors derived from human embryonic stem cells reveals alternative developmental signaling pathways. *Stem Cells Dev.* *20*, 1395–1409.
- Desbordes, S.C., Placantonakis, D.G., Ciro, A., Socci, N.D., Lee, G., Djaballah, H., and Studer, L. (2008). High-throughput screening assay for the identification of compounds regulating self-renewal and differentiation in human embryonic stem cells. *Cell Stem Cell* *2*, 602–612.
- Deuse, T., Seifert, M., Phillips, N., Fire, A., Tyan, D., Kay, M., Tsao, P.S., Hua, X., Velden, J., Eiermann, T., et al. (2011). Human leukocyte antigen I knockdown human embryonic stem cells induce host ignorance and achieve prolonged xenogeneic survival. *Circulation* *124*, S3–9.
- Devine, M.J., Ryten, M., Vodicka, P., Thomson, A.J., Burdon, T., Houlden, H., Cavaleri, F., Nagano, M., Drummond, N.J., Taanman, J.-W., et al. (2011). Parkinson's disease induced pluripotent stem cells with triplication of the  $\alpha$ -synuclein locus. *Nat Commun* *2*, 440.

- DeVries, S.H. (2000). Bipolar cells use kainate and AMPA receptors to filter visual information into separate channels. *Neuron* 28, 847–856.
- DeVries, S.H., and Schwartz, E.A. (1999). Kainate receptors mediate synaptic transmission between cones and “Off” bipolar cells in a mammalian retina. *Nature* 397, 157–160.
- Dharmaraj, S., Li, Y., Robitaille, J.M., Silva, E., Zhu, D., Mitchell, T.N., Maltby, L.P., Baffoe-Bonnie, A.B., and Maumenee, I.H. (2000a). A novel locus for Leber congenital amaurosis maps to chromosome 6q. *Am. J. Hum. Genet.* 66, 319–326.
- Dharmaraj, S.R., Silva, E.R., Pina, A.L., Li, Y.Y., Yang, J.M., Carter, C.R., Loyer, M.K., El-Hilali, H.K., Traboulsi, E.K., Sundin, O.K., et al. (2000b). Mutational analysis and clinical correlation in Leber congenital amaurosis. *Ophthalmic Genet.* 21, 135–150.
- DiMasi, J.A., Hansen, R.W., and Grabowski, H.G. (2003). The price of innovation: new estimates of drug development costs. *J Health Econ* 22, 151–185.
- Dimos, J.T., Rodolfa, K.T., Niakan, K.K., Weisenthal, L.M., Mitsumoto, H., Chung, W., Croft, G.F., Saphier, G., Leibel, R., Goland, R., et al. (2008). Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons. *Science* 321, 1218–1221.
- Dinculescu, A., Glushakova, L., Min, S.-H., and Hauswirth, W.W. (2005). Adeno-associated virus-vectorized gene therapy for retinal disease. *Hum. Gene Ther.* 16, 649–663.
- Dizhoor, A.M. (2000). Regulation of cGMP synthesis in photoreceptors: role in signal transduction and congenital diseases of the retina. *Cellular Signalling* 12, 711–719.
- Dizhoor, A.M., Olshevskaya, E.V., and Peshenko, I.V. (2010). Mg<sup>2+</sup>/Ca<sup>2+</sup> cation binding cycle of guanylyl cyclase activating proteins (GCAPs): role in regulation of photoreceptor guanylyl cyclase. *Mol. Cell. Biochem.* 334, 117–124.
- Do, J.T., and Schöler, H.R. (2010). Cell fusion-induced reprogramming. *Methods Mol. Biol.* 636, 179–190.
- Docherty, K., Bernardo, A.S., and Vallier, L. (2007). Embryonic stem cell therapy for diabetes mellitus. *Semin. Cell Dev. Biol.* 18, 827–838.
- Dominguez, M., Ferres-Marco, D., Gutierrez-Aviño, F.J., Speicher, S.A., and Beneyto, M. (2004). Growth and specification of the eye are controlled independently by Eyegone and Eyeless in *Drosophila melanogaster*. *Nat. Genet.* 36, 31–39.
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D., and Horwitz, E. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8, 315–317.
- Dong, C.-J., and Hare, W.A. (2003). Temporal modulation of scotopic visual signals by A17 amacrine cells in mammalian retina in vivo. *J. Neurophysiol.* 89, 2159–2166.
- Donner, K. (1992). Noise and the absolute thresholds of cone and rod vision. *Vision Res.* 32, 853–866.
- Dowling, J. (2009). Current and future prospects for optoelectronic retinal prostheses. *Eye (Lond)* 23, 1999–2005.
- Dowling, J.E. (1970). Organization of vertebrate retinas. *Invest Ophthalmol* 9, 655–680.

- Dowling, J.E., and Boycott, B.B. (1966). Organization of the primate retina: electron microscopy. *Proc. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* 166, 80–111.
- Drets, M.E., and Shaw, M.W. (1971). Specific banding patterns of human chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 68, 2073–2077.
- Dryja, T.P., Adams, S.M., Grimsby, J.L., McGee, T.L., Hong, D.H., Li, T., Andréasson, S., and Berson, E.L. (2001). Null RPGRIP1 alleles in patients with Leber congenital amaurosis. *Am. J. Hum. Genet.* 68, 1295–1298.
- Ducasse, A., Segal, A., Mathot, E., Favre, F., and Aigron, J.P. (1988). [The optic papilla. Morphological aspects (seen in 300 angiographies)]. *Bull Soc Ophtalmol Fr* 88, 437–441.
- Ducibella, T., Albertini, D.F., Anderson, E., and Biggers, J.D. (1975). The preimplantation mammalian embryo: characterization of intercellular junctions and their appearance during development. *Dev. Biol.* 45, 231–250.
- Durnaoglu, S., Genc, S., and Genc, K. (2011). Patient-Specific Pluripotent Stem Cells in Neurological Diseases. *Stem Cells International* 2011, 1–17.
- Dvash, T., and Benvenisty, N. (2004). Human embryonic stem cells as a model for early human development. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 18, 929–940.
- Dvorak, P., and Hampl, A. (2005). Basic fibroblast growth factor and its receptors in human embryonic stem cells. *Folia Histochem. Cytobiol.* 43, 203–208.
- Dyer, M.A., Livesey, F.J., Cepko, C.L., and Oliver, G. (2003). Prox1 function controls progenitor cell proliferation and horizontal cell genesis in the mammalian retina. *Nat. Genet.* 34, 53–58.
- Ebert, A.D., Yu, J., Rose, F.F., Jr, Mattis, V.B., Lorson, C.L., Thomson, J.A., and Svendsen, C.N. (2009). Induced pluripotent stem cells from a spinal muscular atrophy patient. *Nature* 457, 277–280.
- Echelard, Y., Epstein, D.J., St-Jacques, B., Shen, L., Mohler, J., McMahon, J.A., and McMahon, A.P. (1993). Sonic hedgehog, a member of a family of putative signaling molecules, is implicated in the regulation of CNS polarity. *Cell* 75, 1417–1430.
- Efe, J.A., Hilcove, S., Kim, J., Zhou, H., Ouyang, K., Wang, G., Chen, J., and Ding, S. (2011). Conversion of mouse fibroblasts into cardiomyocytes using a direct reprogramming strategy. *Nat. Cell Biol.* 13, 215–222.
- Eiges, R., Urbach, A., Malcov, M., Frumkin, T., Schwartz, T., Amit, A., Yaron, Y., Eden, A., Yanuka, O., Benvenisty, N., et al. (2007). Developmental study of fragile X syndrome using human embryonic stem cells derived from preimplantation genetically diagnosed embryos. *Cell Stem Cell* 1, 568–577.
- Eiraku, M., and Sasai, Y. (2012). Self-formation of layered neural structures in three-dimensional culture of ES cells. *Current Opinion in Neurobiology*.
- Eiraku, M., Takata, N., Ishibashi, H., Kawada, M., Sakakura, E., Okuda, S., Sekiguchi, K., Adachi, T., and Sasai, Y. (2011). Self-organizing optic-cup morphogenesis in three-dimensional culture. *Nature* 472, 51–56.
- Esteve, P., and Bovolenta, P. (2006). Secreted inducers in vertebrate eye development: more functions for old morphogens. *Curr. Opin. Neurobiol.* 16, 13–19.



- Estrada-Cuzcano, A., Koenekoop, R.K., Coppieters, F., Kohl, S., Lopez, I., Collin, R.W.J., De Baere, E.B.W., Roeleveld, D., Marek, J., Bernd, A., et al. (2011). IQCB1 mutations in patients with leber congenital amaurosis. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 52, 834–839.
- Euler, T., and Wässle, H. (1995). Immunocytochemical identification of cone bipolar cells in the rat retina. *J. Comp. Neurol.* 361, 461–478.
- Evans, M. (2011). Discovering pluripotency: 30 years of mouse embryonic stem cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 12, 680–686.
- Evans, M.J., and Kaufman, M.H. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292, 154–156.
- Fábián, A., Vereb, G., and Szöllösi, J. (2012). The hitchhikers guide to cancer stem cell theory: Markers, pathways and therapy. *Cytometry A*.
- Fain, G.L., Matthews, H.R., Cornwall, M.C., and Koutalos, Y. (2001). Adaptation in vertebrate photoreceptors. *Physiol. Rev.* 81, 117–151.
- Falk, M.J., Zhang, Q., Nakamaru-Ogiso, E., Kannabiran, C., Fonseca-Kelly, Z., Chakarova, C., Audo, I., Mackay, D.S., Zeitz, C., Borman, A.D., et al. (2012). NMNAT1 mutations cause Leber congenital amaurosis. *Nature Genetics*.
- Famiglietti, E.V., Jr, and Kolb, H. (1976). Structural basis for ON-and OFF-center responses in retinal ganglion cells. *Science* 194, 193–195.
- Favor, J., Gloeckner, C.J., Neuhäuser-Klaus, A., Pretsch, W., Sandulache, R., Saule, S., and Zaus, I. (2008). Relationship of Pax6 activity levels to the extent of eye development in the mouse, *Mus musculus*. *Genetics* 179, 1345–1355.
- Feeney, L. (1978). Lipofuscin and melanin of human retinal pigment epithelium. Fluorescence, enzyme cytochemical, and ultrastructural studies. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 17, 583–600.
- Ferris, F.L., 3rd, Kassoff, A., Bresnick, G.H., and Bailey, I. (1982). New visual acuity charts for clinical research. *Am. J. Ophthalmol.* 94, 91–96.
- Feyeux, M., Bourgois-Rocha, F., Redfern, A., Giles, P., Lefort, N., Aubert, S., Bonnefond, C., Bugi, A., Ruiz, M., Deglon, N., et al. (2012). Early transcriptional changes linked to naturally occurring Huntington's disease mutations in neural derivatives of human embryonic stem cells. *Hum. Mol. Genet.* 21, 3883–3895.
- Finlay, B.L. (2008). The developing and evolving retina: using time to organize form. *Brain Res.* 1192, 5–16.
- Finnemann, S.C. (2003). Focal adhesion kinase signaling promotes phagocytosis of integrin-bound photoreceptors. *EMBO J.* 22, 4143–4154.
- Finnemann, S.C., Bonilha, V.L., Marmorstein, A.D., and Rodriguez-Boulan, E. (1997). Phagocytosis of rod outer segments by retinal pigment epithelial cells requires alpha(v)beta5 integrin for binding but not for internalization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 12932–12937.
- Finnemann, S.C., Leung, L.W., and Rodriguez-Boulan, E. (2002). The lipofuscin component A2E selectively inhibits phagolysosomal degradation of photoreceptor phospholipid by the retinal pigment epithelium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 3842–3847.

- Finnemann, S.C., and Rodriguez-Boulan, E. (1999). Macrophage and retinal pigment epithelium phagocytosis: apoptotic cells and photoreceptors compete for alphavbeta3 and alphavbeta5 integrins, and protein kinase C regulates alphavbeta5 binding and cytoskeletal linkage. *J. Exp. Med.* *190*, 861–874.
- Finnemann, S.C., and Silverstein, R.L. (2001). Differential roles of CD36 and alphavbeta5 integrin in photoreceptor phagocytosis by the retinal pigment epithelium. *J. Exp. Med.* *194*, 1289–1298.
- Fishman, W.H., Raam, S., and Stolbach, L.L. (1975). Markers for ovarian cancer: regan isoenzyme and other glycoproteins. *Semin. Oncol.* *2*, 211–216.
- Fitzpatrick, D.A., O'Halloran, D.M., and Burnell, A.M. (2006). Multiple lineage specific expansions within the guanylyl cyclase gene family. *BMC Evol. Biol.* *6*, 26.
- Flannery, J.G., Zolotukhin, S., Vaquero, M.I., LaVail, M.M., Muzyczka, N., and Hauswirth, W.W. (1997). Efficient photoreceptor-targeted gene expression in vivo by recombinant adeno-associated virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *94*, 6916–6921.
- Flax, J.D., Aurora, S., Yang, C., Simonin, C., Wills, A.M., Billingham, L.L., Jendoubi, M., Sidman, R.L., Wolfe, J.H., Kim, S.U., et al. (1998). Engraftable human neural stem cells respond to developmental cues, replace neurons, and express foreign genes. *Nat. Biotechnol.* *16*, 1033–1039.
- Flood, M.T., Gouras, P., and Kjeldbye, H. (1980). Growth characteristics and ultrastructure of human retinal pigment epithelium in vitro. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* *19*, 1309–1320.
- Forrester, J.V. (2002). *The Eye: Basic Sciences in Practice* (Elsevier Health Sciences).
- FRANCESCHETTI, A., and DIETERLE, P. (1954). [Diagnostic and prognostic importance of the electroretinogram in tapetoretinal degeneration with reduction of the visual field and hemeralopia]. *Confin Neurol* *14*, 184–186.
- Frank, U., Plickert, G., and Müller, W.A. (2009). Chapter 3 Cnidarian Interstitial Cells : The Dawn of Stem Cell Research. In *Stem Cells in Marine Organisms*, B. Rinkevich, and V. Matranga, eds. (Springer), pp. 33–39.
- Frank, V., Den Hollander, A.I., Brüchle, N.O., Zonneveld, M.N., Nürnberg, G., Becker, C., Du Bois, G., Kendziorra, H., Roosing, S., Senderek, J., et al. (2008). Mutations of the CEP290 gene encoding a centrosomal protein cause Meckel-Gruber syndrome. *Hum. Mutat.* *29*, 45–52.
- French, A.J., Adams, C.A., Anderson, L.S., Kitchen, J.R., Hughes, M.R., and Wood, S.H. (2008). Development of human cloned blastocysts following somatic cell nuclear transfer with adult fibroblasts. *Stem Cells* *26*, 485–493.
- Freund, C.L., Gregory-Evans, C.Y., Furukawa, T., Papaioannou, M., Looser, J., Ploder, L., Bellingham, J., Ng, D., Herbrick, J.A., Duncan, A., et al. (1997). Cone-rod dystrophy due to mutations in a novel photoreceptor-specific homeobox gene (CRX) essential for maintenance of the photoreceptor. *Cell* *91*, 543–553.
- Freund, C.L., Wang, Q.L., Chen, S., Muskat, B.L., Wiles, C.D., Sheffield, V.C., Jacobson, S.G., McInnes, R.R., Zack, D.J., and Stone, E.M. (1998). De novo mutations in the CRX homeobox gene associated with Leber congenital amaurosis. *Nat. Genet.* *18*, 311–312.
- Friedman, E., and Ts'o, M.O. (1968). The retinal pigment epithelium. II. Histologic changes associated with age. *Arch. Ophthalmol.* *79*, 315–320.

- Friedman, J.S., Chang, B., Kannabiran, C., Chakarova, C., Singh, H.P., Jalali, S., Hawes, N.L., Branham, K., Othman, M., Filippova, E., et al. (2006). Premature truncation of a novel protein, RD3, exhibiting subnuclear localization is associated with retinal degeneration. *Am. J. Hum. Genet.* 79, 1059–1070.
- Friedrich Ben-Nun, I., and Benvenisty, N. (2006). Human embryonic stem cells as a cellular model for human disorders. *Mol. Cell. Endocrinol.* 252, 154–159.
- Frumkin, T., Malcov, M., Telias, M., Gold, V., Schwartz, T., Azem, F., Amit, A., Yaron, Y., and Ben-Yosef, D. (2010). Human embryonic stem cells carrying mutations for severe genetic disorders. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* 46, 327–336.
- Fu, Y., and Yau, K.-W. (2007). Phototransduction in mouse rods and cones. *Pflugers Arch.* 454, 805–819.
- Fuhrmann, S. (2010). Chapter Three - Eye Morphogenesis and Patterning of the Optic Vesicle. In *Invertebrate and Vertebrate Eye Development*, (Academic Press), pp. 61–84.
- Fujimura, N., Taketo, M.M., Mori, M., Korinek, V., and Kozmik, Z. (2009). Spatial and temporal regulation of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling is essential for development of the retinal pigment epithelium. *Developmental Biology* 334, 31–45.
- Fukuda, H., Takahashi, J., Watanabe, K., Hayashi, H., Morizane, A., Koyanagi, M., Sasai, Y., and Hashimoto, N. (2006). Fluorescence-activated cell sorting-based purification of embryonic stem cell-derived neural precursors averts tumor formation after transplantation. *Stem Cells* 24, 763–771.
- Fung, B.K., Hurley, J.B., and Stryer, L. (1981). Flow of information in the light-triggered cyclic nucleotide cascade of vision. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78, 152–156.
- Furue, M.K., Na, J., Jackson, J.P., Okamoto, T., Jones, M., Baker, D., Hata, R.-I., Moore, H.D., Sato, J.D., and Andrews, P.W. (2008). Heparin promotes the growth of human embryonic stem cells in a defined serum-free medium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 13409–13414.
- Furukawa, T., Morrow, E.M., Li, T., Davis, F.C., and Cepko, C.L. (1999). Retinopathy and attenuated circadian entrainment in Crx-deficient mice. *Nat. Genet.* 23, 466–470.
- Fusaki, N., Ban, H., Nishiyama, A., Saeki, K., and Hasegawa, M. (2009). Efficient induction of transgene-free human pluripotent stem cells using a vector based on Sendai virus, an RNA virus that does not integrate into the host genome. *Proc. Jpn. Acad., Ser. B, Phys. Biol. Sci.* 85, 348–362.
- Gachelin, G. (2008). De l'animal expérimental au modèle en recherche biomédicale. *Revue Philosophique De La France Et De L'étranger* 133 - 3, 319.
- Gaiano, N., and Fishell, G. (2002). The role of notch in promoting glial and neural stem cell fates. *Annu. Rev. Neurosci.* 25, 471–490.
- Gal, A., Li, Y., Thompson, D.A., Weir, J., Orth, U., Jacobson, S.G., Apfelstedt-Sylla, E., and Vollrath, D. (2000). Mutations in MERTK, the human orthologue of the RCS rat retinal dystrophy gene, cause retinitis pigmentosa. *Nat. Genet.* 26, 270–271.
- Ganesalingam, J., and Bowser, R. (2010). The application of biomarkers in clinical trials for motor neuron disease. *Biomark Med* 4, 281–297.
- Gangaraju, V.K., and Lin, H. (2009). MicroRNAs: key regulators of stem cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 116–125.

- Garbers, D.L. (1999). The Guanylyl Cyclase Receptors. *Methods* 19, 477–484.
- Garbers, D.L., Chrisman, T.D., Wiegn, P., Katafuchi, T., Albanesi, J.P., Bielinski, V., Barylko, B., Redfield, M.M., and Burnett, J.C., Jr (2006). Membrane guanylyl cyclase receptors: an update. *Trends Endocrinol. Metab.* 17, 251–258.
- Garbers, D.L., and Lowe, D.G. (1994). Guanylyl cyclase receptors. *J. Biol. Chem.* 269, 30741–30744.
- Gardiner, D.M., and Bryant, S.V. (2007). Chapter 12 Tetrapod Limb Regeneration. In *Fins into Limbs: Evolution, Development, and Transformation*, B.K. Hall, ed. (University of Chicago Press),.
- Garg, M. (2012). MicroRNAs, stem cells and cancer stem cells. *World J Stem Cells* 4, 62–70.
- Gasperowicz, M., and Natale, D.R.C. (2011). Establishing three blastocyst lineages--then what? *Biol. Reprod.* 84, 621–630.
- Gayon, J. (2006). Les organismes modèles en biologie et en médecine. In *Les Organismes Modèles Dans La Recherche Médicale*, (Gachelin, Gabriel), pp. 9–43.
- Geens, M., Mateizel, I., Sermon, K., De Rycke, M., Spits, C., Cauffman, G., Devroey, P., Tournaye, H., Liebaers, I., and Van de Velde, H. (2009). Human embryonic stem cell lines derived from single blastomeres of two 4-cell stage embryos. *Hum. Reprod.* 24, 2709–2717.
- Gehring, W.J., and Ikeo, K. (1999). Pax 6: mastering eye morphogenesis and eye evolution. *Trends Genet.* 15, 371–377.
- Geiman, T.M., and Robertson, K.D. (2002). Chromatin remodeling, histone modifications, and DNA methylation-how does it all fit together? *J. Cell. Biochem.* 87, 117–125.
- Gentalen, E., and Chee, M. (1999). A novel method for determining linkage between DNA sequences: hybridization to paired probe arrays. *Nucleic Acids Res.* 27, 1485–1491.
- Geron Corporation (2009). Geron Receives FDA Clearance to Begin World’s First Human Clinical Trial of Embryonic Stem Cell-Based Therapy.
- Geron Corporation (2011). Geron Initiates Clinical Trial of Human Embryonic Stem Cell-Based Therapy.
- Gerrits, A., Dykstra, B., Otten, M., Bystrykh, L., and De Haan, G. (2008). Combining transcriptional profiling and genetic linkage analysis to uncover gene networks operating in hematopoietic stem cells and their progeny. *Immunogenetics* 60, 411–422.
- Gibbs, D., Diemer, T., Khanobdee, K., Hu, J., Bok, D., and Williams, D.S. (2010). Function of MYO7A in the human RPE and the validity of shaker1 mice as a model for Usher syndrome 1B. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 51, 1130–1135.
- Gibbs, D., Kitamoto, J., and Williams, D.S. (2003). Abnormal phagocytosis by retinal pigmented epithelium that lacks myosin VIIa, the Usher syndrome 1B protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 6481–6486.
- Gilbert, J., Henske, P., and Singh, A. (2003). Rebuilding big pharma’s business model. IN *VIVO-NEW YORK THEN NORWALK-* 21, 73–80.
- Gilbert, S.F. (2000). *Developmental Biology* - 6th edition (Sunderland (MA): Sinauer Associates).

