



HAL
open science

Rôle de la protéine dystrophine Dp71 dans l'inflammation vasculaire rétinienne

Brahim El Mathari

► **To cite this version:**

Brahim El Mathari. Rôle de la protéine dystrophine Dp71 dans l'inflammation vasculaire rétinienne. Médecine humaine et pathologie. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2014. Français. NNT : 2014PA066466 . tel-01130311

HAL Id: tel-01130311

<https://theses.hal.science/tel-01130311>

Submitted on 11 Mar 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE

Ecole doctorale ED3C Cerveau Cognition Comportement

Présentée par

Brahim EL MATHARI

Pour obtenir le grade de Docteur de l'Université Pierre et Marie Curie

Sujet de la thèse :

Rôle de la protéine dystrophine Dp71 dans l'inflammation vasculaire rétinienne

Présentée et soutenue publiquement le 19 décembre 2014

Devant un jury composé de :

Rapporteurs : Pr. David Gaucher
Pr. Thomas Claudepierre
Présidente du Jury : Pr. Hélène Hardin-Pouzet
Examineur : Dr. Cyrille Vaillend
Directeurs de thèse : Pr. Ramin Tadayoni
Dr. Álvaro Rendon

A ma mère et mon père,

A mes frères et sœurs,

A ma femme et mes trois enfants

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier M. Thomas Claudepierre et M. David Gaucher d'avoir accepté d'être rapporteurs et d'avoir évalué ce travail de thèse. Je remercie également M. Cyrille Vaillend de me faire l'honneur d'être membre de mon jury de thèse. Je tiens également à remercier Mme Hélène Hardin-Pouzet de me faire l'honneur d'être présidente de ce jury.

Je tiens à remercier sincèrement M. José-Alain Sahel pour m'avoir accueilli et m'avoir permis de mener à bien ce projet de recherche. Je tiens aussi à remercier M. Bernard Gilly et Mme Soraya Bekkali pour la confiance qu'ils m'ont accordée pour la réalisation de ma thèse.

Je tiens sincèrement à remercier mes directeurs de thèse M. Alvaro Rendon et M. Ramin Tadayoni, qui m'ont encadré tout au long de cette étude. Je vous remercie chaleureusement pour vos conseils avisés, votre aide précieuse, et d'avoir partagé avec moi votre expérience.

Mes remerciements vont aussi à tous mes collègues qui m'ont aidé au quotidien : A Hugo Charles-Massance, Ophélie Vacca et Marie Darche pour votre aide et votre disponibilité.

Je tiens à remercier Mme Claudine Grepin pour son soutien et son aide précieuse tout au long de ce projet de recherche.

Enfin, je tiens à remercier Sanofi Fovea pour son soutien.

Liste des abréviations

DMD	dystrophie musculaire de Duchenne
Dp	dystrophin protein
DAPs	dystrophin associated proteins protéines associées à la dystrophine
CGM	cellule gliale de müller
CNE	couche nucléaire externe
CNI	couche nucléaire interne
CPE	couche plexiforme externe
CPI	couche plexiforme interne
EPR	épithélium pigmentaire rétinien
MLE	membrane limitante externe
MLI	membrane limitante interne
DG	dystroglycane
GABA	γ-aminobutyric acid
GLAST	glutamate aspartate transporter
Kir	Inwardly rectifying potassium channel canal potassium à rectification entrante
AQP	aquaporine
BHR	barrière hémato-rétinienne

VEGF vascular endothelial growth factor

VEGF-R1 VEGF récepteur 1

VEGF-R2 VEGF récepteur 2

ZO-1 zonula occludens 1

ICAM-1 intercellular adhesion molecule-1

TNF- α tumor necrosis factor- α

AA acide arachidonique

COX cyclooxygénase

LO lipoxygénase

FLAP 5-LO activating protein

ALOX5AP Arachidonate 5-lipoxygenase Activating Protein

Bcl-2 B-cell lymphoma 2

IL-1 β interleukine-1 beta

PGE2 prostaglandine E2

STZ streptozotocine

ENU éthylnitrosourée

Sommaire

Introduction	8
1- La rétine.....	9
1-1 Anatomie de l'œil	9
1-2 Anatomie et physiologie de la rétine	11
1-2.1 La neurorétine	13
1-2.2 Les cellules gliales	15
1-2.2.1 Les cellules microgliales	15
1-2.2.2 Les astrocytes	16
1-2.2.3 Les cellules gliales de Müller	16
1-2.3 Le système vasculaire	21
2- Les dystrophines.....	23
2-1 Historique	23
2-2 Le gène	23
2-3 Pathologie	24
2-4 Protéines codées par le gène DMD	25
2-5 Structure de la protéine dystrophine	26
3- La dystrophine Dp71	27
3-1 Les protéines associées à la dystrophine Dp71	27
3-2 Rôle de la Dp71 dans le cerveau	29
3-2.1 Dp71 et troubles cognitifs	29
3-2.2 Dp71 et barrière hémato-encéphalique	30
4- Structure et propriété de la barrière hémato-rétinienne	31
5- L'inflammation rétinienne et pathologies associées.....	34
5-1 Les médiateurs de l'inflammation	34
5-1.1 Le TNF-α	34
5-1.2 Le VEGF et ses récepteurs	35
5-1.2.1 VEGF et cellules gliales de Müller	36
5-1.3 Recrutement des leucocytes et ICAM-1	37
5-1.4 Dégénérescence des capillaires rétiniens	39
5-1.5 Les médiateurs de l'inflammation dérivés des lipides	40
5-1.6 Bcl-2	42
5-1.7 AQP4	43

6-	Les modèles animaux d'étude de la Dp71 dans la rétine.....	44
6-1	La souris mdx^{3Cv}	45
6-2	La souris Dp71-null	45
7-	Rôle de la Dp71 dans la rétine.....	46
7-1	Localisation de la Dp71 dans la rétine	46
7-2	Rôle du complexe Dp71-DAPs dans l'homéostasie rétinienne	50
7-3	Physiopathologie rétinienne de la souris Dp71-null	52
7-4	Angiogenèse postnatale normal et pathologique	53
8-	But du projet de thèse.....	56
8-1	Premier article : <i>Rôle de la Dp71 dans la régulation osmotique et la perméabilité vasculaire rétinienne</i>	56
8-2	Deuxième article : <i>Dp71 et inflammation vasculaire rétinienne</i>	56
8-3	Troisième article : Caractérisation de l'inflammation rétinienne chez la souris mdx^{3Cv}	57
	Premier article	58
9-	Rôle de la Dp71 dans la régulation osmotique et la perméabilité vasculaire rétinienne	59
9-1	Situation du sujet	59
9-2	Résultats	60
9-3	Conclusion	61
	Deuxième article.....	75
10-	Dp71 et inflammation vasculaire rétinienne	76
10-1	Introduction	76
10-2	Résultats	78
10-3	Conclusion	81
	Troisième article.....	114
11-	Caractérisation de l'inflammation rétinienne chez la souris mdx^{3Cv} (Article en préparation)	115
11-1	Introduction	115
11-2	Méthodes	116
11-3	Conclusion	127
	Discussion & Perspectives	128
12	Discussion générale.....	129
13	Perspectives.....	133
14	Bibliographies	137

Introduction

1- La rétine

1-1 Anatomie de l'œil

L'œil, organe de la vision, est constitué de circuits nerveux complexes qui ont pour principale fonction de transformer le signal lumineux capté par l'œil en signal électrique qui gagne le cerveau via le nerf optique.

L'œil peut se décomposer en trois principales tuniques (Figure 1) :

- **La tunique externe** regroupe la cornée et la sclère :
 - **La sclère (sclérotique)**, que l'on appelle souvent le « blanc » de l'œil, est une tunique fibreuse de collagène dense. Elle aide le globe oculaire à conserver sa forme et protège des lésions.
 - **La cornée** : c'est une structure transparente qui n'est pas vascularisée, afin d'assurer la transmission de la lumière. Elle est formée de cinq couches : épithélium, membrane de Bowman, stroma, membrane de Descemet et endothélium. Les cellules épithéliales sont renouvelées tous les sept jours. La cornée est séparée de la sclère par le limbe, structure richement innervée et vascularisée qui adhère à la conjonctive. La conjonctive est une fine membrane qui recouvre la face interne de la paupière et une partie de la sclère.
- **La tunique moyenne**, aussi appelée uvée, se compose de l'iris, des corps ciliaires et de la choroïde :
 - **L'iris**, partie qui donne sa couleur à l'œil, est formé de fibres pigmentées qui entourent la pupille. La pupille s'adapte à la lumière en se contractant et en se dilatant par l'intermédiaire du sphincter de l'iris.

- **Les corps ciliaires** créent la jonction entre l'iris et la choroïde. Les corps ciliaires sont également en contact avec la rétine au niveau de la zone appelée ora serrata. Les corps ciliaires assurent la sécrétion d'une substance liquide, l'humeur aqueuse.
- **La choroïde** : c'est une structure qui se trouve entre la rétine et la sclère. C'est un tissu vascularisé qui nourrit les corps ciliaires, l'iris et la partie externe de la rétine.
- **La tunique interne** correspond au tissu nerveux, la rétine.

Ces différentes tuniques, enferment trois milieux transparents formants une lentille convergente :

- **L'humeur aqueuse** : c'est un liquide transparent produit par les corps ciliaires. La pression intraoculaire dépend entre autre de cette production. L'humeur aqueuse circule de la chambre postérieure vers la chambre antérieure, d'où elle s'écoule vers le canal de Schlemm par le réseau trabéculaire.
- **Le cristallin** : c'est une lentille biconvexe incolore, transparente et non vascularisée. Sa structure lui permet de dévier les rayons lumineux sur la rétine. Sa partie antérieure est en contact avec l'humeur aqueuse et la partie postérieure avec l'humeur vitrée.
- **L'humeur vitrée (ou corps vitré)** : c'est une substance gélatineuse transparente composée principalement d'eau, qui occupe les deux tiers du volume de l'œil.

La voie visuelle comprend la rétine, le nerf optique, le chiasma optique, les tractus optiques, les corps géniculés latéraux, les radiations optiques et l'aire visuelle primaire du cerveau.

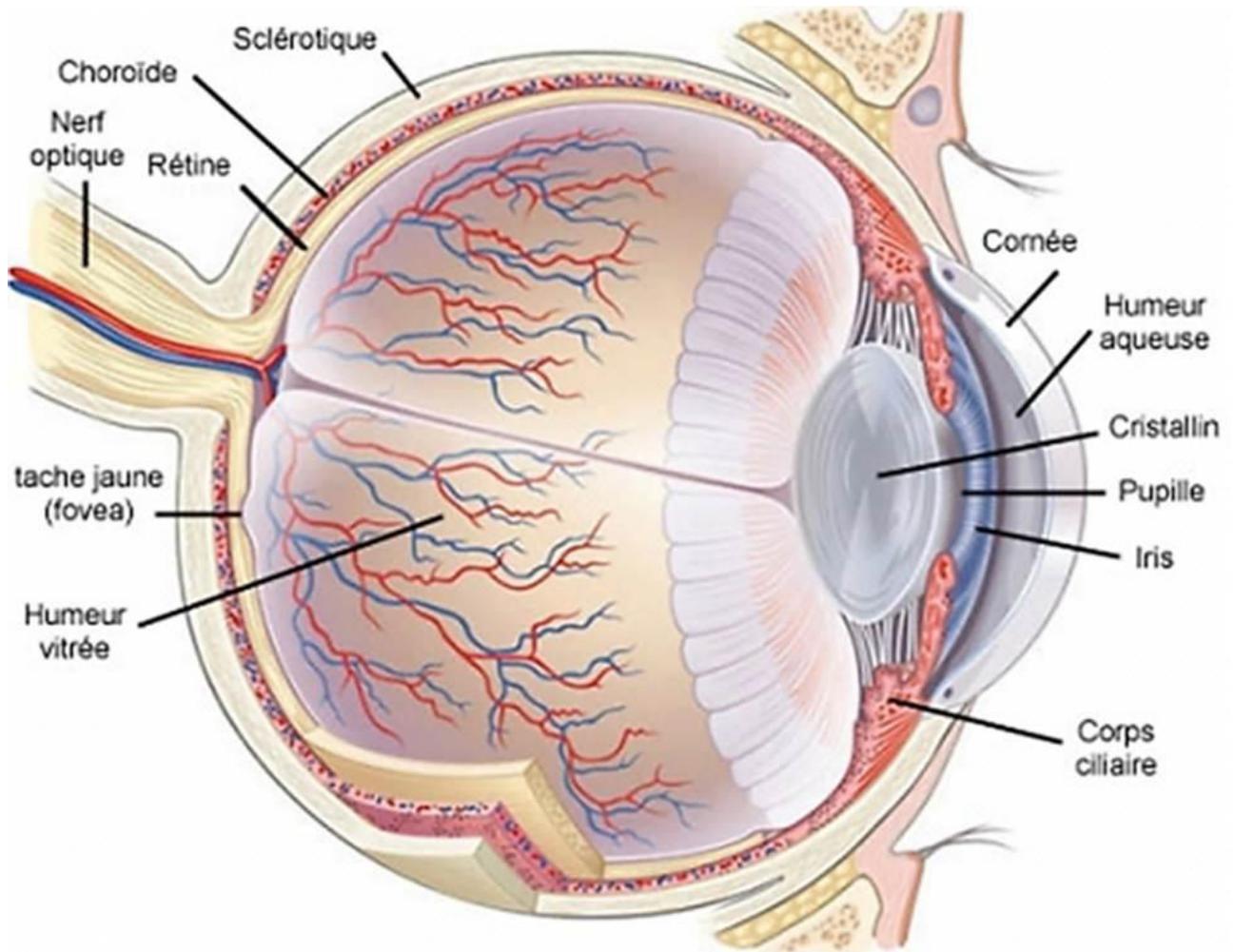


Figure 1. Anatomie de l'œil (<http://baladesnaturalistes.hautetfort.com/archive/2012/07/28/des-cellules-souches-dans-la-retine.html>).

1-2 Anatomie et physiologie de la rétine

La rétine est la première étape importante du traitement des stimuli lumineux, grâce à plusieurs couches de neurones. Cette étape est ensuite suivie d'un message électrique qui va traverser le nerf optique pour finalement atteindre les voies optiques jusqu'au lobe occipital du cerveau, où ils sont perçus comme une image.

La rétine tapisse la surface intérieure du fond de l'œil et se prolonge pour former le nerf optique. Au fond de l'œil à travers la pupille, nous pouvons observer les principaux éléments

de la rétine qui sont le disque du nerf optique (ou papille optique), les vaisseaux sanguins de la rétine et la macula (Figure 2). La macula est la zone dont dépend la vision centrale. Le reste de la rétine sert à la vision périphérique. Au centre de la macula se trouve la fovéa, qui n'est pas vascularisée.

