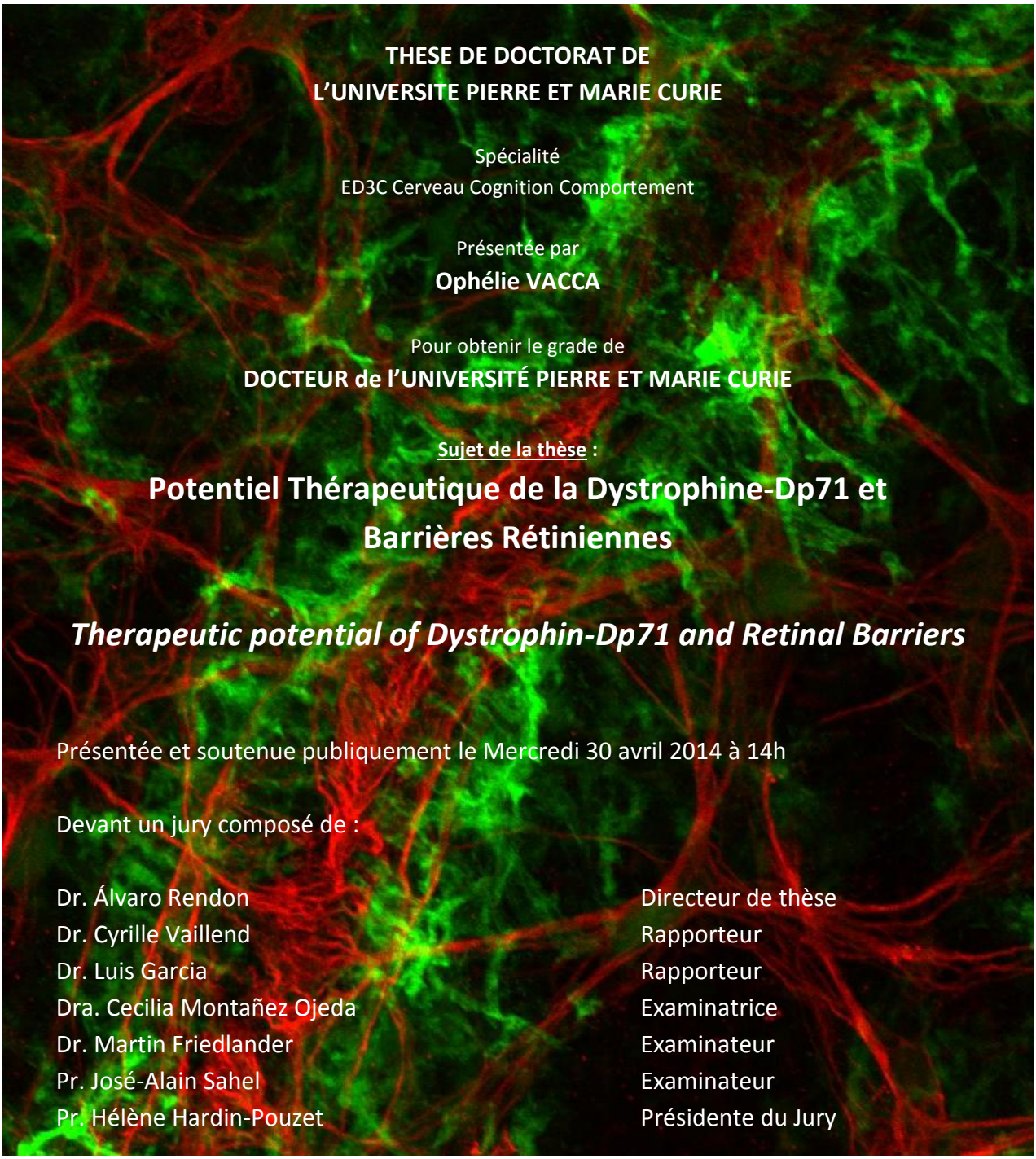


THESE DE DOCTORAT DE
L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE

Spécialité
ED3C Cerveau Cognition Comportement

Présentée par
Ophélie VACCA

Pour obtenir le grade de
DOCTEUR de l'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE

Sujet de la thèse :

Potentiel Thérapeutique de la Dystrophine-Dp71 et Barrières Rétiniennes

Therapeutic potential of Dystrophin-Dp71 and Retinal Barriers

Présentée et soutenue publiquement le Mercredi 30 avril 2014 à 14h

Devant un jury composé de :

Dr. Álvaro Rendon	Directeur de thèse
Dr. Cyrille Vaillend	Rapporteur
Dr. Luis Garcia	Rapporteur
Dra. Cecilia Montañez Ojeda	Examinatrice
Dr. Martin Friedlander	Examinateur
Pr. José-Alain Sahel	Examinateur
Pr. Hélène Hardin-Pouzet	Présidente du Jury

Université Pierre & Marie Curie - Paris 6
Bureau d'accueil, inscription des doctorants et base de données
Esc G, 2ème étage
15 rue de l'école de médecine
75006 PARIS

Tél. Secrétariat : 01 44 27 28 10
Fax : 01 44 27 23 95
Tél. pour les étudiants de A à EL : 01 44 27 28 07
Tél. pour les étudiants de EM à ME : 01 44 27 28 05
Tél. pour les étudiants de MF à Z : 01 44 27 28 02
E-mail : scolarite.doctorat@upmc.fr

Je dédicace cette thèse à Dahmane, ma moitié.

Tu m'as portée et supportée pour que j'aille toujours plus loin,

tu m'as donné confiance en moi et sans ton amour je n'y serais jamais parvenue.

REMERCIEMENTS

Je souhaite remercier en premier lieu tous les membres du jury qui me font l'honneur d'évaluer ce travail. Je remercie très sincèrement M. Cyrille Vaillend et M. Luis Garcia pour avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail et pour y consacrer un temps précieux. J'adresse également mes sincères remerciements à Mme Hélène Hardin-Pouzet pour me faire l'honneur d'être présidente de ce jury.

Queria agradecer a la Dra. Cecilia Montañez por aceptar ser parte de mi jurado de tesis sino también por darme la bienvenida con los brazos abiertos en su laboratorio. Viví una experiencia muy gratificante, tanto desde el punto de vista científico que personal. Una vez más, muchas gracias.

I would like to thank Mr. Martin Friedlander for doing me the honor to be part of my thesis committee and, I hope, for the beginning of a long and productive collaboration.

Je tiens à remercier M. José-Alain Sahel pour m'avoir accueillie dans un environnement de travail aussi agréable et pour avoir accepté de faire parti de mon jury de thèse.

Un immense merci à mon directeur de thèse, Alvaro Rendon, qui m'a transmis sa passion pour la recherche, m'a donné l'envie de me lancer dans ce projet de thèse si passionant, a cru en mes capacités dès le début, et m'a fait confiance pour le mener à bien. J'espère que ce projet qui nous tient tant à cœur se poursuivra encore longtemps, qu'il ira le plus loin possible et je sais que vous continuerez à le défendre avec un enthousiasme à toute épreuve. Si je ne vous avez pas rencontré il y a déjà cinq ans, je n'aurais certainement pas fait

de thèse et je n'aurais pas vécu une expérience aussi gratifiante. J'ai trouvé ma voie grâce à vous. Encore une fois, merci pour tout.

Muchísimas gracias a Yonathan Garfias quien fue para mi un guía durante mis primeros meses al Instituto de la Visión y quien me pasó su entusiasmo por la investigación.

Je souhaite évidemment remercier Deniz Dalkara grâce à qui ce projet a pris une toute autre envergure. Sans ton expérience des AAV, toutes ces découvertes n'auraient pas vu le jour. Merci aussi pour ta disponibilité et tes conseils pour l'écriture des articles.

Merci à Ramin Tadayoni, à Abdoulaye Sene, à Patrice Fort et à Cécile Dalloz qui m'ont précédé comme doctorants et dont les travaux ont enrichit considérablement nos connaissances sur le rôle de la Dp71 dans la rétine ouvrant les perspectives thérapeutiques sur lesquelles je me suis appuyée tout au long de cette thèse.

Je ne manquerai pas de remercier Alexis Bemelmans qui m'a beaucoup aidé lors de l'écriture de mon projet de thèse pour mes multiples demandes de bourse doctorale.

Merci à Adeline Berger, ma collègue de bureau qui a beaucoup compté pour moi ces quatre dernières années, qui est une excellente scientifique dont les conseils ont été précieux, et une amie qui m'a soutenue et supportée dans les moments de galère. Nos longues discussions vont me manquer.

Merci à tous mes collègues et amis de la team Dp71 qui m'ont aidé au quotidien et avec qui j'ai passé de très bons moments : A Marie Darche, la toute première étudiante que j'ai encadrée en BTS et qui est devenue une ingénieure indispensable à notre équipe et surtout une amie très proche. A Romain Bénard, Sijia Cao, Gabriela Ortiz, Brahim El-Mathari,

Hugo Charles-Massance, Sophie Bonin, et Audrey Giocanti pour vos conseils, votre temps, votre soutien, votre bonne humeur et votre générosité.

Muchas gracias a Jorge por su ayuda científica en varios momentos de mi tesis, por su disponibilidad para responder a mis preguntas, por su hospitalidad durante mi estancia en México y por enseñarme las inyecciones de ratón P1 con paciencia al principio de mi Máster2.

Merci à tous mes collègues de l'Institut de la Vision pour votre amitié et votre soutien: Stéphane, Shulong, Peggy, Mélissa, Cécile, Zakia, Emeline, Laura, Célia, Larissa, Déborah, Charlotte, Elisa, Bertrand, Angélique, Antoine, Katie, Aïcha, Firas etc. Merci à tous ceux ou celles que j'ai omis involontairement de citer.

Muchas gracias a Rocío y a Candelaria quienes fueron compañeras de doctorado muy agradables. Muchas gracias a todos los estudiantes y investigadores mexicanos con los que he tenido el placer de trabajar o de descubrir la cuidad de México, la cultura y sobretodo la cocina mexicana: José, Alejandra, Lourdes, Griselda, Océlotl, Mayram, Cesar, Sandra, Brenda, Víctor, seguramente olvido a alguien y pido disculpas…

Enfin, je tiens à remercier l'Association Française contre les myopathies qui soutien notre équipe depuis plusieurs années et qui m'a accordé sa confiance pour quatre années consécutives. L'ensemble des résultats que j'ai obtenu, n'aurait pas vu le jour sans votre appui. Je tiens également à remercier ECOS-Nord pour son soutien favorisant notre collaboration avec le laboratoire du Dr Cecilia Montañez sur un projet commun.

LISTE DES ABREVIATIONS

AAV	adeno-associated virus/virus adéno-associé
AQP	aquaporine
BHR	barrière hémato-rétinienne
CCG	couche des cellules ganglionnaires
CGM	cellule gliale de müller
CNE	couche nucléaire externe
CNI	couche nucléaire interne
CPE	couche plexiforme externe
CPI	couche plexiforme interne
DAPs	dystrophin associated proteins/protéines associées à la dystrophine
DB	dystrobrevine
DG	dystroglycane
DMD	dystrophie musculaire de Duchenne
Dp	dystrophin protein
EPR	épithélium pigmentaire rétinien
FN	fibres nerveuses
GS	glutamine synthétase
ITR	inverted terminal repeat/séquences inversées répétées
Kir	inwardly rectifying potassium channel/canal potassium à rectification entrante
MLE	membrane limitante externe
MLI	membrane limitante interne
SE	segment externe

SG sarcoglycane

shRNA small hairpin ribonucleic acid/ petits ARN en épingle à cheveux

SNC système nerveux central

SNP système nerveux périphérique

SP segments des photorécepteurs

SYN syntrophine

Up utrophin protein

SOMMAIRE

I. Préface 13

II. L'Œil 18

1) Présentation générale 18

2) La Rétine 20

a) Organisation Antéro-Postérieure 20

b) Organisation Centre/Périphérie. 21

c) Organisation Cellulaire 23

III. La Cellule Gliale de Müller 26

1) Propriétés fonctionnelles et Pathologies 26

2) Homéostasie du potassium et de l'eau 28

3) Barrière Hémato-Rétinienne 30

IV. La Dystrophine Dp71 33

1) Introduction 33

2) Ses Isoformes 36

3) Régulation de son Expression 41

4) Son Rôle dans le Système Nerveux Central 44

5) Son Rôle dans la Rétine 48

a) Localisation 48

b) Les Protéines Associées à la Dp71 (DAPs) 52

c) Physiopathologie de la souris Dp71-null 55

i. Ischémie et ERG 55

ii. Angiogenèse Normale et Pathologique 56

iii. Homéostasie et Barrière Hémato-Rétinienne 59

V. L'AAV en Thérapie Génique et Barrières Rétiniennes 62

1) Biologie des Virus Adéno-Associés 62

2) AAV et Transfert de Gènes 64

3) AAV dans la Rétine 66

4) Cibler les Cellules Gliales de Müller 74

VI. Résultats personnels 78

1) Transduction par AAVs de la rétine Dp71-null présentant une rupture de la barrière hémato-rétinienne (Article publié dans GLIA) 78

a) Situation du Sujet 78

b) Résultats 80

c) Conclusion 81

2) La restauration de l'expression de la Dp71 chez la souris Dp71-null permet de rétablir une perméabilité hémato-rétinienne physiologique et de réabsorber l'œdème rétinien (Article en préparation) 118

a) Situation du Sujet 118

b) Résultats 120

c) Conclusion 121

VII. Discussion & Perspectives 159

1) L'Absence de Dp71 Fragilise la MLI et Favorise la Thérapie Génique (Annexe 1 - Brevet Inserm N°13 305 914.7 déposé le 28 juin 2013) 159

2) La Souris Dp71-null : Un Modèle d'Œdème Rétinien 163

3) La Restauration de l'Expression de la Dp71 163

4) Surexpression de la Dp71 et du Complexe Protéique Dépendant de la Dp71 163

a) Restauration de la BHR et Résorption de l'Œdème Rétinien 165

b) La Membrane Limitante Interne 165

c) Effet Potentiel sur la Néoangiogenèse 166

5) L'Inhibition de la Dp71 167

VIII. Annexes 170

1) Méthode d'expression par injection intravitréenne d'un vecteur contenant un polynucléotide d'intérêt en combinaison avec un inhibiteur de l'expression de la Dp71 (Brevet Inserm) 170

2) Etude de la fonction des isoformes de la Dp71 dans les tissus neuronaux (Projet ECOS-Nord) 185

IX. Table des Illustrations 188

1) Introduction 188

2) Article 1 : AAV Mediated Gene Delivery In Dp71-Null Mouse Model With Compromised Barriers 192

3) Article 1 Supplemental Figures 194

4) Article 2 : AAV-Mediated Gene Therapy In Dystrophin-Dp71 Deficient Mouse Leads To Blood-Retinal Barrier Restoration And Edema Reabsorption 195

5) Article 2 Supplemental Figures 196

6) Annexes 197

X. Bibliographie 199

XI. Résumé 222

XII. Summary 223

PRÉFACE

I. Préface

La barrière hémato-rétinienne (BHR) joue un rôle important dans la régulation homéostatique du microenvironnement dans la rétine. Elle est constituée de composants externes et internes. La BHR interne est formée par des jonctions serrées entre les cellules endothéliales des capillaires rétiniens alors que la BHR externe est formée par des jonctions serrées entre les cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien. Les cellules gliales de Müller (CGM), les astrocytes et les péricytes participent au bon fonctionnement de la BHR interne. Dans de nombreuses pathologies incluant la rétinopathie diabétique, les occlusions veineuses rétiniennes et certaines pathologies respiratoires, l'hypoxie de la rétine entraîne une rupture de la BHR interne. Cette altération de la BHR interne associée à une augmentation de la perméabilité vasculaire provoque un œdème vasogénique, un décollement de la rétine et des dommages tissulaires, avec différentes conséquences sur la fonction visuelle.

Expérimentalement, le décollement de la rétine entraîne une activation rapide des cellules gliales mais également des modifications morphologiques, biochimiques et fonctionnelles de ces cellules (Francke et al. 2001; Geller et al. 2001; Uhlmann et al. 2003). Ces modifications sont associées à une délocalisation des canaux potassiques Kir4.1 et une baisse de l'expression des canaux aqueux AQP4. Chez la souris, le décollement de rétine entraîne une baisse rapide de l'expression de la dystrophine Dp71 (Sene et al. 2009). Des résultats similaires ont été observés lorsque l'expression de la Dp71 est invalidée génétiquement chez la souris. Chez la souris Dp71-null, le décollement de la rétine entraîne une gliose et une hypertrophie des CGM. Ces modifications sont associées à une délocalisation des canaux potassiques Kir4.1 et une baisse de l'expression des canaux

aqueux AQP4 (Fort et al. 2008). La Dp71 étant responsable de l'agrégation et de la localisation précise de Kir4.1 et d'AQP4 dans la CGM à travers un complexe macromoléculaire, l'altération de son expression dans un contexte pathologique a pour conséquence une redistribution de ces canaux. Les mécanismes qui entraînent la baisse de la Dp71 dans les CGM de la rétine décollée ne sont pas connus mais cette baisse pourrait être induite par l'ischémie relative de la rétine après le décollement de la rétine (Li et al. 2001).

Le décollement de rétine est souvent associé à une accumulation de fluide dans le tissu rétinien (Jackson et al. 2003). L'altération de la fonction d'absorption des CGM suite à un décollement contribue à la formation d'un œdème rétinien chronique. Dans la rétine murine expérimentalement décollée, la prise en charge de l'eau par les CGM est altérée et elle se traduit par un gonflement de ces cellules lorsqu'elles sont soumises à un stress osmotique alors que ce stress n'a aucun effet sur des CGM issues de rétine saine. Notre laboratoire a montré que les CGM de souris Dp71-null présentent les mêmes caractéristiques physiologiques que celles issues de la rétine décollée. L'absence de la Dp71, d'origines différentes, dans ces CGM entraînerait une augmentation de facteurs pathogéniques qui provoquent la formation d'un œdème intracellulaire.

Dans la rétine, il existe un lien spatial étroit entre les CGM et les vaisseaux sanguins suggérant un rôle important de ces cellules dans la formation et le maintien de la barrière hémato-rétinienne mais également dans la capture de nutriments et l'élimination des métabolites, en condition normale (Distler and Dreher 1996; Tout et al. 1993). L'absence de la Dp71 entraîne des altérations physiologiques et morphologiques des CGM, plus particulièrement au niveau de l'interface glie-vaisseaux. Ainsi, dans la rétine de souris Dp71-null, la perméabilité vasculaire est fortement augmentée par rapport à la rétine de souris sauvage. La Dp71 étant très impliquée dans la régulation de l'homéostasie des CGM, son

absence aurait un impact sur la régulation de la BHR effectuée par les CGM. En condition hypoxique ou inflammatoire, les CGM augmentent leur sécrétion de VEGF, un facteur de croissance de l'endothélium vasculaire qui rompt la BHR (Eichler et al. 2000; Kaur et al. 2006; Kaur et al. 2008). L'altération des caractéristiques physiologiques des CGM modifierait alors l'expression de divers facteurs modulant la perméabilité de la BHR.

L'ensemble des caractéristiques de la rétine Dp71-null révélées par notre laboratoire au cours de ces dix dernières années nous ont permis d'envisager d'utiliser cette souris transgénique comme modèle animal des pathologies rétiniennes associées à une rupture de la BHR, telles que la rétinopathie diabétique, la dégénérescence maculaire liée à l'âge ou les occlusions veineuses rétiniennes. Nous nous sommes intéressés à la Dp71 comme cible thérapeutique potentielle dans le but de rétablir une perméabilité normale de la BHR.

La question que nous nous posons est la suivante : la restauration de l'expression de la Dp71 serait-elle capable de restaurer une BHR physiologique ? Nous avons choisit d'utiliser les virus adéno-associés, de plus en plus employés en thérapie génique, pour pouvoir délivrer spécifiquement la Dp71 aux CGM ce qui nous a aussi permis de mieux comprendre le rôle de la Dp71 dans la rétine.

Avant de présenter les résultats relatifs à ce travail, une synthèse de la bibliographie actuelle nous permettra de placer les objectifs de cette étude. Nous commencerons par décrire le système visuel, la cellule gliale de Müller qui est au cœur de la régulation de la physiologie rétinienne, puis la Dp71 et les troubles consécutifs à son absence. Une dernière partie sera consacrée à la présentation des AAV utilisés en thérapie génique. Par la suite, nous présenterons les résultats obtenus sous la forme d'un article publié dans GLIA ainsi que d'un article en cours de préparation. Nous terminerons enfin par une dernière section

présentant l'intégration des résultats dans les connaissances actuelles et les perspectives envisagées qui nous ont permis de soumettre un brevet.

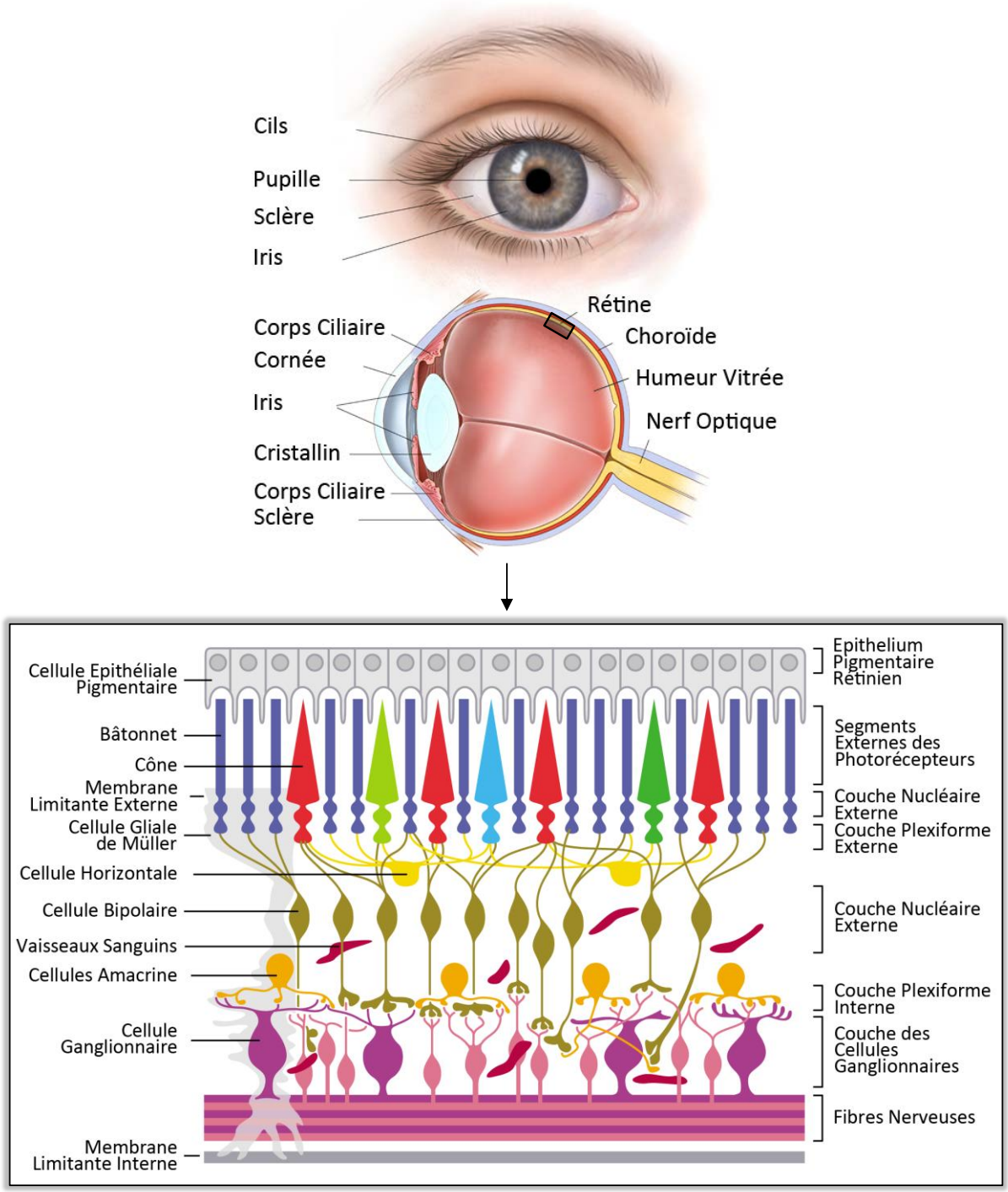
INTRODUCTION

II. L'Œil

1) Présentation générale

Lorsque l'on regarde les yeux de quelqu'un, nous pouvons facilement voir plusieurs structures : (i) la pupille, une ouverture qui semble noire (à cause des pigments d'absorption de la rétine) et qui permet à la lumière d'entrer dans l'œil ; (ii) l'iris, un muscle circulaire coloré qui contrôle la taille de la pupille afin de laisser pénétrer plus ou moins de lumière en fonction de l'environnement ; (iii) la cornée, une surface externe transparente qui recouvre à la fois la pupille et l'iris, et qui est la première et la plus puissante lentille du système optique et permet, avec le cristallin la production d'une image nette au niveau des photorécepteurs de la rétine ; et (iv) la sclère, la partie blanche de l'œil, qui est en continuité avec la cornée et fait partie de la paroi de support du globe oculaire (Figure 1, haut).

La première étape de la vision consiste à capter l'information lumineuse et à la traiter avant de la faire parvenir aux aires intégratives supérieures. Cette étape se passe dans la structure dédiée à cet effet : l'œil. On peut diviser cette étape en deux parties : l'acquisition de l'information lumineuse dans le segment antérieur de l'œil puis la transduction de l'information par la rétine qui va ensuite la transmettre vers les aires visuelles du cerveau. L'œil est composé de diverses parties de natures et fonctions très différentes (Figure 1). Le stimulus lumineux va traverser quatre compartiments de l'œil avant d'être « réceptionné » au niveau d'un cinquième: (i) la cornée : une membrane transparente directement en contact avec l'air ambiant ; (ii) l'humeur aqueuse et l'humeur vitrée : des liquides transparents, filtrés et renouvelés en permanence ; (iii) le cristallin : tissu épithélial transparent très spécialisé ; (iv) la rétine : tissu nerveux tapissant le fond de l'œil (Figure 1, milieu).



<u>Figure 1</u> : L'Œil et la Rétine. (Haut) Partie visible de l'œil, (Milieu) Coupe sagittale horizontale de l'œil humain adulte, (Bas) Organisation stratifiée de la rétine.

2) La Rétine

La rétine est l'organe neurosensoriel qui permet la réception et la transformation de l'information visuelle puis sa transmission sous la forme d'un message nerveux jusqu'aux structures cérébrales supérieures. L'organisation de la rétine peut être décrite selon deux axes, l'un allant de la partie postérieure vers la partie antérieure et l'autre du centre vers la périphérie.

a) Organisation Antéro-Postérieure

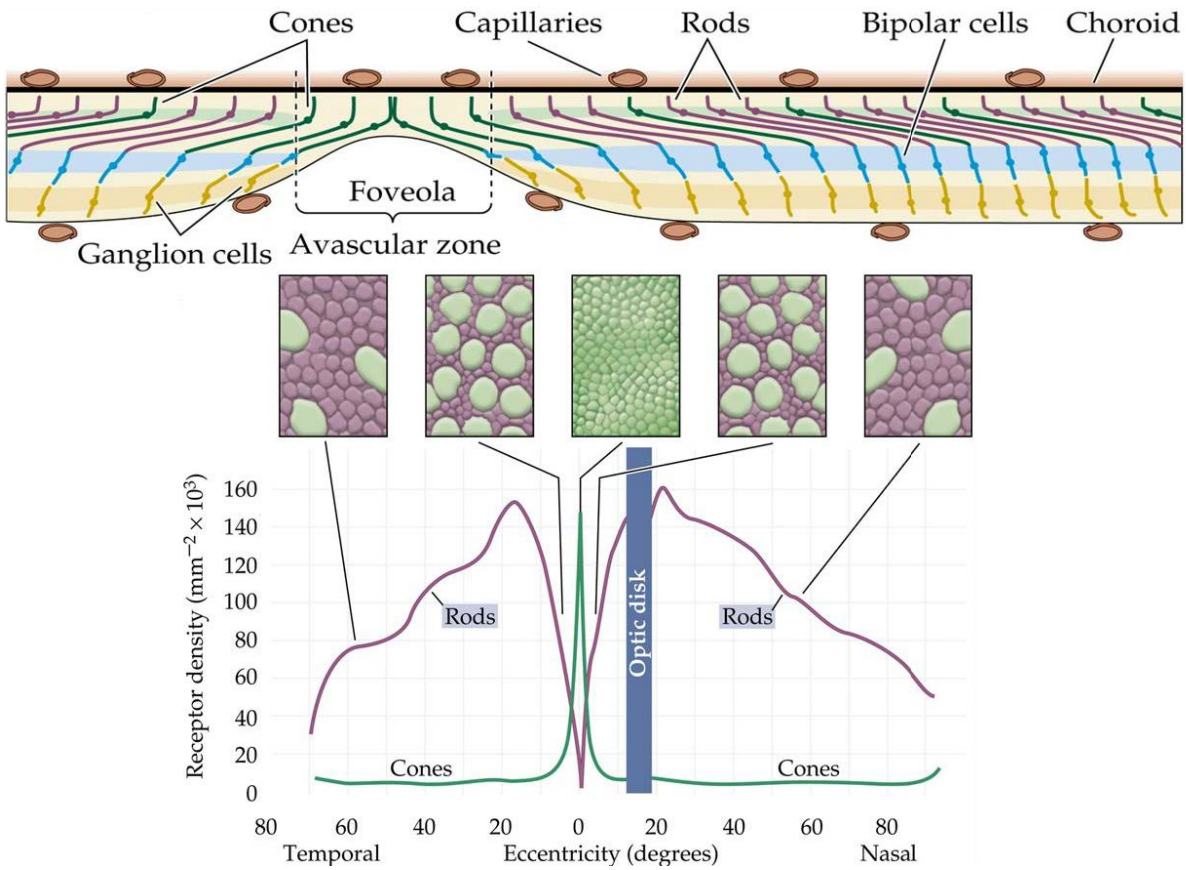
Les cellules de la rétine et leurs prolongements sont stratifiés en dix couches qui peuvent être identifiées histologiquement (Figure 1, bas).

- L'épithélium pigmentaire rétinien (EPR), formée d'une monocouche de cellules épithéliales séparant les segments externes des photorécepteurs de la choroïde.
- La couche des segments externes des photorécepteurs (SE).
- La membrane limitante externe (MLE), formée par de nombreuses zonula adherens entre les CGM et les photorécepteurs.
- La couche nucléaire externe (CNE), composée par les corps cellulaires des photorécepteurs.
- La couche plexiforme externe (CPE), formée des synapses des photorécepteurs avec les cellules bipolaires, les cellules horizontales et les cellules interplexiformes.
- La couche nucléaire interne (CNI), composée des corps cellulaires des cellules bipolaires, horizontales, amacrines et interplexiformes ainsi que les noyaux des cellules gliales de Müller (CGM).
- La couche plexiforme interne (CPI), formée des synapses entre les cellules bipolaires, amacrines et ganglionnaires.

- La couche des cellules ganglionnaires (CG), qui contient aussi les cellules amacrines déplacées.
- La couche des fibres nerveuses (FN), correspondant aux axones des cellules ganglionnaires allant former le nerf optique, qui contient aussi les astrocytes.
- La membrane limitante interne (MLI), constituée des pieds des cellules gliales de Müller.

b) Organisation Centre/Périphérie.

La partie centrale de la rétine est la plus importante pour les fonctions visuelles et comporte donc des modifications structurales. La fovéa, avec en son centre la fovéola, est une petite dépression de la rétine où se situe le point focal postérieur du système optique. Cette petite dépression est due à un déplacement centrifuge des cellules de la rétine interne et se caractérise par l'absence de photorécepteurs de type bâtonnet ainsi que de vaisseaux sanguins. Comme le montre la figure 2, le nombre de photorécepteurs de type cône diminue alors que celui de type bâtonnet augmente progressivement avant de décroître lui aussi, en allant vers la périphérie de la rétine. Le point aveugle ou disque optique, qui correspond au départ du nerf optique, est lui dépourvu de photorécepteurs. La région parafovéale se caractérise par une grande accumulation de cellules de la rétine interne. La couche des cellules ganglionnaires devient une monocouche à la fin de la région périfovéale marquant la fin de la rétine centrale.



<u>Figure 2</u> : Organisation centre/périphérie de la rétine humaine. Le nerf optique (optic disk) n'est pas l'axe visuel mais c'est la fovéa. Le centre de la fovéa (fovéola) est une zone avasculaire alors que le reste de la rétine est très vascularisé. En outre, la fovéola est constituée exclusivement de photorécepteurs de type cônes. Plus on se déplace du centre de la rétine vers sa périphérie plus la balance cônes/bâtonnets s'inverse.

c) Organisation Cellulaire

La rétine neurale est constituée de six types principaux de neurones : les photorécepteurs, les cellules horizontales, les cellules bipolaires, les cellules amacrines, les cellules interplexiformes et les cellules ganglionnaires (Figure 1, bas). Les cellules photoréceptrices captent l'information lumineuse via leur segment externe. La rétine assure alors la conversion du signal lumineux en signal nerveux et participe également au traitement de cette information, particulièrement chez les oiseaux et les vertébrés à sang froid. Chez les mammifères, la plus grande partie du traitement de l'information se fait dans les aires corticales supérieures vers lesquelles les axones des cellules ganglionnaires dirigent l'information.

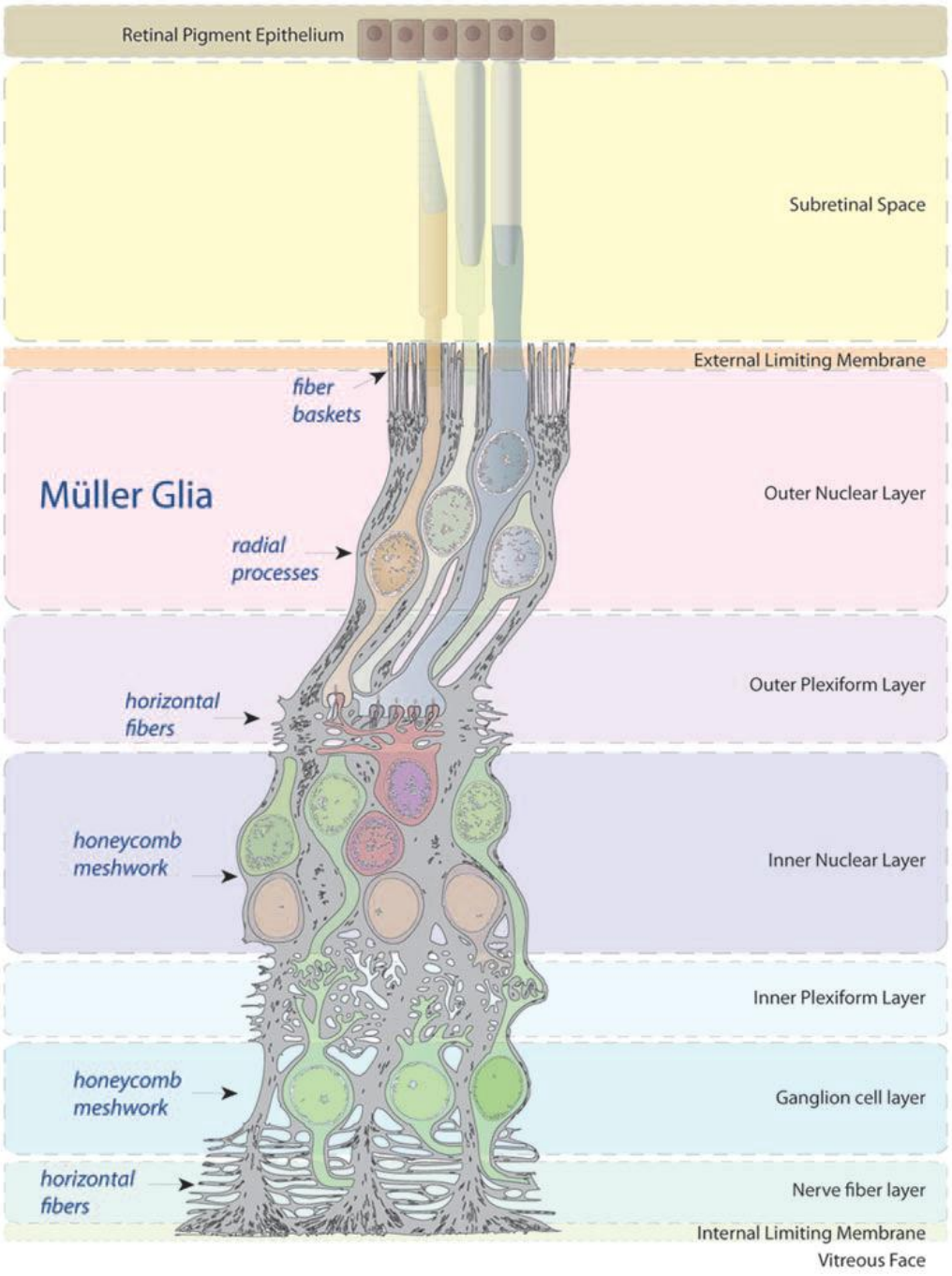
Quatre types de cellules gliales ont été décrites dans la rétine : les cellules gliales de Müller (CGM), les astrocytes, la microglie et chez certaines espèces, des cellules myélinisantes qui entourent les cellules ganglionnaires.

Les cellules gliales de Müller constituent les cellules gliales principales de la rétine. Alors que leurs corps cellulaires se situent dans la couche nucléaire interne, elles traversent la rétine de part en part. Leurs prolongements vont entourer aussi bien les corps cellulaires que les prolongements et les synapses des neurones de la rétine, permettant leur isolement électrique et neurochimique (Figure 3). Ces prolongements vont également entourer les vaisseaux sanguins, participant ainsi à la barrière hémato-rétinienne. La membrane limitante externe est formée par les extrémités distales des CGM autour des photorécepteurs. Sur ce plan, les CGM communiquent entre elles par des jonctions de type zonulae adherens chez les primates et par des jonctions gap chez les vertébrés inférieurs. Des extensions membranaires, microvillis, sont émises par les CGM dans l'espace sous rétinien permettant une facilitation du passage des ions et des métabolites. L'extrémité proximale des CGM est

appelée le « pied » et leur interaction forme la délimitation avec le corps vitré : la membrane limitante interne. Cette membrane couvre la totalité de la rétine, y compris la fovéa, indiquant l'importance de celle-ci. En plus de cette fonction de support des neurones de la rétine les CGM jouent un rôle important dans la transmission de l'information visuelle (Newman 2004).

Les astrocytes ont une forme en étoile et sont principalement présents dans la couche des fibres nerveuses. Leurs prolongements entrent en contact avec les cellules ganglionnaires et les vaisseaux sanguins.

On retrouve normalement un faible nombre de cellules de la microglie réticulo-endothéliale dans la rétine et uniquement dans la couche des axones des cellules ganglionnaires. Dans des conditions pathologiques, ces cellules phagocytaires très mobiles peuvent être retrouvées partout dans la rétine.



<u>Figure 3</u> : Représentation de l'intégration de la cellule gliale de Müller autour des neurones de la rétine. Illustration des cellules gliales de Müller traversant toute la rétine, où elles entourent tous les types de neurones de la rétine depuis les cellules ganglionnaires (en bas) jusqu'aux photorécepteurs (en haut). Image modifiée à partir de l'histologie de l'œil humain, atlas et manuels scolaires. Hogan, Michael J., Jorge A. Alvarado, Joan Esperson Weddell. Philadelphia: W. B. Saunders, 1971.

III. La Cellule Gliale de Müller

1) Propriétés fonctionnelles et Pathologies

La cellule gliale de Müller (CGM) représente la principale glie de la rétine des vertébrés et elle constitue même la seule cellule macrogliale dans les rétines avasculaires chez les vertébrés incluant les mammifères. Les CGM constituent un lien anatomique entre les neurones rétiniens et des compartiments tels que les vaisseaux sanguins rétiniens, le vitré et l'espace sous-rétinien avec lesquels ces neurones échangent des molécules. Ce lien n'est pas seulement anatomique mais également fonctionnel. A cet effet, les CGM possèdent une multitude de canaux ioniques, récepteurs à ligand, transporteurs transmembranaires et des enzymes (Newman and Reichenbach 1996) (Sarthy and Ripps 2001). La plupart de ces molécules étant quasi-exclusivement exprimées dans les CGM.

Une des caractéristiques majeure des CGM réside en la grande conductance de leur membrane au K+. Ceci est largement dû à la présence d'une forte densité de canaux K+ (Kir4.1) au niveau de la membrane des CGM. Il a été montré que tout blocage des canaux K+ entraîne une dépolarisation de la membrane des CGM (Newman and Karwoski 1989; Pannicke et al. 2006). La fonction de support des neurones par les cellules gliales nécessite une association d'un potentiel de membrane de repos très négatif (-80 mV) et une forte conductance au K+.

Au cours du développement de la rétine, les CGM jouent un rôle essentiel dans la création et le maintien de l'architecture neuro-rétinale (Willbold et al. 1997), le support de la survie neuronale et la régulation de la transmission de l'information visuelle (Newman and Reichenbach 1996; Reichenbach et al. 1993). Les CGM sont impliquées dans le métabolisme du glucose dans la rétine en fournissant aux neurones des nutriments tels que le

lactate/pyruvate pour leur métabolisme oxydatif (Poitry-Yamate et al. 1995; Tsacopoulos and Magistretti 1996) mais également dans l'élimination des déchets métaboliques. De plus les CGM régulent le flux sanguin et contribuent à la formation et au maintien de la barrière hémato-rétinienne (Paulson and Newman 1987; Tout et al. 1993). Les CGM participent aux processus de signalisation neuronale en capturant et recyclant les neurotransmetteurs (Matsui et al. 1999). Ces cellules expriment la CRALBP, une protéine qui convertit les trans-retinal en 11-cis-rétinol qui est par la suite utilisé par les photorécepteurs à cône. Ainsi les CGM seraient impliquées dans le recyclage des photopigments (Bunt-Milam and Saari 1983; Das et al. 1992). Contrairement aux neurones rétiniens qui présentent une sensibilité accrue à divers traumatismes, les CGM sont résistantes à l'ischémie, l'hypoxie ou l'hypoglycémie (Stone et al. 1999). Le métabolisme énergétique particulier des CGM leur permettrait de résister à la plupart des traumatismes rétiniens et de rester des acteurs majeurs dans les pathologies rétiniennes. Dans un contexte pathologique, les CGM pourraient moduler la réponse immune et inflammatoire, en produisant des cytokines (Caspi and Roberge 1989; Roberge et al. 1991). De plus les CGM peuvent phagocyter des fragments de cellules rétiniennes et les substances étrangères (Mano and Puro 1990; Stolzenburg et al. 1992). En réponse à presque toutes les altérations pathologiques de la rétine, les CGM s'activent et cette réaction est appelée : gliose. Cette activation nécessite probablement une interaction entre les CGM et les microglies qui ont la capacité de moduler la production, par les CGM, de facteurs trophiques qui promeuvent la mort ou la survie des cellules photoréceptrices (Harada et al. 2002).

Des études ont permis de montrer que la destruction sélective des CGM au début de la période postnatale conduit à une dysplasie rétinienne, une mort des photorécepteurs par apoptose et à un stade plus tardif, une dégénérescence rétinienne et une prolifération des

cellules de l'épithélium pigmentaire (Dubois-Dauphin et al. 2000). Plus récemment, d'autres études ont confirmé et complété ces observations sur le rôle crucial des CGM dans la rétine. Tout d'abord, l'ablation conditionnelle des CGM dans un modèle de souris transgénique provoque l'apoptose des photorécepteurs, une télengiectasie vasculaire, une rupture de la barrière hémato-rétinienne et plus tard une néovascularisation intrarétinienne (Shen et al. 2012a). Ensuite, l'ablation optogénétique des CGM par l'utilisation de virus adéno-associés (AAV) véhiculant un gène codant pour une protéine cytotoxique, KillerRed, induit une pathologie dégénérative progressive de la rétine caractérisée par les symptômes suivants : désorganisation de la rétine, augmentation de l'aire et du volume des vaisseaux sanguins rétiniens, formation de vaisseaux tortueux, apparition de fuites vasculaires, diminution des amplitudes photopiques et scotopiques des ERG (Byrne et al. 2013). Tous ces travaux ont permis de mettre en évidence le rôle des CGM dans le maintien de la structure et de la fonction rétinienne et leur implication dans la pathologie de la rétine.

2) Homéostasie du potassium et de l'eau

Les cellules gliales de Müller sont responsables de la régulation de l'homéostasie du K+ rétinien et grâce au tamponnage spatial du courant potassique, elles neutralisent les variations locales de [K+] extracellulaire résultant de l'activité des neurones (Newman and Reichenbach 1996; Newman et al. 1984). Une dérégulation de l'homéostasie du K+ rétinien entraîne une hyperexcitation des neurones et une toxicité liée au glutamate. Les ions K+ libérés par les neurones lors de leur activation s'accumulent dans les couches synaptiques (plexiformes) et sont pris en charge par les CGM qui vont relarguer cet excès de K+ dans le vitré, la circulation sanguine et l'espace sous rétinien (Karwoski et al. 1989; Newman et al. 1984; Reichenbach et al. 1992; Steinberg et al. 1980). Plusieurs études ont montré que le

tamponnage spatial du K+ par les CGM se faisait à travers le canal à rectification entrante Kir4.1 (Ishii et al. 1997; Kofuji et al. 2000). Ce canal protéique est exprimé de manière polarisée dans la CGM avec une forte concentration de Kir4.1 au niveau des pieds des CGM qui forment la membrane limitante interne mais également au niveau des prolongements des CGM qui entourent les vaisseaux sanguins (Dalloz et al. 2003; Kofuji et al. 2002; Kofuji et al. 2000).

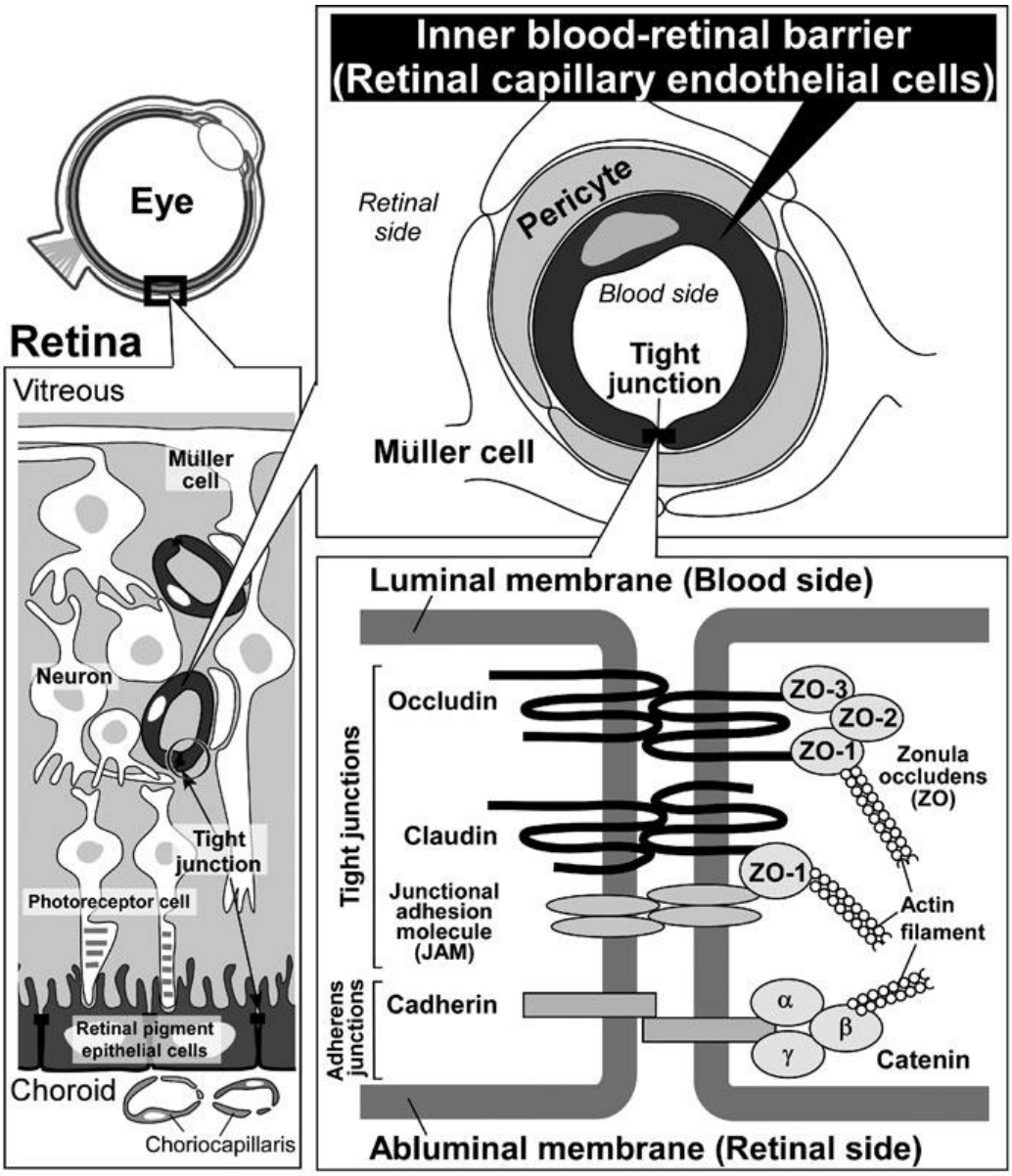
En conditions normales, l'eau s'accumule dans le tissu rétinien suivant 3 processus : une production endogène et continue d'eau associée à une synthèse oxydative d'adénosine 5'- triphosphate (ATP), un influx d'eau provenant de la circulation sanguine, couplé à des substrats métaboliques tels que le glucose et enfin l'entrée d'eau dans la rétine grâce à la pression intraoculaire (Marmor 1999). Cette eau est continuellement exfiltrée de la rétine par l'épithélium pigmentaire et les CGM qui déshydratent respectivement l'espace sous rétinien et la rétine interne (Bringmann et al. 2004). Les flux d'eau à travers ces cellules sont couplés aux flux d'ions et ce phénomène est facilité par les canaux aqueux, les aquaporines. L'expression des canaux aqueux AQP4 dans les CGM est polarisée avec une forte concentration de ces canaux au niveau des pieds des CGM et de leurs prolongements entourant les vaisseaux sanguins (Nagelhus et al. 1999). Plusieurs études de co-localisation des canaux Kir4.1 et AQP4 dans les CGM, ont permis de mettre en évidence un couplage possible entre le tamponnage spatial du K+ et le transport de l'eau. De plus, AQP4 est exprimée dans tous les domaines membranaires qui constituent des zones de capture ou de relarguage du K+. A cause de ce couplage fonctionnel, l'inhibition des transports rapides d'eau aura comme effet, un retard du courant K+ à travers les CGM. Et inversement, une altération des courants K+ perturbe les transports d'eau dans les CGM. De telles dérégulations ont une conséquence néfaste sur l'activité synaptique. Ainsi une inactivation

génétique d'AQP4 chez la souris entraîne une baisse de l'amplitude de l'onde b de l'électrorétinogramme (Li et al. 2002), suggérant une réduction ou perturbation de l'excitabilité des cellules bipolaires après l'inhibition des transports rapides d'eau. De plus chez ces souris, l'inactivation d'AQP4 leur confère une protection contre l'ischémie (Da and Verkman 2004). En effet, les transports rapides d'eau seraient impliqués dans la mort neuronale après l'ischémie. Les canaux AQP4 exprimés dans les CGM facilitent l'exfiltration de l'eau vers les vaisseaux ainsi que la régulation de l'activité neuronale et la transmission synaptique dépendantes des flux d'eaux.

3) Barrière Hémato-Rétinienne

La barrière hémato-rétinienne (BHR) est constituée de composants internes et externes et elle joue un rôle important dans la régulation homéostatique du microenvironnement de la rétine. La BHR contrôle les mouvements liquidiens et moléculaires entre les lits vasculaires de l'œil et le tissu rétinien. Cette barrière empêche l'entrée de macromolécules et autres agents potentiellement nuisibles, dans la rétine. La BHR interne est formée par les jonctions étanches (serrées) entre les cellules endothéliales lesquelles sont entourées par les prolongements des cellules gliales de Müller et des astrocytes alors que la BHR externe est formée par les jonctions étanches entre les cellules de l'épithélium pigmentaire (Ashton 1965; Reichenbach et al. 2007; Shakib and Cunha-Vaz 1966). Dans la rétine, il existe un lien spatial étanche entre les cellules gliales de Müller et les vaisseaux sanguins, ce qui confère aux CGM un rôle crucial dans la formation et le maintien de la BHR, dans la capture de nutriments et l'élimination de métabolites en condition normale (Figure 4) (Distler and Dreher 1996; Tout et al. 1993).

Dans des contextes pathologiques tels que le diabète, le dysfonctionnement des CGM pourrait contribuer à la rupture de la BHR (Tretiach et al. 2005). Le VEGF, un facteur de croissance de l'endothélium vasculaire, est connu pour augmenter la perméabilité vasculaire dans tous les tissus du corps. En condition hypoxique ou inflammatoire, il a été montré que les CGM augmentent leur sécrétion de VEGF, le facteur de perméabilité vasculaire (Eichler et al. 2000; Kaur et al. 2006). Des études réalisées *in vitro* ont permis de montrer l'effet trophique de la CGM sur la BHR et cet effet est perdu lorsque les CGM sont placées en condition hypoxique (Tretiach et al. 2005). Les CGM sécrètent également du PEDF, un facteur de croissance dérivé de l'épithélium pigmentaire, qui inhibe l'effet du VEGF et réduit ainsi la perméabilité vasculaire. En condition hypoxique, l'expression du PEDF diminue fortement dans les CGM (Duh et al. 2002). La fonction de la BHR est également altérée par les métalloprotéinases de la matrice (MMPs) des CGM car ces MMPs entraînent une dégradation protéolytique des protéines de jonctions serrées, les occludines (Behzadian et al. 2001; Giebel et al. 2005).



<u>Figure 4</u> : La Barrière Hémato-Rétinienne interne. Elle se compose des jonctions serrées (tight junctions) entre les cellules endothéliales des vaisseaux rétiniens, des péricytes et des pieds des cellules gliales de Müller autour de ces vaisseaux (Hosoya and Tachikawa 2012).

IV. La Dystrophine Dp71

1) Introduction

La Dystrophine a été identifiée il y a près de 30 ans comme étant la protéine déficiente dans la dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) (Koenig et al. 1988). La DMD est une pathologie neuromusculaire liée à l'X fréquente (une naissance de sexe masculin sur 3500) et léthale caractérisée par une dégénérescence musculaire progressive et des troubles cognitifs. Le gène DMD est le gène le plus long identifié à ce jour, d'environ 2,5 millions de paires de bases. Il est situé sur le bras court du chromosome X au locus Xp21. Il représente environ 0,1 % du génome humain, contient 79 exons qui codent pour la dystrophine, une protéine du cytosquelette de 427 kDa et de 3685 acides aminés. L'expression du gène DMD est hautement régulée et la transcription de la Dp427 est contrôlée par trois promoteurs tissus-spécifiques indépendants (Barnea et al. 1990; Gorecki et al. 1992; Nudel et al. 1989) (Figure 5).