- Glaser, T., Jepeal, L., Edwards, J.G., Young, S.R., Favor, J., and Maas, R.L. (1994). PAX6 gene dosage effect in a family with congenital cataracts, aniridia, anophthalmia and central nervous system defects. *Nat. Genet.* 7, 463–471.
- Glaser, T., Walton, D.S., and Maas, R.L. (1992). Genomic structure, evolutionary conservation and aniridia mutations in the human PAX6 gene. *Nat. Genet.* 2, 232–239.
- Gorbatyuk, M., Justilien, V., Liu, J., Hauswirth, W.W., and Lewin, A.S. (2007). Suppression of mouse rhodopsin expression in vivo by AAV mediated siRNA delivery. *Vision Res.* 47, 1202–1208.
- Gore, A., Li, Z., Fung, H.-L., Young, J.E., Agarwal, S., Antosiewicz-Bourget, J., Canto, I., Giorgetti, A., Israel, M.A., Kiskinis, E., et al. (2011). Somatic coding mutations in human induced pluripotent stem cells. *Nature* 471, 63–67.
- Gosbell, A.D., Stefanovic, N., Scurr, L.L., Pete, J., Kola, I., Favilla, I., and De Haan, J.B. (2006). Retinal light damage: structural and functional effects of the antioxidant glutathione peroxidase-1. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 47, 2613–2622.
- Gouras, P., Brown, K., Ivert, L., and Neuringer, M. (2011). A novel melano-lysosome in the retinal epithelium of rhesus monkeys. *Exp. Eye Res.* 93, 937–946.
- Gourraud, P.-A., Gilson, L., Girard, M., and Peschanski, M. (2012). The role of human leukocyte antigen matching in the development of multiethnic “haplobank” of induced pluripotent stem cell lines. *Stem Cells* 30, 180–186.
- Grainger, R.M., Herry, J.J., and Henderson, R.A. (1988). Reinvestigation of the role of the optic vesicle in embryonic lens induction. *Development* 102, 517–526.
- Graw, J. (2003). The genetic and molecular basis of congenital eye defects. *Nat. Rev. Genet.* 4, 876–888.
- Graw, J. (2010). Chapter Ten - Eye development. In *Organogenesis in Development*, pp. 343–386.
- Greber, B., Lehrach, H., and Adjaye, J. (2007). Fibroblast growth factor 2 modulates transforming growth factor beta signaling in mouse embryonic fibroblasts and human ESCs (hESCs) to support hESC self-renewal. *Stem Cells* 25, 455–464.
- Greger, I.H., and Esteban, J.A. (2007). AMPA receptor biogenesis and trafficking. *Curr. Opin. Neurobiol.* 17, 289–297.
- Gregory-Evans, C.Y., Williams, M.J., Halford, S., and Gregory-Evans, K. (2004). Ocular coloboma: a reassessment in the age of molecular neuroscience. *J. Med. Genet.* 41, 881–891.
- Greider, C.W., and Blackburn, E.H. (1985). Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts. *Cell* 43, 405–413.
- Grimes, W.N., Zhang, J., Graydon, C.W., Kachar, B., and Diamond, J.S. (2010). Retinal Parallel Processors: More than 100 Independent Microcircuits Operate within a Single Interneuron. *Neuron* 65, 873–885.
- Grindley, J.C., Davidson, D.R., and Hill, R.E. (1995). The role of Pax-6 in eye and nasal development. *Development* 121, 1433–1442.
- Grünert, U., and Hughes, T.E. (1993). Immunohistochemical localization of GABAA receptors in the scotopic pathway of the cat retina. *Cell Tissue Res.* 274, 267–277.

- Gu, S., Lennon, A., Li, Y., Lorenz, B., Fossarello, M., North, M., Gal, A., and Wright, A. (1998). Tubby-like protein-1 mutations in autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Lancet* 351, 1103–1104.
- Guenou, H., Nissan, X., Larcher, F., Feteira, J., Lemaitre, G., Saidani, M., Del Rio, M., Barrault, C.C., Bernard, F.-X., Peschanski, M., et al. (2009). Human embryonic stem-cell derivatives for full reconstruction of the pluristratified epidermis: a preclinical study. *Lancet* 374, 1745–1753.
- Güven, M., Görgün, E., Ünal, M., Yenerel, M., Batar, B., Küçümen, B., Dinç, U.A., Güven, G.S., Ulus, T., and Yüksel, A. (2011). Glutathione S-transferase M1, GSTT1 and GSTP1 genetic polymorphisms and the risk of age-related macular degeneration. *Ophthalmic Res.* 46, 31–37.
- Guillery, R.W., Mason, C.A., and Taylor, J.S. (1995). Developmental determinants at the mammalian optic chiasm. *J. Neurosci.* 15, 4727–4737.
- Guillery, R.W., Okoro, A.N., and Witkop, C.J., Jr (1975). Abnormal visual pathways in the brain of a human albino. *Brain Res.* 96, 373–377.
- Gunhaga, L. (2011). The lens: a classical model of embryonic induction providing new insights into cell determination in early development. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* 366, 1193–1203.
- Haeseleer, F., Imanishi, Y., Maeda, T., Possin, D.E., Maeda, A., Lee, A., Rieke, F., and Palczewski, K. (2004). Essential role of Ca<sup>2+</sup>-binding protein 4, a Cav1.4 channel regulator, in photoreceptor synaptic function. *Nat. Neurosci.* 7, 1079–1087.
- Haeseleer, F., Jang, G.-F., Imanishi, Y., Driessen, C.A.G.G., Matsumura, M., Nelson, P.S., and Palczewski, K. (2002). Dual-substrate specificity short chain retinol dehydrogenases from the vertebrate retina. *J. Biol. Chem.* 277, 45537–45546.
- Hagins, W.A., Penn, R.D., and Yoshikami, S. (1970). Dark current and photocurrent in retinal rods. *Biophys. J.* 10, 380–412.
- Hagstrom, S.A., Watson, R.F., Pauer, G.J.T., and Grossman, G.H. (2012). Tulp1 is involved in specific photoreceptor protein transport pathways. *Adv. Exp. Med. Biol.* 723, 783–789.
- Haire, S.E., Pang, J., Boye, S.L., Sokal, I., Craft, C.M., Palczewski, K., Hauswirth, W.W., and Semple-Rowland, S.L. (2006). Light-driven cone arrestin translocation in cones of postnatal guanylate cyclase-1 knockout mouse retina treated with AAV-GC1. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 47, 3745–3753.
- Hajkova, D., Imanishi, Y., Palamalai, V., Rao, K.C.S., Yuan, C., Sheng, Q., Tang, H., Zeng, R., Darrow, R.M., Organisciak, D.T., et al. (2010). Proteomic changes in the photoreceptor outer segment upon intense light exposure. *J. Proteome Res.* 9, 1173–1181.
- Halder, G., Callaerts, P., Flister, S., Walldorf, U., Kloter, U., and Gehring, W.J. (1998). Eyeless initiates the expression of both sine oculis and eyes absent during Drosophila compound eye development. *Development* 125, 2181–2191.
- Hall, M.O., Obin, M.S., Prieto, A.L., Burgess, B.L., and Abrams, T.A. (2002). Gas6 binding to photoreceptor outer segments requires gamma-carboxyglutamic acid (Gla) and Ca(2+) and is required for OS phagocytosis by RPE cells in vitro. *Exp. Eye Res.* 75, 391–400.
- Hall, M.O., Prieto, A.L., Obin, M.S., Abrams, T.A., Burgess, B.L., Heeb, M.J., and Agnew, B.J. (2001). Outer segment phagocytosis by cultured retinal pigment epithelial cells requires Gas6. *Exp. Eye Res.* 73, 509–520.

- Hall, P.A., and Watt, F.M. (1989). Stem cells: the generation and maintenance of cellular diversity. *Development* 106, 619–633.
- Hall, W.S., and Eubank, M.D. (1896). The regeneration of the blood. *The Journal of Experimental Medicine* 1, 656.
- Hameed, A., Khaliq, S., Ismail, M., Anwar, K., Ebenezer, N.D., Jordan, T., Mehdi, S.Q., Payne, A.M., and Bhattacharya, S.S. (2000). A novel locus for Leber congenital amaurosis (LCA4) with anterior keratoconus mapping to chromosome 17p13. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 41, 629–633.
- Hamilton, W.J., and Boyd, J.D. (1960). Development of the human placenta in the first three months of gestation. *J. Anat.* 94, 297–328.
- Hamming, N.A., Apple, D.J., Gieser, D.K., and Vygantas, C.M. (1977). Ultrastructure of the hyaloid vasculature in primates. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 16, 408–415.
- Han, D.W., Tapia, N., Hermann, A., Hemmer, K., Höing, S., Araúzo-Bravo, M.J., Zaehres, H., Wu, G., Frank, S., Moritz, S., et al. (2012). Direct reprogramming of fibroblasts into neural stem cells by defined factors. *Cell Stem Cell* 10, 465–472.
- Hanein, S., Perrault, I., Gerber, S., Tanguy, G., Barbet, F., Ducroq, D., Calvas, P., Dollfus, H., Hamel, C., Lopponen, T., et al. (2004). Leber congenital amaurosis: comprehensive survey of the genetic heterogeneity, refinement of the clinical definition, and genotype-phenotype correlations as a strategy for molecular diagnosis. *Hum. Mutat.* 23, 306–317.
- Hanein, S., Perrault, I., Gerber, S., Tanguy, G., Hamel, C., Dufier, J.-L., Rozet, J.-M., and Kaplan, J. (2005). [Leber congenital amaurosis: comprehensive survey of genetic heterogeneity. A clinical definition update]. *J Fr Ophtalmol* 28, 98–105.
- Hanein, S., Perrault, I., Olsen, P., Lopponen, T., Hietala, M., Gerber, S., Jeanpierre, M., Barbet, F., Ducroq, D., Hakiki, S., et al. (2002). Evidence of a founder effect for the RETGC1 (GUCY2D) 2943DelG mutation in Leber congenital amaurosis pedigrees of Finnish origin. *Hum. Mutat.* 20, 322–323.
- Hanna, J.H., Saha, K., and Jaenisch, R. (2010). Pluripotency and cellular reprogramming: facts, hypotheses, unresolved issues. *Cell* 143, 508–525.
- Hannan, N.J., Paiva, P., Dimitriadis, E., and Salamonsen, L.A. (2010). Models for study of human embryo implantation: choice of cell lines? *Biol. Reprod.* 82, 235–245.
- Hanson, I.M., Fletcher, J.M., Jordan, T., Brown, A., Taylor, D., Adams, R.J., Punnett, H.H., and Van Heyningen, V. (1994). Mutations at the PAX6 locus are found in heterogeneous anterior segment malformations including Peters' anomaly. *Nat. Genet.* 6, 168–173.
- Hara, A., Aoki, H., Taguchi, A., Niwa, M., Yamada, Y., Kunisada, T., and Mori, H. (2008). Neuron-like differentiation and selective ablation of undifferentiated embryonic stem cells containing suicide gene with Oct-4 promoter. *Stem Cells Dev.* 17, 619–627.
- Harada, S., and Rodan, G.A. (2003). Control of osteoblast function and regulation of bone mass. *Nature* 423, 349–355.
- Hargus, G., Cooper, O., Deleidi, M., Levy, A., Lee, K., Marlow, E., Yow, A., Soldner, F., Hockemeyer, D., Hallett, P.J., et al. (2010). Differentiated Parkinson patient-derived induced pluripotent stem cells grow in the adult rodent brain and reduce motor asymmetry in Parkinsonian rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 15921–15926.



- Harland, R. (2000). Neural induction. *Curr. Opin. Genet. Dev.* *10*, 357–362.
- Harland, R. (2008). Induction into the Hall of Fame: tracing the lineage of Spemann's organizer. *Development* *135*, 3321–3323.
- Harland, R., and Gerhart, J. (1997). Formation and function of Spemann's organizer. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *13*, 611–667.
- Harrington, L., Klintworth, G.K., Secor, T.E., and Breitman, M.L. (1991). Developmental analysis of ocular morphogenesis in alpha A-crystallin/diphtheria toxin transgenic mice undergoing ablation of the lens. *Dev. Biol.* *148*, 508–516.
- Harris, H. (1965). Behaviour of differentiated nuclei in heterokaryons of animal cells from different species. *Nature* *206*, 583–588.
- Hartveit, E. (1999). Reciprocal synaptic interactions between rod bipolar cells and amacrine cells in the rat retina. *J. Neurophysiol.* *81*, 2923–2936.
- Haruta, M., Sasai, Y., Kawasaki, H., Amemiya, K., Ooto, S., Kitada, M., Suemori, H., Nakatsuji, N., Ide, C., Honda, Y., et al. (2004). In Vitro and In Vivo Characterization of Pigment Epithelial Cells Differentiated from Primate Embryonic Stem Cells. *IOVS* *45*, 1020–1025.
- 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*, 979–990.
- Haverkamp, S., Grünert, U., and Wässle, H. (2001). Localization of kainate receptors at the cone pedicles of the primate retina. *J. Comp. Neurol.* *436*, 471–486.
- Hay, E.D. (1980). Development of the vertebrate cornea. *Int. Rev. Cytol.* *63*, 263–322.
- Hay, E.D., and Revel, J.P. (1969). Fine structure of the developing avian cornea. *Monogr Dev Biol* *1*, 1–144.
- Hayasaka, S., Saito, T., Nakajima, H., Takahashi, O., Mizuno, K., and Tada, K. (1985). Clinical trials of vitamin B6 and proline supplementation for gyrate atrophy of the choroid and retina. *The British Journal of Ophthalmology* *69*, 283.
- Heinänen, K., Näntö-Salonen, K., Leino, L., Pulkki, K., Heinonen, O., Valle, D., and Simell, O. (1998). Gyrate Atrophy of the Choroid and Retina: Lymphocyte Ornithine- $\delta$ -Aminotransferase Activity in Different Mutations and Carriers. *Pediatric Research* *44*, 381–385.
- Heins, N., Englund, M.C.O., Sjöblom, C., Dahl, U., Tønning, A., Bergh, C., Lindahl, A., Hanson, C., and Semb, H. (2004). Derivation, characterization, and differentiation of human embryonic stem cells. *Stem Cells* *22*, 367–376.
- Hemati, N., Feathers, K.L., Chrispell, J.D., Reed, D.M., Carlson, T.J., and Thompson, D.A. (2005). RPE65 surface epitopes, protein interactions, and expression in rod- and cone-dominant species. *Mol. Vis.* *11*, 1151–1165.
- Hemmati-Brivanlou, A., and Melton, D. (1997). Vertebrate embryonic cells will become nerve cells unless told otherwise. *Cell* *88*, 13–17.

- Henderson, R.H., Williamson, K.A., Kennedy, J.S., Webster, A.R., Holder, G.E., Robson, A.G., FitzPatrick, D.R., Van Heyningen, V., and Moore, A.T. (2009). A rare de novo nonsense mutation in OTX2 causes early onset retinal dystrophy and pituitary dysfunction. *Mol. Vis.* 15, 2442–2447.
- Hendrickson, A., Bumsted-O'Brien, K., Natoli, R., Ramamurthy, V., Possin, D., and Provis, J. (2008). Rod photoreceptor differentiation in fetal and infant human retina. *Experimental Eye Research* 87, 415–426.
- Hendrickson, A., Possin, D., Vajzovic, L., and Toth, C.A. (2012). Histologic Development of the Human Fovea From Midgestation to Maturity. *Am. J. Ophthalmol.*
- Hendrickson, A.E., and Yuodelis, C. (1984). The morphological development of the human fovea. *Ophthalmology* 91, 603–612.
- Hendry, S.H., and Calkins, D.J. (1998). Neuronal chemistry and functional organization in the primate visual system. *Trends Neurosci.* 21, 344–349.
- Hendry, S.H., and Reid, R.C. (2000). The koniocellular pathway in primate vision. *Annu. Rev. Neurosci.* 23, 127–153.
- Henkind, P. (1967). Radial peripapillary capillaries of the retina. I. Anatomy: human and comparative. *Br J Ophthalmol* 51, 115–123.
- Hentze, H., Graichen, R., and Colman, A. (2007). Cell therapy and the safety of embryonic stem cell-derived grafts. *Trends Biotechnol.* 25, 24–32.
- Herman, K.G., and Steinberg, R.H. (1982). Phagosome movement and the diurnal pattern of phagocytosis in the tapetal retinal pigment epithelium of the opossum. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 23, 277–290.
- Hewitt, K.J., and Garlick, J.A. (2012). Cellular reprogramming to reset epigenetic signatures. *Mol. Aspects Med.*
- Hill, R.E., Favor, J., Hogan, B.L., Ton, C.C., Saunders, G.F., Hanson, I.M., Prosser, J., Jordan, T., Hastie, N.D., and Van Heyningen, V. (1991). Mouse small eye results from mutations in a paired-like homeobox-containing gene. *Nature* 354, 522–525.
- Hirabayashi, Y., Fujimori, O., and Shimizu, S. (2003). Bruch's membrane of the brachymorphic mouse. *Med Electron Microsc* 36, 139–146.
- Hirami, Y., Osakada, F., Takahashi, K., Okita, K., Yamanaka, S., Ikeda, H., Yoshimura, N., and Takahashi, M. (2009). Generation of retinal cells from mouse and human induced pluripotent stem cells. *Neurosci. Lett.* 458, 126–131.
- Hirano, M., Yamamoto, A., Yoshimura, N., Tokunaga, T., Motohashi, T., Ishizaki, K., Yoshida, H., Okazaki, K., Yamazaki, H., Hayashi, S.-I., et al. (2003). Generation of structures formed by lens and retinal cells differentiating from embryonic stem cells. *Dev. Dyn.* 228, 664–671.
- Hirasawa, H., Shiells, R., and Yamada, M. (2002). A metabotropic glutamate receptor regulates transmitter release from cone presynaptic terminals in carp retinal slices. *J. Gen. Physiol.* 119, 55–68.
- Hodgkinson, C.A., Moore, K.J., Nakayama, A., Steingrímsson, E., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., and Arnheiter, H. (1993). Mutations at the mouse microphthalmia locus are associated with defects in a gene encoding a novel basic-helix-loop-helix-zipper protein. *Cell* 74, 395–404.

- Hofer, S., Karaus, A., and Frahm, J. (2010). Reconstruction and dissection of the entire human visual pathway using diffusion tensor MRI. *Front Neuroanat* 4, 15.
- Hoffman, L.M., and Carpenter, M.K. (2005). Human embryonic stem cell stability. *Stem Cell Rev* 1, 139–144.
- Hogan, M.J., Alvarado, J.A., and Weddell, J.E. (1971). *Histology of the human eye: an atlas and textbook* [by] Michael J. Hogan, Jorge A. Alvarado [and] Joan Esperson Weddell (Saunders).
- Hogg, R., and Chakravarthy, U. (2004). AMD and micronutrient antioxidants. *Current Eye Research* 29, 387–401.
- Den Hollander, A.I., Black, A., Bennett, J., and Cremers, F.P.M. (2010). Lighting a candle in the dark: advances in genetics and gene therapy of recessive retinal dystrophies. *J Clin Invest* 120, 3042–3053.
- Den Hollander, A.I., Ten Brink, J.B., De Kok, Y.J., Van Soest, S., Van den Born, L.I., Van Driel, M.A., Van de Pol, D.J., Payne, A.M., Bhattacharya, S.S., Kellner, U., et al. (1999). Mutations in a human homologue of *Drosophila crumbs* cause retinitis pigmentosa (RP12). *Nat. Genet.* 23, 217–221.
- Den Hollander, A.I., Heckenlively, J.R., Van den Born, L.I., De Kok, Y.J., Van der Velde-Visser, S.D., Kellner, U., Jurklies, B., Van Schooneveld, M.J., Blankenagel, A., Rohrschneider, K., et al. (2001). Leber congenital amaurosis and retinitis pigmentosa with Coats-like exudative vasculopathy are associated with mutations in the crumbs homologue 1 (CRB1) gene. *Am. J. Hum. Genet.* 69, 198–203.
- Den Hollander, A.I., Koenekoop, R.K., Mohamed, M.D., Arts, H.H., Boldt, K., Towns, K.V., Sedmak, T., Beer, M., Nagel-Wolfrum, K., McKibbin, M., et al. (2007). Mutations in LCA5, encoding the ciliary protein lebercilin, cause Leber congenital amaurosis. *Nat. Genet.* 39, 889–895.
- Den Hollander, A.I., Koenekoop, R.K., Yzer, S., Lopez, I., Arends, M.L., Voesenek, K.E.J., Zonneveld, M.N., Strom, T.M., Meitinger, T., Brunner, H.G., et al. (2006). Mutations in the CEP290 (NPHP6) gene are a frequent cause of Leber congenital amaurosis. *Am. J. Hum. Genet.* 79, 556–561.
- Den Hollander, A.I., Roepman, R., Koenekoop, R.K., and Cremers, F.P.M. (2008). Leber congenital amaurosis: Genes, proteins and disease mechanisms. *Progress in Retinal and Eye Research* 27, 391–419.
- Hong, H., Takahashi, K., Ichisaka, T., Aoi, T., Kanagawa, O., Nakagawa, M., Okita, K., and Yamanaka, S. (2009). Suppression of induced pluripotent stem cell generation by the p53-p21 pathway. *Nature* 460, 1132–1135.
- Horsford, D.J., Nguyen, M.-T.T., Sellar, G.C., Kothary, R., Arnheiter, H., and McInnes, R.R. (2005). Chx10 repression of Mitf is required for the maintenance of mammalian neuroretinal identity. *Development* 132, 177–187.
- Hosseinkhani, H., Hong, P.-D., Yu, D.-S., Chen, Y.-R., Ickowicz, D., Farber, I.-Y., and Domb, A.J. (2012). Development of 3D in vitro platform technology to engineer mesenchymal stem cells. *Int J Nanomedicine* 7, 3035–3043.
- Hotta, A., Cheung, A.Y.L., Farra, N., Vijayaragavan, K., Séguin, C.A., Draper, J.S., Pasceri, P., Maksakova, I.A., Mager, D.L., Rossant, J., et al. (2009). Isolation of human iPS cells using EOS lentiviral vectors to select for pluripotency. *Nat. Methods* 6, 370–376.
- Houbaviy, H.B., Murray, M.F., and Sharp, P.A. (2003). Embryonic Stem Cell-Specific MicroRNAs. *Developmental Cell* 5, 351–358.

Howden, S.E., Gore, A., Li, Z., Fung, H.-L., Nisler, B.S., Nie, J., Chen, G., McIntosh, B.E., Gulbranson, D.R., Diol, N.R., et al. (2011). Genetic correction and analysis of induced pluripotent stem cells from a patient with gyrate atrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *108*, 6537–6542.

Hu, Q., Friedrich, A.M., Johnson, L.V., and Clegg, D.O. (2010). Memory in induced pluripotent stem cells: reprogrammed human retinal-pigmented epithelial cells show tendency for spontaneous redifferentiation. *Stem Cells* *28*, 1981–1991.

Huang, P., He, Z., Ji, S., Sun, H., Xiang, D., Liu, C., Hu, Y., Wang, X., and Hui, L. (2011). Induction of functional hepatocyte-like cells from mouse fibroblasts by defined factors. *Nature* *475*, 386–389.

Huangfu, D., Maehr, R., Guo, W., Eijkelenboom, A., Snitow, M., Chen, A.E., and Melton, D.A. (2008a). Induction of pluripotent stem cells by defined factors is greatly improved by small-molecule compounds. *Nat. Biotechnol.* *26*, 795–797.

Huangfu, D., Osafune, K., Maehr, R., Guo, W., Eijkelenboom, A., Chen, S., Muhlestein, W., and Melton, D.A. (2008b). Induction of pluripotent stem cells from primary human fibroblasts with only Oct4 and Sox2. *Nat. Biotechnol.* *26*, 1269–1275.

Hufnagel, R.B., Ahmed, Z.M., Corrêa, Z.M., and Sisk, R.A. (2012). Gene therapy for Leber congenital amaurosis: advances and future directions. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology = Albrecht Von Graefes Archiv Fur Klinische Und Experimentelle Ophthalmologie*.

Hughes, A.E., Newton, V.E., Liu, X.Z., and Read, A.P. (1994). A gene for Waardenburg Syndrome type 2 maps close to the human homologue of the microphthalmia gene at chromosome 3p12–p14.1. *Nature Genetics* *7*, 509–512.

Hussein, S.M., Batada, N.N., Vuoristo, S., Ching, R.W., Autio, R., Närvä, E., Ng, S., Sourour, M., Hämmäläinen, R., Olsson, C., et al. (2011). Copy number variation and selection during reprogramming to pluripotency. *Nature* *471*, 58–62.

Hwang, W.S., Roh, S.I., Lee, B.C., Kang, S.K., Kwon, D.K., Kim, S., Kim, S.J., Park, S.W., Kwon, H.S., Lee, C.K., et al. (2005). Patient-specific embryonic stem cells derived from human SCNT blastocysts. *Science* *308*, 1777–1783.

Ichim, T., Riordan, N.H., and Stroncek, D.F. (2011). The king is dead, long live the king: entering a new era of stem cell research and clinical development. *J Transl Med* *9*, 218.