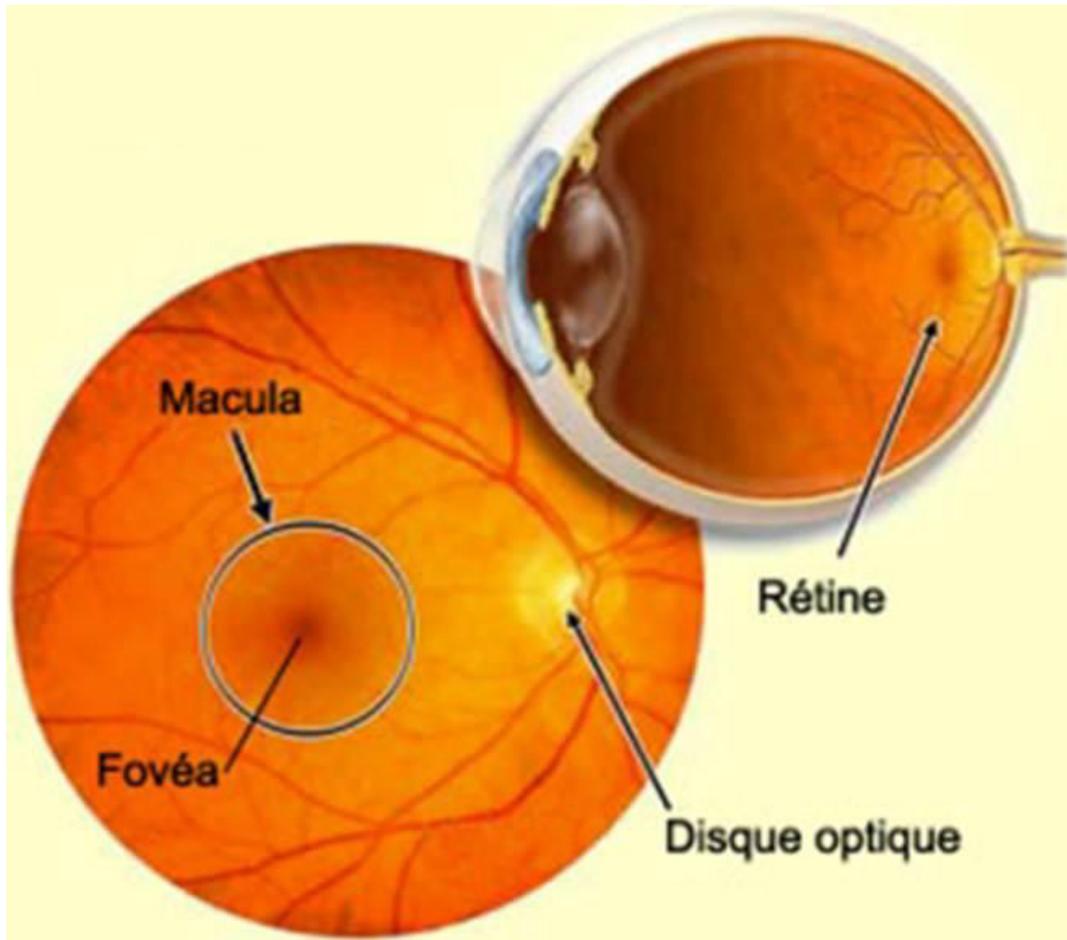


Figure 2. Fond d'œil (http://lecerveau.mcgill.ca/flash/a/a_02/a_02_cr/a_02_cr_vis/a_02_cr_vis.html).

Les principaux éléments constituant la rétine sont :

- La neurorétine, qui comprend l'ensemble des cellules nerveuses.
- Les cellules gliales.
- Le système vasculaire.

1-2.1 La neurorétine

On retrouve dans la rétine cinq types de neurones qui sont : les photorécepteurs, les cellules horizontales, les cellules bipolaires, les cellules amacrines et les cellules ganglionnaires.

La rétine est une structure organisée en dix couches alternées (Figure 3) :

- **L'épithélium pigmentaire rétinien (EPR)** qui consiste en une monocouche de cellules qui repose sur la membrane de Bruch. Cette membrane sépare l'EPR de la choriocapillaire.
- **La couche des photorécepteurs** est subdivisée en segments interne et externe.
- **La membrane limitante externe (MLE)**
- **La couche nucléaire externe (CNE)**, formée par les corps cellulaires des photorécepteurs.
- **La couche plexiforme externe (CPE)**, qui comprend les synapses formées entre les photorécepteurs et les cellules horizontales.
- **La couche nucléaire interne (CNI)**, composée par les corps cellulaires des cellules bipolaires, horizontales, amacrines et gliales de Müller.
- **La couche plexiforme interne (CPI)**, qui comprend les synapses formées entre les cellules bipolaire, amacrines et ganglionnaires.
- **La couche des cellules ganglionnaires (CCG)**, qui vont former la couche de fibres nerveuses avec leurs axones.
- **La couche des fibres nerveuse** qui vont former le nerf optique.
- **La membrane limitantes interne (MLI)**, contient les pieds des cellules gliales de Müller.

Les photorécepteurs sont les cellules les plus profondes, par rapport à l'arrivée de la lumière.

Ils sont subdivisés en deux types cellulaires qui sont : les bâtonnets et les cônes. Les bâtonnets

permettent surtout une vision de nuit ou lorsque l'environnement est sombre, alors que les cônes permettent d'avoir une vision nette lorsque la lumière est vive, de voir les couleurs et la définition des images. Chez l'homme, la rétine centrale comprend la macula, une zone pratiquement avasculaire qui contient en son centre la fovea, une petite dépression qui est responsable de la vision des détails. Cette région spécialisée, uniquement peuplée de cônes, est l'endroit de la rétine qui permet la meilleure acuité visuelle (Yamada 1969).

Les cellules bipolaires permettent la transmission de l'influx nerveux provenant des photorécepteurs vers les cellules amacrines et ganglionnaires. De plus, les cellules bipolaires reçoivent des afférences des cellules horizontales. En raison de la convergence différente des systèmes des cônes et des bâtonnets, les cellules bipolaires sont connectées à plusieurs bâtonnets alors qu'elles ne forment qu'une seule synapse avec un cône, mais dans la région fovéale seulement.

Les cellules horizontales, forment des synapses avec à la fois les photorécepteurs et les cellules bipolaires. Ces cellules participent à l'inhibition latérale de l'influx nerveux provenant des photorécepteurs par la libération d'acide aminés inhibiteur, comme le GABA. Cette inhibition permet de supprimer sélectivement les signaux nerveux superflus, améliorant ainsi le contraste des images visualisées.

Les cellules amacrines, sont les principales cellules dopaminergiques de la rétine, et forment des synapses avec les cellules bipolaires et ganglionnaires.

Les cellules ganglionnaires, centralisent l'influx nerveux provenant de l'ensemble des cellules rétinienne, pour le transmettre au cerveau via le nerf optique.

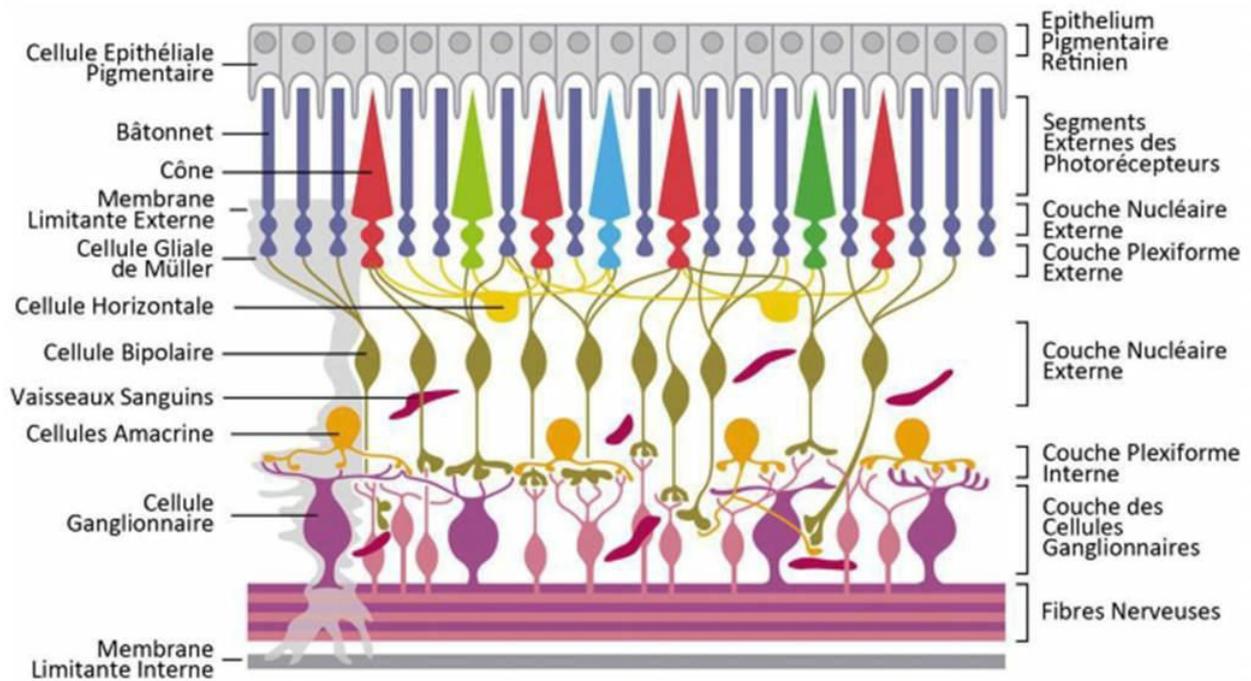


Figure 3. Anatomie de la rétine (http://journals.cambridge.org/fulltext_content/ERM/ERM6_15/S1462399404008129sup006.htm).

1-2.2 Les cellules gliales

Les cellules gliales exercent de nombreuses fonctions physiologiques essentielles et sont impliquées dans la réponse aux lésions et dans plusieurs pathologies rétinienne. La rétine possède trois types de cellules gliales représentées par un type de cellules microgliales et deux types de cellules macrogliales, les astrocytes et les cellules gliales de Müller.

1-2.2.1 Les cellules microgliales

Les cellules microgliales sont retrouvées au niveau de la couche plexiforme interne et des cellules ganglionnaires. Ces cellules sont en moins grand nombre que les autres cellules gliales, mais sont importantes en conditions pathologiques. Ces cellules dérivent des monocytes, cellules immunitaires sanguines de la rétine et ont un rôle de défense. En condition pathologique, ces cellules initient un processus d'inflammation et de réparation du tissu. De plus, dans un environnement inflammatoire, les cellules microgliales deviennent très mobiles et migrent vers la rétine externe, pouvant parfois se retrouver au niveau des

photorécepteurs lors d'une forte inflammation. Dans des conditions pathologiques, ces cellules microgliales changent de morphologie, avec une augmentation du volume de leurs péricaryons et de leurs prolongements. Il a été montré qu'une stimulation des cellules microgliales rétiniennes en culture avec du LPS provoque une production accrue d'IL-1 β et de TNF- α (Wang, Yu et al. 2005).

1-2.2.2 Les astrocytes

Les astrocytes sont situés principalement au niveau de la couche plexiforme interne, la couche des cellules ganglionnaires et des fibres nerveuses de la rétine. Grâce à leurs prolongements ces cellules sont en contact avec les cellules ganglionnaires et les vaisseaux sanguins, contribuant ainsi à l'absorption de certaines substances liées au métabolisme neuronal et à la stabilisation de la barrière hémato-rétinienne (Gardner, Lieth et al. 1997).

1-2.2.3 Les cellules gliales de Müller

Les cellules gliales de Müller (CGM) représentent les plus importantes cellules gliales, par le nombre, la morphologie, la localisation et les fonctions au niveau de la rétine. Ces cellules de Müller s'étendent sur toute l'épaisseur de la rétine, avec leur corps cellulaire localisé dans la couche nucléaire interne. A partir de ce corps cellulaire s'étend un prolongement principal qui se termine par un large pied en formant la partie proximale de la CGM, participant ainsi à une séparation avec l'humeur vitrée, appelée membrane limitante interne (Newman and Reichenbach 1996). Les extrémités distales des CGM participent à la membrane limitante externe autour des photorécepteurs. Les CGM sont ainsi en contact et interagissent avec toutes les cellules rétiniennes, créant de la sorte un lien anatomique et fonctionnel (Figure 4). Leurs prolongements entrent en contact avec les différentes synapses et les vaisseaux sanguins de la rétine, participant ainsi à la formation et au maintien de la barrière hémato-rétinienne (Tout, Chan-Ling et al. 1993). Les CGM expriment spécifiquement un nombre

important de canaux ioniques (exemple : le canal potassique Kir4.1, permettant le tamponnage), de récepteurs (exemple : les récepteurs au GABA et au glutamate, qui modulent l'activité neuronale), d'enzymes (exemple : l'anhydrase carbonique, qui permet la conversion du CO_2 en H^+ et HCO_3^-) et de transporteurs transmembranaires (co-transporteur des ions H^+ et HCO_3^- , participant à l'élimination de CO_2 produit par l'activité neuronale) (Newman and Reichenbach 1996).

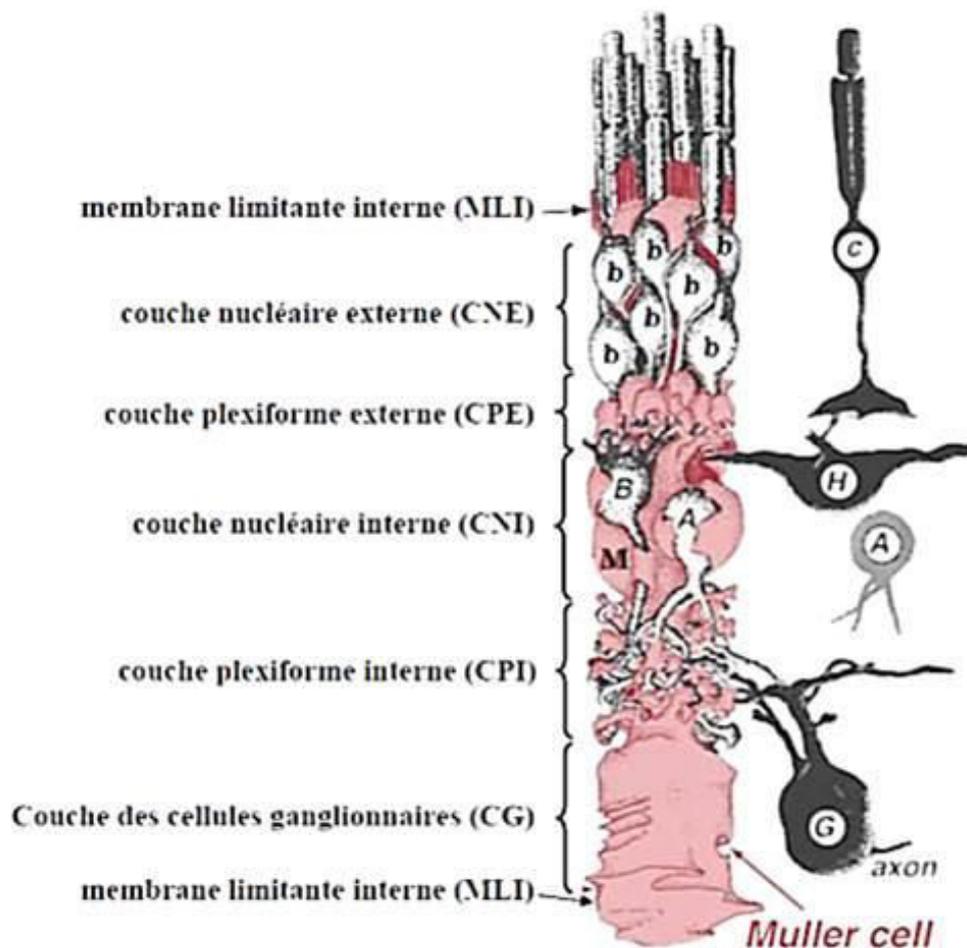


Figure 4. Représentation schématique des interactions entre la cellule gliale de Müller et les autres neurones de la rétine. c: cône, b: bâtonnet, h: cellules horizontales, B: cellules bipolaires, A: cellules amacrine, M: cellule gliale de Müller, G: cellule ganglionnaire. (<http://webvision.med.utah.edu/book/part-ii-anatomy-and-physiology-of-the-retina/glial-cells-of-the-retina/>)

- Rôle dans le recyclage des neurotransmetteurs

Au niveau de la zone d'interactions neurone-glie, les CGM jouent un rôle fondamental dans le recyclage des neurotransmetteurs. Les CGM expriment à leurs surfaces un système de capture

des neurotransmetteurs d'acides aminés, tels que le glutamate, la glycine et l'acide γ -aminobutyrique (GABA) (Sarthy, Pignataro et al. 2005). Le glutamate représente le neurotransmetteur principal de la rétine. Pour permettre un bon fonctionnement de la synapse excitatrice et éviter une neurotoxicité, le glutamate est éliminé de la fente synaptique par les CGM (Barnett and Pow 2000). Afin d'éliminer le glutamate, les CGM expriment le transporteur glutamate/aspartate dépendant du sodium, GLAST, qui est le transporteur majeur pour éliminer le glutamate de la rétine (Otori, Shimada et al. 1994). Un dysfonctionnement de ce transporteur, dans les CGM, provoque une augmentation du glutamate extracellulaire, contribuant ainsi à une dérégulation neuronale et à l'apoptose dans des conditions pathologiques (Barnett and Pow 2000). A la suite de sa capture par les CGM, le glutamate est transformé en glutamine par l'action de la glutamine synthétase (GS), qui est exclusivement exprimée par les CGM. La glutamine est ensuite transportée vers les neurones en tant que précurseur pour la synthèse du glutamate et de GABA (Pow and Crook 1996).

Les CGM expriment aussi des récepteurs ionotropiques et métabotropiques GABAergiques, glutaminergiques, purinergiques, noradrénergiques, muscariniques et dopaminergiques (Newman 2003).