Après l'identification et la caractérisation de la dystrophine dans les tissus musculaires, la recherche dans ce domaine s'est orientée sur l'analyse de l'expression des produits du gène DMD dans des tissus non musculaires. La découverte pour le moment de quatre promoteurs internes a conduit à la mise en évidence de différents produits C-terminaux courts, nommés en fonction de leur masse moléculaire déduite : Dp260, Dp140, Dp116 et Dp71 (Figures 5 et 6). Outre leurs différentes tailles, ces protéines présentent une expression spatio-temporelle variable.

Les produits du gène DMD peuvent être exprimés dans certaines parties du cortex cérébral (Barnea et al. 1990; Boyce et al. 1991; Jung et al. 1993; Nudel et al. 1989), dans les cellules de Purkinje (Gorecki et al. 1992), dans les cellules gliales (Bar et al. 1990; Gorecki et

al. 1992; Hugnot et al. 1992; Lederfein et al. 1992; Rapaport et al. 1993), dans les cellules de Schwann (Byers et al. 1993) et dans plusieurs organes (rein, rétine, foie, poumon, cœur, pancréas et testicule) (Ahn and Kunkel 1993; Durbeej et al. 1997; Muntoni et al. 2003). Plusieurs produits du gène DMD peuvent être exprimés dans un même type cellulaire ou tissulaire montrant la potentialité fonctionnelle de ces protéines.

La Dp71 est exprimée dans une grande variété de tissus non musculaires et elle est le produit majoritaire du gène DMD dans le système nerveux central (SNC) (Bar et al. 1990; Blake et al. 1992; Hugnot et al. 1992). En outre, elle s'exprime dans les cellules souches embryonnaires pluripotentes ce qui en fait, le premier produit détectable du gène DMD au cours du développement (Rapaport et al. 1992). Plus récemment, l'étude de la Dp71 est devenue pertinente en raison de son implication directe avec les deux principaux DMD phénotypes non-musculaires: les troubles cognitifs (Daoud et al. 2009a; Moizard et al. 1998; Moizard et al. 2000) et une physiologie rétinienne anormale (Dalloz et al. 2003; Sene et al. 2009).

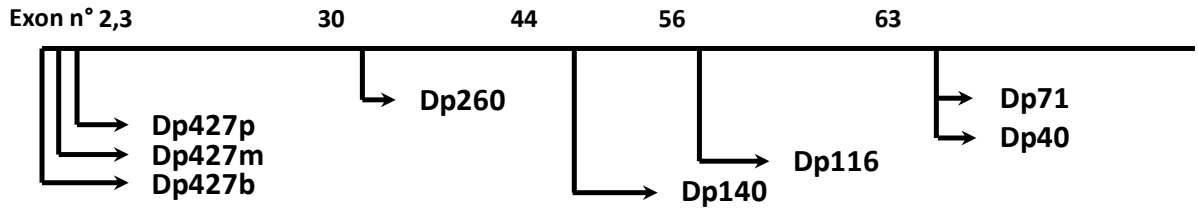


Figure 5 : Organisation du gène DMD. Localisation des promoteurs tissus spécifiques de la Dp427 et des promoteurs internes responsable de l'expression des produits courts du gène DMD (b: brain; m: muscle; p: cellule de Purkinje).

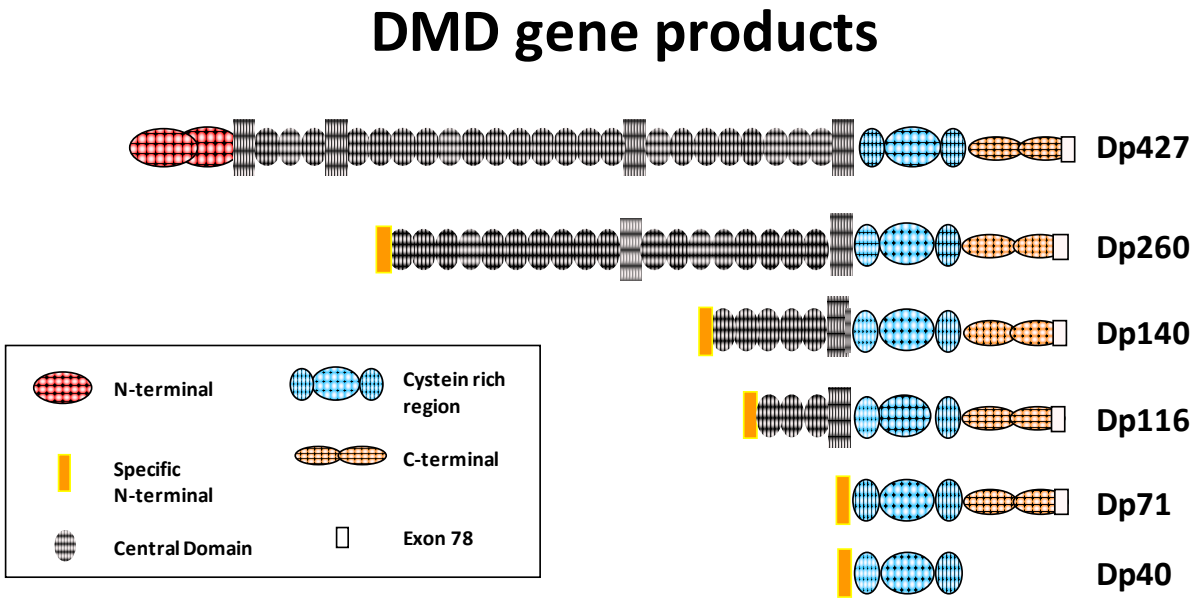


Figure 6 : Produits du gène DMD. Schématisation de la structure de la dystrophine et des 5 produits courts issus du gène DMD.

2) Ses Isoformes

La Dp71 est issue d'un promoteur de type « housekeeping », comme les « gènes de ménage », responsable de son expression ubiquitaire, situé dans la partie distale du gène DMD, entre les exons 62 et 63 donnant un ARN messager de 4,8 ou 6,5 kb présent dans une grande variété de tissus, tel que le cerveau, le foie, les testicules, le poumon, l'estomac et le rein, mais pas dans le muscle squelettique (Bar et al. 1990; Blake et al. 1992; Hugnot et al. 1992; Lederfein et al. 1992; Lederfein et al. 1993). Ce transcrit contient un premier exon unique avec un site d'initiation ATG dans le cadre de lecture de la séquence consécutive d'ADNc de la Dp71.

La partie carboxy-terminale chez les membres de la famille des dystrophines représente la région la plus hautement conservée de la molécule (Blake et al. 1995). Cependant, des variants de la région 3' terminale produits par épissage alternatif ont été identifiés, essentiellement par amplification par RT-PCR de l'ARNm de la Dp71 (Bies et al. 1992; Feener et al. 1989). Certains de ces variants sont exprimés dans des tissus distincts à différents stades de développement (Bies et al. 1992).

L'ARNm de la Dp71 subit plusieurs événements d'épissage alternatif complexes (Bies et al. 1992; Feener et al. 1989; Jin et al. 2007; Lumeng et al. 1999). Les différents transcrits identifiés à ce jour peuvent être répartis en 4 sous-populations : Dp71d, Dp71f, Dp71e et Dp40 (Figure 7 et 8). Les isoformes de la Dp71 possèdent soit l'exon 78 intact, ce sont les Dp71d ; soit l'épissage de l'exon 78, ce sont les Dp71f. L'épissage de l'exon 78 entraîne un décalage du cadre de lecture entraînant le remplacement des 13 derniers acides aminés hydrophiles de la Dp71 par 31 acides aminés hydrophobes (Figure 8) (Kramarcy et al. 1994; Lederfein et al. 1992). Récemment le groupe de Cecilia Montañez a mis en évidence l'existence d'une troisième sous-population d'isoformes de la Dp71, les Dp71e, possédant

une région carboxy-terminale différente des deux familles précédemment décrites (Saint Martin et al. 2012). En effet, les Dp71e conservent 34 pb de l'intron 77 ce qui entraîne un décalage du cadre de lecture et la transcription de seulement 29 pb de cette séquence intronique en raison de la présence d'un codon stop empêchant la transcription des exons 78 et 79. Cette nouvelle région carboxy-terminale est composée de 10 nouveaux acides aminés hydrophiles (Figure 8).

L'exon 71 peut aussi être épissé, on parle alors de **Dp71a**, **Dp71ab** ou **Dp71e** en fonction du C-terminal. Lorsque les exons 71 à 74 sont excisés, on obtient la **Dp71c** (aussi appelée $Dp71\Delta_{110}{}^{m}$), la **$Dp71_{\Delta 110}$** (Austin et al. 2002) ou la **Dp71ec** selon le C-terminal (Figure 7), ayant un poids moléculaire estimé de 58-60 kDa. La suppression de l'exon 71 ou des exons 71 à 74 entraîne la perte du site de liaison à la syntrophine (Suzuki et al. 1995). La localisation cellulaire des isoformes Dp71 dépend de l'extrémité carboxy-terminale, et par conséquent, elle peut modifier leurs fonctions (Aleman et al. 2001; Ceccarini et al. 1997; Gorecki et al. 1992; Marquez et al. 2003).

L'isoforme la plus courte de la Dp71 est la **Dp40** issue d'un ARN messager de 2,2 kb, mise en évidence en 1993 par criblage d'une banque ADNc de Schwannome de rat et initialement appelée apo-dystrophine-3 (Tinsley et al. 1993). Le cadre ouvert de lecture de la Dp40 prévoit une protéine de 341 acides aminés avec un poids moléculaire estimé de 40 kDa, contenant l'extrémité N-terminale de sept acides aminés et le domaine riche en cysteines de la Dp71 mais la région 3'-UTR provient de l'intron 70. Un rôle crucial de la Dp40 dans la fonction présynaptique est envisagé (Tozawa et al. 2012).

Grâce à une collaboration ECOS-Nord entre le laboratoire du Dr Rendon et celui du Pr Montañez, une nouvelle isoforme de la Dp71e a été mise en évidence dans la rétine de souris sauvage possédant l'exon 71 et l'intron 77 à la place des exons 78-79. Cette isoforme

qui n’a pas été nommée à ce jour, reflète l’existence d’une large diversité d’épissages alternatifs produisant de nombreuses isoformes de la Dp71 qui lui permettent d’assurer de nombreuses fonctions.

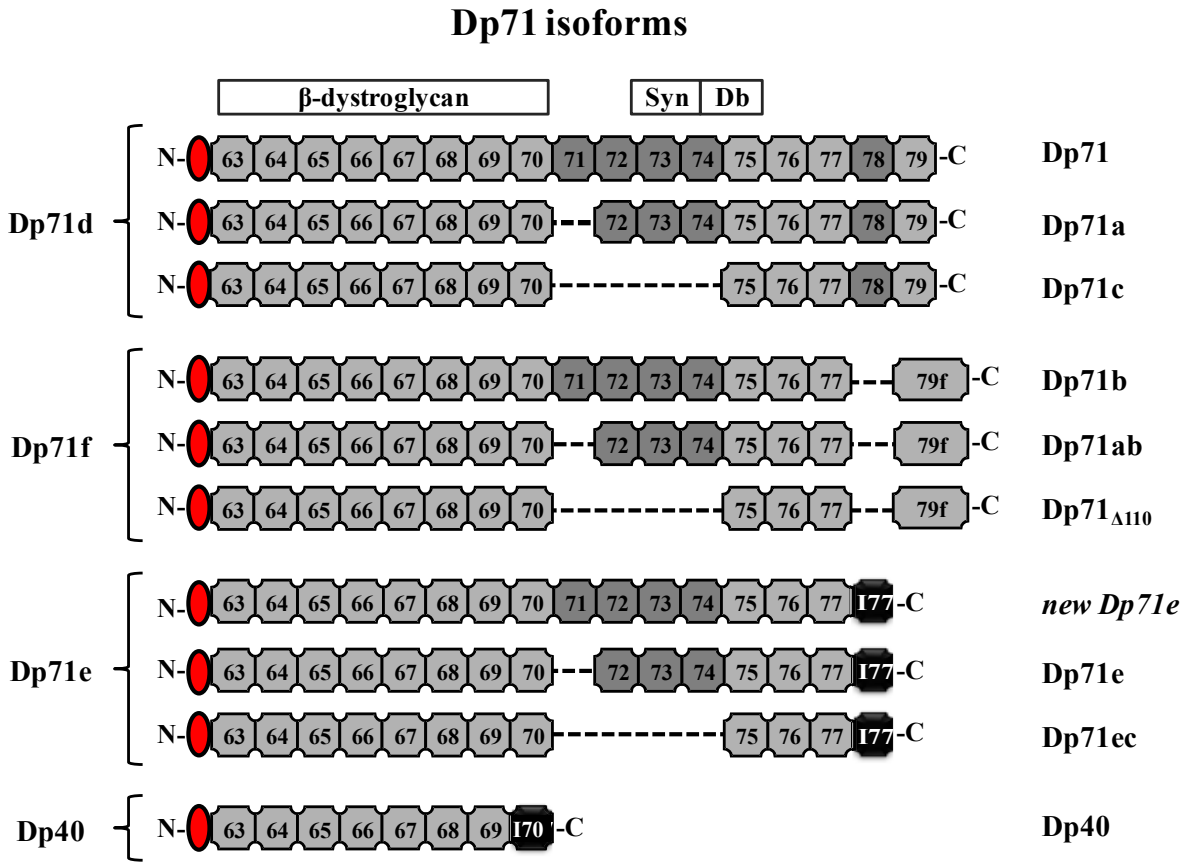


Figure 7 : Description des isoformes de la dystrophin 71. L'extrémité N-terminale (ellipse rouge) possède un motif de liaison à l'actine composé de six acides aminés uniques. La région riche en cystéines présente un domaine de liaison au β-dystroglycane et l'extrémité C-terminale possède des sites de liaison à la syntrophine et à la dystrobrévine. Les isoformes de la Dp71 sont appelées Dp71 (avec les exons 71 et 78), Dp71a (sans l'exon 71, avec l'exon 78), Dp71c (sans les exons 71-74, avec l'exon 78), Dp71b (sans l'exon 78, avec l'exon 79f), Dp71ab (sans les exons 71 et 78, avec l'exon 79f), $Dp71_{\Delta 110}$ (sans les exons 71-74 et 78, avec l'exon 79f), Dp71e (sans les exons 71, 78 et 79, avec l'intron 77), Dp71ec (sans les exons 71-74, 78 et 79, avec l'intron 77) et Dp40 (sans les exons 70-79, avec l'intron 70). Une nouvelle isoforme de la Dp71e, n'ayant pas encore été nommée, a été identifiée dans la rétine de souris sauvage (avec l'exon 71, sans les exons 78 et 79, avec l'intron 77).

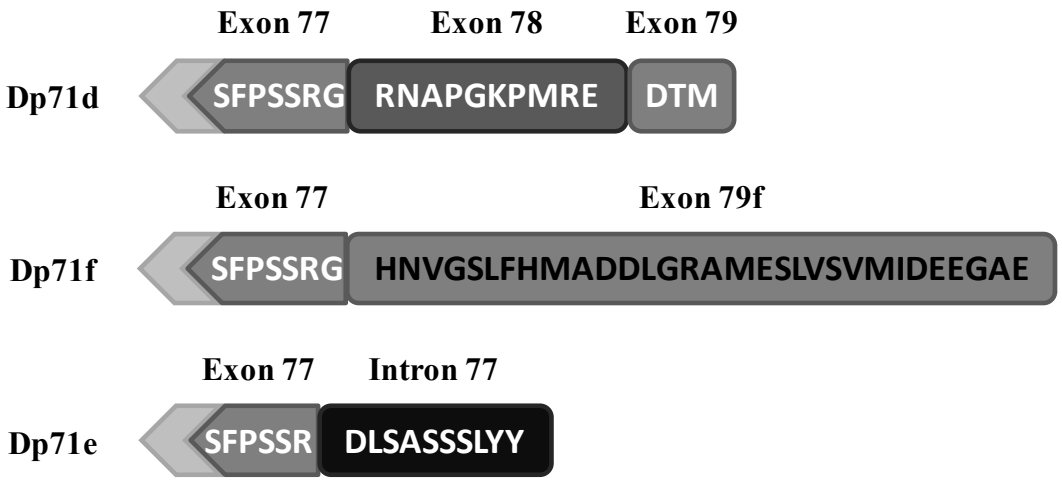


Figure 8 : Représentation des différentes régions carboxy-terminales de la Dp71. Séquences en acides aminés de la région C-terminale de chaque sous-population de Dp71 (Dp71d, Dp71f et Dp71e).

3) Régulation de son Expression

Comme il a déjà été mentionné, l'expression de la Dp71 est ubiquitaire à l'exception du muscle squelettique. Cependant, son niveau d'expression varie en fonction des différents tissus, du type cellulaire et au cours de la différenciation. En effet, le taux de Dp71 transcrit et traduit augmente pendant la différenciation des astrocytes cérébraux chez le rat (Imamura and Ozawa 1998) induite par l'AMPc (adénosine monophosphate cyclique), et pendant la différenciation des cellules PC12 (lignée cellulaire dérivée d'un phéochromocytome de la médullaire surrénale de rat) (Cisneros et al. 1996; Marquez et al. 2003) induite par le NGF (facteur de croissance neuronale), indiquant que l'expression de la Dp71 est principalement modulée au niveau transcriptionnel.

Le promoteur de la Dp71 a été localisé dans l'intron entre les exons 62 et 63 du gène DMD. Il possède la structure classique d'un promoteur « housekeeping » (Lederfein et al. 1993): il présente une région riche en GC avec plusieurs sites de liaisons à des protéines Sp1 (specificity protein 1), mais ne possède aucun motif TATA ou CAAT. La liaison de protéines Sp1 à des régions riches en GC stabilise la machinerie transcriptionnelle et définit le site d'initiation de la transcription dans les promoteurs n'ayant pas de boîte TATA. L'activité du promoteur de la Dp71 relativement élevée est associée à des événements morphogènes et à la différenciation terminale de plusieurs tissus et organes murins (SNC et périphérique, poumons, vaisseaux sanguins, organes de l'ouïe, de la vision et de l'odorat) (Sarig et al. 1999). Il a été constaté qu'une région promotrice proximale de 224 pb contenant quatre sites de liaison à des protéines Sp1 et un site de liaison aux éléments AP2 (protéine activatrice 2) est nécessaire et suffisante pour permettre l'expression à un niveau basal de la Dp71 dans les cellules musculaires et neuronales (Figure 9) (de Leon et al. 2005; Morales-Lazaro et al. 2010). De plus, l'expression ectopique de la Dp71 dans le muscle squelettique

de souris transgéniques ayant une expression normale de la dystrophine provoque un phénotype de dystrophie musculaire (Leibovitz et al. 2002). D'autre part, l'expression basale de la Dp71 dans des neurones indifférenciés est contrôlée par l'action combinée des protéines Sp1 et AP2α en tant que régulateurs positifs et négatifs, respectivement. Dans les neurones différenciés, l'induction de l'activité du promoteur de la Dp71 provient de la régulation positive exercée par Sp1 et de la perte de liaison d'AP2α au promoteur, levant ainsi la répression (Figure 9) (Morales-Lazaro et al. 2010).

La régulation de l'expression de la Dp71 assure sa présence dans des types cellulaires précis et/ou à des stades de développement spécifiques, ce qui permet le bon fonctionnement de processus cellulaires dans lesquels la Dp71 est impliquée. En outre, il semble que le gène DMD doit être étroitement régulé pour éviter la redondance fonctionnelle et une concurrence dommageable entre les différentes dystrophines.

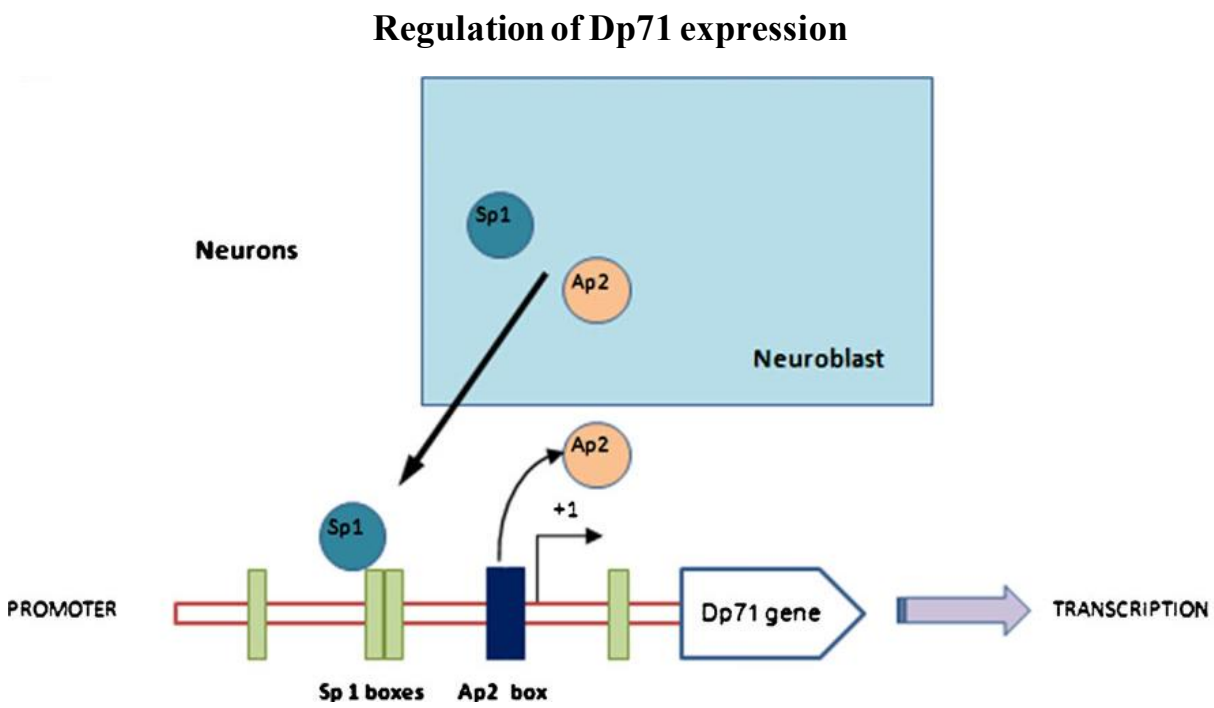


Figure 9 : L'expression de la Dp71 est induite au cours de la différenciation neuronale. L'expression basale de la Dp71 dans les neuroblastes est maintenue par l'action combinée des facteurs de transcription Sp1 et AP2, en agissant sur le promoteur de la Dp71 comme activateur et répresseur, respectivement. L'induction de l'activité du promoteur de la Dp71 au cours de la différenciation neuronale est le résultat de la régulation positive exercée par Sp1 ainsi que de la perte de la liaison de AP2α au motif AP2, libérant le promoteur de la répression (Tadayoni et al. 2012).

4) Son Rôle dans le Système Nerveux Central

La présence d'un retard mental non progressif est maintenant largement acceptée et reconnu comme une caractéristique commune à une proportion substantielle de patients atteints de DMD. L'analyse du fonctionnement intellectuel et de la DMD a révélé que l'intelligence à la fois verbale et non verbale est affectée chez les enfants atteints de DMD (Cotton et al. 2001). Plusieurs études ont suggéré que des réarrangements dans la partie C-terminale du gène semblent être associés de manière préférentielle avec une déficience cognitive que des mutations dans la partie N-terminale (Moizard et al. 1998; Muntoni et al. 2003; Rapaport et al. 1991).

Une corrélation cohérente a émergé entre des mutations situées dans la région : de 49 patients et ont trouvé une altération du transcrit de la Dp71 chez deux patients atteints de DMD ayant un retard mental sévère (Moizard et al. 1998). Le même laboratoire a étendu l'étude à 11 autres patients atteints de DMD avec un retard mental et a détecté cinq mutations ponctuelles entraînant l'arrêt prématuré de la traduction de la Dp71 (Moizard et al. 2000). Une étude récente basée sur la comparaison de données cliniques, cognitives et moléculaires d'une grande cohorte de 81 patients atteints de dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) ou de dystrophie musculaire de Becker (BMD), a révélé que les patients atteints de la BMD avec un retard mental présentent des mutations dans les exons 75 et 76 qui affectent significativement l'expression ou la localisation de la Dp71. Cependant, les patients atteints de DMD avec des mutations en amont de l'exon 62, ayant donc la perte de fonction de tous les produits du gène DMD sauf de la Dp71, sont associés principalement à des performances cognitive normales ou limites (Daoud et al. 2009a). En résumé, on peut dire que la perte de fonction de tous les produits de la dystrophine est systématiquement

associée à la forme grave de retard mental, et que le déficit en Dp71 est un facteur qui contribue à la gravité du retard mental et peut expliquer une baisse de quotient intellectuel (Daoud et al. 2009a).

Des études au niveau tissulaire et cellulaire montrent la participation potentielle de la Dp71 aux fonctions neuronales. La Dp71 s'exprime dans différentes structures et types cellulaires du SNC, y compris dans les astrocytes périvasculaires (Haenggi et al. 2004; Szabo et al. 2004), les CGM dans la rétine (Claudepierre et al. 2000b), les neurones dans l'hippocampe et du bulbe olfactif (Gorecki and Barnard 1995), les neurones de l'hippocampe et les astrocytes du proencéphale en culture (Aleman et al. 2001), et les densités post-synaptiques *in vivo* (Blake et al. 1999).

L'utilisation de modèles de souris DMD a apporté des preuves tangibles sur la participation des dystrophines, et spécifiquement de la Dp71, dans le développement du système nerveux et de la maturation. Récemment, une étude approfondie sur des souris Dp71-null a fourni la première preuve solide pour comprendre comment la perte de la Dp71 peut altérer les fonctions neuronales et cognitives (Daoud et al. 2009b). Une analyse ultrastructurale de la longueur de la densité post-synaptique chez les souris Dp71-null a révélé que le cerveau adulte présentait une réduction du nombre de synapses excitatrices avec un agrandissement de leur taille, ce qui indique une réduction de la densité synaptique et une altération morphologique de la zone active post-synaptique. En outre, des coupes d'hippocampe de souris Dp71-null ont montré une augmentation drastique de la transmission glutamatergique CA1 qui est associée à une réduction de la potentialisation (LTP) mais pas de la dépression à long terme (LTD) (Miranda et al. 2011). La caractérisation du comportement des souris Dp71-null a révélé des troubles sélectifs caractérisés par une

réduction de l'exploration et du comportement de recherche de la nouveauté, un déficit de rétention de l'évitement passif, et des déficiences dans l'apprentissage de l'espace et de la mémoire (Daoud et al. 2009b).

En outre, le groupe de Béatrice Nico et collaborateurs a rapporté, dans une série d'expériences effectuées chez la souris mdx, que la perturbation de l'expression de la Dp71 peut altérer la barrière hémato-encéphalique et l'homéostasie de l'eau et du potassium dans les astrocytes périvasculaires, ce qui pourrait indirectement affecter la fonction neuronale (Nico et al. 2003; Nico et al. 2004; Nico et al. 2010).

De plus, il a été montré par le groupe de Latifa Dorbani-Mamine que la Dp71 est impliquée dans l'activité fonctionnelle du système hypothalamo-neurohypophysaire. Sa localisation au niveau des pieds des astrocytes souligne l'importance des interactions neurones-vaisseaux-glies pour la détection centrale de l'osmolalité. Dans le noyau supra-optique, la Dp71 est impliquée dans osmosensibilité et la définition de la "osmostat" (centre de régulation qui contrôle l'osmolalité du fluide extracellulaire), alors que, dans la neurohypophyse, elle est impliquée dans le réglage fin de la libération de vasopressine (Benabdesselam et al. 2010).

En conclusion, ces résultats établissent que la perte congénitale de la Dp71 semble nuire de manière significative à l'organisation et à la maturation synaptique des synapses glutamatergiques centrales, ce qui peut expliquer certaines altérations de la fonction et la plasticité synaptique contribuant à la déficience intellectuelle chez les patients DMD.

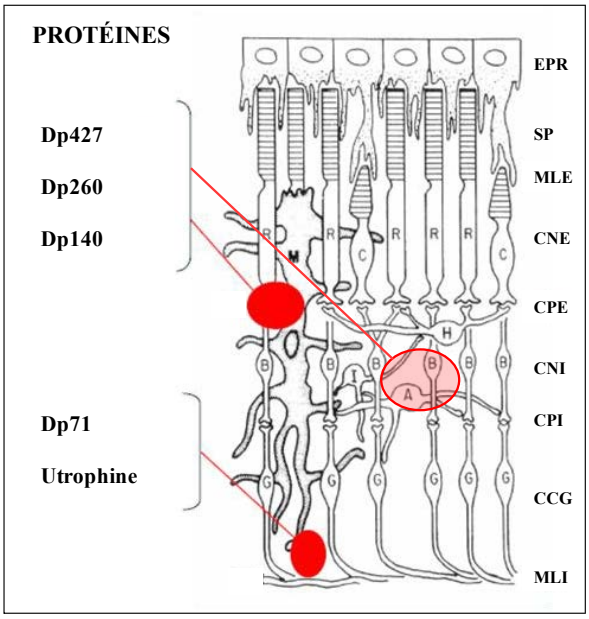


Figure 10 : Localisation des différents produits du gène DMD, et de l'utrophine dans la rétine neurale murine. EPR : épithélium pigmentaire rétinien; SP : segments des photorécepteurs; MLE : membrane limitante externe ; CNE : couche nucléaire externe; CPL : couche plexiforme externe ; CNI : couche nucléaire interne ; CPI : couche plexiforme interne ; CCG : couche des cellules ganglionnaires; MLI : membrane limitante interne.

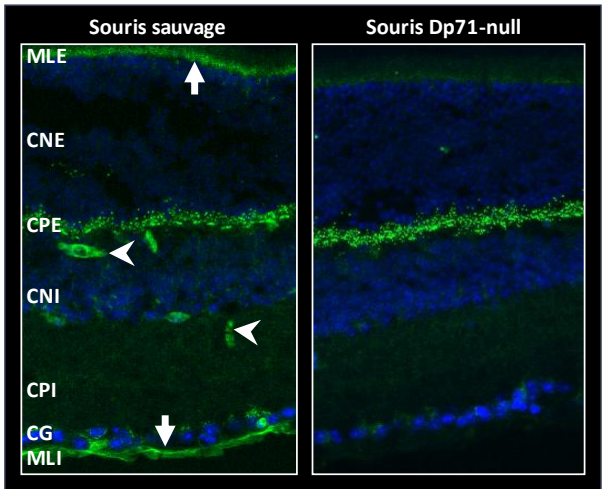


Figure 11 : Expression de la Dp71 autour des vaisseaux, au niveau de la membrane limitante externe et interne. Marquage immunohistochimique des dystrophines avec l'anticorps pan-spécifique H4 (vert) et des noyaux (DAPI, bleu) sur des coupes de rétines de souris sauvages et Dp71-null (Sene et al. 2009).

5) Son Rôle dans la Rétine

a) Localisation

Tous les produits du gène DMD, à l'exception de la Dp116, sont exprimés dans la rétine et présentent un profil d'expression différentiel (Claudepierre et al. 1999; Howard et al. 1998; Rodius et al. 1997). Alors que les Dp427, Dp260 et Dp140 sont exprimées au niveau des neurones de la première synapse de la rétine (Figure 10), la Dp71 est majoritairement exprimée par la principale cellule gliale de la rétine : la cellule gliale de Müller (CGM) (Figure 10, 11, 12) (Claudepierre et al. 1999).

La localisation cellulaire exacte des dystrophines Dp427, Dp260 et Dp140 au niveau de la première synapse de la rétine est encore débattue. En effet, des études suggèrent une localisation post-synaptique des dystrophines Dp427, Dp260 et Dp140 chez le lapin et le bovin (Koulen et al. 1998; Schmitz et al. 1993), alors que d'autres les localisent uniquement du côté pré-synaptique (Blank et al. 1999; Sato et al. 2008; Ueda et al. 1997). Récemment, une réévaluation de la localisation des dystrophines dans la rétine murine a permis de préciser qu'en plus de leur localisation au niveau des synapses des photorécepteurs, la Dp427, la Dp260, et la Dp140 sont exprimées dans les neurones de la couche nucléaire interne, notamment dans les cellules bipolaires et dans certaines cellules amacrines pour la Dp427. La Dp427 est proportionnellement plus exprimée dans les synapses des cônes que dans celles des bâtonnets par rapport à la Dp260 (Figure 10) (Wersinger et al. 2011). Un autre membre de la superfamille des dystrophines, l'utrophine, a été identifié dans la rétine, et a été localisé comme la Dp71 dans les CGM (Figure 10) (Claudepierre et al. 1999).

Au sein de notre laboratoire, la localisation de la Dp71 dans la rétine de la souris sauvage a été affinée. En effet, il a été démontré que la Dp71 ne s'exprime pas seulement

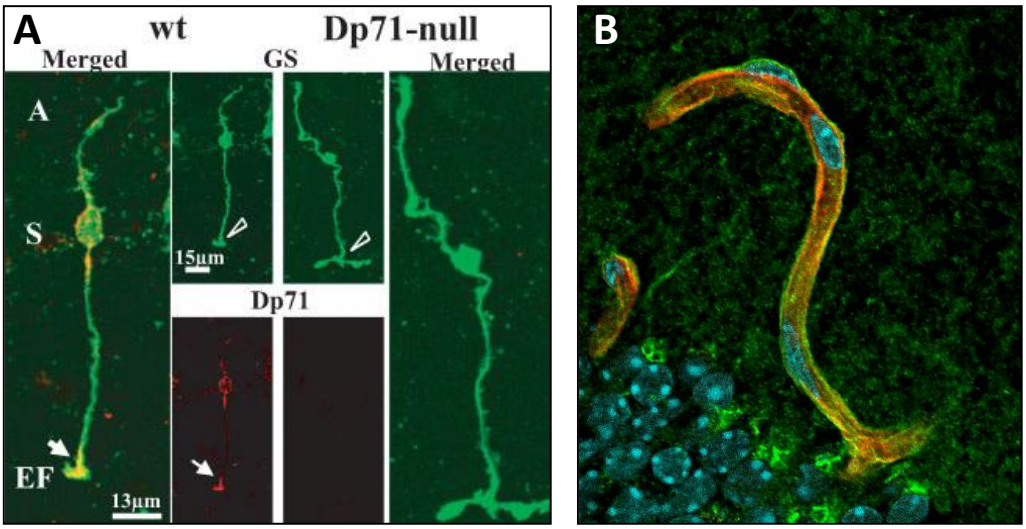
dans les CGM, mais aussi dans les astrocytes (P6 et adulte) et dans les péricytes autour des vaisseaux rétiniens (Figures 11 et 12) (Tadayoni 2009). L'observation de CGM isolées a permis de révéler une répartition clusterisée de la Dp71 au niveau des pieds et du soma des CGM. Cette localisation a été effectuée à l'aide des anticorps H4 et Dys2 reconnaissants un peptide issu de l'exon 78 (peptide 3669–3685) et de l'anticorps 5F3 reconnaissant un peptide issu de l'exon 79f (31 acides aminés alternatifs du C-ter), ce qui nous permet d'en déduire la localisation de deux sous-populations de Dp71, les Dp71 d et f. La localisation des Dp71e et de la Dp40 dans la rétine reste à élucider.

La disparition du marquage H4 des dystrophines au niveau de la membrane limitante externe chez la rétine Dp71-null suggère une expression de la Dp71 au niveau de la couche des photorecepteurs, cette localisation n'a pas encore été explorée (Figure 11).

Notre équipe a aussi étudié la présence de la Dp71 dans la rétine humaine. Les dystrophines Dp427, Dp260, Dp140 et Dp71 ont été identifiées dans des échantillons post-mortem de rétine humaine normale. L'expression des dystrophines dans la rétine humaine est comparable à la rétine de souris. En outre, la Dp71 semble être le principal produit de gène DMD dans la rétine humaine comme chez la souris (Figure 13) (Tadayoni 2009).

Localisation subcellulaire de la Dp71 dans la rétine de souris

Cellules gliales de Müller **Péricytes**



Astrocytes

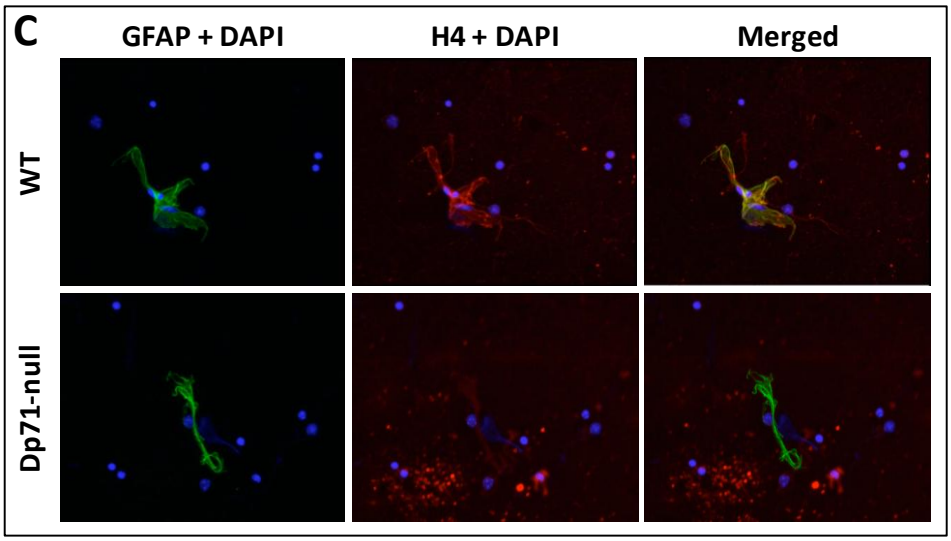
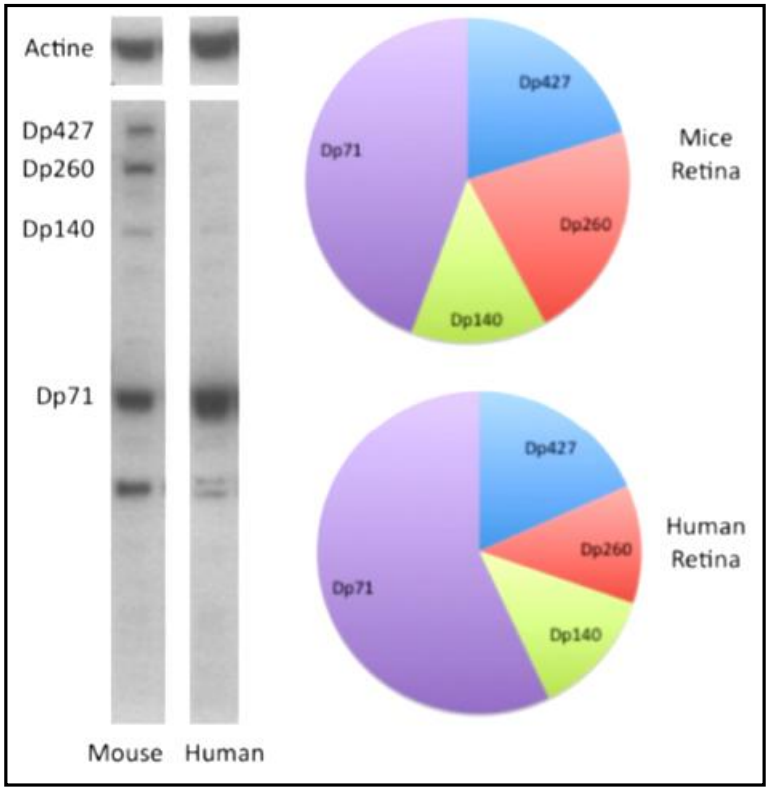


Figure 12 : Expression de la Dp71 dans les cellules gliales de Müller, dans les péricytes et dans les astrocytes. A : Localisation de la Dp71 (H4, rouge) dans des CGM isolées (glutamine synthétase, vert) (Fort et al. 2008) ; B : Images confocales d'une rétine à plat de souris sauvage après immunomarquage lectine *Griffonia simplicifolia* (rouge), H4 (vert) et DAPI (bleu) (Tadayoni 2009); C : Immunomarquage DAPI (bleu), GFAP (vert) et H4 (rouge) sur des cellules de rétines obtenues de souris sauvages et Dp71-null (Tadayoni 2009).



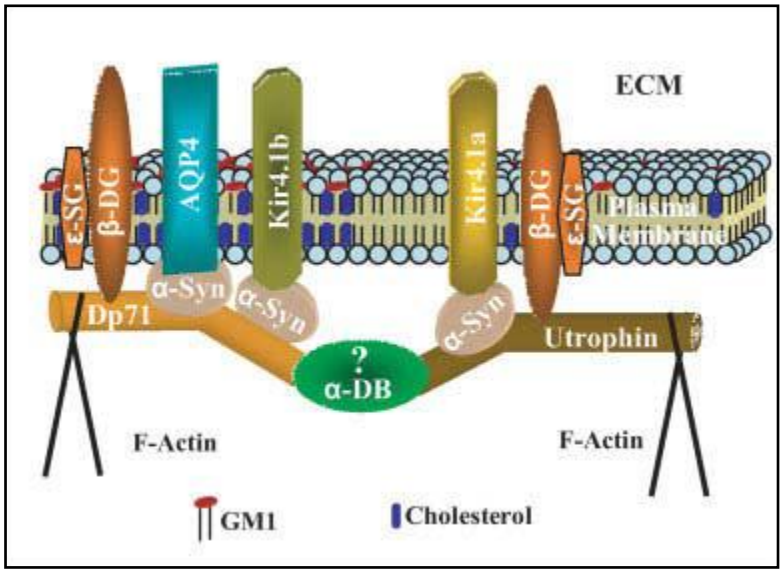
<u>Figure 13</u> : Expression des protéines issues du gène DMD dans la rétine murine et humaine. (À droite) Proportion des différentes dystrophines mesurées dans des échantillons de rétine de souris (vers le haut) et de rétines humaines (vers le bas). Les valeurs ont été normalisées par rapport à l'actine avant d'être moyennées. (À gauche) Western Blot correspondant aux diagrammes (Tadayoni 2009).

b) Les Protéines Associées à la Dp71 (DAPs)

Les DAPs (dystrophin associated proteins) constituent un ensemble de protéines bien caractérisées dans le muscle, où elles prennent part au maintien de la structure de la myofibrille et de l'homéostasie du calcium (Blake and Martin-Rendon 2002). Une expression défective de ces protéines peut conduire à différentes sortes de dystrophies musculaires. Les DAPs peuvent être subdivisées en 3 groupes, en fonction de leur localisation cellulaire ainsi que leur interaction avec les autres DAPs : les dystroglycanes (DG) ; les sarcoglycanes (SG) et le sarcospane ; et les protéines cytoplasmiques (les syntrophines (Syn) et les dystrobrévines (DB)).

Bien que la similarité entre la séquence de la Dp71 et celle de la dystrophine (Dp427) prédit que la Dp71 puisse également être une molécule du cytosquelette associée à la membrane plasmique, les groupes de Yaffe et Nudel, ainsi que celle de Rendon (Jung et al. 1993; Rapaport et al. 1993), ont mis en évidence pour la première fois la localisation de la Dp71, en utilisant un anticorps monoclonal dirigé contre le domaine C-terminal à la fois de la dystrophine et de la Dp71. Blake et collaborateurs (Blake et al. 1999) ont démontré pour la première fois que la Dp71 est capable de former des complexes avec le DAPC (Dystrophin-associated proteins complex) dans un tissu non-musculaire, le cerveau. Ils ont trouvé que la β-dystrobrévine, la Dp71d, l'α- et la β2- syntrophine sont fortement enrichies dans la fraction de la densité post-synaptique du proencéphale de rat, et ils ont révélé par immunoprécipitation que la Dp71d est associée à l'α-dystrobrévine-1 dans le cerveau de rat. Diverses études ont mis en évidence l'expression de différentes DAPs dans la rétine. Ainsi, le β-DG a été la première des DAPs à être localisée dans la rétine (Montanaro et al. 1995; Ueda et al. 1998). Ensuite, dans notre laboratoire, un complexe DAPs lié à la Dp71 a été caractérisé dans des cellules gliales de Müller en culture. En effet, la Dp71 a été trouvée en

interaction avec le β-dystroglycane, le δ-sarcoglycane, et l'α1-syntrophine, pendant que le β-dystroglycane est associé à l'α-dystrobrévine-1 (Claudepierre et al. 2000a). Ces protéines ont pu être localisées plus précisément au niveau du pied des cellules gliales de la rétine, près du corps vitré, mais aussi à proximité des vaisseaux sanguins. Des doubles marquages sur des CGM de rat en culture ont permis de montrer que la Dp71 était distribuée en agrégats le long du cytosquelette d'actine, suggérant une interaction possible entre le complexe formé par la Dp71 et le cytosquelette d'actine, à l'image de ce qui se passe dans le muscle autour de la dystrophine (Claudepierre et al. 2000b). Par la suite, nous avons montré dans les CGM isolées à partir de rétine de souris Dp71-null que la Dp71 est la seule dystrophine exprimée dans la CGM. Nous avons également confirmé une concentration de Dp71 dans les pieds des CGM des souris. Les DAPs suivantes: le β-dystroglycane, l'ε-sarcoglycane, l'α-syntrophine et l'α-dystrobrevine sont aussi exprimés dans les CGM. L'utrophine, les DAPs ainsi que Kir4.1 et AQP4 sont principalement localisés dans les pieds des CGM et l'absence de la Dp71 entraîne une délocalisation de ces protéines le long des CGM. Cette redistribution est associée à une baisse de l'expression du β-dystroglycane, d'AQP4 et une surexpression de l'utrophine. Dans les pieds des CGM, la Dp71 s'associe aux DAPs pour former un complexe macromoléculaire qui lie Kir4.1 et AQP4. L'utrophine peut également s'associer à ces DAPs pour lier les deux canaux. Lorsque la Dp71 est absente, seul persiste le complexe autour de l'utrophine qui ne lie que Kir4.1. Cependant les complexes autour de la Dp71 et de l'utrophine sont localisés dans des domaines membranaires distincts. En effet le complexe Dp71/DAPs est agrégé dans un microdomaine membranaire, « lipide raft » tandis que le complexe utrophine/DAPs est localisé dans un domaine membranaire ordinaire, « non-raft » (Figure 14) (Fort et al. 2008).



<u>Figure 14</u> : Modèle hypothétique des complexes Dp71- et Utrophin-DAPs se liant à Kir4.1 et à AQP4. Il est connu que la Dp71 et l'Utrophine peuvent être toutes les deux associées au β-DG (β-dystroglycane) et à l'α-Syn (α-syntrophine). Le sous-complexe Dp71-DAPs est localisé dans la membrane plasmique enrichie en GM1-cholestérol où l'α-Syn se lie à Kir4.1b et à AQP4. Dans le sous-complexe Utrophin-DAPs, l'α-Syn est associée uniquement à Kir4.1a. L'α-DB (α-dystrobrévine) pourrait fonctionner comme la clé de voûte de l'échafaudage moléculaire pour permettre l'association physique des deux sous-complexes. La position de l'ε-SG (ε-sarcoglycane) et de l'α-DB dans ce complexe macromoléculaire devra être confirmée (Fort et al. 2008).

c) Physiopathologie de la souris Dp71-null

i. Ischémie et ERG

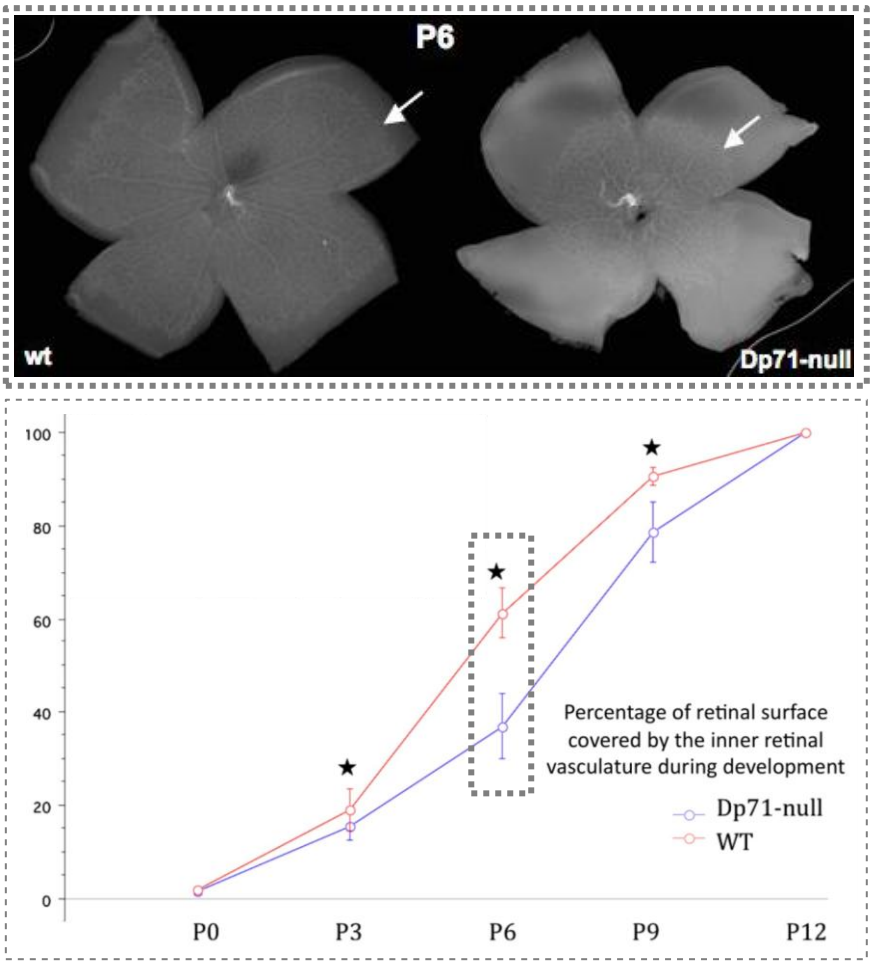
Dans la rétine, l'absence de Dp71 entraîne une délocalisation des canaux potassiques Kir4.1 et aqueux AQP4. Ces deux canaux jouent un rôle important dans l'homéostasie du potassium et de l'eau dans la rétine (Dalloz et al. 2003). Les souris Dp71-null présentent une hypersensibilité à l'ischémie rétinienne qui se traduit par une mort neuronale accrue. L'enregistrement de l'activité des cellules excitables de la rétine, l'électrorétinogramme (ERG), en condition scotopique (d'adaptation à l'obscurité) a permis de mettre en évidence chez cette souche de souris une faible diminution de l'amplitude de l'onde b (Cia 2014). Cependant les mécanismes qui sous-tendent les modifications électrophysiologiques de la rétine en absence de la Dp71, sont mal connus. L'utilisation de souris AQP4-null ou Kir4.1-null a permis de mettre en évidence une perturbation de l'ERG seulement en absence d'AQP4, avec une réduction de l'onde b en condition scotopique (Kofuji et al. 2000; Li et al. 2002).

Plusieurs études ont mis en évidence une perturbation de l'ERG en condition scotopique chez plus de 80% des patients DMD (Cibis et al. 1993; Sigesmund et al. 1994). Cette altération de la neurotransmission rétinienne se traduit par l'absence de l'onde b de l'ERG. De plus, les patients ayant des mutations dans les parties plus distales du gène présentaient les perturbations de l'ERG les plus sévères, suggérant une implication accrue des produits courts, tel que la Dp71, dans la neurotransmission rétinienne (De Becker et al. 1994; Fitzgerald et al. 1999; Pillers et al. 1999a; Pillers et al. 1999b).

ii. Angiogenèse Normale et Pathologique

Des travaux récents menés dans notre laboratoire ont permis de montrer que l'absence de Dp71 inhibe l'angiogenèse postnatale jusqu'à P6 (six jours après la naissance) (Figure 15). Cet effet semble se produire par l'intermédiaire des astrocytes dans lequel nous avons mis en évidence la présence de Dp71. En effet, l'absence de Dp71 induit un retard de déploiement des astrocytes dans la rétine jusqu'à P6, ce qui agit comme un facteur limitant pour l'angiogenèse. Après P6, les astrocytes couvrent entièrement la rétine mais avec une plus faible densité cellulaire chez les souris Dp71-null comparée à la souche sauvage. Après P6, l'activité d'angiogenèse est plus élevée chez les souris Dp71-null permettant un rattrapage de la vascularisation des souris sauvages à P12. Ce second effet semble être lié aux vaisseaux et plus précisément leurs péricytes dans lesquels la présence de Dp71 a été également mise en évidence (Tadayoni R 2010).

L'exposition de souris sauvages à une atmosphère riche en oxygène de P7 à P12 induit une vaso-oblitération et le retour à une atmosphère normale de P12 à P17 provoque une néovascularisation de la rétine comme pour la rétinopathie du prématuré induite par hyperoxie chez l'homme. Nous avons mis en évidence que l'absence de Dp71 protège la rétine de la vaso-oblitération ainsi que de la néoangiogenèse. En effet, de P9 à P17, la souris Dp71-null présente une zone avasculaire réduite par rapport à la souris sauvage. Et à P17, la néovascularisation rétinienne par rapport à la surface de la rétine vascularisée est significativement plus basse chez la souris Dp71-null par rapport à la souris sauvage. La Dp71 a donc un effet anti-angiogénique dans un contexte d'angiogenèse pathologique (Figure 16) (Tadayoni 2009).



<u>Figure 15</u> : Vascularisation postnatale de la rétine (P6) chez la souris Dp71-null comparée à la souche sauvage (WT). Pourcentage de surface rétinienne recouverte par le réseau vasculaire de la rétine interne au cours du développement chez la souris WT (rouge) et Dp71-null (bleu). Les barres représentent les écart-types (Standard Deviation), les étoiles indiquent les différences significatives. La vascularisation rétinienne est significativement retardée chez la souris Dp71-null par rapport à la souris sauvage de P3 à P9. A P12, toutes les rétines sont complètement recouvertes par la première couche de vaisseaux (Tadayoni 2009).