Idelson, M., Alper, R., Obolensky, A., Ben-Shushan, E., Hemo, I., Yachimovich-Cohen, N., Khaner, H., Smith, Y., Wisner, O., Gropp, M., et al. (2009). Directed differentiation of human embryonic stem cells into functional retinal pigment epithelium cells. *Cell Stem Cell* *5*, 396–408.

Imamura, N., Dake, Y., and Amemiya, T. (1995). Circadian rhythm in the retinal pigment epithelium related to vitamin B12. *Life Sci.* *57*, 1317–1323.

Imamura, Y., Noda, S., Hashizume, K., Shinoda, K., Yamaguchi, M., Uchiyama, S., Shimizu, T., Mizushima, Y., Shirasawa, T., and Tsubota, K. (2006). Drusen, choroidal neovascularization, and retinal pigment epithelium dysfunction in SOD1-deficient mice: a model of age-related macular degeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *103*, 11282–11287.

Inagawa, K., and Ieda, M. (2012). Direct Reprogramming of Mouse Fibroblasts into Cardiac Myocytes. *J Cardiovasc Transl Res.*

Inoue, H., and Yamanaka, S. (2011). The use of induced pluripotent stem cells in drug development. *Clin. Pharmacol. Ther.* *89*, 655–661.

- De Iongh, R., and McAvoy, J.W. (1993). Spatio-temporal distribution of acidic and basic FGF indicates a role for FGF in rat lens morphogenesis. *Dev. Dyn.* *198*, 190–202.
- Ishida, A.T., Stell, W.K., and Lightfoot, D.O. (1980). Rod and cone inputs to bipolar cells in goldfish retina. *J. Comp. Neurol.* *191*, 315–335.
- Ishii, M., Morigiwa, K., Takao, M., Nakanishi, S., Fukuda, Y., Mimura, O., and Tsukamoto, Y. (2009). Ectopic synaptic ribbons in dendrites of mouse retinal ON- and OFF-bipolar cells. *Cell Tissue Res.* *338*, 355–375.
- Israel, M.A., Yuan, S.H., Bardy, C., Reyna, S.M., Mu, Y., Herrera, C., Hefferan, M.P., Van Gorp, S., Nazor, K.L., Boscolo, F.S., et al. (2012). Probing sporadic and familial Alzheimer's disease using induced pluripotent stem cells. *Nature* *482*, 216–220.
- Itskovitz-Eldor, J., Schuldiner, M., Karsenti, D., Eden, A., Yanuka, O., Amit, M., Soreq, H., and Benvenisty, N. (2000). Differentiation of human embryonic stem cells into embryoid bodies compromising the three embryonic germ layers. *Mol. Med.* *6*, 88–95.
- Izaddoost, S., Nam, S.-C., Bhat, M.A., Bellen, H.J., and Choi, K.-W. (2002). *Drosophila* Crumbs is a positional cue in photoreceptor adherens junctions and rhabdomeres. *Nature* *416*, 178–183.
- Jacobs, G.H. (1996). Primate photopigments and primate color vision. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *93*, 577–581.
- Jacobs, J.J.L., and Van Lohuizen, M. (2002). Polycomb repression: from cellular memory to cellular proliferation and cancer. *Biochim. Biophys. Acta* *1602*, 151–161.
- Jacobson, S.G., Aleman, T.S., Cideciyan, A.V., Heon, E., Golczak, M., Beltran, W.A., Sumaroka, A., Schwartz, S.B., Roman, A.J., Windsor, E.A.M., et al. (2007). Human cone photoreceptor dependence on RPE65 isomerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *104*, 15123–15128.
- Jacobson, S.G., Aleman, T.S., Cideciyan, A.V., Sumaroka, A., Schwartz, S.B., Windsor, E.A.M., Traboulsi, E.I., Heon, E., Pittler, S.J., Milam, A.H., et al. (2005). Identifying photoreceptors in blind eyes caused by RPE65 mutations: Prerequisite for human gene therapy success. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *102*, 6177–6182.
- Jacobson, S.G., Cideciyan, A.V., Ratnakaram, R., Heon, E., Schwartz, S.B., Roman, A.J., Peden, M.C., Aleman, T.S., Boye, S.L., Sumaroka, A., et al. (2011). Gene Therapy for Leber Congenital Amaurosis Caused by RPE65 Mutations: Safety and Efficacy in 15 Children and Adults Followed Up to 3 Years. *Archives of Ophthalmology* *130*, 9–24.
- Jaenisch, R., and Young, R. (2008). Stem cells, the molecular circuitry of pluripotency and nuclear reprogramming. *Cell* *132*, 567–582.
- Jaks, V., Barker, N., Kasper, M., Van Es, J.H., Snippert, H.J., Clevers, H., and Toftgård, R. (2008). Lgr5 marks cycling, yet long-lived, hair follicle stem cells. *Nat. Genet.* *40*, 1291–1299.
- Jaks, V., Kasper, M., and Toftgård, R. (2010). The hair follicle—a stem cell zoo. *Exp. Cell Res.* *316*, 1422–1428.
- Jakus, M.A. (1956). STUDIES ON THE CORNEA. II. THE FINE STRUCTURE OF DESCMET'S MEMBRANE. *The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology* *2*, 243.
- Jakus, M.A. (1962). Further Observations on the Fine Structure of the Cornea. *IOVS* *1*, 202–225.

- James, D., Levine, A.J., Besser, D., and Hemmati-Brivanlou, A. (2005). TGF $\beta$ /activin/nodal signaling is necessary for the maintenance of pluripotency in human embryonic stem cells. *Development* 132, 1273–1282.
- Janecke, A.R., Thompson, D.A., Utermann, G., Becker, C., Hübner, C.A., Schmid, E., McHenry, C.L., Nair, A.R., Rüschemann, F., Heckenlively, J., et al. (2004). Mutations in RDH12 encoding a photoreceptor cell retinol dehydrogenase cause childhood-onset severe retinal dystrophy. *Nat. Genet.* 36, 850–854.
- Jang, C.-C., Chao, J.-L., Jones, N., Yao, L.-C., Bessarab, D.A., Kuo, Y.M., Jun, S., Desplan, C., Beckendorf, S.K., and Sun, Y.H. (2003). Two Pax genes, eye gone and eyeless, act cooperatively in promoting *Drosophila* eye development. *Development* 130, 2939–2951.
- Jarrett, S.G., Liang, L.-P., Hellier, J.L., Staley, K.J., and Patel, M. (2008a). Mitochondrial DNA damage and impaired base excision repair during epileptogenesis. *Neurobiol. Dis.* 30, 130–138.
- Jarrett, S.G., Lin, H., Godley, B.F., and Boulton, M.E. (2008b). Mitochondrial DNA damage and its potential role in retinal degeneration. *Prog Retin Eye Res* 27, 596–607.
- Jastrzebska, B., Tsybovsky, Y., and Palczewski, K. (2010). Complexes between photoactivated rhodopsin and transducin: progress and questions. *Biochemical Journal* 428, 1–10.
- Jay, B. (1987). Causes of blindness in schoolchildren. *Br Med J (Clin Res Ed)* 294, 1183–1184.
- Jiang, L.Q., and Streilein, J.W. (1991). Immune privilege extended to allogeneic tumor cells in the vitreous cavity. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 32, 224–228.
- Jiang, Z., Liang, K., Zhang, Q., and Tao, L. (2012). Glutathione S-transferases polymorphisms confer susceptibility to senile cortical cataract in the Han Chinese population. *Mol. Vis.* 18, 1247–1252.
- Jin, M., Li, S., Moghrabi, W.N., Sun, H., and Travis, G.H. (2005). Rpe65 is the retinoid isomerase in bovine retinal pigment epithelium. *Cell* 122, 449–459.
- Jin, Z.-B., Okamoto, S., Osakada, F., Homma, K., Assawachananont, J., Hirami, Y., Iwata, T., and Takahashi, M. (2011). Modeling retinal degeneration using patient-specific induced pluripotent stem cells. *PLoS ONE* 6, e17084.
- Jones, R.E., and López, K.H. (2006). *Human Reproductive Biology* (Academic Press).
- Jordan, S.A., Farrar, G.J., Kenna, P., Humphries, M.M., Sheils, D.M., Kumar-Singh, R., Sharp, E.M., Soriano, N., Ayuso, C., and Benitez, J. (1993). Localization of an autosomal dominant retinitis pigmentosa gene to chromosome 7q. *Nat. Genet.* 4, 54–58.
- Jordan, T., Hanson, I., Zaletayev, D., Hodgson, S., Prosser, J., Seawright, A., Hastie, N., and Van Heyningen, V. (1992). The human PAX6 gene is mutated in two patients with aniridia. *Nat. Genet.* 1, 328–332.
- Judson, R.L., Babiarz, J.E., Venere, M., and Blelloch, R. (2009). Embryonic stem cell-specific microRNAs promote induced pluripotency. *Nat. Biotechnol.* 27, 459–461.
- Jung, J., Hackett, N.R., Pergolizzi, R.G., Pierre-Destine, L., Krause, A., and Crystal, R.G. (2007). Ablation of tumor-derived stem cells transplanted to the central nervous system by genetic modification of embryonic stem cells with a suicide gene. *Hum. Gene Ther.* 18, 1182–1192.

- Juronen, E., Tasa, G., Veromann, S., Parts, L., Tiidla, A., Pulges, R., Panov, A., Soovere, L., Koka, K., and Mikelsaar, A.V. (2000). Polymorphic glutathione S-transferase M1 is a risk factor of primary open-angle glaucoma among Estonians. *Exp. Eye Res.* *71*, 447–452.
- Kablar, B., Vignali, R., Menotti, L., Pannese, M., Andreazzoli, M., Polo, C., Giribaldi, M.G., Boncinelli, E., and Barsacchi, G. (1996). Xotx genes in the developing brain of *Xenopus laevis*. *Mech. Dev.* *55*, 145–158.
- Kageyama, R., Ohtsuka, T., and Kobayashi, T. (2008). Roles of Hes genes in neural development. *Dev. Growth Differ.* *50 Suppl 1*, S97–103.
- Kaji, K., Norrby, K., Paca, A., Mileikovsky, M., Mohseni, P., and Woltjen, K. (2009). Virus-free induction of pluripotency and subsequent excision of reprogramming factors. *Nature* *458*, 771–775.
- Kaltz, N., Funari, A., Hippauf, S., Delorme, B., Noël, D., Riminucci, M., Jacobs, V.R., Häupl, T., Jorgensen, C., Charbord, P., et al. (2008). In vivo osteoprogenitor potency of human stromal cells from different tissues does not correlate with expression of POU5F1 or its pseudogenes. *Stem Cells* *26*, 2419–2424.
- Kan, L., Israsena, N., Zhang, Z., Hu, M., Zhao, L.-R., Jalali, A., Sahni, V., and Kessler, J.A. (2004). Sox1 acts through multiple independent pathways to promote neurogenesis. *Dev. Biol.* *269*, 580–594.
- Kaplan, J. (2008). Leber congenital amaurosis: from darkness to spotlight. *Ophthalmic Genet.* *29*, 92–98.
- Kaplan, J., Bonneau, D., Frézal, J., Munnich, A., and Dufier, J.L. (1990). Clinical and genetic heterogeneity in retinitis pigmentosa. *Hum. Genet.* *85*, 635–642.
- Karan, S., Frederick, J.M., and Baehr, W. (2010). Novel functions of photoreceptor guanylate cyclases revealed by targeted deletion. *Mol. Cell. Biochem.* *334*, 141–155.
- Karl, M.O., Kroeger, W., Wimmers, S., Milenkovic, V.M., Valtink, M., Engelmann, K., and Strauss, O. (2008). Endogenous Gas6 and Ca<sup>2+</sup>-channel activation modulate phagocytosis by retinal pigment epithelium. *Cell. Signal.* *20*, 1159–1168.
- Kato, Y., Tani, T., Sotomaru, Y., Kurokawa, K., Kato, J., Doguchi, H., Yasue, H., and Tsunoda, Y. (1998). Eight calves cloned from somatic cells of a single adult. *Science* *282*, 2095–2098.
- Kawasaki, H., Mizuseki, K., Nishikawa, S., Kaneko, S., Kuwana, Y., Nakanishi, S., Nishikawa, S.I., and Sasai, Y. (2000). Induction of midbrain dopaminergic neurons from ES cells by stromal cell-derived inducing activity. *Neuron* *28*, 31–40.
- Keen, T.J., Mohamed, M.D., McKibbin, M., Rashid, Y., Jafri, H., Maumenee, I.H., and Inglehearn, C.F. (2003). Identification of a locus (LCA9) for Leber's congenital amaurosis on chromosome 1p36. *Eur. J. Hum. Genet.* *11*, 420–423.
- Keirstead, H.S., Nistor, G., Bernal, G., Totoiu, M., Cloutier, F., Sharp, K., and Steward, O. (2005). Human Embryonic Stem Cell-Derived Oligodendrocyte Progenitor Cell Transplants Remyelinate and Restore Locomotion after Spinal Cord Injury. *J. Neurosci.* *25*, 4694–4705.
- Keller, D.A., Juberg, D.R., Catlin, N., Farland, W.H., Hess, F.G., Wolf, D.C., and Doerrner, N.G. (2012). Identification and characterization of adverse effects in 21st century toxicology. *Toxicol. Sci.* *126*, 291–297.
- Kennedy, D. (2006). Editorial retraction. *Science* *311*, 335.



- Kevany, B.M., and Palczewski, K. (2010). Phagocytosis of retinal rod and cone photoreceptors. *Physiology (Bethesda)* 25, 8–15.
- Keymolen, K., Goossens, V., De Rycke, M., Sermon, K., Boelaert, K., Bonduelle, M., Van Steirteghem, A., and Liebaers, I. (2007). Clinical outcome of preimplantation genetic diagnosis for cystic fibrosis: the Brussels' experience. *Eur. J. Hum. Genet.* 15, 752–758.
- Khurana (2005). Diseases of the Retina. In *Ophthalmology*, (New Age International), pp. 248–249.
- Kim, H.S., Oh, S.K., Park, Y.B., Ahn, H.J., Sung, K.C., Kang, M.J., Lee, L.A., Suh, C.S., Kim, S.H., Kim, D.-W., et al. (2005a). Methods for derivation of human embryonic stem cells. *Stem Cells* 23, 1228–1233.
- Kim, J., Efe, J.A., Zhu, S., Talantova, M., Yuan, X., Wang, S., Lipton, S.A., Zhang, K., and Ding, S. (2011). Direct reprogramming of mouse fibroblasts to neural progenitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 7838–7843.
- Kim, J.B., Greber, B., Araúzo-Bravo, M.J., Meyer, J., Park, K.I., Zaehres, H., and Schöler, H.R. (2009). Direct reprogramming of human neural stem cells by OCT4. *Nature* 461, 649–643.
- Kim, J.Y., Siegmund, K.D., Tavaré, S., and Shibata, D. (2005b). Age-related human small intestine methylation: evidence for stem cell niches. *BMC Med* 3, 10.
- Kim, M.K., Jang, G., Oh, H.J., Yuda, F., Kim, H.J., Hwang, W.S., Hossein, M.S., Kim, J.J., Shin, N.S., Kang, S.K., et al. (2007). Endangered wolves cloned from adult somatic cells. *Cloning Stem Cells* 9, 130–137.
- Kiskinis, E., and Eggan, K. (2010). Progress toward the clinical application of patient-specific pluripotent stem cells. *Journal of Clinical Investigation* 120, 51–59.
- Kitisin, K., Saha, T., Blake, T., Golestaneh, N., Deng, M., Kim, C., Tang, Y., Shetty, K., Mishra, B., and Mishra, L. (2007). Tgf-Beta signaling in development. *Sci. STKE* 2007, cm1.
- Kleinjan, D.A., Bancewicz, R.M., Gautier, P., Dahm, R., Schonthaler, H.B., Damante, G., Seawright, A., Hever, A.M., Yeyati, P.L., Van Heyningen, V., et al. (2008). Subfunctionalization of duplicated zebrafish pax6 genes by cis-regulatory divergence. *PLoS Genet.* 4, e29.
- KLEINSMITH, L.J., and PIERCE, G.B., Jr (1964). MULTIPOTENTIALITY OF SINGLE EMBRYONAL CARCINOMA CELLS. *Cancer Res.* 24, 1544–1551.
- Klimanskaya, I., Chung, Y., Becker, S., Lu, S.-J., and Lanza, R. (2006). Human embryonic stem cell lines derived from single blastomeres. *Nature* 444, 481–485.
- Klimanskaya, I., Chung, Y., Meisner, L., Johnson, J., West, M.D., and Lanza, R. (2005). Human embryonic stem cells derived without feeder cells. *Lancet* 365, 1636–1641.
- Klimanskaya, I., Hipp, J., Rezai, K.A., West, M., Atala, A., and Lanza, R. (2004). Derivation and comparative assessment of retinal pigment epithelium from human embryonic stem cells using transcriptomics. *Cloning Stem Cells* 6, 217–245.
- Klug, K., Herr, S., Ngo, I.T., Sterling, P., and Schein, S. (2003). Macaque Retina Contains an S-Cone OFF Midget Pathway. *J. Neurosci.* 23, 9881–9887.
- Knowles, J.A., Shugart, Y., Banerjee, P., Gilliam, T.C., Lewis, C.A., Jacobson, S.G., and Ott, J. (1994). Identification of a locus, distinct from RDS-peripherin, for autosomal recessive retinitis pigmentosa on chromosome 6p. *Hum. Mol. Genet.* 3, 1401–1403.

- Knupp, C., Pinali, C., Lewis, P.N., Parfitt, G.J., Young, R.D., Meek, K.M., and Quantock, A.J. (2009). The architecture of the cornea and structural basis of its transparency. *Adv Protein Chem Struct Biol* 78, 25–49.
- Koch, K.-W., Duda, T., and Sharma, R.K. (2002). Photoreceptor specific guanylate cyclases in vertebrate phototransduction. *Mol. Cell. Biochem.* 230, 97–106.
- Koenekoop, R.K., Wang, H., Majewski, J., Wang, X., Lopez, I., Ren, H., Chen, Y., Li, Y., Fishman, G.A., Genead, M., et al. (2012). Mutations in NMNAT1 cause Leber congenital amaurosis and identify a new disease pathway for retinal degeneration. *Nature Genetics*.
- Koivisto, H., Hyvärinen, M., Strömberg, A.-M., Inzunza, J., Matilainen, E., Mikkola, M., Hovatta, O., and Teerijoki, H. (2004). Cultures of human embryonic stem cells: serum replacement medium or serum-containing media and the effect of basic fibroblast growth factor. *Reprod. Biomed. Online* 9, 330–337.
- Kola, I., and Landis, J. (2004). Can the pharmaceutical industry reduce attrition rates? *Nat Rev Drug Discov* 3, 711–715.
- Kolb, H. (1970). Organization of the outer plexiform layer of the primate retina: electron microscopy of Golgi-impregnated cells. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* 258, 261–283.
- Kolb, H., Fernandez, E., Schouten, J., Ahnelt, P., Linberg, K.A., and Fisher, S.K. (1994). Are there three types of horizontal cell in the human retina? *J. Comp. Neurol.* 343, 370–386.
- Kolb, H., Linberg, K.A., and Fisher, S.K. (1992). Neurons of the human retina: a Golgi study. *J. Comp. Neurol.* 318, 147–187.
- Kolb, H., Mariani, A., and Gallego, A. (1980). A second type of horizontal cell in the monkey retina. *J. Comp. Neurol.* 189, 31–44.
- Kolb, H., Nelson, R., and Mariani, A. (1981). Amacrine cells, bipolar cells and ganglion cells of the cat retina: a Golgi study. *Vision Res.* 21, 1081–1114.
- Kolesnikov, A.V., and Kefalov, V.J. (2012). Transretinal ERG recordings from mouse retina: rod and cone photoreponses. *J Vis Exp*.
- Korbel, J.O., Urban, A.E., Affourtit, J.P., Godwin, B., Grubert, F., Simons, J.F., Kim, P.M., Palejev, D., Carriero, N.J., Du, L., et al. (2007). Paired-end mapping reveals extensive structural variation in the human genome. *Science* 318, 420–426.
- Korenbrodt, J.I. (2012). Speed, sensitivity, and stability of the light response in rod and cone photoreceptors: Facts and models. *Prog Retin Eye Res* 31, 442–466.
- Korenbrodt, J.I., and Cone, R.A. (1972). Dark ionic flux and the effects of light in isolated rod outer segments. *J. Gen. Physiol.* 60, 20–45.
- Kraus, J., Weber, R.G., Cremer, M., Seebacher, T., Fischer, C., Schurra, C., Jauch, A., Lichter, P., Bensimon, A., and Cremer, T. (1997). High-resolution comparative hybridization to combed DNA fibers. *Hum. Genet.* 99, 374–380.
- Krinsky, N.I., Landrum, J.T., and Bone, R.A. (2003). Biologic mechanisms of the protective role of lutein and zeaxanthin in the eye. *Annu. Rev. Nutr.* 23, 171–201.

- Krupnick, J.G., Gurevich, V.V., and Benovic, J.L. (1997). Mechanism of quenching of phototransduction. Binding competition between arrestin and transducin for phosphorhodopsin. *J. Biol. Chem.* *272*, 18125–18131.
- Ku, S., Soragni, E., Campau, E., Thomas, E.A., Altun, G., Laurent, L.C., Loring, J.F., Napierala, M., and Gottesfeld, J.M. (2010). Friedreich's ataxia induced pluripotent stem cells model intergenerational GAA·TTC triplet repeat instability. *Cell Stem Cell* *7*, 631–637.
- Kuffler, S.W. (1953). Discharge patterns and functional organization of mammalian retina. *J. Neurophysiol.* *16*, 37–68.
- Kumar, J.P., and Moses, K. (2001). Expression of evolutionarily conserved eye specification genes during *Drosophila* embryogenesis. *Dev. Genes Evol.* *211*, 406–414.
- Kumar, R., Sharma, A., Pattnaik, A.K., and Varadwaj, P.K. (2010). Stem cells: An overview with respect to cardiovascular and renal disease. *J Nat Sci Biol Med* *1*, 43–52.
- Kundu, S., and Peterson, C.L. (2009). Role of chromatin states in transcriptional memory. *Biochim. Biophys. Acta* *1790*, 445–455.
- Kuncanjanawan, T., Noisa, P., and Parnpai, R. (2011). Modeling neurological disorders by human induced pluripotent stem cells. *J. Biomed. Biotechnol.* *2011*, 350131.
- Kupfer, C., Chumbley, L., and Downer, J.C. (1967). Quantitative histology of optic nerve, optic tract and lateral geniculate nucleus of man. *J. Anat.* *101*, 393–401.
- Kuroda, T., Tada, M., Kubota, H., Kimura, H., Hatano, S., Suemori, H., Nakatsuji, N., and Tada, T. (2005). Octamer and Sox elements are required for transcriptional cis regulation of Nanog gene expression. *Mol. Cell. Biol.* *25*, 2475–2485.
- Lamb, T.D., and Pugh, E.N., Jr (2006). Phototransduction, dark adaptation, and rhodopsin regeneration the proctor lecture. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* *47*, 5137–5152.
- Lamb, T.M., and Harland, R.M. (1995). Fibroblast growth factor is a direct neural inducer, which combined with noggin generates anterior-posterior neural pattern. *Development* *121*, 3627–3636.
- Lamba, D.A., Gust, J., and Reh, T.A. (2009). Transplantation of human embryonic stem cell-derived photoreceptors restores some visual function in Crx-deficient mice. *Cell Stem Cell* *4*, 73–79.
- Lamba, D.A., Karl, M.O., Ware, C.B., and Reh, T.A. (2006). Efficient generation of retinal progenitor cells from human embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *103*, 12769–12774.
- Lamba, D.A., McUsic, A., Hirata, R.K., Wang, P.-R., Russell, D., and Reh, T.A. (2010). Generation, purification and transplantation of photoreceptors derived from human induced pluripotent stem cells. *PLoS ONE* *5*, e8763.
- Larsson, J., and Karlsson, S. (2005). The role of Smad signaling in hematopoiesis. *Oncogene* *24*, 5676–5692.
- Laurent, L.C., Ulitsky, I., Slavin, I., Tran, H., Schork, A., Morey, R., Lynch, C., Harness, J.V., Lee, S., Barrero, M.J., et al. (2011). Dynamic changes in the copy number of pluripotency and cell proliferation genes in human ESCs and iPSCs during reprogramming and time in culture. *Cell Stem Cell* *8*, 106–118.
- Laustriat, D., Gide, J., Héchard, C., and Peschanski, M. (2009). [Embryonic stem cells in pharmacology]. *Med Sci (Paris)* *25 Spec No 2*, 32–38.