- **Rôle dans l'homéostasie de la rétine**

Les cellules gliales de Müller sont impliquées dans le métabolisme du glucose, alimentant ainsi les neurones rétiniens en nutriments tels que le lactate/pyruvate pour le métabolisme oxydatif (Tsacopoulos and Magistretti 1996). Les CGM sont aussi responsables de l'élimination des déchets métaboliques.

Les CGM jouent aussi un rôle important dans le recyclage des photopigments, en exprimant une protéine cellulaire de liaison au rétinaldéhyde (CRALBP), qui lie le *all*-transretinal pour

le transformer en 11-*cis*-retinal relâché dans le milieu extracellulaire où il est utilisé par les photorécepteurs de types cônes.

Les CGM contrôlent le pH intra-rétinien, par la régulation des ions potassique (K^+). Elles tamponnent les ions K^+ de l'espace intercellulaire, permettant d'éviter les changements locaux de concentration du K^+ extracellulaire associés à l'activité des neurones (Newman, Frambach et al. 1984). Ce tamponnage est réalisé par l'intermédiaire du canal Kir4.1 (Kofuji, Ceelen et al. 2000). Ce canal est fortement exprimé dans les pieds des CGM, au niveau de la membrane limitante interne, mais aussi dans les prolongements des CGM qui entourent les vaisseaux sanguins (Daloz, Sarig et al. 2003).

Les CGM maintiennent aussi l'homéostasie de l'eau par élimination du surplus provenant du système vasculaire, de l'espace sous-rétinien et de l'humeur vitrée. C'est le canal aqueux aquaporine-4 (AQP4), qui permet d'éliminer l'excès d'eau au niveau de la rétine. Ce canal est fortement exprimé au niveau des prolongements entourant les vaisseaux et dans les pieds des CGM (Nagelhus, Horio et al. 1999).

- Rôle dans la gliose et l'inflammation

Les CGM sont plus résistantes que les neurones aux pathologies telles que l'ischémie. En effet, en condition pathologique, les CGM produisent des cytokines pro-inflammatoires (Caspi and Roberge 1989), et peuvent même phagocyter des substances exogènes et des débris de cellules mortes (Mano and Puro 1990, Francke, Makarov et al. 2001).

La réaction des CGM suite à une altération de la rétine, est appelée gliose. Cette gliose se caractérise par une augmentation de la protéine acide fibrillaire gliale GFAP, induite par une lésion de la rétine (Bignami and Dahl 1979, Eisenfeld, Bunt-Milam et al. 1984).

En fonction de la lésion rétinienne, la gliose des CGM peut être bénéfique ou néfaste pour les cellules rétiniennes (Bringmann and Reichenbach 2001). Les CGM peuvent sécréter des facteurs trophiques et anti-oxydants pour protéger le tissu endommagé (Honjo, Tanihara et al. 2000). Cependant, dans certaines conditions pathologiques, les CGM libèrent des facteurs de croissance, comme le VEGF, qui peuvent au contraire amplifier la lésion, en induisant la rupture de la barrière hémato-rétinienne et une néovascularisation (Bringmann, Pannicke et al. 2006).

Des altérations rétiniennes prononcées peuvent entraîner une activation suivie d'une dédifférenciation des CGM provoquant une dérégulation de leurs principales fonctions (Bringmann, Biedermann et al. 2000). Cette prolifération contribue au dysfonctionnement de l'homéostasie ionique et aqueuse, mais aussi à une perturbation du recyclage des neurotransmetteurs.

La délétion postnatale des CGM engendre une dysplasie rétinienne, l'apoptose des photorécepteurs suivie d'une dégénérescence des autres cellules rétiniennes, ainsi qu'une prolifération des cellules de l'épithélium pigmentaire (Dubois-Dauphin, Poitry-Yamate et al. 2000). De plus, une délétion conditionnelle des CGM induit l'apoptose des photorécepteurs, la rupture de la barrière hémato-rétinienne et provoque plus tardivement une néovascularisation rétinienne chez la souris adulte (Shen, Fruttiger et al. 2012).

Les CGM représentent aussi un élément majeur dans la survie des neurones rétiniens, comme l'a démontrée une étude du modèle de dégénérescence des photorécepteurs provoquée par une forte exposition lumineuse. Ce modèle induit une augmentation de la sécrétion du basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) par les CGM, contribuant ainsi à la protection des photorécepteurs (Harada, Harada et al. 2000).

1-2.3 Le système vasculaire

La rétine est alimentée en oxygène et nutriments par deux systèmes vasculaires distincts, qui sont le réseau choroïdien et rétinien. Ces deux réseaux sont issus de l'artère ophtalmique, une des branches de l'artère carotide interne.

Le réseau vasculaire choroïdien forme sous l'épithélium pigmentaire rétinien un ensemble de capillaires appelés choriocapillaire. Ce réseau choroïdien permet d'alimenter la rétine externe, qui comprend les photorécepteurs, en besoins métaboliques, et se caractérise par des fenestrations au niveau des vaisseaux laissant passer des protéines de différentes masses moléculaires.

Le réseau vasculaire rétinien est issu de l'artère centrale qui se subdivise en deux branches, supérieure et inférieure, donnant elles-mêmes naissance à deux branches, nasale et temporale. Ce système prend en charge l'apport en besoins métaboliques aux couches internes de la rétine. Artères et artérioles rétiniennes donnent naissance aux capillaires rétiniens. A l'opposé de ceux de la choriocapillaire, les capillaires rétiniens ne sont pas fenêtrés. Ce réseau vasculaire forme trois couches vasculaires au niveau de la rétine interne : la couche superficielle localisée au niveau des cellules ganglionnaires, la couche intermédiaire située au niveau de la couche plexiforme interne et la couche profonde située au niveau de la couche plexiforme externe de la rétine. Dans la couche superficielle, les artérioles sont prédominantes, alors que la couche profonde contient un plus grand nombre de veinules. La couche intermédiaire est formée de vaisseaux orientés perpendiculairement aux vaisseaux des couches superficielle et profonde. La majorité des microvaisseaux (environ 70%), ont tendance à orienter le flux artériolaire de la couche superficielle vers la couche profonde. De manière symétrique, la circulation veineuse provenant de la couche profonde, rejoint les

veines de la couche superficielle via les veinules de la couche intermédiaire (Figure 5) (Paques, Tadayoni et al. 2003).

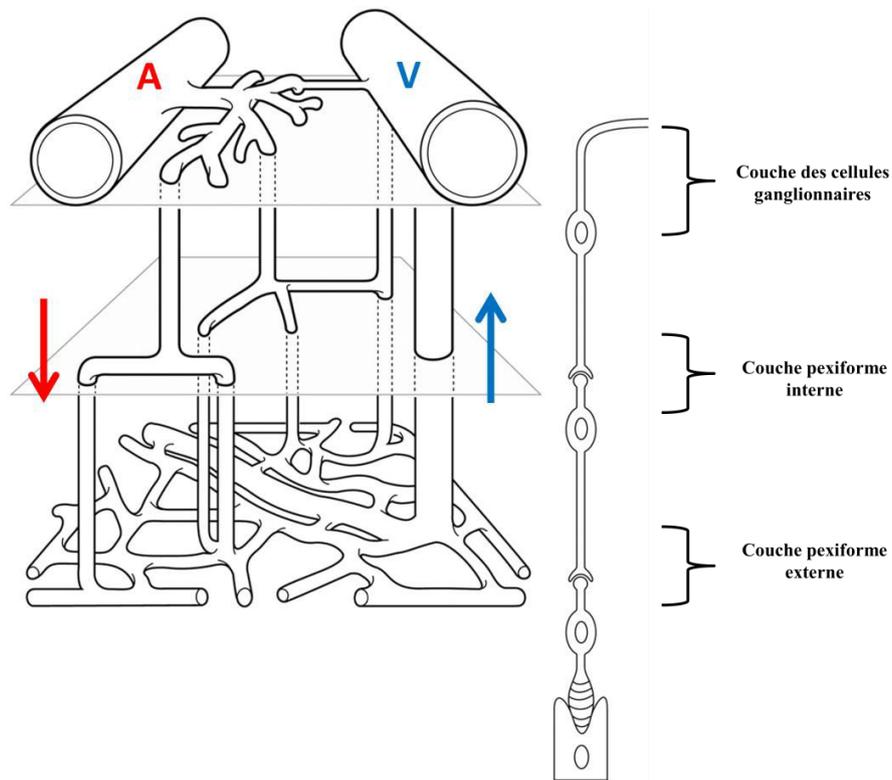


Figure 5. Représentation schématique de l'architecture vasculaire et de la circulation du sang de la rétine. A: artériole; V: veinule; flèches: circulation du sang. Figure adaptée de (Paques, Tadayoni et al. 2003)

Etant donnée la forte consommation en oxygène, la rétine est le tissu le plus vascularisé de l'organisme. La choriocapillaire, de par la taille de ses capillaires et la courte distance de l'artère à la veine, présente un débit sanguin très élevé; ceci permet le maintien d'une concentration suffisante en oxygène et la réduction de celle en dioxyde de carbone. Le réseau choroïdien permet de fournir environ 85% du débit sanguin oculaire total (Delaey and Van De Voorde 2000). Le débit sanguin choroïdien est régulé par une innervation du système nerveux sympathique. Contrairement à la choriocapillaire, la rétine est caractérisée par un débit sanguin faible et autorégulé, c'est-à-dire qu'elle ne possède pas d'innervation du système nerveux autonome. De par ce fait, le tonus vasculaire est régulé par des facteurs locaux. La modulation du débit sanguin rétinien est assurée par les cellules endothéliales et les neurones, qui produisent du monoxyde d'azote (NO), des prostaglandines, de l'endothéline et des

hormones circulantes comme l'angiotensine et les catécholamines (Delaey and Van De Voorde 2000).

La structure et l'arrangement des microvaisseaux de la rétine interne, ainsi que l'autorégulation du débit sanguin, permettent une irrigation adaptée aux changements de pression de perfusion et aux besoins métaboliques (Ben-Nun, Alder et al. 2000).

2- Les dystrophines

2-1 Historique

La dystrophie musculaire de Duchenne (**DMD**) a été décrite de manière détaillée en 1861 par le physiologiste Guillaume Benjamin Amand Duchenne (Tyler 2003). Cependant, les premières observations ont été rapportées par Edward Meyron et William John Little en 1853 (Emery and Emery 1993).

2-2 Le gène

Le gène DMD a été identifié et localisé sur le bras court du chromosome X au locus p21 en 1986 (Monaco, Neve et al. 1986). Avec 2.4 millions de paires de bases, il compte parmi les plus grands gènes connus et représente 0.1 % du génome total. Il est composé de 79 exons codant pour un ARN messager (ARNm) de 14 kilobase (Kb) séparés par d'énormes introns d'environ 200 Kb (Koenig, Hoffman et al. 1987). Seulement 0.6 % du gène code pour la protéine dystrophine (Figure 6A). Cette protéine permet le maintien de l'intégrité des fibres musculaires.

2-3 Pathologie

Différentes mutations retrouvées au sein du gène DMD sont responsables de la dystrophie musculaire de Duchenne, maladie qui touche l'ensemble des muscles de l'organisme (muscles cardiaques, squelettiques et lisses) et principalement les garçons avec une prévalence de 1 sur 3500 (Emery 1991). Cette maladie se caractérise par une dégénérescence musculaire entraînant une diminution progressive jusqu'à la perte de la force musculaire. Cette pathologie est aussi associée à des troubles respiratoires et cardiaques. Ces atteintes physiques peuvent être accompagnées de troubles d'ordre mental, ainsi que par des infarctus ischémiques corticales (Rosman and Kakulas 1966).

L'électrorétinogramme (ERG), permet d'évaluer l'activité électrique des neurones rétiniens en réponse à différents stimulus lumineux. Cet enregistrement est composé de plusieurs ondes, dont les deux principales sont l'onde a et l'onde b. Ces ondes représentent la durée et l'amplitude du signal électrique à travers la rétine, reflétant ainsi l'activité neuronale. L'onde a, qui est négative, représente l'hyperpolarisation des photorécepteurs. L'onde b, qui est positive, représente la dépolarisation des cellules bipolaires. Plusieurs petites ondes appelées potentiels oscillatoires, sont présentes au niveau de la partie ascendante de l'onde b et reflètent en partie l'activité électrique des cellules amacrines. Chez 80% des patients DMD, l'ERG en condition scotopique (adaptation à l'obscurité) montre une réduction de l'onde b (Pillers, Bulman et al. 1993). Au niveau oculaire, il a aussi été rapporté plusieurs cas de patients DMD présentant au fond de l'œil une rétinopathie proliférative avec des hémorragies rétiniennes et une néovascularisation (Louie, Apte et al. 2004, Fagan, Levy et al. 2012, Hahn, Lin et al. 2013).

2-4 Protéines codées par le gène DMD

Les protéines dystrophines sont nommées par l'abréviation Dp pour « *Dystrophin protein* », suivie du poids moléculaire de la protéine. L'expression du gène DMD est contrôlée par plusieurs promoteurs internes. Ce gène présente trois promoteurs tissus spécifiques (Musculaire, Cérébrale et cellules de Purkinje), codant pour un ARNm de 14 Kb pour les quatre produits longs de 427 kDa (Dp427). D'autres promoteurs internes sont à l'origine de différents produits courts (Figure 6B) :

- . La Dp260 est principalement exprimée dans la rétine, le cerveau et le muscle cardiaque (D'Souza, Nguyen et al. 1995).
- . La Dp140 est principalement exprimée dans le cerveau et le rein (Lidov and Kunkel 1997).
- . La Dp116 est exprimée dans les cellules de Schwann et est spécifique du système nerveux périphérique (Byers, Lidov et al. 1993).
- . La Dp71 est exprimée dans la plupart des tissus de l'organisme, sauf dans le muscle squelettique (Ahn and Kunkel 1993).

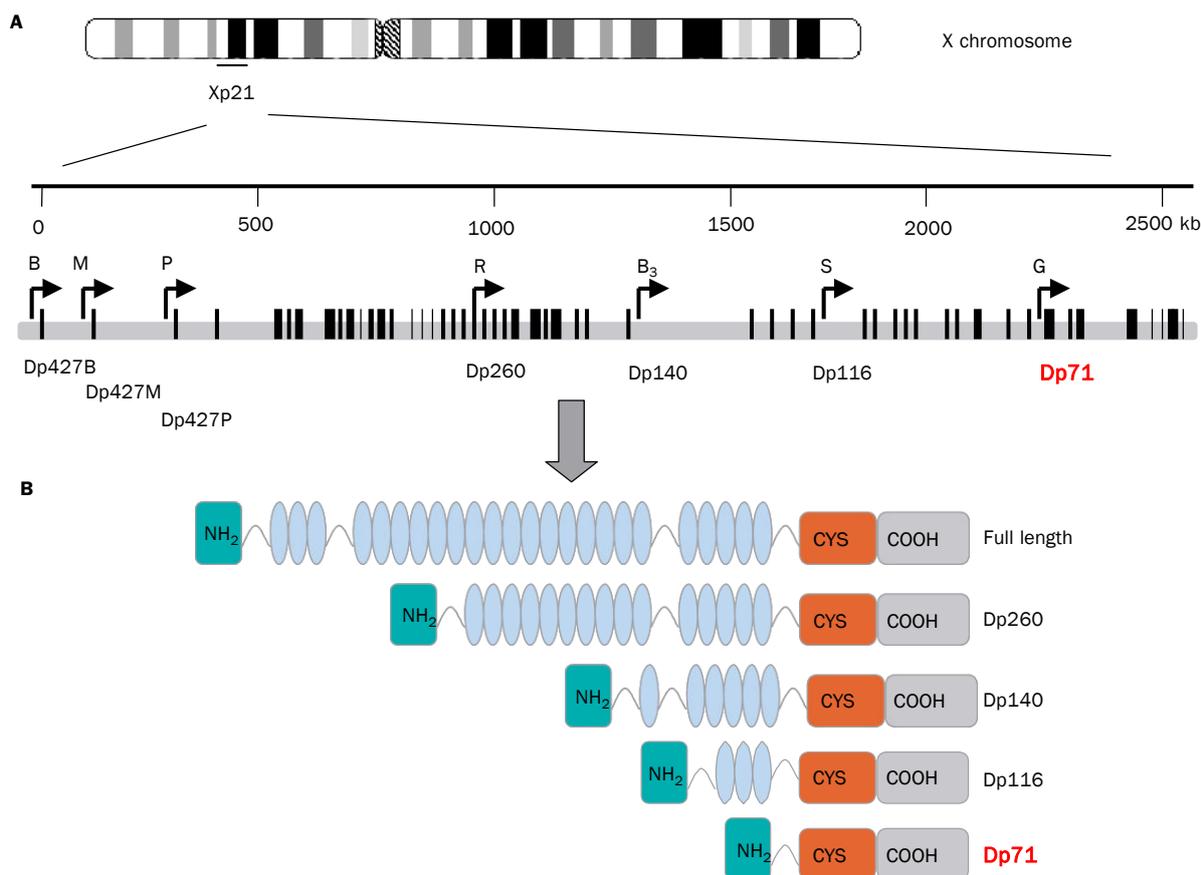


Figure 6. A, Représentation schématique du gène DMD. Les barres verticales représentent les 79 exons. Les flèches indiquent les différents promoteurs tissu spécifiques : Cérébral (B), musculaire (M), des cellules de Purkinje (P), de la rétine (R), des cellules de Schwann (S) et du promoteur général Dp71 (G) spécifique de plusieurs tissus, sauf le muscle. B, Les structures des différentes protéines dystrophines, codées par les différents promoteurs sont représentées. Le domaine N-terminal est suivie par le domaine « spectrin like », le domaine riche en cystéine et le domaine C-terminal (Muntoni, Torelli et al. 2003).