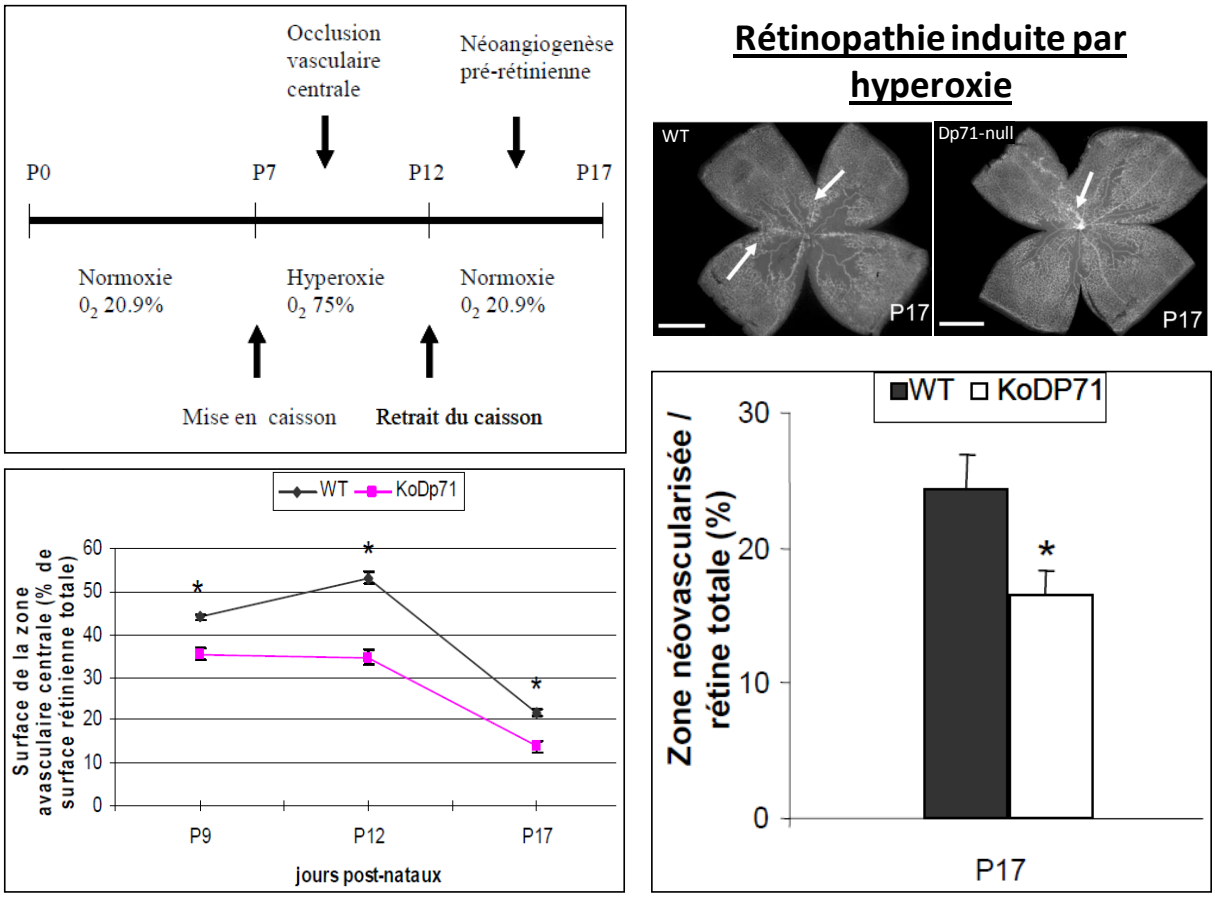


Figure 16 : Effet anti-angiogénique de l'absence de Dp71. (En haut, à gauche) Description du protocole d'induction de la rétinopathie du prématuré. (En bas, à gauche) Quantification de la surface avasculaire centrale de P9 à P17 chez la souris WT par rapport à la souris Dp71-null. (En haut, à droite) Visualisation de la zone d'occlusion vasculaire centrale et des touffes néovasculaires (flèches) à P17 chez les souris WT et Dp71-null sur des rétines à plat. (En bas, à droite) Quantification de la surface néovascularisée à P17 : la souris Dp71-null présente une néo-angiogenèse inférieure à celle de la souris WT (Tadayoni 2009).

iii. Homéostasie et Barrière Hémato-Rétinienne

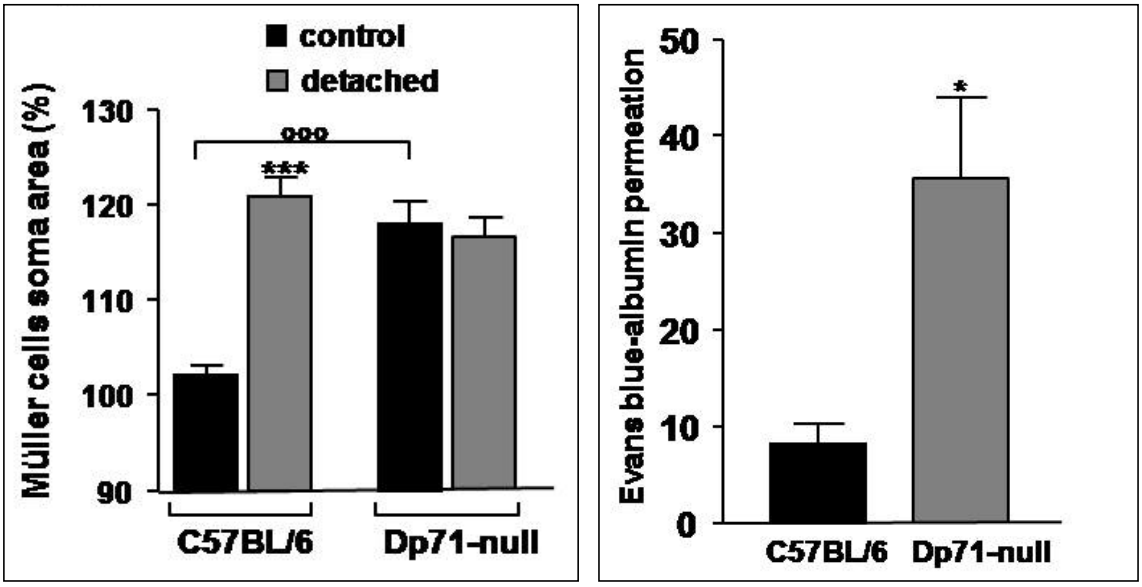
Dans un modèle expérimental de décollement de rétine chez la souris C57BL/6, l'étude de l'immunolocalisation de Kir4.1 et d'AQP4 a permis de mettre en évidence une délocalisation du canal potassique Kir4.1 et une baisse de l'expression du canal aqueux AQP4 dans la rétine décollée. La distribution de la Dp71 et de l'utrophine n'est pas modifiée après le décollement de rétine mais leur niveau d'expression est fortement modifié. Ces modifications sont associées à une forte gliose des CGM dans la rétine décollée. Ceci a été confirmé par analyse protéique la baisse de l'expression d'AQP4 et la Dp71 mais également la surexpression de l'utrophine après le décollement de rétine (Sene et al. 2009).

Il a également été montré chez les souris C57BL/6, nous avons montré que la délocalisation des canaux Kir4.1 est associée à une forte hypertrophie des CGM de la rétine décollée et par conséquent, la densité des courant K+ est diminuée. Le décollement de la rétine chez la souris Dp71-null entraîne également une hypertrophie des CGM et une baisse de la densité des courants K+.

Une dérégulation du transport de l'eau se traduit par un gonflement des CGM lorsqu'elles sont exposées à un stress osmotique. Alors que la dérégulation du transport de l'eau n'est observée que dans les CGM de la rétine décollée chez les souris C57BL/6, le transport de l'eau est déjà fortement perturbé dans les CGM de la rétine de souris Dp71-null avant tout décollement de la rétine (Figure 17, gauche). Chez les souris Dp71-null il a été mis en évidence l'implication de médiateurs inflammatoires dans le gonflement des CGM.

De plus, l'étude de la perméabilité des vaisseaux sanguins de la rétine a permis de mettre en évidence une altération de la régulation de la barrière hémato-rétinienne avec augmentation de la perméabilité vasculaire en absence de la Dp71 (Figure 17, droite).

Dans un contexte pathologique, l'expression de la Dp71 est fortement réduite ce qui entraîne une délocalisation de Kir4.1 et une baisse d'AQP4. La surexpression de l'utrophine ne permet pas de compenser cette baisse de la Dp71. L'absence de la Dp71 entraîne une dérégulation du transport de l'eau associée à une altération des courants K+. Cette absence de Dp71 dans les CGM modifie leurs propriétés physiologiques et fonctionnelles, notamment dans la régulation de la perméabilité vasculaire (Sene et al. 2009).



<u>Figure 17</u> : Propriétés de gonflement osmotique des cellules gliales de Müller et Perméabilité de la barrière hémato-rétinienne. (A gauche) Les cellules de Müller « contrôle » et issues d'un décollement de rétine de souris WT et Dp71-null ont été exposées à un défi hypotonique. Chez les souris WT, seules les cellules de décollement de la rétine gonflent alors que les cellules de Müller « contrôle » de rétine de souris Dp71-null présentent un gonflement en conditions normales. (A droite) La perméabilité de la barrière hémato-rétinienne a été mesurée sur des souris adultes WT et Dp71-null à l'aide de la méthode du bleu Evans qui est un test de perméabilité vasculaire. La perméabilité vasculaire est fortement augmentée chez les souris Dp71-null par rapport aux souris C57BL/6 (Sene et al. 2009).

V. L'AAV en Thérapie Génique et Barrières Rétiniennes

1) Biologie des Virus Adéno-Associés

Le virus adéno-associé (AAV) est un parvovirus non pathogène de 20 à 25 nm de diamètre, composé d'un génome à ADN simple brin de 4,7 kb contenu dans une capside icosaédrique non-enveloppée (Knipe DM 2006). Son génome contient deux gènes viraux, *rep* et *cap*, flanqués de séquences inversées répétées (ITR, inverted terminal repeat) de 145 pb qui fonctionnent comme une origine virale de réplication et un signal d'encapsidation (Knipe DM 2006). Le gène *rep* code pour quatre protéines non structurales qui ont un rôle dans la réplication virale, la régulation transcriptionnelle, l'intégration génomique et l'assemblage du virion (Knipe DM 2006). Le gène *cap* code pour trois protéines structurales (VP1, VP2, VP3) qui s'assemblent pour former une capside virale de 60 sous-unités (Sonntag et al. 2011; Sonntag et al. 2010). La capside du virus régit sa capacité à transduire des cellules à partir de sa liaison à un récepteur initial de surface cellulaire pour être internalisé par la cellule cible par endocytose. Après être entré dans la cellule, le virion s'échappe des endosomes précoces et se dirige jusqu'à la zone périnucléaire. Le moment où le virion perd sa capside n'est pas clairement établi, cela peut être avant ou après son entrée dans le noyau (Lux et al. 2005; Nonnenmacher and Weber 2011; Sonntag et al. 2006). Une fois dans le noyau, la synthèse du deuxième brin d'ADN doit se produire pour que l'expression des gènes viraux soit possible (Ferrari et al. 1996). Enfin, en l'absence de co-infection avec un virus helper, l'AAV entre en phase de latence durant laquelle les génomes viraux peuvent s'intégrer sélectivement dans le chromosome humain 19 au locus AAV1S (AAV sauvages) ou persistent en tant qu'épisomes extrachromosomaux (AAV sauvages ou recombinants) (Figure 18) (Duan et al. 1998; Kotin et al. 1990; Nakai et al. 2000).

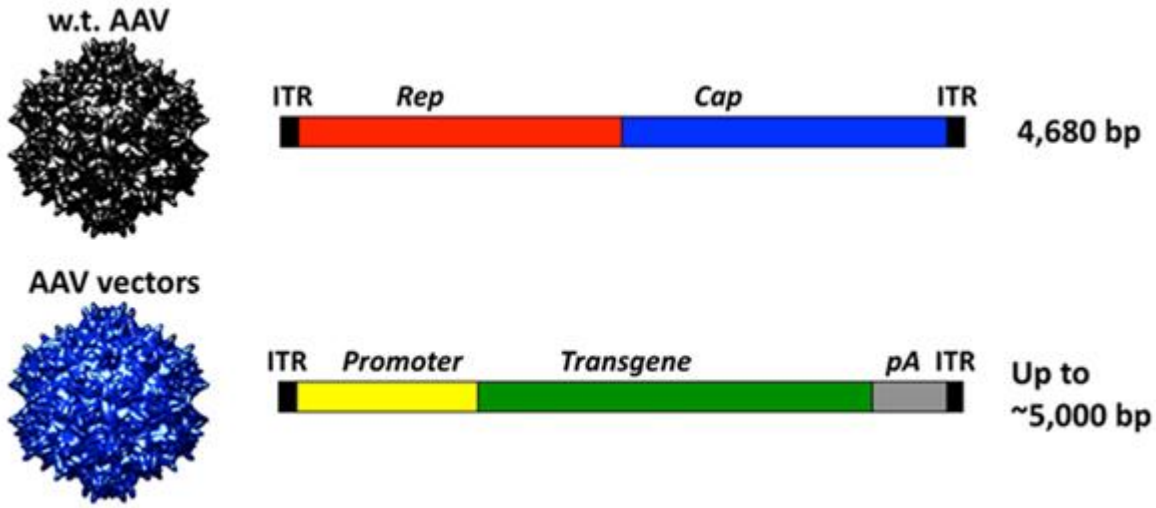


Figure 18 : Les virus adéno-associés et les AAV recombinants. Les AAV sont des virus de petite taille, de 20 à 25 nm de diamètre, non enveloppés. Ils possèdent un génome d'ADN monocaténaire de ~ 4,7 kilobases codant pour deux ensembles de gènes, les gènes *rep,* nécessaires pour la réplication et l'assemblage des virions, et les gènes *cap* qui codent pour les trois protéines, VP1, VP2, VP3 et qui forment la capside virale icosaédrique de 60 sous-unités avec une stœchiométrie de 1:1:10, respectivement. Les gènes *rep* et *cap* sont flanqués de deux séquences inversées répétées (ITR) qui sont nécessaires pour l'encapsidation du génome dans la capside virale (Zhou and Muzyczka 1998). Les ITR sont les seules séquences virales conservées dans les AAV recombinants, qui sont par ailleurs dépourvus de toute séquence virale codante (Masat et al. 2013).

2) AAV et Transfert de Gènes

Dans les versions recombinantes de l'AAV, un gène d'intérêt est inséré entre les ITR à la place des gènes *rep* et *cap*, et ces derniers sont fournis ainsi que des gènes viraux auxiliaires lors de la production du vecteur (Flotte 2004). Le vecteur résultant peut transduire aussi bien des cellules en division que des cellules quiescentes avec une expression stable du transgène pour plusieurs années en absence de virus helper dans des tissus post-mitotiques. Les AAV avec différentes capsides sont appelés sérotypes. Chaque sérotype a une efficacité différente pour infecter chaque type de cellulaire, cette propriété est appelée le tropisme (Colella & Auricchio 2010). Les mutations des protéines de capside permettent d'obtenir parfois de meilleures efficacités de transduction ou des tropismes différents selon les variants naturels. Il existe 11 sérotypes d'origine naturelle (Mori et al. 2004) et plus de 100 variants de l'AAV, dont chacun diffère par sa séquence en acides aminés, en particulier dans les régions hypervariables des protéines de capside, et donc par leurs propriétés de transfert de gène (Schaffer et al. 2008; Wu et al. 2006). De plus, des milliers de capsides génétiquement modifiées ont été créés par mutagenèse rationnelle de la capside (Petrs-Silva et al. 2011; Petrs-Silva et al. 2009; Zhong et al. 2008). Aucun AAV n'a été associé à ce jour à une maladie humaine, ce qui rend l'AAV recombinant très attractif pour l'application clinique (Knipe DM 2006).

L'AAV a donné des résultats prometteurs dans un nombre croissant d'essais cliniques (Bainbridge et al. 2008; Hauswirth et al. 2008; Maguire et al. 2008). Tout d'abord, le succès du transfert de gène par AAV a été très bien illustré par trois essais clinique en phase I pour l'amaurose congénitale de Leber (LCA), une maladie cécitante autosomique récessive rare, causée par des mutations de type perte de fonction du gène RPE65 codant pour une

isomérase du cycle visuel. De nombreux patients qui ont reçu une injection sous-rétinienne d'AAV2 codant pour une copie fonctionnelle du gène RPE65, présentent une amélioration significative et durable de la fonction visuelle et aucun effet toxique observable à ce jour (Bainbridge et al. 2008; Maguire et al. 2009; Maguire et al. 2008). Un deuxième exemple récent, l'injection d'AAV8 codant pour le facteur IX chez des patients souffrants d'hémophilie B, a abouti à des niveaux suffisants de protéine sécrétée pour atténuer le phénotype de saignement du patient (Nathwani et al. 2011). Les AAV recombinants sont également étudiés cliniquement pour traiter les dystrophies musculaires, la maladie de Parkinson et la maladie d'Alzheimer (Ginn et al. 2013). Néanmoins, il existe des obstacles qui peuvent limiter son utilité, comme les réponses immunitaires anticapsides, la faible transduction de certains tissus, l'incapacité à cibler spécifiquement certains types cellulaires et l'incapacité à vectoriser des séquences d'ADN de grande taille. Le design rationnel a fait des progrès dans la création de variants d'AAV ayant des propriétés améliorées (Girod et al. 1999; Zhong et al. 2008). Dans de nombreux cas, cependant, la connaissance mécanistique des AAV est insuffisante pour renforcer efficacement le design rationnel visant à améliorer l'AAV. L'évolution dirigée a émergé comme une stratégie alternative visant à créer de nouveaux variants de l'AAV qui répondent à des besoins biomédicaux spécifiques (Kwon and Schaffer 2008). L'évolution dirigée est une approche d'ingénierie moléculaire à haut débit qui a été utilisée avec succès pour produire des protéines pharmaceutiques avec des activités biologiques améliorées, des anticorps ayant une affinité de liaison augmentée et des enzymes avec de nouvelles spécificités (Romero and Arnold 2009). La méthode imite le processus de l'évolution naturelle, qui répète la diversification et la sélection génétique pour permettre l'accumulation de mutations clés ou de modifications génétiques qui améliorent

progressivement la fonction d'une molécule, même sans connaissance de la base mécanistique sous-jacente (Maheshri et al. 2006).

3) AAV dans la Rétine

Le nombre de personnes ayant une déficience visuelle dans le monde est estimé à 285 millions, dont 39 millions sont légalement aveugle (Mariotti et al. 2012). La plupart de ces patients souffrent de maladies qui affectent des types cellulaires de la rétine. L'œil, par rapport à d'autres tissus et organes, a des caractéristiques qui le rendent particulièrement approprié pour la thérapie génique (Bainbridge et al. 2006).

Tout d'abord, il s'agit d'un petit compartiment fermé. Pour cette raison, une concentration virale élevée durant longue période peut être obtenue en injectant une petite quantité de virus avec une diffusion et un risque systémique d'effets indésirables très faibles. En raison de son cloisonnement interne à l'intérieur de l'œil, un virus peut être délivré sélectivement au niveau des différentes structures oculaires, telles que la chambre antérieure, la cavité vitréenne, ou l'espace sous-rétinien (Figure 19). En raison de la compartimentation à l'intérieur de l'œil, un virus peut être délivré sélectivement au niveau des différentes structures oculaires, telles que la cavité vitréenne, ou l'espace sous-rétinien (Figure 19).

Deuxièmement, la plupart des types de cellules de la rétine sont stables, ils ne se divisent pas ou peu (Bhatia et al. 2011), et on peut obtenir une expression prolongée du transgène parce qu'ils ne sont pas dilués au cours des divisions cellulaires.

Troisièmement, l'œil est partiellement protégé des actions du système immunitaire par une barrière hémato-rétinienne (Streilein et al. 1997). Cette caractéristique, en plus de

l'inhibition locale de la réponse immunitaire et de l'induction systémique de cellules T régulatrices immunosuppressives par des mécanismes spécifiques à l'œil, contribue à un phénomène connu sous le nom de privilège immun oculaire (Caspi 2010; Streilein 2003), ce qui assure une protection partielle contre les réponses immunitaires antivirales.

Quatrièmement, de nombreux modèles animaux de maladies rétiniennes héréditaires ont déjà été développés chez les rongeurs, et les chiens, ce qui facilite l'évaluation préclinique de l'efficacité thérapeutique (Fletcher et al. 2011).

Cinquièmement, la transparence optique de l'œil, avec les progrès récents des techniques d'imagerie *in vivo* telles que l'ophtalmoscopie laser à balayage (SLO, scanning laser ophthalmoscopy), la tomographie par cohérence optique (OCT, optical coherence tomography), l'autofluorescence, et l'optique adaptative, permet non seulement une visualisation non invasive directe de l'expression du gène rapporteur, mais aussi une évaluation précise des résultats de thérapie génique dans les modèles animaux et chez les patients humains.

Sixièmement, le l'œil controlatéral non traité est potentiellement utile en tant que témoin en recherche comme dans les essais cliniques.

Les AAV peuvent être modifiés pour affiner un certain nombre d'éléments facultatifs. Ces éléments peuvent conférer sa spécificité à l'AAV pour cibler des types cellulaires spécifiques, mais aussi permettent d'obtenir des niveaux d'expression élevés ou une expression au moment choisi (Perabo et al. 2008; Petrs-Silva et al. 2009; Zhong et al. 2008). Ces éléments facultatifs comprennent les types de capsides responsables de l'entrée du virus, les protéines de capside responsables du traitement intracellulaire de l'AAV, et les

formes d'AAV simple ou double brin, ainsi que la séquence du gène d'intérêt et son promoteur (Klimczak et al. 2009; Pang et al. 2011).

Les AAV traversent un chemin compliqué au cours du processus de transfert de gènes. Au niveau cellulaire, la liaison du virus aux récepteurs de surface cellulaire, l'internalisation, l'accumulation nucléaire, la décapsidation, et la conversion du génome du virus de simple à double brin peuvent représenter des barrières au transfert de gènes. Cependant, pour l'administration *in vivo*, l'interaction hôte-virus commence au niveau du site d'injection, qui peut être la cavité vitréenne ou l'espace sous-rétinien, car le virus a d'abord besoin d'atteindre le tissu et les cellules cibles (Figure 19).

Le tropisme des AAV de sérotypes 1 à 9 a été précédemment étudié dans la rétine. Après une injection sous-rétinienne, l'AAV6 transduit principalement l'EPR, comme l'AAV1, auquel il est étroitement lié (Auricchio et al. 2001; Xiao et al. 1999; Yang et al. 2002). L'AAV4 présente une transduction exclusive et stable de l'EPR après injection sous-rétinienne, tandis que l'AAV3 transduit faiblement les cellules de la rétine (Weber et al. 2003; Yang et al. 2002). Les AAV2, 5, 7, 8, et 9 transduisent l'EPR et les photorécepteurs ; et les AAV8 et 9 transduisent également les CGM. De plus, les AAV5, 7, 8, et 9 montrent aussi une efficacité de transduction et une plus rapide expression du transgène que l'AAV2 après une injection sous-rétinienne (Yang et al. 2002). Cependant, l'AAV2 a été largement exploité pour améliorer ses caractéristiques de transduction dans la rétine (Auricchio 2003; Auricchio et al. 2001; Rabinowitz et al. 2002; Yang et al. 2002) et il est le seul AAV capable de transduire efficacement la rétine interne après une injection intravitréenne, indiquant que la jonction vitréorétinienne représente une vraie barrière tissulaire au transfert de gènes par AAV.

Il a été démontré que, après injection intravitréenne, le profil de transduction des AAV dans les cellules rétiniennes diffère de manière significative entre les rats nouveau-nés et adultes (Harvey et al. 2002). L'injection d'AAV2 à P0 entraîne la transduction des photorécepteurs, des cellules amacrines, et des cellules bipolaires, alors que la grande majorité des cellules transduites chez l'adulte ne sont que les cellules ganglionnaires de la rétine (RGC) (Harvey et al. 2002). La membrane limitante interne (MLI) - une membrane basale qui contient dix protéines de la matrice extracellulaire (Candiello et al. 2007) et qui définit histologiquement la frontière entre la rétine et le vitré (Halfter et al. 2008) (Figure 20) – constitue la première barrière physique à la pénétration de l'AAV dans la rétine depuis le vitré chez les adultes, alors qu'une MLI moins différenciées ou un espace extracellulaire plus important dans la rétine en développement peut présenter moins d'obstacles. La MLI a été identifiée comme étant une barrière à la transduction par AAV de la rétine par digestion de celle-ci avec la Pronase E, un groupe d'enzymes protéolytiques de Streptomyces griseus, capable de digérer la MLI chez le singe et chez le rat (Dalkara et al. 2009; Heegaard et al. 1986). Des récepteurs tels que les HSPG et le récepteur 32 k de la laminine qui sont abondants dans la MLI permettent la liaison des AAV de sérotypes 2, 8 et 9, tandis que les AAV de sérotypes 1 et 5 qui se lient à l'acide sialique, absent de la MLI, sont incapables de transduire la rétine de rat après injection intravitréenne (Dalkara et al. 2009; Hellstrom et al. 2009; Petrs-Silva et al. 2009). Ainsi, il a été démontré que, en combinant une injection intravitréenne d'AAV5 et de Pronase E, il était possible d'obtenir une expression intense du transgène dans différents types cellulaires de la rétine incluant les cellules de l'EPR et les photorécepteurs (Figure 21).

D'autre part, la présence de niveaux élevés de HSPG dans la MLI peut permettre l'accumulation de particules virales à la jonction vitréorétinienne et agir comme un «puits»

(Dalkara et al. 2009). Non seulement la MLI peut ainsi piéger dans sa matrice les particules virales capables de lier les HSPG mais elle peut également localiser efficacement le virus et l'empêcher d'être éliminé du vitré via le réseau trabéculaire, ce qui facilite la transduction ultérieure (Sakurai et al. 2001).

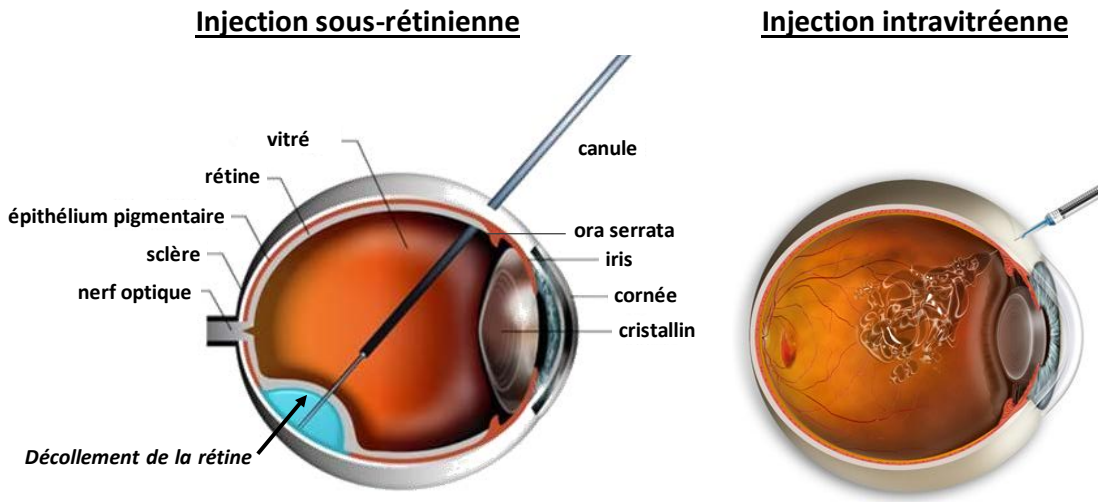


Figure 19 : Voies d'injection intraoculaire en thérapie génique via des AAV. (À gauche) L'injection sous-rétinienne consiste à traverser la sclère, le vitré puis la rétine et à injecter entre l'épithélium pigmentaire et la rétine, ce qui crée un décollement de la rétine. (À droite) L'injection intravitréenne, beaucoup moins traumatique que l'injection sous-rétinienne (à gauche), consiste à injecter directement dans le vitré en traversant la sclère au niveau de l'ora serrata.

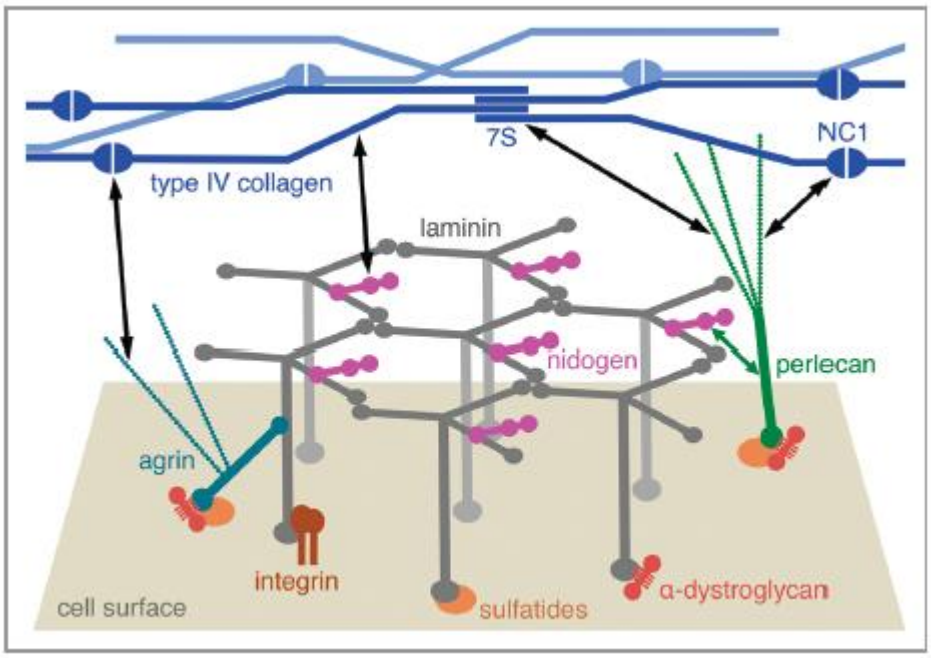


Figure 20 : Représentation schématique de la structure moléculaire de la membrane basale. Le réseau de laminine est ancré à la surface cellulaire par des interactions entre ses bras longs à des récepteurs cellulaires (intégrines, glycolipides sulfatés / sulfatides et α-dystroglycane). Les interactions collatérales sont faites avec des HSPG tels que l'agrine et le perlécane. Un réseau indépendant est formé par le collagène de type IV, par des interactions entre ses domaines N-terminaux (7S) et ses domaines C-terminaux (NC1), ainsi que par des associations latérales des triples hélices. Les réseaux de laminine et de collagène sont liés par le nidogène et par les héparane sulfates (doubles flèches noires) (Hohenester and Yurchenco 2013).

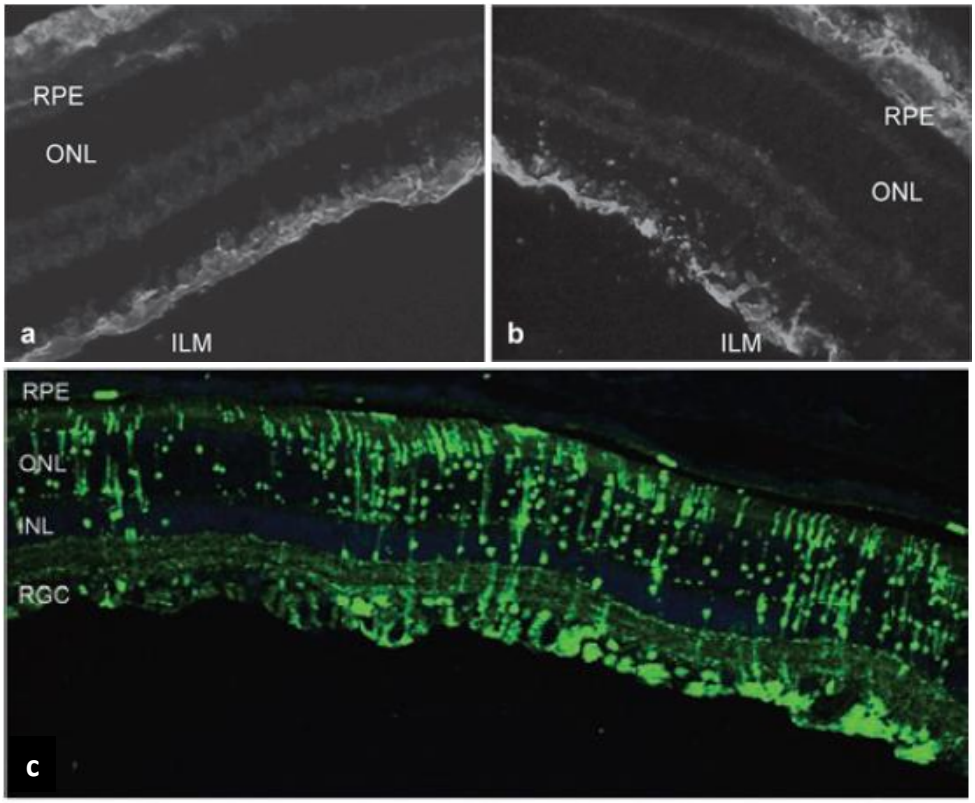


Figure 21 : Effets de la digestion à la Pronase E sur la membrane limitante interne. La rétine non traitée (a) marquées avec un anticorps anti-laminine présente une immunoréactivité au niveau de la MLI et de la choroïde alors que la rétine traitée à la Pronase E (b) présente une MLI désintégrée. RPE, épithélium pigmentaire rétinien ; ONL, couche nucléaire externe ; ILM, membrane limitante interne. (c) Trois mois après traitement à la Pronase E et injection intravitréenne d'AAV5, la rétine présente une expression intense du transgène GFP dans toutes les couches de la rétine (Dalkara et al. 2009).

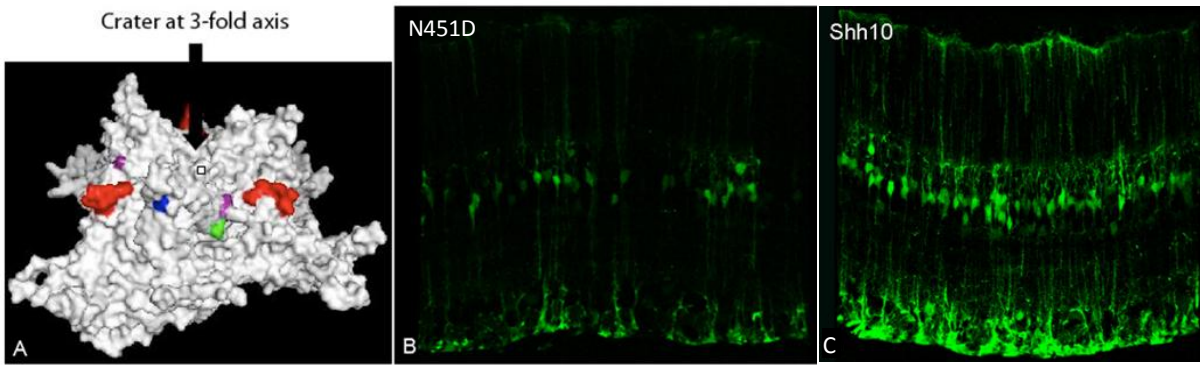
4) Cibler les Cellules Gliales de Müller

L'utilisation de vecteurs viraux, y compris de virus adéno-associés pour la transduction *in vivo* de cellules gliales a rencontré un succès limité (Davidson et al. 2000; de Leeuw et al. 2006; Liu et al. 2005), même lorsqu'ils sont combinés avec des promoteurs spécifiques des cellules gliales (Fitzsimons et al. 2002). Par conséquent, il était nécessaire de concevoir un variant d'AAV pour transférer efficacement des gènes aux cellules gliales.

À l'aide de l'évolution dirigée, les équipes des Prs Schaffer et Flannery ont récemment réussi à créer des AAV recombinants ayant de nouvelles propriétés de transfert de gènes, et cette approche a été depuis étendue pour générer des variants d'AAV hautement chimériques par brassage ADN (shuffling), mutagénèse aléatoire, diversification génétique et sélection sur des cultures primaires (Excoffon et al. 2009; Grimm et al. 2008; Koerber et al. 2008; Li et al. 2008). Ils ont fusionné avec succès de nombreuses stratégies, qui permettent de créer des bibliothèques d'AAV, pour générer de nombreux vecteurs qui pourront être utilisé en thérapie génique. Grâce à un criblage de ces AAV chimériques sur des cultures primaires d'astrocytes humains ils ont identifié un nouveau vecteur qui s'est révélé capable de transduire spécifiquement et efficacement les cellules gliales de Müller dans la rétine après injection intravitréenne chez le rat, le ShH10 (Koerber et al. 2008; Koerber et al. 2009).

Le ShH10 dérive du sérotype 6. Il est très spécifique des CGM, tandis que l'AAV6 ne donne aucune expression détectable dans la rétine lors de l'administration intravitréenne, mais curieusement il ne diffère de l'AAV6 qu'au niveau de quatre résidus: I319V, N451D, D532N, and H642N. Il a été mis en évidence que la mutation D532N améliore l'affinité du virus pour les protéoglycanes à héparane sulfate (HSPG). La mutation D532N est située près

du domaine de liaison aux HSPG de la capside du ShH10, et lorsque cette mutation est associée aux modifications N451D et I319V, la transduction de la MGC est synergiquement améliorée probablement grâce à une meilleure relation récepteur/co-récepteur (Figure 22). De plus, la mutation N451D diminue l'affinité de l'AAV6 pour l'acide sialique favorisant ainsi une autre voie de transduction. La mécanistique d'infection du ShH10 n'est pas totalement élucidée, mais les nouvelles propriétés conférées par ces mutations lui permettent de transduire spécifiquement les CGM (Klimczak et al. 2009).



<u>Figure 22</u> : Comparaison de l'AAV6 recombinant possédant la mutation N451D et du ShH10. (A) Représentation de la sous-unité VP3 de la capside de l'AAV6 : en bleu, la mutation N451D, en vert la mutation D532N et en violet le domaine de liaison aux HSPG (acide aminé K531). (B) Profil de transduction de l'AAV6 modifié en N451D. (C) Profil de transduction du ShH10 (Klimczak et al. 2009).

RESULTATS

VI. Résultats personnels

1) Transduction par AAVs de la rétine Dp71-null présentant une rupture de la barrière hémato-rétinienne (Article publié dans GLIA)

a) Situation du Sujet

La cellule gliale de Müller (CGM) est la principale cellule gliale de la rétine. Elle participe à la structure de la rétine en traversant toutes les couches neuronales et en formant les membranes limitantes externes et internes de la rétine. La CGM contribue avec les cellules endothéliales, les péricytes et les astrocytes à la mise en place de la barrière hémato-rétinienne (BHR) en limitant le passage de substances de la circulation sanguine vers la rétine (Hosoya and Tachikawa 2012). Plusieurs études ont montrées que l'ablation des CGM provoque une fuite vasculaire intense ce qui montre le rôle majeur des CGM dans le maintien d'une perméabilité normale de la BHR (Byrne et al. 2013; Dubois-Dauphin et al. 2000; Shen et al. 2012b). De nombreuses pathologies oculaires sont associées à une rupture de la BHR telles que la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA), la rétinopathie diabétique (RD) et la télangiectasie maculaire de type 2 (MacTel2). Nous avons montré, dans une précédente étude, que l'absence de Dp71 dans les CGM chez la souris Dp71-null entraîne une rupture de la BHR ainsi que d'autres caractéristiques de ces pathologies (Sene et al. 2009).

La Dp71 est une protéine du cytosquelette associée à la membrane localisée au niveau des pieds des CGM qui participe à l'homéostasie de la rétine (Tadayoni et al. 2012). La souris Dp71-null présente une rupture de la BHR accompagnée d'une délocalisation des canaux Kir4.1 et AQP4 et du β-dystroglycane tout le long de la CGM ainsi qu'une down-

régulation de AQP4 et du β-dystroglycane (Fort et al. 2008). En outre, les pieds des CGM deviennent lâches et s'élargissent en raison de l'absence d'ancrage du complexe de DAPs (Dystrophin associated proteins) par la Dp71 (Fort et al. 2008) et de la fuite vasculaire (Sene et al. 2009). De la même manière, nous avons démontré que lors d'un décollement de la rétine, la Dp71 est down-régulée et que la perméabilité vasculaire est augmentée. Tous ces résultats suggèrent que la souris Dp71-null peut être utilisée comme modèle animal de rupture de la BHR ayant de nombreuses caractéristiques communes aux pathologies humaines (Brevets Inserm N°08 305381.9 et N° EP09305608.3).

Étant donné que la CGM est impliquée dans tous les processus pathologiques des atteintes de la rétine, nous avons étudié leur participation à la perméabilité de la BHR chez la souris Dp71-null. Pour atteindre cet objectif, nous avons marqué les CGM Dp71-null en utilisant un virus adéno-associé (AAV) recombinant, le ShH10-GFP, conçu pour cibler spécifiquement les CGM dans la rétine de rat (Klimczak et al. 2009). Nous avons analysé le profil de transduction de la rétine Dp71-null par rapport au témoin sauvage. Comme la CGM fait partie de la membrane limitante interne (MLI), nous avons examiné si cette barrière n'était pas également compromise en plus de la BHR chez la souris Dp71-null. En effet, les AAV injectés dans le vitré peuvent soit s'accumuler et se fixer à la MLI (AAV2, AAV8, et AAV9) soit diffuser s'ils ne possèdent pas de site de liaison au niveau de la MLI (AAV1 et AAV5) (Dalkara et al. 2009). L'AAV5, injecté dans le vitré, est incapable de transduire la rétine alors qu'il mène à une infection intense de toutes les couches de la rétine lorsque la MLI est altérée. Notre objectif à long terme est de développer une thérapie génique visant à traiter des pathologies présentant une perméabilité de la BHR accrue. Cette thérapie devra prendre en compte le fait que la rétine à traiter présente une BHR corrompue. Il faudra ainsi s'assurer de la non-diffusion des AAV depuis le vitré vers la circulation sanguine puisque

l'utilisation réussie de l'AAV pour la thérapie génique oculaire en clinique est largement dû à l'absence de propagation des virus à partir du site d'injection, minimisant la diffusion systémique du virus et de la possibilité d'effets secondaires indésirables suivant l'injection intraoculaire (Bainbridge et al. 2008; Cideciyan et al. 2008; Maguire et al. 2008).

b) Résultats

Dans le but de comprendre l'implication des CGM dans la perméabilité de la rétine déficiente en Dp71, nous avons utilisé un AAV conçu pour cibler spécifiquement ces cellules, le ShH10. Nous avons ainsi comparé les interactions entre les CGM, le réseau vasculaire (BHR), et la MLI chez la souris Dp71-null par rapport à la souris sauvage.

Nous avons mis en évidence que le ShH10 permet de transduire spécifiquement et efficacement les CGM chez la souris sauvage et chez la souris Dp71-null. Cependant, les profils de transduction sont très différents entre ces deux modèles de souris. Chez la souris sauvage, les CGM transduites se distribuent le long des grands vaisseaux sanguins à la surface interne de la rétine alors que chez la souris Dp71-null, le ShH10-GFP transduit les CGM dans toute la rétine. Grâce au marquage GFP des CGM par le ShH10, nous avons remarqué que les pieds des CGM déficientes en Dp71 ne s'enroulent pas autour des vaisseaux comme ils le font dans les rétines de type sauvage. En outre, nous avons constaté que les CGM sont transduites significativement plus intensément en absence de Dp71, suggérant que les AAV ont un meilleur accès à la rétine chez ce modèle de souris.

L'administration intravitréenne d'AAV5 a conduit au marquage intense et sélectif des photorécepteurs de la rétine Dp71-null indiquant que la MLI devient perméable aux AAV en absence de Dp71. Cette observation nous a conduits à vérifier l'état de la MLI par un

marquage de la laminine - composant majeur de la MLI - et ainsi nous avons mis en évidence une altération significative et un amincissement de la MLI chez la souris Dp71-null.

Nous avons aussi démontré que, chez les souris Dp71-null, la MLI est très perméable à différents sérotypes d'AAV après une injection intravitréenne alors que la BHR reste imperméable aux particules virales, une considération importante pour la sécurité des thérapies géniques à venir pour traiter des pathologies visuelles associées à une BHR compromise.

c) Conclusion

Plusieurs pathologies rétiniennes sont liées à un phénotype de rupture de la BHR. C'est pourquoi comprendre les mécanismes moléculaires qui contribuent à l'intégrité des barrières rétiniennes est très important. La souris Dp71-null est un bon modèle animal pour étudier l'implication de la CGM dans le maintien de ces barrières. En effet, l'absence de Dp71, exprimée très abondamment dans la CGM, provoque une rupture de la BHR chez cette souris.

L'utilisation du ShH10 comme outil de marquage des CGM, nous a permis de mettre en évidence chez la souris sauvage que les CGM transduites étaient principalement localisées autour des vaisseaux majeurs de la rétine. Il est bien connu que la MLI est plus fine au niveau des vaisseaux principaux de la rétine (Yanoff and Fine 1996) et que les CGM s'enroulent autour des vaisseaux sanguins ce qui peut expliquer ce profil de transduction le long du réseau vasculaire de la rétine après injection de particules virales dans le vitré de la souris normale. Contrairement à la souris sauvage, la souris Dp71-null présente une zone transduite par le ShH10 beaucoup plus large reflétant un meilleur accès des CGM aux particules virales.

En absence de Dp71, les pieds des CGM sont plus larges et plus étalés (Fort et al. 2008) exposant une plus large surface de contact au virus au niveau de la MLI. La laminine est un composant clé de la MLI au cours du développement suggérant qu'elle joue un rôle important dans son organisation. Notre étude a montré que l'absence de Dp71 détériore la laminine et altère significativement l'organisation de la MLI. La laminine se lie à plusieurs récepteurs de surface cellulaire comme le dystroglycane (Durbeej 2010), c'est pourquoi il n'est pas surprenant qu'en absence de dystroglycane au niveau des pieds des CGM de la souris Dp71-null, la laminine et la MLI soient désorganisées.

L'amincissement de la MLI est une caractéristique importante du point de vue de l'infection virale puisque l'injection intravitréenne d'AAV est gênée par la présence de cette membrane (Dalkara et al. 2009; Ivanova et al. 2010; Yin et al. 2011). La voie intravitréenne est préférée car elle est moins invasive et permet l'administration du virus à toute la rétine. Les méthodes actuelles d'injection sous-rétiniennes impliquent de réaliser un décollement de la rétine pour atteindre la rétine externe ce qui résulte dans la transduction umiquement d'une partie de la rétine (Jacobson et al. 2012).

Nous avons testé la perméabilité de la MLI en administrant l'AAV5, un virus incapable d'atteindre la rétine externe en injection intravitréenne, et nous avons montré qu'en absence de Dp71 ce virus est capable de transduire spécifiquement les photorécepteurs et donc d'atteindre des couches profondes de la rétine. Cette observation indique que les injections sous-rétiniennes invasives pourraient être évitées puisque même la rétine externe peut être atteinte par injection intravitréenne d'AAV en absence de Dp71 (Brevet Inserm N°13 305 914.7 déposé le 28 juin 2013).

L'expression de la Dp71 est down-régulée après décollement de la rétine montrant le rôle central de cette protéine dans le maintien d'une perméabilité normale de la BHR. Ainsi, l'expression exogène de la Dp71 pourrait potentiellement restaurer les propriétés de barrière des pieds des CGM. C'est pourquoi cette étude préliminaire de transfert de gène par AAV aux CGM pose les bases du développement d'une thérapie génique visant à restaurer l'expression de la Dp71 dans des pathologies associées à une rupture de la BHR. Un obstacle potentiel serait la fuite de virus dans la circulation sanguine. Nous avons donc analysé des échantillons sanguins de souris ayant reçues au préalable une injection intravitréenne de virus et nous n'avons détecté aucune trace de virus dans ces échantillons.

En conclusion la MLI de la souris Dp71-null est plus fine et plus perméable aux AAV après injection intravitréenne alors que la BHR reste imperméable aux AAV. Ces résultats sont rassurants pour le développement de thérapies géniques pour des pathologies liées à une BHR altérée telles que la DMLA, la DB ou MacTel2, et la souris Dp71-null est un excellent modèle d'étude de ces pathologies.

This work has been published (see the first page of the paper below), but for an easy reading and a better observation of the figures, we have joined the manuscript of the article:

AAV-mediated gene delivery in Dp71-null mouse model with compromised barriers

Ophélie Vacca, Marie Darche, David V. Schaffer, John G. Flannery, José-Alain Sahel, Alvaro Rendon, Deniz Dalkara.

Glia. 2014 Mar;62(3):468-76. doi: 10.1002/glia.22617. Epub 2013 Dec 31.

RESEARCH ARTICLE

AAV-mediated Gene Delivery in Dp71-null Mouse Model with Compromised Barriers

Ophélie Vacca,[1] Marie Darche,[1] David V. Schaffer,[2] John G. Flannery,[3] José-Alain Sahel,[1,4,5,6] Alvaro Rendon,[1] and Deniz Dalkara[1]

Formation and maintenance of the blood–retinal barrier (BRB) is required for proper vision and breaching of this barrier contributes to the pathology in a wide variety of retinal conditions such as retinal detachment and diabetic retinopathy. Dystrophin Dp71 being a key membrane cytoskeletal protein, expressed mainly in Müller cells, its absence has been related to BRB permeability through delocalization and down-regulation of the AQP4 and Kir4.1 channels. Dp71-null mouse is thus an excellent model to approach the study of retinal pathologies showing blood–retinal barrier permeability. We aimed to investigate the participation of Müller cells in the BRB and in the inner limiting membrane of Dp71-null mice compared with wild-type mice in order to understand how these barriers work in this model of permeable BRB. To this aim, we used an Adeno-associated virus (AAV) variant, ShH10-GFP, engineered to target Müller cells specifically. ShH10 coding GFP was introduced by intravitreal injection and Müller cell transduction was studied in Dp71-null mice in comparison to wild-type animals. We show that Müller cell transduction follows a significantly different pattern in Dp71-null mice indicating changes in viral cell-surface receptors as well as differences in the permeability of the inner limiting membrane in this mouse line. However, the compromised BRB of the Dp71-null mice does not lead to virus leakage into the bloodstream when the virus is injected intravitreally – an important consideration for AAV-mediated retinal gene therapy.

GLIA 2013;00:000–000

Key words: Dystrophin Dp71, Müller cell, AAV, blood–retinal barrier, inner limiting membrane

Introduction

Müller cells are the principal glial cell of the retina. They provide architectural support stretching radially across the thickness of the neural layers and their endfeet form the limits of the retina at the outer and inner limiting membranes, respectively. Additionally, Müller cells are intimately connected with retinal endothelial cells, pericytes, and astrocytes to establish the blood–retinal barrier (BRB) limiting material transport between the bloodstream and the retina (Hosoya and Tachikawa, 2012). Conditional Müller cell ablation leads to rapid and intense focal vascular leakage (Shen et al., 2012) showing the crucial role of these cells in the maintenance of this barrier. In the clinic, BRB breakdown is seen in retinal detachment, inflammatory eye diseases, age-related macular degeneration (AMD), and in macular oedema, an important complication of numerous injuries and ocular diseases such as uveitis, diabetic retinopathy (DR), and macular telangiectasia (MacTel 2). In MacTel 2 and in DR, Müller cell loss and abnormalities have been observed associated with BRB breakdown. Currently, there is no good transgenic animal model to study diseases with BRB breakdown because these pathologies are not purely genetic but multifactorial. In previous work, we have shown that the absence of Dystrophin Dp71 in Müller cells causes a breakdown of the BRB emulating some hallmarks associated with these diseases.

Dp71 is a membrane-bound cytoskeletal protein localized at the Müller cell endfeet participating in ion and water homeostasis (Tadayoni et al., 2012). The Dp71 knockout mouse (Sarig et al., 1999) shows a blood–retinal barrier (BRB) permeability together with a redistribution of the ion channels

View this article online at wileyonlinelibrary.com. DOI: 10.1002/glia.22617

Published online Month 00, 2013 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com). Received June 12, 2013, Accepted for publication Nov 22, 2013.

Address correspondence to: Alvaro Rendon, Institut de la Vision/INSERM/UPMC, Univ Paris 06/CNRS/CHNO des Quinze-Vingts, Paris, France. E-mail: alvaro.rendon@inserm.fr and Deniz Dalkara, Institut de la Vision/INSERM/UPMC, Univ Paris 06/CNRS/CHNO des Quinze-Vingts, Paris, France. E-mail: deniz.dalkara@inserm.fr

From the [1]Institut de la Vision/INSERM/UPMC, Univ Paris 06/CNRS/CHNO des Quinze-Vingts, Paris, France; [2]University of California Berkeley, Department of Bioengineering, Department of Chemical Engineering, Helen Wills Neuroscience Institute; [3]University of California Berkeley, Department of Molecular and Cell Biology, Helen Wills Neuroscience Institute; [4]Fondation Ophtalmologique Adolphe de Rothschild, Paris, France; [5]Institute of Ophthalmology, University College of London, United Kingdom; [6]Académie des Sciences–Institut de France, Paris, France.

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

© 2013 Wiley Periodicals, Inc.

AAV MEDIATED GENE DELIVERY IN Dp71-NULL MOUSE MODEL WITH COMPROMISED BARRIERS

Ophélie Vacca[1], Marie Darche[1], David V. Schaffer[5,6], John G. Flannery[5,6], José-Alain Sahel[1,2,3,4], Alvaro Rendon[1], Deniz Dalkara[1]

[1]Institut de la Vision/INSERM/UPMC Univ Paris 06/CNRS/CHNO des Quinze-Vingts, Paris, France

[2]Fondation Ophtalmologique Adolphe de Rothschild, Paris, France

[3]Institute of Ophthalmology, University College of London, UK

[4]Académie des Sciences–Institut de France, Paris, France

[5]Univ of California, Berkeley, Berkeley, CA

[6]HWNI and CChem

KEY WORDS

Dystrophin Dp71; Müller cell; AAV; blood-retinal barrier; inner limiting membrane

ABSTRACT

Formation and maintenance of the blood-retinal barrier (BRB) is required for proper vision and breaching of this barrier contributes to the pathology in a wide variety of retinal conditions such as retinal detachment and diabetic retinopathy. Dystrophin Dp71 being a key membrane cytoskeletal protein, expressed mainly in Müller cells, its absence has been related to BRB permeability through delocalization and down-regulation of the AQP4 and Kir4.1 channels. Dp71-null mouse is thus an excellent model to approach the study of retinal pathologies showing blood-retinal barrier permeability. We aimed to investigate the participation of Müller cells in the BRB and in the inner limiting membrane of Dp71-null mice compared with wild-type mice in order to understand how these barriers work in this model of permeable BRB. To this aim, we used an Adeno-associated virus (AAV) variant, ShH10-GFP, engineered to target Müller cells specifically. ShH10 coding GFP was introduced by intravitreal injection and Müller cell transduction was studied in Dp71-null mice in comparison to wild-type animals. We show that Müller cell transduction follows a significantly different pattern in Dp71-null mice indicating changes in viral cell-surface receptors as well as differences in the permeability of the inner limiting membrane in this mouse line. However, the compromised BRB of the Dp71-null mice does not lead to virus leakage into the blood stream when the virus is injected intravitreally – an important consideration for AAV mediated retinal gene therapy.