- Laustriat, D., Gide, J., and Peschanski, M. (2010). Human pluripotent stem cells in drug discovery and predictive toxicology. *Biochem. Soc. Trans.* 38, 1051–1057.
- LaVail, M.M. (1973). Kinetics of rod outer segment renewal in the developing mouse retina. *J. Cell Biol.* 58, 650–661.
- Lawson, K.A., Meneses, J.J., and Pedersen, R.A. (1991). Clonal analysis of epiblast fate during germ layer formation in the mouse embryo. *Development* 113, 891–911.
- Leber, T. (1869). Über retinitis pigmentosa und angeborene amaurose. *Albrecht Von Graefes Arch Ophthalmol* 15, 1–25.
- Lee, B.C., Kim, M.K., Jang, G., Oh, H.J., Yuda, F., Kim, H.J., Hossein, M.S., Shamim, M.H., Kim, J.J., Kang, S.K., et al. (2005). Dogs cloned from adult somatic cells. *Nature* 436, 641.
- Lee, G., Papapetrou, E.P., Kim, H., Chambers, S.M., Tomishima, M.J., Fasano, C.A., Ganat, Y.M., Menon, J., Shimizu, F., Viale, A., et al. (2009). Modelling pathogenesis and treatment of familial dysautonomia using patient-specific iPSCs. *Nature* 461, 402–406.
- Lefort, N., Feyeux, M., Bas, C., Féraud, O., Bennaceur-Griscelli, A., Tachdjian, G., Peschanski, M., and Perrier, A.L. (2008). Human embryonic stem cells reveal recurrent genomic instability at 20q11.21. *Nat. Biotechnol.* 26, 1364–1366.
- Lefort, N., Perrier, A.L., Laâbi, Y., Varela, C., and Peschanski, M. (2009). Human embryonic stem cells and genomic instability. *Regen Med* 4, 899–909.
- Lesage, S., Durr, A., and Brice, A. (2006). LRRK2 , gène majeur de la maladie de Parkinson dans les pays du Maghreb. *Médecine/sciences* 22, 470–471.
- Leschik, J., Stefanovic, S., Brinon, B., and Pucéat, M. (2008). Cardiac commitment of primate embryonic stem cells. *Nat Protoc* 3, 1381–1387.
- Leskov, I.B., Klenchin, V.A., Handy, J.W., Whitlock, G.G., Govardovskii, V.I., Bownds, M.D., Lamb, T.D., Pugh, E.N., Jr, and Arshavsky, V.Y. (2000). The gain of rod phototransduction: reconciliation of biochemical and electrophysiological measurements. *Neuron* 27, 525–537.
- Levenstein, M.E., Ludwig, T.E., Xu, R.-H., Llanas, R.A., VanDenHeuvel-Kramer, K., Manning, D., and Thomson, J.A. (2006). Basic fibroblast growth factor support of human embryonic stem cell self-renewal. *Stem Cells* 24, 568–574.
- Li, H., Tierney, C., Wen, L., Wu, J.Y., and Rao, Y. (1997). A single morphogenetic field gives rise to two retina primordia under the influence of the prechordal plate. *Development (Cambridge, England)* 124, 603–615.
- Li, H.O., Zhu, Y.F., Asakawa, M., Kuma, H., Hirata, T., Ueda, Y., Lee, Y.S., Fukumura, M., Iida, A., Kato, A., et al. (2000). A cytoplasmic RNA vector derived from nontransmissible Sendai virus with efficient gene transfer and expression. *J. Virol.* 74, 6564–6569.
- Li, J., Wang, G., Wang, C., Zhao, Y., Zhang, H., Tan, Z., Song, Z., Ding, M., and Deng, H. (2007). MEK/ERK signaling contributes to the maintenance of human embryonic stem cell self-renewal. *Differentiation* 75, 299–307.
- Li, Y., McClintick, J., Zhong, L., Edenberg, H.J., Yoder, M.C., and Chan, R.J. (2005a). Murine embryonic stem cell differentiation is promoted by SOCS-3 and inhibited by the zinc finger transcription factor Klf4. *Blood* 105, 635–637.

- Li, Y., Powell, S., Brunette, E., Lebkowski, J., and Mandalam, R. (2005b). Expansion of human embryonic stem cells in defined serum-free medium devoid of animal-derived products. *Biotechnol. Bioeng.* *91*, 688–698.
- Li, Y.N., Matsui, J.I., and Dowling, J.E. (2009). Specificity of the horizontal cell-photoreceptor connections in the zebrafish (*Danio rerio*) retina. *J. Comp. Neurol.* *516*, 442–453.
- Li, Z., Sun, X., Chen, J., Liu, X., Wisely, S.M., Zhou, Q., Renard, J.-P., Leno, G.H., and Engelhardt, J.F. (2006). Cloned ferrets produced by somatic cell nuclear transfer. *Dev. Biol.* *293*, 439–448.
- Lian, Q., Chow, Y., Esteban, M.A., Pei, D., and Tse, H.-F. (2010). Future perspective of induced pluripotent stem cells for diagnosis, drug screening and treatment of human diseases. *Thromb. Haemost.* *104*, 39–44.
- Liang, Y., Liu, Z., Shuai, X., Wang, W., Liu, J., Bi, W., Wang, C., Jing, X., Liu, Y., and Tao, E. (2012). Delivery of cationic polymer-siRNA nanoparticles for gene therapies in neural regeneration. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *421*, 690–695.
- Liao, J.-L., Yu, J., Huang, K., Hu, J., Diemer, T., Ma, Z., Dvash, T., Yang, X.-J., Travis, G.H., Williams, D.S., et al. (2010). Molecular signature of primary retinal pigment epithelium and stem-cell-derived RPE cells. *Hum. Mol. Genet.* *19*, 4229–4238.
- Libby, R.T., and Gould, D.B. (2010). Endoplasmic reticulum stress as a primary pathogenic mechanism leading to age-related macular degeneration. *Adv. Exp. Med. Biol.* *664*, 403–409.
- Lindvall, O., Brundin, P., Widner, H., Rehnström, S., Gustavii, B., Frackowiak, R., Leenders, K.L., Sawle, G., Rothwell, J.C., and Marsden, C.D. (1990a). Grafts of fetal dopamine neurons survive and improve motor function in Parkinson's disease. *Science* *247*, 574–577.
- Lindvall, O., Brundin, P., Widner, H., Rehnström, S., Gustavii, B., Frackowiak, R., Leenders, K.L., Sawle, G., Rothwell, J.C., Marsden, C.D., et al. (1990b). In reply: fetal brain grafts and Parkinson's disease. *Science* *250*, 1435.
- Linker, C., and Stern, C.D. (2004). Neural induction requires BMP inhibition only as a late step, and involves signals other than FGF and Wnt antagonists. *Development* *131*, 5671–5681.
- Lister, R., Pelizzola, M., Kida, Y.S., Hawkins, R.D., Nery, J.R., Hon, G., Antosiewicz-Bourget, J., O'Malley, R., Castanon, R., Klugman, S., et al. (2011). Hotspots of aberrant epigenomic reprogramming in human induced pluripotent stem cells. *Nature* *471*, 68–73.
- Littink, K.W., Van Genderen, M.M., Collin, R.W.J., Roosing, S., De Brouwer, A.P.M., Riemsdijk, F.C.C., Venselaar, H., Thiadens, A.A.H.J., Hoyng, C.B., Rohrschneider, K., et al. (2009). A novel homozygous nonsense mutation in CABP4 causes congenital cone-rod synaptic disorder. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* *50*, 2344–2350.
- Liu, H., Ye, Z., Kim, Y., Sharkis, S., and Jang, Y.-Y. (2010). Generation of endoderm-derived human induced pluripotent stem cells from primary hepatocytes. *Hepatology* *51*, 1810–1819.
- Liu, I.S., Chen, J.D., Ploder, L., Vidgen, D., Van der Kooy, D., Kalnins, V.I., and McInnes, R.R. (1994). Developmental expression of a novel murine homeobox gene (*Chx10*): evidence for roles in determination of the neuroretina and inner nuclear layer. *Neuron* *13*, 377–393.
- Liu, J., Verma, P.J., Evans-Galea, M.V., Delatycki, M.B., Michalska, A., Leung, J., Crombie, D., Sarsero, J.P., Williamson, R., Dottori, M., et al. (2011a). Generation of induced pluripotent stem cell lines from Friedreich ataxia patients. *Stem Cell Rev* *7*, 703–713.

- Liu, S.-P., Fu, R.-H., Huang, Y.-C., Chen, S.-Y., Chien, Y.-J., Hsu, C.Y., Tsai, C.-H., Shyu, W.-C., and Lin, S.-Z. (2011b). Induced pluripotent stem (iPS) cell research overview. *Cell Transplant* 20, 15–19.
- Livingstone, M., and Hubel, D. (1988). Segregation of form, color, movement, and depth: anatomy, physiology, and perception. *Science* 240, 740–749.
- Lloyd, R.I. (1940). Variations in the Development and Regression of Bergmeister's Papilla and the Hyaloid Artery. *Trans Am Ophthalmol Soc* 38, 326–332.
- Loh, Y.-H., Agarwal, S., Park, I.-H., Urbach, A., Huo, H., Heffner, G.C., Kim, K., Miller, J.D., Ng, K., and Daley, G.Q. (2009). Generation of induced pluripotent stem cells from human blood. *Blood* 113, 5476–5479.
- López, R., López-Gallardo, M., Busturia, I., Anezary, L., and Prada, C. (2005). Spatial and temporal patterns of growth and differentiation of cone oil droplets in the chick retina. *J. Neurosci. Res.* 79, 401–411.
- Lotery, A.J., Jacobson, S.G., Fishman, G.A., Weleber, R.G., Fulton, A.B., Namperumalsamy, P., Héon, E., Levin, A.V., Grover, S., Rosenow, J.R., et al. (2001). Mutations in the CRB1 gene cause Leber congenital amaurosis. *Arch. Ophthalmol.* 119, 415–420.
- Lotery, A.J., Namperumalsamy, P., Jacobson, S.G., Weleber, R.G., Fishman, G.A., Musarella, M.A., Hoyt, C.S., Héon, E., Levin, A., Jan, J., et al. (2000). Mutation analysis of 3 genes in patients with Leber congenital amaurosis. *Arch. Ophthalmol.* 118, 538–543.
- Lowe, D.G., Dizhoor, A.M., Liu, K., Gu, Q., Spencer, M., Laura, R., Lu, L., and Hurley, J.B. (1995). Cloning and expression of a second photoreceptor-specific membrane retina guanylyl cyclase (RetGC), RetGC-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92, 5535–5539.
- Lowry, W.E., Richter, L., Yachechko, R., Pyle, A.D., Tchieu, J., Sridharan, R., Clark, A.T., and Plath, K. (2008). Generation of human induced pluripotent stem cells from dermal fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 2883–2888.
- Lu, B., Malcuit, C., Wang, S., Girman, S., Francis, P., Lemieux, L., Lanza, R., and Lund, R. (2009). Long-term safety and function of RPE from human embryonic stem cells in preclinical models of macular degeneration. *Stem Cells* 27, 2126–2135.
- Ludwig, T.E., Levenstein, M.E., Jones, J.M., Berggren, W.T., Mitchen, E.R., Frane, J.L., Crandall, L.J., Daigh, C.A., Conard, K.R., Piekarczyk, M.S., et al. (2006). Derivation of human embryonic stem cells in defined conditions. *Nat. Biotechnol.* 24, 185–187.
- Lujan, E., Chanda, S., Ahlenius, H., Südhof, T.C., and Wernig, M. (2012). Direct conversion of mouse fibroblasts to self-renewing, tripotent neural precursor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, 2527–2532.
- Lund, R.D., Wang, S., Klimanskaya, I., Holmes, T., Ramos-Kelsey, R., Lu, B., Girman, S., Bischoff, N., Sauv e, Y., and Lanza, R. (2006). Human embryonic stem cell-derived cells rescue visual function in dystrophic RCS rats. *Cloning Stem Cells* 8, 189–199.
- Lwigale, P.Y., and Bronner-Fraser, M. (2009). Semaphorin3A/neuropilin-1 signaling acts as a molecular switch regulating neural crest migration during cornea development. *Dev. Biol.* 336, 257–265.
- Lwigale, P.Y., Cressy, P.A., and Bronner-Fraser, M. (2005). Corneal keratocytes retain neural crest progenitor cell properties. *Dev. Biol.* 288, 284–293.

- Ma, W., Yan, R.-T., Li, X., and Wang, S.-Z. (2009). Reprogramming RPE to differentiate towards retinal neurons with Sox2. *Stem Cells* 27, 1376–1387.
- Macarthur, C.C., Fontes, A., Ravinder, N., Kuninger, D., Kaur, J., Bailey, M., Taliana, A., Vemuri, M.C., and Lieu, P.T. (2012). Generation of human-induced pluripotent stem cells by a nonintegrating RNA Sendai virus vector in feeder-free or xeno-free conditions. *Stem Cells Int* 2012, 564612.
- Macdonald, R., Barth, K.A., Xu, Q., Holder, N., Mikkola, I., and Wilson, S.W. (1995). Midline signalling is required for Pax gene regulation and patterning of the eyes. *Development* 121, 3267–3278.
- MacNeil, M.A., and Masland, R.H. (1998). Extreme diversity among amacrine cells: implications for function. *Neuron* 20, 971–982.
- Maeda, A., Maeda, T., Golczak, M., Chou, S., Desai, A., Hoppel, C.L., Matsuyama, S., and Palczewski, K. (2009). Involvement of All-trans-retinal in Acute Light-induced Retinopathy of Mice. *Journal of Biological Chemistry* 284, 15173–15183.
- Maeda, A., Maeda, T., Golczak, M., and Palczewski, K. (2008). Retinopathy in Mice Induced by Disrupted All-trans-retinal Clearance. *Journal of Biological Chemistry* 283, 26684–26693.
- Maeda, T., Imanishi, Y., and Palczewski, K. (2003). Rhodopsin phosphorylation: 30 years later. *Prog Retin Eye Res* 22, 417–434.
- Magoon, E.H., and Robb, R.M. (1981). Development of myelin in human optic nerve and tract. A light and electron microscopic study. *Arch. Ophthalmol.* 99, 655–659.
- Maguire, A.M., High, K.A., Auricchio, A., Wright, J.F., Pierce, E.A., Testa, F., Mingozzi, F., Bencicelli, J.L., Ying, G., 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, 1597–1605.
- 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., et al. (2008). Safety and efficacy of gene transfer for Leber’s congenital amaurosis. *N. Engl. J. Med.* 358, 2240–2248.
- Maherali, N., and Hochedlinger, K. (2008). Guidelines and techniques for the generation of induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 3, 595–605.
- Mahroo, O.A.R., and Lamb, T.D. (2012). Slowed recovery of human photopic ERG a-wave amplitude following intense bleaches: a slowing of cone pigment regeneration? *Doc Ophthalmol* 125, 137–147.
- Makino, C.L., Wen, X.H., and Lem, J. (2003). Piecing together the timetable for visual transduction with transgenic animals. *Curr. Opin. Neurobiol.* 13, 404–412.
- Mallanna, S.K., and Rizzino, A. (2010). Emerging roles of microRNAs in the control of embryonic stem cells and the generation of induced pluripotent stem cells. *Dev. Biol.* 344, 16–25.
- Mallon, B.S., Park, K.-Y., Chen, K.G., Hamilton, R.S., and McKay, R.D.G. (2006). Toward xeno-free culture of human embryonic stem cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 38, 1063–1075.
- Marc, R.E., and Jones, B.W. (2002). Molecular phenotyping of retinal ganglion cells. *J. Neurosci.* 22, 413–427.
- Marchetto, M.C., Brennand, K.J., Boyer, L.F., and Gage, F.H. (2011). Induced pluripotent stem cells (iPSCs) and neurological disease modeling: progress and promises. *Hum. Mol. Genet.* 20, R109–115.



- Marchetto, M.C.N., Carromeu, C., Acab, A., Yu, D., Yeo, G.W., Mu, Y., Chen, G., Gage, F.H., and Muotri, A.R. (2010). A model for neural development and treatment of Rett syndrome using human induced pluripotent stem cells. *Cell* *143*, 527–539.
- Mardon, G., Solomon, N.M., and Rubin, G.M. (1994). *dachshund* encodes a nuclear protein required for normal eye and leg development in *Drosophila*. *Development* *120*, 3473–3486.
- Mariani, A.P. (1990). Amacrine cells of the rhesus monkey retina. *J. Comp. Neurol.* *301*, 382–400.
- Marieb, E., and Hoehn, K. (2010). *Anatomie et physiologie humaine 8e + eText* (Pearson).
- Marlhens, F., Bareil, C., Griffoin, J.M., Zrenner, E., Amalric, P., Eliaou, C., Liu, S.Y., Harris, E., Redmond, T.M., Arnaud, B., et al. (1997). Mutations in RPE65 cause Leber's congenital amaurosis. *Nat. Genet.* *17*, 139–141.
- Marmorstein, A.D. (2001). The polarity of the retinal pigment epithelium. *Traffic* *2*, 867–872.
- Marmorstein, A.D., Finnemann, S.C., Bonilha, V.L., and Rodriguez-Boulan, E. (1998). Morphogenesis of the retinal pigment epithelium: toward understanding retinal degenerative diseases. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *857*, 1–12.
- Marquardt, T., and Gruss, P. (2002). Generating neuronal diversity in the retina: one for nearly all. *Trends Neurosci.* *25*, 32–38.
- Marro, S., Pang, Z.P., Yang, N., Tsai, M.-C., Qu, K., Chang, H.Y., Südhof, T.C., and Wernig, M. (2011). Direct lineage conversion of terminally differentiated hepatocytes to functional neurons. *Cell Stem Cell* *9*, 374–382.
- Marson, A., Levine, S.S., Cole, M.F., Frampton, G.M., Brambrink, T., Johnstone, S., Guenther, M.G., Johnston, W.K., Wernig, M., Newman, J., et al. (2008). Connecting microRNA genes to the core transcriptional regulatory circuitry of embryonic stem cells. *Cell* *134*, 521–533.
- Marteyn, A., Maury, Y., Gauthier, M.M., Lecuyer, C., Vernet, R., Denis, J.A., Pietu, G., Peschanski, M., and Martinat, C. (2011). Mutant human embryonic stem cells reveal neurite and synapse formation defects in type 1 myotonic dystrophy. *Cell Stem Cell* *8*, 434–444.
- Martí, E., Takada, R., Bumcrot, D.A., Sasaki, H., and McMahon, A.P. (1995). Distribution of Sonic hedgehog peptides in the developing chick and mouse embryo. *Development* *121*, 2537–2547.
- Martin, G.R. (1981). Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *78*, 7634–7638.
- Martínez-Morales, J.R., Rodrigo, I., and Bovolenta, P. (2004). Eye development: a view from the retina pigmented epithelium. *Bioessays* *26*, 766–777.
- Masland, R.H. (1988). Amacrine cells. *Trends Neurosci.* *11*, 405–410.
- Masland, R.H. (2001). Neuronal diversity in the retina. *Curr. Opin. Neurobiol.* *11*, 431–436.
- Masland, R.H. (2012). The tasks of amacrine cells. *Vis. Neurosci.* *29*, 3–9.
- Massé, K., Bhamra, S., Eason, R., Dale, N., and Jones, E.A. (2007). Purine-mediated signalling triggers eye development. *Nature* *449*, 1058–1062.

- Mata, N.L., Radu, R.A., Clemmons, R.C., and Travis, G.H. (2002). Isomerization and oxidation of vitamin a in cone-dominant retinas: a novel pathway for visual-pigment regeneration in daylight. *Neuron* 36, 69–80.
- Mataftsi, A., Schorderet, D.F., Chachoua, L., Boussalah, M., Nouri, M.T., Barthelmes, D., Borruat, F.-X., and Munier, F.L. (2007). Novel TULP1 mutation causing leber congenital amaurosis or early onset retinal degeneration. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 48, 5160–5167.
- Mateizel, I., De Temmerman, N., Ullmann, U., Cauffman, G., Sermon, K., Van de Velde, H., De Rycke, M., Degreef, E., Devroey, P., Liebaers, I., et al. (2006). Derivation of human embryonic stem cell lines from embryos obtained after IVF and after PGD for monogenic disorders. *Hum. Reprod.* 21, 503–511.
- Maurice, D.M. (1957). The structure and transparency of the cornea. *J Physiol* 136, 263–286.1.
- Mayshar, Y., Ben-David, U., Lavon, N., Biancotti, J.-C., Yakir, B., Clark, A.T., Plath, K., Lowry, W.E., and Benvenisty, N. (2010). Identification and classification of chromosomal aberrations in human induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 7, 521–531.
- McBee, J.K., Palczewski, K., Baehr, W., and Pepperberg, D.R. (2001). Confronting complexity: the interlink of phototransduction and retinoid metabolism in the vertebrate retina. *Prog Retin Eye Res* 20, 469–529.
- McLeod, D.S., and Luty, G.A. (1994). High-resolution histologic analysis of the human choroidal vasculature. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 35, 3799–3811.
- McNeish, J. (2004). Embryonic stem cells in drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* 3, 70–80.
- McNeish, J., Roach, M., Hambor, J., Mather, R.J., Weibley, L., Lazzaro, J., Gazard, J., Schwarz, J., Volkmann, R., Machacek, D., et al. (2010). High-throughput screening in embryonic stem cell-derived neurons identifies potentiators of alpha-amino-3-hydroxyl-5-methyl-4-isoxazolepropionate-type glutamate receptors. *J. Biol. Chem.* 285, 17209–17217.
- MEDAWAR, P.B. (1948). Immunity to homologous grafted skin; the fate of skin homografts transplanted to the brain, to subcutaneous tissue, and to the anterior chamber of the eye. *Br J Exp Pathol* 29, 58–69.
- Melillo, P., Pecchia, L., Testa, F., Rossi, S., Bennett, J., and Simonelli, F. (2012). Pupillometric analysis for assessment of gene therapy in Leber Congenital Amaurosis patients. *Biomedical Engineering Online* 11, 40.
- Menasché, P. (2008a). Cardiac cell therapy trials: chronic myocardial infarction and congestive heart failure. *J Cardiovasc Transl Res* 1, 201–206.
- Menasché, P. (2008b). Current status and future prospects for cell transplantation to prevent congestive heart failure. *Semin. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 20, 131–137.
- Meng, L., Ely, J.J., Stouffer, R.L., and Wolf, D.P. (1997). Rhesus monkeys produced by nuclear transfer. *Biol. Reprod.* 57, 454–459.
- Menger, N., and Wässle, H. (2000). Morphological and physiological properties of the A17 amacrine cell of the rat retina. *Vis. Neurosci.* 17, 769–780.
- Mercader, A., Valbuena, D., and Simón, C. (2006). Human embryo culture. *Meth. Enzymol.* 420, 3–18.