2-5 Structure de la protéine dystrophine

La protéine dystrophine est hydrophile et ne présente pas d'enchaînement d'acides aminés hydrophobes, et est localisée dans le cytoplasme, associée à la membrane cytoplasmique.

Cette protéine est composée de quatre domaines fonctionnels distincts (Figure 7) :

- Un domaine N-terminal de liaison aux filaments d'actines du cytosquelette (Renley, Rybakova et al. 1998, Orlova, Rybakova et al. 2001). Il comprend également deux sites d'interaction avec la calmoduline dénommés CaMBS1 et 2 (CaMBS : Calmodulin binding site) (Bonet-Kerrache, Fabrizio et al. 1994).

- Un domaine central composé de séquences répétées similaires à la structure triple hélice de la spectrine (Koenig, Monaco et al. 1988). Ce domaine contient aussi des zones charnières qui sont des séquences non répétées, riches en résidus proline, donnant à la dystrophine sa flexibilité.
- Un domaine riche en cystéines présentant des sites de liaisons au calcium, au zinc et au β -dytroglycane qui est une protéine transmembranaire.
- Le domaine C-terminal permet l'association de la dystrophine avec d'autres protéines, telles que la dystrobrevine et les syntrophines. Les mutations du domaine C terminal sont responsables des phénotypes les plus sévères (Hoffman, Garcia et al. 1991)

La structure de la dystrophine lui permet de faire le lien entre la matrice extracellulaire et l'actine du cytosquelette via le β - et l' α -dytroglycanes.

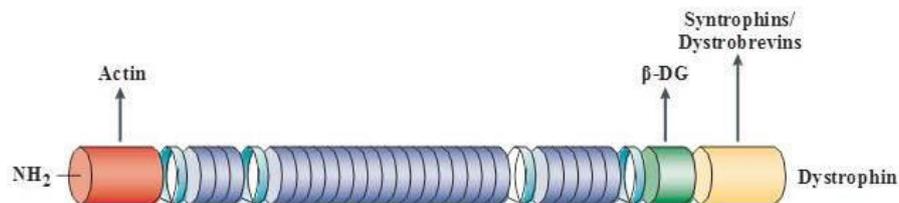


Figure 7. Structure de la protéine dystrophine (van Deutekom and van Ommen 2003).

3- La dystrophine Dp71

3-1 Les protéines associées à la dystrophine Dp71

La dystrophine Dp71 est associée à un complexe protéique localisé sous la membrane cytoplasmique. Ce complexe protéique est nommé « Dystrophin Associated Proteins » (DAPs) (Ehmsen, Poon et al. 2002).

Dans le cerveau, au niveau de l'hippocampe, le complexe associé à la Dp71 est composé de l' α -syntrophine, de l' α -dystrobrevine (Blake, Hawkes et al. 1999), du canal aqueux

aquaporine-4 (AQP4) (Neely, Amiry-Moghaddam et al. 2001) et du β -dytroglycane (Connors, Adams et al. 2004). Ce complexe a été localisé au niveau des astrocytes (Figure 8).

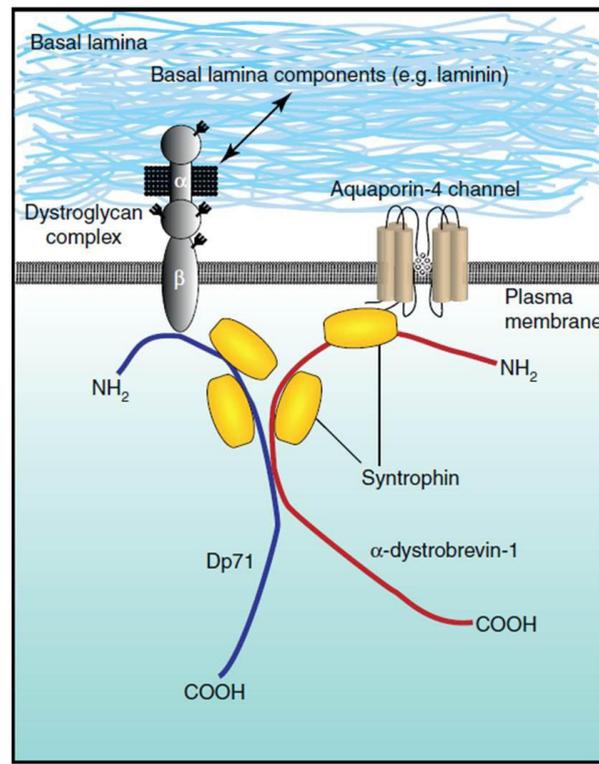


Figure 8. Représentation schématique du complexe Dp71-DAPs, localisé dans le cerveau, au niveau des prolongements des astrocytes entourant les vaisseaux sanguins (Waite, Brown et al. 2012).

Au niveau de la rétine ce complexe a été caractérisé au niveau des cellules gliales de Müller (CGM). Dans les CGM, la Dp71 est associée au β -dytroglycane (Montanaro, Carbonetto et al. 1995), à l' α -dytroglycane, au sarcoglycane, à l' α -syntrophine, à l' α -dystrobrevine, au canal potassique Kir4.1 et aqueux AQP4 (Claudepierre, Dalloz et al. 2000, Dalloz, Sarig et al. 2003) (Figure 9). Plus précisément, ce complexe associé à la protéine Dp71 a été caractérisé au niveau du pied des cellules gliales de Müller (Fort, Sene et al. 2008).

La protéine Dp71, de par sa localisation à la membrane et son association au β -dytroglycane (protéine du DAPs) qui se lie à la matrice extracellulaire via l' α -dytroglycane, permet le maintien de la structure de la membrane cytoplasmique. Ce complexe Dp71-DAPs présente

aussi un rôle dans la régulation de l'homéostasie ionique et aqueuse via le canal Kir4.1 et le canal AQP4 respectivement (Fort, Sene et al. 2008).

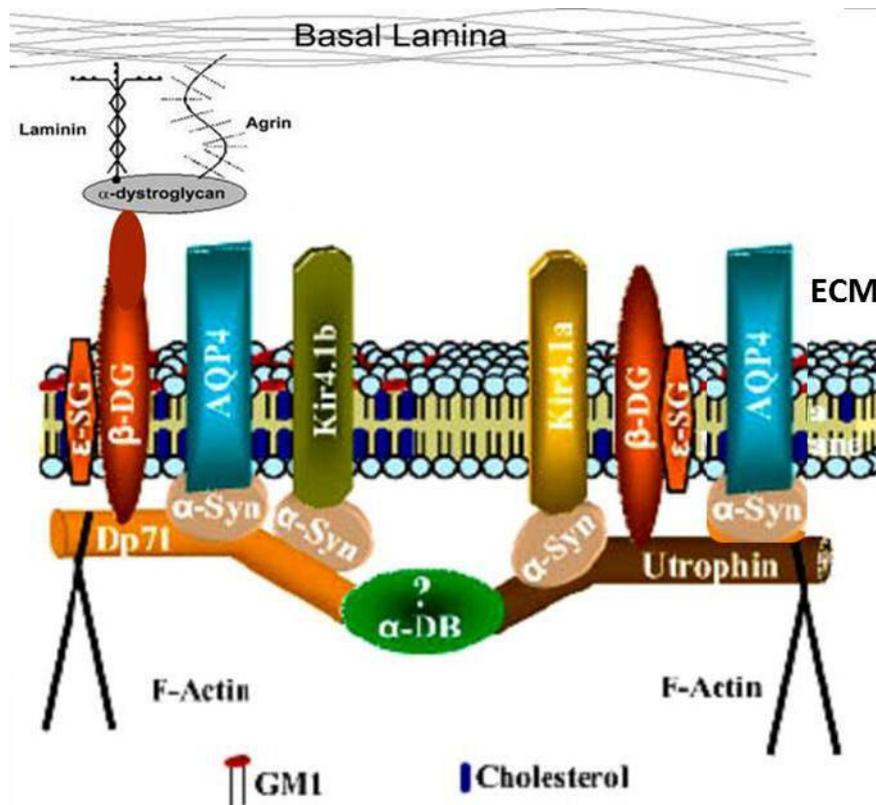


Figure 9. Représentation schématique du complexe Dp71-DAPs, localisé dans la rétine, au niveau des cellules gliales de Müller. Adaptée de (Fort, Sene et al. 2008).

3-2 Rôle de la Dp71 dans le cerveau

3-2.1 Dp71 et troubles cognitifs

La protéine Dp71 est la dystrophine majoritairement exprimée dans le cerveau. Des travaux ont montré que les patients DMD possédant des mutations affectant l'expression de la Dp71, présentent plus de troubles cognitifs que les patients DMD dont l'expression de la Dp71 n'est pas altérée (Daoud, Angeard et al. 2009).

La protéine Dp71 est fortement exprimée dans le gyrus dentelé de l'hippocampe, au niveau neuronal, dans les zones postsynaptiques (Gorecki and Barnard 1995, Jancsik and Hajos 1999). La délétion de la protéine Dp71 chez la souris Dp71-null, est à l'origine de

l'augmentation de la transmission glutamatergique associée à une réduction de la plasticité synaptique au niveau des neurones CA1 de l'hippocampe. De plus, une perte de l'apprentissage spatial et de la mémorisation, associée à une réduction du nombre des synapses excitatrices ainsi qu'à une altération morphologique de la zone postsynaptique ont été mis en évidence chez la souris Dp71-null (Daoud, Candelario-Martinez et al. 2009).

3-2.2 Dp71 et barrière hémato-encéphalique

La Dp71 est localisée spécifiquement dans la partie périvasculaire des astrocytes, participant ainsi à la mise en place et à la stabilisation de la barrière hémato-encéphalique (BHE) par la formation de l'unité gliovasculaire (Blake and Kroger 2000). La BHE exerce un contrôle au niveau des substances qui entrent dans l'encéphale, elle est imperméable aux protéines présentes dans le plasma ainsi qu'à de nombreuses molécules de grande taille, pouvant être potentiellement toxiques pour les neurones.

Chez la souris *mdx*, caractérisée par une délétion du gène permettant la synthèse de la dystrophine Dp427, l'expression de la Dp71 est fortement réduite dans le cerveau (Nico, Tamma et al. 2010). La structure et la fonction de la BHE sont fortement perturbées chez la souris *mdx*, avec une réduction de l'expression de la protéine zonula occludens-1 (ZO-1) qui participe à la formation des jonctions serrées entre les cellules endothéliales. Cette souris *mdx* présente aussi une réduction de l'expression du canal aqueux AQP4 localisé au niveau des astrocytes (Nico, Frigeri et al. 2003). La protéine AQP4 en association à la dystrophine Dp71 est impliquée dans l'homéostasie aqueuse et le maintien de la BHE (Nicchia, Nico et al. 2004) (Figure 10). En parallèle de ces anomalies structurelles et cellulaires, cette souris développe aussi une forte inflammation cérébrale, avec une augmentation de l'expression du facteur VEGF (vascular endothelial growth factor), ainsi qu'une surexpression de son récepteur de type 2, le VEGFR2 (Nico, Corsi et al. 2002). De plus, les métalloprotéinases matricielles,

MMP-2 et MMP-9 impliquées dans l'altération de la BHE, sont surexprimées chez la souris *mdx* (Nico, Corsi et al. 2006). Toutes ces anomalies pourraient participer à l'augmentation de la perméabilité vasculaire trouvée chez la souris *mdx* (Nico, Frigeri et al. 2003).

En résumé, l'ensemble de ces travaux montrent l'importance de la protéine Dp71, puisque la réduction de son expression provoque des altérations synaptiques ainsi qu'une rupture de la BHE associée à une inflammation.

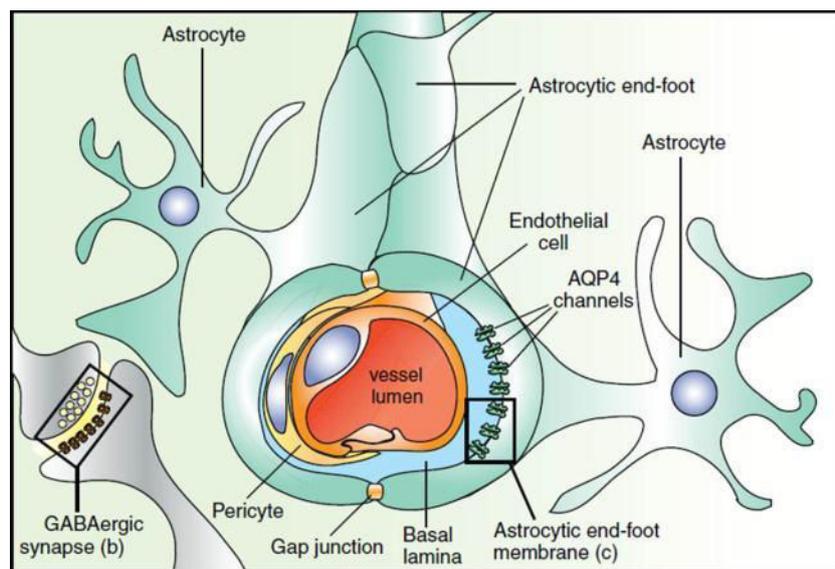


Figure 10. Représentation schématique de la barrière hémato-encéphalique (Waite, Brown et al. 2012).

4- Structure et propriété de la barrière hémato-rétinienne

La barrière hémato-rétinienne (BHR) possède une structure similaire à celle trouvée dans la barrière hémato-encéphalique (BHE). La BHR empêche le passage de cellules et de molécules provenant de la circulation sanguine, préservant ainsi l'homéostasie et l'intégrité de la rétine. La rétine est protégée par deux barrières hémato-rétiniennes : externe et interne.

La BHR externe est représentée par l'épithélium pigmentaire rétinien (EPR), qui sépare la rétine de la choriocapillaire. L'EPR est séparé de la choriocapillaire par la membrane de Bruch, qui protège la rétine de l'envahissement par les vaisseaux de la choriocapillaire. De

plus, la membrane de Bruch permet de réguler la diffusion de certaines molécules entre la choriocapillaire et l'EPR.

La BHR interne est formée par des cellules endothéliales unies entre elles par trois types de jonctions : les jonctions serrées étanches, adhésives d'ancrages et gap communicantes (Klaassen, Van Noorden et al. 2013).

Les jonctions serrées sont formées par des protéines de type claudines et occludines, qui sont reliées au cytosquelette d'actine via les protéines de type zonula occludens (ZO). Les péricytes participent aussi à la stabilisation de la jonction entre les cellules endothéliales (Armulik, Genove et al. 2011). De plus, les péricytes jouent un rôle important dans la régulation du débit sanguin, par l'intermédiaire de leurs propriétés contractiles (Wu, Kawamura et al. 2003).