INTRODUCTION

Müller cells are the principal glial cell of the retina. They provide architectural support stretching radially across the thickness of the neural layers and their endfeet form the limits of the retina at the outer and inner limiting membrane respectively. Additionally, Müller cells are intimately connected with retinal endothelial cells, pericytes, and astrocytes to establish the blood retinal barrier (BRB) limiting material transport between the bloodstream and the retina (Hosoya and Tachikawa 2012). Conditional Müller cell ablation leads to rapid and intense focal vascular leakage (Shen et al. 2012a) showing the crucial role of these cells in the maintenance of this barrier. In the clinic, BRB breakdown is seen in retinal detachment, inflammatory eye diseases, age-related macular degeneration (AMD), and in macular oedema, an important complication of numerous injuries and ocular diseases such as uveitis, diabetic retinopathy (DR), and macular telangiectasia (MacTel2). In MacTel2 and in DR, Müller cell loss and abnormalities have been observed associated with BRB breakdown. Currently, there is no good transgenic animal model to study diseases with BRB breakdown because these pathologies are not purely genetic but multifactorial. In previous work we have shown that the absence of Dystrophin Dp71 in Müller cells causes a breakdown of the BRB emulating some hallmarks associated with these diseases.

Dp71 is a membrane-bound cytoskeletal protein localized at the Müller cell endfeet participating in ion and water homeostasis (Tadayoni et al. 2012). The Dp71 knockout mouse (Sarig et al. 1999) shows a blood-retinal barrier (BRB) permeability together with a redistribution of the ion channels Kir4.1, the water transport protein, Aquaporin 4 (AQP4) and the β-dystroglycan throughout the Müller cells, as well as a down-regulation of the AQP4 and β-dystroglycan (Fort et al. 2008). Dramatic morphological modification of the Müller cell endfeet occurs in absence of Dp71. Müller cell endfeet become slack and spread

due to the lack of anchoring through Dp71 (Fort et al. 2008) and vascular permeability increases (Sene et al. 2009). Similarly, in retinal detachment, Dp71 protein becomes down-regulated, leading to increased retinal vascular permeability (Sene et al. 2009). These findings collectively suggest that Dp71-null mouse can be used as an animal model with permeable BRB emulating a number of hallmarks of retinal detachment, diabetic retinopathy or age-related macular degeneration (patents № 08 305381.9, 2008; and № EP09305608.3, 2010). As Müller cells are involved in virtually all pathological processes concerning the retina, we wanted to investigate their participation in the BRB permeability that occurs in the Dp71-null mice at a morphological level. To this aim, we fluorescently labeled Müller cells of the Dp71-null mouse, using an Adeno-associated virus (AAV) variant, ShH10-GFP, engineered to target Müller cells specifically (Klimczak et al. 2009). In the Dp71-null mouse, we noted that the Müller cells are transduced throughout the retina, whereas Müller cell transduction follows the large retinal blood vessels at the inner surface of the retina in the normal mouse retinas. The endfeet of the Dp71 deficient Müller cells do not wrap around the vasculature as they do in the wild-type retinas. Furthermore, we found that these cells are transduced more intensely in absence of Dp71, insinuating a better viral access to the retina in this mouse model.

A long-term perspective of this work is to develop AAV-based gene therapies for diseases with permeable BRB. These gene therapies need to account for a retina with compromised barriers. Information on how AAV vectors behave in retinas displaying some hallmark symptoms of diseases with increased vascular permeability is timely. We have thus examined the increased retinal transduction observed using AAV in more detail in the Dp71-null model. As Müller cell endfeet are considered part of the inner limiting membrane, we inquired if this barrier might also be compromised in addition to the BRB, in this mouse.

Previous work has shown that AAV injected into the vitreous both binds and accumulates at the ILM (AAV2, 5, and 9) or diffuses away from the retina if binding sites are unavailable (AAV1 and AAV5) (Dalkara et al. 2009). Changes in the transduction patterns are most obvious with AAV5 vectors administered intravitreally, as this vector incapable of infecting the wild-type retina leads to the most robust pattern of gene expression when the inner limiting membrane is breached. Indeed, intravitreal delivery of AAV5 led to intense and selective labeling of photoreceptor cells in the Dp71-null retina indicating the ILM becomes permeable to AAV in absence of Dp71. This finding indicates that invasive subretinal injections can be avoided as even the outer retina can be reached through intravitreal AAV administration in absence of Dp71.

Another consideration in the development of gene therapies in diseases with compromised BRB is virus leakage into the bloodstream. The successful application of AAV in ocular gene therapy in the clinic (Bainbridge et al. 2008; Cideciyan et al. 2008; Maguire et al. 2008) is largely due to the lack of spread of virus from the injection site, which minimizes systemic dissemination of the virus and the possibility of unwanted systemic side effects following intraocular delivery. Here we demonstrate that, in the Dp71-null mice, the ILM is highly permeable to different AAV serotypes after an intravitreal injection whereas the BRB remains impermeable to AAV particles, an important consideration for the safety of gene therapies for diseases with compromised BRB.

MATERIALS AND METHODS

Animals

The Dp71-null mice (Sarig et al. 1999) was a kind gift from Pr David Yaffe and were produced by replacing, via homologous recombination, most of the first and unique exon of Dp71 and of a small part of Dp71 first intron with a sequence encoding a β-gal-neomycin-resistance chimeric protein (β-geo). In this mouse line, Dp71 expression is abolished without interfering with the expression of other products of the DMD (Duchenne Muscular Dystrophy) gene. C57BL/6J mice strain (JANVIER, France) was used as controls for this study. All animals used in this study were cared for and handled according to the ARVO Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research.

Generation and purification of AAV vectors

Recombinant AAVs were produced by the plasmid co-transfection method (Choi et al. 2007a; Choi et al. 2007b), and the resulting lysates were purified via iodixanol gradient ultracentrifugation as previously described. Briefly 40% iodixanol fraction was concentrated and buffer exchanged using Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Units. Vector stocks were then tittered for DNase-resistant vector genomes by real time PCR relative to a standard (Aurnhammer et al. 2012).

Injections

Before vector administration, mice were anesthetized with ketamine (50 mg/kg) xylazine (10 mg/kg Rompum). Pupils were dilated by the ocular instillation of neosynephrine 5% Faure (Europhta) and mydriaticum 0,5% (Théa) eye drops. An ultrafine 30-gauge disposable needle was passed through the sclera, at the equator and next to the limbus, into the vitreous cavity. Injection of 1 µl stock containing 1-4x10^{11} vp, was made with direct

observation of the needle in the center of the vitreous cavity. Left eyes were injected and right eyes served as control.

Fundus photography

Fundus examinations were performed at 7, 14, 21 and 28 days after the intravitreal injection of AAV5 or ShH10 coding GFP under the ubiquitous CAG promoter. Fundus photographs were obtained with a scanning laser ophthalmoscope (SLO) (HRA, Heidelberg, Germany) or a Micron III fundus camera. Mouse pupils were dilated by the application of neosynephrine (5%) and mydriaticum (0,5%) eye drops prior to imaging.

Optical Coherence Tomography

OCT was performed using an SD-OCT system (Bioptigen Inc., Durham, NC). Hydration with normal saline was used to preserve corneal clarity. Volume analysis centered on the optic nerve head was performed, using 100 horizontal, raster, and consecutive B-scan lines, each one composed of 1200 A-scans. The volume size was 1.4 × 0.1 mm either side of the optic nerve. A custom software was used to generate the en face fundus image using reflectance information obtained from the OCT sections (volume intensity projection), so that the point-to-point correlation between OCT and fundus position was possible and accurate.

PCR analysis of mouse blood samples

Genomic DNA from blood samples was extracted using QIAamp® DNA Micro Kit (QIAGEN, Germany) according to the manufacturer's instructions. PCR amplifications of genomic DNA were performed using GoTaq® DNA polymerase (Promega, USA) on a ThermoCycler instrument (Applied Biosystem). PCR primers were designed using Primer3

software. The following primer pair was used: GFP, sense 5'- CGACACAATCTGCCCTTTCG -3', antisense 5'- CATGGACGAGCTGTACAAGGGA -3'.

Immunochemistry

One month after vector injection, enucleated eyes were dissected to remove lens and cornea, and fixed by immersion in 4% paraformaldehyde for 1 hour. Fixed eyes were cryoprotected in 30% sucrose, frozen and embedded in Cryomatrix (Thermo Shandon). 10µm-cryosections were cut and mounted on SuperFrost/Plus slides (Microm). Sections were permeabilized for 10 minutes with 0.1% Triton X100 in PBS (Phosphate Buffer Saline) and blocked for 1 hour with 1% bovine serum albumin, 0.1% Tween 20 in PBS. For retinal flatmounts, enucleated eyes were immersion fixed in 4% paraformaldehyde for 10 minutes. Retinas were separated from the RPE and sclera by cutting around the ora serrata and cutting the optic nerve. For agarose sections, fixed retinas were rinsed in PBS, embedded in warm 5% agarose (type XI, Sigma) and sectioned at 100 µm with a vibratome (Leica, Allendale, NJ). Tissues were then incubated with primary antibodies in blocking buffer at 4°C overnight. The antibodies used are as follows: anti-GFAP antibody (Z0334, Dako) 1/1500, anti-laminin (L9393, Sigma) 1/1000, anti-rhodopsin clone 4D2 (MABN15, Millipore) 1/500, anti-glutamine synthetase clone GS-6 (MAB302, Millipore) 1/1500, PNA Lectin (L32459, Invitrogen) 1/40; Lectin from *Bandeiraea simplicifolia* TRITC conjugate (L5264, Sigma) 1/80. After several washes with PBS, secondary antibodies (Interchim, France) coupled to Alexa fluor (Invitrogen, France) were used diluted 1:800 for 1 hour at room temperature. Retinas were mounted with Fluorsave reagent (Calbiochem). Confocal microscopy was performed on an Olympus FV1000 laser-scanning confocal microscope. Images were acquired sequentially, line by line, in order to reduce excitation and emission crosstalk, step size was defined according to the Nyquist-Shannon sampling theorem. Exposure settings that minimized

oversaturated pixels in the final images were used. Twelve bit Images were then processed with FIJI, Z-sections were projected on a single plane using maximum intensity under Z-project function and finally converted to 8-bit RGB color mode.

Data analysis

Results are expressed as mean ± Standard Error of the Mean (SEM). Confocal stacks of 50 images were taken with the same settings. These images were Z projected and the fluorescence area was quantified with Fiji (Fiji Is Just ImageJ) software. Fluorescence data were then analysed using Mann Whitney U test with Prism 5 (GraphPad Software, San Diego, CA). p values < 0,05 accepted as statistically significant.

RESULTS

ShH10-GFP targets Müller glial cells in the wild-type mouse retina

Previously, the AAV variant ShH10, engineered for specific glial transduction by directed evolution, has been characterized in rat retinas (Klimczak et al. 2009) and has been shown to transduce almost exclusively the Müller cells with small amount of off target expression in RGCs. To validate the Müller cell specificity of this virus in mouse retina, we injected intravitreally 1-4.10^{11} vg of ShH10 coding GFP under the control of a ubiquitous promoter. Injections were done in 8-weeks-old mice and followed weekly by *in vivo* fluorescence imaging up to 4 weeks after injection (n=10). We observed that GFP expression peaked at day 7 and remained constant thereafter (Figure 1A). Histological examination of GFP expression in retinal flatmounts revealed a strong expression pattern localized near major vasculature and the optic nerve (Figure 1B). Confocal imaging of retinal cross-sections (Figure 1C) and retinal flatmounts (Figure I) after GFAP immunostaining, showed exclusive Müller cell transduction using ShH10 and no GFP expression in astrocytes or retinal ganglion cells (RGCs). In conclusion, in wild-type mice ShH10-GFP is highly selective for Müller cells.

Müller cell transduction with ShH10-GFP in the Dp71-null mouse retina

To assess Müller cell morphology in the Dp71-null mice, ShH10-GFP was delivered at an equal titer into the vitreous of Dp71-null mice (n=10). Transduction patterns were compared to wild-type retinas, by scanning laser ophthalmoscope (SLO) (Figure 2A and B) 15 days post-injection. One month post-injection in flatmounted retinas (Figure 2C and D) were imaged and contrasted. Figure 2C and D shows representative images of GFP fluorescence in the two mouse models. Dp71-null mice show a more widespread and higher intensity Müller

cell transduction compared to wild-type mice (n= 6). The numbered rectangles on flatmounted retinas (Figure 2C and D), represent the four representative areas used for confocal images in Figures 2E and F. Using these confocal stacks acquired using the same settings, we compared the transduction levels in the Müller cells by quantifying the extent of GFP labeled area and GFP intensity for each retina (Figure 2G and H). The fluorescence area was approximately 2 fold larger in the Dp71-null than in the wild-type mice and the fluorescence intensity was approximately 6 fold higher in the Dp71-null than in the wild-type mice. Interactions between GFP labeled Müller glia and astrocytes were examined using higher magnification confocal images following GFAP labeling. This showed that ShH10 did not transduce any astrocytes, (Figures 2I and 2J) and similar interactions were observed between astrocytes and blood vessels in both retinas. We also confirmed the high selectivity of ShH10 for Müller cells on agarose sections in Dp71-null mice showing there is no expression in other cell-types using ShH10 (Figure S1). These results collectively show that the Müller cells can be more easily and intensively transduced by ShH10 in absence of Dp71. Furthermore, labeling of the Müller cells shows their endfeet are more spread out in absence of Dp71 than those of wild-type mice, confirming previous observations (Fort et al. 2008).

The inner-limiting membrane is altered in the Dp71-null mice

The Müller cell endfeet are deformed in absence of Dp71 (Fort et al. 2008), and this leads to changes in the structure of the inner limiting membrane (ILM) in addition to the previously described leakiness of the BRB. To compare the characteristics of the ILM in wild-type and Dp71-null mice, cross sections of Dp71-null retinas with GFP labeled Müller cells were examined in relation to the ILM. The ILM was labeled with an anti-laminin antibody as

laminin is a major component of the ILM secreted by Müller cell endfeet (Halfter et al. 2008). Our data shows that the ILM is thinner and compacted around the Müller cell endfeet in retinal cross-sections (Figure 3A-D). This provides evidence for thinning of the ILM in the Dp71-null retinas through the delocalization of laminin in absence anchoring through beta-dystroglycan.

Prior studies have shown that Kir4.1 and AQP4 associate with the Dp71-dependent DAPs complex at the Müller cell endfeet and that this complex associates with laminin through beta-dystroglycan (Hirrlinger et al. 2011) (Figure 3G). It is known that Dp71 absence is correlated with a profound reorganization in Muller cells including the compensatory up-regulation and redistribution of utrophin along the Muller cell body, a dramatic decrease of AQP4 expression, a significant decreased expression and redistribution of beta dystroglycan along with the increased expression and redistribution of alpha dystrobrevin and the redistribution of Kir4.1. These important intracellular perturbations are reflected by a lack of interaction of the DAPs complex with ILM components outside the Müller cell.

In wt retinas, laminin forms a homogenous layer at the Müller cell endfeet covering the vitreo-retinal junction. In contrast, Dp71-null retinas show heterogeneous distribution of laminin, with intensely labeled and unevenly distributed patches of laminin across the retina (Figure 3E-F).

In addition to the observations about ILM thickness, we observed that all layers of Dp71-null mouse retinas were thinner than those of the wild-type mice (Supplemental Figure S2). Retinal thickness loss as well as the ECM becoming more porous in absence of Dp71 can be additional factors contributing to the improvement in AAV transduction. *In vivo* OCT imaging confirmed our histological observations of retinal thickness. OCT imaging was performed 100 µm around the optic nerve on 8 eyes of each strain. Following measurements

were made after Z projection of OCT images at 500 µm from the optic nerve (Supplemental Figure S2A): (i) the whole retina, from the retinal pigment epithelium (RPE) to the ganglion cell layer (GCL); (ii) the photoreceptor layer composed of the outer segments (OS) and the inner segments (IS); (iii) the outer nuclear layer (ONL); (iv) and the inner retina consisting of the inner nuclear layer (INL), the inner plexiform layer (IPL), the GCL and the ILM (Supplemental Figure S2B). After statistical analysis, we showed that each retinal cell layer is significantly thinner in Dp71-null mice than in wild-type mice (Supplemental Figure S2C).

Intravitreal injection of AAV5-GFP strongly transduces photoreceptors in Dp71-null mouse retina.

It has been shown that the mild digestion of the ILM with a nonspecific protease enhanced transduction of multiple retinal cell types from the vitreous, with AAV5 mediating particularly remarkable expression at the photoreceptor layer (Dalkara et al. 2009). AAV5 is known to only transduce the photoreceptor cells when it is injected subretinally or when the ILM of the retina is disrupted (Dalkara et al. 2009; Kolstad et al. 2010; Li et al. 2009). Based on this knowledge, we tested the ability of AAV5 to transduce retinal photoreceptors after injection into the vitreous of Dp71-null mice testing the hypothesis of a disrupted ILM. As anticipated, one month after intravitreal injection of AAV5-GFP (n=6), we obtained strong photoreceptor transduction across the entire retina in the Dp71-null mice (Figures 4B and 4C) whereas in the wild-type retina there was no detectable GFP expression (Figure 4A). Agarose sections further confirm GFP expression restricted to the photoreceptor layer (Figure 4D-F). The overall reduction in thickness of the retina might also contribute to this phenomenon observation.

The blood-retinal barrier of the Dp71-null mice is not permeable to AAVs

Knowing that in the Dp71-null mouse, the BRB is leaky to certain molecules as large as BSA, we wanted to test the extent of this permeability for particles, such as AAV. We checked if intravitreally injected ShH10-GFP can cross the BRB to go into the bloodstream. We collected blood from wild-type and Dp71-null mice 24, 48 and 72 hours after intravitreal injection of ShH10-GFP and measured the presence of viral DNA in the collected blood for each time point using PCR. We were not able to amplify GFP DNA from the bloodstream of either mouse strain indicating that the BRB is not permeable to virus when they are injected into the vitreous (Figure S4, lanes 4-5, 8-9, 12-13). As a positive control, AAV injected into the blood stream through the penile vein clearly showed presence of the GFP transgene in the circulation (data not shown). This result is reassuring for the development of ocular gene therapy aimed at treating diseases showing a BRB breakdown.

DISCUSSION

Several retinal diseases are associated with a blood-retinal barrier breakdown phenotype and understanding the molecular mechanisms that contribute to the integrity of retinal barriers is of importance. The Dp71-null mouse is a good animal model to study the involvement of Müller glia in maintaining retinal barriers. Indeed, the absence of Dp71, most abundantly expressed in Müller glial cells, leads to the blood-retinal barrier breakdown in this mouse.

In order to understand the involvement of Müller glia in retinal permeability in the Dp71 mouse, we used an engineered AAV variant called ShH10 to label these cells. We then compared the interaction between Müller glia, retinal vasculature (BRB) and inner limiting membrane in the Dp71-null retina in comparison to a wild-type retina. ShH10 led to specific and efficient transgene expression in Müller glia, both in the Dp71-null and wild-type retinas (Figure 5, arrow 1). However the transduction patterns were found to be strikingly different in these two retinas. In the wild-type mouse, ShH10 led to intense and specific transduction of Müller cells in proximity to retinal blood vessels. It is well known that the ILM is thinner at the site of the major retinal blood vessels (Yanoff and Fine 1996), and the Müller glial endfeet wrap around the blood vessels which explain this typical transduction pattern alongside the major vasculature observed after intravitreal injection of AAV particles in a normal retina. Interestingly, in the Dp71-null mouse, ShH10 transduced a larger area of the retina, and led to stronger gene expression in the Müller cells. This reflects better viral access to Müller cell endfeet in the Dp71-null mouse. In absence of Dp71, the Müller cell endfeet are larger and more spread-out (Fort et al. 2008) presenting a larger contact surface for the virus at the ILM. Retinal basement membranes serve as attachment sites for Müller cells on the ILM, providing polarity cues to adherent cells. Laminin is a key component of ILM

throughout development, suggesting that it plays key roles in its organization. Our study shows that the absence Dp71 affects laminins and significantly alters organization of the inner limiting membrane. Mice with compound deletion of both the β2 and the γ3 laminin genes show similar disruption of the ILM (Pinzon-Duarte et al. 2010) supporting our observations. Laminins bind to a variety of cell surface receptors, including integrins, dystroglycan, sulfated glycolipids, and syndecans (Durbeej 2010) (Figure 3G). Therefore it is not surprising that in absence of dystroglycan, laminins become disorganized both at the ILM and within the ECM. This visible disorganization of the ILM substantiated by laminin is the mechanistic basis for the increased permeability of the Dp71-null retina to AAV particles. All of these phenomena involving Müller cells and Dp71 likely contribute to the overall thinning of the retina in absence of Dp71 as well as to the thinning and permeabilization of the retinal barriers.

The thinning of the ILM is particularly important from a viral transduction standpoint as intravitreal administration of AAV vectors are hindered by the presence of this membrane (Dalkara et al. 2009; Ivanova et al. 2010; Yin et al. 2011). Intravitreal administration route is a preferred administration route to access the retina as it is non-invasive and leads to pan-retinal delivery. Current gene delivery methods require an injurious subretinal injection to reach the outer retina and only transduce a fraction of the retina (Jacobson et al. 2012). There have been several studies shedding light onto how ILM acts as a barrier to retinal transduction by AAVs (Aartsen et al. 2010; Cehajic-Kapetanovic et al. 2011; Dalkara et al. 2009; Kolstad et al. 2010). Previously it has been shown that mild digestion of the ILM with a non-specific protease, increases viral access to the retina (Dalkara et al. 2009). Similarly, it has been demonstrated (Aartsen et al. 2010) that Müller glial cell transduction by AAV6, an AAV serotype similar to ShH10, is improved by a disruption of the ILM by collagenase

treatment. In this latter study, the pattern of GFP expression follows the major vessels in the wild-type retina whereas GFP expression increases throughout the retina after mild-digestion of the ILM with collagenase, similar to our observations in the Dp71-null retina. In parallel, it has been shown that retinal degenerative disease can cause the ILM to become compromised providing better access to viral particles (Kolstad et al. 2010). Altogether these findings led us to hypothesize that the absence of Dp71 might lead to a more permissive ILM. Since the selective visualization of the ILM is challenging, we tested the hypothesis of a leaky ILM by applying another AAV serotype, which cannot transduce retinal cells across an intact ILM. AAV serotype 5 is able to transduce the retinal photoreceptors when applied subretinally yet it does not lead to retinal transduction when applied into the vitreous of wild-type rodents as its primary attachment receptors are shielded by the ILM and inner neurons. We observed that AAV5 leads to pan-retinal photoreceptor transduction in the Dp71-null mouse confirming that the ILM of this mouse strain is permissive (Figure 5, arrow 2) allowing deeper retinal access to this serotype. As a perspective, we can imagine that transient inhibition of Dp71 via siRNA might be a promising way to increase photoreceptor transduction allowing AAVs such as AAV5 to be delivered through the vitreous.

Dp71 expression is down-regulated after retinal detachment, proving the key role of this protein in the maintenance of a normal BRB permeability. Thus, Dp71 expression can potentially restore the barrier properties of the Müller cell endfeet if we can provide the protein exogenously. In this context, this preliminary study of AAV mediated targeting of Müller glia sets the basis for developing retinal gene therapy aimed at restoring Dp71 expression in retinal disease with leaky BRB. A potential obstacle for the development of AAV gene therapy for eye diseases with compromised BRB is the leakage of virus into the bloodstream. We thus analyzed blood samples from mice intravitreally injected with ShH10-

GFP to detect the presence of viral particles in the bloodstream. We found no evidence of the GFP transgene in the circulation of Dp71-null or wild-type mice after intravitreal administration of ShH10 (Figure 5, crossed arrow 3).

In conclusion, the ILM of Dp71-null mouse is thinner and more permeable to several AAV serotypes after intravitreal injection while the BRB of these mice remains selective for AAV particles. These findings are reassuring for the development of gene therapies for diseases with compromised BRB and the Dp71-null mouse offers a good model for the study of pathologies showing a BRB breakdown such as AMD, diabetic retinopathy and the MacTel2.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: ShH10 transduces Müller cells around retinal vasculature in the wild-type retina. 4-weeks after ShH10-GFP injection: (A) Fundus image of an adult mouse showing GFP expression around retinal blood vessels, (B) flatmounted retina of the left eye intravitreally injected with ShH10 showing the same GFP expression pattern (scale bar: 500 µm), and (C) confocal image of a retinal cryosection shows exclusive Müller cell transduction (scale bar: 20 µm).

Figure 2: Müller cells are transduced more widely and strongly in the Dp71-null retina. SLO images two weeks post ShH10-GFP injection in wild type (A) and Dp71-null (B) retinas *in vivo*. *Ex vivo* imaging of flatmounted retinas (scale bar: 500 µm) of wild-type (C) and Dp71-null (D) mouse retinas one month after ShH10-GFP (4.10^{11}vp) injection. Confocal stacks in C and D were used to quantify GFP expression levels around the Müller cell nuclei (scale bar: 20 µm) (G) shows the GFP fluorescent area (p=0.0011, Mann Whitney U test) and (H) shows the GFP intensity (p=0.0002, Mann Whitney U test) in wild-type and Dp71-null mice (n=16). Higher magnification confocal images of ShH10 treated retinal flatmounts using lectin from *Bandeiraea simplicifolia* (red), anti-GFAP (grey) and DAPI (bleu) (I) wild-type retina and (J) Dp71-null retina. Labeling of the Müller cells (green) shows endfeet more spread out in absence of Dp71 than those of wild-type mice (see arrows) (scale bar: 20 µm).

Figure 3: Comparative analysis of the ILM thickness in Dp71-null and wild-type retinas. Cryosection of a wild-type (A) and a Dp71-null (B, scale bar: 25 µm) mice retina labeled with DAPI (blue) to visualize the nuclei, anti-glutamine synthetase antibody (green) for the Müller

cells and pan-laminin antibody to show the inner limiting membrane (scale bar: 25 µm). (C-D) Labeling in images A and B with a pan-laminin antibody (grey), prior to merging the colors of different channels. Flatmount images of a wild-type (E) and a Dp71-null (F) retina, after laminin labeling (scale bar: 50 µm). (G) Hypothetical model of Dp71- and Utrophin- DAPs complexes binding laminins in the ILM showing the close link between Dp71, dystroglycans and laminins and illustrating how the absence Dp71 can affect laminins and significantly alters organization of the ILM.

Figure 4: Efficient photoreceptor transduction with AAV5-GFP in Dp71-null mouse retina. (A) Flatmount of a wild-type retina imaged at 28 days after intravitreal injection of AAV5. (B) Flatmount of a Dp71-null mouse retina showing strong fluorescence on the photoreceptor side 4 weeks after intravitreal injection of AAV5 (scale bars: 500 µm). (C) Higher magnification image of the area indicated by the white rectangle in panel B (scale bar: 30 µm). Agarose sections of the Dp71-null mice retina transduced by the AAV5-GFP showing the rods labeled by rho4d2 (D), the photoreceptors expressing GFP (E) and the merged of D and E to colocalize the GFP expression and the rods (F) (scale bars: 20 µm).

Figure 5: Schematic representation of a Dp71-null mouse retina after intravitreal injection of AAV. The arrow 1 represents the enhanced transduction of Müller cells by ShH10 in the Dp71-null mouse. The arrow 2 shows the efficient transduction of photoreceptors by AAV5 because of the altered ILM of the Dp71-null mouse. The arrow 3 highlights that the BRB breakdown of the Dp71-null mouse retina does not allow the passage of viruses into the bloodstream.

Figure S1: Transduction profile of ShH10-GFP in Dp71-null retina. Confocal imaging of 100-µm agarose sections from Dp71-null mouse retinas. Müller cells are labeled with an anti-glutamine synthetase antibody (red) and DAPI (blue) in A, GFP expression (green) with DAPI staining in B and the merge of A and B revealing exclusive Müller cell transduction by ShH10-GFP virus in C (scale bar: 20 µm).

Figure S2: OCT measurements with Fiji Software at 500 µm from the optic nerve. (A) The thickness of the whole retina (from RPE to GCL), the photoreceptors (OS and IS), the ONL and the inner retina (INL, IPL, GCL) has been measured at the black arrows indicated on this OCT image. OCT images of wild-type (B, left) and Dp71-null (B, right) retinas. (C) The thickness of the whole retina (from RPE to GCL), the photoreceptors (OS and IS), the ONL and the inner retina (INL, IPL, GCL) has been quantified at 500 µm from the optic nerve using Fiji software and the results were analyzed using Mann Whitney U test.

Figure S3: Photoreceptor transduction with AAV5-GFP in Dp71-null mouse retina. Agarose sections of the Dp71-null mice retina transduced by the AAV5-GFP showing the cones labeled by PNA lectin (A), the photoreceptors widely expressing GFP (B) and the merged of A and B to colocalize the GFP expression and the cones (C) (scale bars: 20 µm).

Figure S4: PCR amplification of GFP transgene in the circulation after intravitreal administration of ShH10. PCR of the blood obtained from mice intravitreally injected with ShH10-GFP at different times after injection. Lane 5-12, even numbers for wild-type mice

and odd numbers for Dp71-null mice; lane 2, 1ng of pTR-SB-smCBA-hGFP; lane 3, water; lanes 5-6, blood DNA before injection; lanes 7-8, 24h after IVT; lanes 9-10, 48h after IVT; lanes 11-12, 72h after IVT. Lanes 1 and 4, Invitrogen scale ladder (100 bp): 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 1000, 1500, 2000, 3000 bp.

FIGURES

Figure 1

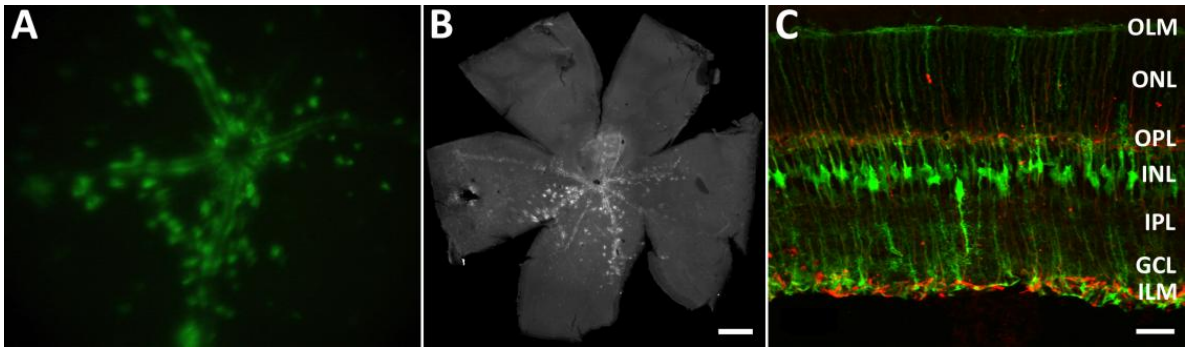


Figure 2

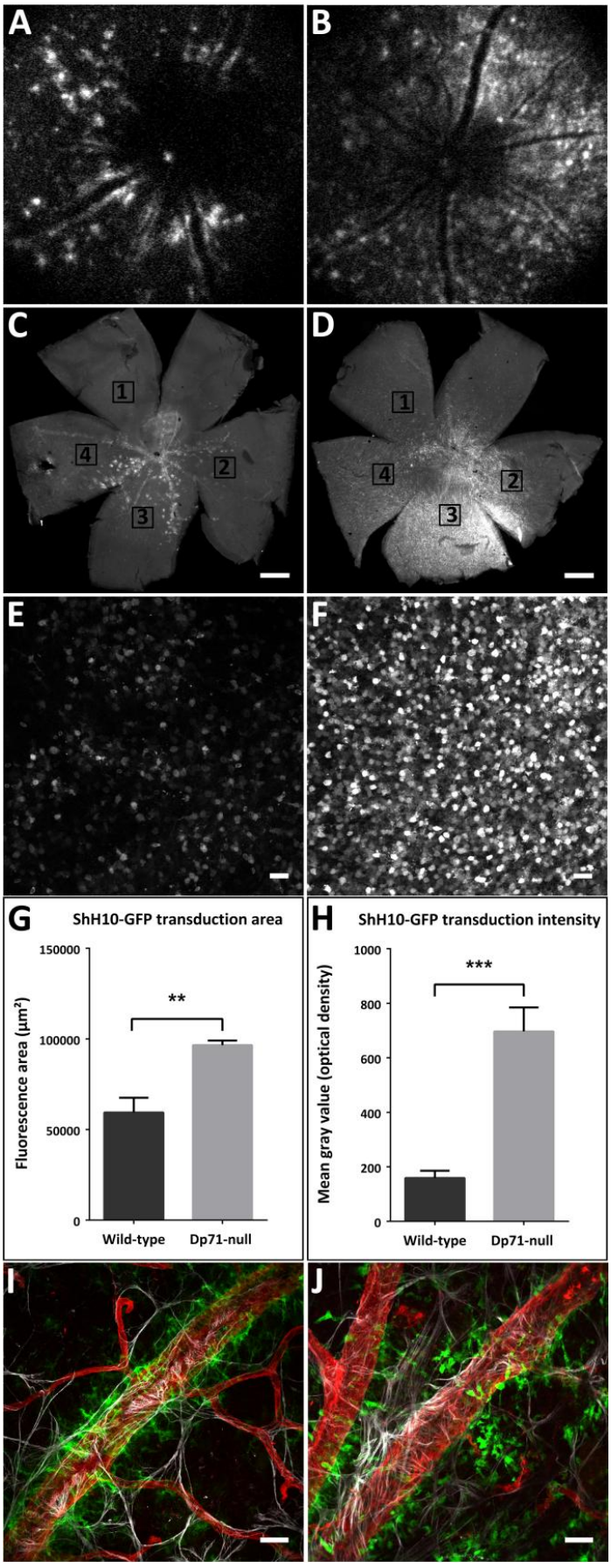

A
B
C
D
1
2
3
4
E
F
G
ShH10-GFP transduction area
Fluorescence area (µm²)
150000
100000
50000
0
**
Wild-type
Dp71-null
H
ShH10-GFP transduction intensity
Mean gray value (optical density)
1000
800
600
400
200
0
***
Wild-type
Dp71-null
I
J

Figure 3

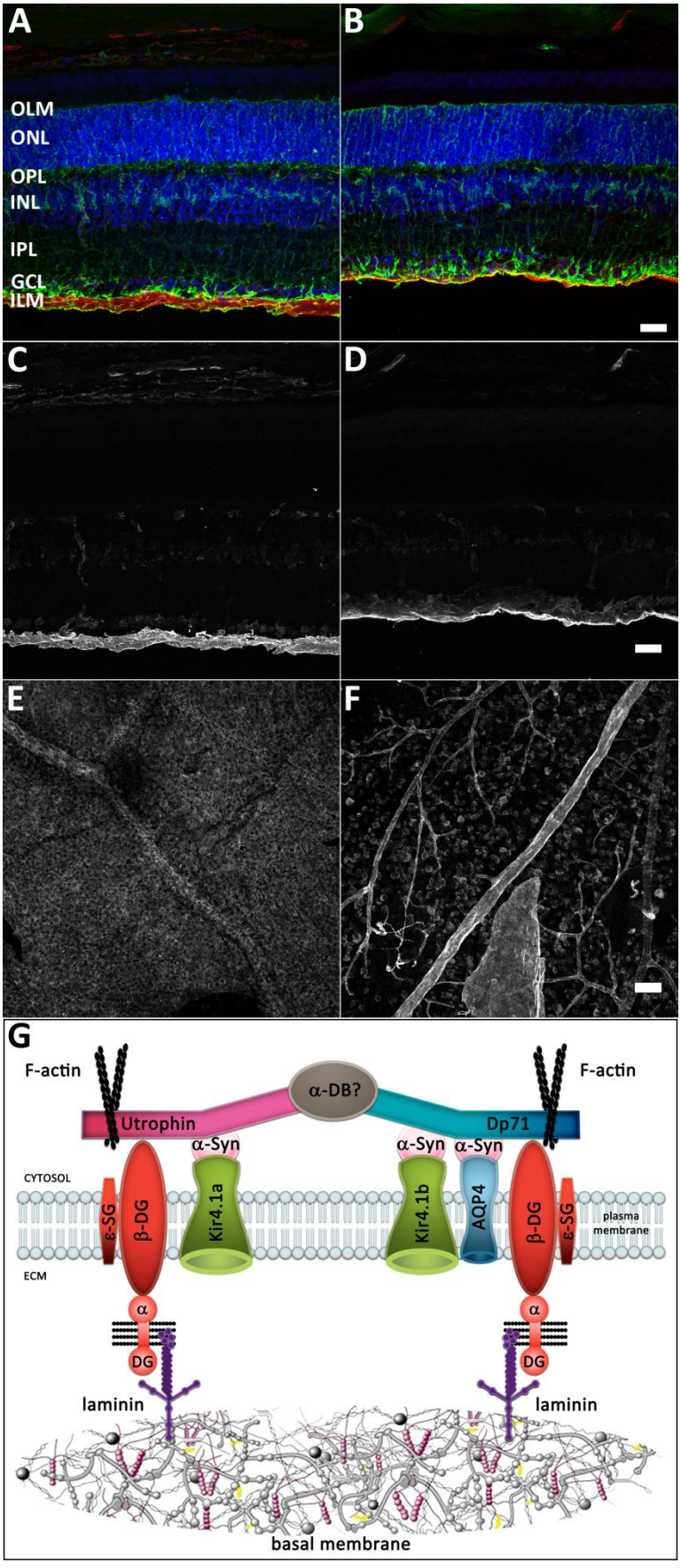

A
OLM
ONL
OPL
INL
IPL
GCL
ILM
B
C
D
E
F
G
F-actin
α-DB?
F-actin
Utrophin
Dp71
α-Syn
α-Syn
α-Syn
CYTOSOL
ε-SG
β-DG
Kir4.1a
Kir4.1b
AQP4
β-DG
ε-SG
plasma membrane
ECM
α
α
DG
DG
laminin
laminin
basal membrane

Figure 4

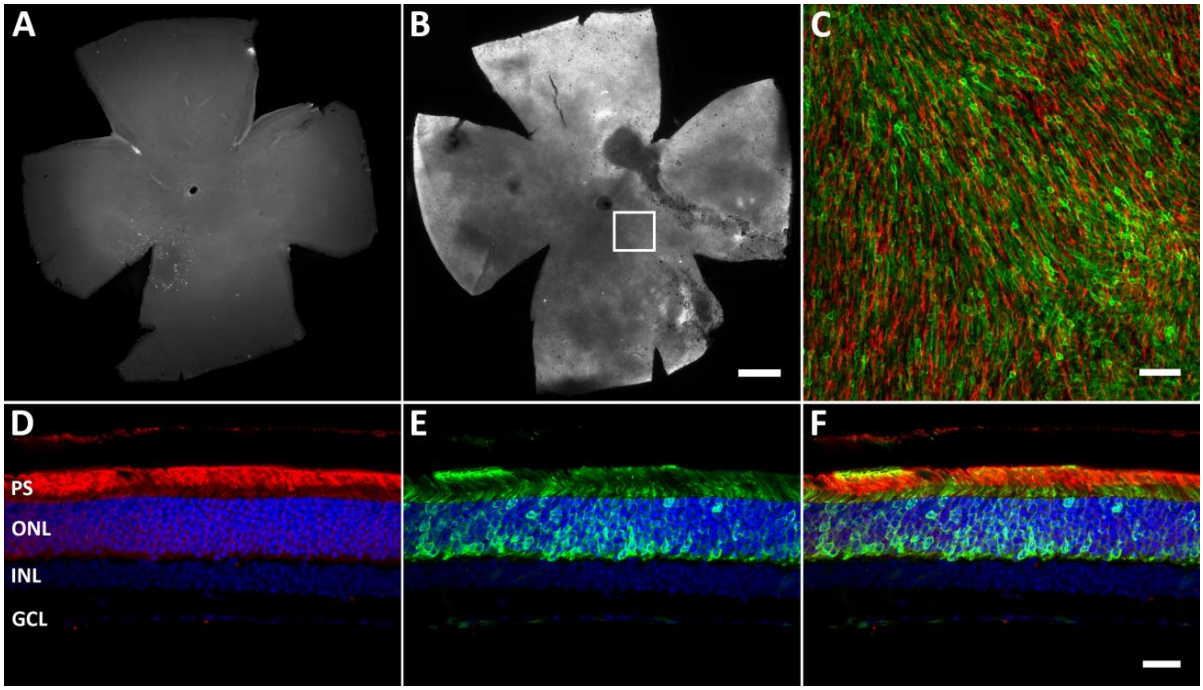


Figure 5

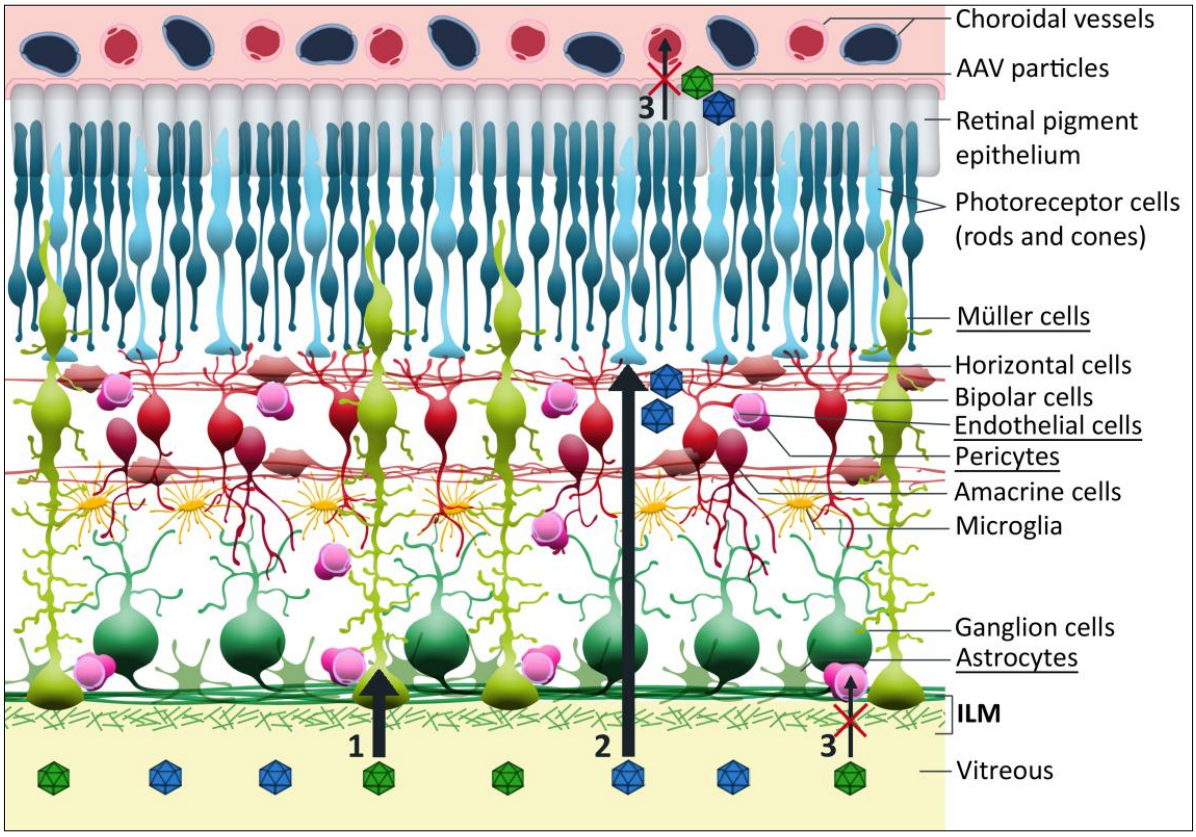


Figure S1

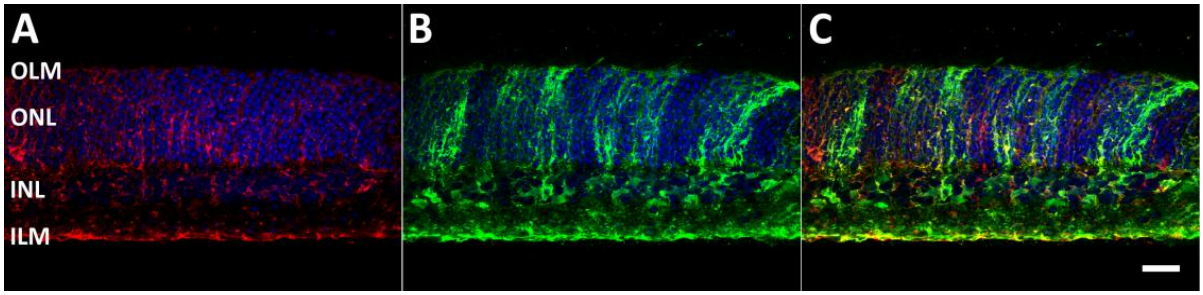


Figure S2

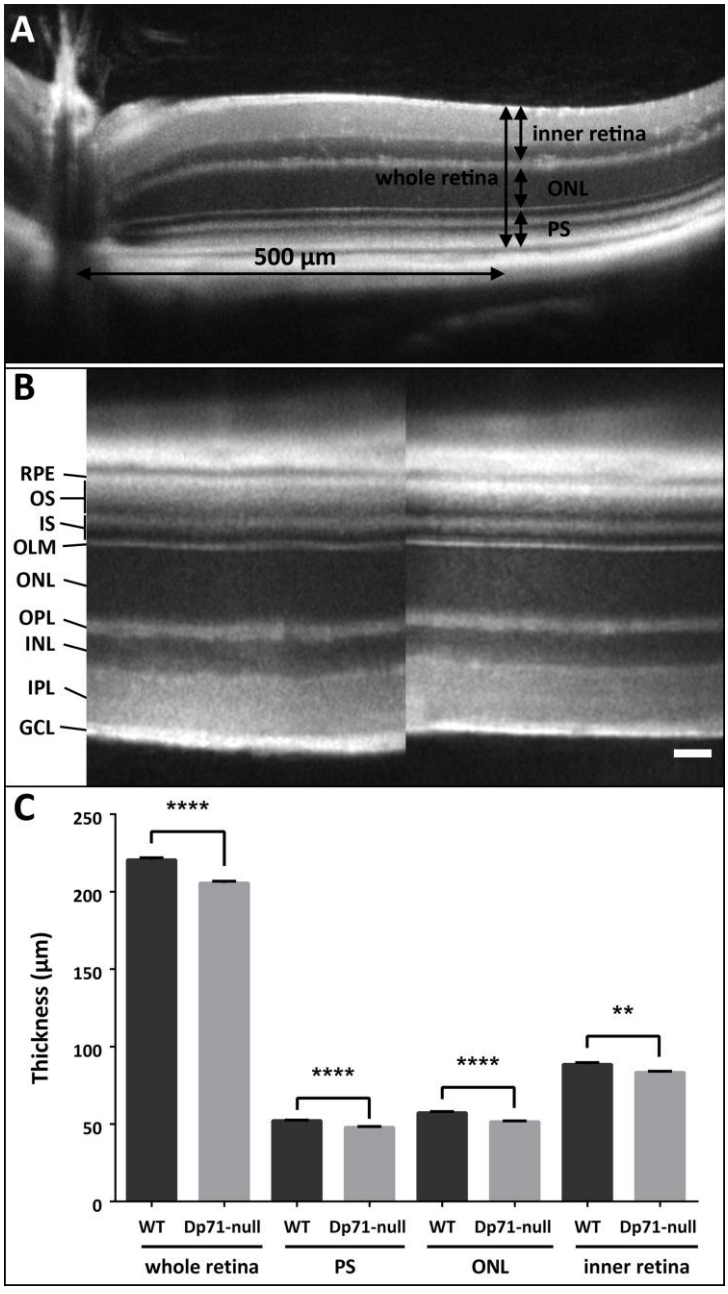


Figure S3

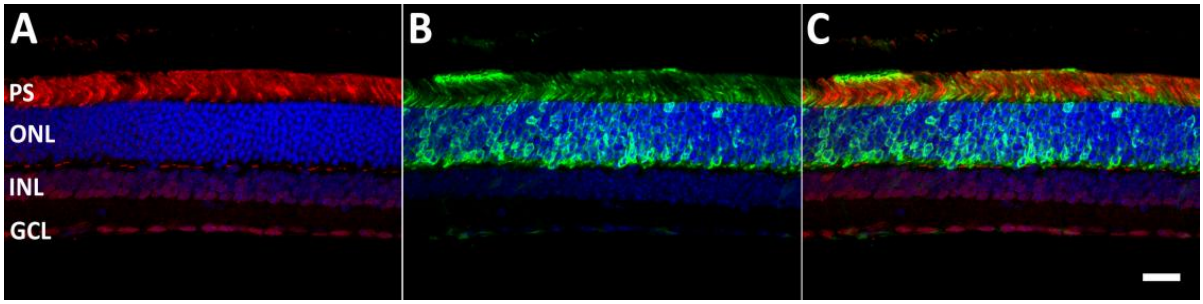
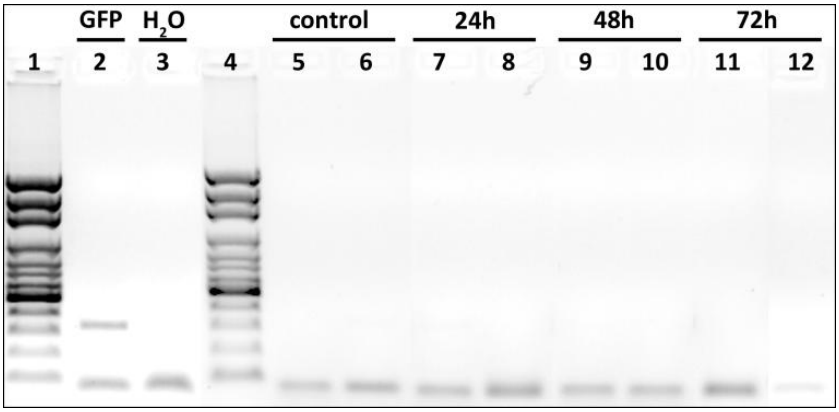


Figure S4



ACKNOWLEDGMENTS

We acknowledge the Association Française contre les Myopathies (AFM) for a research project grant number 14853 to A.R. and a PhD fellowship to O.V. and Allergan INC. This work performed in the frame of the LABEX LIFESENSES [reference ANR-10-LABX-65] was supported by French state funds managed by the ANR. We thank Meike Visel, Peggy Barbe and Mélissa Desrosiers for technical assistance with AAV preparations and Romain Bénard for assistance in retinal injections. We also sincerely thank Adeline Berger and Sophie Cavallero for their excellent expertise in OCT imaging. We are grateful to Stéphane Fouquet for excellent technical assistance in confocal microscopy and his expert input with the interpretation of the results. We earnestly thank Sékou Fofana for his valuable help for the graphic design of our schemes. We also acknowledge Michel Paques for skillful assistance in SLO imaging. Finally, we are very grateful to Ramin Tadayoni for his support and accurate analysis of our results.

REFERENCES

Aartsen WM, van Cleef KW, Pellissier LP, Hoek RM, Vos RM, Blits B, Ehlert EM, Balaggan KS, Ali RR, Verhaagen J and others. 2010. GFAP-driven GFP expression in activated mouse Muller glial cells aligning retinal blood vessels following intravitreal injection of AAV2/6 vectors. PLoS One 5(8):e12387.

Aurnhammer C, Haase M, Muether N, Hausl M, Rauschhuber C, Huber I, Nitschko H, Busch U, Sing A, Ehrhardt A and others. 2012. Universal real-time PCR for the detection and quantification of adeno-associated virus serotype 2-derived inverted terminal repeat sequences. Hum Gene Ther Methods 23(1):18-28.

Bainbridge JW, Smith AJ, Barker SS, Robbie S, Henderson R, Balaggan K, Viswanathan A, Holder GE, Stockman A, Tyler N and others. 2008. Effect of gene therapy on visual function in Leber's congenital amaurosis. N Engl J Med 358(21):2231-9.

Cehajic-Kapetanovic J, Le Goff MM, Allen A, Lucas RJ, Bishop PN. 2011. Glycosidic enzymes enhance retinal transduction following intravitreal delivery of AAV2. Mol Vis 17:1771-83.

Choi VW, Asokan A, Haberman RA, Samulski RJ. 2007a. Production of recombinant adeno-associated viral vectors. Curr Protoc Hum Genet Chapter 12:Unit 12 9.

Choi VW, Asokan A, Haberman RA, Samulski RJ. 2007b. Production of recombinant adeno-associated viral vectors for *in vitro* and *in vivo* use. Curr Protoc Mol Biol Chapter 16:Unit 16 25.

Cideciyan AV, Aleman TS, Boye SL, Schwartz SB, Kaushal S, Roman AJ, Pang JJ, Sumaroka A, Windsor EA, Wilson JM and others. 2008. Human gene therapy for RPE65 isomerase

deficiency activates the retinoid cycle of vision but with slow rod kinetics. Proc Natl Acad Sci U S A 105(39):15112-7.

Dalkara D, Kolstad KD, Caporale N, Visel M, Klimczak RR, Schaffer DV, Flannery JG. 2009. Inner limiting membrane barriers to AAV-mediated retinal transduction from the vitreous. Mol Ther 17(12):2096-102.

Durbeej M. 2010. Laminins. Cell Tissue Res 339(1):259-68.

Fort PE, Sene A, Pannicke T, Roux MJ, Forster V, Mornet D, Nudel U, Yaffe D, Reichenbach A, Sahel JA and others. 2008. Kir4.1 and AQP4 associate with Dp71- and utrophin-DAPs complexes in specific and defined microdomains of Muller retinal glial cell membrane. Glia 56(6):597-610.

Halfter W, Dong S, Dong A, Eller AW, Nischt R. 2008. Origin and turnover of ECM proteins from the inner limiting membrane and vitreous body. Eye (Lond) 22(10):1207-13.

Hirrlinger PG, Pannicke T, Winkler U, Claudepierre T, Varshney S, Schulze C, Reichenbach A, Brunken WJ, Hirrlinger J. 2011. Genetic deletion of laminin isoforms beta2 and gamma3 induces a reduction in Kir4.1 and aquaporin-4 expression and function in the retina. PLoS One 6(1):e16106.

Hosoya K, Tachikawa M. 2012. The inner blood-retinal barrier: molecular structure and transport biology. Adv Exp Med Biol 763:85-104.

Ivanova E, Hwang GS, Pan ZH, Troilo D. 2010. Evaluation of AAV-mediated expression of Chop2-GFP in the marmoset retina. Invest Ophthalmol Vis Sci 51(10):5288-96.

Jacobson SG, Cideciyan AV, Ratnakaram R, Heon E, Schwartz SB, Roman AJ, Peden MC, Aleman TS, Boye SL, Sumaroka A and others. 2012. Gene therapy for leber congenital amaurosis caused by RPE65 mutations: safety and efficacy in 15 children and adults followed up to 3 years. Arch Ophthalmol 130(1):9-24.