- Metcalfe, D. (2007). Concise Review: Hematopoietic Stem Cells and Tissue Stem Cells: Current Concepts and Unanswered Questions. *STEM CELLS* 25, 2390–2395.
- Meulemans, D., and Bronner-Fraser, M. (2004). Gene-regulatory interactions in neural crest evolution and development. *Dev. Cell* 7, 291–299.
- Meyer, J.S., Howden, S.E., Wallace, K.A., Verhoeven, A.D., Wright, L.S., Capowski, E.E., Pinilla, I., Martin, J.M., Tian, S., Stewart, R., et al. (2011). Optic vesicle-like structures derived from human pluripotent stem cells facilitate a customized approach to retinal disease treatment. *Stem Cells* 29, 1206–1218.
- Meyer, J.S., Shearer, R.L., Capowski, E.E., Wright, L.S., Wallace, K.A., McMillan, E.L., Zhang, S.-C., and Gamm, D.M. (2009). Modeling early retinal development with human embryonic and induced pluripotent stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 16698–16703.
- Mihelec, M., Pearson, R.A., Robbie, S.J., Buch, P.K., Azam, S.A., Bainbridge, J.W.B., Smith, A.J., and Ali, R.R. (2011). Long-term preservation of cones and improvement in visual function following gene therapy in a mouse model of leber congenital amaurosis caused by guanylate cyclase-1 deficiency. *Hum. Gene Ther.* 22, 1179–1190.
- Mikkelsen, T.S., Hanna, J., Zhang, X., Ku, M., Wernig, M., Schorderet, P., Bernstein, B.E., Jaenisch, R., Lander, E.S., and Meissner, A. (2008). Dissecting direct reprogramming through integrative genomic analysis. *Nature* 454, 49–55.
- Mikkola, M., Olsson, C., Palgi, J., Ustinov, J., Palomaki, T., Horelli-Kuitunen, N., Knuutila, S., Lundin, K., Otonkoski, T., and Tuuri, T. (2006). Distinct differentiation characteristics of individual human embryonic stem cell lines. *BMC Dev. Biol.* 6, 40.
- Milam, A.H., Barakat, M.R., Gupta, N., Rose, L., Aleman, T.S., Pianta, M.J., Cideciyan, A.V., Sheffield, V.C., Stone, E.M., and Jacobson, S.G. (2003). Clinicopathologic effects of mutant GUCY2D in Leber congenital amaurosis. *Ophthalmology* 110, 549–558.
- Mirzayans, F., Pearce, W.G., MacDonald, I.M., and Walter, M.A. (1995). Mutation of the PAX6 gene in patients with autosomal dominant keratitis. *Am. J. Hum. Genet.* 57, 539–548.
- Mitchell, K.J. (2011). The genetics of neurodevelopmental disease. *Current Opinion in Neurobiology* 21, 197–203.
- Mitne-Neto, M., Machado-Costa, M., Marchetto, M.C.N., Bengtson, M.H., Joazeiro, C.A., Tsuda, H., Bellen, H.J., Silva, H.C.A., Oliveira, A.S.B., Lazar, M., et al. (2011). Downregulation of VAPB expression in motor neurons derived from induced pluripotent stem cells of ALS8 patients. *Hum. Mol. Genet.* 20, 3642–3652.
- Miyazaki, T., Futaki, S., Hasegawa, K., Kawasaki, M., Sanzen, N., Hayashi, M., Kawase, E., Sekiguchi, K., Nakatsuji, N., and Suemori, H. (2008). Recombinant human laminin isoforms can support the undifferentiated growth of human embryonic stem cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 375, 27–32.
- Miyazono, S., Shimauchi-Matsukawa, Y., Tachibanaki, S., and Kawamura, S. (2008). Highly efficient retinal metabolism in cones. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105, 16051–16056.
- Miyoshi, N., Ishii, H., Nagano, H., Haraguchi, N., Dewi, D.L., Kano, Y., Nishikawa, S., Tanemura, M., Mimori, K., Tanaka, F., et al. (2011). Reprogramming of mouse and human cells to pluripotency using mature microRNAs. *Cell Stem Cell* 8, 633–638.

- Moiseyev, G., Chen, Y., Takahashi, Y., Wu, B.X., and Ma, J.-X. (2005). RPE65 is the isomerohydrolase in the retinoid visual cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *102*, 12413–12418.
- Moiseyev, G., Takahashi, Y., Chen, Y., Gentleman, S., Redmond, T.M., Crouch, R.K., and Ma, J.-X. (2006). RPE65 is an iron(II)-dependent isomerohydrolase in the retinoid visual cycle. *J. Biol. Chem.* *281*, 2835–2840.
- Molday, R.S., and Molday, L.L. (1998). Molecular properties of the cGMP-gated channel of rod photoreceptors. *Vision Res.* *38*, 1315–1323.
- Moon, S.Y., Park, Y.B., Kim, D.-S., Oh, S.K., and Kim, D.-W. (2006). Generation, culture, and differentiation of human embryonic stem cells for therapeutic applications. *Mol. Ther.* *13*, 5–14.
- Moore, K.A., and Lemischka, I.R. (2006). Stem cells and their niches. *Science* *311*, 1880–1885.
- Moore, K.B., Mood, K., Daar, I.O., and Moody, S.A. (2004). Morphogenetic movements underlying eye field formation require interactions between the FGF and ephrinB1 signaling pathways. *Dev. Cell* *6*, 55–67.
- Morgan, T.H. (1901). Regeneration and liability to injury. *Science* *14*, 235–248.
- Morimura, H., Fishman, G.A., Grover, S.A., Fulton, A.B., Berson, E.L., and Dryja, T.P. (1998). Mutations in the RPE65 gene in patients with autosomal recessive retinitis pigmentosa or leber congenital amaurosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *95*, 3088–3093.
- Morris, M.B., Dastmalchi, S., and Church, W.B. (2009). Rhodopsin: structure, signal transduction and oligomerisation. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *41*, 721–724.
- Morrison, S.J., Prowse, K.R., Ho, P., and Weissman, I.L. (1996). Telomerase activity in hematopoietic cells is associated with self-renewal potential. *Immunity* *5*, 207–216.
- Mostoslavsky, G. (2012). Concise review: The magic act of generating induced pluripotent stem cells: many rabbits in the hat. *Stem Cells* *30*, 28–32.
- Müller, F., Rohrer, H., and Vogel-Höpker, A. (2007). Bone morphogenetic proteins specify the retinal pigment epithelium in the chick embryo. *Development* *134*, 3483–3493.
- Müller, W.A. (1997). *Developmental Biology* (Springer).
- Mukherjee, P.K., Marcheselli, V.L., De Rivero Vaccari, J.C., Gordon, W.C., Jackson, F.E., and Bazan, N.G. (2007). Photoreceptor outer segment phagocytosis attenuates oxidative stress-induced apoptosis with concomitant neuroprotectin D1 synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *104*, 13158–13163.
- Muniz, A., Villazana-Espinoza, E.T., Hatch, A.L., Trevino, S.G., Allen, D.M., and Tsin, A.T.C. (2007). A novel cone visual cycle in the cone-dominated retina. *Experimental Eye Research* *85*, 175–184.
- Nagaoka, M., Si-Tayeb, K., Akaike, T., and Duncan, S.A. (2010). Culture of human pluripotent stem cells using completely defined conditions on a recombinant E-cadherin substratum. *BMC Dev. Biol.* *10*, 60.
- Najmabadi, H., Hu, H., Garshasbi, M., Zemojtel, T., Abedini, S.S., Chen, W., Hosseini, M., Behjati, F., Haas, S., Jamali, P., et al. (2011). Deep sequencing reveals 50 novel genes for recessive cognitive disorders. *Nature* *478*, 57–63.

- Nakagawa, M., Koyanagi, M., Tanabe, K., Takahashi, K., Ichisaka, T., Aoi, T., Okita, K., Mochiduki, Y., Takizawa, N., and Yamanaka, S. (2008). Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat. Biotechnol.* *26*, 101–106.
- Nakamura-Ishizu, A., and Suda, T. (2012). Hematopoietic stem cell niche: An interplay among a repertoire of multiple functional niches. *Biochim. Biophys. Acta.*
- Nakanishi, S. (1992). Molecular diversity of glutamate receptors and implications for brain function. *Science* *258*, 597–603.
- Nakano, T., Ando, S., Takata, N., Kawada, M., Muguruma, K., Sekiguchi, K., Saito, K., Yonemura, S., Eiraku, M., and Sasai, Y. (2012). Self-formation of optic cups and storable stratified neural retina from human ESCs. *Cell Stem Cell* *10*, 771–785.
- Nakayama, A., Nguyen, M.T., Chen, C.C., Opdecamp, K., Hodgkinson, C.A., and Arnheiter, H. (1998). Mutations in microphthalmia, the mouse homolog of the human deafness gene MITF, affect neuroepithelial and neural crest-derived melanocytes differently. *Mech. Dev.* *70*, 155–166.
- Nakayama, M. (2009). Cell Therapy Using Induced Pluripotent Stem (iPS) Cells Meets Next-Next Generation DNA Sequencing Technology. *Curr. Genomics* *10*, 303–305.
- Nandrot, E.F., Anand, M., Almeida, D., Atabai, K., Sheppard, D., and Finnemann, S.C. (2007). Essential role for MFG-E8 as ligand for alphavbeta5 integrin in diurnal retinal phagocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *104*, 12005–12010.
- Nandrot, E.F., Kim, Y., Brodie, S.E., Huang, X., Sheppard, D., and Finnemann, S.C. (2004). Loss of synchronized retinal phagocytosis and age-related blindness in mice lacking alphavbeta5 integrin. *J. Exp. Med.* *200*, 1539–1545.
- Narsinh, K.H., Jia, F., Robbins, R.C., Kay, M.A., Longaker, M.T., and Wu, J.C. (2011). Generation of adult human induced pluripotent stem cells using nonviral minicircle DNA vectors. *Nat Protoc* *6*, 78–88.
- Natarajan, T.G., Ganesan, N., and Fitzgerald, K.T. (2010). Cancer stem cells and markers: new model of tumorigenesis with therapeutic implications. *Cancer Biomark* *9*, 65–99.
- Nathans, J., Piantanida, T.P., Eddy, R.L., Shows, T.B., and Hogness, D.S. (1986a). Molecular genetics of inherited variation in human color vision. *Science* *232*, 203–210.
- Nathans, J., Thomas, D., and Hogness, D.S. (1986b). Molecular genetics of human color vision: the genes encoding blue, green, and red pigments. *Science* *232*, 193–202.
- Naujok, O., Kaldrack, J., Taivankhuu, T., Jörns, A., and Lenzen, S. (2010). Selective removal of undifferentiated embryonic stem cells from differentiation cultures through HSV1 thymidine kinase and ganciclovir treatment. *Stem Cell Rev* *6*, 450–461.
- Nawy, S., and Jahr, C.E. (1991). cGMP-gated conductance in retinal bipolar cells is suppressed by the photoreceptor transmitter. *Neuron* *7*, 677–683.
- Neitz, J., and Neitz, M. (2011). The genetics of normal and defective color vision. *Vision Research* *51*, 633–651.
- Nelson, R., Famiglietti, E.V., and Kolb, H. (1978). Intracellular staining reveals different levels of stratification for on- and off-center ganglion cells in cat retina. *J Neurophysiol* *41*, 472–483.
- Nelson, R., and Kolb, H. (1984). Amacrine cells in scotopic vision. *Ophthalmic Res.* *16*, 21–26.

- Nelson, R., and Kolb, H. (1985). A17: a broad-field amacrine cell in the rod system of the cat retina. *J. Neurophysiol.* *54*, 592–614.
- Nguyen, H.N., Byers, B., Cord, B., Shcheglovitov, A., Byrne, J., Gujar, P., Kee, K., Schüle, B., Dolmetsch, R.E., Langston, W., et al. (2011). LRRK2 mutant iPSC-derived DA neurons demonstrate increased susceptibility to oxidative stress. *Cell Stem Cell* *8*, 267–280.
- Nguyen, M., and Arnheiter, H. (2000). Signaling and transcriptional regulation in early mammalian eye development: a link between FGF and MITF. *Development* *127*, 3581–3591.
- Nichols, J., and Smith, A. (2012). Pluripotency in the embryo and in culture. *Cold Spring Harb Perspect Biol* *4*.
- Nichols, J., Zevnik, B., Anastassiadis, K., Niwa, H., Klewe-Nebenius, D., Chambers, I., Schöler, H., and Smith, A. (1998). Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell* *95*, 379–391.
- Nichols, L.L., 2nd, Alur, R.P., Boobalan, E., Sergeev, Y.V., Caruso, R.C., Stone, E.M., Swaroop, A., Johnson, M.A., and Brooks, B.P. (2010). Two novel CRX mutant proteins causing autosomal dominant Leber congenital amaurosis interact differently with NRL. *Hum. Mutat.* *31*, E1472–1483.
- Nickla, D.L., and Wallman, J. (2010). The multifunctional choroid. *Progress in Retinal and Eye Research* *29*, 144–168.
- Nikas, G., Ao, A., Winston, R.M., and Handyside, A.H. (1996). Compaction and surface polarity in the human embryo in vitro. *Biol. Reprod.* *55*, 32–37.
- Nistor, G., Seiler, M.J., Yan, F., Ferguson, D., and Keirstead, H.S. (2010). Three-dimensional early retinal progenitor 3D tissue constructs derived from human embryonic stem cells. *J. Neurosci. Methods* *190*, 63–70.
- Niwa, H., Toyooka, Y., Shimosato, D., Strumpf, D., Takahashi, K., Yagi, R., and Rossant, J. (2005). Interaction between Oct3/4 and Cdx2 determines trophoblast differentiation. *Cell* *123*, 917–929.
- Noll, M. (1993). Evolution and role of Pax genes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* *3*, 595–605.
- Nomura, A., Shigemoto, R., Nakamura, Y., Okamoto, N., Mizuno, N., and Nakanishi, S. (1994). Developmentally regulated postsynaptic localization of a metabotropic glutamate receptor in rat rod bipolar cells. *Cell* *77*, 361–369.
- Nornes, H.O., Dressler, G.R., Knapik, E.W., Deutsch, U., and Gruss, P. (1990). Spatially and temporally restricted expression of Pax2 during murine neurogenesis. *Development* *109*, 797–809.
- O’Driscoll, C. (2004). A virtual space odyssey. *Nature Horizon: Charting Chemical Space*.
- O’Rahilly, R. (1983). The timing and sequence of events in the development of the human eye and ear during the embryonic period proper. *Anat. Embryol.* *168*, 87–99.
- O’Rahilly, R., and Müller, F. (2008). Significant features in the early prenatal development of the human brain. *Ann. Anat.* *190*, 105–118.
- Oesch, N.W., Wade Kothmann, W., and Diamond, J.S. (2011). Illuminating synapses and circuitry in the retina. *Current Opinion in Neurobiology* *21*, 238–244.
- Ogino, H., and Yasuda, K. (2000). Sequential activation of transcription factors in lens induction. *Dev. Growth Differ.* *42*, 437–448.

- Oh, S.-I., Lee, C.K., Cho, K.J., Lee, K.-O., Cho, S.-G., and Hong, S. (2012). Technological Progress in Generation of Induced Pluripotent Stem Cells for Clinical Applications. *The Scientific World Journal* 2012, 1–10.
- Oh, S.K., Kim, H.S., Park, Y.B., Seol, H.W., Kim, Y.Y., Cho, M.S., Ku, S.Y., Choi, Y.M., Kim, D.-W., and Moon, S.Y. (2005). Methods for expansion of human embryonic stem cells. *Stem Cells* 23, 605–609.
- Ohsawa, R., and Kageyama, R. (2008). Regulation of retinal cell fate specification by multiple transcription factors. *Brain Res.* 1192, 90–98.
- Ohyama, M. (2007). Hair follicle bulge: a fascinating reservoir of epithelial stem cells. *J. Dermatol. Sci.* 46, 81–89.
- Okita, K., Ichisaka, T., and Yamanaka, S. (2007). Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* 448, 313–317.
- Okita, K., Nakagawa, M., Hyenjong, H., Ichisaka, T., and Yamanaka, S. (2008). Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors. *Science* 322, 949–953.
- Okumura-Nakanishi, S., Saito, M., Niwa, H., and Ishikawa, F. (2005). Oct-3/4 and Sox2 regulate Oct-3/4 gene in embryonic stem cells. *J. Biol. Chem.* 280, 5307–5317.
- Oliveira, L., Miniou, P., Viegas-Pequignot, E., Rozet, J.-M., Dollfus, H., and Pittler, S.J. (1994). Human Retinal Guanylate Cyclase (GUC2D) Maps to Chromosome 17p13.1. *Genomics* 22, 478–481.
- Oliver, G., Mailhos, A., Wehr, R., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., and Gruss, P. (1995). Six3, a murine homologue of the sine oculis gene, demarcates the most anterior border of the developing neural plate and is expressed during eye development. *Development* 121, 4045–4055.
- Olson, M.D. (1979). Development of Bruch's membrane in the chick: an electron microscopic study. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 18, 329–338.
- Onder, T.T., and Daley, G.Q. (2012). New lessons learned from disease modeling with induced pluripotent stem cells. *Current Opinion in Genetics & Development*.
- Onwochei, B.C., Simon, J.W., Bateman, J.B., Couture, K.C., and Mir, E. (2000). Ocular colobomata. *Surv Ophthalmol* 45, 175–194.
- Osakada, F., Ikeda, H., Mandai, M., Wataya, T., Watanabe, K., Yoshimura, N., Akaike, A., Akaike, A., Sasai, Y., and Takahashi, M. (2008). Toward the generation of rod and cone photoreceptors from mouse, monkey and human embryonic stem cells. *Nat. Biotechnol.* 26, 215–224.
- Osakada, F., Ikeda, H., Sasai, Y., and Takahashi, M. (2009a). Stepwise differentiation of pluripotent stem cells into retinal cells. *Nat Protoc* 4, 811–824.
- Osakada, F., Jin, Z.-B., Hiram, Y., Ikeda, H., Danjyo, T., Watanabe, K., Sasai, Y., and Takahashi, M. (2009b). In vitro differentiation of retinal cells from human pluripotent stem cells by small-molecule induction. *J. Cell. Sci.* 122, 3169–3179.
- Osterberg, G. (1935). Topography of the layer of rods and cones in the human retina. *Acta Ophthalmol Suppl.* 6, 1–103.
- Ostrer, H. (2011). Changing the game with whole exome sequencing. *Clin. Genet.* 80, 101–103.

- Othman, H., Saadat, I., Farvardin-Jahromi, M., and Saadat, M. (2012). Susceptibility to exudative age-related macular degeneration and three genetic polymorphisms of glutathione S-transferase Z1 (GSTZ1). *Eur J Ophthalmol* 22, 431–435.
- Owen, M. (1988). Marrow stromal stem cells. *J. Cell Sci. Suppl.* 10, 63–76.
- Owen, M., and Friedenstein, A.J. (1988). Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors. *Ciba Found. Symp.* 136, 42–60.
- Palczewski, K. (1997). GTP-binding-protein-coupled receptor kinases--two mechanistic models. *Eur. J. Biochem.* 248, 261–269.
- Palczewski, K. (2012). Chemistry and biology of vision. *J. Biol. Chem.* 287, 1612–1619.
- Pang, J., Chang, B., Kumar, A., Nusinowitz, S., Noorwez, S.M., Li, J., Rani, A., Foster, T.C., Chiodo, V.A., Doyle, T., et al. (2006). Gene Therapy Restores Vision-Dependent Behavior as Well as Retinal Structure and Function in a Mouse Model of RPE65 Leber Congenital Amaurosis. *Molecular Therapy* 13, 565–572.
- Pang, Z.P., Yang, N., Vierbuchen, T., Ostermeier, A., Fuentes, D.R., Yang, T.Q., Citri, A., Sebastiano, V., Marro, S., Südhof, T.C., et al. (2011). Induction of human neuronal cells by defined transcription factors. *Nature* 476, 220–223.
- Pannbacker, R.G. (1973). Control of guanylate cyclase activity in the rod outer segment. *Science* 182, 1138–1140.
- Papayannopoulou, T., and Scadden, D.T. (2008). Stem-cell ecology and stem cells in motion. *Blood* 111, 3923–3930.
- Park, I.-H., Arora, N., Huo, H., Maherali, N., Ahfeldt, T., Shimamura, A., Lensch, M.W., Cowan, C., Hochedlinger, K., and Daley, G.Q. (2008a). Disease-specific induced pluripotent stem cells. *Cell* 134, 877–886.
- Park, I.-H., Zhao, R., West, J.A., Yabuuchi, A., Huo, H., Ince, T.A., Lerou, P.H., Lensch, M.W., and Daley, G.Q. (2008b). Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. *Nature* 451, 141–146.
- Parker, H.G., Kruglyak, L., and Ostrander, E.A. (2006). Molecular genetics: DNA analysis of a putative dog clone. *Nature* 440, E1–2.
- Parker, R.O., and Crouch, R.K. (2010). Retinol dehydrogenases (RDHs) in the visual cycle. *Experimental Eye Research* 91, 788–792.
- Parsons, M.A., Rennie, I.G., Rundle, P.A., Dhingra, S., Mudhar, H., and Singh, A.D. (2005). Congenital hypertrophy of retinal pigment epithelium: a clinico-pathological case report. *Br J Ophthalmol* 89, 920–921.
- Pasadhika, S., Fishman, G.A., Stone, E.M., Lindeman, M., Zelkha, R., Lopez, I., Koenekoop, R.K., and Shahidi, M. (2010). Differential macular morphology in patients with RPE65-, CEP290-, GUCY2D-, and AIPL1-related Leber congenital amaurosis. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 51, 2608–2614.
- Patani, R., Compston, A., Puddifoot, C.A., Wyllie, D.J.A., Hardingham, G.E., Allen, N.D., and Chandran, S. (2009). Activin/Nodal inhibition alone accelerates highly efficient neural conversion from human embryonic stem cells and imposes a caudal positional identity. *PLoS ONE* 4, e7327.



- Patthey, C., and Gunhaga, L. (2011). Specification and regionalisation of the neural plate border. *Eur. J. Neurosci.* *34*, 1516–1528.
- Pawlak, A., Rózanowska, M., Zareba, M., Lamb, L.E., Simon, J.D., and Sarna, T. (2002). Action spectra for the photoconsumption of oxygen by human ocular lipofuscin and lipofuscin extracts. *Arch. Biochem. Biophys.* *403*, 59–62.
- Pawlak, A., Wrona, M., Rózanowska, M., Zareba, M., Lamb, L.E., Roberts, J.E., Simon, J.D., and Sarna, T. (2003). Comparison of the aerobic photoreactivity of A2E with its precursor retinal. *Photochem. Photobiol.* *77*, 253–258.
- Pearson, A.A. (1980). The development of the eyelids. Part I. External features. *J. Anat.* *130*, 33–42.
- Peiffer, I., Barbet, R., Hatzfeld, A., Li, M.-L., and Hatzfeld, J.A. (2010). Optimization of physiological xenofree molecularly defined media and matrices to maintain human embryonic stem cell pluripotency. *Methods Mol. Biol.* *584*, 97–108.
- Peiffer, I., Barbet, R., Zhou, Y.-P., Li, M.-L., Monier, M.-N., Hatzfeld, A., and Hatzfeld, J.A. (2008). Use of xenofree matrices and molecularly-defined media to control human embryonic stem cell pluripotency: effect of low physiological TGF-beta concentrations. *Stem Cells Dev.* *17*, 519–533.
- Peister, A., Mellad, J.A., Larson, B.L., Hall, B.M., Gibson, L.F., and Prockop, D.J. (2004). Adult stem cells from bone marrow (MSCs) isolated from different strains of inbred mice vary in surface epitopes, rates of proliferation, and differentiation potential. *Blood* *103*, 1662–1668.
- Pelikka, M., Tanentzapf, G., Pinto, M., Smith, C., McGlade, C.J., Ready, D.F., and Tepass, U. (2002). Crumbs, the Drosophila homologue of human CRB1/RP12, is essential for photoreceptor morphogenesis. *Nature* *416*, 143–149.
- Pelton, T.A., Bettess, M.D., Lake, J., Rathjen, J., and Rathjen, P.D. (1998). Developmental complexity of early mammalian pluripotent cell populations in vivo and in vitro. *Reprod. Fertil. Dev.* *10*, 535–549.
- Pepe, I.M. (2001). Recent advances in our understanding of rhodopsin and phototransduction. *Prog Retin Eye Res* *20*, 733–759.
- Pera, M.F. (2011). Stem cells: The dark side of induced pluripotency. *Nature* *471*, 46–47.
- Pera, M.F., Reubinoff, B., and Trounson, A. (2000). Human embryonic stem cells. *J. Cell. Sci.* *113* (Pt 1), 5–10.
- Pera, M.F., and Tam, P.P.L. (2010). Extrinsic regulation of pluripotent stem cells. *Nature* *465*, 713–720.
- Pera, M.F., and Trounson, A.O. (2004). Human embryonic stem cells: prospects for development. *Development* *131*, 5515–5525.
- Perrault, I., Hanein, S., Gerard, X., Delphin, N., Fares-Taie, L., Gerber, S., Pelletier, V., Mercé, E., Dollfus, H., Puech, B., et al. (2010). Spectrum of SPATA7 mutations in Leber congenital amaurosis and delineation of the associated phenotype. *Hum. Mutat.* *31*, E1241–1250.
- Perrault, I., Hanein, S., Gerber, S., Barbet, F., Ducroq, D., Dollfus, H., Hamel, C., Dufier, J.-L., Munnich, A., Kaplan, J., et al. (2004). Retinal dehydrogenase 12 (RDH12) mutations in leber congenital amaurosis. *Am. J. Hum. Genet.* *75*, 639–646.