Les cellules gliales participent à la formation et à la stabilisation de la BHR. Les astrocytes forment et stabilisent la BHR, en entourant les vaisseaux présents au niveau de la couche des cellules ganglionnaires et des fibres nerveuses (Schnitzer 1987). Les cellules microgliales interagissent aussi avec les cellules endothéliales et sont activées lors de la survenue d'une inflammation vasculaire rétinienne (Kuiper, Witmer et al. 2004). Les cellules gliales de Müller quant à elles projettent des prolongements qui entourent l'ensemble des vaisseaux de la rétine, ce qui leur confère un rôle majeur dans la formation et le maintien de la BHR (Tout, Chan-Ling et al. 1993) (Figure 11).

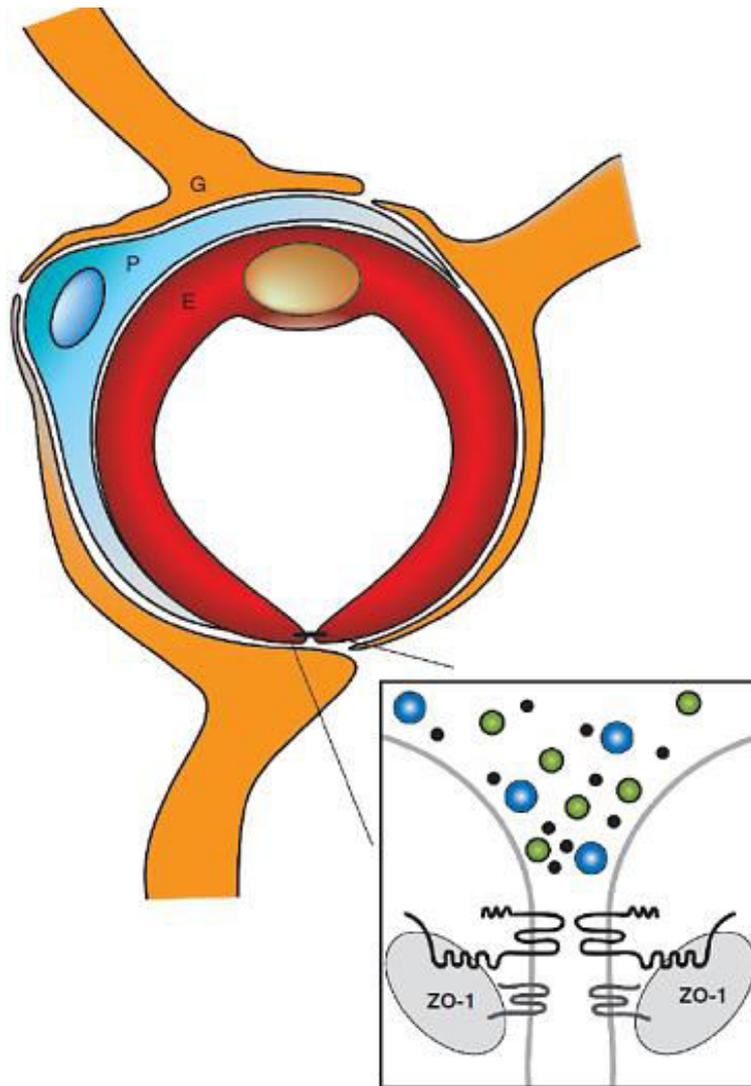


Figure 11. Représentation schématique de la barrière hémato-rétinienne. E: cellule endothéliale; P: péricyte ; G: prolongements des cellules gliales ; ZO: protéine zonula occludens. (David A. Antonetti et al, 2008) http://rd.springer.com/chapter/10.1007/978-1-59745-563-3_14.

La perméabilité vasculaire due à la rupture de la BHR et à l'œdème maculaire sont les causes majeures de perte de la vision dans les principales maladies oculaires telles que la rétinopathie diabétique, la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA), l'occlusion veineuse rétinienne (OVR) et l'uvéite. De plus, en conditions pathologiques, la sécrétion de cytokines inflammatoires et de VEGF sont à l'origine de la perméabilité vasculaire rétinienne (Joussen, Poulaki et al. 2004).

5- L'inflammation rétinienne et pathologies associées

L'inflammation est un mécanisme de défense de l'organisme en réponse à une agression, dans le but de limiter et d'activer le processus de réparation des dommages provoqués dans les tissus vascularisés. En réponse à une lésion, le tissu déclenche une réponse inflammatoire par la libération de divers médiateurs. Cette réponse provoque une vasodilatation des vaisseaux et une augmentation de la perméabilité vasculaire, ce qui entraîne une diffusion des protéines plasmatiques vers le tissu. Cette fuite vasculaire est suivie par une migration des leucocytes du sang vers le site de la lésion.

L'inflammation est un phénomène physiologique bénéfique, puisque très rapidement après une lésion, la réponse inflammatoire est amorcée pour permettre une guérison spontanée. Dans ce cas on parle d'inflammation aiguë. Cependant, lorsque cette inflammation persiste, elle devient chronique et néfaste pour le tissu. L'inflammation rétinienne se caractérise par une augmentation de l'expression de facteurs inflammatoires, une perméabilité vasculaire accrue et un recrutement des leucocytes. Cette inflammation est aussi associée à une dégénérescence des capillaires rétiens.

5-1 Les médiateurs de l'inflammation

5-1.1 Le TNF- α

Le tumor necrosis factor- α (TNF- α) est une cytokine pro-inflammatoire produite par les macrophages, les cellules microgiales et les cellules gliales de Müller (Cotinet, Goureau et al. 1997, Rao, Kimoto et al. 2003, Couturier, Bousquet et al. 2014). Le TNF- α est impliqué dans la pathogénèse de la néovascularisation rétinienne expérimentale, la vitréorétinopathie proliférative, et l'œdème maculaire (Limb, Hollifield et al. 2001, Grant, Afzal et al. 2004, Theodossiadis, Markomichelakis et al. 2007). Il a été démontré que le TNF- α induit l'apoptose des cellules endothéliales dans la rétinopathie diabétique (Joussen, Doehmen et al.

2009). Des augmentations des taux de TNF- α , d'IL-1 β , et d'autres médiateurs de l'inflammation ont été mesurées dans le vitré de patients présentant une rétinopathie diabétique (Demircan, Safran et al. 2006). Le TNF- α est responsable du recrutement des leucocytes et de l'induction de l'expression de facteurs inflammatoires. L'administration sous-cutanée d'un récepteur TNF- α soluble, qui agit comme inhibiteur compétitif pour bloquer les effets du TNF- α se liant aux cellules, réduit le recrutement des leucocytes dans les vaisseaux sanguins de la rétine et la rupture de la barrière hémato-rétinienne chez le rat diabétique (Joussen, Poulaki et al. 2002, Joussen, Doehmen et al. 2009). L'injection intravitréenne d'un autre inhibiteur du TNF- α , conduit à une réduction significative de la perte des péricytes et de la dégénérescence des capillaires chez le rat diabétique (Behl, Krothapalli et al. 2008, Behl, Krothapalli et al. 2009). De plus, les souris génétiquement déficientes en TNF- α présentent une réduction de la perméabilité vasculaire et du recrutement des leucocytes, induits par le diabète (Huang, Gandhi et al. 2011). Chez l'homme, des taux élevés de TNF- α et de VEGF ont été mesurés dans le vitré de patients présentant un détachement rétinien (Rasier, Gormus et al. 2010).

L'inhibition du VEGF produit par les cellules gliales de Müller, diminue de manière significative l'expression du TNF- α et d'ICAM-1 chez des souris diabétiques (Wang, Xu et al. 2010).

5-1.2 Le VEGF et ses récepteurs

Le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire, VEGF (Vascular endothelial growth factor) est un médiateur de l'angiogenèse par l'activation de la migration, de la prolifération et de la survie des cellules endothéliales. La famille du VEGF est constituée par le VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E et du placental growth factor (PlGF) (Takahashi and Shibuya 2005, Otrrock, Makarem et al. 2007). Parmi les différents membres de la famille du

VEGF, le VEGF-A est le plus étudié, c'est une protéine cruciale dans la régulation de l'angiogenèse et de la perméabilité vasculaire (Shams and Ianchulev 2006). Il est impliqué dans la pathogenèse de diverses maladies oculaires, telles que la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA), l'occlusion veineuse rétinienne (OVR) et la rétinopathie diabétique (RD) (Shams and Ianchulev 2006). En raison de l'épissage alternatif, il existe au moins neuf isoformes différentes du VEGF-A, mais certaines isoformes, comme le VEGF-A165, jouent un rôle plus important dans la pathogenèse des maladies oculaires (Usui, Ishida et al. 2004). Le VEGF-A joue un rôle important dans l'angiogenèse pathologique, en induisant une néovascularisation dans la rétinopathie proliférative et en augmentant la perméabilité vasculaire dans l'œdème maculaire diabétique (Shams and Ianchulev 2006). Le VEGF se lie avec une forte affinité et active deux récepteurs à activité tyrosine kinase, le VEGFR-1 (Flt-1) et VEGFR-2 (KDR/Flk-1). Ces récepteurs régulent l'angiogenèse physiologique et pathologique (Shibuya 2006). Le VEGFR-1 se lie au VEGF-A avec une affinité 10 fois plus grande que le VEGFR-2, mais agit essentiellement comme un séquestreur de ligand, ce qui limite la quantité de VEGF-A qui peut accéder au VEGFR-2 présent à la surface des cellules endothéliales (Roberts, Kearney et al. 2004).

5-1.2.1 VEGF et cellules gliales de Müller

De nombreuses études ont démontrées que dans la rétine, le VEGF est principalement exprimé par les cellules gliales de Müller, les cellules endothéliales, les astrocytes, l'épithélium pigmentaire rétinien (EPR) et les cellules ganglionnaires (Aiello, Northrup et al. 1995, Pierce, Avery et al. 1995, Stone, Itin et al. 1995, Stone, Chan-Ling et al. 1996, Miller, Adamis et al. 1997). Il est maintenant bien établi que la cellule gliale de Müller, est la principale source de VEGF et est responsable de sa modulation dans la rétinopathie diabétique. En effet, en réponse à l'hypoxie, les cellules gliales de Müller sécrètent de grandes quantités de VEGF (Aiello, Northrup et al. 1995). En outre, il a été montré que la délétion

conditionnelle du VEGF dérivant des cellules gliales de Müller diminue de manière significative le recrutement des leucocytes, l'inflammation vasculaire rétinienne et la fuite vasculaire dans le modèle de souris diabétique (Wang, Xu et al. 2010).

Une étude réalisée chez le singe a montré que des injections intravitréennes répétées de VEGF, induisent une dilatation et une tortuosité des vaisseaux, un œdème, des micro-anévrismes, des hémorragies intrarétiniennes, ainsi qu'une occlusion des capillaires associée à une ischémie (Tolentino, Miller et al. 1996). De plus, le taux de VEGF intravitréen est élevé chez les patients présentant une rétinopathie diabétique (Aiello, Avery et al. 1994). L'œdème maculaire chez ces patients peut être considérablement réduit par l'administration intravitréenne d'un anti-VEGF (Diabetic Retinopathy Clinical Research, Elman et al. 2010).

Il a été démontré que le VEGF stimule l'expression de la molécule d'adhésion intracellulaire-1 (ICAM-1) (Kim, Moon et al. 2001).

5-1.3 Recrutement des leucocytes et ICAM-1

Le recrutement et la migration des leucocytes neutrophiles est un phénomène primordial de l'inflammation. Lors d'une réponse inflammatoire, les neutrophiles quittent la circulation et migrent à travers le vaisseau sanguin pour atteindre le tissu lésé dans le but d'enclencher la réparation tissulaire. Cependant, dans certaines pathologies, le recrutement massif des leucocytes est responsable des dommages tissulaires.

En réponse à l'inflammation, les cellules endothéliales ainsi que les leucocytes expriment des molécules d'adhésions cellulaires à leurs surfaces. Les principales molécules d'adhésions sont les sélectines, les intégrines et les immunoglobulines. La forte expression de ces molécules d'adhésion favorise l'attachement des leucocytes à l'endothélium.

Le recrutement des leucocytes au site de la lésion se réalise en quatre étapes successives : attachement et roulement, activation, adhésion ferme et diapédèse. La première étape consiste en une interaction entre les leucocytes et les cellules endothéliales, généralement réalisée par l'intermédiaire des sélectines qui induisent l'attachement et le roulement. Ces interactions sont faibles. Des cytokines chimiotactiques à la surface des cellules endothéliales induisent l'activation des leucocytes, ce qui conduit à des changements de conformation dans les molécules d'intégrines permettant une adhésion ferme entre l'endothélium et les leucocytes par l'intermédiaire de l'immunoglobuline ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecule-1) exprimée à la surface des cellules endothéliales. La diapédèse permettant l'insertion des leucocytes entre les cellules endothéliales et le passage vers le tissu rétinien, peut alors avoir lieu (Figure 12).

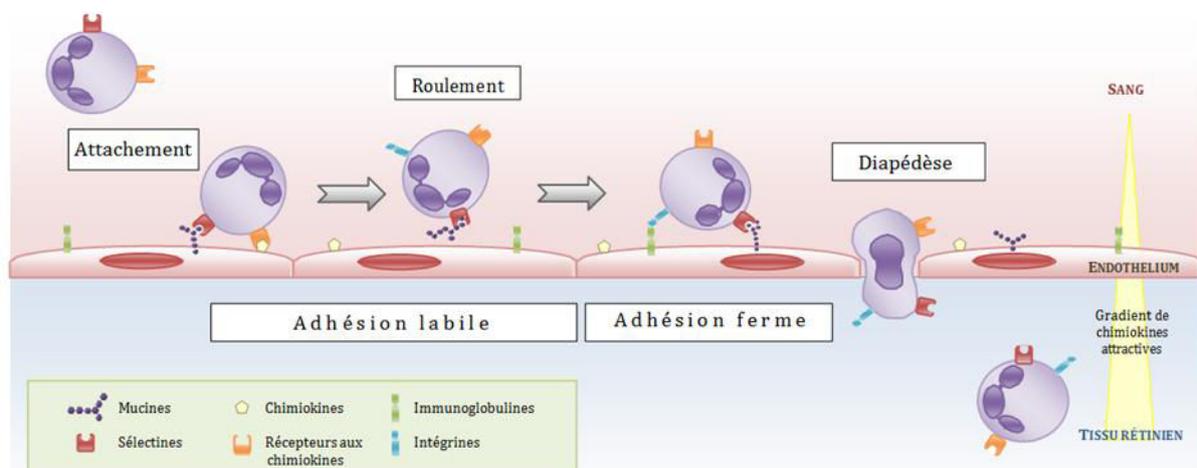


Figure 12. Représentation schématique du recrutement des leucocytes au site inflammatoire.
<http://www.cours-pharmacie.com/immunologie/limmunite-innee.html>.

L'expression d'ICAM-1 est fortement augmentée à la surface des cellules endothéliales en réponse à un stimulus inflammatoire (Hubbard and Rothlein 2000). ICAM-1 est le ligand majeur des intégrines $\beta 2$ (LFA-1 et Mac-1) sur l'endothélium lors d'une inflammation. Cette

liaison d'ICAM-1 a pour conséquence l'augmentation de la sécrétion de cytokines et de protéines membranaires (Hubbard and Rothlein 2000).

Fait intéressant, il a été montré que le VEGF augmente l'expression d'ICAM-1 dans l'endothélium des capillaires rétiens et l'injection intra-vitréenne de VEGF régule à la hausse l'expression d'ICAM-1 dans la rétine (Lu, Perez et al. 1999). Cette surexpression d'ICAM-1 dans les vaisseaux de la rétine et l'infiltration des leucocytes ont été observées dans les yeux post-mortem humains de patient avec une rétinopathie diabétique (McLeod, Lefer et al. 1995). De plus, l'inhibition d'ICAM-1 réduit l'adhésion des leucocytes et la fuite vasculaire dans le modèle rat de rétinopathie diabétique (McLeod, Lefer et al. 1995).

L'adhésion des leucocytes a été montrée comme étant un contributeur de l'occlusion et de la dégénérescence des vaisseaux sanguins dans la rétine diabétique (McLeod, Lefer et al. 1995).