Klimczak RR, Koerber JT, Dalkara D, Flannery JG, Schaffer DV. 2009. A novel adeno-associated viral variant for efficient and selective intravitreal transduction of rat Muller cells. PLoS One 4(10):e7467.

Kolstad KD, Dalkara D, Guerin K, Visel M, Hoffmann N, Schaffer DV, Flannery JG. 2010. Changes in adeno-associated virus-mediated gene delivery in retinal degeneration. Hum Gene Ther 21(5):571-8.

Li W, Kong F, Li X, Dai X, Liu X, Zheng Q, Wu R, Zhou X, Lu F, Chang B and others. 2009. Gene therapy following subretinal AAV5 vector delivery is not affected by a previous intravitreal AAV5 vector administration in the partner eye. Mol Vis 15:267-75.

Maguire AM, Simonelli F, Pierce EA, Pugh EN, Jr., Mingozzi F, Bennicelli J, Banfi S, Marshall KA, Testa F, Surace EM and others. 2008. Safety and efficacy of gene transfer for Leber's congenital amaurosis. N Engl J Med 358(21):2240-8.

Pinzon-Duarte G, Daly G, Li YN, Koch M, Brunken WJ. 2010. Defective formation of the inner limiting membrane in laminin beta2- and gamma3-null mice produces retinal dysplasia. Invest Ophthalmol Vis Sci 51(3):1773-82.

Sarig R, Mezger-Lallemand V, Gitelman I, Davis C, Fuchs O, Yaffe D, Nudel U. 1999. Targeted inactivation of Dp71, the major non-muscle product of the DMD gene: differential activity of the Dp71 promoter during development. Hum Mol Genet 8(1):1-10.

Sene A, Tadayoni R, Pannicke T, Wurm A, El Mathari B, Benard R, Roux MJ, Yaffe D, Mornet D, Reichenbach A and others. 2009. Functional implication of Dp71 in osmoregulation and vascular permeability of the retina. PLoS One 4(10):e7329.

Shen W, Fruttiger M, Zhu L, Chung SH, Barnett NL, Kirk JK, Lee S, Coorey NJ, Killingsworth M, Sherman LS and others. 2012. Conditional Muller cell ablation causes independent

neuronal and vascular pathologies in a novel transgenic model. J Neurosci 32(45):15715-27.

Tadayoni R, Rendon A, Soria-Jasso LE, Cisneros B. 2012. Dystrophin Dp71: the smallest but multifunctional product of the Duchenne muscular dystrophy gene. Mol Neurobiol 45(1):43-60.

Yanoff M, Fine BS. 1996. Occular Pathology: Mosby-Wolfe.

Yin L, Greenberg K, Hunter JJ, Dalkara D, Kolstad KD, Masella BD, Wolfe R, Visel M, Stone D, Libby RT and others. 2011. Intravitreal injection of AAV2 transduces macaque inner retina. Invest Ophthalmol Vis Sci 52(5):2775-83.

2) La restauration de l'expression de la Dp71 chez la souris Dp71-null permet de rétablir une perméabilité hémato-rétinienne physiologique et de réabsorber l'œdème rétinien (Article en préparation)

a) Situation du Sujet

La Dystrophine Dp71 est un produit court du gène DMD responsable de la dystrophie musculaire de Duchenne, impliquée dans les fonctions vasculaires et gliales de la rétine. Elle se lie en N-terminal à l'actine et en C-terminal au complexe DAPs (dystrophin associated proteins) établissant ainsi un lien moléculaire entre le cytosquelette et la matrice extracellulaire (MEC). Le complexe DAPs contient le dystroglycane, la syntrophine, la dystrobrévine et le sarcoglycane. Ces protéines sont trouvées soit en association avec la Dp71 soit avec l'utrophine, l'homologue autosomal de la dystrophine Dp427 (Claudepierre et al. 2000b). La Dp71 est la dystrophine majeure du système nerveux central (SNC). Dans la rétine, elle se localise principalement au niveau des pieds des cellules gliales de Müller (CGM) à proximité des vaisseaux en relation avec la barrière hémato-rétinienne (BHR) (Claudepierre et al. 2000b; Howard et al. 1998).

La BHR est formée des jonctions serrées localisées entre les cellules endothéliales, des péricytes et des pieds des CGM autour des vaisseaux de la rétine. En effet, les CGM participent au maintien et aux fonctions de la BHR (Distler and Dreher 1996; Tout et al. 1993; Tretiach et al. 2005). Lors d'une précédente étude, nous avons mis en évidence que l'absence de Dp71 chez la souris Dp71-null cause une rupture de la BHR suggérant un rôle crucial de la Dp71 sur l'intégrité de la BHR (Sene et al. 2009). En effet, l'inactivation génétique de la Dp71 (Sarig et al. 1999) altère la distribution du β-dystroglycane, et des

canaux Kir4.1 et AQP4 le long de la CGM et provoque la dérégulation du transport de l'eau et du potassium à travers la CGM. Cette délocalisation augmente la vulnérabilité de la rétine neurale face à une ischémie transitoire en entraînant une mort cellulaire (Dalloz et al. 2003; Fort et al. 2008). Ainsi, la Dp71 associée au β-dystroglycane est nécessaire à la bonne localisation de ces canaux potassiques et aqueux (Connors and Kofuji 2002; Fort et al. 2008) et permet leur stabilisation dans des domaines membranaires spécifiques en limitant leur diffusion latérale. A partir de maintenant nous appellerons la Dp71, le β-dystroglycane, Kir4.1 et AQP4 situés au niveau du pied de la CGM, le complexe protéique dépendent de la Dp71. L'inhibition de la Dp71 est associée à une altération du transport transmembranaire de l'eau ce qui entraîne une perturbation au niveau de la régulation du volume des CGM (Sene et al. 2009). La fuite vasculaire et l'altération de l'absorption des fluides de la rétine par l'interface glio-vasculaire sont des symptômes majeures de la rupture de la BHR. Cependant la rétine Dp71-null n'est pas naturellement œdémateuse puisque nous n'avons pas mesuré d'augmentation significative de l'épaisseur de la rétine chez ce modèle murin (Vacca et al. 2013). En clinique la rupture de la BHR, pouvant entraîner un œdème maculaire, et qui survient dans plusieurs traumatismes tels que le décollement de la rétine est une cause majeure de perte de vision. Un tel phénomène est observé dans des pathologies telles que la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA), les uvéites, la rétinopathie diabétique (RD), ou la télangiectasie maculaire de type 2 (MacTel2) (Charbel Issa et al. 2012). La rupture de la BHR est donc un symptôme qui est au cœur de nombreuses pathologies oculaires. De précédentes études ont montré que dans les modèles murins de décollement de la rétine et du syndrome d'Irvine-Gass, la rupture de la BHR mène à la down-régulation de la Dp71 (Sene et al. 2009) (Giocanti-Auregan A 2011). Ainsi, l'absence de Dp71 provoque la rupture de la BHR et inversement la rupture de la BHR entraîne une diminution de l'expression de la Dp71

faisant de la souris Dp71-null, un bon modèle d'étude de la BHR et de la protéine Dp71, une cible thérapeutique idéale pour élaborer de nouveaux traitements des pathologies associées à une rupture de la BHR (Brevets Inserm N°08 305381.9 et N° EP09305608.3).

Dans cette étude, nous avons développé une thérapie génique dans le but de restaurer l'expression de la Dp71 chez la souris Dp71-null et ainsi diminuer la perméabilité vasculaire de la rétine Dp71-null. Pour atteindre cet objectif, nous avons utilisé un virus adéno-associé (AAV) pour apporter la Dp71 à la principale cellule de la rétine impliquée dans la BHR, la CGM. Ces dernières années, l'AAV est devenu l'outil le plus prometteur pour le transfert de gène à la rétine. Sa faible immunogénicité, sa capacité à infecter la majeure partie des cellules de la rétine et l'obtention d'une expression durable du transgène, ont fait de ce virus un moyen sûr et efficace de transfert de gène. Nous avons récemment testé un AAV recombinant, le ShH10 qui transduit efficacement et spécifiquement les CGM depuis le vitré de la souris Dp71-null (Klimczak et al. 2009; Vacca et al. 2013). Ici, nous avons utilisé ce variant d'AAV pour restaurer l'expression de la Dp71 dans la CGM de la souris déficiente en Dp71 dans le but de restaurer une perméabilité normale de la BHR.

b) Résultats

Pour obtenir une expression bicistronique de la GFP humanisée et de la Dp71 de souris, nous avons utilisé le peptide viral 2A. Nous avons cloné la séquence de la GFP-2A-Dp71 sous le contrôle du promoteur ubiquitaire CBA et encapsidé cette construction dans la capside ShH10. Ce nouveau virus, ShH10-hGFP-2A-Dp71, a été injecté dans le vitré de souris Dp71-null âgées de 8 à 10 semaines, l'expression du transgène GFP a été suivie *in vivo* au fond d'œil et l'épaisseur de la rétine a été mesurée par tomographie à cohérence optique (SD-OCT).

Nous avons montré que le virus ShH10-hGFP-2A-Dp71 permet de restaurer l'expression de la Dp71 dans les CGM de la souris déficiente en Dp71 et que cette Dp71 exogène se localise correctement au niveau des pieds des CGM, c'est-à-dire à proximité des vaisseaux de la rétine et de la BHR. Cette restauration a pour conséquence la surexpression de plusieurs protéines dépendantes de la Dp71 et de protéines de la MEC. De plus, ces protéines dépendantes de la Dp71 se relocalisent dans le compartiment membranaire adéquat après traitement. Pour finir, la restauration de la Dp71 mène à la réabsorption de l'œdème causé par une simple injection de solution saline et permet la restauration d'une perméabilité normale de la BHR.

c) Conclusion

Notre étude montre pour la première fois qu'il est possible de restaurer l'expression de la Dp71 grâce à un AAV (ShH10-hGFP-2A-Dp71) et que la restauration permet de relocaliser toutes les protéines du complexe dépendant de la Dp71 rétablissant ainsi, une homéostasie et une perméabilité de la barrière hémato-rétinienne normale.

A partir de l'ensemble de ces résultats, nous proposons les étapes suivantes qui conduisent à la restauration de la Dp71 chez la souris Dp71-null. Tout d'abord, l'injection intravitréenne du ShH10-hGFP-2A-Dp71 induit la restauration de la Dp71 dans la CGM. Ensuite, la restauration de la Dp71 permet la surexpression et la relocalisation du complexe protéique dépendant de la Dp71 au niveau des pieds des CGM (Figure 7). Finalement, la récupération d'un complexe dépendant de la Dp71 fonctionnel dans les pieds des CGM permet la restauration de la BHR et à la résorption de l'œdème de la rétine.

En sachant que la Dp71 est down-régulée dans des pathologies associées à une rupture de la BHR, la restauration avec succès de la Dp71 est un important pas en avant pour

le développement de nouveaux traitements de pathologies rétiniennes présentant des symptômes de rupture de la BHR ou d'œdème maculaire telles que la DMLA ou la rétinopathie diabétique.

The following article represents an ongoing work that will be submitted to publication:

AAV-MEDIATED GENE THERAPY IN DYSTROPHIN-Dp71 DEFICIENT MOUSE LEADS TO BLOOD-RETINAL BARRIER RESTORATION AND EDEMA REABSORPTION

Ophélie Vacca, Brahim El-Mathari, Hugo Charles-Messance, Abdoulaye Sene, Peggy Barbe, Marie Darche, Stéphane Fouquet, José-Alain Sahel, Ramin Tadayoni, Deniz Dalkara, Alvaro Rendon.

AAV-MEDIATED GENE THERAPY IN DYSTROPHIN-Dp71 DEFICIENT MOUSE LEADS TO BLOOD-RETINAL BARRIER RESTORATION AND EDEMA REABSORPTION

Ophélie Vacca[1], Brahim El-Mathari[1], Hugo Charles-Messance[1], Abdoulaye Sene[1], Peggy Barbe[1], Marie Darche[1], Stéphane Fouquet[1], José-Alain Sahel[1,2,3,4], Ramin Tadayoni[1,7], Deniz Dalkara[1], Alvaro Rendon[1]

[1]Institut de la Vision/INSERM/UPMC Univ Paris 06/CNRS/CHNO des Quinze-Vingts, Paris, France; [2]Fondation Ophtalmologique Adolphe de Rothschild, Paris, France ; [3]Institute of Ophthalmology, University College of London, UK ; [4]Académie des Sciences–Institut de France, Paris, France ; [5]UC Berkeley, Helen Wills Neuroscience Institute; [6]University of California at Berkeley, Department of Chemical Engineering, Department of Bioengineering, and Helen Wills Neuroscience Institute ; [7]Ophthalmology Dept, Hôpital Lariboisière, AP-HP, Univ Paris Diderot, France.

KEY WORDS

Dystrophin Dp71; Müller glial cell; AAV; blood-retinal barrier; edema; gene therapy

ABSTRACT

Dystrophin-Dp71 being a key membrane cytoskeletal protein, expressed mainly in Müller cells that provides a mechanical link at the Müller cells membrane by direct binding to actin and a transmembrane protein complex. Its absence has been related to blood-retinal barrier permeability through delocalization and down-regulation of the AQP4 and Kir4.1 channels (Sene et al. 2009). We have previously shown that the adeno-associated virus variant, ShH10, transduces Müller cells in the Dp71-null mouse retina efficiently and specifically (Vacca et al. 2013). Here, we use ShH10 to restore Dp71 expression in Müller cells of Dp71 deficient mouse to study molecular and functional effects of this restoration in an adult mouse displaying retinal permeability. We show that strong and specific expression of exogenous Dp71 in Müller cells leads to correct localization of the Dp71 protein that restores all protein interactions that are sufficient to re-establish a proper functional blood-retinal barrier and retina homeostasis thus preventing retinas from edema. This study is the basis for development of new therapeutic strategies in dealing with diseases with blood-retinal barrier breakdown and macular edema (such as age-related macular degeneration and diabetic retinopathy).

INTRODUCTION

Dp71 belongs to the dystrophin superfamily, and is a short product of the DMD gene, located on the X chromosome, involved in Duchenne muscular dystrophy (DMD) (Bar et al. 1990). Dp71 - a membrane-bound cytoskeletal protein (Rapaport et al. 1993) plays an important role in glial and vascular functions in the retina. It forms, with other proteins called dystrophin associated proteins (DAPs), a dystrophin glycoprotein complex (DGC) establishing a molecular link between the cytoskeleton and the surrounding extracellular matrix. It contributes to anchor ion/water channels and receptors in specific membrane fractions. DAPs include dystroglycan, syntrophin, dystrobrevin, and sarcoglycan. These are found in association either with Dp71 or utrophin - dystrophin autosomal homolog - (Claudepierre et al. 2000b) and play both structural and intracellular signal transduction roles. Dp71, absent from skeletal muscle, is predominant in the central nervous system (CNS). In the retina, all products of the DMD gene are expressed through the activation of internal promoters for each dystrophin, except the Dp116. The Dp427, Dp260, and Dp140 are expressed in neurons of the outer plexiform layer, whereas Dp71 is mainly localized in Müller cells and more specifically in their inner endfeet and around retinal vessels therefore closely related to the blood retinal barrier (BRB) (Claudepierre et al. 2000b; Howard et al. 1998).

The BRB is formed by tight junctions located between endothelial cells of retinal blood vessels, pericytes and Müller glial cell endfeet. Indeed, Müller cells participate in the maintenance and the functions of the BRB (Distler and Dreher 1996; Tout et al. 1993; Tretiach et al. 2005). Previous work on mice had shown that the deletion of Dp71 causes a BRB breakdown suggesting a crucial role of Dp71 in BRB integrity (Sene et al. 2009). Indeed

genetic inactivation of Dp71 (Sarig et al. 1999) alters β-dystoglycan, potassium and water channels' (Kir4.1 and AQP4) distribution along Müller glial cells that results in a disregulation of water transport through Müller cells associated with a perturbed regulation of the cell volume (Sene et al. 2009). Thus, Dp71 associated to β-dystoglycan is required for proper clustering and precise membrane localization of Kir4.1 and AQP4 channels (Connors and Kofuji 2002; Fort et al. 2008). Most likely, the function of Dp71 by its binding to β-dystoglycan is to stabilize the Kir4.1 and AQP4 channel molecules in specific membrane domains by limiting their lateral diffusion. From now on, we will call Dp71, β-dystoglycan, Kir4.1 and AQP4 of Müller glial cell endfeet, the Dp71-dependent protein complex.

Vascular leakage and impaired fluid absorption from the retinal tissue across the glio-vascular interface are major pathogenic events of BRB breakdown (Cunha-Vaz and Travassos 1984). Both pathological mechanisms are stimulated by the absence of Dp71. Nevertheless, the Dp71-null retina is not naturally edematous since we did not measure any increase in the retinal thickness of this mouse model (Vacca et al. 2013). In the clinic, BRB breakdown of retinal detachment is a major cause of vision loss. Moreover, BRB breakdown in macular edema is an important complication occurring in uveitis, diabetic retinopathy (DR), and macular telangiectasia (MacTel2) (Charbel Issa et al. 2012). The BRB breakdown is a symptom which is the core of many important eye pathologies. In previous studies, we have shown in both retinal detachment and Irvine Gass syndrome mouse model that BRB breakdown leads to Dp71 down-regulation (Sene et al. 2009) (Giocanti-Aurégan et al., poster presentation #6061/A272, ARVO 2011). Thus, the absence of Dp71 causes BRB breakdown and conversely BRB breakdown induces Dp71 down-regulation making of Dp71-null mouse, a good animal model to study BRB permeability and of the Dp71 protein, an ideal

therapeutic target to elaborate novel treatments for ocular diseases related to BRB breakdown (patent № 08 305381.9, 2008; patent № EP09305608.3, 2010).

In this study, we developed a gene therapy to restore Dp71 expression in the Dp71 deficient mouse and thereby increasing retinal vascular permeability. To this aim, we used adeno-associated virus (AAV) to deliver Dp71 transgene to the major cell type involved in BRB maintenance; Müller glial cells. AAV has become the most promising ocular gene delivery vehicle over the past 15 years. Its low immunogenicity, ability to infect the majority of retinal cells, and long-term transgene expression make the virus a safe and very efficient gene delivery vector. We recently tested an AAV capsid variant, ShH10 that efficiently and specifically transduces Müller glial cells from the vitreous of the Dp71-null mouse (Klimczak et al. 2009; Vacca et al. 2013). Here, we employed this variant to restore Dp71 in Müller glial cells of Dp71 deficient mice. First, to obtain a bicistronic expression of human GFP and Dp71, we used the viral 2A peptide (Trichas et al. 2008). We cloned hGFP-2A-Dp71 sequence under the control of a strong ubiquitous CBA promoter and packaged this construct into ShH10 capsid. The new virus, ShH10-hGFP-2A-Dp71, was intraviteally injected to 8-weeks-old Dp71-null mice. GFP fluorescence was observed by fundus images and retinal thickness was measured by optical coherence tomography (SD-OCT).

We found that Dp71 expression lead to proper localization of this protein in Müller glial cell endfeet and consecutively lead to the up-regulation of several genes coding for transmembrane and ECM proteins. Furthermore proteins of the Dp71-dependent complex re-localized to their proper compartments after treatment. Importantly, restoration of Dp71 leads to total reabsorption of edema caused by an intravitreal saline injection of Dp71-null mice as well as restoration of normal BRB permeability. Our data strongly suggest that Dp71

restoration is able to alleviate all symptoms related to the absence of the Dp71 protein despite the fact that intervention was made after development. These finding open promising avenues in the development of gene based therapies in diseases with permeable BRB where Dp71 is down-regulated.

METHODS

Animals

The Dp71-null mice (Sarig et al. 1999) was a kind gift from Pr David Yaffe and were produced by replacing, via homologous recombination, most of the first and unique exon of Dp71 and of a small part of Dp71 first intron with a sequence encoding a β-gal-neomycin-resistance chimeric protein (β-geo). In this mouse line, Dp71 expression is abolished without interfering with the expression of other products of the DMD (Duchenne Muscular Dystrophy) gene. C57BL/6J mice strain (JANVIER, France) was used as controls for this study. All animals used in this study were cared for and handled according to the ARVO Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research.

Generation and purification of AAV vectors

Recombinant AAVs were produced by the plasmid co-transfection method (Grieger et al. 2006) , and the resulting lysates were purified via iodixanol gradient ultracentrifugation as previously described. Briefly 40% iodixanol fraction was concentrated and buffer exchanged using Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Units. Vector stocks were then tittered for DNase-resistant vector genomes by real time PCR relative to a standard (Aurnhammer et al. 2012). Each vector contained a self-complimentary genome encoding the viral 2A peptide for bicistronic expression (Trichas et al. 2008) of GFP and Dp71 under the control of an ubiquitous CBA promoter. The GFP-2A-Dp71 cDNA was synthesized by GENEWIZ, Inc. (USA) and cloned into an AAV plasmid (pTR-SB-smCBA) containing inverted terminal repeat (ITR) regions for the packaging of the interest sequence into ShH10 capsid. The vector was further modified with a single Y445F tyrosine to phenylalanine mutation for enhanced intracellular

and nuclear trafficking (Petrs-Silva et al. 2009), which was introduced into the ShH10 capsid plasmid using a site directed mutagenesis kit (QuikChange Lightning, Agilent Technologies).

Injections

Before vector administration, mice were anesthetized with ketamine (50 mg/kg) xylazine (10 mg/kg Rompum). Pupils were dilated by the ocular instillation of neosynephrine 5% Faure (Europhta) and mydriaticum 0,5% (Théa) eye drops. An ultrafine 30-gauge disposable needle was passed through the sclera, at the equator and next to the limbus, into the vitreous cavity. Injection of 1 µl stock containing 1.8 x 10^{10} particles of AAV was made with direct observation of the needle in the center of the vitreous cavity. Left eyes were injected and right eyes served as control.

Fundus photography

Fundus examinations were performed at one or two months after the intravitreal injection of ShH10 coding GFP or GFP-2A-Dp71 under the ubiquitous CAG promoter. Fundus photographs were obtained with a Micron III fundus camera. Mouse pupils were dilated by the application of neosynephrine (5%) and mydriaticum (0,5%) eye drops prior to imaging.

Optical Coherence Tomography

OCT was performed using an SD-OCT system (Bioptigen Inc., Durham, NC). Hydration with normal saline was used to preserve corneal clarity. Volume analysis centered on the optic nerve head was performed, using 100 horizontal, raster, and consecutive B-scan lines, each one composed of 1200 A-scans. The volume size was 1.4 × 0.1 mm either side of the optic nerve. A custom software was used to generate the en face fundus image using reflectance information obtained from the OCT sections (volume intensity projection), so

that the point-to-point correlation between OCT and fundus position was possible and accurate.

Müller glial cell isolation

The retinas were isolated and incubated in papain (*Papain* from *Carica papaya,* 10108014001, Roche) for 30 minutes at 37 °C, followed by a washing step with saline (PBS) and a 10 minutes fixation step with 4% paraformaldehyde (PFA). After this step, the tissue pieces were shortly incubated in PBS supplemented with DNase I (160 U/ml; Invitrogen) and triturated by a pipette to obtain a suspension of isolated cells. The cells were stored at 4 °C in serum-free minimum essential medium (Sigma) until use within three hours after isolation.

Immunostaining of isolated cells

Suspension of freshly dissociated Müller cells were distributed on glass slides and air dried. Adherent cells are rehydrated with PBS, briefly fixed with 2% PFA, and permeabilized with PBS/0.1% Triton for 5 minutes. After 1 hour of saturation in PBS/0.1% Tween 20/3% normal growth factor (NGS)/1% bovine serum albumin (BSA), cells were incubated with primary antibody (Table 1) overnight at 4°C. After several washes with PBS/0.1% Triton, secondary antibodies (Interchim, France) coupled to Alexa were used diluted 1:500 in PBS for 1 hour at room temperature. Glass slides were mounted with Fluorsave reagent (Calbiochem). Confocal microscopy was performed on an Olympus FV1000 laser-scanning confocal microscope. Images were acquired sequentially, line by line, in order to reduce excitation and emission crosstalk, step size was defined according to the Nyquist-Shannon sampling theorem. Exposure settings that minimized oversaturated pixels in the final images were used. Twelve bit Images were then processed with FIJI, Z-sections were projected on a

single plane using maximum intensity under Z-project function and finally converted to 8-bit RGB color mode.

Table 1: Primary antibodies used for immunostaining and Western Blot

Protein	Species	References	Immunostaining	Western Blot	Source
Glutamin Synthetase	mouse	MAB302	1:2000	-	Millipore
GFAP	rabbit	Z0334	1:1000	-	Dako
Dystrophins (H4)	rabbit	-	1:1000	1:5000	D.Mornet
Dystrophins	mouse	DYS2-CE	1:20	1:10	Novocastra
AQP4	rabbit	AQP-004	1:500	1:100	Alomone
Kir4.1	rabbit	APC-035	1:200	1:500	Alomone
β-dystroglycan	mouse	B-DG-CE	1:200	1:100	Novocastra
Utrophin (K7)	rabbit	-	-	1:500	D.Mornet
Utrophin (DRP2)	mouse	DRP2CE	-	1:10	Novocastra
GFP	chicken	ab13970	1:500	-	Abcam
β-Actin	mouse	A2228	-	1:7500	Sigma

Western Blot analysis

Western blot analysis was performed as previously described (Bordais et al. 2005). In brief, retinal protein extracts were resolved using NuPAGE Tris–Acetate 3-8% gradient gels (Invitrogen, France) and electrotransferred to polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes according to the manufacturer's instructions. PVDF membranes were blocked in PBS containing 5 % dry milk (BIO-RAD, Herts, UK) for 1 hour at room temperature then incubated overnight at 4°C with the primary antibody in the same blocking buffer. Blots were then washed and incubated with the secondary antibody conjugated to horseradish peroxidase (Jackson Immunoresearch laboratories). Chemiluminescence was performed using ECL plus Western blotting detection system (GE Healthcare, Germany) and documented on film (GE Healthcare, Germany).

Quantitative RT-PCR analysis

Total RNA from retina was extracted using Trizol reagent (Invitrogen, France) according to the manufacturer's instructions. Reverse transcription was performed on 1 µg total RNA using SuperScript III and random hexamers (Invitrogen, France). PCR amplifications of cDNA were performed using Master plus SYBR Green I (Roche Diagnostics, Germany) on a LightCycler instrument (Roche Products, Basel, Switzerland). PCR primers were designed using Primer3 software (Rozen and Skaletsky 2000) (Table 2). For relative comparison, the Ct values of real-time PCR results were analysed using the ΔCt method according to the manufacturer's instructions. The amount of cDNA was normalized to the standard internal control obtained using primers for β-Actin.

Table 2: Primer sequences for quantitative RT-PCR

Name	Sense	Antisense
Dp71	ATGAGGGAACACCTCAAAGGCCACG	TCTGGAGCCTTCTGAGCTTC
Dystroglycan	CTTGAGGCGTCCATGCACT	GGCAATTAAATCCGTTGGAATGC
AQP4	CTTTCTGGAAGGCAGTCTCAG	CCACACCGAGCAAAACAAAGAT
Laminin alpha 1	CAGCGCCAATGCTACCTGT	GGATTCGTACTGTTACCGTCACA
Laminin gamma 3	CGGAGCCCTGCATCACAAA	AGCAAGGTCGTCCTCAAAGC
Kir4.1	CCGCGATTTATCAGAGC	AGATCCTTGAGGTAGAGGAA
Utrophin/exon1	GGATCTGGGAAAGCCTTTGGA	TCGTTCTGCCCATCATCAGG
GFAP	CCACCAAACTGGCTGATGTCTAC	TTCTCTCCAAATCCACACGAGC
Agrin	CACCGGGGACACTAGAATCTT	GAGCTACCATAGCAGGGCA
β-Actin	GCTCTTTTCCAGCCTTCCTT	CTTCTGCATCCTGTCAGCAA

Quantification of blood-retinal barrier permeability

Vascular permeability was quantified by measuring albumin leakage from blood vessels into the retina using the Evans blue method (Xu et al. 2001). Briefly, mice were

anesthetized and Evans blue (45 mg/kg; Sigma-Aldrich, Germany) was injected through the jugular vein. Blood samples were taken 3 h after injection of the dye and mice were perfused for 2 minutes via the left ventricle with a citrate buffer (0.05 M, pH 3.5) pre-warmed to 37 °C. After perfusion, both eyes were enucleated and carefully dissected. Retinas were dried in a Speed-Vac for 5 h, weighed and the Evans blue dye was extracted by incubating the retina with 100 µl of formamide for 18 h at 70 °C. Retina samples were centrifuged at 70,000 rpm for 20 minutes and blood samples were centrifuged at 12,000 rpm for 15 minutes. Both supernatants were used to measure absorbance. A background-subtracted absorbance was determined by measuring each sample at both 620 nm (absorbance maximum for Evans blue) and 740 nm (absorbance minimum). Evans blue concentration in the plasma and the retina was calculated from a standard curve of Evans blue in formamide. Blood-retinal barrier permeability was expressed in microliter of Evans blue per gram of wet retina per hour (µl Evans blue x g wet retina-1 x h-1).

Data analysis

Results are expressed as mean ± Standard Error of the Mean (SEM). Confocal stacks of 50 images were taken with the same settings. These images were Z projected and the fluorescence area was quantified with Fiji (Fiji Is Just ImageJ) software. Fluorescence data were then analysed using Mann Whitney U test with Prism 5 (GraphPad Software, San Diego, CA). p values < 0,05 accepted as statistically significant.

RESULTS

ShH10 delivers Dp71 to Müller glial cells

To restore Dp71 expression, we cloned complete murine Dp71 sequence from exon 1 to exon 78 (GenBank: **JN900253.1**) and humanized GFP under the control of a ubiquitous CBA promoter. To obtain a bicistronic expression of both genes, we inserted the viral 2A peptide between sequences coding, on GFP C-terminal and Dp71 N-terminal (Trichas et al. 2008). Thus, we produced an AAV with ShH10 capsid and GFP-2A-Dp71 transgene (referred to as: ShH10-hGFP-2A-Dp71), since ShH10 targets specifically and efficiently Müller glial cells in Dp71-null mice (Vacca et al. 2013).

One microliter stock containing 1.8 x 10^{10} particles of ShH10-hGFP-2A-Dp71 was injected intravitreally to 8-weeks-old Dp71-null mice. Control eyes received vehicle (PBS) or ShH10-hGFP injection. Fundus imaging showed GFP expression across transduced retinas (Figure 1A-1D). We obtained a similar transduction pattern and the same GFP intensity using ShH10-hGFP-2A-Dp71 or ShH10-hGFP (Figure 1E). Both viruses had the same intense transduction pattern only targeting Müller glial cells.

Quantitative RT-PCR and Protein analysis of Dp71-treated eyes

Two months after ShH10-Dp71 injection, RNA and protein were extracted from treated retinas by Trizol method. In parallel, we performed qRT-PCR and Western Blot analysis to evaluate expression levels of Dp71-dependent complex, utrophin (dystrophin homolog, present in Müller glial cell endfeet) and other ECM genes coding for proteins located in Müller glial cell endfeet binding Dp71-dependent protein complex (Figure 7) (Table 1 and Table 2).

We observed that Dp71 mRNA and protein were significantly over-expressed in the Dp71-null retinas in respect to wild-type Dp71 levels (Figure 2 and 3A-C). Thus, ShH10-hGFP-2A-Dp71 restores Dp71 expression in Müller glial cells.

It is known that Dp71 is associated with β-dystroglycan, AQP4 and Kir4.1 clustering in Müller glial cell endfeet. This Dp71-dependent protein complex is linked to the inner limiting membrane by the interaction of laminin and agrin with α-dystroglycan (Fort et al. 2008; Noel et al. 2005). Therefore, we analyzed expression level of all these mRNA, and we found that AQP4, Kir4.1, laminin and agrin mRNA in ShH10-Dp71 treated retinas were significantly higher compared to both wild-type and Dp71-null retinas (Figure 2). At the protein level, we observed that β-dystroglycan was also over-expressed in ShH10-Dp71 treated retinas (Figure 3B-D). Full-length utrophin messenger, dystrophin autosomal homolog expressed in Müller cell endfeet, was also up-regulated. These results suggested that Dp71 over-expression induced the stimulation of a Dp71-dependent transcriptome (Figure 2 and 7).

It is known that Müller glial cells become activated in response to retinal damage or cellular defects. This activation is characterized by the induction of glial fibrillary acidic protein (GFAP). To verify if AAV injection or Dp71 over-expression induce Müller cell gliosis, we quantified GFAP mRNA levels. We found that the amount of GFAP messenger did not increase in treated retinas versus controls (Figure 2).

Relocalization of Dp71 dependent protein complex

In wild-type Müller glial cells, we have already established that Kir4.1, AQP4 and β-dystroglycan co-clustered in the endfeet of these cells. In absence of Dp71, these three proteins are distributed along Müller glial cells (Fort et al. 2008). Here we investigated the

localization of these proteins after Dp71 restoration. We isolated Müller glial cells and immunostained with the following antibodies: anti-glutamine synthetase or anti-GFAP to identify Müller glial cells, H4 to localise exogenous Dp71, anti-β-dystroglycan, anti-AQP4 and anti-Kir4.1. We observed that Dp71 staining was more intense in treated Müller glial cell endfeet than in wild-type cells (Figure 4). We also remarked that the restoration of Dp71 rescued the localization at the Müller gilal cell endfeet of β-dystroglycan, AQP4 and Kir4.1 (Figure 4). Thus, Dp71 expression through ShH10 allowed relocalization of the Dp71-dependent protein complex at the inner limiting membrane of Dp71-null retina, which was the first step prior to rescue Müller glial cell functions. Moreover, we remarked a morphological difference between Dp71-null and Dp71-restored MGC endfeet. Whereas Dp71-null MGC endfeet looked looser and spread-out, Dp71-restored MGC endfeet looked compact and clustered. Therefore, MGC endfeet seemed to recover their wild-type morphology (Figure 4) (Fort et al. 2008).

Reabsorption of Induced Edema in Dp71-null mouse retinas

Although, in a previous work, we have shown that intact retinal layers were thinner in the Dp71-null mice compared to wild-type retinas (Vacca et al. 2013). Here we observed that two months after an intravitreal injection of PBS, the retinas of Dp71-null mice presented a significant thickness increase in the whole retina with respect to the wild-type mice (Figure 5B). The thickness was increased in the inner retina (Figure 5C) whereas the ONL and photoreceptor segments were unchanged (Figure S1). These results suggested that Dp71-null mouse is more sensitive to retinal edema than wild-type mouse and that edema cannot be reabsorbed due to deficient Müller glial cell function. However, upon restoration

of Dp71 through ShH10-Dp71 treatment Dp71-null retinas did not show edema in response to PBS injection (Figure 5B-5C). This absence of thickness variation in ShH10-Dp71 treated retinas after PBS injection suggests that Dp71 expression helps the edema reabsorption by restoring the role of Müller glial cells in retinal homeostasis.

Restoration of Blood-Retinal Barrier Permeability

We have demonstrated in a previous study that the absence of Dp71 in Müller glial cells is accompanied by an increased permeability of the blood-retinal barrier (BRB). We assessed retinal vascular permeability, in wild-type and vehicle-injected Dp71-null mice in comparison to Dp71-null mice treated with ShH10-hGFP-2A-Dp71. Vascular permeability was evaluated using the Evans blue-dye technique (Xu et al. 2001). We showed that restoration of Dp71 by viral mediated expression can rescue normal vascular permeability (Figure 6). This observation is in agreement with the postulated direct correlation existing between Dp71 in Müller glial cells and BRB permeability (Sene et al. 2009). Thus, we can say that Dp71 plays a pivotal role in retinal homeostasis and in BRB permeability.

DISCUSSION

AAV mediated Dp71 expression (ShH10-hGFP-2A-Dp71) in Müller glial cells shows that it is possible to restore Dp71 expression and thereby, relocate Dp71-dependent protein complex. This in turn leads to normal retinal homeostasis, restoring BRB permeability and reabsorbing retinal edema.

ShH10-hGFP-2A-Dp71 leads to Dp71 expression in Müller glial cells deficient in Dp71. The expression level was 7-fold higher compared to wild-type Dp71 levels. A similar result was obtained for Dp71 dependent genes or proteins as α/β-dystroglycan, AQP4, Kir4.1, laminins and utrophin (Figure 2 and 3). These high levels did not seem to cause any adverse effects.

In the present study, we have restored cDNA of the unspliced Dp71, called the Dp71d (Aleman et al. 2001; Austin et al. 1995), thus eliminating any transcriptional regulation and therefore the expression of other Dp71 isoforms (Austin et al. 2002; Ceccarini et al. 1997; Gorecki et al. 1992; Lederfein et al. 1992; Saint Martin et al. 2012; Tozawa et al. 2012). However, Dp71 undergoes several alternative splicing events. Exons 71, 71-74, 78, 78-79 and 70-79 are either present or spliced out producing to date nine different Dp71 isoforms (Tadayoni et al. 2012). Moreover, Dp71 was considered as a cytoplasmic, plasma membrane-associated protein and this idea was largely accepted as dogma, but the group of Cisneros and other colleagues have provided compelling evidence of the nuclear localization of Dp71 (Aleman et al. 2001). Interestingly, it was demonstrated that alternative splicing determined the subcellular localization of Dp71 isoforms (Gonzalez et al. 2000) and immunofluorescence and immunoblotting assays on PC12 cells demonstrated that Dp71d - isoforms containing amino acids encoded by exon 78 - exhibits predominant nuclear localization, while Dp71f -

isoforms lacking amino acids encoded by exon 78 - is localized exclusively in the cytoplasm (Marquez et al. 2003). All these evidence suggests that each Dp71 isoform could have specific function in the mouse retina depending on the cell type and on the subcellular compartment where it is expressed. Moreover, restoration of others isoforms could allow regulation of the Dp71-dependent complex expression. Therefore, it would be very interesting to study the functional effects of the restoration of each Dp71 isoform in the Dp71-null retina.

We have demonstrated for the first time that Dp71 restoration in MGC re-establishes a normal BRB permeability proving that MGC recovered their ability to regulate the vascular permeability (Figure 6) (Distler and Dreher 1996; Tout et al. 1993). This is most likely a result of the relocalization of potassium and water channels (Kir4.1 and AQP4) and of the consequent restoration of the water transport regulation through MGC.

We have shown that Dp71-null retina is more sensitive to needle injury than wild-type retina since a single saline intravitreous injection induce an increase of the inner retina thickness that persists at least two months after the injection (Figure 5). The retinal thickness increase might be due to the deregulation of water transport associated with the K+ current in the Dp71-null MGC. The deregulation of water transport that results in the swelling of MGC when exposed to an osmotic stress (Sene et al. 2009) could lead in Dp71-null mice to retinal edema. It is very difficult to develop macular edema animal models because most experimental animals do not possess macula. Dp71-null retina do not naturally present retinal edema (Vacca et al. 2013) whereas after a single intravitreal injection of saline solution, Dp71-null mice could be used as macular edema animal model.

In addition, we have found that Dp71 restoration leads to the relocalization of Dp71, β-dystroglycan and potassium/water channels (Kir4.1/AQP4) in MGC endfeet at the inner limiting membrane (Figure 4). The relocalization of this macromolecular complex could allow fluid reabsorption by the MGC, hence the decrease in the thickness of the retina corresponding to a reuptake of retinal edema (Figure 5). Moreover, we have previously shown that Dp71 by linking Kir4.1 and AQP4 allows the aggregation of these channels in "lipid raft" membrane domains (Figure 7) (Fort et al. 2008). The aggregation in membrane microdomains of Kir4.1 and AQP4 channels in MGC is crucial for the functional coupling of these channels since these channels co-locate and support K+ and water transport in glial cells (Higashi et al. 2001; Kofuji et al. 2000; Nagelhus et al. 1999; Nielsen and Clausen 1997; Takumi et al. 1995).

Based on the present data, we propose the following model for Dp71 restoration in Dp71-null mice. First, the ShH10-hGFP-2A-Dp71 intravitreal injection induces Dp71 restoration in Müller glial cells. Second, Dp71 restoration allows Dp71-dependent protein complex up-regulation and relocalization in Müller glial cell endfeet (Figure 7). Finally, recovering a functional Dp71-dependent protein complex in Müller glial cell endfeet leads to BRB reinstatement and retinal edema reabsorption. Knowing that Dp71 is down-regulated in pathologies showing BRB breakdown, we highlighted that the successful Dp71 restoration is an important step forwards the development of new treatments for retinal diseases with symptoms of BRB breakdown and macular edema such as AMD and diabetic retinopathy.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: Retinal integrity and transduction efficiency. Fundus images of the Dp71-null retina two months after intravitreal injection of ShH10-GFP (A, C) or ShH10-GFP-2A-Dp71 (B, D) showed that both AAVs strongly transduced the whole retina (C, D). Confocal imaging of an entire cryoslice showing the GFP expression (E) and immunostaining of a close-up image (white rectangle) with glutamine synthetase (red) to visualize the colocalization.

Figure 2: Dp71 mRNA over-expression leads to over-expression of mRNAs associated to Dp71. Quantitative RT-PCR showed an over-expression of Dp71, dystroglycans, AQP4, Kir4.1 and laminins mRNAs in the treated Dp71-null mouse in comparison with the wild-type. Quantitative RT-PCR showed that the utrophin mRNA is up-regulated while GFAP didn't show any variation. Bars represent means + SEM for triplicate data points; n = 7. *p<0.05, **p<0.01 significant differences versus wild-type; °°p<0.01 significant differences versus wild-type; †p<0.05, ††p<0.01 significant differences versus Dp71-null (Mann Whitney U test).

Figure 3: Dp71 and β-dystroglycan over-expression two months after intravitreal injection of ShH10-GFP-Dp71 in the Dp71-null mouse retina. Western blot and subsequent band density semi-quantification relative to β-actin of Dp71 (A, C) using H4 antibody and of β-dystroglycan (B, D).

Figure 4: Relocalization of Dp71 and Dp71 related proteins in the Müller glial cells. Isolated Müller glial cells, expressing GFP and stained with H4 showing Dp71 expression mainly

located in the Müller glial cell endfeet (white arrows). Same observations were made for β-dystroglycan, potassium channel Kir4.1 and for water channel AQP4 (n=4).

Figure 5: Reabsorption of induced retinal edema in Dp71-null mice. Image A showed measurements performed on OCT images to evaluate the thickness of different retinal layers. Graphs B and C showed the thickness of the whole retina (B) and of the inner retina (C) in wild-type and Dp71-null mice intravitreally injected with PBS or ShH10-hGFP-2A-Dp71. Two months after PBS intravitreal injection, we observed a significant increase in the retinal thickness of Dp71-null mice but no modification in the wild-type retina. Dp71 restoration completely resorbed the retinal edema caused by the needle intrusion. Bars represent means + SEM for triplicate data points; n = 9. *p<0.05, ****p<0.0001 significant differences versus wild-type; °p<0.05, °°p<0.01 significant differences versus wild-type; †p<0.05, ††p<0.01 significant differences versus Dp71-null (Mann Whitney U test).

Figure 6: Restoration of the BRB permeability in the Dp71-null mouse. BRB permeability was measured using Evans blue dye vascular permeability assay on WT and Dp71-null adult mice intravitreally injected with PBS or ShH10-Dp71. Vascular permeability was strongly increased in Dp71-null mice compared to WT. However, Dp71-null mice with ShH10-Dp71 present a normal BRB permeability compared to WT. Bars represent means + SEM for triplicate data points; n = 10. *p<0.05 significant differences versus wild-type; †††p<0.001 significant differences versus Dp71-null (Mann Whitney U test).

Figure 7: Hypothetical model of Dp71- and Utrophin-DAPs complexes, linked to Kir4.1 and/or AQP4 channels, binding laminin and agrin of the basement membrane, located in

the Müller glial cell endfeet at the ILM. This schematic drawing shows the close link of Dp71 or Utrophin, with α/β-dystroglycan, Kir4.1, AQP4, laminin and agrin. It illustrates how the absence or the recovery of Dp71 could modify the molecular expression and organization of all these components of the Müller glial cell endfeet membrane and of the ILM. Dp71-dependant complex is located in "lipid raft" membrane domains (dark grey) whereas Utrophin-dependant complex is located in "non-raft" membrane domains (light grey).

Figure S1: Measurements of retinal thickness on OCT images. Graphs A and B showed the thickness of the photoreceptor segments (A) and of the outer nuclear layer (B) in wild-type and Dp71-null mice intravitreally injected with PBS or ShH10-hGFP-2A-Dp71. Bars represent means + SEM for triplicate data points; n = 9. ****$p<0.0001$ significant differences versus wild-type (Mann Whitney U test).

Figure 1

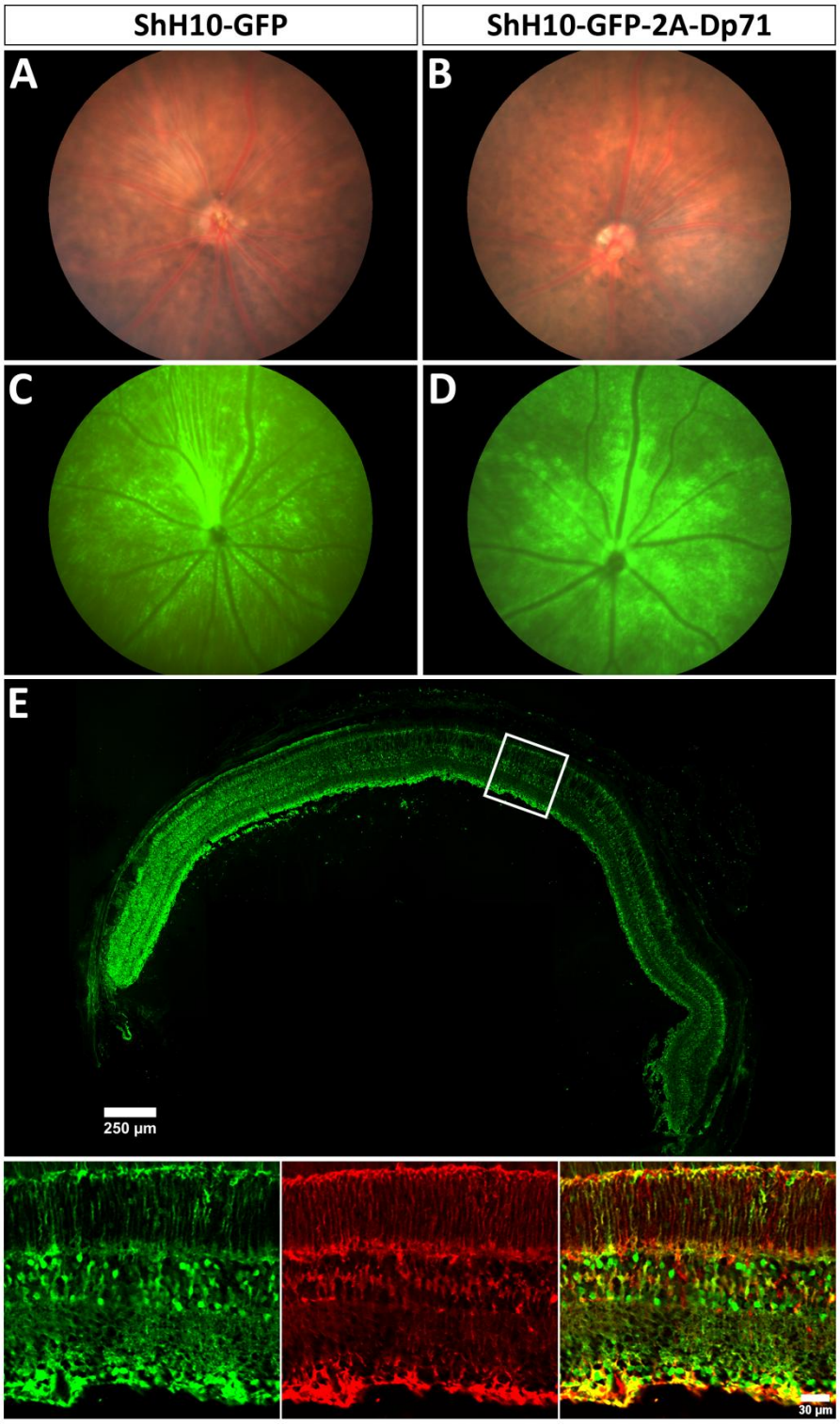


Figure 2

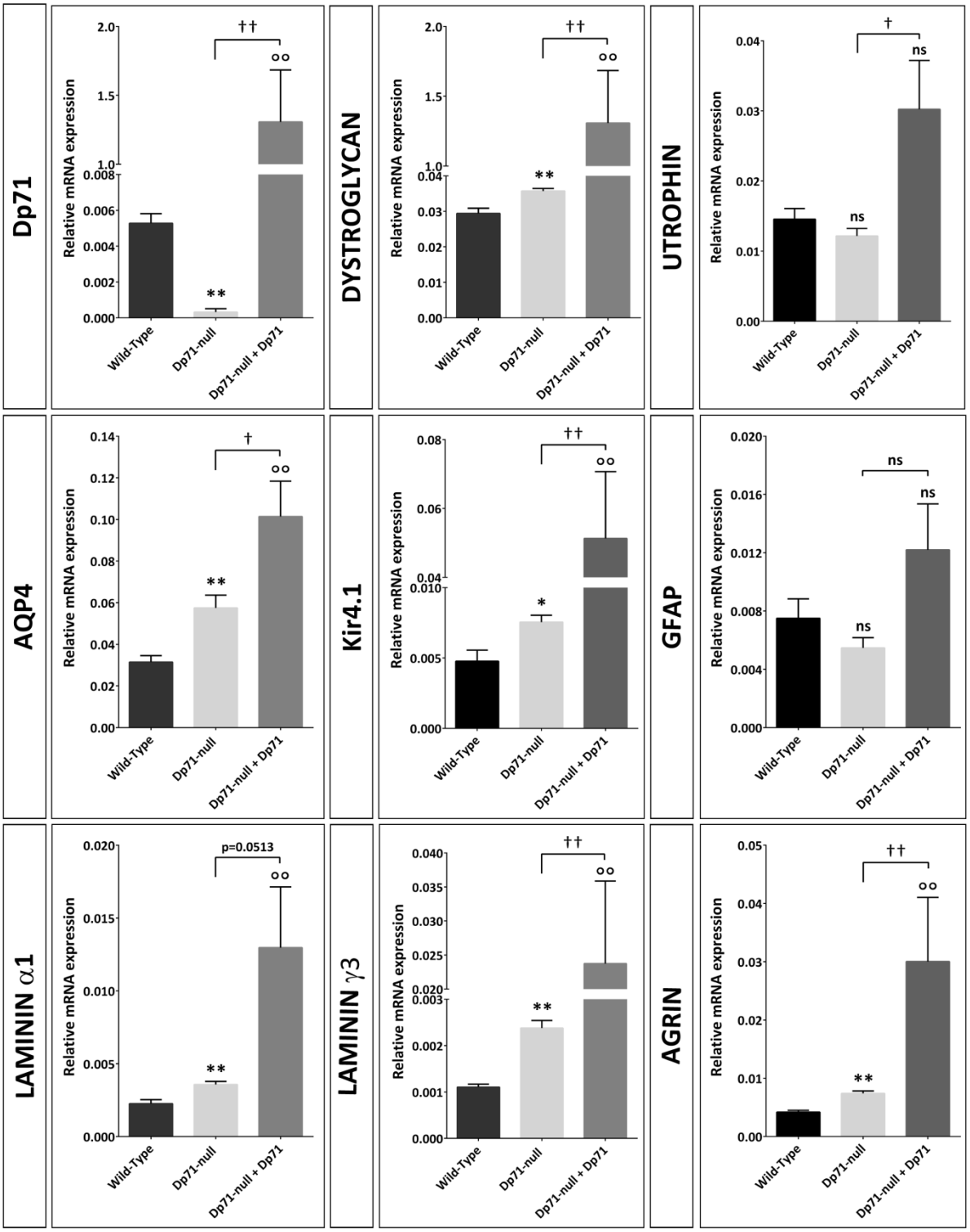

Dp71
DYSTROGLYCAN
UTROPHIN
AQP4
Kir4.1
GFAP
LAMININ α1
LAMININ γ3
AGRIN
Relative mRNA expression
Wild-Type
Dp71-null
Dp71-null + Dp71
**
*
ns
p=0.0513
††
°°
†

Figure 3

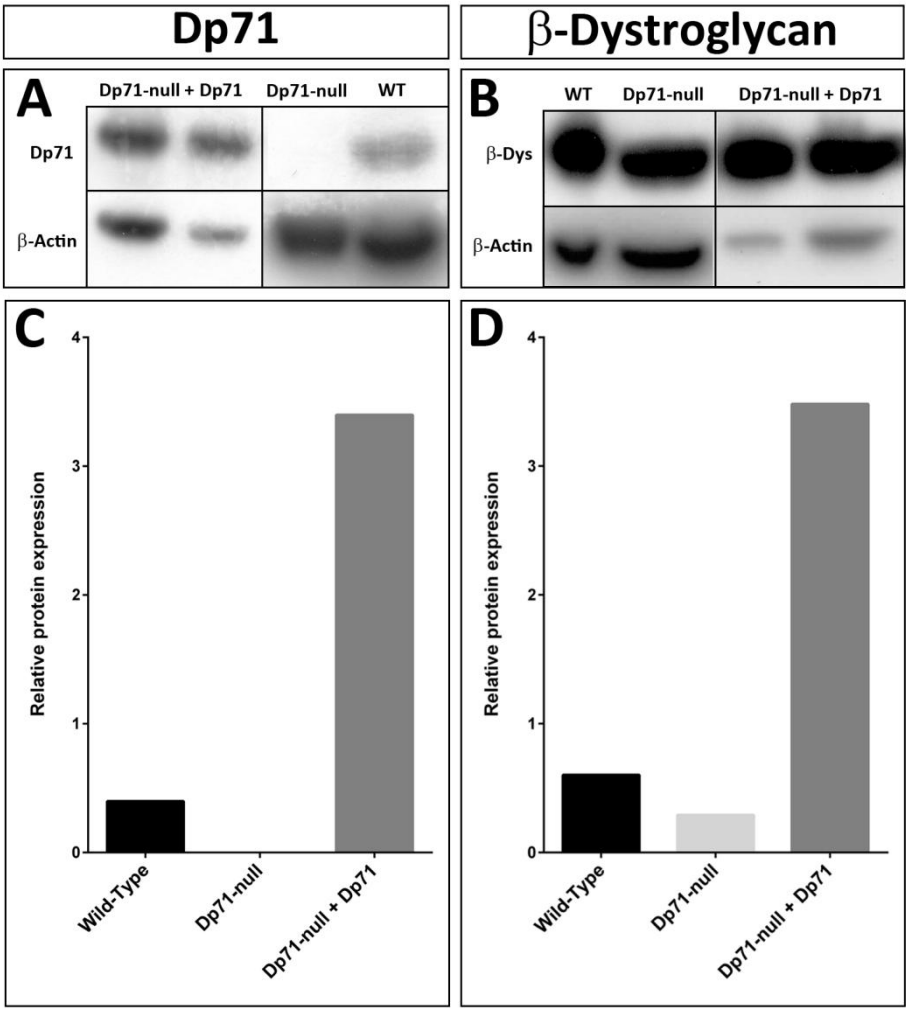

Dp71
β-Dystroglycan
A
Dp71-null + Dp71
Dp71-null
WT
Dp71
β-Actin
B
WT
Dp71-null
Dp71-null + Dp71
β-Dys
β-Actin
C
Relative protein expression
0
1
2
3
4
Wild-Type
Dp71-null
Dp71-null + Dp71
D
Relative protein expression
0
1
2
3
4
Wild-Type
Dp71-null
Dp71-null + Dp71