- Perrault, I., Hanein, S., Zanlonghi, X., Serre, V., Nicouleau, M., Defoort-Delhemmes, S., Delphin, N., Fares-Taie, L., Gerber, S., Xerri, O., et al. (2012). Mutations in *NMNAT1* cause Leber congenital amaurosis with early-onset severe macular and optic atrophy. *Nature Genetics*.
- Perrault, I., Rozet, J.M., Calvas, P., Gerber, S., Camuzat, A., Dollfus, H., Châtelin, S., Souied, E., Ghazi, I., Leowski, C., et al. (1996). Retinal-specific guanylate cyclase gene mutations in Leber's congenital amaurosis. *Nat. Genet.* *14*, 461–464.
- Perrault, I., Rozet, J.M., Gerber, S., Ghazi, I., Ducroq, D., Souied, E., Leowski, C., Bonnemaïson, M., Dufier, J.L., Munnich, A., et al. (2000). Spectrum of *retGC1* mutations in Leber's congenital amaurosis. *Eur. J. Hum. Genet.* *8*, 578–582.
- Perrault, I., Rozet, J.M., Gerber, S., Ghazi, I., Leowski, C., Ducroq, D., Souied, E., Dufier, J.L., Munnich, A., and Kaplan, J. (1999a). Leber congenital amaurosis. *Mol. Genet. Metab.* *68*, 200–208.
- Perrault, I., Rozet, J.M., Ghazi, I., Leowski, C., Bonnemaïson, M., Gerber, S., Ducroq, D., Cabot, A., Souied, E., Dufier, J.L., et al. (1999b). Different functional outcome of *RetGC1* and *RPE65* gene mutations in Leber congenital amaurosis. *Am. J. Hum. Genet.* *64*, 1225–1228.
- Perrier, A.L., Tabar, V., Barberi, T., Rubio, M.E., Bruses, J., Topf, N., Harrison, N.L., and Studer, L. (2004). Derivation of midbrain dopamine neurons from human embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *101*, 12543–12548.
- Peschanski, M. (2001). [10 years of substitution therapy for neurodegenerative diseases using fetal neuron grafts: a positive outcome but with questions for the future]. *J. Soc. Biol.* *195*, 51–55.
- Peschanski, M., Hantraye, P., Bachoud-Lévi, A.C., and Césaro, P. (2000). [Therapeutic potential of fetal neuron grafts in neurodegenerative diseases]. *Bull. Acad. Natl. Med.* *184*, 1213–1217; discussion 1218–1220.
- Peters, S., Reinthal, E., Blitgen-Heinecke, P., Bartz-Schmidt, K.-U., and Schraermeyer, U. (2006). Inhibition of lysosomal degradation in retinal pigment epithelium cells induces exocytosis of phagocytic residual material at the basolateral plasma membrane. *Ophthalmic Res.* *38*, 83–88.
- Pfaff, N., Moritz, T., Thum, T., and Cantz, T. (2012). miRNAs involved in the generation, maintenance, and differentiation of pluripotent cells. *J. Mol. Med.* *90*, 747–752.
- Pfisterer, U., Wood, J., Nihlberg, K., Hallgren, O., Bjermer, L., Westergren-Thorsson, G., Lindvall, O., and Parmar, M. (2011). Efficient induction of functional neurons from adult human fibroblasts. *Cell Cycle* *10*, 3311–3316.
- Phillips, C.I., Levy, A.M., Newton, M., and Stokoe, N.L. (1987). Blindness in schoolchildren: importance of heredity, congenital cataract, and prematurity. *Br J Ophthalmol* *71*, 578–584.
- Phillips, M.J., Wallace, K.A., Dickerson, S.J., Miller, M.J., Verhoeven, A.D., Martin, J.M., Wright, L.S., Shen, W., Capowski, E.E., Percin, E.F., et al. (2012). Blood-derived human iPS cells generate optic vesicle-like structures with the capacity to form retinal laminae and develop synapses. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* *53*, 2007–2019.
- Pickering, S.J., Minger, S.L., Patel, M., Taylor, H., Black, C., Burns, C.J., Ekonomou, A., and Braude, P.R. (2005). Generation of a human embryonic stem cell line encoding the cystic fibrosis mutation  $\Delta F508$ , using preimplantation genetic diagnosis. *Reprod. Biomed. Online* *10*, 390–397.
- Pin, J.P., and Duvoisin, R. (1995). The metabotropic glutamate receptors: structure and functions. *Neuropharmacology* *34*, 1–26.

- Pinheiro, P., and Mülle, C. (2006). Kainate receptors. *Cell Tissue Res.* 326, 457–482.
- Pitt, G.A., Collins, F.D., Morton, R.A., and Stok, P. (1955). Studies on rhodopsin. VIII. Retinylidenemethylamine, an indicator yellow analogue. *Biochem. J.* 59, 122–128.
- Pittack, C., Grunwald, G.B., and Reh, T.A. (1997). Fibroblast growth factors are necessary for neural retina but not pigmented epithelium differentiation in chick embryos. *Development* 124, 805–816.
- Pittenger, M.F., Mackay, A.M., Beck, S.C., Jaiswal, R.K., Douglas, R., Mosca, J.D., Moorman, M.A., Simonetti, D.W., Craig, S., and Marshak, D.R. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284, 143–147.
- Plafker, S.M., O’Mealey, G.B., and Szweda, L.I. (2012). Mechanisms for countering oxidative stress and damage in retinal pigment epithelium. *Int Rev Cell Mol Biol* 298, 135–177.
- Plickert, G., Frank, U., and Müller, W.A. (2012). Hydractinia, a pioneering model for stem cell biology and reprogramming somatic cells to pluripotency. *The International Journal of Developmental Biology*.
- Polans, A., Baehr, W., and Palczewski, K. (1996). Turned on by Ca<sup>2+</sup>! The physiology and pathology of Ca<sup>2+</sup>-binding proteins in the retina. *Trends in Neurosciences* 19, 547–554.
- Polejaeva, I.A., Chen, S.H., Vaught, T.D., Page, R.L., Mullins, J., Ball, S., Dai, Y., Boone, J., Walker, S., Ayares, D.L., et al. (2000). Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nature* 407, 86–90.
- Poliakov, E., Gentleman, S., Cunningham, F.X., Jr, Miller-Ihli, N.J., and Redmond, T.M. (2005). Key role of conserved histidines in recombinant mouse beta-carotene 15,15’-monooxygenase-1 activity. *J. Biol. Chem.* 280, 29217–29223.
- Polyak, S.L. (1941). *The retina* (Chicago: University of Chicago Press).
- Porto, F.B.O., Perrault, I., Hicks, D., Rozet, J.-M., Hanoteau, N., Hanein, S., Kaplan, J., and Sahel, J.A. (2002). Prenatal human ocular degeneration occurs in Leber’s congenital amaurosis (LCA2). *J Gene Med* 4, 390–396.
- Porto, F.B.O., Perrault, I., Hicks, D., Rozet, J.-M., Hanoteau, N., Hanein, S., Kaplan, J., and Sahel, J.A. (2003). Prenatal human ocular degeneration occurs in Leber’s Congenital Amaurosis (LCA1 and 2). *Adv. Exp. Med. Biol.* 533, 59–68.
- Prada, C., Puga, J., Pérez-Méndez, L., López, R., and Ramírez, G. (1991). Spatial and Temporal Patterns of Neurogenesis in the Chick Retina. *Eur. J. Neurosci.* 3, 559–569.
- Preising, M.N., Hausotter-Will, N., Solbach, M.C., Friedburg, C., Rüschenhof, F., and Lorenz, B. (2012). Mutations in RD3 are associated with an extremely rare and severe form of early onset retinal dystrophy. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 53, 3463–3472.
- Pritchard, J.F., Jurima-Romet, M., Reimer, M.L.J., Mortimer, E., Rolfe, B., and Cayen, M.N. (2003). Making better drugs: Decision gates in non-clinical drug development. *Nat Rev Drug Discov* 2, 542–553.
- Probst, A.V., Dunleavy, E., and Almouzni, G. (2009). Epigenetic inheritance during the cell cycle. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 192–206.
- Prockop, D.J. (1997). Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* 276, 71–74.

- Psychoyos, D., and Stern, C.D. (1996). Restoration of the organizer after radical ablation of Hensen's node and the anterior primitive streak in the chick embryo. *Development* *122*, 3263–3273.
- Pugh, E.N., Jr, Duda, T., Sitaramayya, A., and Sharma, R.K. (1997). Photoreceptor guanylate cyclases: a review. *Biosci. Rep.* *17*, 429–473.
- Purves, D., Augustine, G., and Albertson, D. (2001a). Chapter 11. Vision: The Eye. Anatomical Distribution of Rods and Cones. In *Neuroscience*, (Sunderland (MA): Sinauer Associates),.
- Purves, D., Augustine, G., and Albertson, D. (2001b). Chapter 11. Vision: The Eye. Functional Specialization of the Rod and Cone Systems. In *Neuroscience*, (Sunderland (MA): Sinauer Associates),.
- Purves, D., Augustine, G., and Albertson, D. (2001c). Chapter 12. Central Visual Pathways. Parallel Streams of Information from Retina to Cortex. In *Neuroscience*, (Sunderland (MA): Sinauer Associates),.
- Quiring, R., Walldorf, U., Kloter, U., and Gehring, W.J. (1994). Homology of the eyeless gene of *Drosophila* to the Small eye gene in mice and Aniridia in humans. *Science* *265*, 785–789.
- Radtke, F., and Clevers, H. (2005). Self-renewal and cancer of the gut: two sides of a coin. *Science* *307*, 1904–1909.
- Railliet, A.-L.-J. (1895). Chapitre II. - Organisation et développement des animaux. In *Traité de zoologie médicale et agricole*, par A. Railliet,... 2e édition..., (Asselin et Houzeau (Paris)),.
- Rajala, K., Hakala, H., Panula, S., Aivio, S., Pihlajamäki, H., Suuronen, R., Hovatta, O., and Skottman, H. (2007). Testing of nine different xeno-free culture media for human embryonic stem cell cultures. *Hum. Reprod.* *22*, 1231–1238.
- Rao, R.R., and Stice, S.L. (2004). Gene expression profiling of embryonic stem cells leads to greater understanding of pluripotency and early developmental events. *Biol. Reprod.* *71*, 1772–1778.
- Rapaport, D.H., Rakic, P., and LaVail, M.M. (1996). Spatiotemporal gradients of cell genesis in the primate retina. *Perspect Dev Neurobiol* *3*, 147–159.
- Ray, H.J., and Niswander, L. (2012). Mechanisms of tissue fusion during development. *Development* *139*, 1701–1711.
- Redmond, T.M., Poliakov, E., Yu, S., Tsai, J.-Y., Lu, Z., and Gentleman, S. (2005). Mutation of key residues of RPE65 abolishes its enzymatic role as isomerohydrolase in the visual cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *102*, 13658–13663.
- Redmond, T.M., Yu, S., Lee, E., Bok, D., Hamasaki, D., Chen, N., Goletz, P., Ma, J.-X., Crouch, R.K., and Pfeifer, K. (1998). Rpe65 is necessary for production of 11-cis-vitamin A in the retinal visual cycle. *Nature Genetics* *20*, 344–351.
- Reubinoff, B.E., Itsykson, P., Turetsky, T., Pera, M.F., Reinhartz, E., Itzik, A., and Ben-Hur, T. (2001). Neural progenitors from human embryonic stem cells. *Nat. Biotechnol.* *19*, 1134–1140.
- Reubinoff, B.E., Pera, M.F., Fong, C.Y., Trounson, A., and Bongso, A. (2000). Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. *Nat. Biotechnol.* *18*, 399–404.
- Rey, A. (2003). [Are stem cells well named?]. *Med Sci (Paris)* *19*, 645.

- Reya, T., Morrison, S.J., Clarke, M.F., and Weissman, I.L. (2001). Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 414, 105–111.
- Rezaie, T., Karimi-Nejad, M.-H., Meshkat, M.-R., Sohbati, S., Karimi-Nejad, R., Najmabadi, H., and Sarfarazi, M. (2007). Genetic screening of leber congenital amaurosis in a large consanguineous Iranian family. *Ophthalmic Genet.* 28, 224–228.
- Rhinn, M., Dierich, A., Le Meur, M., and Ang, S. (1999). Cell autonomous and non-cell autonomous functions of Otx2 in patterning the rostral brain. *Development* 126, 4295–4304.
- Rhinn, M., Dierich, A., Shawlot, W., Behringer, R.R., Le Meur, M., and Ang, S.L. (1998). Sequential roles for Otx2 in visceral endoderm and neuroectoderm for forebrain and midbrain induction and specification. *Development* 125, 845–856.
- Ribelayga, C. (2010). Vertebrate vision: TRP channels in the spotlight. *Curr. Biol.* 20, R278–280.
- Richards, M., Fong, C.-Y., Chan, W.-K., Wong, P.-C., and Bongso, A. (2002). Human feeders support prolonged undifferentiated growth of human inner cell masses and embryonic stem cells. *Nat. Biotechnol.* 20, 933–936.
- Rideout, W.M., 3rd, Eggan, K., and Jaenisch, R. (2001). Nuclear cloning and epigenetic reprogramming of the genome. *Science* 293, 1093–1098.
- Ridge, K.D., Abdulaev, N.G., Sousa, M., and Palczewski, K. (2003). Phototransduction: crystal clear. *Trends Biochem. Sci.* 28, 479–487.
- Rigaudiere, F., and Le Gargasson, J. (2007). Explorations électrophysiologiques sensorielles : électrorétinogramme, électro-oculogramme, potentiels évoqués visuels. [Article 21-046-A-10] 1–23.
- Rivera-Perez, J.A. (2007). Axial specification in mice: ten years of advances and controversies. *J. Cell. Physiol.* 213, 654–660.
- Rizzolo, L.J. (2007). Development and role of tight junctions in the retinal pigment epithelium. *Int. Rev. Cytol.* 258, 195–234.
- De Robertis, E., and Franchi, C.M. (1956). Electron microscope observations on synaptic vesicles in synapses of the retinal rods and cones. *J Biophys Biochem Cytol* 2, 307–318.
- De Robertis, E.M. (2006). Spemann’s organizer and self-regulation in amphibian embryos. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7, 296–302.
- Roberts, J.M., and Forrester, J.V. (1990). Factors affecting the migration and growth of endothelial cells from microvessels of bovine retina. *Exp. Eye Res.* 50, 165–172.
- Rohmann, A., Gotthardt, M., Willnow, T.E., Hammer, R.E., and Herz, J. (1996). Sustained somatic gene inactivation by viral transfer of Cre recombinase. *Nat. Biotechnol.* 14, 1562–1565.
- Rolling, F. (2004). Recombinant AAV-mediated gene transfer to the retina: gene therapy perspectives. *Gene Ther.* 11 Suppl 1, S26–32.
- Rolling, F., Le Meur, G., Stieger, K., Smith, A.J., Weber, M., Deschamps, J.Y., Nivard, D., Mendes-Madeira, A., Provost, N., Péréon, Y., et al. (2006). Gene therapeutic prospects in early onset of severe retinal dystrophy: restoration of vision in RPE65 Briard dogs using an AAV serotype 4 vector that specifically targets the retinal pigmented epithelium. *Bull. Mem. Acad. R. Med. Belg.* 161, 497–508; discussion 508–509.

- Rompani, S.B., and Cepko, C.L. (2008). Retinal progenitor cells can produce restricted subsets of horizontal cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *105*, 192–197.
- Ronquillo, C.C., Bernstein, P.S., and Baehr, W. (2012). Senior-Løken syndrome: A syndromic form of retinal dystrophy associated with nephronophthisis. *Vision Res.*
- Roorda, A., Metha, A.B., Lennie, P., and Williams, D.R. (2001). Packing arrangement of the three cone classes in primate retina. *Vision Research* *41*, 1291–1306.
- Rosenbaum, J. (1929). COLOBOMA OF THE OPTIC NERVE WITH REMAINS OF THE HYALOID ARTERY. *Br J Ophthalmol* *13*, 407–408.
- Rosler, E.S., Fisk, G.J., Ares, X., Irving, J., Miura, T., Rao, M.S., and Carpenter, M.K. (2004). Long-term culture of human embryonic stem cells in feeder-free conditions. *Dev. Dyn.* *229*, 259–274.
- Rowan, S., Chen, C.-M.A., Young, T.L., Fisher, D.E., and Cepko, C.L. (2004). Transdifferentiation of the retina into pigmented cells in ocular retardation mice defines a new function of the homeodomain gene *Chx10*. *Development* *131*, 5139–5152.
- Rubenstein, J.L., and Beachy, P.A. (1998). Patterning of the embryonic forebrain. *Curr. Opin. Neurobiol.* *8*, 18–26.
- Rubin, L., and Haston, K. (2011). Stem cell biology and drug discovery. *BMC Biology* *9*, 42.
- Ruiz, A., Kuehn, M.H., Andorf, J.L., Stone, E., Hageman, G.S., and Bok, D. (2001). Genomic organization and mutation analysis of the gene encoding lecithin retinol acyltransferase in human retinal pigment epithelium. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* *42*, 31–37.
- Ryeom, S.W., Silverstein, R.L., Scotto, A., and Sparrow, J.R. (1996a). Binding of anionic phospholipids to retinal pigment epithelium may be mediated by the scavenger receptor CD36. *J. Biol. Chem.* *271*, 20536–20539.
- Ryeom, S.W., Sparrow, J.R., and Silverstein, R.L. (1996b). CD36 participates in the phagocytosis of rod outer segments by retinal pigment epithelium. *J. Cell. Sci.* *109 ( Pt 2)*, 387–395.
- Saari, J.C. (2012). Vitamin a metabolism in rod and cone visual cycles. *Annu. Rev. Nutr.* *32*, 125–145.
- Saha, K., and Jaenisch, R. (2009). Technical Challenges in Using Human Induced Pluripotent Stem Cells to Model Disease. *Cell Stem Cell* *5*, 584–595.
- Saint-Geniez, M., and D'Amore, P.A. (2004). Development and pathology of the hyaloid, choroidal and retinal vasculature. *Int. J. Dev. Biol.* *48*, 1045–1058.
- Sapolsky, R.J., Hsie, L., Berno, A., Ghandour, G., Mittmann, M., and Fan, J.B. (1999). High-throughput polymorphism screening and genotyping with high-density oligonucleotide arrays. *Genet. Anal.* *14*, 187–192.
- Sarangarajan, R., and Apte, S.P. (2005). Melanization and phagocytosis: implications for age related macular degeneration. *Mol. Vis.* *11*, 482–490.
- Sauer, T., Patel, M., Chan, C.-C., and Tuo, J. (2008). Unfolding the therapeutic potential of chemical chaperones for age-related macular degeneration. *Expert Review of Ophthalmology* *3*, 29–42.
- Saxén, L. (1994). [Hans Spemann, the founder of modern developmental biology]. *Hippokratés (Helsinki)* *11*, 23–33.

Schedl, A., Ross, A., Lee, M., Engelkamp, D., Rashbass, P., Van Heyningen, V., and Hastie, N.D. (1996). Influence of PAX6 gene dosage on development: overexpression causes severe eye abnormalities. *Cell* 86, 71–82.

Scheres, B. (2007). Stem-cell niches: nursery rhymes across kingdoms. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 345–354.

Schwartz, S.D., Hubschman, J.-P., Heilwell, G., Franco-Cardenas, V., Pan, C.K., Ostrick, R.M., Mickunas, E., Gay, R., Klimanskaya, I., and Lanza, R. (2012). Embryonic stem cell trials for macular degeneration: a preliminary report. *Lancet* 379, 713–720.

Seeliger, M.W., Grimm, C., Ståhlberg, F., Friedburg, C., Jaissle, G., Zrenner, E., Guo, H., Remé, C.E., Humphries, P., Hofmann, F., et al. (2001). New views on RPE65 deficiency: the rod system is the source of vision in a mouse model of Leber congenital amaurosis. *Nat. Genet.* 29, 70–74.

Seibler, P., Graziotto, J., Jeong, H., Simunovic, F., Klein, C., and Krainc, D. (2011). Mitochondrial Parkin recruitment is impaired in neurons derived from mutant PINK1 induced pluripotent stem cells. *J. Neurosci.* 31, 5970–5976.

Seiler, A., Oelgeschläger, M., Liebsch, M., Pirow, R., Riebeling, C., Tralau, T., and Luch, A. (2011). Developmental toxicity testing in the 21st century: the sword of Damocles shattered by embryonic stem cell assays? *Arch. Toxicol.* 85, 1361–1372.

Seiler, M.J., Aramant, R.B., Seeliger, M.W., Bragadottir, R., Mahoney, M., and Narfstrom, K. (2009). Functional and structural assessment of retinal sheet allograft transplantation in feline hereditary retinal degeneration. *Vet Ophthalmol* 12, 158–169.

Seiler, M.J., Aramant, R.B., Thomas, B.B., Peng, Q., Satta, S.R., and Keirstead, H.S. (2010a). Visual restoration and transplant connectivity in degenerate rats implanted with retinal progenitor sheets. *Eur. J. Neurosci.* 31, 508–520.

Seiler, M.J., Rao, B., Aramant, R.B., Yu, L., Wang, Q., Kitayama, E., Pham, S., Yan, F., Chen, Z., and Keirstead, H.S. (2010b). Three-dimensional optical coherence tomography imaging of retinal sheet implants in live rats. *J. Neurosci. Methods* 188, 250–257.

Semb, H. (2005). Human embryonic stem cells: origin, properties and applications. *APMIS* 113, 743–750.

Semple-Rowland, S.L., Lee, N.R., Van Hooser, J.P., Palczewski, K., and Baehr, W. (1998). A null mutation in the photoreceptor guanylate cyclase gene causes the retinal degeneration chicken phenotype. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 1271–1276.

Sergouniotis, P.I., Davidson, A.E., Mackay, D.S., Li, Z., Yang, X., Plagnol, V., Moore, A.T., and Webster, A.R. (2011). Recessive mutations in KCNJ13, encoding an inwardly rectifying potassium channel subunit, cause leber congenital amaurosis. *Am. J. Hum. Genet.* 89, 183–190.

Sergueef, N. (2009). *Anatomie fonctionnelle appliquée à l'ostéopathie crânienne* (Elsevier Masson).

Seriola, A., Spits, C., Simard, J.P., Hilven, P., Haentjens, P., Pearson, C.E., and Sermon, K. (2011). Huntington's and myotonic dystrophy hESCs: down-regulated trinucleotide repeat instability and mismatch repair machinery expression upon differentiation. *Hum. Mol. Genet.* 20, 176–185.