5-1.4 Dégénérescence des capillaires rétiens

Le recrutement excessif des leucocytes et l'activation de leurs adhésions aux vaisseaux rétiens avec obstruction ultérieure du système vasculaire est un événement pathologique déterminant dans de nombreuses maladies rétiennes pouvant entraîner une perte de la vision. Les processus inflammatoires sont à l'origine de beaucoup d'altérations vasculaires de la rétine observées histologiquement dans la rétinopathie diabétique précoce, telles que la perte des péricytes, les micro-anévrysmes, et la non-perfusion et la dégénérescence des capillaires (De Venecia, Davis et al. 1976) (Figure 13). De plus, dans le modèle de rat diabétique, au niveau des zones d'occlusions des capillaires rétiens, les lésions des cellules endothéliales et la perte des capillaires sont étroitement associées avec l'adhésion leucocytaire (Schroder, Palinski et al. 1991, Meleth, Agron et al. 2005). Il a été montré que le singe diabétique présente une occlusion des capillaires rétiens associée à une augmentation de l'adhésion leucocytaire (Kim, Johnson et al. 2005). En effet dans cette étude, un nombre élevé

de leucocytes intravasculaires ont été détectés à proximité des zones de capillaires non-perfusés dans les rétines de singes diabétiques. En outre, l'ischémie transitoire de la rétine dans un modèle aiguë de lésion par ischémie-reperfusion chez le rat conduit à la dégénérescence des capillaires rétiens (Zheng, Gong et al. 2007, Wang, Li et al. 2011).

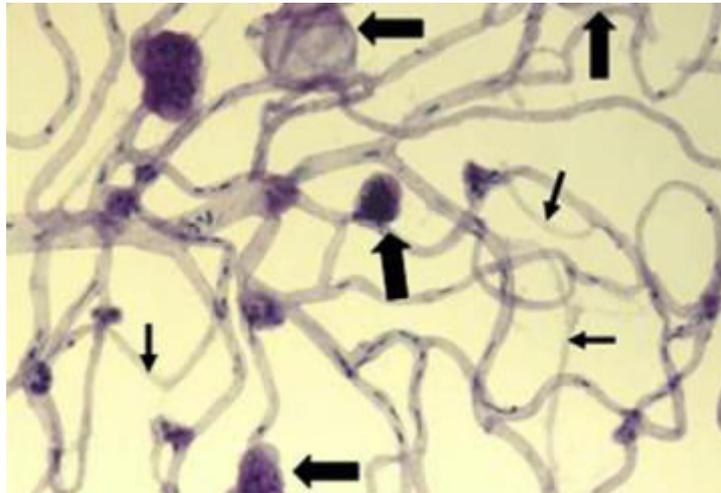


Figure 13. Microvaisseaux rétiens isolés d'un patient diabétique montrant de nombreux micro-anévrysmes (flèches épaisses) et des capillaires dégénérés (flèches minces). (Tang and Kern 2011)

5-1.5 Les médiateurs de l'inflammation dérivés des lipides

Les médiateurs lipidiques sont synthétisés à partir des phospholipides membranaires. En effet, l'hydrolyse des phospholipides par la phospholipase A2 (PLA2), entraîne la libération d'acides gras libres et de lysophospholipides. Parmi ces acides gras libres, l'acide arachidonique (AA) est le précurseur commun des médiateurs inflammatoires de la famille des eicosanoïdes comprenant, les prostaglandines, les leucotriènes, les thromboxanes ainsi que les lipoxines. La synthèse de l'ensemble de ces médiateurs inflammatoires à partir de l'AA se fait via deux voies : la voie de la cyclooxygénase (COX) et celle de la lipoxygénase (LO).

La voie de la lipoxygénase assure la synthèse de leucotriènes (LTB4, LTC4, LTD4 et LTE4) et de lipoxines (LXA4 et LXB4) via le métabolisme de l'AA par l'action de l'enzyme 5-lipoxygénase. Cette enzyme est présente dans les cellules inflammatoires, telles que les neutrophiles, les macrophages et les lymphocytes. Ces cellules assurent la synthèse de

leucotriènes en réponse à de nombreux stimuli inflammatoires incluant le lipopolysaccharide (LPS) et les cytokines. Lors de l'activation des leucocytes, le LTA₄ est libéré à proximité des cellules endothéliales pour être par la suite transformé en LTC₄ et LTD₄ par l'endothélium. La 5-lipoxygénase, en collaboration avec la 12-lipoxygénase, permet la synthèse de lipoxines. Une synthèse efficace de leucotriènes par la 5-lipoxygénase, nécessite la présence d'une protéine appelée « 5-LO activating protéine » (FLAP). La protéine FLAP est codée par le gène ALOX5AP (Arachidonate 5-lipoxygenase Activating Protein) (Byrum, Goulet et al. 1997).

La voie de la cyclooxygénase implique le concours de deux enzymes, COX-1 et COX-2. L'enzyme COX-1 est produite de manière constitutive dans la majorité des tissus de l'organisme et est nécessaire par exemple à la protection du tube digestif. Alors que la COX-2 est surexprimée en réponse à divers stress cellulaires et stimuli inflammatoires, tels que le LPS, IL-1 β et le TNF- α (Simon 1999). À l'inverse de COX-1, COX-2 est associée à de nombreux processus pathologiques (cancer, maladie d'Alzheimer, inflammation chronique, douleur) (Andreasson, Savonenko et al. 2001, Lee, Rodriguez et al. 2005, Shao, Guo et al. 2014). Ces enzymes sont à l'origine de la synthèse des prostaglandines (PGD₂, PGE₂ et PGF₂ α), de la prostacycline (PGI₂) et du thromboxane A₂ (TXA₂). Les prostaglandines sont responsables de la vasodilatation et du recrutement leucocytaire associés au processus inflammatoire.

Il a été démontré chez la souris transgénique 5-LO KO que la délétion du gène codant pour l'enzyme 5-lipoxygénase protège contre la perte des capillaires rétiniens induite par le diabète (Gubitosi-Klug, Talahalli et al. 2008). De plus, la production de leucotriène est augmentée dans la rétine de souris diabétiques (Talahalli, Zarini et al. 2010).

Dans les stades avancés de la rétinopathie diabétique, l'enzyme COX-2 a été identifiée dans les cellules endothéliales vasculaires des membranes épitréiniennes fibrovasculaires prélevées chez des patients diabétiques (El-Asrar, Missotten et al. 2008). De plus, la prostaglandine PGE2 est surexprimée par les cellules gliales de Müller exposées à des niveaux élevés de glucose (Du, Sarthy et al. 2004).

5-1.6 Bcl-2

L'apoptose est une mort cellulaire programmée fortement régulée, qui est nécessaire à la mort cellulaire naturelle et à la survie des organismes multicellulaires. Cependant, lorsque ce mécanisme d'apoptose est dérégulé, cela mène à l'accumulation néfaste de cellules. Cette dérégulation est à l'origine des cancers humains.

L'apoptose est activée par des protéines de la famille « B-cell lymphoma 2 » (Bcl-2). Cette famille est composée de trois groupes protéiques caractérisés par un domaine d'homologie structurale, BH (Bcl-2 homology). Tout d'abord, i) le groupe des protéines anti-apoptotiques est composé par Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1, Bcl-w, qui comprend quatre domaines BH; ii) Le groupe des protéines apoptotiques Bax et Bak, qui possède trois domaines BH; et iii) le groupe protéique caractérisé par un seul domaine BH, composé par Bad, Bid, Bim.

L'apoptose peut être activée par deux voies : intrinsèque et extrinsèque. La voie intrinsèque est activée par des stress cellulaires tels que la perte de l'attachement cellulaire, le défaut de facteurs de croissances, l'hypoxie ou la cytotoxicité. Cette voie provoque l'activation de Bax et Bak, qui induisent la perméabilisation de la membrane mitochondriale, entraînant la libération du cytochrome C qui forme l'apoptosome. Cet apoptosome enclenche l'activation des caspases responsables de l'apoptose. La voie extrinsèque est activée par des récepteurs dits « de mort » tels que la famille des Fas et le TNF- α . L'activation de ces récepteurs entraîne l'induction des caspases conduisant à la protéolyse, ainsi qu'à la fragmentation de l'ADN.

Le facteur anti-apoptotique Bcl-2 est exprimé dans la rétine et a été détecté dans les cellules gliales de Müller rétinienne humaines (Grosche, Hartig et al. 1995, Mizutani, Gerhardinger et al. 1998). Bcl-2 agit en préservant l'intégrité mitochondriale (Adams and Cory 1998). Il a été rapporté que le VEGF induit l'expression de Bcl-2 (Gerber, Dixit et al. 1998, Nor, Christensen et al. 1999). La surexpression de Bcl-2 dans l'endothélium vasculaire inhibe les lésions microvasculaires de la rétinopathie diabétique chez la souris diabétique (Kern, Du et al. 2010).

5-1.7 AQP4

Les aquaporines (AQP) sont des canaux membranaires permettant le passage de l'eau, qui jouent un rôle essentiel dans la régulation du volume cellulaire et par conséquent dans l'homéostasie et le volume cérébral et rétinien. Elles ont été découvertes dans des organismes aussi divers que les bactéries, les plantes, les insectes et les mammifères (Agre, Sasaki et al. 1993). La famille des AQPs est composée de 13 membres (AQP0–AQP12) chez les mammifères (King, Kozono et al. 2004, Verkman 2005). Les AQPs sont retrouvées dans la plupart des types cellulaires et résident de manière constitutive à la membrane cytoplasmique.

L'aquaporine 4 (AQP4) est le canal aqueux le plus abondant dans le cerveau et la rétine. Ce canal est impliqué dans la pathogenèse de l'œdème de divers traumatismes cérébraux (Papadopoulos, Krishna et al. 2002, Venero, Machado et al. 2004). Ce canal AQP4 est exprimé dans les pieds et au niveau de l'extrémité périvasculaire des cellules gliales de Müller et des astrocytes dans la rétine interne, ce qui facilite le flux d'eau au niveau des interfaces glio-vasculaires et glio-vitréennes (Nagelhus, Veruki et al. 1998, Da and Verkman 2004, Bosco, Cusato et al. 2005).

La co-localisation du canal AQP4 avec le canal potassique rectifiant entrant Kir4.1 dans des domaines membranaires distincts de la cellule gliale de Müller a conduit à suggérer que le

transport de l'eau est couplé à des courants potassiques à tamponnage spatial circulant à travers les cellules gliales de Müller (Nagelhus, Horio et al. 1999). De plus il a été montré par co-immunoprécipitation qu'AQP4 et Kir4.1 font partie du complexe DAPs (protéines associées à la dystrophine) (Connors, Adams et al. 2004, Connors and Kofuji 2006). Ces deux canaux sont associés à la Dp71 et ont été localisés au niveau des prolongements entourant les vaisseaux des cellules gliales de Müller et dans les pieds de ces mêmes cellules gliales (Fort, Sene et al. 2008).

La délétion du gène codant l'AQP4 chez la souris réduit significativement l'œdème rétinien et la mort cellulaire après une ischémie (Da and Verkman 2004). Pannicke et al, ont démontré que l'expression de facteurs inflammatoires est augmentée dans la rétine de souris knock-out AQP4 (Pannicke, Wurm et al. 2010). Chez les rats diabétiques obtenus par injection de streptozotocine (STZ) et des rats spontanément diabétiques, l'expression d'AQP4 est augmentée dans la rétine (Fukuda, Nakanishi et al. 2010, Zhang, Xu et al. 2011)..

6- Les modèles animaux d'étude de la Dp71 dans la rétine

Il existe plusieurs modèles d'étude murins de la DMD tels que les souris déficientes pour la Dp427 (mdx), Dp427 et Dp260 (mdx^{2cv}), ou Dp427, Dp260 et Dp140 (mdx^{4cv}).

La souris mdx présente une délétion de la protéine Dp427, mais aussi une forte réduction de la Dp71 dans le cerveau (Nico, Tamma et al. 2010). De plus, une étude réalisée par notre équipe, chez la souris mdx, ne montre pas de réduction de l'expression de la Dp71 dans la rétine (résultat non publié).

Les deux principaux modèles d'étude de la fonction de la protéine Dp71, présentant une réduction ou une perte totale de l'expression de la Dp71 dans la rétine, sont, respectivement, la souris mdx^{3cv} et la Dp71-null.

6-1 La souris mdx^{3Cv}

La souris mdx^{3Cv} a été obtenue suite à une expérience de mutagenèse chimique utilisant l'éthylnitrosourée (ENU). Cette souris possède un point de mutation dans l'intron 65 (Cox, Phelps et al. 1993).

La souris mdx^{3Cv} est la seule souche parmi les modèles murins déficients en dystrophines, présentant une mutation entraînant une diminution très importante de tous les produits du gène DMD, dont la Dp71 (Daloz, Claudepierre et al. 2001). De plus, c'est la seule souche qui possède une altération de l'onde b de l'ERG similaire à celle observée chez les patients DMD (Pillers, Weleber et al. 1995). Il a été montré que la souris mdx^{3Cv} présente au niveau rétinien une disparition de la protéine β -dystroglycane dans la couche plexiforme externe, cependant cette protéine est toujours présente au niveau de la membrane limitante interne et autour des vaisseaux rétiens (Blank, Koulen et al. 1999, Daloz, Claudepierre et al. 2001). De plus, une étude de l'angiogenèse rétinienne menée chez la souris mdx^{3Cv} nous a permis de mettre en évidence un retard de vascularisation rétinienne chez cette souris comparée à la souris contrôle. Ce retard persiste jusqu'à l'âge postnatal 6 (P6, six jours après la naissance) (Tadayoni et al, article en préparation).

6-2 La souris Dp71-null

Le promoteur et le premier exon de la Dp71 sont situés dans l'intron 62 du gène DMD. La souris Dp71-null a été obtenue par le remplacement, par recombinaison homologe, de la majeure partie du premier et unique exon de la Dp71 et de la petite partie du premier intron de la Dp71 avec la séquence codant pour une protéine chimère β -gal-néomycine-résistance (β -geo) sans promoteur (Sarig, Mezger-Lallemand et al. 1999) (Figure 14).

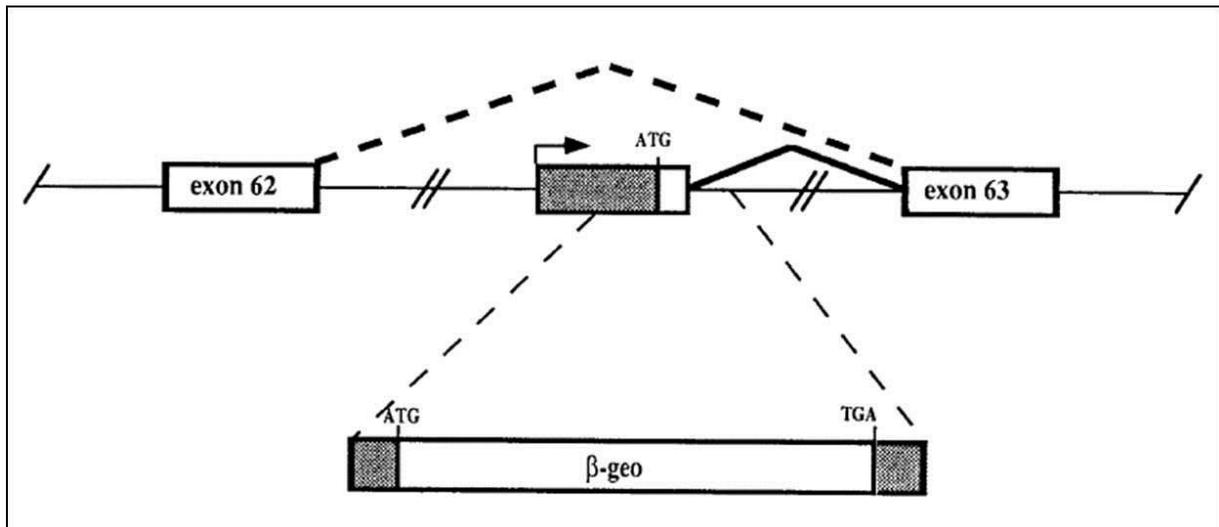


Figure 14. Le remplacement d'une partie du premier exon du gène de la Dp71 par le gène β -geo. Le premier exon et unique de la Dp71 et l'initiation de la transcription de la Dp71 (flèche coudée) sont situés dans l'intron entre les exons 62 et 63 du gène de la DMD. Les cadres indiquent les exons. Les parties sombres, les régions 5'- ou 3'-non traduites; parties vides, les régions traduites; les lignes fines horizontales, les introns (pas à l'échelle). Les lignes en gras indiquent les deux épissages alternatifs: trait gras continu, l'épissage de la transcription initiée par le promoteur de la Dp71; ligne en gras pointillé, l'épissage des transcrits initiés en amont (tous les autres produits connus du gène DMD). ATG, codon d'initiation de la Dp71 chez les souris contrôles; TGA, codon stop du gène chimérique de la β -gal-néomycine (β -géo). Le gène β -geo inséré est décrit schématiquement ci-dessus. Le remplacement est indiqué par des lignes fines pointillées.