Figure 4

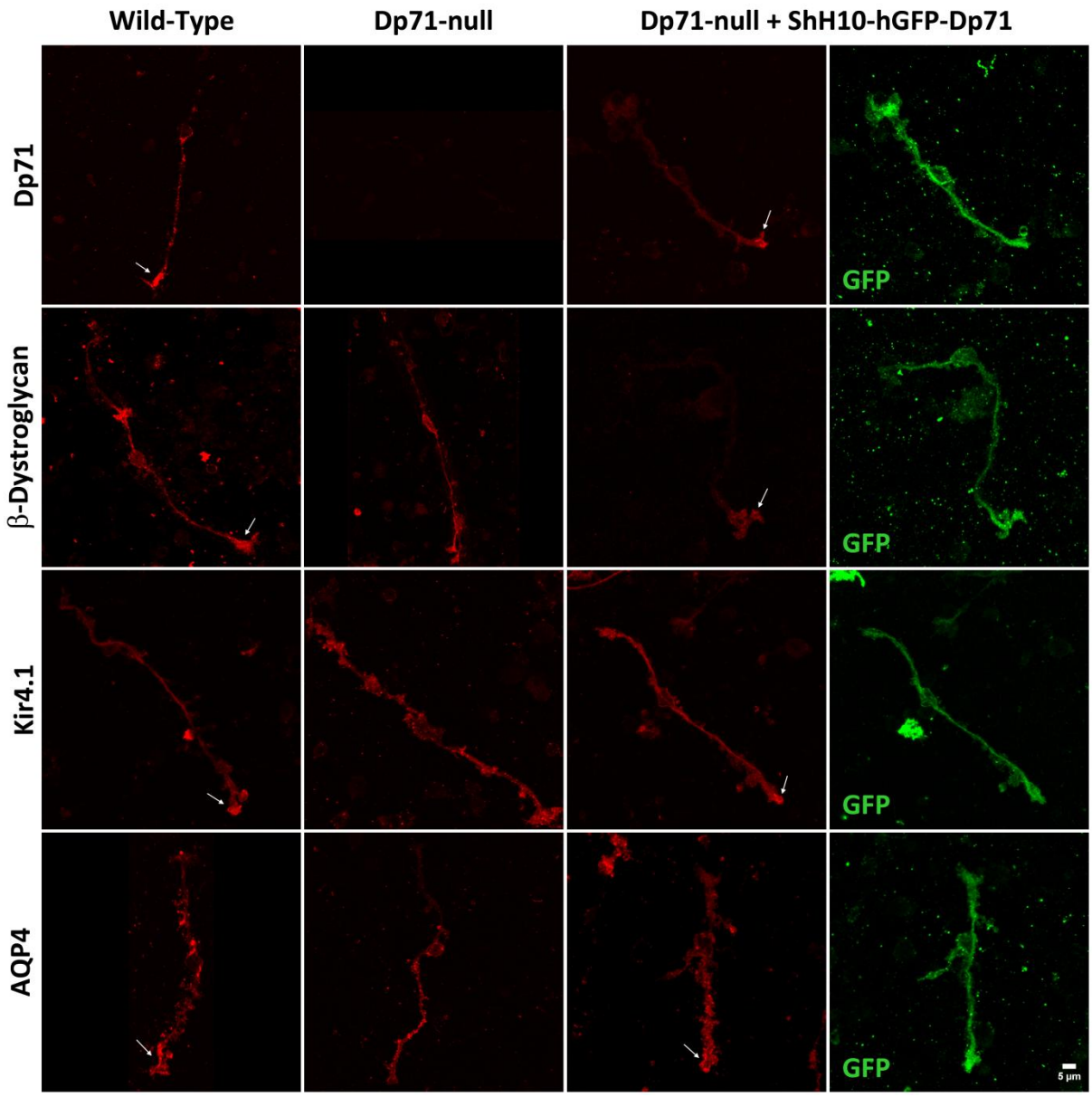

Wild-Type
Dp71-null
Dp71-null + ShH10-hGFP-Dp71
Dp71
β-Dystroglycan
Kir4.1
AQP4
GFP
GFP
GFP
GFP
5 µm

Figure 5

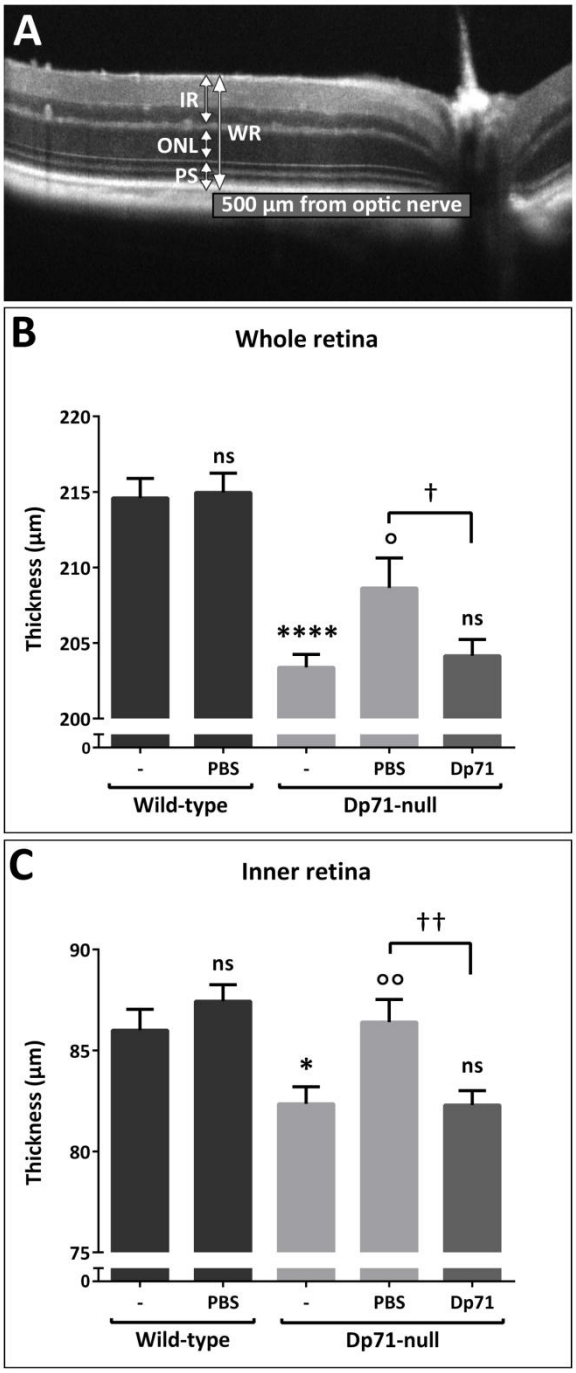

A
IR
WR
ONL
PS
500 µm from optic nerve
B
Whole retina
Thickness (µm)
220
215
210
205
200
0
ns
****
°
†
ns
-
PBS
-
PBS
Dp71
Wild-type
Dp71-null
C
Inner retina
Thickness (µm)
90
85
80
75
0
ns
*
°°
††
ns
-
PBS
-
PBS
Dp71
Wild-type
Dp71-null

Figure 6

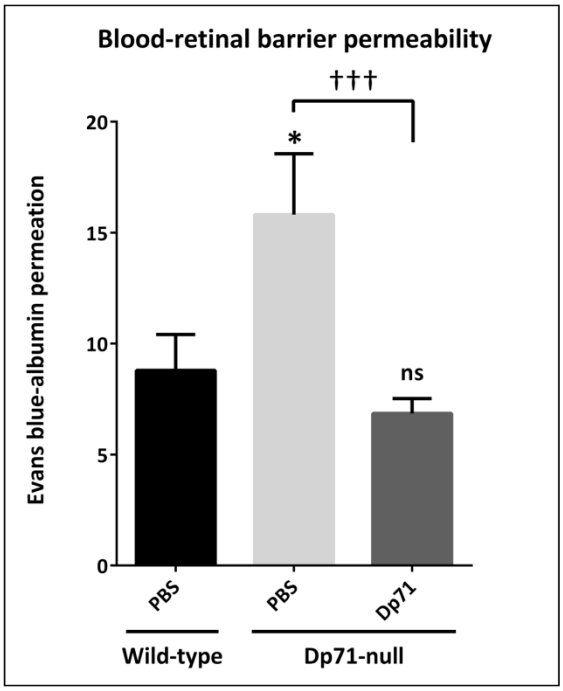


Figure 7

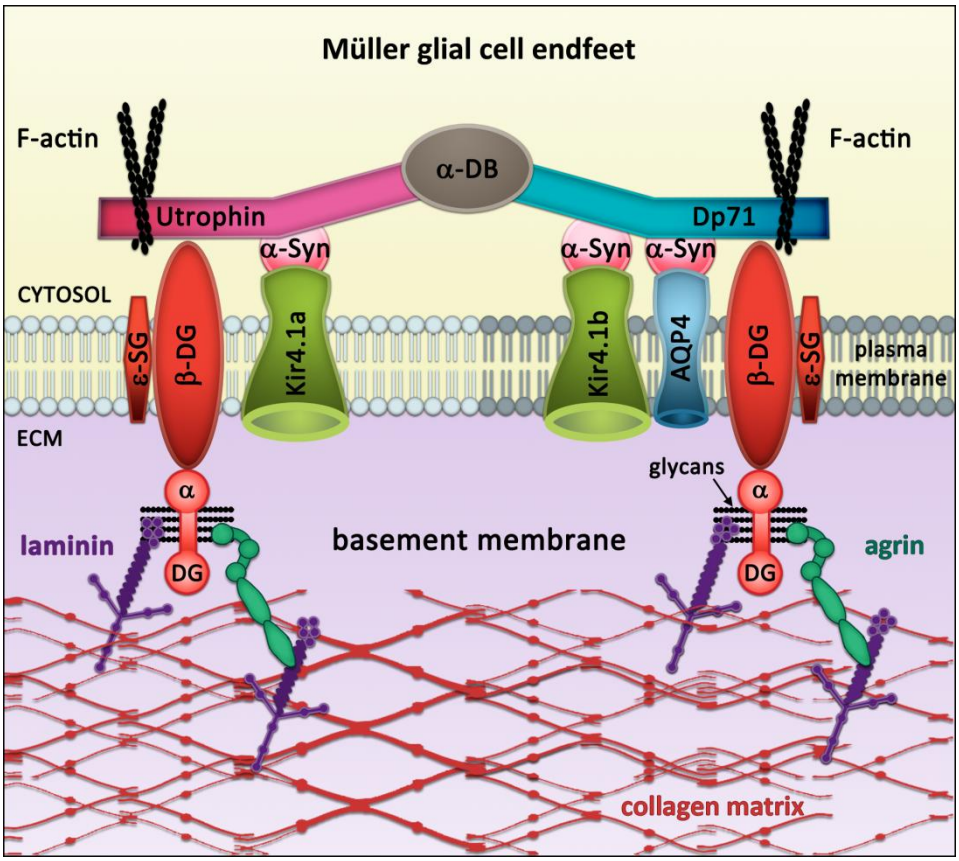
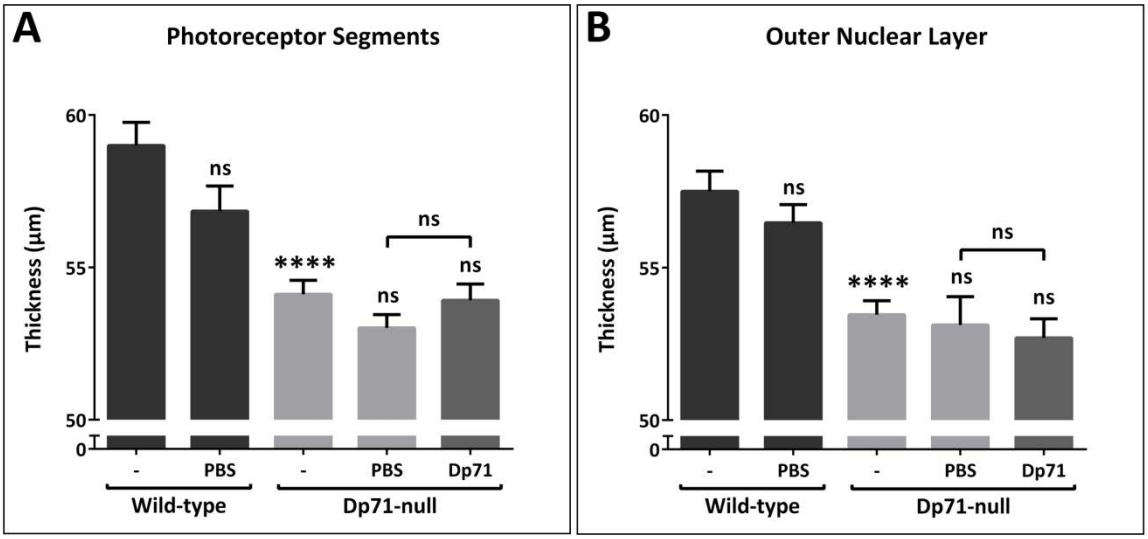


Figure S1


A
Photoreceptor Segments
Thickness (µm)
60
55
50
0
ns
****
ns
ns
ns
-
PBS
-
PBS
Dp71
Wild-type
Dp71-null
B
Outer Nuclear Layer
Thickness (µm)
60
55
50
0
ns
****
ns
ns
ns
-
PBS
-
PBS
Dp71
Wild-type
Dp71-null

ACKNOWLEDGEMENTS

We acknowledge the Association Française contre les Myopathies (AFM) for a research project grant number 14853 to A.R. and a PhD fellowship to O.V. and Allergan INC. This work performed in the frame of the LABEX LIFESENSES [reference ANR-10-LABX-65] was supported by French state funds managed by the ANR. We also received support from the Ecos-Nord program No. M11S02. Finally, we thank Mélissa Desrosiers for technical assistance with AAV preparations.

REFERENCES

Aleman V, Osorio B, Chavez O, Rendon A, Mornet D, Martinez D. 2001. Subcellular localization of Dp71 dystrophin isoforms in cultured hippocampal neurons and forebrain astrocytes. Histochem Cell Biol 115(3):243-54.

Aurnhammer C, Haase M, Muether N, Hausl M, Rauschhuber C, Huber I, Nitschko H, Busch U, Sing A, Ehrhardt A and others. 2012. Universal real-time PCR for the detection and quantification of adeno-associated virus serotype 2-derived inverted terminal repeat sequences. Hum Gene Ther Methods 23(1):18-28.

Austin RC, Fox JE, Werstuck GH, Stafford AR, Bulman DE, Dally GY, Ackerley CA, Weitz JI, Ray PN. 2002. Identification of Dp71 isoforms in the platelet membrane cytoskeleton. Potential role in thrombin-mediated platelet adhesion. J Biol Chem 277(49):47106-13.

Austin RC, Howard PL, D'Souza VN, Klamut HJ, Ray PN. 1995. Cloning and characterization of alternatively spliced isoforms of Dp71. Hum Mol Genet 4(9):1475-83.

Bar S, Barnea E, Levy Z, Neuman S, Yaffe D, Nudel U. 1990. A novel product of the Duchenne muscular dystrophy gene which greatly differs from the known isoforms in its structure and tissue distribution. Biochem J 272(2):557-60.

Bordais A, Bolanos-Jimenez F, Fort P, Varela C, Sahel JA, Picaud S, Rendon A. 2005. Molecular cloning and protein expression of Duchenne muscular dystrophy gene products in porcine retina. Neuromuscul Disord 15(7):476-87.

Ceccarini M, Rizzo G, Rosa G, Chelucci C, Macioce P, Petrucci TC. 1997. A splice variant of Dp71 lacking the syntrophin binding site is expressed in early stages of human neural development. Brain Res Dev Brain Res 103(1):77-82.

Charbel Issa P, Gillies MC, Chew EY, Bird AC, Heeren TF, Peto T, Holz FG, Scholl HP. 2012. Macular telangiectasia type 2. Prog Retin Eye Res.

Claudepierre T, Mornet D, Pannicke T, Forster V, Dalloz C, Bolanos F, Sahel J, Reichenbach A, Rendon A. 2000. Expression of Dp71 in Muller glial cells: a comparison with utrophin- and dystrophin-associated proteins. Invest Ophthalmol Vis Sci 41(1):294-304.

Connors NC, Kofuji P. 2002. Dystrophin Dp71 is critical for the clustered localization of potassium channels in retinal glial cells. J Neurosci 22(11):4321-7.

Cunha-Vaz JG, Travassos A. 1984. Breakdown of the blood-retinal barriers and cystoid macular edema. Surv Ophthalmol 28 Suppl:485-92.

Distler C, Dreher Z. 1996. Glia cells of the monkey retina--II. Muller cells. Vision Res 36(16):2381-94.

Fort PE, Sene A, Pannicke T, Roux MJ, Forster V, Mornet D, Nudel U, Yaffe D, Reichenbach A, Sahel JA and others. 2008. Kir4.1 and AQP4 associate with Dp71- and utrophin-DAPs complexes in specific and defined microdomains of Muller retinal glial cell membrane. Glia 56(6):597-610.

Gonzalez E, Montanez C, Ray PN, Howard PL, Garcia-Sierra F, Mornet D, Cisneros B. 2000. Alternative splicing regulates the nuclear or cytoplasmic localization of dystrophin Dp71. FEBS Lett 482(3):209-14.

Gorecki DC, Monaco AP, Derry JM, Walker AP, Barnard EA, Barnard PJ. 1992. Expression of four alternative dystrophin transcripts in brain regions regulated by different promoters. Hum Mol Genet 1(7):505-10.

Grieger JC, Choi VW, Samulski RJ. 2006. Production and characterization of adeno-associated viral vectors. Nat Protoc 1(3):1412-28.

Higashi K, Fujita A, Inanobe A, Tanemoto M, Doi K, Kubo T, Kurachi Y. 2001. An inwardly rectifying K(+) channel, Kir4.1, expressed in astrocytes surrounds synapses and blood vessels in brain. Am J Physiol Cell Physiol 281(3):C922-31.

Howard PL, Dally GY, Wong MH, Ho A, Weleber RG, Pillers DA, Ray PN. 1998. Localization of dystrophin isoform Dp71 to the inner limiting membrane of the retina suggests a unique functional contribution of Dp71 in the retina. Hum Mol Genet 7(9):1385-91.

Klimczak RR, Koerber JT, Dalkara D, Flannery JG, Schaffer DV. 2009. A novel adeno-associated viral variant for efficient and selective intravitreal transduction of rat Muller cells. PLoS One 4(10):e7467.

Kofuji P, Ceelen P, Zahs KR, Surbeck LW, Lester HA, Newman EA. 2000. Genetic inactivation of an inwardly rectifying potassium channel (Kir4.1 subunit) in mice: phenotypic impact in retina. J Neurosci 20(15):5733-40.

Lederfein D, Levy Z, Augier N, Mornet D, Morris G, Fuchs O, Yaffe D, Nudel U. 1992. A 71-kilodalton protein is a major product of the Duchenne muscular dystrophy gene in brain and other nonmuscle tissues. Proc Natl Acad Sci U S A 89(12):5346-50.

Marquez FG, Cisneros B, Garcia F, Ceja V, Velazquez F, Depardon F, Cervantes L, Rendon A, Mornet D, Rosas-vargas H and others. 2003. Differential expression and subcellular distribution of dystrophin Dp71 isoforms during differentiation process. Neuroscience 118(4):957-66.

Nagelhus EA, Horio Y, Inanobe A, Fujita A, Haug FM, Nielsen S, Kurachi Y, Ottersen OP. 1999. Immunogold evidence suggests that coupling of K+ siphoning and water transport in rat retinal Muller cells is mediated by a coenrichment of Kir4.1 and AQP4 in specific membrane domains. Glia 26(1):47-54.

Nielsen OB, Clausen T. 1997. Regulation of Na(+)-K+ pump activity in contracting rat muscle. J Physiol 503 (Pt 3):571-81.

Noel G, Belda M, Guadagno E, Micoud J, Klocker N, Moukhles H. 2005. Dystroglycan and Kir4.1 coclustering in retinal Muller glia is regulated by laminin-1 and requires the PDZ-ligand domain of Kir4.1. J Neurochem 94(3):691-702.

Petrs-Silva H, Dinculescu A, Li Q, Min SH, Chiodo V, Pang JJ, Zhong L, Zolotukhin S, Srivastava A, Lewin AS and others. 2009. High-efficiency transduction of the mouse retina by tyrosine-mutant AAV serotype vectors. Mol Ther 17(3):463-71.

Rapaport D, Greenberg DS, Tal M, Yaffe D, Nudel U. 1993. Dp71, the nonmuscle product of the Duchenne muscular dystrophy gene is associated with the cell membrane. FEBS Lett 328(1-2):197-202.

Rozen S, Skaletsky H. 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. Methods Mol Biol 132:365-86.

Saint Martin A, Aragon J, Depardon-Benitez F, Sanchez-Trujillo A, Mendoza-Hernandez G, Ceja V, Montanez C. 2012. Identification of Dp71e, a new dystrophin with a novel carboxy-terminal end. FEBS J 279(1):66-77.

Sarig R, Mezger-Lallemand V, Gitelman I, Davis C, Fuchs O, Yaffe D, Nudel U. 1999. Targeted inactivation of Dp71, the major non-muscle product of the DMD gene: differential activity of the Dp71 promoter during development. Hum Mol Genet 8(1):1-10.

Sene A, Tadayoni R, Pannicke T, Wurm A, El Mathari B, Benard R, Roux MJ, Yaffe D, Mornet D, Reichenbach A and others. 2009. Functional implication of Dp71 in osmoregulation and vascular permeability of the retina. PLoS One 4(10):e7329.

Tadayoni R, Rendon A, Soria-Jasso LE, Cisneros B. 2012. Dystrophin Dp71: the smallest but multifunctional product of the Duchenne muscular dystrophy gene. Mol Neurobiol 45(1):43-60.

Takumi T, Ishii T, Horio Y, Morishige K, Takahashi N, Yamada M, Yamashita T, Kiyama H, Sohmiya K, Nakanishi S and others. 1995. A novel ATP-dependent inward rectifier potassium channel expressed predominantly in glial cells. J Biol Chem 270(27):16339-46.

Tout S, Chan-Ling T, Hollander H, Stone J. 1993. The role of Muller cells in the formation of the blood-retinal barrier. Neuroscience 55(1):291-301.

Tozawa T, Itoh K, Yaoi T, Tando S, Umekage M, Dai H, Hosoi H, Fushiki S. 2012. The shortest isoform of dystrophin (Dp40) interacts with a group of presynaptic proteins to form a presumptive novel complex in the mouse brain. Mol Neurobiol 45(2):287-97.

Tretiach M, Madigan MC, Wen L, Gillies MC. 2005. Effect of Muller cell co-culture on in vitro permeability of bovine retinal vascular endothelium in normoxic and hypoxic conditions. Neurosci Lett 378(3):160-5.

Trichas G, Begbie J, Srinivas S. 2008. Use of the viral 2A peptide for bicistronic expression in transgenic mice. BMC Biol 6:40.

Vacca O, Darche M, Schaffer DV, Flannery JG, Sahel JA, Rendon A, Dalkara D. 2013. AAV-mediated gene delivery in Dp71-null mouse model with compromised barriers. Glia.

Xu Q, Qaum T, Adamis AP. 2001. Sensitive blood-retinal barrier breakdown quantitation using Evans blue. Invest Ophthalmol Vis Sci 42(3):789-94.

DISCUSSION & PERSPECTIVES

VII. Discussion & Perspectives

1) L'Absence de Dp71 Fragilise la MLI et Favorise la Thérapie Génique

Les stratégies en thérapies géniques pour le traitement de pathologies rétiniennes ont fait des avancées majeures ces dernières années, en particulier avec l'utilisation des AAV. En effet, l'AAV est le vecteur viral le plus utilisé en thérapie génique pour traiter des troubles héréditaires de la rétine tels que l'amaurose congénitale de Leber et des troubles acquis tels que la dégénérescence maculaire liée à l'âge ou la rétinopathie diabétique. L'AAV est un vecteur de choix en thérapeutique puisqu'il est non-pathogène, permet une expression durable du transgène après une seule injection, est capable d'infecter la plupart des cellules de la rétine et ne déclenche pas de réponse immunitaire. D'autre part, la barrière hémato-rétinienne empêche la dissémination par la circulation sanguine du virus et l'apparition d'effets secondaires systémiques après injection intraoculaire.

Une limite très importante de ces thérapies est la faible efficacité de transduction de la rétine par injection intravitréenne obligeant à utiliser la voie sous-rétinienne. Cependant, l'injection sous-rétinienne d'AAV nécessite de réaliser une vitrectomie en créant un trou au travers de la rétine et de détacher les photorécepteurs de l'épithélium pigmentaire rétinien par l'injection de fluide, causant des dommages tissulaires au niveau du site d'injection. En outre, la plupart des pathologies pour lesquelles sont développées ces thérapies sont des maladies dégénératives de la rétine ce qui signifie qu'elle présente une architecture rétinienne fragile (Wright et al. 2010, Lin et al. 2009) et qu'une chirurgie sous-rétinienne pourra induire des dommages mécaniques importants, une gliose réactionnelle et une perte de fonction de la rétine (Nork et al. 2012). Trois études cliniques récentes, visant à traiter l'amaurose congénitale de Leber de type 2 par injection sous-rétinienne d'AAV portant le

gène RPE65, ce sont avérées efficaces dans la rétine extrafovéale mais n'offrent aucun bénéfice et quelques risques pour le traitement de la fovéa (Jacobson et al. 2012).

La faible efficacité d'infection de la rétine par des particules virales par injection intravitréenne est due à une faible concentration locale de virus en raison de sa diffusion dans le vitré mais aussi à des barrières physiques rétiniennes. En effet, il a été montré que les AAV injectés dans le vitré s'accumulent au niveau de la membrane limitante interne (MLI) dans des zones où cette membrane est désorganisée ou bien diffusent loin de la rétine, et qu'une légère digestion de la membrane limitante interne stimule la transduction de la rétine par les AAV (Dalkara et al. 2009). La MLI est donc une barrière à la pénétration des AAV dans la rétine depuis le vitré chez l'adulte mais l'injection intravitréenne reste le meilleur moyen d'administration des AAV.

Nous savons que la Dp71 est une protéine du cytosquelette associée à la membrane qui se lie d'une part à l'actine, d'autre part au complexe transmembranaire des DAPs (protéines associées à la dystrophine). Elle permet l'ancrage de ce complexe macromoléculaire - incluant le β-dystroglycane, l'ε-sarcoglycane, l'α-syntrophine et l'α-dystrobrevine - à la membrane de la CGM au niveau de la MLI (Claudepierre et al. 2000a; Claudepierre et al. 2000b). L'absence de Dp71 chez la souris Dp71-null entraîne la délocalisation du β-dystroglycane le long de la CGM (Fort et al. 2008). Le β-dystroglycane se lie au α-dystroglycane lui-même lié à la laminine qui est un composant majeur de la MLI (Claudepierre et al. 2000a). Or, nous avons montré que la MLI de la souris déficiente en Dp71 par rapport à la souche sauvage est significativement plus fine et désorganisée, en raison d'une altération de la localisation de l'expression de la laminine (Vacca et al. 2013). Cette caractéristique rend la MLI hautement perméable à différents sérotypes d'AAV après

injection intravitréenne, alors que la barrière hémato-rétinienne conserve sa sélectivité et empêche la diffusion systémique des particules virales (Vacca et al. 2013). Ce résultat nous a permis d'envisager de développer une nouvelle méthode visant à déstabiliser l'interaction Dp71/ dystroglycane / laminine, dans le but de perméabiliser la membrane limitante interne, favorisant ainsi la transduction de la rétine par voie intravitréenne, une voie moins traumatique pour la rétine en thérapie génique (Annexe 1, Brevet Inserm).

Parmi les techniques qui pourraient être envisagées pour fragiliser la MLI, il y a (i) le peeling de la MLI (Abdelkader and Lois 2008) ; (ii) la photocoagulation laser (Lee et al. 2014) ; (iii) la digestion enzymatique de la MLI par une pronase (Dalkara et al. 2009) ; et (iv) le détachement postérieur du vitré par dégradation de la fibronectine et de la laminine grâce à l'ocriplasmine (Microplasmin, ThromboGenics, Iselin, NJ) (Chen et al. 2009; Tsui et al. 2012).

Toutes ces techniques sont assez invasives, présentent des risques de dommages pour la rétine et sont parfois difficilement applicables à un modèle d'étude murin. Cependant d'autres moyens plus adaptés à la perspective thérapeutique existent. Il a été démontré qu'il était possible de bloquer l'interaction entre le α-dystroglycane et la laminine dans des myotubes en culture (Brown et al. 1999) à l'aide de l'anticorps monoclonal IIH6. La présence prolongée l'anticorps IIH6 dans ces cultures permet d'induire un phénotype dystrophic *in vitro*. On peut supposer que cet anticorps a désorganisé le complexe DAPs comme c'est le cas dans la DMD en absence de dystrophine. Une autre étude, menée sur des cultures primaires d'astrocytes de cerveau de souris, montre que l'IIH6 bloque leur adhésion à la laminine en empêchant l'intéraction dystroglycane/laminine et diminue leur capacité à réabsorber l'eau (Hawkins et al. 2013). Ce résultat est en accord avec nos observations chez la souris Dp71-null, qui présente une délocalisation des canaux Kir4.1 et AQP4 en raison de

l’absence d’ancrage à la membrane par la Dp71 associée au DAPC lui-même lié à la laminine et provoquant de la même manière une dérégulation du transport de l’eau (Sene et al. 2009). L’anticorps IIH6 est donc un excellent candidat pour rompre la liaison entre la laminine et le dystroglycane dans la MLI, qui pourrait être utilisé en combinaison avec un AAV en injection intravitréenne en thérapie génique.

D'autres perspectives thérapeutiques doivent être encore explorées comme la possibilité de bloquer le site de phosphorylation O-Mannosyl de l'α-dystroglycane nécessaire à sa liaison à la laminine (Yoshida-Moriguchi et al. 2010), ou de bloquer le module LG4-5 de la laminine α2 avec des peptides comme l'A2G78 ou l’A2G80 qui empêchent son interaction avec l'héparane sulfate et/ou l'α-dystroglycane (Suzuki et al. 2010).

Enfin, une autre cible potentielle serait l'utilisation d'un composé pharmacologique, le chloranil (Noel et al. 2011). Le chloranil provoque le clivage du β-dystroglycane de la surface cellulaire de 43 kDa en une forme à 31 kDa via un mécanisme médié par des métalloprotéinases. Des variants chimiques du chloranile induisent également l’excrétion du β-dystroglycane, conduisant à la perte d’ancrage à la surface cellulaire et à la perte de liaison à la laminine, entraînant l'inhibition du clustering du dystroglycane et d’AQP4 à la membrane de cultures primaires d’astrocytes cérébraux de rat. L'utilisation de NAC - un anti-oxydant - préviendrait l'effet du chloranil sur le dystroglycane. L’effet du chloranil est donc réversible ce qui constitue un avantage incontestable dans la mise au point de traitements applicables à l'homme.

2) La Souris Dp71-null : Un Modèle d'Œdème Rétinien

Nous avons montré que la rétine Dp71-null est plus sensible à la blessure de l'aiguille que la rétine sauvage, puisqu'une seule injection intravitréenne de PBS chez la souris transgénique entraîne une augmentation significative de l'épaisseur de la rétine qui persiste jusqu'à deux mois après traitement. Cette augmentation de l'épaisseur de la rétine est probablement due à la dérégulation du transport de l'eau qui provoque le gonflement des CGM chez la souris Dp71-null (Sene et al. 2009) menant à l'apparition d'un œdème de la rétine. Il est difficile de développer un modèle animal d'œdème maculaire puisque la plupart des modèles expérimentaux ne possèdent pas de macula. On peut dire que même si la rétine Dp71-null ne présente pas naturellement d'œdème de la rétine (Vacca et al. 2013), une simple injection intravitréenne de solution saline peut rendre la rétine Dp71-null œdémateuse et nous permettre de l'utiliser comme modèle d'étude de l'œdème maculaire.

3) La Restauration de l'Expression de la Dp71

a) Surexpression de la Dp71 et du Complexe Protéique Dépendant de la Dp71

Nous avons montré qu'il est possible de restaurer l'expression de la Dp71 grâce à un AAV (ShH10-hGFP-2A-Dp71) et que cette restauration permet de relocaliser toutes les protéines du complexe dépendant de la Dp71 rétablissant ainsi une homéostasie et une perméabilité de la barrière hémato-rétinienne normale. Le ShH10-hGFP-2A-Dp71 entraîne une expression sept fois plus élevée de la Dp71 chez la souris Dp71-null par rapport à la souris sauvage. Un résultat similaire a été obtenu pour les ARNm et les protéines du complexe dépendant de la Dp71 mais ces niveaux élevés d'expression ne semblent pas

induire d'effets secondaires indésirables. Cependant, nous souhaitons parvenir à restaurer la Dp71 à un niveau physiologique en utilisant des doses de virus plus faibles dans nos futures études. Quand nous aurons déterminé la dose optimale d'AAV à utiliser pour restaurer un niveau physiologique de Dp71 dans la rétine, nous devrons vérifier la localisation des protéines du complexe dépendant de la Dp71 et nous testerons à nouveau la perméabilité de la BHR et la réabsorption de l'œdème rétinien. Un niveau physiologique de Dp71 ne sera pas nécessairement suffisant pour récupérer la fonction de la BHR.

En effet, dans cette étude, nous avons restauré l'ADNc de la Dp71d, une isoforme de la Dp71 (Aleman et al. 2001 ; Austin et al. 1955). Nous nous sommes donc affranchi de tout phénomène de régulation transcriptionnelle et de la production de différentes isoformes de la Dp71 (Austin et al. 2002 ; Ceccarini et al. 1977 ; Gorecki et al. 1992 ; Lederfein et al. 1992 ; Saint Martin et al. 2012 ; Tozawa et al. 2012). En effet, l'ARN de la Dp71 subit de nombreux épisodes d'épissage alternatif, produisant neuf isoformes de la Dp71 connues à ce jour (Tadayoni et al. 2012). De plus, la Dp71 a été longtemps considérée comme une protéine uniquement cytoplasmique associée à la membrane mais l'équipe du Dr B. Cisneros a apporté de nombreuses évidences de la localisation nucléaire de la Dp71 (Aleman et al. 2011). Il a été démontré que l'épissage alternatif détermine la localisation subcellulaire des isoformes de la Dp71 (Gonzales et al. 2000 ; Marquez et al. 2003). Toutes ces informations suggèrent que chaque isoforme de la Dp71 peut avoir un rôle spécifique en fonction du type cellulaire et de la localisation subcellulaire où elle est exprimée. C'est pourquoi il serait important d'étudier les effets fonctionnels de la restauration de chaque isoforme de la Dp71 dans la rétine de souris Dp71-null et d'observer si ces isoformes permettent la régulation de l'expression des protéines du complexe dépendant de la Dp71 (Annexe 2, Projet ECOS-Nord).

b) Restauration de la BHR et Résorption de l'Œdème Rétinien

Nous avons démontré que la restauration de la Dp71 dans la CGM a permis de rétablir une perméabilité normale de la BHR, prouvant que la CGM a récupéré sa capacité à réguler la perméabilité vasculaire (Distler and Dreher 1996 ; Tout et al. 1933). Il est probable que ce soit le résultat de la relocalisation des canaux aqueux et potassiques (Kir4.1 et AQP4) et donc de la restauration de la régulation du transport de l'eau par les CGM.

Nous avons mis en évidence que la restauration de la Dp71 mène à la relocalisation de la Dp71, du β-dystroglycane, des canaux Kir4.1 et AQP4 dans les pieds des CGM au niveau de la membrane limitante interne (MLI) (Fort et al. 2008). La relocalisation de ce complexe macromoléculaire a permis la réabsorption des fluides par les CGM et la diminution de l'épaisseur de la rétine correspondant à la résorption de l'œdème rétinien.

c) La Membrane Limitante Interne

Nous avons montré qu'en absence de Dp71, la MLI est plus fine et désorganisée, laissant les AAV transduire plus facilement les cellules de la rétine (Vacca et al. 2013). Plus précisément nous avons mis en évidence que l'absence de Dp71 affecte la laminine - un composant majeur de la MLI – et altère significativement l'organisation de cette membrane. En effet, nous savons que la laminine, l'agrine et le DGC (dystroglycane, Dp71, syntrophine, sarcoglycane et dystrobrévine) associé aux canaux Kir4.1 et AQP4, sont distribués le long de la membrane au niveau du pied de la CGM, au contact avec le vitrée (Claudepierre et al. 2000a; Fort et al. 2008; Hopf and Hoch 1996; Howard et al. 1998; Mascarenhas et al. 2003; Moukhles et al. 2000). Ici, nous avons montré que le dystroglycan, l'utrophine, AQP4, Kir4.1, la laminine et l'agrine sont up-régulés après la surexpression de la Dp71. Toutes ces protéines sont liées directement ou indirectement à la Dp71 (Fort et al. 2008; Noel et al.

2005). C'est pourquoi nous pouvons envisager que la restauration de la Dp71, stimulant l'expression de toutes ces protéines dépendantes de la Dp71 et relocalisant le β-dystroglycane (qui se lie à la laminine et à l'agrine via l'α-dystroglycane), puisse aussi rétablir une MLI fonctionnelle faisant de nouveau barrière à l'entrée des AAV dans la rétine (Dalkara et al. 2009). Nous envisageons d'analyser la distribution de la laminine et de tester la capacité de la MLI à filtrer les particules AAV. En effet, nous savons que la MLI Dp71-null est perméable à l'AAV de sérotype 5. Nous souhaitons donc injecter l'AAV5 dans le vitré de souris dont l'expression de la Dp71 a été restaurée par le ShH10-hGFP-2A-Dp71, afin d'observer si nous pouvons récupérer une MLI fonctionnelle capable de faire de nouveau barrière à l'entrée des AAV dans la rétine (Dalkara et al. 2009).

d) Effet Potentiel sur la Néoangiogenèse

La souris transgénique mdx3cv possède un épissage alternatif aberrant du gène DMD conduisant à l'expression résiduelle des produits du gène DMD et notamment à un niveau réduit de Dp71 dans le système nerveux central (Cox et al. 1993; Dalloz et al. 2001). Il a été montré que cette souris présente un ERG négatif similaire à celui de patients souffrant de DMD, fournissant ainsi un bon modèle d'étude du phénotype visuel de la myopathie de Duchenne. D'autre part, un nombre restreint de patients DMD développent à l'âge adulte une rétinopathie proliférative (Fagan et al. 2012). Dans le but de comprendre ce phénomène, l'équipe du Dr Martin Friedlander a montré que la souris mdx3cv soumise à un stress hypoxique (modèle de rétinopathie du prématuré induite par hypoxie) présente une augmentation significative de la néoangiogenèse associée à une activation des cellules gliales de Müller (gliose réactionnelle) et à la diminution de l'expression des canaux potassiques Kir4.1 et aqueux AQP4 (Mollie Friedlander 2012). La Dp71, étant la dystrophine

majoritaire dans la rétine et étant impliquée dans le maintien de l'homéostasie rétinienne par l'ancrage des canaux Kir4.1 et AQP4 à la membrane, semble être une excellente cible thérapeutique dans ce modèle d'angiogenèse pathologique chez une souris déficiente en Dp71. Il serait intéressant de restaurer l'expression de la Dp71 chez la souris mdx3cv, comme nous l'avons fait chez la souris Dp71-null, pour protéger la rétine face à cette néoangiogenèse et ainsi développer une stratégie thérapeutique préventive chez les patients atteints de dystrophie musculaire de Duchenne.

4) L'Inhibition de la Dp71

Dans notre équipe, El-Mathari et al. a récemment démontré que la rétine Dp71-null possède des caractéristiques d'un état pré-inflammatoire (Wang et al. 2010; Zhong et al. 2012) retrouvées dans des pathologies vasculaires rétiniennes telles que la rétinopathie diabétique (RD), l'uvéite postérieure ou l'occlusion veineuse rétinienne (OVR) (El-Mathari Brahim 2014). En effet, il s'avère que l'expression du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire VEGF et de la molécule d'adhésion ICAM-1 (exprimé à la surface des cellules endothéliales) sont significativement plus élevées chez la souris Dp71-null par rapport à la souche sauvage provoquant l'augmentation de la leucostasie (nombre de leucocytes adhérents). Cependant, certaines caractéristiques plus dramatiques pour la rétine telles que la néovascularisation rétinienne, les occlusions veineuses ou l'œdème rétinien (Han et al. 2013; Lee et al. 2010) sont absentes. Or, il est probable que l'absence de Dp71 puisse être partiellement compensée par l'augmentation de l'utrophine, l'homologue autosomal de la dystrophine (Fort et al. 2008). Ainsi, nous avons entrepris de développer une méthode d'inhibition de la Dp71 par shRNA dans le but d'étudier les effets d'une inhibition chronique à l'âge adulte de la Dp71, s'affranchissant ainsi d'éventuelles compensations moléculaires

survenue au cours du développement chez la souris Dp71-null. La création d'une souris knock-out conditionnel inductible étant difficile à développer en raison de la régulation très complexe du gène DMD, nous avons choisit d'utiliser la méthode d'interférence ARN associée aux AAV (ShH10) pour inhiber la Dp71 spécifiquement dans les cellules gliales de Müller. Nous avons réalisé le design de cinq shRNA spécifiques de la région 5'UTR de la Dp71 que nous avons clonés dans des plasmides AAV sous contrôle du promoteur U6 (à ARN Pol III) et qui seront testés prochainement par injection intravitréenne. Nous envisageons aussi d'utiliser une des méthodes précédemment exposées de déstabilisation de la membrane limitante interne pour faciliter l'infection de la rétine sauvage par le ShH10 et potentialiser l'action des shRNA.

ANNEXES

VIII. Annexes

1) Méthode d'expression par injection intravitréenne d'un vecteur contenant un polynucléotide d'intérêt en combinaison avec un inhibiteur de l'expression de la Dp71 (Brevet Inserm)

Les résultats que nous avons publiés dans GLIA (Vacca et al. 2013), révélant que l'absence de Dp71 fragilise la membrane limitante interne et favorise la transduction de la rétine par les AAV, nous ont permis de déposer le brevet suivant :

METHODS FOR EXPRESSING A POLYNUCLEOTIDE OF INTEREST IN THE RETINA OF A SUBJECT. Ophélie VACCA, Deniz Dalkara, Alvaro Rendon, José-Alain Sahel. Brevet Inserm N°13 305 914.7 déposé le 28 juin 2013.

METHODS FOR EXPRESSING A POLYNUCLEOTIDE OF INTEREST IN THE RETINA OF A SUBJECT

FIELD OF THE INVENTION:

The present invention relates to methods for expressing a polynucleotide of interest in the retina of a subject.

BACKGROUND OF THE INVENTION:

Gene therapy strategies for the treatment of retinal disease have made major advances in recent years, in particular with the use of Adeno-Associated Virus (AAV) vectors. Indeed, AAV vectors are currently among the most frequently used viral vector for gene therapy aimed at inherited retinal disorders and for acquired disorders such as age related macular degeneration or diabetic retinopathy. AAV is regarded as the vector of choice for therapies because of its lack of pathogenicity, long-term gene expression following a single injection, and ability to infect the majority of retinal cells. AAV is a virus composed of a 4.7-kb single-stranded DNA genome enclosed within a 25-nm capsid. The tissue tropism and transduction efficiency of this virus depend on the capsid composition which allows initial receptor attachment, cellular entry, trafficking mechanisms and defines the selectivity for specific cells or tissues. The blood-retinal barrier minimizes systemic dissemination of the virus and the possibility of unwanted systemic side effects following intraocular delivery. Moreover, immune responses following intraocular vector administration are attenuated compared to those following systemic administration. An important limit to such therapy is that for most AAV serotypes intravitreal delivery results in poor retinal transduction, restricted to the inner retinal cells (mostly retinal ganglion cells and some Müller cells). The outer retina (photoreceptors and retinal pigment epithelium) harbor the majority of mutations leading to retinal degeneration. The only way to obtain AAV-mediated gene delivery to these therapeutically important cell-types has been the use of subretinal injection route. However, subretinal injection of AAV needs to make vitrectomy to create a needle hole through the retina and detach the photoreceptors from their supportive retinal pigment epithelium (RPE) with the injection of fluid, causing tissue damage at the site of injection. Three recent clinical trials for the retinal disease type 2 Leber's congenital amaurosis (LCA2) used subretinal injections to deliver AAV that carried the retinal isomerase–encoding gene RPE65 to the RPE; the trial protocol benefited from the atypical pathology of LCA2, which exhibits a loss

of photosensitive function without significant structural disruption of retinal layers for many years (Jacobson et al., 2005, Bainbridge et al., 2008, Cideciyan et al., 2008, Maguire et al., 2008, Maguire et al., 2009). In contrast, most retinal degenerative diseases (including retinitis pigmentosa and macular degeneration, which account for half of all retinal degeneration cases) are characterized by the progressive loss of photoreceptor cells and increasingly fragile retinal architecture across the entire retina (Wright et al., 2010, Lin et al., 2009). In such disease states, subretinal surgery can induce mechanical damage, reactive gliosis, and loss of function (Nork et al, 2012). These procedural effects have even been documented in one LCA2 trial, as patients receiving a subretinal injection under the foveal region lost retinal thickness and visual acuity; these results led investigators to conclude that LCA gene therapy is efficacious in the extrafoveal retina but offers no benefit and some risk in treating thefovea (Jacobson et al., 2012). The lack of infection from the vitreous is due to low local concentrations due to diffusion in the vitreous as well as physical barriers to retinal penetration by the viral particles. It has been shown that AAV injected into the vitreous accumulates at the inner limiting membrane (ILM) in area where this membrane is disorganised or, diffuses away from the retina and that a mild digestion of the ILM enhances AAV transduction (Dalkara et al. 2009}. The ILM pose a barrier for the penetration of AAV into the retina from the vitreous in adults but this is the best route for AAV delivery.

SUMMARY OF THE INVENTION:

The present invention relates to methods for expressing a polynucleotide of interest in the retina of a subject.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION:

The purpose of the inventors was to explore the tropism and the efficiency of AAVs in the Dp71-null mouse model presenting permeable retinal barriers in order to choose the best AAV for a future gene therapy aimed at treating diseases with such symptoms of permeable barriers (such as the blood-retina barrier) and to ensure the safety of the virus infection across leaky BRB. Furthermore, they studied the Müller cells in view of the blood-retinal barrier (BRB) and the inner limiting membrane (ILM) of Dp71-null mice in comparison to wild-type mice. The inventors aimed to understand via AAV infection how these glial cells behave when BRB is compromised. To target the Müller glial cells and thereby the BRB restoration, they used an AAV variant, ShHl0-GFP, engineered to target specifically Müller cells (Klimczak et al. 2009). They found that Müller cells are transduced more widely in Dp71-null

mice and as glial interactions are altered in Dp71-null mice at the ILM. This lead them to inquire about the integrity of this retinal barrier – the ILM- which has a negative impact on viral transduction after intravitreal administration. The inventors observed on 20 nm-cryosections and on OCT *in vivo* imaging that the inner retina of Dp71-null mice is significantly thinner than wild-type mice indicating an alteration of the inner retina in the deficient mice. To test if the ILM in Dp71-null mice is really disorganised, they injected AAV5-GFP, an AAV serotype that does not lead to transduction of retinal neurons by intravitreal injection in wild-type mice because of the ILM barrier. They showed that the photoreceptors in Dp71-null mice are largely transduced proving that the ILM in the knockout mouse is altered allowing diffusion of this virus through the retina. Finally, they raised the question of the integrity of the BRB and they checked if AAV can cross the BRB after intravitreal injection of ShHl0-GFP, their potential therapeutic vector. The inventors found that no trace of this virus was found in the bloodstream of wild-type mice or in the Dp71-null mice 24, 48 or 72 hours after intravitreal injection of ShHl0. Here they demonstrate that, in the Dp71-null mice, the ILM is highly permeable to different AAV serotypes after an intravitreal injection whereas the BRB remains selective for particles such as AAVs.

The present invention relates to a method for expressing a polynucleotide of interest in the retina of a subject comprising the step consisting of injecting into the vitreous an amount of a vector containing the polynucleotide of interest in combination with an amount of an inhibitor of Dp71 expression.

According to the invention, the term "subject" or "subject in need thereof", is intended for a human or non-human mammal. Typically the subject is affected or likely to be affected with a retinal disease.

As used herein the term “retinal disease” refers to a broad class of diseases wherein the functioning of the retina is affected for example due to damage or degeneration of the photoreceptors; ganglia or optic nerve; or even neovascularization. One skilled in the art can distinguish inherited retinal diseases and acquired retinal disorders. Representative examples of retinal acquired diseases include but are not limited to macular degeneration such as age related macular degeneration, and diabetic retinopathies. Examples of inherited retinal diseases include but are not limited to retinitis pigmentosa, Leber’s congenital Amaurosis, X-linked Retinoschisis.

The method of the present invention is particularly relevant for expressing a polynucleotide of interest in the outer retina (photoreceptors and retinal pigment epithelium).

Accordingly, the present invention provides methods for treating, preventing, or, inhibiting retinal diseases, comprising the general step injecting into the vitreous of the subject an amount of a vector containing the polynucleotide of interest in combination with an amount of an inhibitor of Dp71 expression.

A wide variety of diseases of the eye may thus be treated given the teachings provided herein.

For example, the method of the invention is performed in order to treat or prevent macular degeneration. Briefly, the leading cause of visual loss in the elderly is macular degeneration (MD), which has an increasingly important social and economic impact in the United States. As the size of the elderly population increases in this country, age related macular degeneration (AMD) will become a more prevalent cause of blindness than both diabetic retinopathy and glaucoma combined. Although laser treatment has been shown to reduce the risk of extensive macular scarring from the "wet" or neovascular form of the disease, there are currently no effective treatments for the vast majority of patients with MD.

The method of the invention may also be performed in order to treat or prevent an inherited retinal degeneration. One of the most common inherited retinal degenerations is retinitis pigmentosa (RP), which results in the degeneration of photoreceptor cells, and the RPE. Other inherited conditions include Bardet-Biedl syndrome (autosomal recessive); Bassen-Kornzweig syndrome, Best disease, choroidema, gyrate atrophy, Leber congenital amaurosis, Refsun syndrome, Stargardt disease; Cone or cone-rod dystrophy (autosomal dominant and X-linked forms); Congenital stationary night blindness (autosomal dominant, autosomal recessive and X-linked forms); Macular degeneration (autosomal dominant and autosomal recessive forms); Optic atrophy, autosomal dominant and X-linked forms); Retinitis pigmentosa (autosomal dominant, autosomal recessive and X-linked forms); Syndromic or systemic retinopathy (autosomal dominant, autosomal recessive and X-linked forms); and Usher syndrome (autosomal recessive).

In the context of the invention, the term "treating" or "treatment", as used herein, means reversing, alleviating, inhibiting the progress of, or preventing the disorder or condition to which such term applies, or one or more symptoms of such disorder or condition (e.g., retinal diseases).

One skilled in the art knows, by its knowledge of the scientific literature in his field, which are the polynucleotides that may be more appropriate to treat a specific retinal disease.

In a particular the polynucleotide product is a polypeptide that will enhance the function of a retinal cell, e.g., the function of a rod or cone photoreceptor cell, a retinal ganglion cell, a Muller cell, a bipolar cell, an amacrine cell, a horizontal cell, or a retinal pigmented epithelial cell. Examples of polynucleotides of interest include but are not limited to those encoding for a polypeptide selected from the group consisting of neuroprotective polypeptides (e.g., GDNF, CNTF, NT4, NGF, and NTN); anti-angiogenic polypeptides (e.g., a soluble vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor; a VEGF-binding antibody; a VEGF-binding antibody fragment (e.g., a single chain anti-VEGF antibody); endostatin; tumstatin; angiostatin; a soluble Fit polypeptide (Lai et al. (2005) Mol. Ther. 12:659); an Fc fusion protein comprising a soluble Fit polypeptide (see, e.g., Pechan et al. (2009) Gene Ther. 16: 10); pigment epithelium- derived factor (PEDF); a soluble Tie-2 receptor; etc.); tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP-3); a light-responsive opsin, e.g., a rhodopsin; anti-apoptotic polypeptides (e.g., Bcl-2, Bcl-Xl); and the like. Other suitable polypeptides include, but are not limited to, glial derived neurotrophic factor (GDNF); fibroblast growth factor 2; neurturin (NTN); ciliary neurotrophic factor (CNTF); nerve growth factor (NGF); neurotrophin-4 (NT4); brain derived neurotrophic factor (BDNF); epidermal growth factor; rhodopsin; X-linked inhibitor of apoptosis; and Sonic hedgehog. Suitable light-responsive opsins include, e.g., a light-responsive opsin as described in U.S. Patent Publication No. 2007/0261127 (e.g., ChR2; Chop2, CaTCh); U.S. Patent Publication No. 2001/0086421; U.S. Patent Publication No. 2010/0015095; and Diester et al. (2011) Nat. Neurosci. 14:387 or halorhodopsin (e.g. eNpHR) or other light gated ion channel or proton pumps. Suitable polypeptides also include retinoschisin. Suitable polypeptides include, e.g., retinitis pigmentosa GTPase regulator (RGPR)-interacting protein-1 (see, e.g., GenBank Accession Nos. Q96KN7, Q9EPQ2, and Q9GLM3); peripherin-2 (Prph2) (see, e.g., GenBank Accession No. NP_000313; peripherin; a retinal proteinisomerase (RPE65), (see, e.g., GenBank AAC39660; and Morimura et al. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:3088); and the like.