Sermon, K.D., Simon, C., Braude, P., Viville, S., Borstlap, J., and Veiga, A. (2009). Creation of a registry for human embryonic stem cells carrying an inherited defect: joint collaboration between ESHRE and hESCreg. *Hum. Reprod.* 24, 1556–1560.

- Shapley, R.M., and Victor, J.D. (1981). How the contrast gain control modifies the frequency responses of cat retinal ganglion cells. *J. Physiol. (Lond.)* 318, 161–179.
- Sharon, D., Blackshaw, S., Cepko, C.L., and Dryja, T.P. (2002). Profile of the genes expressed in the human peripheral retina, macula, and retinal pigment epithelium determined through serial analysis of gene expression (SAGE). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 315–320.
- Sharpe, L.T., and Stockman, A. (1999). Rod pathways: the importance of seeing nothing. *Trends Neurosci.* 22, 497–504.
- Shen, W., and Mardon, G. (1997). Ectopic eye development in *Drosophila* induced by directed dachshund expression. *Development* 124, 45–52.
- Shen, Y., Liu, X.-L., and Yang, X.-L. (2006). N-methyl-D-aspartate receptors in the retina. *Mol. Neurobiol.* 34, 163–179.
- Sheridan, S.D., Theriault, K.M., Reis, S.A., Zhou, F., Madison, J.M., Daheron, L., Loring, J.F., and Haggarty, S.J. (2011). Epigenetic characterization of the FMR1 gene and aberrant neurodevelopment in human induced pluripotent stem cell models of fragile X syndrome. *PLoS ONE* 6, e26203.
- Shiels, P.G., Kind, A.J., Campbell, K.H., Waddington, D., Wilmut, I., Colman, A., and Schnieke, A.E. (1999). Analysis of telomere lengths in cloned sheep. *Nature* 399, 316–317.
- Shin, T., Kraemer, D., Pryor, J., Liu, L., Rugila, J., Howe, L., Buck, S., Murphy, K., Lyons, L., and Westhusin, M. (2002). A cat cloned by nuclear transplantation. *Nature* 415, 859.
- Shyjan, A.W., De Sauvage, F.J., Gillett, N.A., Goeddel, D.V., and Lowe, D.G. (1992). Molecular cloning of a retina-specific membrane guanylyl cyclase. *Neuron* 9, 727–737.
- Silva, J., Barrandon, O., Nichols, J., Kawaguchi, J., Theunissen, T.W., and Smith, A. (2008). Promotion of reprogramming to ground state pluripotency by signal inhibition. *PLoS Biol.* 6, e253.
- Simeone, A., Acampora, D., Mallamaci, A., Stornaiuolo, A., D'Apice, M.R., Nigro, V., and Boncinelli, E. (1993). A vertebrate gene related to orthodenticle contains a homeodomain of the bicoid class and demarcates anterior neuroectoderm in the gastrulating mouse embryo. *EMBO J.* 12, 2735–2747.
- Sincich, L.C., and Horton, J.C. (2005). The circuitry of V1 and V2: integration of color, form, and motion. *Annu. Rev. Neurosci.* 28, 303–326.
- Singleton, A.B. (2011). Exome sequencing: a transformative technology. *Lancet Neurol* 10, 942–946.
- Sinn, P.L., Sauter, S.L., and McCray, P.B., Jr (2005). Gene therapy progress and prospects: development of improved lentiviral and retroviral vectors--design, biosafety, and production. *Gene Ther.* 12, 1089–1098.
- Sivakamasundari, J., Kavitha, G., Natarajan, V., and Ramakrishnan, S. (2012). Characterization of optic disc in human retinal images using tsallis entropy based method. *Biomed Sci Instrum* 48, 524–531.
- Slaughter, M.M., and Miller, R.F. (1981). 2-amino-4-phosphonobutyric acid: a new pharmacological tool for retina research. *Science* 211, 182–185.
- Smith, A.J., Bainbridge, J.W., and Ali, R.R. (2009). Prospects for retinal gene replacement therapy. *Trends Genet.* 25, 156–165.



- Smith, J.R., Vallier, L., Lupo, G., Alexander, M., Harris, W.A., and Pedersen, R.A. (2008). Inhibition of Activin/Nodal signaling promotes specification of human embryonic stem cells into neuroectoderm. *Dev. Biol.* *313*, 107–117.
- Smith, W.C., and Harland, R.M. (1992). Expression cloning of noggin, a new dorsalizing factor localized to the Spemann organizer in *Xenopus* embryos. *Cell* *70*, 829–840.
- Snellman, J., Kaur, T., Shen, Y., and Nawy, S. (2008). Regulation of ON bipolar cell activity. *Prog Retin Eye Res* *27*, 450–463.
- Sohocki, M.M., Bowne, S.J., Sullivan, L.S., Blackshaw, S., Cepko, C.L., Payne, A.M., Bhattacharya, S.S., Khaliq, S., Qasim Mehdi, S., Birch, D.G., et al. (2000). Mutations in a new photoreceptor-pineal gene on 17p cause Leber congenital amaurosis. *Nat. Genet.* *24*, 79–83.
- Sohocki, M.M., Daiger, S.P., Bowne, S.J., Rodriguez, J.A., Northrup, H., Heckenlively, J.R., Birch, D.G., Mintz-Hittner, H., Ruiz, R.S., Lewis, R.A., et al. (2001). Prevalence of mutations causing retinitis pigmentosa and other inherited retinopathies. *Hum. Mutat.* *17*, 42–51.
- Sohocki, M.M., Malone, K.A., Sullivan, L.S., and Daiger, S.P. (1999). Localization of retina/pineal-expressed sequences: identification of novel candidate genes for inherited retinal disorders. *Genomics* *58*, 29–33.
- Soldner, F., Hockemeyer, D., Beard, C., Gao, Q., Bell, G.W., Cook, E.G., Hargus, G., Blak, A., Cooper, O., Mitalipova, M., et al. (2009). Parkinson's disease patient-derived induced pluripotent stem cells free of viral reprogramming factors. *Cell* *136*, 964–977.
- Solomon, S.G., and Lennie, P. (2007). The machinery of colour vision. *Nat. Rev. Neurosci.* *8*, 276–286.
- Soman, P., Tobe, B.T.D., Lee, J.W., Winquist, A.A.M., Singec, I., Vecchio, K.S., Snyder, E.Y., and Chen, S. (2012). Three-dimensional scaffolding to investigate neuronal derivatives of human embryonic stem cells. *Biomedical Microdevices*.
- Sommer, C.A., Stadtfeld, M., Murphy, G.J., Hochedlinger, K., Kotton, D.N., and Mostoslavsky, G. (2009). Induced pluripotent stem cell generation using a single lentiviral stem cell cassette. *Stem Cells* *27*, 543–549.
- Son, E.Y., Ichida, J.K., Wainger, B.J., Toma, J.S., Rafuse, V.F., Woolf, C.J., and Eggan, K. (2011). Conversion of mouse and human fibroblasts into functional spinal motor neurons. *Cell Stem Cell* *9*, 205–218.
- Spalton, D.J. (1996). 17 La Papille. In *Atlas d'ophtalmologie clinique*, (De Boeck Supérieur), pp. 438–440.
- Sparrow, J.R., Gregory-Roberts, E., Yamamoto, K., Blonska, A., Ghosh, S.K., Ueda, K., and Zhou, J. (2012). The bisretinoids of retinal pigment epithelium. *Prog Retin Eye Res* *31*, 121–135.
- Speicher, M.R., Gwyn Ballard, S., and Ward, D.C. (1996). Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi-fluor FISH. *Nat. Genet.* *12*, 368–375.
- Speicher, M.R., and Ward, D.C. (1996). The coloring of cytogenetics. *Nat. Med.* *2*, 1046–1048.
- Spitznas, M., and Hogan, M.J. (1970). Outer segments of photoreceptors and the retinal pigment epithelium. Interrelationship in the human eye. *Arch. Ophthalmol.* *84*, 810–819.

- Spivakov, M., and Fisher, A.G. (2007). Epigenetic signatures of stem-cell identity. *Nat. Rev. Genet.* 8, 263–271.
- Van der Spuy, J., Kim, J.H., Yu, Y.S., Szel, A., Luthert, P.J., Clark, B.J., and Cheetham, M.E. (2003). The expression of the Leber congenital amaurosis protein AIPL1 coincides with rod and cone photoreceptor development. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 44, 5396–5403.
- Stacher Hörndli, C., and Chien, C.-B. (2012). Sonic hedgehog is indirectly required for intraretinal axon pathfinding by regulating chemokine expression in the optic stalk. *Development* 139, 2604–2613.
- Stadtfeld, M., and Hochedlinger, K. (2010). Induced pluripotency: history, mechanisms, and applications. *Genes Dev.* 24, 2239–2263.
- Stadtfeld, M., Nagaya, M., Utikal, J., Weir, G., and Hochedlinger, K. (2008). Induced pluripotent stem cells generated without viral integration. *Science* 322, 945–949.
- Steinberg, R.H., Fisher, S.K., and Anderson, D.H. (1980). Disc morphogenesis in vertebrate photoreceptors. *J. Comp. Neurol.* 190, 501–508.
- Stell, W.K., and Lightfoot, D.O. (1975). Color-specific interconnections of cones and horizontal cells in the retina of the goldfish. *J. Comp. Neurol.* 159, 473–502.
- Stevens, L.C., and Little, C.C. (1954). Spontaneous Testicular Teratomas in an Inbred Strain of Mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 40, 1080–1087.
- Stewart, R., Stojkovic, M., and Lako, M. (2006). Mechanisms of self-renewal in human embryonic stem cells. *Eur. J. Cancer* 42, 1257–1272.
- Stewart, R.M., and Gerhart, J.C. (1990). The anterior extent of dorsal development of the *Xenopus* embryonic axis depends on the quantity of organizer in the late blastula. *Development* 109, 363–372.
- Stiles, J., and Jernigan, T.L. (2010). The basics of brain development. *Neuropsychol Rev* 20, 327–348.
- Stockman, A., MacLeod, D.I., and Johnson, N.E. (1993). Spectral sensitivities of the human cones. *J Opt Soc Am A Opt Image Sci Vis* 10, 2491–2521.
- Stockman, A., and Sharpe, L.T. (2000). The spectral sensitivities of the middle- and long-wavelength-sensitive cones derived from measurements in observers of known genotype. *Vision Res.* 40, 1711–1737.
- Stockton, D.W., Lewis, R.A., Abboud, E.B., Al-Rajhi, A., Jabak, M., Anderson, K.L., and Lupski, J.R. (1998). A novel locus for Leber congenital amaurosis on chromosome 14q24. *Hum. Genet.* 103, 328–333.
- Stojkovic, M., Lako, M., Stojkovic, P., Stewart, R., Przyborski, S., Armstrong, L., Evans, J., Herbert, M., Hyslop, L., Ahmad, S., et al. (2004). Derivation of human embryonic stem cells from day-8 blastocysts recovered after three-step in vitro culture. *Stem Cells* 22, 790–797.
- Stojkovic, P., Lako, M., Stewart, R., Przyborski, S., Armstrong, L., Evans, J., Murdoch, A., Strachan, T., and Stojkovic, M. (2005). An autogeneic feeder cell system that efficiently supports growth of undifferentiated human embryonic stem cells. *Stem Cells* 23, 306–314.
- Stone, E.M. (2007). Leber congenital amaurosis - a model for efficient genetic testing of heterogeneous disorders: LXIV Edward Jackson Memorial Lecture. *Am. J. Ophthalmol.* 144, 791–811.

- Strauss, O. (2005). The retinal pigment epithelium in visual function. *Physiol. Rev.* 85, 845–881.
- Streilein, J.W. (2003). Ocular immune privilege: therapeutic opportunities from an experiment of nature. *Nat. Rev. Immunol.* 3, 879–889.
- Streilein, J.W., Niederkorn, J.Y., and Shaddock, J.A. (1980). Systemic immune unresponsiveness induced in adult mice by anterior chamber presentation of minor histocompatibility antigens. *J. Exp. Med.* 152, 1121–1125.
- Streit, A. (2004). Early development of the cranial sensory nervous system: from a common field to individual placodes. *Dev. Biol.* 276, 1–15.
- Streit, A., and Stern, C.D. (1999). Neural induction. A bird's eye view. *Trends Genet.* 15, 20–24.
- Strek, W., Streck, P., Nowogrodzka-Zagórska, M., Litwin, J.A., Pityński, K., and Miodoński, A.J. (1993). Hyaloid vessels of the human fetal eye. A scanning electron microscopic study of corrosion casts. *Arch. Ophthalmol.* 111, 1573–1577.
- Strelchenko, N., Verlinsky, O., Kukhareno, V., and Verlinsky, Y. (2004). Morula-derived human embryonic stem cells. *Reprod. Biomed. Online* 9, 623–629.
- Strettoi, E., Novelli, E., Mazzoni, F., Barone, I., and Damiani, D. (2010). Complexity of retinal cone bipolar cells. *Progress in Retinal and Eye Research* 29, 272–283.
- Strettoi, E., Raviola, E., and Dacheux, R.F. (1992). Synaptic connections of the narrow-field, bistratified rod amacrine cell (AII) in the rabbit retina. *J. Comp. Neurol.* 325, 152–168.
- Stryer, L. (1983). Transducin and the cyclic GMP phosphodiesterase: amplifier proteins in vision. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 48 Pt 2, 841–852.
- Sugii, S., Kida, Y., Kawamura, T., Suzuki, J., Vassena, R., Yin, Y.-Q., Lutz, M.K., Berggren, W.T., Izpisua Belmonte, J.C., and Evans, R.M. (2010). Human and mouse adipose-derived cells support feeder-independent induction of pluripotent stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 3558–3563.
- Sullivan, D.M., Chung, D.C., Anglade, E., Nussenblatt, R.B., and Csaky, K.G. (1996). Adenovirus-mediated gene transfer of ornithine aminotransferase in cultured human retinal pigment epithelium. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 37, 766–774.
- Surani, M.A. (2005). Nuclear reprogramming by human embryonic stem cells. *Cell* 122, 653–654.
- Swain, P.K., Chen, S., Wang, Q.L., Affatigato, L.M., Coats, C.L., Brady, K.D., Fishman, G.A., Jacobson, S.G., Swaroop, A., Stone, E., et al. (1997). Mutations in the cone-rod homeobox gene are associated with the cone-rod dystrophy photoreceptor degeneration. *Neuron* 19, 1329–1336.
- Swaroop, A., Wang, Q.L., Wu, W., Cook, J., Coats, C., Xu, S., Chen, S., Zack, D.J., and Sieving, P.A. (1999). Leber congenital amaurosis caused by a homozygous mutation (R90W) in the homeodomain of the retinal transcription factor CRX: direct evidence for the involvement of CRX in the development of photoreceptor function. *Hum. Mol. Genet.* 8, 299–305.
- Swistowski, A., Peng, J., Liu, Q., Mali, P., Rao, M.S., Cheng, L., and Zeng, X. (2010). Efficient generation of functional dopaminergic neurons from human induced pluripotent stem cells under defined conditions. *Stem Cells* 28, 1893–1904.
- Szabo, E., Rampalli, S., Risueño, R.M., Schnerch, A., Mitchell, R., Fiebig-Comyn, A., Levadoux-Martin, M., and Bhatia, M. (2010). Direct conversion of human fibroblasts to multilineage blood progenitors. *Nature* 468, 521–526.

- Tada, M., Takahama, Y., Abe, K., Nakatsuji, N., and Tada, T. (2001). Nuclear reprogramming of somatic cells by in vitro hybridization with ES cells. *Curr. Biol.* *11*, 1553–1558.
- Takahashi, K., Okita, K., Nakagawa, M., and Yamanaka, S. (2007a). Induction of pluripotent stem cells from fibroblast cultures. *Nat Protoc* *2*, 3081–3089.
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., and Yamanaka, S. (2007b). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* *131*, 861–872.
- Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* *126*, 663–676.
- Tam, P.P., and Steiner, K.A. (1999). Anterior patterning by synergistic activity of the early gastrula organizer and the anterior germ layer tissues of the mouse embryo. *Development* *126*, 5171–5179.
- Tamm, E.R., and Lütjen-Drecoll, E. (1996). Ciliary body. *Microsc. Res. Tech.* *33*, 390–439.
- Tan, P.E.Z., Yu, P.K., Balaratnasingam, C., Cringle, S.J., Morgan, W.H., McAllister, I.L., and Yu, D.-Y. (2012). Quantitative confocal imaging of the retinal microvasculature in the human retina. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* *53*, 5728–5736.
- Tanaka, T., Takahashi, K., Yamane, M., Tomida, S., Nakamura, S., Oshima, K., Niwa, A., Nishikomori, R., Kambe, N., Hara, H., et al. (2012). Induced pluripotent stem cells from CINCA syndrome patients as a model for dissecting somatic mosaicism and drug discovery. *Blood*.
- Tang, P.H., Wheless, L., and Crouch, R.K. (2011). Regeneration of Photopigment Is Enhanced in Mouse Cone Photoreceptors Expressing RPE65 Protein. *Journal of Neuroscience* *31*, 10403–10411.
- Tannenbaum, S.E., Tako Turetsky, T., Singer, O., Aizenman, E., Kirshberg, S., Ilouz, N., Gil, Y., Berman-Zaken, Y., Perlman, T.S., Geva, N., et al. (2012). Derivation of Xeno-Free and GMP-Grade Human Embryonic Stem Cells - Platforms for Future Clinical Applications. *PLoS ONE* *7*, e35325.
- Tassabehji, M., Newton, V.E., Liu, X.Z., Brady, A., Donnai, D., Krajewska-Walasek, M., Murday, V., Norman, A., Obersztyn, E., and Reardon, W. (1995). The mutational spectrum in Waardenburg syndrome. *Hum. Mol. Genet.* *4*, 2131–2137.
- Taube, S.E. (2009). Biomarkers in oncology: trials and tribulations. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *1180*, 111–118.
- Taube, S.E., Clark, G.M., Dancy, J.E., McShane, L.M., Sigman, C.C., and Gutman, S.I. (2009). A Perspective on Challenges and Issues in Biomarker Development and Drug and Biomarker Codevelopment. *J Natl Cancer Inst* *101*, 1453–1463.
- Taylor, C.J., Bolton, E.M., and Bradley, J.A. (2011). Immunological considerations for embryonic and induced pluripotent stem cell banking. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* *366*, 2312–2322.
- Taylor, M.V. (2000). Muscle development: molecules of myoblast fusion. *Curr. Biol.* *10*, R646–648.
- Teller, D.C., Stenkamp, R.E., and Palczewski, K. (2003). Evolutionary analysis of rhodopsin and cone pigments: connecting the three-dimensional structure with spectral tuning and signal transfer. *FEBS Letters* *555*, 151–159.
- Tenzen, T., Zembowicz, F., and Cowan, C.A. (2010). Genome modification in human embryonic stem cells. *J. Cell. Physiol.* *222*, 278–281.

- Tesar, P.J., Chenoweth, J.G., Brook, F.A., Davies, T.J., Evans, E.P., Mack, D.L., Gardner, R.L., and McKay, R.D.G. (2007). New cell lines from mouse epiblast share defining features with human embryonic stem cells. *Nature* 448, 196–199.
- Thier, M., Müntz, B., Mielke, S., and Edenhofer, F. (2012a). Cellular reprogramming employing recombinant sox2 protein. *Stem Cells Int* 2012, 549846.
- Thier, M., Wörsdörfer, P., Lakes, Y.B., Gorris, R., Herms, S., Opitz, T., Seiferling, D., Quandt, T., Hoffmann, P., Nöthen, M.M., et al. (2012b). Direct conversion of fibroblasts into stably expandable neural stem cells. *Cell Stem Cell* 10, 473–479.
- Thomas, A.J., and Erickson, C.A. (2008). The making of a melanocyte: the specification of melanoblasts from the neural crest. *Pigment Cell Melanoma Res* 21, 598–610.
- Thompson, D.A., and Gal, A. (2003). Vitamin A metabolism in the retinal pigment epithelium: genes, mutations, and diseases. *Prog Retin Eye Res* 22, 683–703.
- Thompson, D.A., Li, Y., McHenry, C.L., Carlson, T.J., Ding, X., Sieving, P.A., Apfelstedt-Sylla, E., and Gal, A. (2001). Mutations in the gene encoding lecithin retinol acyltransferase are associated with early-onset severe retinal dystrophy. *Nat. Genet.* 28, 123–124.
- Thomson, J.A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S.S., Waknitz, M.A., Swiergiel, J.J., Marshall, V.S., and Jones, J.M. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282, 1145–1147.
- Thomson, J.A., Kalishman, J., Golos, T.G., Durning, M., Harris, C.P., Becker, R.A., and Hearn, J.P. (1995). Isolation of a primate embryonic stem cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92, 7844–7848.
- Tian, N., and Slaughter, M.M. (1995). Functional properties of a metabotropic glutamate receptor at dendritic synapses of ON bipolar cells in the amphibian retina. *Vis. Neurosci.* 12, 755–765.
- Torrez, L.B., Perez, Y., Yang, J., Zur Nieden, N.I., Klassen, H., and Liew, C.G. (2012). Derivation of neural progenitors and retinal pigment epithelium from common marmoset and human pluripotent stem cells. *Stem Cells Int* 2012, 417865.
- Treisman, J., Harris, E., and Desplan, C. (1991). The paired box encodes a second DNA-binding domain in the paired homeo domain protein. *Genes Dev.* 5, 594–604.
- Tropel, P., Tournois, J., Côme, J., Varela, C., Moutou, C., Fagner, P., Cailleret, M., Laâbi, Y., Peschanski, M., and Viville, S. (2010). High-efficiency derivation of human embryonic stem cell lines following pre-implantation genetic diagnosis. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* 46, 376–385.
- Trounson, A., Thakar, R.G., Lomax, G., and Gibbons, D. (2011). Clinical trials for stem cell therapies. *BMC Med* 9, 52.
- Trounson, A.O. (2001). The derivation and potential use of human embryonic stem cells. *Reprod. Fertil. Dev.* 13, 523–532.
- Tsai, Z.-Y., Singh, S., Yu, S.-L., Kao, L.-P., Chen, B.-Z., Ho, B.-C., Yang, P.-C., and Li, S.S.-L. (2010). Identification of microRNAs regulated by activin A in human embryonic stem cells. *J. Cell. Biochem.* 109, 93–102.
- Turetsky, T., Aizenman, E., Gil, Y., Weinberg, N., Shufaro, Y., Revel, A., Laufer, N., Simon, A., Abeliovich, D., and Reubinoff, B.E. (2008). Laser-assisted derivation of human embryonic stem cell lines from IVF embryos after preimplantation genetic diagnosis. *Hum. Reprod.* 23, 46–53.