7- Rôle de la Dp71 dans la rétine

La Dp71 est la dystrophine majoritairement exprimée dans le cerveau et la rétine. Pour étudier le rôle de la Dp71 nous avons utilisé la souris Dp71-null qui permet, à la différence des autres modèles, d'avoir une délétion de la seule protéine Dp71.

7-1 Localisation de la Dp71 dans la rétine

La protéine Dp71 a été localisée autour des vaisseaux rétiens, au niveau de la membrane limitante interne et dans la couche des photorécepteurs (Claudepierre, Dalloz et al. 2000) (Figure 15). La localisation rétinienne de la protéine Dp71 a été réalisée par l'utilisation d'un anticorps pan-spécifique H4 (qui marque l'ensemble des dystrophines). Cette localisation a été déduite par la comparaison de coupes de rétines de souris contrôles et de souris Dp71-null.

Nous pouvons observer en figure 14, que sur la coupe de rétine de souris Dp71-null, il n'y a pas de marquage autour des vaisseaux, dans la limitante interne et au niveau des photorécepteurs.

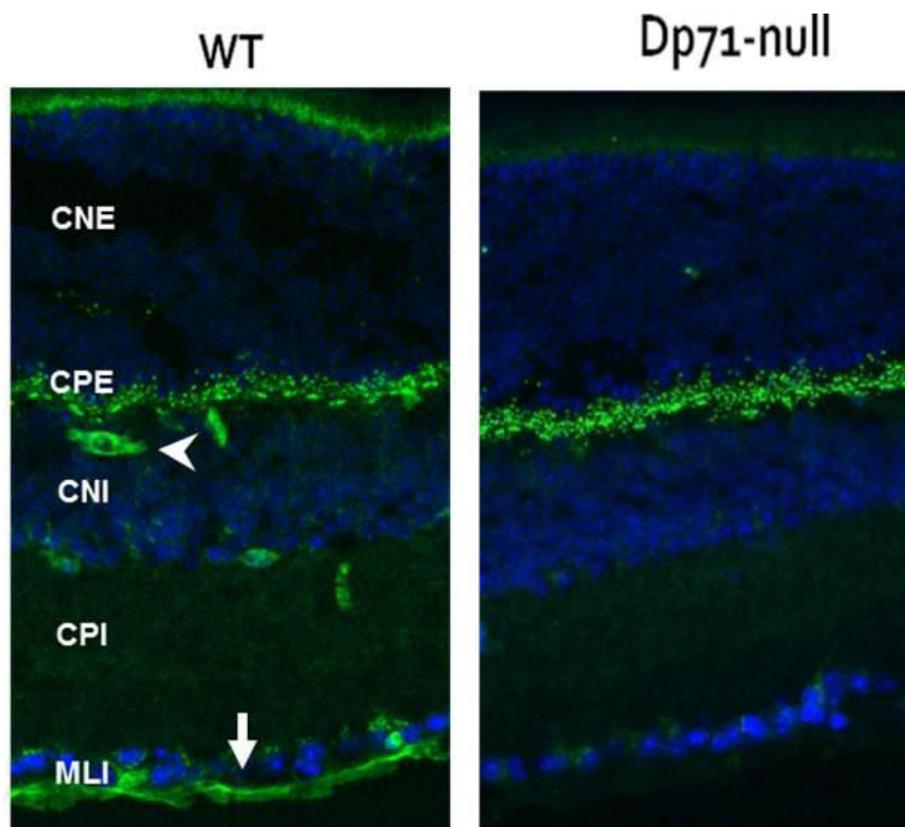


Figure 15. Localisation rétinienne de la Dp71 chez la souris. Marquage immunohistochimique des dystrophines sur des coupes de rétines avec l'utilisation de l'anticorps pan-spécifique H4 (qui marque l'ensemble de dystrophines) en vert et les noyaux en bleu (Fort, Sene et al. 2008).

La Dp71 est majoritairement exprimée au niveau de cellules gliales de Müller de la rétine (Claudepierre, Rodius et al. 1999). Plus précisément la Dp71 est fortement concentrée dans les pieds de cellules gliales de Müller (Fort, Sene et al. 2008). De plus, l'étude de la localisation des dystrophines dans les cellules gliales de Müller isolées à partir de la rétine de

souris Dp71-null et contrôles, a permis de démontrer que la Dp71 est la seule dystrophine qui est exprimée dans les cellules gliales de Müller (Fort, Sene et al. 2008) (Figure 16).

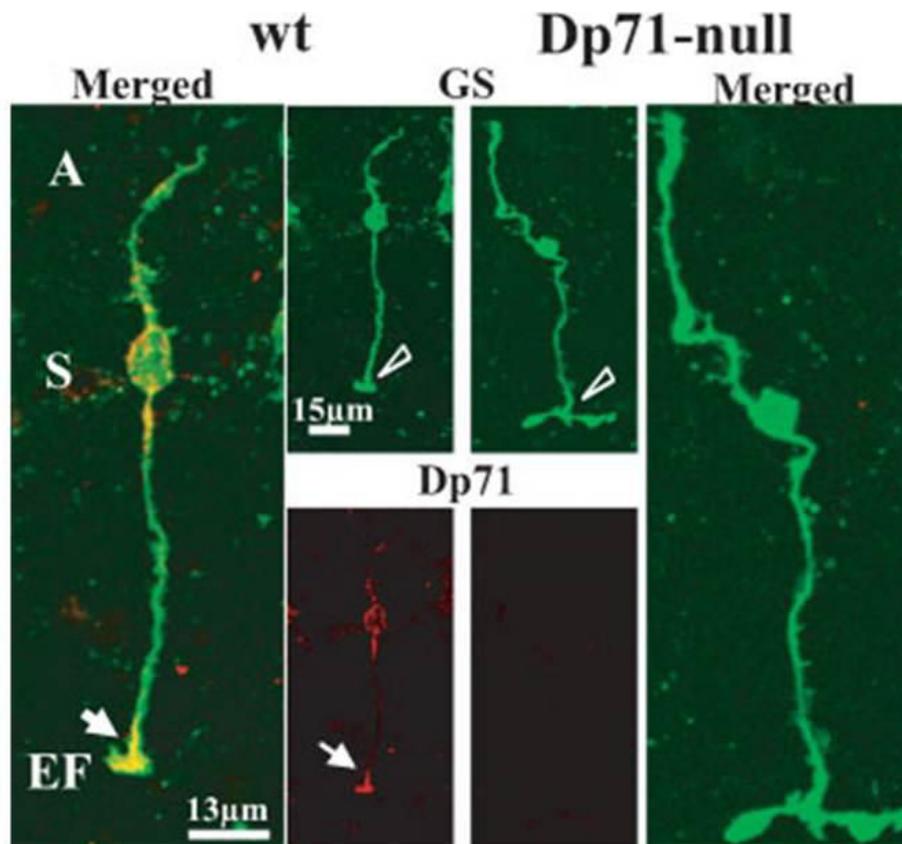


Figure 16. Localisation de la Dp71 dans les cellules gliales de Müller. Marquage immunohistochimique de la dystrophine Dp71 (H4, en rouge) et de la glutamine synthases (GS, en vert) sur des cellules gliales de Müller isolées (Fort, Sene et al. 2008).

La Dp71 a aussi été détectée dans la rétine humaine et porcine, par un marquage immunohistochimique, permettant de mettre en évidence une expression de la dystrophine autour des vaisseaux et dans la membrane limitante interne (Figure 17A) (Bordais, Bolanos-Jimenez et al. 2005). Par western blot, notre équipe a caractérisé les protéines dystrophines présentes dans les rétines humaines, porcines et de la souris (Figure 17B).

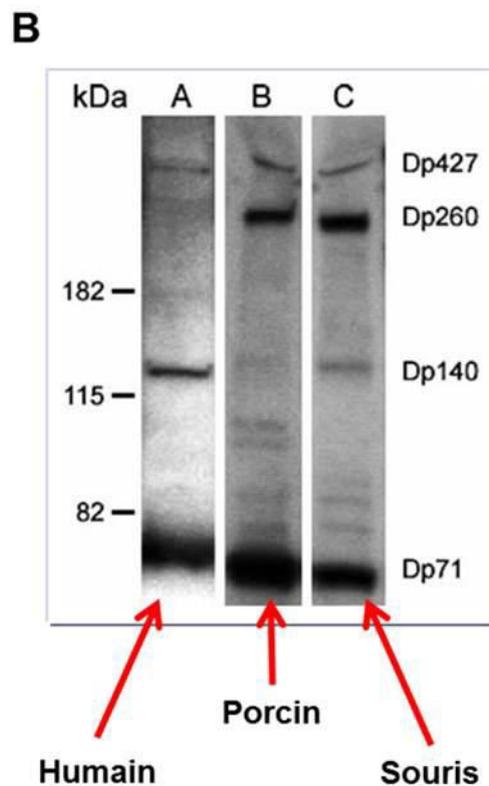
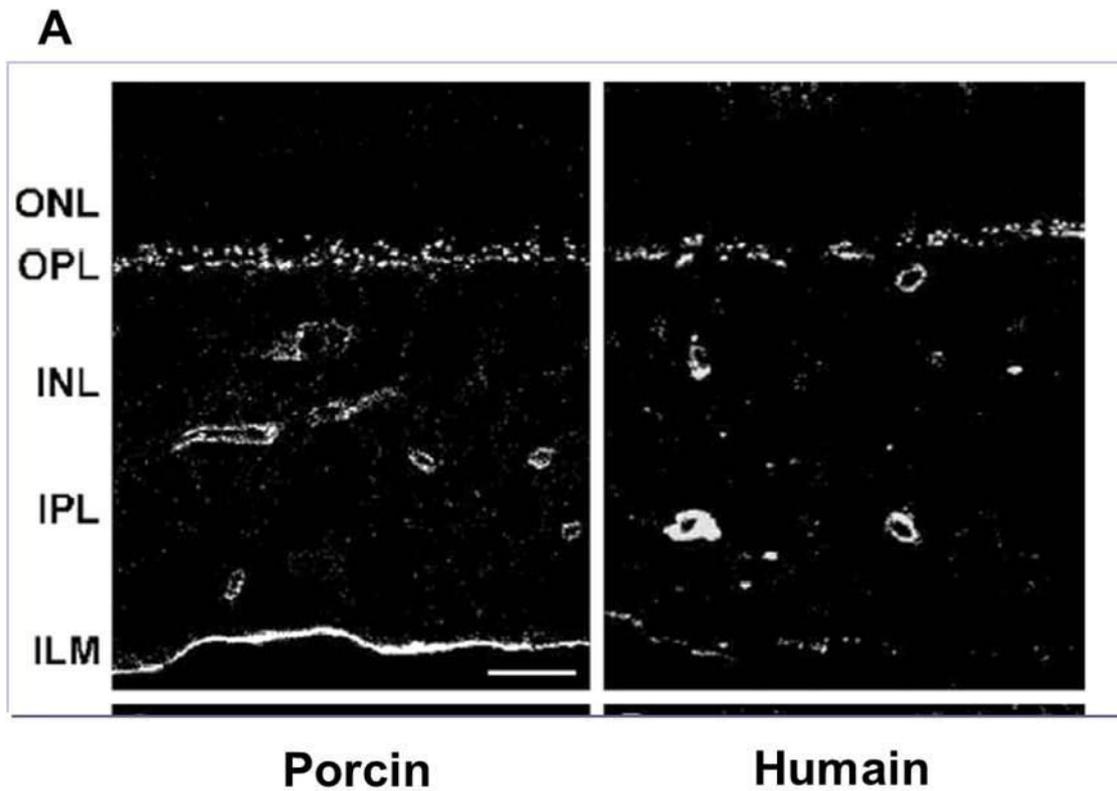


Figure 17. Localisation rétinienne de la Dp71 chez l'homme, le porc et la souris. A : Marquage immunohistochimique des dystrophines sur des coupes de rétines avec l'utilisation de l'anticorps pan-spécifique Dys2. B : détection des différentes dystrophines par western blot et l'utilisation de l'anticorps Dys2 (Bordais, Bolanos-Jimenez et al. 2005).

7-2 Rôle du complexe Dp71-DAPs dans l'homéostasie rétinienne

Le complexe protéique DAPs (protéines associées à la dystrophine) lié à la Dp71 a été caractérisé dans les cellules gliales de Müller de la rétine. Il a été montré dans notre laboratoire que la protéine Dp71 interagit avec le β -dystroglycane, l' α 1-syntrophine ainsi que les δ - et γ -sarcoglycane, ces protéines pouvant interagir et former un complexe dans les CGM en culture (Claudepierre, Dalloz et al. 2000, Claudepierre, Mornet et al. 2000). L'ensemble de ces protéines a été localisé plus précisément au niveau des pieds des cellules gliales de Müller en contact avec l'humeur vitrée, ainsi qu'autour des vaisseaux rétiniens. Des doubles marquages sur des CGM 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, Dalloz et al. 2000).

L'utrophine, 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 lie Kir4.1 et pas AQP4. De plus, 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 » (Fort, Sene et al. 2008) (Figure 18).

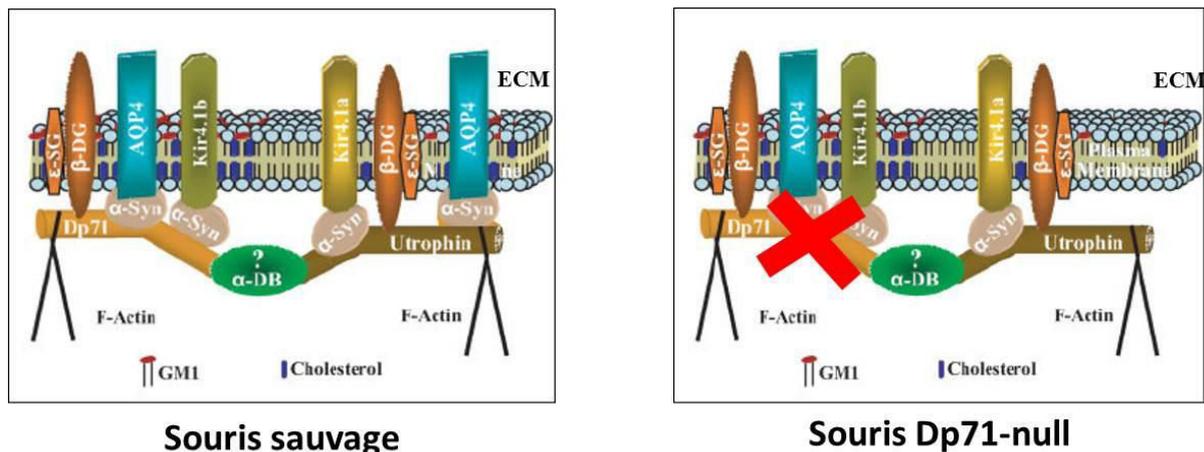


Figure 18. Modèle hypothétique des complexes Dp71- et Utrophin-DAPs se liant à Kir4.1 et à AQP4. Il est connu que la Dp71 et l'Utrophine peuvent être toutes les deux associées au β -DG (β -dystroglycane) et à l' α -Syn (α -syntrophine). Le sous-complexe Dp71-DAPs est localisé dans la membrane plasmique enrichie en GM1-cholestérol où l' α -Syn se lie à Kir4.1b et à AQP4. En absence de Dp71 (souris Dp71-null), le sous-complexe Utrophin-DAPs, l' α -Syn est associée uniquement à Kir4.1a. L' α -DB (α -dystrobrevine) 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).

L'enregistrement des courants potassiques, à différents niveaux de la CGM, a permis de mettre en évidence qu'en absence de Dp71 ceux-ci sont moins importants au niveau des pieds des CGM, alors qu'ils sont au contraire augmentés dans les prolongements proximaux et distaux ainsi que dans le soma. Ceci confirme que les canaux potassiques, qui sont normalement concentrés dans les pieds des CGM, sont, en absence de Dp71, redistribués tout le long de la cellule.