Suitable polypeptides also include: CHM (choroidermia (Rab escort protein 1)), a polypeptide that, when defective or missing, causes choroideremia (see, e.g., Donnelly et al. (1994) Hum. Mol. Genet. 3: 1017; and van Bokhoven et al. (1994) Hum. Mol. Genet. 3: 1041); and Crumbs homolog 1 (CRB1), a polypeptide that, when defective or missing, causes Leber congenital amaurosis and retinitis pigmentosa (see, e.g., den Hollander et al. (1999) Nat. Genet. 23:217; and GenBank Accession No. CAM23328). Suitable polypeptides also include polypeptides that, when defective or missing, lead to achromotopsia, where such polypeptides include, e.g., cone photoreceptor cGMP-gated channel subunit alpha (CNGA3) (see, e.g., GenBank Accession No. NP_001289; and Booij et al. (2011) Ophthalmology 118: 160-167); cone photoreceptor cGMP-gated cation channel beta-subunit (CNGB3) (see, e.g., Kohl et al.(2005) Eur J Hum Genet. 13(3):302); guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha transducing activity polypeptide 2 (GNAT2) (ACHM4); and ACHM5; and polypeptides that, when defective or lacking, lead to various forms of color blindness (e.g., L-opsin, M-opsin, and S-opsin). See Mancuso et al. (2009) Nature 461(7265):784-787. In a particular embodiment, the polynucleotide of interest may encode for a neurotrophic factor. As used herein, the "neurotrophic factor" is a generic term of proteins having a physiological action such as survival and maintenance of nerve cells, promotion of neuronal differentiation. Examples of neurotrophic factors include but are not limited to bFGF, aFGF, BDNF, CNTF, IL-1beta, NT-3, IGF-II, GDNF, NGF and RdCVF.

In certain circumstances, the polynucleotide product of interest is a site-specific endonuclease that provide for site-specific knock-down of gene function, e.g., where the endonuclease knocks out an allele associated with a retinal disease. For example, where a dominant allele encodes a defective copy of a gene that, when wild-type, is a retinal structural protein and/or provides for normal retinal function, a site-specific endonuclease (such as TALEnucleases, meganucleases or Zinc finger nucleases) can be targeted to the defective allele and knock out the defective allele. In addition to knocking out a defective allele, a site-specific nuclease can also be used to stimulate homologous recombination with a donor DNA that encodes a functional copy of the protein encoded by the defective allele. Thus, e.g., the method of the invention can be used to deliver both a site-specific endonuclease that knocks out a defective allele, and can be used to deliver a functional copy of the defective allele, resulting in repair of the defective allele, thereby providing for production of a functional retinal protein (e.g., functional retinoschisin, functional RPE65, functional peripherin, etc.). See, e.g., Li et al. (2011) Nature 475:217. In some embodiments, the vector comprises a

polynucleotide that encodes a site- specific endonuclease; and a polynucleotide that encodes a functional copy of a defective allele, where the functional copy encodes a functional retinal protein. Functional retinal proteins include, e.g., retinoschisin, RPE65, retinitis pigmentosa GTPase regulator (RGPR)-interacting protein- 1, peripherin, peripherin-2, and the like. Site-specific endonucleases that are suitable for use include, e.g., zinc finger nucleases (ZFNs); and transcription activator-like effector nucleases (TALENs), where such site- specific endonucleases are non-naturally occurring and are modified to target a specific gene. Such site-specific nucleases can be engineered to cut specific locations within a genome, and non-homologous end joining can then repair the break while inserting or deleting several nucleotides. Such site-specific endonucleases (also referred to as "INDELs") then throw the protein out of frame and effectively knock out the gene. See, e.g., U.S. Patent Publication No. 2011/0301073.

In some embodiments, the polynucleotide product is an interfering RNA (RNAi). Typically, suitable RNAi include RNAi that decrease the level of an apoptotic or angiogenic factor in a cell. For example, an RNAi can be an shRNA or siRNA that reduces the level of a polynucleotide product that induces or promotes apoptosis in a cell. Genes whose polynucleotide products induce or promote apoptosis are referred to herein as "pro-apoptotic genes" and the products of those genes (mRNA; protein) are referred to as "pro-apoptotic polynucleotide products." Pro-apoptotic polynucleotide products include, e.g., Bax, Bid, Bak, and Bad polynucleotide products. See, e.g., U.S. Patent No. 7,846,730. Interfering RNAs could also be against an angiogenic product, for example VEGF (e.g., Cand5; see, e.g., U.S. Patent Publication No. 2011/0143400; U.S. Patent Publication No. 2008/0188437; and Reich et al. (2003) Mol. Vis. 9:210), VEGFRl (e.g., Sirna-027; see, e.g., Kaiser et al. (2010) Am. J. Ophthalmol. 150:33; and Shen et al. (2006) Gene Ther. 13:225), or VEGFR2 (Kou et al. (2005) Biochem. 44: 15064). See also, U.S. Patent Nos. 6,649,596, 6,399,586, 5,661,135, 5,639,872, and 5,639,736; and U.S. Patent Nos. 7,947,659 and 7,919,473.

In one embodiment, the vector containing the polynucleotide of interest is selected from the group consisting of viral gene delivery vectors. Viral gene delivery vectors include, but are not limited to nucleic acid sequences from the following viruses: RNA viruses such as a retrovirus (as for example moloney murine leukemia virus and lentiviral derived vectors), harvey murine sarcoma virus, murine mammary tumor virus, and rous sarcoma virus; adenovirus, adeno-associated virus; SV40-type viruses; polyoma viruses; Epstein-Barr

viruses; papilloma viruses; herpes virus; vaccinia virus; polio virus and AAV vectors. Preferred viral gene delivery vector are rAAV vectors. "AAV" is an abbreviation for adeno-associated virus, and may be used to refer to the virus itself or derivatives thereof. The term covers all serotypes and variants both naturally occurring and engineered forms. The abbreviation "rAAV" refers to recombinant adeno-associated virus, also referred to as a recombinant AAV vector (or "rAAV vector"). The term "AAV" includes but is not limited to AAV type 1 (AAV-1), AAV type 2 (AAV-2), AAV type 3 (AAV-3), AAV type 4 (AAV-4), AAV type 5 (AAV-5), AAV type 6 (AAV-6), AAV type 7 (AAV-7), and AAV type 8 (AAV-8).) and AAV type 9 (AAV9). The genomic sequences of various serotypes of AAV, as well as the sequences of the native terminal repeats (TRs), Rep proteins, and capsid subunits are known in the art. Such sequences may be found in the literature or in public databases such as GenBank. See, e.g., GenBank Accession Numbers NC_002077 (AAV-1), AF063497 (AAV-1), NC_001401 (AAV-2), AF043303 (AAV-2), NC_001729 (AAV-3), NC_001829 (AAV-4), U89790 (AAV-4), NC_006152 (AAV-5), AF513851 (AAV-7), AF513852 (AAV-8), and NC_006261 (AAV-8). An "rAAV vector" as used herein refers to an AAV vector comprising the polynucleotide of interest (i.e a heterologous polynucleotide) for the genetic transformation of a cell. In general, the rAAV vectors contain 5' and 3' adeno-associated virus inverted terminal repeats (ITRs), and the polynucleotide of interest operatively linked to sequences which regulate its expression in a target cell. In particular the rAVVs that may be used according to the invention include those described in WO2012145601.

The vector may also comprise regulatory sequences allowing expression and, secretion of the encoded protein, such as e.g., a promoter, enhancer, polyadenylation signal, internal ribosome entry sites (IRES), sequences encoding protein transduction domains (PTD), and the like. In this regard, the vector comprises a promoter region, operably linked to the polynucleotide of interest, to cause or improve expression of the protein in infected cells. Such a promoter may be ubiquitous, tissue-specific, strong, weak, regulated, chimeric, inducible, etc., to allow efficient and suitable production of the protein in the infected tissue. The promoter may be homologous to the encoded protein, or heterologous, including cellular, viral, fungal, plant or synthetic promoters. Most preferred promoters for use in the present invention shall be functional in cells or the retina, more preferably in photoreceptor or ganglion cells of the retina or in cells of the RPE. Examples of such regulated promoters include, without limitation, Tet on/off element- containing promoters, rapamycin-inducible promoters and metallothionein promoters. Examples of ubiquitous promoters include viral

promoters, particularly the CMV promoter, the RSV promoter, the SV40 promoter, etc. and cellular promoters such as the PGK (phosphoglycerate kinase) promoter. The promoters may also be neurospecific promoters such as the Synapsin or the NSE (Neuron Specific Enolase) promoters (or NRSE (Neuron restrictive silencer element) sequences placed upstream from the ubiquitous PGK promoter), or promoters specific for various retinal cell types such as the RPE65, the VMD2, the Rhodopsin or the cone arrestin promoters. The vector may also comprise target sequences for miRNAs achieving suppression of transgene expression in non-desired cells. For example, suppression of expression in the hematopoietic lineages ("de-targeting") enables stable gene transfer in the transduced cells by reducing the incidence and the extent of the transgene-specific immune response (Brown BD, Nature Medicine 2008). In a particular embodiment, the vector comprises a leader sequence allowing secretion of the encoded protein. Fusion of the polynucleotide of interest with a sequence encoding a secretion signal peptide (usually located at the N-terminal end of secreted polypeptides) will allow the production of the therapeutic protein in a form that can be secreted from the transduced cells. Examples of such signal peptides include the albumin, the β-glucuronidase, the alkaline protease or the fibronectin secretory signal peptides. In a most preferred embodiment, the promoter is specific or functional in cells of the retina, in particular in photoreceptor or ganglion cells of the retina or in the RPE, i.e., allows (preferential) expression of the transgene in said cells. For example, suitable photoreceptor- specific regulatory elements include, e.g., a rhodopsin promoter; a rhodopsin kinase promoter (Young et al. (2003) Ophthalmol. Vis. Sci. 44:4076); a beta phosphodiesterase gene promoter (Nicoud et al. (2007) J. Gene Med. 9: 1015); a retinitis pigmentosa gene promoter (Nicoud et al. (2007) supra); an interphotoreceptor retinoid-binding protein (IRBP) gene enhancer (Nicoud et al. (2007) supra); an IRBP gene promoter (Yokoyama et al. (1992) Exp Eye Res. 55:225).

The doses of vectors may be easily adapted by the skilled artisan, e.g., depending on the disease condition, the subject (for example, according to his weight, metabolism, etc.), the treatment schedule, etc. A preferred effective dose within the context of this invention is a dose allowing an optimal transduction of the cells of the retina (photoreceptor or ganglion cells or cells of the RPE). Typically, from 10^8 to 10^{12} viral genomes (transducing units) are administered per dose in mice, preferably from about 10^9 to 10^{11}. Typically, the doses of AAV vectors to be administered in humans may range from 10^8 to 10^{12} viral genomes, most preferably from 10^9 to 10^{11}.

The term "Dp71" has its general meaning in the art and refers to the Duchenne Muscular Dystrophy (DMD) gene product 71. Dp71 protein consists of a unique seven-residues N-terminus fused to the cysteine-rich and C-terminal domains of dystrophin (Hugnot, J.P., (1992) Lederfein, D., (1992)). Exemplary native Dp71 amino acid and nucleotide sequences are depicted in table 1:

Isoform	Genebank Accession Number	GenPept database Acce
Transcript variant Dp71ab, mRNA	NM_004018	NP_004009
Transcript variant Dp71a, mRNA	NM_004017	NP_004008
Transcript variant Dp71b, mRNA	NM_004016	NP_004007
transcript variant Dp71, mRNA	NM_004015	NP_004006

Table 1 : isoforms of Dp71 transcript variants

An “inhibitor of Dp71 expression” refers to a natural or synthetic compound that has a biological effect to inhibit or significantly reduce the expression of Dp71.

Inhibitor of the Dp71 expression may consist in a small organic molecule that inhibits the expression of Dp71. In particular, inhibitors of Dp 71 may consist in beta-nataphtoflavone as those described in Bermudez de Leon et al. (2006).

Inhibitors of expression for use in the present invention may be also based on anti-sense oligonucleotide constructs. Anti-sense oligonucleotides, including anti-sense RNA molecules and anti-sense DNA molecules, would act to directly block the translation of Dp71 mRNA by binding thereto and thus preventing protein translation or increasing mRNA degradation, thus decreasing the level of Dp71, and thus activity, in a cell. For example, antisense oligonucleotides of at least about 15 bases and complementary to unique regions of the mRNA transcript sequence encoding Dp71 can be synthesized, e.g., by conventional phosphodiester techniques. Methods for using antisense techniques for specifically inhibiting gene expression of genes whose sequence is known are well known in the art (e.g. see U.S. Pat. Nos. 6,566,135; 6,566,131; 6,365,354; 6,410,323; 6,107,091; 6,046,321; and 5,981,732). Small inhibitory RNAs (siRNAs) can also function as inhibitors of expression for use in the present invention. Dp71 gene expression can be reduced by contacting a subject or cell with a small double stranded RNA (dsRNA), or a vector or construct causing the production of a

small double stranded RNA, such that Dp71 gene expression is specifically inhibited (i.e. RNA interference or RNAi). Methods for selecting an appropriate dsRNA or dsRNA-encoding vector are well known in the art for genes whose sequence is known (e.g. see Tuschl, T. et al. (1999); Elbashir, S. M. et al. (2001); Hannon, GJ. (2002); McManus, MT. et al. (2002); Brummelkamp, TR. et al. (2002); U.S. Pat. Nos. 6,573,099 and 6,506,559; and International Patent Publication Nos. WO 01/36646, WO 99/32619, and WO 01/68836). All or part of the phosphodiester bonds of the siRNAs of the invention are advantageously protected. This protection is generally implemented via the chemical route using methods that are known by art. The phosphodiester bonds can be protected, for example, by a thiol or amine functional group or by a phenyl group. The 5'- and/or 3'- ends of the siRNAs of the invention are also advantageously protected, for example, using the technique described above for protecting the phosphodiester bonds. The siRNAs sequences advantageously comprises at least twelve contiguous dinucleotides or their derivatives. As used herein, the term "siRNA derivatives" with respect to the present nucleic acid sequences refers to a nucleic acid having a percentage of identity of at least 90% with erythropoietin or fragment thereof, preferably of at least 95%, as an example of at least 98%, and more preferably of at least 98%. As used herein, "percentage of identity" between two nucleic acid sequences, means the percentage of identical nucleic acid, between the two sequences to be compared, obtained with the best alignment of said sequences, this percentage being purely statistical and the differences between these two sequences being randomly spread over the nucleic acid sequences. As used herein, "best alignment" or "optimal alignment", means the alignment for which the determined percentage of identity (see below) is the highest. Sequences comparison between two nucleic acids sequences are usually realized by comparing these sequences that have been previously align according to the best alignment; this comparison is realized on segments of comparison in order to identify and compared the local regions of similarity. The best sequence alignment to perform comparison can be realized, beside by a manual way, by using the global homology algorithm developed by SMITH and WATERMAN (*Ad. App. Math.*, vol.2, p:482, 1981), by using the local homology algorithm developped by NEDDLEMAN and WUNSCH (*J. Mol. Biol.*, vol.48, p:443, 1970), by using the method of similarities developed by PEARSON and LIPMAN (*Proc. Natl. Acd. Sci. USA*, vol.85, p:2444, 1988), by using computer softwares using such algorithms (GAP, BESTFIT, BLAST P, BLAST N, FASTA, TFASTA in the Wisconsin Genetics software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI USA), by using the MUSCLE multiple alignment algorithms (Edgar, Robert C., *Nucleic Acids Research*, vol. 32, p:1792, 2004). To

get the best local alignment, one can preferably use BLAST software. The identity percentage between two sequences of nucleic acids is determined by comparing these two sequences optimally aligned, the nucleic acids sequences being able to comprise additions or deletions in respect to the reference sequence in order to get the optimal alignment between these two sequences. The percentage of identity is calculated by determining the number of identical position between these two sequences, and dividing this number by the total number of compared positions, and by multiplying the result obtained by 100 to get the percentage of identity between these two sequences.

One essential feature of the invention is that the antisense oligonucleotide is not delivered in association with a viral vector. Accordingly, the antisense oligonucleotide is injected alone (i.e. "naked") in the vitreous of the patient and use of viral vectors encoding for the inhibitor of Dp71 expression is thus excluded from the scope of the invention. One skilled in the art knows that antisense oligonucleotides are commonly used in clinics for intravitreal injections (e.g. against cytomegalovirus retinal infections immunocompromised patients with Vitravene ®, retinal delivery by repeated intravitreal injections).

In some embodiment, the vector containing the polynucleotide of interest and the inhibitor of Dp71 expression are to be used simultaneous or sequentially within a given time. The inhibitor of Dp71 expression can be injected into the vitreous in either order, e.g. the inhibitor of Dp71 expression can be injected first into the vitreous and then the vector containing the polynucleotide of interest can be injected or vice versa.

The present invention also provides a pharmaceutical composition comprising a vector containing the polynucleotide of interest, an inhibitor of Dp71 expression and a pharmaceutically acceptable carrier, diluent, excipient, or buffer. According to the invention, the pharmaceutical composition is compatible for intravitreal injection. In some embodiments, the pharmaceutically acceptable carrier, diluent, excipient, or buffer is suitable for use in a human. Such excipients, carriers, diluents, and buffers include any pharmaceutical agent that can be administered without undue toxicity. Carriers might include cationic lipids, non-ionic lipids and polyethylene glycol (PEG) as synthetic vectors to enhance siRNA delivery. siRNA might be contained in the hydrophilic interior of the particle or polyethyleneimine and derivatives can be used to fabricate both linear and branched polymeric delivery agents. Cationic polymers with a linear or branched structure can serve as efficient transfection agents

because of their ability to bind and condense nucleic acids into stabilized nanoparticles. Such materials have also been shown to stimulate nonspecific endocytosis as well as endosomal escape necessary to enhance nucleic acid uptake. Cyclodextrin-based delivery agents can also be used to increase siRNA delivery. Pharmaceutically acceptable excipients include, but are not limited to, liquids such as water, saline, glycerol and ethanol. Pharmaceutically acceptable salts can be included therein, for example, mineral acid salts such as hydrochlorides, hydrobromides, phosphates, sulfates, and the like; and the salts of organic acids such as acetates, propionates, malonates, benzoates, and the like. Additionally, auxiliary substances, such as wetting or emulsifying agents, pH buffering substances, and the like, may be present in such vehicles. A wide variety of pharmaceutically acceptable excipients are known in the art and need not be discussed in detail herein. Pharmaceutically acceptable excipients have been amply described in a variety of publications, including, for example, A. Gennaro (2000) "Remington: The Science and Practice of Pharmacy," 20th edition, Lippincott, Williams, & Wilkins; Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems (1999) H.C. Ansel et al., eds., 7th ed., Lippincott, Williams, & Wilkins; and Handbook of Pharmaceutical Excipients (2000) A.H. Kibbe et al., eds., 3 rd ed. Amer. Pharmaceutical Assoc.

The invention will be further illustrated by the following figures and examples. However, these examples and figures should not be interpreted in any way as limiting the scope of the present invention.

ABSTRACT OF THE INVENTION

METHODS FOR EXPRESSING A POLYNUCLEOTIDE OF INTEREST IN THE RETINA OF A SUBJECT

The present invention relates to methods for expressing a polynucleotide of interest in the retina of a subject. In particular, the present invention relates to a method for expressing a polynucleotide of interest in the retina of a subject comprising the step consisting of injecting into the vitreous an amount of a vector containing the polynucleotide of interest in combination with an amount of an inhibitor of Dp71 expression.

2) Étude de la fonction des isoformes de la Dp71 dans les tissus neuronaux (Projet ECOS-Nord)

Nous avons débuté en 2012 une collaboration Franco-Mexicaine soutenue par le programme ECOS-Nord jusqu'en 2015 avec l'équipe du Pr Cecilia Montañez. Cette collaboration a pour but de parvenir à caractériser les différentes isoformes de la Dp71 dans la rétine et dans de cerveau de la souris C57BL6J, c'est-à-dire de localiser chaque isoforme et d'analyser leurs fonctions dans ces tissus neuronaux. Pour cela, j'ai effectué un stage de deux mois au Cinvestav à Mexico dans le laboratoire du Pr Montañez et deux jeunes chercheurs de l'équipe du Pr Montañez, les Drs Jorge Aragon Medrano et José Romo-Yáñez, ont également effectué un stage de deux mois à l'Institut de la Vision à Paris dans l'équipe du Dr Rendon. Au cours de ces stages, nous sommes parvenus à identifier dix isoformes de la Dp71 présentes dans la rétine de souris C57BL6J (Figure 23). Ses isoformes ont été séquencées et quatre séquences ont été envoyées pour publication à GenBank : Dp71a, Dp71ab, Dp71b et la Dp40 (Figure 24), la séquence de la Dp71d ayant déjà été publiée (Mus musculus strain C57BL/6J dystrophin 71 mRNA, complete cds, Vacca O, Suarez Sanchez MR, Garfias Y, Aragon J, Benard R, Tadayoni R, Sahel JA, Montanez C, Cisneros B and Rendon A ; GenBank JN900253.1, 17 janvier 2012). Enfin, nous avons réussi à cloner cinq des isoformes de la Dp71 qui s'expriment dans la rétine de souris C57BL6J : la Dp71d, la Dp71a, la Dp71b, la Dp71ab, et la Dp40 (Figure 23, rectangles bleus) dans des plasmides AAV sous contrôle du promoteur ubiquitaire CAG. Ces plasmides permettront de produire un AAV pour chaque isoforme de la Dp71, de restaurer leur expression chez la souris Dp71-null et d'étudier leurs localisations ainsi que leurs différents rôles dans la rétine murine.

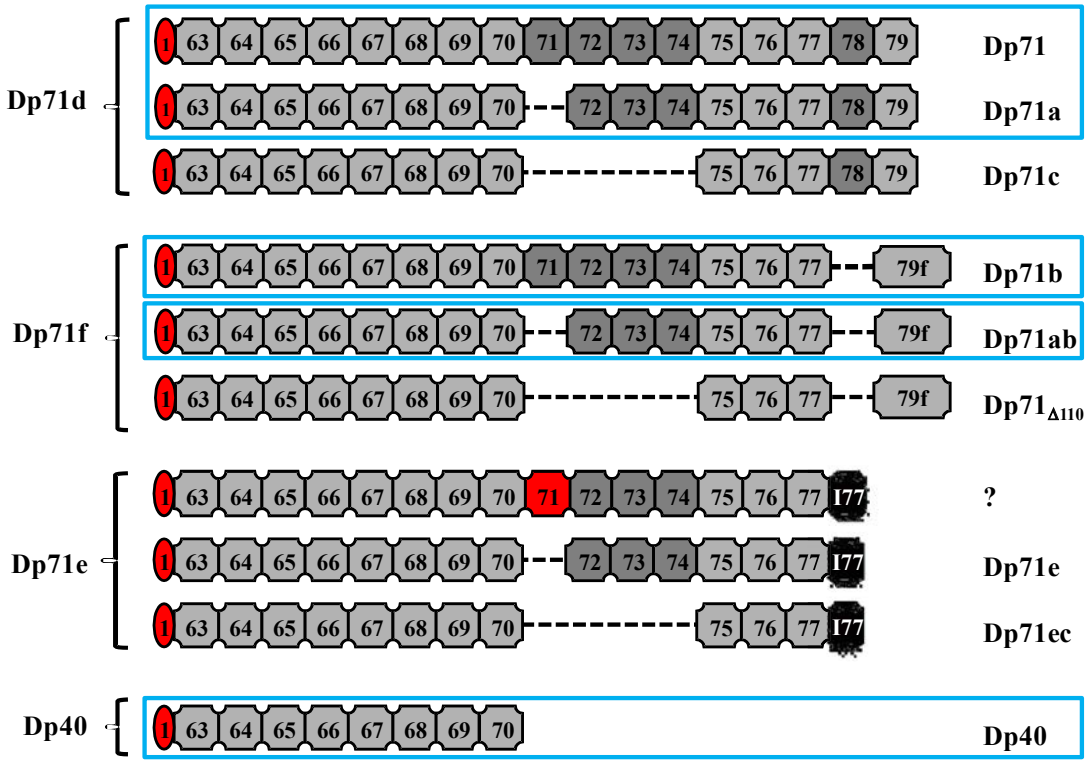


Figure 1 : Représentation des différentes isoformes de la Dp71 présentes chez la souris C57BL6J et clonées dans le plasmide scCAGeGFP pour la production d'AAV recombinants (rectangles bleus).

Isoformes de la Dp71 identifiées chez la souris C57BL6J

Mus musculus strain C57BL/6J dystrophin Dp71a (DMD) gene, complete cds.
Romo-Yañez J, Aragón J, Vacca O, González-Reyes M, Rendón A and Montañez C.
GenBank accession number KJ480729

Mus musculus strain C57BL/6J dystrophin Dp71ab (DMD) gene, complete cds.
Romo-Yañez J, Aragón J, Vacca O, González-Reyes M, Rendón A and Montañez C.
GenBank accession number KJ480731

Mus musculus strain C57BL/6J dystrophin Dp71b (DMD) gene, complete cds.
Aragón J, Romo-Yañez J, Vacca O, González-Reyes M, Rendón A and Montañez C.
GenBank accession number KJ480730

Mus musculus strain C57BL/6J dystrophin Dp40 (DMD) gene, complete cds.
Aragón J, Romo-Yañez J, Vacca O, Rendón A and Montañez C.
GenBank accession number KJ480728

Figure 2 : Séquences des isoformes de la Dp71 identifiées chez la souris C57BL6J et soumises à GenBank pour publication grâce au soutien du programme ECOS-Nord.

TABLE DES ILLUSTRATIONS

IX. Table des Illustrations

1) Introduction

Figure 1 : L'Œil et la Rétine. (Haut) Partie visible de l'œil, (Milieu) Coupe sagittale horizontale de l'œil humain adulte, (Bas) Organisation stratifiée de la rétine. 19

Figure 2 : Organisation centre/périphérie de la rétine humaine. Le nerf optique (optic disk) n'est pas l'axe visuel mais c'est la fovéa. Le centre de la fovéa (fovéola) est une zone avasculaire alors que le reste de la rétine est très vascularisé. En outre, la fovéola est constituée exclusivement de photorécepteurs de type cônes. Plus on se déplace du centre de la rétine vers sa périphérie plus la balance cônes/bâtonnets s'inverse. 22

Figure 3 : Représentation de l'intégration de la cellule gliale de Müller autour des neurones de la rétine. Illustration des cellules gliales de Müller traversant toute la rétine, où elles entourent tous les types de neurones de la rétine depuis les cellules ganglionnaires (en bas) jusqu'aux photorécepteurs (en haut). Image modifiée à partir de l'histologie de l'œil humain, atlas et manuels scolaires. Hogan, Michael J., Jorge A. Alvarado, Joan Esperson Weddell. Philadelphia: W. B. Saunders, 1971. 25

Figure 4 : La Barrière Hémato-Rétinienne interne. Elle se compose des jonctions serrées (tight junctions) entre les cellules endothéliales des vaisseaux rétiniens, des péricytes et des pieds des cellules gliales de Müller autour de ces vaisseaux (Hosoya and Tachikawa 2012). 32

Figure 5 : Organisation du gène DMD. Localisation des promoteurs tissus spécifiques de la Dp427 et des promoteurs internes responsable de l'expression des produits courts du gène DMD (b: brain; m: muscle; p: cellule de Purkinje). 35

Figure 6 : Produits du gène DMD. Schématisation de la structure de la dystrophine et des 5 produits courts issus du gène DMD. 35

Figure 7 : Description des isoformes de la dystrophin 71. L'extrémité N-terminale (ellipse rouge) possède un motif de liaison à l'actine composé de six acides aminés uniques. La région riche en cystéines présente un domaine de liaison au β-dystroglycane et l'extrémité C-

terminale possède des sites de liaison à la syntrophine et à la dystrobrévine. Les isoformes de la Dp71 sont appelées Dp71 (avec les exons 71 et 78), Dp71a (sans l'exon 71, avec l'exon 78), Dp71c (sans les exons 71-74, avec l'exon 78), Dp71b (sans l'exon 78, avec l'exon 79f), Dp71ab (sans les exons 71 et 78, avec l'exon 79f), $Dp71_{\Delta 110}$ (sans les exons 71-74 et 78, avec l'exon 79f), Dp71e (sans les exons 71, 78 et 79, avec l'intron 77), Dp71ec (sans les exons 71-74, 78 et 79, avec l'intron 77) et Dp40 (sans les exons 70-79, avec l'intron 70). Une nouvelle isoforme de la Dp71e, n'ayant pas encore été nommée, a été identifiée dans la rétine de souris sauvage (avec l'exon 71, sans les exons 78 et 79, avec l'intron 77). 39

Figure 8 : Représentation des différentes régions carboxy-terminales de la Dp71. Séquences en acides aminés de la région C-terminale de chaque sous-population de Dp71 (Dp71d, Dp71f et Dp71e). 40

Figure 9 : L'expression de la Dp71 est induite au cours de la différenciation neuronale. L'expression basale de la Dp71 dans les neuroblastes est maintenue par l'action combinée des facteurs de transcription Sp1 et AP2, en agissant sur le promoteur de la Dp71 comme activateur et répresseur, respectivement. L'induction de l'activité du promoteur de la Dp71 au cours de la différenciation neuronale est le résultat de la régulation positive exercée par Sp1 ainsi que de la perte de la liaison de AP2α au motif AP2, libérant le promoteur de la répression (Tadayoni et al. 2012). 43

Figure 10 : Localisation des différents produits du gène DMD, et de l'utrophine dans la rétine neurale murine. EPR : épithélium pigmentaire rétinien; SP : segments des photorécepteurs; MLE : membrane limitante externe ; CNE : couche nucléaire externe; CPL : couche plexiforme externe ; CNI : couche nucléaire interne ; CPI : couche plexiforme interne ; CCG : couche des cellules ganglionnaires; MLI : membrane limitante interne. 47

Figure 11 : Expression de la Dp71 autour des vaisseaux, au niveau de la membrane limitante externe et interne. Marquage immunohistochimique des dystrophines avec l'anticorps pan-spécifique H4 (vert) et des noyaux (DAPI, bleu) sur des coupes de rétines de souris sauvages et Dp71-null (Sene et al. 2009). 47

Figure 12 : Expression de la Dp71 dans les cellules gliales de Müller, dans les péricytes et dans les astrocytes. A : Localisation de la Dp71 (H4, rouge) dans des CGM isolées (glutamine

synthétase, vert) (Fort et al. 2008) ; B : Images confocales d'une rétine à plat de souris sauvage après immunomarquage lectine *Griffonia simplicifolia* (rouge), H4 (vert) et DAPI (bleu) (Tadayoni 2009); C : Immunomarquage DAPI (bleu), GFAP (vert) et H4 (rouge) sur des cellules de rétines obtenues de souris sauvages et Dp71-null (Tadayoni 2009). 50

Figure 13 : Expression des protéines issues du gène DMD chez la rétine murine et humaine. (À droite) Proportion des différentes dystrophines mesurées dans des échantillons de rétine de souris (vers le haut) et de rétines humaines (vers le bas). Les valeurs ont été normalisées par rapport à l'actine avant d'être moyennées. (À gauche) Western Blot correspondant aux diagrammes (Tadayoni 2009)..... 51

Figure 14 : Modèle hypothétique des complexes Dp71- et Utrophin-DAPs se liant à Kir4.1 et à AQP4. Il est connu que la Dp71 et l'Utrophine peuvent être toutes les deux associées au β-DG (β-dystroglycane) et à l'α-Syn (α-syntrophine). Le sous-complexe Dp71-DAPs est localisé dans la membrane plasmique enrichie en GM1-cholestérol où l'α-Syn se lie à Kir4.1b et à AQP4. Dans le sous-complexe Utrophin-DAPs, l'α-Syn est associée uniquement à Kir4.1a. L'α-DB (α-dystrobrévine) pourrait fonctionner comme une clé de voûte de l'échafaudage moléculaire pour permettre l'association physique des deux sous-complexes. La position de l'ε-SG (ε-sarcoglycane) et de l'α-DB dans ce complexe macromoléculaire devra être confirmée (Fort et al. 2008). 54

Figure 15 : Vascularisation postnatale de la rétine (P6) chez la souris Dp71-null comparée à la souche sauvage (WT). Pourcentage de surface rétinienne recouverte par le réseau vasculaire de la rétine interne au cours du développement chez la souris WT (rouge) et Dp71-null (bleu). Les barres sont des écart-types (Standard Deviation). Les étoiles indiquent les différences significatives. La vascularisation rétinienne est significativement retardée chez la souris Dp71-null par rapport à la souris sauvage de P3 à P9. A P12, toutes les rétines sont complètement recouvertes par la première couche de vaisseaux (Tadayoni 2009). 57

Figure 16 : Effet anti-angiogénique de l'absence de Dp71. (En haut, à gauche) Description du protocole d'induction de la rétinopathie du prématuré. (En bas, à gauche) Quantification de la surface avasculaire centrale de P9 à P17 chez la souris WT par rapport à la souris Dp71-null. (En haut, à droite) Visualisation de la zone d'occlusion vasculaire centrale et des touffes

néovasculaires (flèches) à P17 chez les souris WT et Dp71-null sur des rétines à plat. (En bas, à droite) Quantification de la surface néovascularisée à P17 : la souris Dp71-null présente une néo-angiogenèse inférieure à celle de la souris WT (Tadayoni 2009)..... 58

Figure 17 : Propriétés de gonflement osmotique des cellules gliales de Müller et Perméabilité de la barrière hémato-rétinienne. (A gauche) Les cellules de Müller « contrôle » et issues d'un décollement de rétine de souris WT et Dp71-null ont été exposées à un défi hypotonique. Chez les souris WT, seules les cellules de décollement de la rétine gonflent alors que les cellules de Müller « contrôle » de rétine de souris Dp71-null gonflement en conditions normales. (A droite) La perméabilité de la barrière hémato-rétinienne a été mesurée sur des souris adultes WT et Dp71-null à l'aide de la méthode du bleu Evans qui est un test de perméabilité vasculaire. La perméabilité vasculaire est fortement augmentée chez les souris Dp71-null par rapport aux souris C57BL/6 (Sene et al. 2009)..... 61

Figure 18 : Les virus adéno-associés et les AAV recombinants. Les AAV sont de petite taille, de 20 à 25 nm de diamètre, les virus non enveloppés avec un génome d'ADN monocaténaire de ~ 4,7 kilobases codant pour deux ensembles de gènes, les gènes *rep* nécessaires pour la réplication et l'assemblage des virions et les gènes *cap* qui codent pour les trois protéines, VP1, VP2, VP3 et qui forment la capside virale icosaédrique de 60 sous-unités avec une stœchiométrie de 1:1:10, respectivement. Les gènes *rep* et *cap* sont flanqués de deux séquences inversées répétées (ITR) qui sont nécessaires pour l'encapsidation du génome dans la capside virale (Zhou and Muzyczka 1998), les ITR sont les seules séquences virales conservées dans les AAV recombinants, qui sont par ailleurs dépourvues de toute séquence virale codante (Masat et al. 2013). 63

Figure 19 : Voies d'injection intraoculaire en thérapie génique via les AAV. (À gauche) L'injection sous-rétinienne consiste à traverser la sclère, le vitré puis la rétine et à injecter entre l'épithélium pigmentaire et la rétine ce qui crée un décollement de la rétine. (À droite) L'injection intravitréenne, beaucoup moins traumatique que l'injection sous-rétinienne (à gauche), consiste à injecter directement dans le vitré en traversant la sclère au niveau de l'ora serrata. 71

Figure 20 : Représentation schématique de la structure moléculaire de la membrane basale. Le réseau de laminine est ancré à la surface cellulaire par des interactions entre ses bras longs à des récepteurs cellulaires (intégrines, glycolipides sulfatés / sulfatides et α-dystroglycane). Les interactions collatérales sont faites avec des HSPG tels que l'agrine et le perlécane. Un réseau indépendant est formé par le collagène de type IV, par des interactions entre ses domaines N-terminaux (7S) et ses domaines C-terminaux (NC1), ainsi que par des associations latérales des triples hélices. Les réseaux de laminine et de collagène sont liés par le nidogène et par les héparane sulfates (doubles flèches noires) (Hohenester and Yurchenco 2013)..... 72

Figure 21 : Effets de la digestion à la Pronase E sur la membrane limitante interne. La rétine non traitée (a) marquées avec un anticorps anti-laminine présente une immunoréactivité au niveau de la MLI et de la choroïde alors que la rétine traitée à la Pronase E (b) présente une MLI désintégrée. RPE, épithélium pigmentaire rétinien ; ONL, couche nucléaire externe ; ILM, membrane limitante interne. (c) Trois mois après traitement à la Pronase E et injection intravitréenne d'AAV5, la rétine présente une expression intense du transgène GFP dans toutes les couches de la rétine (Dalkara et al. 2009). 73

Figure 22 : Comparaison de l'AAV6 recombinant avec la mutation N451D et du ShH10. (A) Représentation de la sous-unité VP3 de la capside de l'AAV6 : en bleu, la mutation N451D, en vert la mutation D532N et en violet le domaine de liaison aux HSPG (acide aminé K531). (B) Profil de transduction de l'AAV6 modifié en N451D. (C) Profil de transduction du ShH10 (Klimczak et al. 2009). 76

2) Article 1 : AAV Mediated Gene Delivery In Dp71-Null Mouse Model With Compromised Barriers

Figure 1: ShH10 transduces Müller cells around retinal vasculature in the wild-type retina. 4-weeks after ShH10-GFP injection: (A) Fundus image of an adult mouse showing GFP expression around retinal blood vessels, (B) flatmounted retina of the left eye intravitreally injected with ShH10 showing the same GFP expression pattern (scale bar: 500 µm), and (C) confocal image of a retinal cryosection shows exclusive Müller cell transduction (scale bar: 20 µm). 103

Figure 2: Müller cells are transduced more widely and strongly in the Dp71-null retina. SLO images two weeks post ShH10-GFP injection in wild type (A) and Dp71-null (B) retinas *in vivo*. *Ex vivo* imaging of flatmounted retinas (scale bar: 500 µm) of wild-type (C) and Dp71-null (D) mouse retinas one month after ShH10-GFP (4.10^{11}vp) injection. Confocal stacks in C and D were used to quantify GFP expression levels around the Müller cell nuclei (scale bar: 20 µm) (G) shows the GFP fluorescent area (p=0.0011, Mann Whitney U test) and (H) shows the GFP intensity (p=0.0002, Mann Whitney U test) in wild-type and Dp71-null mice (n=16). Higher magnification confocal images of ShH10 treated retinal flatmounts using lectin from *Bandeiraea simplicifolia* (red), anti-GFAP (grey) and DAPI (bleu) (I) wild-type retina and (J) Dp71-null retina. Labeling of the Müller cells (green) shows endfeet more spread out in absence of Dp71 than those of wild-type mice (see arrows) (scale bar: 20 µm). 103

Figure 3: Comparative analysis of the ILM thickness in Dp71-null and wild-type retinas. Cryosection of a wild-type (A) and a Dp71-null (B, scale bar: 25 µm) mice retina labeled with DAPI (blue) to visualize the nuclei, anti-glutamine synthetase antibody (green) for the Müller cells and pan-laminin antibody to show the inner limiting membrane (scale bar: 25 µm). (C-D) Labeling in images A and B with a pan-laminin antibody (grey), prior to merging the colors of different channels. Flatmount images of a wild-type (E) and a Dp71-null (F) retina, after laminin labeling (scale bar: 50 µm). (G) Hypothetical model of Dp71- and Utrophin- DAPs complexes binding laminins in the ILM showing the close link between Dp71, dystroglycans and laminins and illustrating how the absence Dp71 can affect laminins and significantly alters organization of the ILM. 103

Figure 4: Efficient photoreceptor transduction with AAV5-GFP in Dp71-null mouse retina. (A) Flatmount of a wild-type retina imaged at 28 days after intravitreal injection of AAV5. (B) Flatmount of a Dp71-null mouse retina showing strong fluorescence on the photoreceptor side 4 weeks after intravitreal injection of AAV5 (scale bars: 500 µm). (C) Higher magnification image of the area indicated by the white rectangle in panel B (scale bar: 30 µm). Agarose sections of the Dp71-null mice retina transduced by the AAV5-GFP showing the rods labeled by rho4d2 (D), the photoreceptors expressing GFP (E) and the merged of D and E to colocalize the GFP expression and the rods (F) (scale bars: 20 µm)..... 104

Figure 5: Schematic representation of a Dp71-null mouse retina after intravitreal injection of AAV. The arrow 1 represents the enhanced transduction of Müller cells by ShH10 in the Dp71-null mouse. The arrow 2 shows the efficient transduction of photoreceptors by AAV5 because of the altered ILM of the Dp71-null mouse. The arrow 3 highlights that the BRB breakdown of the Dp71-null mouse retina does not allow the passage of viruses into the bloodstream. 104

3) Article 1 Supplemental Figures

Figure S1: Transduction profile of ShH10-GFP in Dp71-null retina. Confocal imaging of 100-µm agarose sections from Dp71-null mouse retinas. Müller cells are labeled with an anti-glutamine synthetase antibody (red) and DAPI (blue) in A, GFP expression (green) with DAPI staining in B and the merge of A and B revealing exclusive Müller cell transduction by ShH10-GFP virus in C (scale bar: 20 µm). 105

Figure S2: OCT measurements with Fiji Software at 500 µm from the optic nerve. (A) The thickness of the whole retina (from RPE to GCL), the photoreceptors (OS and IS), the ONL and the inner retina (INL, IPL, GCL) has been measured at the black arrows indicated on this OCT image. OCT images of wild-type (B, left) and Dp71-null (B, right) retinas. (C) The thickness of the whole retina (from RPE to GCL), the photoreceptors (OS and IS), the ONL and the inner retina (INL, IPL, GCL) has been quantified at 500 µm from the optic nerve using Fiji software and the results were analyzed using Mann Whitney U test. 105

Figure S3: Photoreceptor transduction with AAV5-GFP in Dp71-null mouse retina. Agarose sections of the Dp71-null mice retina transduced by the AAV5-GFP showing the cones labeled by PNA lectin (A), the photoreceptors widely expressing GFP (B) and the merged of A and B to colocalize the GFP expression and the cones (C) (scale bars: 20 µm). 105

Figure S4: PCR amplification of GFP transgene in the circulation after intravitreal administration of ShH10. PCR of the blood obtained from mice intravitreally injected with ShH10-GFP at different times after injection. Lane 5-12, even numbers for wild-type mice and odd numbers for Dp71-null mice; lane 2, 1ng of pTR-SB-smCBA-hGFP; lane 3, water; lanes 5-6, blood DNA before injection; lanes 7-8, 24h after IVT; lanes 9-10, 48h after IVT;

lanes 11-12, 72h after IVT. Lanes 1 and 4, Invitrogen scale ladder (100 bp): 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 1000, 1500, 2000, 3000 bp. 105

4) Article 2 : AAV-Mediated Gene Therapy In Dystrophin-Dp71 Deficient Mouse Leads To Blood-Retinal Barrier Restoration And Edema Reabsorption

Figure 1: Retinal integrity and transduction efficiency. Fundus images of the Dp71-null retina two months after intravitreal injection of ShH10-GFP (A, C) or ShH10-GFP-2A-Dp71 (B, D) showed that both AAVs strongly transduced the whole retina (C, D). Confocal imaging of an entire cryoslice showing the GFP expression (E) and immunostaining of a close-up image (white rectangle) with glutamine synthetase (red) to visualize the colocalization. 142

Figure 2: Dp71 mRNA over-expression leads to over-expression of mRNAs associated to Dp71. Quantitative RT-PCR showed an over-expression of Dp71, dystroglycans, AQP4, Kir4.1 and laminins mRNAs in the treated Dp71-null mouse in comparison with the wild-type. Quantitative RT-PCR showed that the utrophin mRNA is up-regulated while GFAP didn't show any variation. Bars represent means + SEM for triplicate data points; n = 7. *p<0.05, **p<0.01 significant differences versus wild-type; °°p<0.01 significant differences versus wild-type; †p<0.05, ††p<0.01 significant differences versus Dp71-null (Mann Whitney U test). 142

Figure 3: Dp71 and β-dystroglycan over-expression two months after intravitreal injection of ShH10-GFP-Dp71 in the Dp71-null mouse retina. Western blot and subsequent band density semi-quantification relative to β-actin of Dp71 (A, C) using H4 antibody and of β-dystroglycan (B, D). 142

Figure 4: Relocalization of Dp71 and Dp71 related proteins in the Müller glial cells. Isolated Müller glial cells, expressing GFP and stained with H4 showing Dp71 expression mainly located in the Müller glial cell endfeet (white arrows). Same observations were made for β-dystroglycan, potassium channel Kir4.1 and for water channel AQP4 (n=4). 142

Figure 5: Reabsorption of induced retinal edema in Dp71-null mice. Image A showed measurements performed on OCT images to evaluate the thickness of different retinal

layers. Graphs B and C showed the thickness of the whole retina (B) and of the inner retina (C) in wild-type and Dp71-null mice intravitreally injected with PBS or ShH10-hGFP-2A-Dp71. Two months after PBS intravitreal injection, we observed a significant increase in the retinal thickness of Dp71-null mice but no modification in the wild-type retina. Dp71 restoration completely resorbed the retinal edema caused by the needle intrusion. Bars represent means + SEM for triplicate data points; n = 9. *p<0.05, ****p<0.0001 significant differences versus wild-type; °p<0.05, °°p<0.01 significant differences versus wild-type; †p<0.05, ††p<0.01 significant differences versus Dp71-null (Mann Whitney U test). 143

Figure 6: Restoration of the BRB permeability in the Dp71-null mouse. BRB permeability was measured using Evans blue dye vascular permeability assay on WT and Dp71-null adult mice intravitreally injected with PBS or ShH10-Dp71. Vascular permeability was strongly increased in Dp71-null mice compared to WT. However, Dp71-null mice with ShH10-Dp71 present a normal BRB permeability compared to WT. Bars represent means + SEM for triplicate data points; n = 10. *p<0.05 significant differences versus wild-type; †††p<0.001 significant differences versus Dp71-null (Mann Whitney U test). 143

Figure 7: Hypothetical model of Dp71- and Utrophin-DAPs complexes, linked to Kir4.1 and/or AQP4 channels, binding laminin and agrin of the basement membrane, located in the Müller glial cell endfeet at the ILM. This schematic drawing shows the close link of Dp71 or Utrophin, with α/β-dystroglycan, Kir4.1, AQP4, laminin and agrin. It illustrates how the absence or the recovery of Dp71 could modify the molecular expression and organization of all these components of the Müller glial cell endfeet membrane and of the ILM. Dp71-dependant complex is located in “lipid raft” membrane domains (dark grey) whereas Utrophin-dependant complex is located in “non-raft” membrane domains (light grey)..... 143

5) Article 2 Supplemental Figures

Figure S1: Measurements of retinal thickness on OCT images. Graphs A and B showed the thickness of the photoreceptor segments (A) and of the outer nuclear layer (B) in wild-type and Dp71-null mice intravitreally injected with PBS or ShH10-hGFP-2A-Dp71. Bars represent means + SEM for triplicate data points; n = 9. ****p<0.0001 significant differences versus wild-type (Mann Whitney U test). 144

6) Annexes

Figure 1 : Représentation des différentes isoformes de la Dp71 présentes chez la souris C57BL6J et clonées dans le plasmide scCAGeGFP pour la production d'AAV recombinants (rectangles bleus). 186

Figure 2 : Séquences des isoformes de la Dp71 identifiées chez la souris C57BL6J et soumises à GenBank pour publication grâce au soutien du programme ECOS-Nord. 186

BIBLIOGRAPHIE

X. Bibliographie

Aartsen WM, van Cleef KW, Pellissier LP, Hoek RM, Vos RM, Blits B, Ehlert EM, Balaggan KS, Ali RR, Verhaagen J and others. 2010. GFAP-driven GFP expression in activated mouse Muller glial cells aligning retinal blood vessels following intravitreal injection of AAV2/6 vectors. PLoS One 5(8):e12387.

Abdelkader E, Lois N. 2008. Internal limiting membrane peeling in vitreo-retinal surgery. Surv Ophthalmol 53(4):368-96.

Ahn AH, Kunkel LM. 1993. The structural and functional diversity of dystrophin. Nat Genet 3(4):283-91.

Aleman V, Osorio B, Chavez O, Rendon A, Mornet D, Martinez D. 2001. Subcellular localization of Dp71 dystrophin isoforms in cultured hippocampal neurons and forebrain astrocytes. Histochem Cell Biol 115(3):243-54.

Ashton N. 1965. Bowman lecture. The blood-retinal barrier and vaso-glial relationships in retinal disease. Trans Ophthalmol Soc U K 85:199-230.

Auricchio A. 2003. Pseudotyped AAV vectors for constitutive and regulated gene expression in the eye. Vision Res 43(8):913-8.

Auricchio A, Kobinger G, Anand V, Hildinger M, O'Connor E, Maguire AM, Wilson JM, Bennett J. 2001. Exchange of surface proteins impacts on viral vector cellular specificity and transduction characteristics: the retina as a model. Hum Mol Genet 10(26):3075-81.

Aurnhammer C, Haase M, Muether N, Hausl M, Rauschhuber C, Huber I, Nitschko H, Busch U, Sing A, Ehrhardt A and others. 2012. Universal real-time PCR for the detection and quantification of adeno-associated virus serotype 2-derived inverted terminal repeat sequences. Hum Gene Ther Methods 23(1):18-28.

Austin RC, Fox JE, Werstuck GH, Stafford AR, Bulman DE, Dally GY, Ackerley CA, Weitz JI, Ray PN. 2002. Identification of Dp71 isoforms in the platelet membrane cytoskeleton. Potential role in thrombin-mediated platelet adhesion. J Biol Chem 277(49):47106-13.

Austin RC, Howard PL, D'Souza VN, Klamut HJ, Ray PN. 1995. Cloning and characterization of alternatively spliced isoforms of Dp71. Hum Mol Genet 4(9):1475-83.

Bainbridge JW, Smith AJ, Barker SS, Robbie S, Henderson R, Balaggan K, Viswanathan A, Holder GE, Stockman A, Tyler N and others. 2008. Effect of gene therapy on visual function in Leber's congenital amaurosis. N Engl J Med 358(21):2231-9.

Bainbridge JW, Tan MH, Ali RR. 2006. Gene therapy progress and prospects: the eye. Gene Ther 13(16):1191-7.

Bar S, Barnea E, Levy Z, Neuman S, Yaffe D, Nudel U. 1990. A novel product of the Duchenne muscular dystrophy gene which greatly differs from the known isoforms in its structure and tissue distribution. Biochem J 272(2):557-60.

Barnea E, Zuk D, Simantov R, Nudel U, Yaffe D. 1990. Specificity of expression of the muscle and brain dystrophin gene promoters in muscle and brain cells. Neuron 5(6):881-8.

Behzadian MA, Wang XL, Windsor LJ, Ghaly N, Caldwell RB. 2001. TGF-beta increases retinal endothelial cell permeability by increasing MMP-9: possible role of glial cells in endothelial barrier function. Invest Ophthalmol Vis Sci 42(3):853-9.

Benabdesselam R, Sene A, Raison D, Benmessaoud-Mesbah O, Ayad G, Mornet D, Yaffe D, Rendon A, Hardin-Pouzet H, Dorbani-Mamine L. 2010. A deficit of brain dystrophin 71 impairs hypothalamic osmostat. J Neurosci Res 88(2):324-34.

Bhatia B, Jayaram H, Singhal S, Jones MF, Limb GA. 2011. Differences between the neurogenic and proliferative abilities of Muller glia with stem cell characteristics and the ciliary epithelium from the adult human eye. Exp Eye Res 93(6):852-61.

Bies RD, Phelps SF, Cortez MD, Roberts R, Caskey CT, Chamberlain JS. 1992. Human and murine dystrophin mRNA transcripts are differentially expressed during skeletal muscle, heart, and brain development. Nucleic Acids Res 20(7):1725-31.

Blake DJ, Hawkes R, Benson MA, Beesley PW. 1999. Different dystrophin-like complexes are expressed in neurons and glia. J Cell Biol 147(3):645-58.

Blake DJ, Love DR, Tinsley J, Morris GE, Turley H, Gatter K, Dickson G, Edwards YH, Davies KE. 1992. Characterization of a 4.8kb transcript from the Duchenne muscular dystrophy locus expressed in Schwannoma cells. Hum Mol Genet 1(2):103-9.

Blake DJ, Martin-Rendon E. 2002. Intermediate filaments and the function of the dystrophin-protein complex. Trends Cardiovasc Med 12(5):224-8.

Blake DJ, Tinsley JM, Davies KE, Knight AE, Winder SJ, Kendrick-Jones J. 1995. Coiled-coil regions in the carboxy-terminal domains of dystrophin and related proteins: potentials for protein-protein interactions. Trends Biochem Sci 20(4):133-5.

Blank M, Koulen P, Blake DJ, Kroger S. 1999. Dystrophin and beta-dystroglycan in photoreceptor terminals from normal and mdx3Cv mouse retinae. Eur J Neurosci 11(6):2121-33.

Bordais A, Bolanos-Jimenez F, Fort P, Varela C, Sahel JA, Picaud S, Rendon A. 2005. Molecular cloning and protein expression of Duchenne muscular dystrophy gene products in porcine retina. Neuromuscul Disord 15(7):476-87.

Boyce FM, Beggs AH, Feener C, Kunkel LM. 1991. Dystrophin is transcribed in brain from a distant upstream promoter. Proc Natl Acad Sci U S A 88(4):1276-80.

Bringmann A, Reichenbach A, Wiedemann P. 2004. Pathomechanisms of cystoid macular edema. Ophthalmic Res 36(5):241-9.

Brown SC, Fassati A, Popplewell L, Page AM, Henry MD, Campbell KP, Dickson G. 1999. Dystrophic phenotype induced in vitro by antibody blockade of muscle alpha-dystroglycan-laminin interaction. J Cell Sci 112 (Pt 2):209-16.

Bunt-Milam AH, Saari JC. 1983. Immunocytochemical localization of two retinoid-binding proteins in vertebrate retina. J Cell Biol 97(3):703-12.

Byers TJ, Lidov HG, Kunkel LM. 1993. An alternative dystrophin transcript specific to peripheral nerve. Nat Genet 4(1):77-81.

Byrne LC, Khalid F, Lee T, Zin EA, Greenberg KP, Visel M, Schaffer DV, Flannery JG. 2013. AAV-mediated, optogenetic ablation of Muller Glia leads to structural and functional changes in the mouse retina. PLoS One 8(9):e76075.

Candiello J, Balasubramani M, Schreiber EM, Cole GJ, Mayer U, Halfter W, Lin H. 2007. Biomechanical properties of native basement membranes. FEBS J 274(11):2897-908.

Caspi RR. 2010. A look at autoimmunity and inflammation in the eye. J Clin Invest 120(9):3073-83.

Caspi RR, Roberge FG. 1989. Glial cells as suppressor cells: characterization of the inhibitory function. J Autoimmun 2(5):709-22.

Ceccarini M, Rizzo G, Rosa G, Chelucci C, Macioce P, Petrucci TC. 1997. A splice variant of Dp71 lacking the syntrophin binding site is expressed in early stages of human neural development. Brain Res Dev Brain Res 103(1):77-82.

Cehajic-Kapetanovic J, Le Goff MM, Allen A, Lucas RJ, Bishop PN. 2011. Glycosidic enzymes enhance retinal transduction following intravitreal delivery of AAV2. Mol Vis 17:1771-83.