- Turque, N., Plaza, S., Radvanyi, F., Carriere, C., and Saule, S. (1994). Pax-QNR/Pax-6, a paired box- and homeobox-containing gene expressed in neurons, is also expressed in pancreatic endocrine cells. *Mol. Endocrinol.* *8*, 929–938.
- Twig, G., Levy, H., and Perlman, I. (2003). Color opponency in horizontal cells of the vertebrate retina. *Progress in Retinal and Eye Research* *22*, 31–68.
- Ueda, M., Masu, Y., Ando, A., Maeda, H., Del Monte, M.A., Uyama, M., and Ito, S. (1998). Prevention of ornithine cytotoxicity by proline in human retinal pigment epithelial cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* *39*, 820–827.
- Ulshafer, R.J., Allen, C., Dawson, W.W., and Wolf, E.D. (1984). Hereditary retinal degeneration in the Rhode Island Red chicken. I. Histology and ERG. *Exp. Eye Res.* *39*, 125–135.
- Ulshafer, R.J., and Allen, C.B. (1985a). Hereditary retinal degeneration in the Rhode Island Red chicken: ultrastructural analysis. *Exp. Eye Res.* *40*, 865–877.
- Ulshafer, R.J., and Allen, C.B. (1985b). Ultrastructural changes in the retinal pigment epithelium of congenitally blind chickens. *Curr. Eye Res.* *4*, 1009–1021.
- Underbayev, C., Kasar, S., Yuan, Y., and Raveche, E. (2012). MicroRNAs and induced pluripotent stem cells for human disease mouse modeling. *J. Biomed. Biotechnol.* *2012*, 758169.
- Urbach, A., Bar-Nur, O., Daley, G.Q., and Benvenisty, N. (2010). Differential modeling of fragile X syndrome by human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* *6*, 407–411.
- Urbach, A., Schuldiner, M., and Benvenisty, N. (2004). Modeling for Lesch-Nyhan disease by gene targeting in human embryonic stem cells. *Stem Cells* *22*, 635–641.
- Utikal, J., Maherali, N., Kulalert, W., and Hochedlinger, K. (2009). Sox2 is dispensable for the reprogramming of melanocytes and melanoma cells into induced pluripotent stem cells. *J. Cell. Sci.* *122*, 3502–3510.
- Vallier, L., Alexander, M., and Pedersen, R.A. (2005). Activin/Nodal and FGF pathways cooperate to maintain pluripotency of human embryonic stem cells. *J. Cell. Sci.* *118*, 4495–4509.
- Vallier, L., Touboul, T., Chng, Z., Brimpari, M., Hannan, N., Millan, E., Smithers, L.E., Trotter, M., Rugg-Gunn, P., Weber, A., et al. (2009). Early cell fate decisions of human embryonic stem cells and mouse epiblast stem cells are controlled by the same signalling pathways. *PLoS ONE* *4*, e6082.
- Vaney, D.I., Gynther, I.C., and Young, H.M. (1991). Rod-signal interneurons in the rabbit retina: 2. AII amacrine cells. *J. Comp. Neurol.* *310*, 154–169.
- Vanuytsel, T., Senger, S., Fasano, A., and Shea-Donohue, T. (2012). Major signaling pathways in intestinal stem cells. *Biochim. Biophys. Acta.*
- Vardi, N. (1998). Alpha subunit of Go localizes in the dendritic tips of ON bipolar cells. *J. Comp. Neurol.* *395*, 43–52.
- Vardi, N., and Smith, R.G. (1996). The AII amacrine network: coupling can increase correlated activity. *Vision Res.* *36*, 3743–3757.
- Verghese, P.B., Sasaki, Y., Yang, D., Stewart, F., Sabar, F., Finn, M.B., Wroge, C.M., Mennerick, S., Neil, J.J., Milbrandt, J., et al. (2011). Nicotinamide mononucleotide adenylyl transferase 1 protects

against acute neurodegeneration in developing CNS by inhibiting excitotoxic-necrotic cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *108*, 19054–19059.

Verlinsky, Y., Strelchenko, N., Kukharenko, V., Rechitsky, S., Verlinsky, O., Galat, V., and Kuliev, A. (2005). Human embryonic stem cell lines with genetic disorders. *Reprod. Biomed. Online* *10*, 105–110.

Vickaryous, M.K., and Hall, B.K. (2006). Human cell type diversity, evolution, development, and classification with special reference to cells derived from the neural crest. *Biological Reviews* *81*, 425–455.

Vieira, C., Pombero, A., García-Lopez, R., Gimeno, L., Echevarria, D., and Martínez, S. (2010). Molecular mechanisms controlling brain development: an overview of neuroepithelial secondary organizers. *Int. J. Dev. Biol.* *54*, 7–20.

Vierbuchen, T., Ostermeier, A., Pang, Z.P., Kokubu, Y., Südhof, T.C., and Wernig, M. (2010). Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors. *Nature* *463*, 1035–1041.

Vignery, A. (2000). Osteoclasts and giant cells: macrophage-macrophage fusion mechanism. *Int J Exp Pathol* *81*, 291–304.

Vishnivetskiy, S.A., Raman, D., Wei, J., Kennedy, M.J., Hurley, J.B., and Gurevich, V.V. (2007). Regulation of arrestin binding by rhodopsin phosphorylation level. *J. Biol. Chem.* *282*, 32075–32083.

Vogel-Höpker, A., Momose, T., Rohrer, H., Yasuda, K., Ishihara, L., and Rapaport, D.H. (2000). Multiple functions of fibroblast growth factor-8 (FGF-8) in chick eye development. *Mech. Dev.* *94*, 25–36.

Völgyi, B., Deans, M.R., Paul, D.L., and Bloomfield, S.A. (2004). Convergence and segregation of the multiple rod pathways in mammalian retina. *J. Neurosci.* *24*, 11182–11192.

Vrensen, G.F., Graw, J., and De Wolf, A. (1991). Nuclear breakdown during terminal differentiation of primary lens fibres in mice: a transmission electron microscopic study. *Exp. Eye Res.* *52*, 647–659.

Vugler, A., Carr, A.-J., Lawrence, J., Chen, L.L., Burrell, K., Wright, A., Lundh, P., Semo, M., Ahmado, A., Gias, C., et al. (2008). Elucidating the phenomenon of HESC-derived RPE: anatomy of cell genesis, expansion and retinal transplantation. *Exp. Neurol.* *214*, 347–361.

Waardenburg, P.J., and Schappert-Kimmijser, J. (1963). ON VARIOUS RECESSIVE BIOTYPES OF LEBER'S CONGENITAL AMAUROSIS\*. *Acta Ophthalmologica* *41*, 317–320.

Wakayama, T., Perry, A.C., Zuccotti, M., Johnson, K.R., and Yanagimachi, R. (1998). Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature* *394*, 369–374.

Wald, G. (1968). Molecular basis of visual excitation. *Science* *162*, 230–239.

Walls, G.L. (Gordon L. (1942). *The vertebrate eye and its adaptive radiation* (Bloomfield Hills, Mich., Cranbrook Institute of Science).

Wan, Q.-F., and Heidelberger, R. (2011). Synaptic release at mammalian bipolar cell terminals. *Vis. Neurosci.* *28*, 109–119.

Wang, G., Zhang, H., Zhao, Y., Li, J., Cai, J., Wang, P., Meng, S., Feng, J., Miao, C., Ding, M., et al. (2005). Noggin and bFGF cooperate to maintain the pluripotency of human embryonic stem cells in the absence of feeder layers. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *330*, 934–942.

- Wang, H., Den Hollander, A.I., Moayed, Y., Abulimiti, A., Li, Y., Collin, R.W.J., Hoyng, C.B., Lopez, I., Abboud, E.B., Al-Rajhi, A.A., et al. (2009). Mutations in SPATA7 cause Leber congenital amaurosis and juvenile retinitis pigmentosa. *Am. J. Hum. Genet.* 84, 380–387.
- Wang, J.-S., and Kefalov, V.J. (2009). An alternative pathway mediates the mouse and human cone visual cycle. *Curr. Biol.* 19, 1665–1669.
- Wang, J.-S., and Kefalov, V.J. (2011). The cone-specific visual cycle. *Prog Retin Eye Res* 30, 115–128.
- Wang, L., Schulz, T.C., Sherrer, E.S., Dauphin, D.S., Shin, S., Nelson, A.M., Ware, C.B., Zhan, M., Song, C.-Z., Chen, X., et al. (2007). Self-renewal of human embryonic stem cells requires insulin-like growth factor-1 receptor and ERBB2 receptor signaling. *Blood* 110, 4111–4119.
- Wang, S.-Z., and Yan, R.-T. (2012). Chick retinal pigment epithelium transdifferentiation assay for proneural activities. *Methods Mol. Biol.* 884, 201–209.
- Wang, X., Wang, H., Cao, M., Li, Z., Chen, X., Patenia, C., Gore, A., Abboud, E.B., Al-Rajhi, A.A., Lewis, R.A., et al. (2011a). Whole-exome sequencing identifies ALMS1, IQCB1, CNGA3, and MYO7A mutations in patients with Leber congenital amaurosis. *Hum. Mutat.* 32, 1450–1459.
- Wang, Z., Sugano, E., Isago, H., Hiroi, T., Tamai, M., and Tomita, H. (2011b). Differentiation of neuronal cells from NIH/3T3 fibroblasts under defined conditions. *Development, Growth & Differentiation* 53, 357–365.
- Warnes, T.W., and Smith, A. (1987). Tumour markers in diagnosis and management. *Baillieres Clin. Gastroenterol.* 1, 63–89.
- Warren, L., Manos, P.D., Ahfeldt, T., Loh, Y.-H., Li, H., Lau, F., Ebina, W., Mandal, P.K., Smith, Z.D., Meissner, A., et al. (2010). Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA. *Cell Stem Cell* 7, 618–630.
- Warren, L., Ni, Y., Wang, J., and Guo, X. (2012). Feeder-free derivation of human induced pluripotent stem cells with messenger RNA. *Sci Rep* 2, 657.
- Washington, N.L., Haendel, M.A., Mungall, C.J., Ashburner, M., Westerfield, M., and Lewis, S.E. (2009). Linking human diseases to animal models using ontology-based phenotype annotation. *PLoS Biol.* 7, e1000247.
- Watabe, T., Yamashita, J.K., Mishima, K., and Miyazono, K. (2006). TGF-beta signaling in embryonic stem cell-derived endothelial cells. *Methods Mol. Biol.* 330, 341–351.
- Wells, D.N., Misica, P.M., Day, T.A., and Tervit, H.R. (1997). Production of cloned lambs from an established embryonic cell line: a comparison between in vivo- and in vitro-matured cytoplasts. *Biol. Reprod.* 57, 385–393.
- Wenkel, H., Chen, P.W., Ksander, B.R., and Streilein, J.W. (1999). Immune privilege is extended, then withdrawn, from allogeneic tumor cell grafts placed in the subretinal space. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 40, 3202–3208.
- Wensel, T.G., and Stryer, L. (1986). Reciprocal control of retinal rod cyclic GMP phosphodiesterase by its gamma subunit and transducin. *Proteins* 1, 90–99.
- Wenzel, A., Von Lintig, J., Oberhauser, V., Tanimoto, N., Grimm, C., and Seeliger, M.W. (2007). RPE65 is essential for the function of cone photoreceptors in NRL-deficient mice. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 48, 534–542.



- Werblin, F.S., and Dowling, J.E. (1969). Organization of the retina of the mudpuppy, *Necturus maculosus*. II. Intracellular recording. *J. Neurophysiol.* 32, 339–355.
- Wernig, M., Meissner, A., Cassady, J.P., and Jaenisch, R. (2008). c-Myc is dispensable for direct reprogramming of mouse fibroblasts. *Cell Stem Cell* 2, 10–12.
- Westheimer, G. (2007). The ON-OFF dichotomy in visual processing: from receptors to perception. *Prog Retin Eye Res* 26, 636–648.
- William, K.J., and Krause, W. (2005). Krause's Essential Human Histology for Medical Students (Universal-Publishers).
- Williams, M.L., Coleman, J.E., Haire, S.E., Aleman, T.S., Cideciyan, A.V., Sokal, I., Palczewski, K., Jacobson, S.G., and Semple-Rowland, S.L. (2006). Lentiviral expression of retinal guanylate cyclase-1 (RetGC1) restores vision in an avian model of childhood blindness. *PLoS Med.* 3, e201.
- Williams, R.W., and Moody, S.A. (2003). 5 : Developmental and Genetic Control of Cell Number in the Retina. In *The Visual Neurosciences*, L.M. Chalupa, and J.S. Werner, eds. (MIT Press), pp. 63–76.
- Wilmut, I., Schnieke, A.E., McWhir, J., Kind, A.J., and Campbell, K.H. (1997). Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 385, 810–813.
- Wilson, S.I., and Edlund, T. (2001). Neural induction: toward a unifying mechanism. *Nat. Neurosci.* 4 *Suppl*, 1161–1168.
- Woltjen, K., Michael, I.P., Mohseni, P., Desai, R., Mileikovsky, M., Hämmäläinen, R., Cowling, R., Wang, W., Liu, P., Gertsenstein, M., et al. (2009). piggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nature* 458, 766–770.
- Wong, L.-F., Goodhead, L., Prat, C., Mitrophanous, K.A., Kingsman, S.M., and Mazarakis, N.D. (2006). Lentivirus-mediated gene transfer to the central nervous system: therapeutic and research applications. *Hum. Gene Ther.* 17, 1–9.
- Wong, V.W., Levi, B., Rajadas, J., Longaker, M.T., and Gurtner, G.C. (2012). Stem Cell Niches for Skin Regeneration. *International Journal of Biomaterials* 2012, 1–8.
- Woods, G.L., White, K.L., Vanderwall, D.K., Li, G.-P., Aston, K.I., Bunch, T.D., Meerdo, L.N., and Pate, B.J. (2003). A mule cloned from fetal cells by nuclear transfer. *Science* 301, 1063.
- Wu, Y., Singh, S., Georgescu, M.-M., and Birge, R.B. (2005). A role for Mer tyrosine kinase in alphavbeta5 integrin-mediated phagocytosis of apoptotic cells. *J. Cell. Sci.* 118, 539–553.
- Wu, Y., Tibrewal, N., and Birge, R.B. (2006). Phosphatidylserine recognition by phagocytes: a view to a kill. *Trends in Cell Biology* 16, 189–197.
- Xiao, L., Yuan, X., and Sharkis, S.J. (2006). Activin A maintains self-renewal and regulates fibroblast growth factor, Wnt, and bone morphogenic protein pathways in human embryonic stem cells. *Stem Cells* 24, 1476–1486.
- Xie, X., Hiona, A., Lee, A.S., Cao, F., Huang, M., Li, Z., Cherry, A., Pei, X., and Wu, J.C. (2011). Effects of long-term culture on human embryonic stem cell aging. *Stem Cells Dev.* 20, 127–138.
- Xu, C., Inokuma, M.S., Denham, J., Golds, K., Kundu, P., Gold, J.D., and Carpenter, M.K. (2001). Feeder-free growth of undifferentiated human embryonic stem cells. *Nat. Biotechnol.* 19, 971–974.

- Xu, C., Rosler, E., Jiang, J., Lebkowski, J.S., Gold, J.D., O'Sullivan, C., Delavan-Boorsma, K., Mok, M., Bronstein, A., and Carpenter, M.K. (2005). Basic fibroblast growth factor supports undifferentiated human embryonic stem cell growth without conditioned medium. *Stem Cells* 23, 315–323.
- Yagi, T., Ito, D., Okada, Y., Akamatsu, W., Nihei, Y., Yoshizaki, T., Yamanaka, S., Okano, H., and Suzuki, N. (2011). Modeling familial Alzheimer's disease with induced pluripotent stem cells. *Hum. Mol. Genet.* 20, 4530–4539.
- Yamada, E. (1969). Some structural features of the fovea centralis in the human retina. *Arch. Ophthalmol.* 82, 151–159.
- Yamada, S., Samtani, R.R., Lee, E.S., Lockett, E., Uwabe, C., Shiota, K., Anderson, S.A., and Lo, C.W. (2010). Developmental atlas of the early first trimester human embryo. *Developmental Dynamics* 239, 1585–1595.
- Yamanaka, S. (2009). A fresh look at iPS cells. *Cell* 137, 13–17.
- Yamanaka, S., and Blau, H.M. (2010). Nuclear reprogramming to a pluripotent state by three approaches. *Nature* 465, 704–712.
- Yáñez-Muñoz, R.J., Balaggan, K.S., MacNeil, A., Howe, S.J., Schmidt, M., Smith, A.J., Buch, P., MacLaren, R.E., Anderson, P.N., Barker, S.E., et al. (2006). Effective gene therapy with nonintegrating lentiviral vectors. *Nature Medicine* 12, 348–353.
- Yang, R.B., Foster, D.C., Garbers, D.L., and Fülle, H.J. (1995). Two membrane forms of guanylyl cyclase found in the eye. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92, 602–606.
- Yang, R.B., and Garbers, D.L. (1997). Two eye guanylyl cyclases are expressed in the same photoreceptor cells and form homomers in preference to heteromers. *J. Biol. Chem.* 272, 13738–13742.
- Yang, R.-B., Robinson, S.W., Xiong, W.-H., Yau, K.-W., Birch, D.G., and Garbers, D.L. (1999). Disruption of a Retinal Guanylyl Cyclase Gene Leads to Cone-Specific Dystrophy and Paradoxical Rod Behavior. *J. Neurosci.* 19, 5889–5897.
- Yau, K.W. (1994a). Cyclic nucleotide-gated channels: an expanding new family of ion channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 3481–3483.
- Yau, K.W. (1994b). Phototransduction mechanism in retinal rods and cones. The Friedenwald Lecture. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 35, 9–32.
- Ye, Z., Zhan, H., Mali, P., Dowey, S., Williams, D.M., Jang, Y.-Y., Dang, C.V., Spivak, J.L., Moliterno, A.R., and Cheng, L. (2009). Human-induced pluripotent stem cells from blood cells of healthy donors and patients with acquired blood disorders. *Blood* 114, 5473–5480.
- Yoo, A.S., Sun, A.X., Li, L., Shcheglovitov, A., Portmann, T., Li, Y., Lee-Messer, C., Dolmetsch, R.E., Tsien, R.W., and Crabtree, G.R. (2011). MicroRNA-mediated conversion of human fibroblasts to neurons. *Nature* 476, 228–231.
- Yoon, T.-M., Chang, B., Kim, H.-T., Jee, J.-H., Kim, D.-W., and Hwang, D.-Y. (2010). Human embryonic stem cells (hESCs) cultured under distinctive feeder-free culture conditions display global gene expression patterns similar to hESCs from feeder-dependent culture conditions. *Stem Cell Rev* 6, 425–437.

- Yoonessi, A., and Yoonessi, A. (2011). Functional assessment of magno, parvo and konio-cellular pathways; current state and future clinical applications. *J Ophthalmic Vis Res* 6, 119–126.
- Young, R.W. (1967). The renewal of photoreceptor cell outer segments. *J. Cell Biol.* 33, 61–72.
- Young, R.W. (1971). The renewal of rod and cone outer segments in the rhesus monkey. *J. Cell Biol.* 49, 303–318.
- Young, R.W., and Bok, D. (1969). Participation of the retinal pigment epithelium in the rod outer segment renewal process. *J. Cell Biol.* 42, 392–403.
- Yu, J., Chau, K.F., Vodyanik, M.A., Jiang, J., and Jiang, Y. (2011). Efficient feeder-free episomal reprogramming with small molecules. *PLoS ONE* 6, e17557.
- Yu, J., Hu, K., Smuga-Otto, K., Tian, S., Stewart, R., Slukvin, I.I., and Thomson, J.A. (2009). Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences. *Science* 324, 797–801.
- Yu, J., Vodyanik, M.A., He, P., Slukvin, I.I., and Thomson, J.A. (2006). Human embryonic stem cells reprogram myeloid precursors following cell-cell fusion. *Stem Cells* 24, 168–176.
- Yu, J., Vodyanik, M.A., Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J.L., Tian, S., Nie, J., Jonsdottir, G.A., Ruotti, V., Stewart, R., et al. (2007). Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 318, 1917–1920.
- Yu, Y., Yan, J., Zhang, Q., Yan, L., Li, M., Zhou, Q., and Qiao, J. (2012). Successful reprogramming of differentiated cells by somatic cell nuclear transfer, using in vitro-matured oocytes with a modified activation method. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*.
- Yzer, S., Leroy, B.P., De Baere, E., De Ravel, T.J., Zonneveld, M.N., Voesenek, K., Kellner, U., Ciriano, J.P.M., De Faber, J.-T.H.N., Rohrschneider, K., et al. (2006). Microarray-based mutation detection and phenotypic characterization of patients with Leber congenital amaurosis. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 47, 1167–1176.
- Zahabi, A., Shahbazi, E., Ahmadi, H., Hassani, S.-N., Totonchi, M., Taei, A., Masoudi, N., Ebrahimi, M., Aghdami, N., Seifinejad, A., et al. (2012). A New Efficient Protocol for Directed Differentiation of Retinal Pigmented Epithelial Cells from Normal and Retinal Disease Induced Pluripotent Stem Cells. *Stem Cells and Development*.
- Zanella, F., Lorens, J.B., and Link, W. (2010). High content screening: seeing is believing. *Trends Biotechnol.* 28, 237–245.
- Zarbin, M.A. (2004). Current concepts in the pathogenesis of age-related macular degeneration. *Arch. Ophthalmol.* 122, 598–614.
- Zeit, C., Kloeckener-Gruissem, B., Forster, U., Kohl, S., Magyar, I., Wissinger, B., Mátyás, G., Borruat, F.-X., Schorderet, D.F., Zrenner, E., et al. (2006). Mutations in CABP4, the gene encoding the Ca<sup>2+</sup>-binding protein 4, cause autosomal recessive night blindness. *Am. J. Hum. Genet.* 79, 657–667.
- Zeng, X., and Rao, M.S. (2007). Human embryonic stem cells: long term stability, absence of senescence and a potential cell source for neural replacement. *Neuroscience* 145, 1348–1358.
- Zernant, J., Külm, M., Dharmaraj, S., Den Hollander, A.I., Perrault, I., Preising, M.N., Lorenz, B., Kaplan, J., Cremers, F.P.M., Maumenee, I., et al. (2005). Genotyping microarray (disease chip) for Leber congenital amaurosis: detection of modifier alleles. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 46, 3052–3059.

- Zhang, J., Li, W., Trexler, E.B., and Massey, S.C. (2002). Confocal analysis of reciprocal feedback at rod bipolar terminals in the rabbit retina. *J. Neurosci.* 22, 10871–10882.
- Zhang, L., Ye, J.-S., Decot, V., Stoltz, J.-F., and De Isla, N. (2012a). Research on stem cells as candidates to be differentiated into hepatocytes. *Biomed Mater Eng* 22, 105–111.
- Zhang, X., Stojkovic, P., Przyborski, S., Cooke, M., Armstrong, L., Lako, M., and Stojkovic, M. (2006). Derivation of human embryonic stem cells from developing and arrested embryos. *Stem Cells* 24, 2669–2676.
- Zhang, Y., Wan, S.-H., Wu, G.-J., and Zhang, X.-L. (2012b). Magnetic resonance diffusion tensor imaging and diffusion tensor tractography of human visual pathway. *Int J Ophthalmol* 5, 452–458.
- Zhao, H., Zhang, J.-Y., Yang, Z.-C., Liu, M., Gang, B.-Z., and Zhao, Q.-J. (2011). Nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase 1 gene NMNAT1 regulates neuronal dendrite and axon morphogenesis in vitro. *Chin. Med. J.* 124, 3373–3377.
- Zhao, Y., Hong, D.-H., Pawlyk, B., Yue, G., Adamian, M., Grynberg, M., Godzik, A., and Li, T. (2003). 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.
- Zhao, Y., Yin, X., Qin, H., Zhu, F., Liu, H., Yang, W., Zhang, Q., Xiang, C., Hou, P., Song, Z., et al. (2008). Two supporting factors greatly improve the efficiency of human iPSC generation. *Cell Stem Cell* 3, 475–479.
- Zhong, B., Watts, K.L., Gori, J.L., Wohlfahrt, M.E., Enssle, J., Adair, J.E., and Kiem, H.-P. (2011). Safeguarding nonhuman primate iPS cells with suicide genes. *Mol. Ther.* 19, 1667–1675.
- Zhou, H., Wu, S., Joo, J.Y., Zhu, S., Han, D.W., Lin, T., Trauger, S., Bien, G., Yao, S., Zhu, Y., et al. (2009). Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins. *Cell Stem Cell* 4, 381–384.
- Zhou, Q., Renard, J.-P., Le Friec, G., Brochard, V., Beaujean, N., Cherifi, Y., Fraichard, A., and Cozzi, J. (2003). Generation of fertile cloned rats by regulating oocyte activation. *Science* 302, 1179.
- Znoiko, S.L., Crouch, R.K., Moiseyev, G., and Ma, J.-X. (2002). Identification of the RPE65 protein in mammalian cone photoreceptors. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 43, 1604–1609.
- Zuber, M.E., Gestri, G., Viczian, A.S., Barsacchi, G., and Harris, W.A. (2003). Specification of the vertebrate eye by a network of eye field transcription factors. *Development* 130, 5155–5167.