Charbel Issa P, Gillies MC, Chew EY, Bird AC, Heeren TF, Peto T, Holz FG, Scholl HP. 2012. Macular telangiectasia type 2. Prog Retin Eye Res.

Chen W, Mo W, Sun K, Huang X, Zhang YL, Song HY. 2009. Microplasmin degrades fibronectin and laminin at vitreoretinal interface and outer retina during enzymatic vitrectomy. Curr Eye Res 34(12):1057-64.

Choi VW, Asokan A, Haberman RA, Samulski RJ. 2007a. Production of recombinant adeno-associated viral vectors. Curr Protoc Hum Genet Chapter 12:Unit 12 9.

Choi VW, Asokan A, Haberman RA, Samulski RJ. 2007b. Production of recombinant adeno-associated viral vectors for in vitro and in vivo use. Curr Protoc Mol Biol Chapter 16:Unit 16 25.

Cia D. 2014. Slight alteration of the electroretinogram in mice lacking dystrophin Dp71, In press. Ophthalmic Research

Cibis GW, Fitzgerald KM, Harris DJ, Rothberg PG, Rupani M. 1993. The effects of dystrophin gene mutations on the ERG in mice and humans. Invest Ophthalmol Vis Sci 34(13):3646-52.

Cideciyan AV, Aleman TS, Boye SL, Schwartz SB, Kaushal S, Roman AJ, Pang JJ, Sumaroka A, Windsor EA, Wilson JM and others. 2008. Human gene therapy for RPE65 isomerase deficiency activates the retinoid cycle of vision but with slow rod kinetics. Proc Natl Acad Sci U S A 105(39):15112-7.

Cisneros B, Rendon A, Genty V, Aranda G, Marquez F, Mornet D, Montanez C. 1996. Expression of dystrophin Dp71 during PC12 cell differentiation. Neurosci Lett 213(2):107-10.

Claudepierre T, Dalloz C, Mornet D, Matsumura K, Sahel J, Rendon A. 2000a. Characterization of the intermolecular associations of the dystrophin-associated glycoprotein complex in retinal Muller glial cells. J Cell Sci 113 Pt 19:3409-17.

Claudepierre T, Mornet D, Pannicke T, Forster V, Dalloz C, Bolanos F, Sahel J, Reichenbach A, Rendon A. 2000b. Expression of Dp71 in Muller glial cells: a comparison with utrophin- and dystrophin-associated proteins. Invest Ophthalmol Vis Sci 41(1):294-304.

Claudepierre T, Rodius F, Frasson M, Fontaine V, Picaud S, Dreyfus H, Mornet D, Rendon A. 1999. Differential distribution of dystrophins in rat retina. Invest Ophthalmol Vis Sci 40(7):1520-9.

Connors NC, Kofuji P. 2002. Dystrophin Dp71 is critical for the clustered localization of potassium channels in retinal glial cells. J Neurosci 22(11):4321-7.

Cotton S, Voudouris NJ, Greenwood KM. 2001. Intelligence and Duchenne muscular dystrophy: full-scale, verbal, and performance intelligence quotients. Dev Med Child Neurol 43(7):497-501.

Cox GA, Phelps SF, Chapman VM, Chamberlain JS. 1993. New mdx mutation disrupts expression of muscle and nonmuscle isoforms of dystrophin. Nat Genet 4(1):87-93.

Cunha-Vaz JG, Travassos A. 1984. Breakdown of the blood-retinal barriers and cystoid macular edema. Surv Ophthalmol 28 Suppl:485-92.

Da T, Verkman AS. 2004. Aquaporin-4 gene disruption in mice protects against impaired retinal function and cell death after ischemia. Invest Ophthalmol Vis Sci 45(12):4477-83.

Dalkara D, Kolstad KD, Caporale N, Visel M, Klimczak RR, Schaffer DV, Flannery JG. 2009. Inner limiting membrane barriers to AAV-mediated retinal transduction from the vitreous. Mol Ther 17(12):2096-102.

Dalloz C, Claudepierre T, Rodius F, Mornet D, Sahel J, Rendon A. 2001. Differential distribution of the members of the dystrophin glycoprotein complex in mouse retina: effect of the mdx(3Cv) mutation. Mol Cell Neurosci 17(5):908-20.

Dalloz C, Sarig R, Fort P, Yaffe D, Bordais A, Pannicke T, Grosche J, Mornet D, Reichenbach A, Sahel J and others. 2003. Targeted inactivation of dystrophin gene product Dp71: phenotypic impact in mouse retina. Hum Mol Genet 12(13):1543-54.

Daoud F, Angeard N, Demerre B, Martie I, Benyaou R, Leturcq F, Cossee M, Deburgrave N, Saillour Y, Tuffery S and others. 2009a. Analysis of Dp71 contribution in the severity of mental retardation through comparison of Duchenne and Becker patients differing by mutation consequences on Dp71 expression. Hum Mol Genet 18(20):3779-94.

Daoud F, Candelario-Martinez A, Billard JM, Avital A, Khelfaoui M, Rozenvald Y, Guegan M, Mornet D, Jaillard D, Nudel U and others. 2009b. Role of mental retardation-associated dystrophin-gene product Dp71 in excitatory synapse organization, synaptic plasticity and behavioral functions. PLoS One 4(8):e6574.

Das SR, Bhardwaj N, Kjeldbye H, Gouras P. 1992. Muller cells of chicken retina synthesize 11-cis-retinol. Biochem J 285 (Pt 3):907-13.

Davidson BL, Stein CS, Heth JA, Martins I, Kotin RM, Derksen TA, Zabner J, Ghodsi A, Chiorini JA. 2000. Recombinant adeno-associated virus type 2, 4, and 5 vectors: transduction of variant cell types and regions in the mammalian central nervous system. Proc Natl Acad Sci U S A 97(7):3428-32.

De Becker I, Riddell DC, Dooley JM, Tremblay F. 1994. Correlation between electroretinogram findings and molecular analysis in the Duchenne muscular dystrophy phenotype. Br J Ophthalmol 78(9):719-22.

de Leeuw B, Su M, ter Horst M, Iwata S, Rodijk M, Hoeben RC, Messing A, Smitt PS, Brenner M. 2006. Increased glia-specific transgene expression with glial fibrillary acidic protein promoters containing multiple enhancer elements. J Neurosci Res 83(5):744-53.

de Leon MB, Montanez C, Gomez P, Morales-Lazaro SL, Tapia-Ramirez V, Valadez-Graham V, Recillas-Targa F, Yaffe D, Nudel U, Cisneros B. 2005. Dystrophin Dp71 expression is down-regulated during myogenesis: role of Sp1 and Sp3 on the Dp71 promoter activity. J Biol Chem 280(7):5290-9.

Distler C, Dreher Z. 1996. Glia cells of the monkey retina--II. Muller cells. Vision Res 36(16):2381-94.

Duan D, Sharma P, Yang J, Yue Y, Dudus L, Zhang Y, Fisher KJ, Engelhardt JF. 1998. Circular intermediates of recombinant adeno-associated virus have defined structural characteristics responsible for long-term episomal persistence in muscle tissue. J Virol 72(11):8568-77.

Dubois-Dauphin M, Poitry-Yamate C, de Bilbao F, Julliard AK, Jourdan F, Donati G. 2000. Early postnatal Muller cell death leads to retinal but not optic nerve degeneration in NSE-Hu-Bcl-2 transgenic mice. Neuroscience 95(1):9-21.

Duh EJ, Yang HS, Suzuma I, Miyagi M, Youngman E, Mori K, Katai M, Yan L, Suzuma K, West K and others. 2002. Pigment epithelium-derived factor suppresses ischemia-induced retinal neovascularization and VEGF-induced migration and growth. Invest Ophthalmol Vis Sci 43(3):821-9.

Durbeej M. 2010. Laminins. Cell Tissue Res 339(1):259-68.

Durbeej M, Jung D, Hjalt T, Campbell KP, Ekblom P. 1997. Transient expression of Dp140, a product of the Duchenne muscular dystrophy locus, during kidney tubulogenesis. Dev Biol 181(2):156-67.

Eichler W, Kuhrt H, Hoffmann S, Wiedemann P, Reichenbach A. 2000. VEGF release by retinal glia depends on both oxygen and glucose supply. Neuroreport 11(16):3533-7.

El-Mathari Brahim C-MH, Grepin Claudine, Roux Michel, Sahel José-Alain Tadayoni Ramin, Rendon Alvaro, poster presentation. 2014. Dystrophin-Dp71-null mouse presents retinal vascular inflammation. ARVO Annual Meeting.

Excoffon KJ, Koerber JT, Dickey DD, Murtha M, Keshavjee S, Kaspar BK, Zabner J, Schaffer DV. 2009. Directed evolution of adeno-associated virus to an infectious respiratory virus. Proc Natl Acad Sci U S A 106(10):3865-70.

Fagan XJ, Levy J, Al-Qureshi S, Harper CA. 2012. Proliferative retinopathy in Duchenne muscular dystrophy and its response to bevacizumab. Clin Experiment Ophthalmol 40(9):906-7.

Feener CA, Koenig M, Kunkel LM. 1989. Alternative splicing of human dystrophin mRNA generates isoforms at the carboxy terminus. Nature 338(6215):509-11.

Ferrari FK, Samulski T, Shenk T, Samulski RJ. 1996. Second-strand synthesis is a rate-limiting step for efficient transduction by recombinant adeno-associated virus vectors. J Virol 70(5):3227-34.

Fitzgerald KM, Cibis GW, Gettel AH, Rinaldi R, Harris DJ, White RA. 1999. ERG phenotype of a dystrophin mutation in heterozygous female carriers of Duchenne muscular dystrophy. J Med Genet 36(4):316-22.

Fitzsimons HL, Bland RJ, During MJ. 2002. Promoters and regulatory elements that improve adeno-associated virus transgene expression in the brain. Methods 28(2):227-36.

Fletcher EL, Jobling AI, Vessey KA, Luu C, Guymer RH, Baird PN. 2011. Animal models of retinal disease. Prog Mol Biol Transl Sci 100:211-86.

Flotte TR. 2004. Gene therapy progress and prospects: recombinant adeno-associated virus (rAAV) vectors. Gene Ther 11(10):805-10.

Fort PE, Sene A, Pannicke T, Roux MJ, Forster V, Mornet D, Nudel U, Yaffe D, Reichenbach A, Sahel JA and others. 2008. Kir4.1 and AQP4 associate with Dp71- and utrophin-DAPs complexes in specific and defined microdomains of Muller retinal glial cell membrane. Glia 56(6):597-610.

Francke M, Faude F, Pannicke T, Bringmann A, Eckstein P, Reichelt W, Wiedemann P, Reichenbach A. 2001. Electrophysiology of rabbit Muller (glial) cells in experimental retinal detachment and PVR. Invest Ophthalmol Vis Sci 42(5):1072-9.

Geller SF, Lewis GP, Fisher SK. 2001. FGFR1, signaling, and AP-1 expression after retinal detachment: reactive Muller and RPE cells. Invest Ophthalmol Vis Sci 42(6):1363-9.

Giebel SJ, Menicucci G, McGuire PG, Das A. 2005. Matrix metalloproteinases in early diabetic retinopathy and their role in alteration of the blood-retinal barrier. Lab Invest 85(5):597-607.

Ginn SL, Alexander IE, Edelstein ML, Abedi MR, Wixon J. 2013. Gene therapy clinical trials worldwide to 2012 - an update. J Gene Med 15(2):65-77.

Giocanti-Auregan A BR, Chaine G, El-Mathari B, Vacca O, Sahel JA, Rendon A, Tadayoni R. 2011. Interaction between Dystrophin Protein 71 (Dp71), Inner Blood Retinal Barrier and Dexamethasone, poster presentation #6061/A272. ARVO Annual Meeting

Girod A, Ried M, Wobus C, Lahm H, Leike K, Kleinschmidt J, Deleage G, Hallek M. 1999. Genetic capsid modifications allow efficient re-targeting of adeno-associated virus type 2. Nat Med 5(12):1438.

Gonzalez E, Montanez C, Ray PN, Howard PL, Garcia-Sierra F, Mornet D, Cisneros B. 2000. Alternative splicing regulates the nuclear or cytoplasmic localization of dystrophin Dp71. FEBS Lett 482(3):209-14.

Gorecki DC, Barnard EA. 1995. Specific expression of G-dystrophin (Dp71) in the brain. Neuroreport 6(6):893-6.

Gorecki DC, Monaco AP, Derry JM, Walker AP, Barnard EA, Barnard PJ. 1992. Expression of four alternative dystrophin transcripts in brain regions regulated by different promoters. Hum Mol Genet 1(7):505-10.

Grieger JC, Choi VW, Samulski RJ. 2006. Production and characterization of adeno-associated viral vectors. Nat Protoc 1(3):1412-28.

Grimm D, Lee JS, Wang L, Desai T, Akache B, Storm TA, Kay MA. 2008. In vitro and in vivo gene therapy vector evolution via multispecies interbreeding and retargeting of adeno-associated viruses. J Virol 82(12):5887-911.

Haenggi T, Soontornmalai A, Schaub MC, Fritschy JM. 2004. The role of utrophin and Dp71 for assembly of different dystrophin-associated protein complexes (DPCs) in the choroid plexus and microvasculature of the brain. Neuroscience 129(2):403-13.

Halfter W, Dong S, Dong A, Eller AW, Nischt R. 2008. Origin and turnover of ECM proteins from the inner limiting membrane and vitreous body. Eye (Lond) 22(10):1207-13.

Han Z, Guo J, Conley SM, Naash MI. 2013. Retinal angiogenesis in the Ins2(Akita) mouse model of diabetic retinopathy. Invest Ophthalmol Vis Sci 54(1):574-84.

Harada T, Harada C, Kohsaka S, Wada E, Yoshida K, Ohno S, Mamada H, Tanaka K, Parada LF, Wada K. 2002. Microglia-Muller glia cell interactions control neurotrophic factor production during light-induced retinal degeneration. J Neurosci 22(21):9228-36.

Harvey AR, Kamphuis W, Eggers R, Symons NA, Blits B, Niclou S, Boer GJ, Verhaagen J. 2002. Intravitreal injection of adeno-associated viral vectors results in the transduction of different types of retinal neurons in neonatal and adult rats: a comparison with lentiviral vectors. Mol Cell Neurosci 21(1):141-57.

Hauswirth WW, Aleman TS, Kaushal S, Cideciyan AV, Schwartz SB, Wang L, Conlon TJ, Boye SL, Flotte TR, Byrne BJ and others. 2008. Treatment of leber congenital amaurosis due to RPE65 mutations by ocular subretinal injection of adeno-associated virus gene vector: short-term results of a phase I trial. Hum Gene Ther 19(10):979-90.

Hawkins BT, Gu YH, Izawa Y, Del Zoppo GJ. 2013. Disruption of dystroglycan-laminin interactions modulates water uptake by astrocytes. Brain Res 1503:89-96.

Heegaard S, Jensen OA, Prause JU. 1986. Structure and composition of the inner limiting membrane of the retina. SEM on frozen resin-cracked and enzyme-digested retinas of Macaca mulatta. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 224(4):355-60.

Hellstrom M, Ruitenberg MJ, Pollett MA, Ehlert EM, Twisk J, Verhaagen J, Harvey AR. 2009. Cellular tropism and transduction properties of seven adeno-associated viral vector serotypes in adult retina after intravitreal injection. Gene Ther 16(4):521-32.

Higashi K, Fujita A, Inanobe A, Tanemoto M, Doi K, Kubo T, Kurachi Y. 2001. An inwardly rectifying K(+) channel, Kir4.1, expressed in astrocytes surrounds synapses and blood vessels in brain. Am J Physiol Cell Physiol 281(3):C922-31.

Hirrlinger PG, Pannicke T, Winkler U, Claudepierre T, Varshney S, Schulze C, Reichenbach A, Brunken WJ, Hirrlinger J. 2011. Genetic deletion of laminin isoforms beta2 and gamma3 induces a reduction in Kir4.1 and aquaporin-4 expression and function in the retina. PLoS One 6(1):e16106.

Hohenester E, Yurchenco PD. 2013. Laminins in basement membrane assembly. Cell Adh Migr 7(1):56-63.

Hopf C, Hoch W. 1996. Agrin binding to alpha-dystroglycan. Domains of agrin necessary to induce acetylcholine receptor clustering are overlapping but not identical to the alpha-dystroglycan-binding region. J Biol Chem 271(9):5231-6.

Hosoya K, Tachikawa M. 2012. The inner blood-retinal barrier: molecular structure and transport biology. Adv Exp Med Biol 763:85-104.

Howard PL, Dally GY, Wong MH, Ho A, Weleber RG, Pillers DA, Ray PN. 1998. Localization of dystrophin isoform Dp71 to the inner limiting membrane of the retina suggests a unique functional contribution of Dp71 in the retina. Hum Mol Genet 7(9):1385-91.

Hugnot JP, Gilgenkrantz H, Vincent N, Chafey P, Morris GE, Monaco AP, Berwald-Netter Y, Koulakoff A, Kaplan JC, Kahn A and others. 1992. Distal transcript of the dystrophin gene initiated from an alternative first exon and encoding a 75-kDa protein widely distributed in nonmuscle tissues. Proc Natl Acad Sci U S A 89(16):7506-10.

Imamura M, Ozawa E. 1998. Differential expression of dystrophin isoforms and utrophin during dibutyryl-cAMP-induced morphological differentiation of rat brain astrocytes. Proc Natl Acad Sci U S A 95(11):6139-44.

Ishii M, Horio Y, Tada Y, Hibino H, Inanobe A, Ito M, Yamada M, Gotow T, Uchiyama Y, Kurachi Y. 1997. Expression and clustered distribution of an inwardly rectifying potassium channel, KAB-2/Kir4.1, on mammalian retinal Muller cell membrane: their regulation by insulin and laminin signals. J Neurosci 17(20):7725-35.

Ivanova E, Hwang GS, Pan ZH, Troilo D. 2010. Evaluation of AAV-mediated expression of Chop2-GFP in the marmoset retina. Invest Ophthalmol Vis Sci 51(10):5288-96.

Jackson TL, Hillenkamp J, Williamson TH, Clarke KW, Almubarak AI, Marshall J. 2003. An experimental model of rhegmatogenous retinal detachment: surgical results and glial cell response. Invest Ophthalmol Vis Sci 44(9):4026-34.

Jacobson SG, Cideciyan AV, Ratnakaram R, Heon E, Schwartz SB, Roman AJ, Peden MC, Aleman TS, Boye SL, Sumaroka A and others. 2012. Gene therapy for leber congenital amaurosis caused by RPE65 mutations: safety and efficacy in 15 children and adults followed up to 3 years. Arch Ophthalmol 130(1):9-24.

Jin H, Tan S, Hermanowski J, Bohm S, Pacheco S, McCauley JM, Greener MJ, Hinits Y, Hughes SM, Sharpe PT and others. 2007. The dystrotelin, dystrophin and dystrobrevin superfamily: new paralogues and old isoforms. BMC Genomics 8:19.

Jung D, Filliol D, Metz-Boutigue MH, Rendon A. 1993. Characterization and subcellular localization of the dystrophin-protein 71 (Dp71) from brain. Neuromuscul Disord 3(5-6):515-8.

Karwoski CJ, Coles JA, Lu HK, Huang B. 1989. Current-evoked transcellular K+ flux in frog retina. J Neurophysiol 61(5):939-52.

Kaur C, Sivakumar V, Foulds WS. 2006. Early response of neurons and glial cells to hypoxia in the retina. Invest Ophthalmol Vis Sci 47(3):1126-41.

Kaur C, Sivakumar V, Lu J, Tang FR, Ling EA. 2008. Melatonin attenuates hypoxia-induced ultrastructural changes and increased vascular permeability in the developing hippocampus. Brain Pathol 18(4):533-47.

Klimczak RR, Koerber JT, Dalkara D, Flannery JG, Schaffer DV. 2009. A novel adeno-associated viral variant for efficient and selective intravitreal transduction of rat Muller cells. PLoS One 4(10):e7467.

Knipe DM HP, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B et al. 2006. Field's Virology.

Koenig M, Monaco AP, Kunkel LM. 1988. The complete sequence of dystrophin predicts a rod-shaped cytoskeletal protein. Cell 53(2):219-28.

Koerber JT, Jang JH, Schaffer DV. 2008. DNA shuffling of adeno-associated virus yields functionally diverse viral progeny. Mol Ther 16(10):1703-9.

Koerber JT, Klimczak R, Jang JH, Dalkara D, Flannery JG, Schaffer DV. 2009. Molecular evolution of adeno-associated virus for enhanced glial gene delivery. Mol Ther 17(12):2088-95.

Kofuji P, Biedermann B, Siddharthan V, Raap M, Iandiev I, Milenkovic I, Thomzig A, Veh RW, Bringmann A, Reichenbach A. 2002. Kir potassium channel subunit expression in retinal glial cells: implications for spatial potassium buffering. Glia 39(3):292-303.

Kofuji P, Ceelen P, Zahs KR, Surbeck LW, Lester HA, Newman EA. 2000. Genetic inactivation of an inwardly rectifying potassium channel (Kir4.1 subunit) in mice: phenotypic impact in retina. J Neurosci 20(15):5733-40.

Kolstad KD, Dalkara D, Guerin K, Visel M, Hoffmann N, Schaffer DV, Flannery JG. 2010. Changes in adeno-associated virus-mediated gene delivery in retinal degeneration. Hum Gene Ther 21(5):571-8.

Kotin RM, Siniscalco M, Samulski RJ, Zhu XD, Hunter L, Laughlin CA, McLaughlin S, Muzyczka N, Rocchi M, Berns KI. 1990. Site-specific integration by adeno-associated virus. Proc Natl Acad Sci U S A 87(6):2211-5.

Koulen P, Blank M, Kroger S. 1998. Differential distribution of beta-dystroglycan in rabbit and rat retina. J Neurosci Res 51(6):735-47.

Kramarcy NR, Vidal A, Froehner SC, Sealock R. 1994. Association of utrophin and multiple dystrophin short forms with the mammalian M(r) 58,000 dystrophin-associated protein (syntrophin). J Biol Chem 269(4):2870-6.

Kwon I, Schaffer DV. 2008. Designer gene delivery vectors: molecular engineering and evolution of adeno-associated viral vectors for enhanced gene transfer. Pharm Res 25(3):489-99.

Lederfein D, Levy Z, Augier N, Mornet D, Morris G, Fuchs O, Yaffe D, Nudel U. 1992. A 71-kilodalton protein is a major product of the Duchenne muscular dystrophy gene in brain and other nonmuscle tissues. Proc Natl Acad Sci U S A 89(12):5346-50.

Lederfein D, Yaffe D, Nudel U. 1993. A housekeeping type promoter, located in the 3' region of the Duchenne muscular dystrophy gene, controls the expression of Dp71, a major product of the gene. Hum Mol Genet 2(11):1883-8.

Lee DH, Lee SJ, Yoon Ie N. 2010. Clinical progress in impending central retinal vein occlusion. Korean J Ophthalmol 24(2):83-8.

Lee SH, Colosi P, Lee H, Ohn YH, Kim SW, Kwak HW, Park TK. 2014. Laser photocoagulation enhances adeno-associated viral vector transduction of mouse retina. Hum Gene Ther Methods 25(1):83-91.

Leibovitz S, Meshorer A, Fridman Y, Wieneke S, Jockusch H, Yaffe D, Nudel U. 2002. Exogenous Dp71 is a dominant negative competitor of dystrophin in skeletal muscle. Neuromuscul Disord 12(9):836-44.

Li J, Patil RV, Verkman AS. 2002. Mildly abnormal retinal function in transgenic mice without Muller cell aquaporin-4 water channels. Invest Ophthalmol Vis Sci 43(2):573-9.

Li L, Head V, Timpe LC. 2001. Identification of an inward rectifier potassium channel gene expressed in mouse cortical astrocytes. Glia 33(1):57-71.

Li W, Asokan A, Wu Z, Van Dyke T, DiPrimio N, Johnson JS, Govindaswamy L, Agbandje-McKenna M, Leichtle S, Redmond DE, Jr. and others. 2008. Engineering and selection

of shuffled AAV genomes: a new strategy for producing targeted biological nanoparticles. Mol Ther 16(7):1252-60.

Li W, Kong F, Li X, Dai X, Liu X, Zheng Q, Wu R, Zhou X, Lu F, Chang B and others. 2009. Gene therapy following subretinal AAV5 vector delivery is not affected by a previous intravitreal AAV5 vector administration in the partner eye. Mol Vis 15:267-75.

Liu G, Martins IH, Chiorini JA, Davidson BL. 2005. Adeno-associated virus type 4 (AAV4) targets ependyma and astrocytes in the subventricular zone and RMS. Gene Ther 12(20):1503-8.

Lumeng CN, Phelps SF, Rafael JA, Cox GA, Hutchinson TL, Begy CR, Adkins E, Wiltshire R, Chamberlain JS. 1999. Characterization of dystrophin and utrophin diversity in the mouse. Hum Mol Genet 8(4):593-9.

Lux K, Goerlitz N, Schlemminger S, Perabo L, Goldnau D, Endell J, Leike K, Kofler DM, Finke S, Hallek M and others. 2005. Green fluorescent protein-tagged adeno-associated virus particles allow the study of cytosolic and nuclear trafficking. J Virol 79(18):11776-87.

Maguire AM, High KA, Auricchio A, Wright JF, Pierce EA, Testa F, Mingozzi F, Bennicelli JL, Ying GS, Rossi S and others. 2009. Age-dependent effects of RPE65 gene therapy for Leber's congenital amaurosis: a phase 1 dose-escalation trial. Lancet 374(9701):1597-605.

Maguire AM, Simonelli F, Pierce EA, Pugh EN, Jr., Mingozzi F, Bennicelli J, Banfi S, Marshall KA, Testa F, Surace EM and others. 2008. Safety and efficacy of gene transfer for Leber's congenital amaurosis. N Engl J Med 358(21):2240-8.

Maheshri N, Koerber JT, Kaspar BK, Schaffer DV. 2006. Directed evolution of adeno-associated virus yields enhanced gene delivery vectors. Nat Biotechnol 24(2):198-204.

Mano T, Puro DG. 1990. Phagocytosis by human retinal glial cells in culture. Invest Ophthalmol Vis Sci 31(6):1047-55.

Mariotti C, Fancellu R, Caldarazzo S, Nanetti L, Di Bella D, Plumari M, Lauria G, Cappellini MD, Duca L, Solari A and others. 2012. Erythropoietin in Friedreich ataxia: no effect on frataxin in a randomized controlled trial. Mov Disord 27(3):446-9.

Marmor MF. 1999. Mechanisms of fluid accumulation in retinal edema. Doc Ophthalmol 97(3-4):239-49.

Marquez FG, Cisneros B, Garcia F, Ceja V, Velazquez F, Depardon F, Cervantes L, Rendon A, Mornet D, Rosas-vargas H and others. 2003. Differential expression and subcellular distribution of dystrophin Dp71 isoforms during differentiation process. Neuroscience 118(4):957-66.

Masat E, Pavani G, Mingozzi F. 2013. Humoral immunity to AAV vectors in gene therapy: challenges and potential solutions. Discov Med 15(85):379-89.

Mascarenhas JB, Ruegg MA, Winzen U, Halfter W, Engel J, Stetefeld J. 2003. Mapping of the laminin-binding site of the N-terminal agrin domain (NtA). EMBO J 22(3):529-36.

Matsui K, Hosoi N, Tachibana M. 1999. Active role of glutamate uptake in the synaptic transmission from retinal nonspiking neurons. J Neurosci 19(16):6755-66.

Miranda R, Nudel U, Laroche S, Vaillend C. 2011. Altered presynaptic ultrastructure in excitatory hippocampal synapses of mice lacking dystrophins Dp427 or Dp71. Neurobiol Dis 43(1):134-41.

Moizard MP, Billard C, Toutain A, Berret F, Marmin N, Moraine C. 1998. Are Dp71 and Dp140 brain dystrophin isoforms related to cognitive impairment in Duchenne muscular dystrophy? Am J Med Genet 80(1):32-41.

Moizard MP, Toutain A, Fournier D, Berret F, Raynaud M, Billard C, Andres C, Moraine C. 2000. Severe cognitive impairment in DMD: obvious clinical indication for Dp71 isoform point mutation screening. Eur J Hum Genet 8(7):552-6.

Mollie Friedlander TK, Peter D. Westenskow, Lea Scheppke, Edith Aguilar, Martin Friedlander. 2012. Hypoxic Stress Induces Accelerated Pathological Angiogenesis and Gliosis in a Murine Model of Duchenne Muscular Dystrophy, oral communication ARVO Annual Meeting.

Montanaro F, Carbonetto S, Campbell KP, Lindenbaum M. 1995. Dystroglycan expression in the wild type and mdx mouse neural retina: synaptic colocalization with dystrophin, dystrophin-related protein but not laminin. J Neurosci Res 42(4):528-38.

Morales-Lazaro SL, Gonzalez-Ramirez R, Gomez P, Tapia-Ramirez V, de Leon MB, Cisneros B. 2010. Induction of dystrophin Dp71 expression during neuronal differentiation: opposite roles of Sp1 and AP2alpha in Dp71 promoter activity. J Neurochem 112(2):474-85.

Mori S, Wang L, Takeuchi T, Kanda T. 2004. Two novel adeno-associated viruses from cynomolgus monkey: pseudotyping characterization of capsid protein. Virology 330(2):375-83.

Moukhles H, Roque R, Carbonetto S. 2000. alpha-dystroglycan isoforms are differentially distributed in adult rat retina. J Comp Neurol 420(2):182-94.

Muntoni F, Torelli S, Ferlini A. 2003. Dystrophin and mutations: one gene, several proteins, multiple phenotypes. Lancet Neurol 2(12):731-40.

Nagelhus EA, Horio Y, Inanobe A, Fujita A, Haug FM, Nielsen S, Kurachi Y, Ottersen OP. 1999. Immunogold evidence suggests that coupling of K+ siphoning and water transport in rat retinal Muller cells is mediated by a coenrichment of Kir4.1 and AQP4 in specific membrane domains. Glia 26(1):47-54.

Nakai H, Storm TA, Kay MA. 2000. Recruitment of single-stranded recombinant adeno-associated virus vector genomes and intermolecular recombination are responsible for stable transduction of liver in vivo. J Virol 74(20):9451-63.

Nathwani AC, Tuddenham EG, Rangarajan S, Rosales C, McIntosh J, Linch DC, Chowdary P, Riddell A, Pie AJ, Harrington C and others. 2011. Adenovirus-associated virus vector-mediated gene transfer in hemophilia B. N Engl J Med 365(25):2357-65.

Newman E, Reichenbach A. 1996. The Muller cell: a functional element of the retina. Trends Neurosci 19(8):307-12.

Newman EA. 2004. Glial modulation of synaptic transmission in the retina. Glia 47(3):268-74.

Newman EA, Frambach DA, Odette LL. 1984. Control of extracellular potassium levels by retinal glial cell K+ siphoning. Science 225(4667):1174-5.

Newman EA, Karwoski CJ. 1989. Spatial buffering of light-evoked potassium increases by retinal glial (Muller) cells. Acta Physiol Scand Suppl 582:51.

Nico B, Frigeri A, Nicchia GP, Corsi P, Ribatti D, Quondamatteo F, Herken R, Girolamo F, Marzullo A, Svelto M and others. 2003. Severe alterations of endothelial and glial cells in the blood-brain barrier of dystrophic mdx mice. Glia 42(3):235-51.

Nico B, Paola Nicchia G, Frigeri A, Corsi P, Mangieri D, Ribatti D, Svelto M, Roncali L. 2004. Altered blood-brain barrier development in dystrophic MDX mice. Neuroscience 125(4):921-35.

Nico B, Tamma R, Annese T, Mangieri D, De Luca A, Corsi P, Benagiano V, Longo V, Crivellato E, Salmaggi A and others. 2010. Glial dystrophin-associated proteins, laminin and agrin, are downregulated in the brain of mdx mouse. Lab Invest 90(11):1645-60.

Nielsen OB, Clausen T. 1997. Regulation of Na(+)-K+ pump activity in contracting rat muscle. J Physiol 503 (Pt 3):571-81.

Noel G, Belda M, Guadagno E, Micoud J, Klocker N, Moukhles H. 2005. Dystroglycan and Kir4.1 coclustering in retinal Muller glia is regulated by laminin-1 and requires the PDZ-ligand domain of Kir4.1. J Neurochem 94(3):691-702.

Noel G, Stevenson S, Moukhles H. 2011. A high throughput screen identifies chemical modulators of the laminin-induced clustering of dystroglycan and aquaporin-4 in primary astrocytes. PLoS One 6(3):e17559.

Nonnenmacher M, Weber T. 2011. Adeno-associated virus 2 infection requires endocytosis through the CLIC/GEEC pathway. Cell Host Microbe 10(6):563-76.

Nudel U, Zuk D, Einat P, Zeelon E, Levy Z, Neuman S, Yaffe D. 1989. Duchenne muscular dystrophy gene product is not identical in muscle and brain. Nature 337(6202):76-8.

Pang JJ, Dai X, Boye SE, Barone I, Boye SL, Mao S, Everhart D, Dinculescu A, Liu L, Umino Y and others. 2011. Long-term retinal function and structure rescue using capsid mutant AAV8 vector in the rd10 mouse, a model of recessive retinitis pigmentosa. Mol Ther 19(2):234-42.

Pannicke T, Iandiev I, Wurm A, Uckermann O, vom Hagen F, Reichenbach A, Wiedemann P, Hammes HP, Bringmann A. 2006. Diabetes alters osmotic swelling characteristics and membrane conductance of glial cells in rat retina. Diabetes 55(3):633-9.

Paulson OB, Newman EA. 1987. Does the release of potassium from astrocyte endfeet regulate cerebral blood flow? Science 237(4817):896-8.

Perabo L, Huber A, Marsch S, Hallek M, Buning H. 2008. Artificial evolution with adeno-associated viral libraries. Comb Chem High Throughput Screen 11(2):118-26.

Petrs-Silva H, Dinculescu A, Li Q, Deng WT, Pang JJ, Min SH, Chiodo V, Neeley AW, Govindasamy L, Bennett A and others. 2011. Novel properties of tyrosine-mutant AAV2 vectors in the mouse retina. Mol Ther 19(2):293-301.

Petrs-Silva H, Dinculescu A, Li Q, Min SH, Chiodo V, Pang JJ, Zhong L, Zolotukhin S, Srivastava A, Lewin AS and others. 2009. High-efficiency transduction of the mouse retina by tyrosine-mutant AAV serotype vectors. Mol Ther 17(3):463-71.

Pillers DA, Fitzgerald KM, Duncan NM, Rash SM, White RA, Dwinnell SJ, Powell BR, Schnur RE, Ray PN, Cibis GW and others. 1999a. Duchenne/Becker muscular dystrophy: correlation of phenotype by electroretinography with sites of dystrophin mutations. Hum Genet 105(1-2):2-9.

Pillers DA, Weleber RG, Green DG, Rash SM, Dally GY, Howard PL, Powers MR, Hood DC, Chapman VM, Ray PN and others. 1999b. Effects of dystrophin isoforms on signal transduction through neural retina: genotype-phenotype analysis of duchenne muscular dystrophy mouse mutants. Mol Genet Metab 66(2):100-10.

Pinzon-Duarte G, Daly G, Li YN, Koch M, Brunken WJ. 2010. Defective formation of the inner limiting membrane in laminin beta2- and gamma3-null mice produces retinal dysplasia. Invest Ophthalmol Vis Sci 51(3):1773-82.

Poitry-Yamate CL, Poitry S, Tsacopoulos M. 1995. Lactate released by Muller glial cells is metabolized by photoreceptors from mammalian retina. J Neurosci 15(7 Pt 2):5179-91.

Rabinowitz JE, Rolling F, Li C, Conrath H, Xiao W, Xiao X, Samulski RJ. 2002. Cross-packaging of a single adeno-associated virus (AAV) type 2 vector genome into multiple AAV serotypes enables transduction with broad specificity. J Virol 76(2):791-801.

Rapaport D, Fuchs O, Nudel U, Yaffe D. 1992. Expression of the Duchenne muscular dystrophy gene products in embryonic stem cells and their differentiated derivatives. J Biol Chem 267(30):21289-92.

Rapaport D, Greenberg DS, Tal M, Yaffe D, Nudel U. 1993. Dp71, the nonmuscle product of the Duchenne muscular dystrophy gene is associated with the cell membrane. FEBS Lett 328(1-2):197-202.

Rapaport D, Passos-Bueno MR, Brandao L, Love D, Vainzof M, Zatz M. 1991. Apparent association of mental retardation and specific patterns of deletions screened with probes cf56a and cf23a in Duchenne muscular dystrophy. Am J Med Genet 39(4):437-41.

Reichenbach A, Henke A, Eberhardt W, Reichelt W, Dettmer D. 1992. K+ ion regulation in retina. Can J Physiol Pharmacol 70 Suppl:S239-47.

Reichenbach A, Schnitzer J, Reichelt E, Osborne NN, Fritzsche B, Puls A, Richter U, Friedrich A, Knothe AK, Schober W and others. 1993. Development of the rabbit retina, III:

Differential retinal growth, and density of projection neurons and interneurons. Vis Neurosci 10(3):479-98.

Reichenbach A, Wurm A, Pannicke T, Iandiev I, Wiedemann P, Bringmann A. 2007. Muller cells as players in retinal degeneration and edema. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 245(5):627-36.

Roberge FG, Caspi RR, Chan CC, Nussenblatt RB. 1991. Inhibition of T lymphocyte proliferation by retinal glial Muller cells: reversal of inhibition by glucocorticoids. J Autoimmun 4(2):307-14.

Rodius F, Claudepierre T, Rosas-Vargas H, Cisneros B, Montanez C, Dreyfus H, Mornet D, Rendon A. 1997. Dystrophins in developing retina: Dp260 expression correlates with synaptic maturation. Neuroreport 8(9-10):2383-7.

Romero PA, Arnold FH. 2009. Exploring protein fitness landscapes by directed evolution. Nat Rev Mol Cell Biol 10(12):866-76.

Rozen S, Skaletsky H. 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. Methods Mol Biol 132:365-86.

Saint Martin A, Aragon J, Depardon-Benitez F, Sanchez-Trujillo A, Mendoza-Hernandez G, Ceja V, Montanez C. 2012. Identification of Dp71e, a new dystrophin with a novel carboxy-terminal end. FEBS J 279(1):66-77.

Sakurai E, Ozeki H, Kunou N, Ogura Y. 2001. Effect of particle size of polymeric nanospheres on intravitreal kinetics. Ophthalmic Res 33(1):31-6.

Sarig R, Mezger-Lallemand V, Gitelman I, Davis C, Fuchs O, Yaffe D, Nudel U. 1999. Targeted inactivation of Dp71, the major non-muscle product of the DMD gene: differential activity of the Dp71 promoter during development. Hum Mol Genet 8(1):1-10.

Sato S, Omori Y, Katoh K, Kondo M, Kanagawa M, Miyata K, Funabiki K, Koyasu T, Kajimura N, Miyoshi T and others. 2008. Pikachurin, a dystroglycan ligand, is essential for photoreceptor ribbon synapse formation. Nat Neurosci 11(8):923-31.

Schaffer DV, Koerber JT, Lim KI. 2008. Molecular engineering of viral gene delivery vehicles. Annu Rev Biomed Eng 10:169-94.

Schmitz F, Holbach M, Drenckhahn D. 1993. Colocalization of retinal dystrophin and actin in postsynaptic dendrites of rod and cone photoreceptor synapses. Histochemistry 100(6):473-9.

Sene A, Tadayoni R, Pannicke T, Wurm A, El Mathari B, Benard R, Roux MJ, Yaffe D, Mornet D, Reichenbach A and others. 2009. Functional implication of Dp71 in osmoregulation and vascular permeability of the retina. PLoS One 4(10):e7329.

Shakib M, Cunha-Vaz JG. 1966. Studies on the permeability of the blood-retinal barrier. IV. Junctional complexes of the retinal vessels and their role in the permeability of the blood-retinal barrier. Exp Eye Res 5(3):229-34.

Shen W, Fruttiger M, Zhu L, Chung SH, Barnett NL, Kirk JK, Lee S, Coorey NJ, Killingsworth M, Sherman LS and others. 2012a. Conditional Muller cell ablation causes independent neuronal and vascular pathologies in a novel transgenic model. J Neurosci 32(45):15715-27.

Shen W, Fruttiger M, Zhu L, Chung SH, Barnett NL, Kirk JK, Lee S, Coorey NJ, Killingsworth M, Sherman LS and others. 2012b. Conditional Mullercell ablation causes independent neuronal and vascular pathologies in a novel transgenic model. J Neurosci 32(45):15715-27.

Sigesmund DA, Weleber RG, Pillers DA, Westall CA, Panton CM, Powell BR, Heon E, Murphey WH, Musarella MA, Ray PN. 1994. Characterization of the ocular phenotype of Duchenne and Becker muscular dystrophy. Ophthalmology 101(5):856-65.

Sonntag F, Bleker S, Leuchs B, Fischer R, Kleinschmidt JA. 2006. Adeno-associated virus type 2 capsids with externalized VP1/VP2 trafficking domains are generated prior to passage through the cytoplasm and are maintained until uncoating occurs in the nucleus. J Virol 80(22):11040-54.

Sonntag F, Kother K, Schmidt K, Weghofer M, Raupp C, Nieto K, Kuck A, Gerlach B, Bottcher B, Muller OJ and others. 2011. The assembly-activating protein promotes capsid assembly of different adeno-associated virus serotypes. J Virol 85(23):12686-97.

Sonntag F, Schmidt K, Kleinschmidt JA. 2010. A viral assembly factor promotes AAV2 capsid formation in the nucleolus. Proc Natl Acad Sci U S A 107(22):10220-5.

Steinberg RH, Oakley B, 2nd, Niemeyer G. 1980. Light-evoked changes in [K+]0 in retina of intact cat eye. J Neurophysiol 44(5):897-921.

Stolzenburg JU, Haas J, Hartig W, Paulke BR, Wolburg H, Reichelt W, Chao TI, Wolff JR, Reichenbach A. 1992. Phagocytosis of latex beads by rabbit retinal Muller (glial) cells in vitro. J Hirnforsch 33(4-5):557-64.

Stone J, Maslim J, Valter-Kocsi K, Mervin K, Bowers F, Chu Y, Barnett N, Provis J, Lewis G, Fisher SK and others. 1999. Mechanisms of photoreceptor death and survival in mammalian retina. Prog Retin Eye Res 18(6):689-735.

Streilein JW. 2003. Ocular immune privilege: the eye takes a dim but practical view of immunity and inflammation. J Leukoc Biol 74(2):179-85.

Streilein JW, Ksander BR, Taylor AW. 1997. Immune deviation in relation to ocular immune privilege. J Immunol 158(8):3557-60.

Suzuki A, Yoshida M, Ozawa E. 1995. Mammalian alpha 1- and beta 1-syntrophin bind to the alternative splice-prone region of the dystrophin COOH terminus. J Cell Biol 128(3):373-81.

Suzuki N, Hozumi K, Urushibata S, Yoshimura T, Kikkawa Y, Gumerson JD, Michele DE, Hoffman MP, Yamada Y, Nomizu M. 2010. Identification of alpha-dystroglycan binding sequences in the laminin alpha2 chain LG4-5 module. Matrix Biol 29(2):143-51.

Szabo A, Jancsik V, Mornet D, Kalman M. 2004. Immunofluorescence mapping of dystrophin in the rat brain: astrocytes contain the splice variant Dp71f, but this is confined to subpopulations. Anat Embryol (Berl) 208(6):463-77.

Tadayoni R. 2009. Tesis Title : NORMAL AND ABNORMAL RETINAL VASCULARISATION : ROLE OF DYSTROPHIN PROTEIN 71 (Dp71): Paris Diderot. 119 p.

Tadayoni R BR, Dupas B, Sene A, Gaudric A, Sennlaub F, Sahel JA, Rendon A. 2010. Implication of Dystrophin Protein 71 (Dp71) in Retinal Angiogenesis, poster presentaion #30/A77. ARVO Annual Meeting.

Tadayoni R, Rendon A, Soria-Jasso LE, Cisneros B. 2012. Dystrophin Dp71: the smallest but multifunctional product of the Duchenne muscular dystrophy gene. Mol Neurobiol 45(1):43-60.

Takumi T, Ishii T, Horio Y, Morishige K, Takahashi N, Yamada M, Yamashita T, Kiyama H, Sohmiya K, Nakanishi S and others. 1995. A novel ATP-dependent inward rectifier potassium channel expressed predominantly in glial cells. J Biol Chem 270(27):16339-46.

Tinsley JM, Blake DJ, Davies KE. 1993. Apo-dystrophin-3: a 2.2kb transcript from the DMD locus encoding the dystrophin glycoprotein binding site. Hum Mol Genet 2(5):521-4.

Tout S, Chan-Ling T, Hollander H, Stone J. 1993. The role of Muller cells in the formation of the blood-retinal barrier. Neuroscience 55(1):291-301.

Tozawa T, Itoh K, Yaoi T, Tando S, Umekage M, Dai H, Hosoi H, Fushiki S. 2012. The shortest isoform of dystrophin (Dp40) interacts with a group of presynaptic proteins to form a presumptive novel complex in the mouse brain. Mol Neurobiol 45(2):287-97.

Tretiach M, Madigan MC, Wen L, Gillies MC. 2005. Effect of Muller cell co-culture on in vitro permeability of bovine retinal vascular endothelium in normoxic and hypoxic conditions. Neurosci Lett 378(3):160-5.

Trichas G, Begbie J, Srinivas S. 2008. Use of the viral 2A peptide for bicistronic expression in transgenic mice. BMC Biol 6:40.

Tsacopoulos M, Magistretti PJ. 1996. Metabolic coupling between glia and neurons. J Neurosci 16(3):877-85.

Tsui I, Pan CK, Rahimy E, Schwartz SD. 2012. Ocriplasmin for vitreoretinal diseases. J Biomed Biotechnol 2012:354979.

Ueda H, Baba T, Terada N, Kato Y, Tsukahara S, Ohno S. 1997. Dystrophin in rod spherules; submembranous dense regions facing bipolar cell processes. Histochem Cell Biol 108(3):243-8.

Ueda H, Gohdo T, Ohno S. 1998. Beta-dystroglycan localization in the photoreceptor and Muller cells in the rat retina revealed by immunoelectron microscopy. J Histochem Cytochem 46(2):185-91.

Uhlmann S, Bringmann A, Uckermann O, Pannicke T, Weick M, Ulbricht E, Goczalik I, Reichenbach A, Wiedemann P, Francke M. 2003. Early glial cell reactivity in experimental retinal detachment: effect of suramin. Invest Ophthalmol Vis Sci 44(9):4114-22.

Vacca O, Darche M, Schaffer DV, Flannery JG, Sahel JA, Rendon A, Dalkara D. 2013. AAV-mediated gene delivery in Dp71-null mouse model with compromised barriers. Glia.

Wang J, Xu X, Elliott MH, Zhu M, Le YZ. 2010. Muller cell-derived VEGF is essential for diabetes-induced retinal inflammation and vascular leakage. Diabetes 59(9):2297-305.

Weber M, Rabinowitz J, Provost N, Conrath H, Folliot S, Briot D, Cherel Y, Chenuaud P, Samulski J, Moullier P and others. 2003. Recombinant adeno-associated virus serotype 4 mediates unique and exclusive long-term transduction of retinal

pigmented epithelium in rat, dog, and nonhuman primate after subretinal delivery. Mol Ther 7(6):774-81.

Wersinger E, Bordais A, Schwab Y, Sene A, Benard R, Alunni V, Sahel JA, Rendon A, Roux MJ. 2011. Reevaluation of dystrophin localization in the mouse retina. Invest Ophthalmol Vis Sci 52(11):7901-8.

Willbold E, Berger J, Reinicke M, Wolburg H. 1997. On the role of Muller glia cells in histogenesis: only retinal spheroids, but not tectal, telencephalic and cerebellar spheroids develop histotypical patterns. J Hirnforsch 38(3):383-96.

Wu Z, Asokan A, Samulski RJ. 2006. Adeno-associated virus serotypes: vector toolkit for human gene therapy. Mol Ther 14(3):316-27.

Xiao W, Chirmule N, Berta SC, McCullough B, Gao G, Wilson JM. 1999. Gene therapy vectors based on adeno-associated virus type 1. J Virol 73(5):3994-4003.

Xu Q, Qaum T, Adamis AP. 2001. Sensitive blood-retinal barrier breakdown quantitation using Evans blue. Invest Ophthalmol Vis Sci 42(3):789-94.

Yang GS, Schmidt M, Yan Z, Lindbloom JD, Harding TC, Donahue BA, Engelhardt JF, Kotin R, Davidson BL. 2002. Virus-mediated transduction of murine retina with adeno-associated virus: effects of viral capsid and genome size. J Virol 76(15):7651-60.

Yanoff M, Fine BS. 1996. Occular Pathology: Mosby-Wolfe.

Yin L, Greenberg K, Hunter JJ, Dalkara D, Kolstad KD, Masella BD, Wolfe R, Visel M, Stone D, Libby RT and others. 2011. Intravitreal injection of AAV2 transduces macaque inner retina. Invest Ophthalmol Vis Sci 52(5):2775-83.

Yoshida-Moriguchi T, Yu L, Stalnaker SH, Davis S, Kunz S, Madson M, Oldstone MB, Schachter H, Wells L, Campbell KP. 2010. O-mannosyl phosphorylation of alpha-dystroglycan is required for laminin binding. Science 327(5961):88-92.

Zhong L, Li B, Mah CS, Govindasamy L, Agbandje-McKenna M, Cooper M, Herzog RW, Zolotukhin I, Warrington KH, Jr., Weigel-Van Aken KA and others. 2008. Next generation of adeno-associated virus 2 vectors: point mutations in tyrosines lead to high-efficiency transduction at lower doses. Proc Natl Acad Sci U S A 105(22):7827-32.

Zhong Y, Li J, Chen Y, Wang JJ, Ratan R, Zhang SX. 2012. Activation of endoplasmic reticulum stress by hyperglycemia is essential for Muller cell-derived inflammatory cytokine production in diabetes. Diabetes 61(2):492-504.

Zhou X, Muzyczka N. 1998. In vitro packaging of adeno-associated virus DNA. J Virol 72(4):3241-7.

XI. Résumé

La formation et l'intégrité de la barrière hémato-rétinienne (BHR) sont nécessaires au maintien d'une bonne vision et la violation de cette barrière contribue à l'apparition d'un grand nombre de pathologies rétiniennes telles que le décollement de la rétine, la rétinopathie diabétique (RD) et la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA). La dystrophine Dp71 est une protéine du cytosquelette associée à la membrane qui s'exprime majoritairement dans les cellules gliales de Müller (CGM). Son absence a été associée à une augmentation de la perméabilité vasculaire liée à la délocalisation et à la diminution de l'expression des canaux AQP4 et Kir4.1. La souris Dp71-null est donc un excellent modèle d'étude des pathologies rétiniennes présentant une rupture de la BHR.

Dans un premier temps, nous avons étudié l'implication des CGM dans la BHR et la membrane limitante interne (MLI) de la souris Dp71-null en comparaison avec la souche sauvage. Pour atteindre cet objectif, nous avons utilisé un virus adéno-associé (AAV) recombinant, le ShH10, qui a été conçu pour cibler spécifiquement les CGM. Le ShH10 codant pour la GFP a été introduit par injection intravitréenne et la transduction des CGM a été étudiée chez la souris Dp71-null et comparée à la souris sauvage. Nous avons montré que la transduction des CGM suit un profil significativement différent chez la souris déficiente en Dp71 indiquant l'existence de différences au niveau des récepteurs de surface cellulaire ainsi que des différences de perméabilité de la MLI. Cependant, l'atteinte de la BHR chez la souris Dp71-null ne mène pas à la fuite de virus vers la circulation sanguine lorsqu'il est injecté dans le vitré. Il s'agit d'une considération capitale pour le développement de thérapies géniques en cas de rupture de la BHR.

Dans un second temps, nous avons utilisé le ShH10 pour restaurer l'expression de la Dp71 dans la CGM afin d'étudier les effets moléculaires et fonctionnels de cette restauration chez la souris adulte présentant une perméabilité rétinienne accrue due à l'absence de Dp71. Nous avons démontré que la Dp71 transduite s'exprime de façon forte et spécifique dans les CGM des rétines traitées, se localise correctement au sein de la cellule et restaure ses fonctions, permettant ainsi un rétablissement de la BHR et de l'homéostasie rétinienne protégeant la rétine de l'œdème.

L'ensemble de nos résultats démontrent que chez la souris déficiente en Dp71 ayant une rupture de la BHR, il est possible de restaurer une perméabilité et une homéostasie rétinienne normale grâce à la surexpression de la Dp71. Cette étude est à la base du développement de nouvelles stratégies thérapeutiques dans le traitement de pathologies associées à une rupture de la BHR et à un œdème maculaire, comme la DMLA et la RD.

XII. Summary

Formation and maintenance of the blood-retinal barrier (BRB) is required for proper vision and breaching of this barrier contributes to the pathology in a wide variety of retinal conditions such as retinal detachment, diabetic retinopathy and age-related macular degeneration (AMD). Dystrophin Dp71 being a key membrane cytoskeletal protein, expressed mainly in Müller glial cells (MGC), its absence has been related to BRB permeability through delocalization and down-regulation of the AQP4 and Kir4.1 channels. Dp71-null mouse is thus an excellent model to approach the study of retinal pathologies showing blood-retinal barrier permeability.

First, we aimed to investigate the participation of MGC in the BRB and in the inner limiting membrane (ILM) of Dp71-null mice compared with wild-type mice in order to understand how these barriers work in this model of permeable BRB. To this aim, we used an adeno-associated virus (AAV) variant, ShH10-GFP, engineered to target MGC specifically. ShH10 coding GFP was introduced by intravitreal injection and MGC transduction was studied in Dp71-null mice in comparison to wild-type animals. We show that MGC transduction follows a significantly different pattern in Dp71-null mice indicating changes in viral cell-surface receptors as well as differences in the permeability of the ILM in this mouse line. However, the compromised BRB of the Dp71-null mice does not lead to virus leakage into the blood stream when the virus is injected intravitreally – an important consideration for AAV mediated retinal gene therapy.

Second, we used ShH10 to restore Dp71 expression in MGC to study molecular and functional effects of this restoration in an adult mouse displaying retinal permeability due to absence of Dp71. We showed that strong and specific expression of Dp71 in MGC leads to correct localization of the Dp71 protein in treated mice's retinas and restores the function of this protein in re-establishing BRB and retina homeostasis preventing retinas from edema.

Our results collectively demonstrated that in Dp71 deficient mouse with compromised barriers, normal BRB permeability and retinal homeostasis can be restored through over-expression of Dp71. This study is the basis for development of new therapeutic strategies in dealing with diseases with BRB breakdown and macular edema such as AMD and diabetic retinopathy.