L'absence de la Dp71 entraîne non seulement des modifications fonctionnelles, mais également morphologiques des CGM. En effet les CGM issues de rétine de souris Dp71-null sont hypertrophiées et les pieds de ces cellules sont « relâchés » et étalés sur une plus grande surface contrairement aux pieds des CGM de souris contrôles qui sont « concentrés » (Fort, Sene et al. 2008).

7-3 Physiopathologie rétinienne de la souris Dp71-null

Plusieurs études ont mise en évidence une altération de la neurotransmission rétinienne reflétée par une perturbation de l'ERG, avec la réduction de l'amplitude de l'onde b chez 80% des patients DMD (Cibis, Fitzgerald et al. 1993, Sigesmund, Weleber et al. 1994). D'autres travaux ont montré que 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, comme la protéine Dp71 dans la neurotransmission rétinienne (Fitzgerald, Cibis et al. 1999, Pillers, Fitzgerald et al. 1999, Pillers, Weleber et al. 1999). En effet, chez la souris Dp71-null, la mesure de l'ERG, en condition scotopique (adaptation à l'obscurité), a permis de mettre en évidence une faible réduction de l'onde b (Cia, Simonutti et al. 2014).

Le β -dystroglycane est une protéine transmembranaire qui se lie à la dystrophine Dp71 via l' α -dystroglycane. Cette liaison permet une connexion entre le cytosquelette et la matrice extracellulaire. Chez la souris Dp71-null, l'expression du β -dystroglycane est fortement réduite au niveau des cellules gliales de Müller (Fort, Sene et al. 2008). De plus, la délétion de la protéine β -dystroglycane chez la souris induit une réduction de l'amplitude de l'onde b de l'ERG, associée à une déficience visuelle (Satz, Philp et al. 2009).

La souris Dp71-null soumise à une forte ischémie-reperfusion provoquée par une augmentation de la pression intraoculaire présente une importante dégénérescence des cellules ganglionnaires rétiniennes (Daloz, Sarig et al. 2003).

L'expression et la localisation des canaux Kir4.1 et AQP4 sont étroitement liées à la Dp71. Chez la souris Dp71-null, l'expression d'AQP4 est fortement réduite et Kir4.1 est délocalisé le long des cellules gliales de Müller rétiniennes. La dérégulation de l'homéostasie du K^+ rétinien est à l'origine d'une hyperexcitation des neurones et d'une toxicité liée au glutamate. En effet, la délétion de Kir4.1 entraîne une forte baisse des courants K^+ et une dépolarisation

de la membrane des cellules gliales de Müller, réduisant ainsi la capture du glutamate par ces cellules de Müller (Kofuji, Ceelen et al. 2000, Kofuji, Biedermann et al. 2002). Dans le modèle d'occlusion de la branche veineuse rétinienne chez le rat, à la fois AQP4 et Kir4.1 sont régulés à la baisse avec une délocalisation de la protéine Kir4.1 (Rehak, Hollborn et al. 2009). L'expression des ARNm d'AQP4 et de Kir4.1 est fortement réduite dans les rétines de patients atteints de rétinopathie proliférante par rapport aux témoins post-mortem (Tenckhoff, Hollborn et al. 2005). Cependant, il a été rapporté que l'induction de l'uvéite chez le rat par injection de lymphocytes T auto-agressifs activés provenant de chevaux atteints d'uvéite récurrente équine, provoque une hausse significative d'AQP4 rétinien (Eberhardt, Amann et al. 2011). De plus, une étude sur l'uvéite induite par une endotoxine chez le rat a montré, 24h après l'injection intravitréenne de LPS, une diminution de l'expression d'AQP4, qui augmente ensuite à un niveau basal dans les 14 jours suivants (Liu, Kobayashi et al. 2007). La délétion de la Dp71 est associée à un gonflement des cellules gliales de Müller (Sene, Tadayoni et al. 2009). De plus, il a été montré que la délétion du gène AQP4 protège la rétine contre le gonflement dans un modèle murin d'ischémie, accentuant ainsi l'importance de l'AQP4 dans le transport de l'eau (Da and Verkman 2004). Cependant, la fonction exacte et l'impact d'AQP4 dans l'œdème rétinien ne sont pas clairs et demandent des études plus approfondies.

7-4 Angiogenèse postnatale normal et pathologique

L'étude de l'angiogenèse postnatal (PN) en l'absence de Dp71 a été menée par notre laboratoire (Tadayoni et al, article en préparation). Cette étude a montré que l'absence de Dp71 provoque une inhibition de l'angiogenèse très prononcée jusqu'à P6 (six jours après la naissance) (Figure 19). De plus en parallèle de cette inhibition nous avons observé un retard de déploiement des astrocytes dans la rétine jusqu'à P6, ce qui pourrait agir comme un facteur limitant pour l'angiogenèse. Nous avons aussi mis en évidence l'expression de la protéine

Dp71 dans les astrocytes. Après P6, les astrocytes recouvrent entièrement la surface de la rétine, cependant leur densité est plus faible chez les souris Dp71-null comparées à la souche contrôle. La vascularisation rétinienne chez la souris Dp71-null est fortement induite après P6, et rattrape celle de la souris contrôle à P12 (Tadayoni et al, article en préparation).

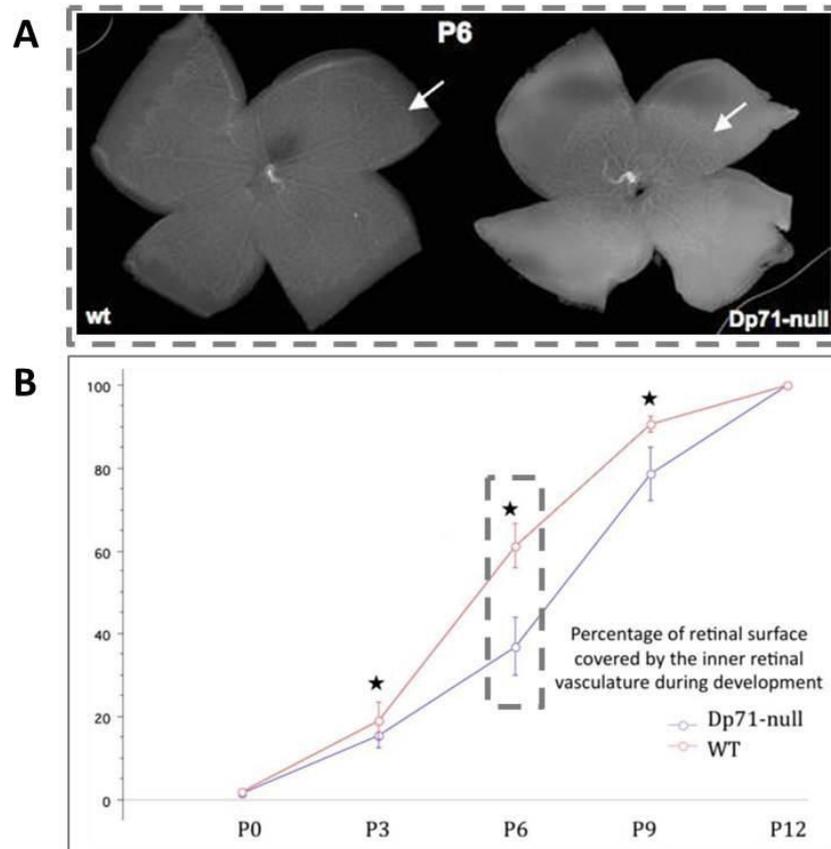


Figure 19. Vascularisation postnatale de P0 à P12. A : vascularisation postnatale de la rétine (P6). B : Pourcentage de surface rétinienne recouverte par le réseau vasculaire de la rétine interne au cours du développement chez la souris WT (rouge) et Dp71-null (bleu). Les barres représentent les écart-types (Standard Deviation), les étoiles indiquent les différences significatives. La vascularisation rétinienne est significativement retardée chez la souris Dp71-null par rapport à la souris contrôle de P3 à P9. La plus forte différence entre la rétine de souris Dp71-null et la souris contrôle est observée à P6. A P12, les rétines des deux groupes sont complètement recouvertes par le réseau vasculaire (Tadayoni et al, article en préparation).

Nous avons aussi étudié l'angiogenèse postnatal dans le modèle d'hyperoxie-normoxie. Ce modèle consiste en une exposition des souris à une hyperoxie (passage de 21% à 75% d'oxygène) à P7. Après cinq jours d'exposition à 75% d'oxygène, les souris sont ramenées à 21% d'oxygène à P12. Cette hyperoxie provoque une vaso-régression. Le retour à une

atmosphère normale de P7 à P17 induit le développement de néovaisseaux comme ceux observés chez l'homme dans la rétinopathie du prématuré. Après hyperoxie, à P12, la rétine de souris Dp71-null, présente une vaso-régression plus faible que la souris contrôle qui dure jusqu'à P17. Ce résultat suggère que l'absence de Dp71 protège contre la perte de vaisseaux en conditions hyperoxiques. Après le retour à la normal, à P17, la rétine de souris Dp71-null développe une néovascularisation rétinienne plus faible que celle de la souris contrôle (Figure 20).

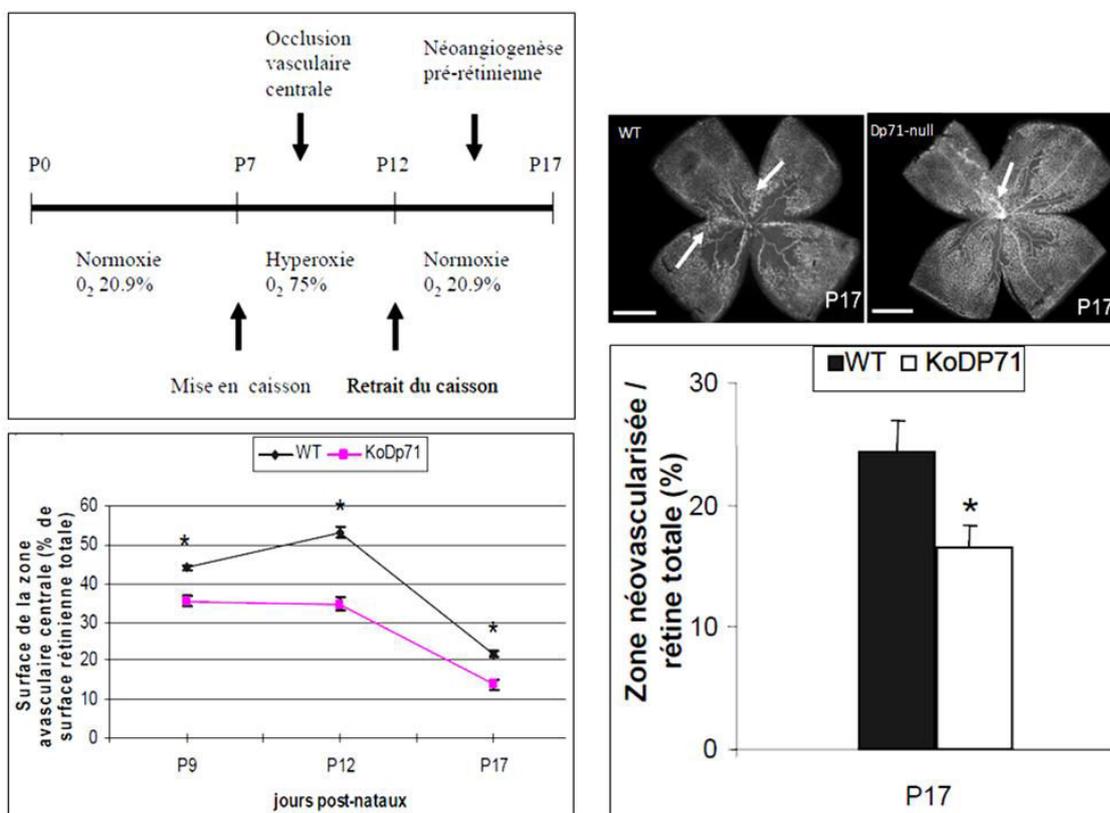


Figure 20. Modèle d'hyperoxie-normoxie. Effet anti-angiogénique de l'absence de la Dp71. (En haut, à gauche) Description du protocole d'induction de la rétinopathie du prématuré. (En bas, à gauche) Quantification de la surface avasculaire centrale de P9 à P17 chez la souris WT par rapport à la souris 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 et al, article en préparation).

8- But du projet de thèse

8-1 Premier article : *Rôle de la Dp71 dans la régulation osmotique et la perméabilité vasculaire rétinienne.*

L'absence de la Dp71 au niveau rétinien induit une perturbation de l'homéostasie aqueuse et potassique (Fort, Sene et al. 2008), ainsi qu'un gonflement des cellules gliales de Müller. Le premier objectif de notre étude a été d'analyser l'effet d'un décollement rétinien sur l'homéostasie rétinienne et l'expression de la Dp71 chez une souris sauvage. De plus, nous avons entrepris de mesurer la perméabilité vasculaire rétinienne chez la souris Dp71-null. Ce premier travail nous a permis de mieux comprendre le rôle de la Dp71 dans la régulation osmotique et la perméabilité vasculaire rétinienne.

8-2 Deuxième article : *Dp71 et inflammation vasculaire rétinienne*

Les troubles homéostatiques et la réduction de l'onde b sont retrouvés dans les pathologies rétiniennes humaines associées à des anomalies vasculaires, telles que la rétinopathie diabétique (Tenckhoff, Hollborn et al. 2005). La souris Dp71-null présente une légère réduction de l'amplitude de l'onde b et une amplitude de l'onde a normale par rapport aux souris contrôles (Cia, Simonutti et al. 2014). De plus, chez la souris Dp71-null, il a été montré dans notre laboratoire un retard de vascularisation jusqu'à 6 jours après la naissance (Tadayoni et al, article en préparation). La souris Dp71-null possède une sensibilité accrue à l'ischémie-reperfusion expérimentale, provoquant une plus forte perte neuronale que chez les souris sauvages. Ces anomalies nous ont conduits à nous intéresser au système vasculaire et à l'inflammation rétinienne. En effet, dans ce deuxième travail nous avons entrepris de caractériser l'inflammation vasculaire rétinienne, la leucostase, la morphologie microgiale, la gliose réactionnelle, ainsi que la perte des capillaires chez la souris Dp71-null.

8-3 Troisième article : Caractérisation de l'inflammation rétinienne chez la souris mdx^{3Cv}

Nous avons aussi entrepris de caractériser l'inflammation rétinienne, chez la souris mdx^{3Cv}, la seule souche qui possède une altération de l'onde b de l'ERG similaire à celle observée chez les patients DMD (Pillers, Weleber et al. 1995). La souris mdx^{3Cv} présente une réduction de l'expression de la Dp71 et de l'ensemble des autres dystrophines. Cependant, aucune étude n'a été menée pour quantifier précisément la protéine Dp71, ni pour caractériser l'inflammation et la perméabilité vasculaire rétinienne chez la souris mdx^{3Cv}. L'objectif de ce troisième article est d'étudier l'impact d'une forte réduction de l'expression de la Dp71 en caractérisant les facteurs inflammatoires, l'adhésion leucocytaire, ainsi que la perméabilité vasculaire rétinienne.

Premier article

9- Rôle de la Dp71 dans la régulation osmotique et la perméabilité vasculaire rétinienne

9-1 Situation du sujet

Les cellules gliales de Müller (CGM), principale glie de la rétine chez les vertébrés, sont fondamentales pour la régulation de l'homéostasie rétinienne (Ripps and Witkovsky 1985). 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 (Reichenbach et al. 1995). A l'image des astrocytes dans le cerveau, les CGM jouent un rôle important dans la régulation de l'homéostasie rétinienne particulièrement dans le recyclage des neurotransmetteurs et le maintien de l'équilibre ionique (Barnett et al. 2001; Brew and Attwell 1987; Ehinger 1977). 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).

La régulation des flux d'eau et le tamponnage spatial du K^+ à travers les CGM sont médiés par les canaux AQP4 et Kir4.1 (Bringmann et al. 2000; Kofuji et al. 2000). Ces canaux sont localisés dans les pieds des CGM et des prolongements entourant les vaisseaux (Kofuji et al. 2002; Kofuji et al. 2000; Nagelhus et al. 1999). Le fonctionnement de Kir4.1 et d'AQP4 nécessitant une localisation précise dans les CGM, ces canaux sont agrégés et positionnés par la Dp71 qui présente le même patron d'expression que Kir4.1 et AQP4 (Daloz et al. 2003; Kofuji et al. 2002). En effet, la Dp71, en s'associant aux DAPs, permet de localiser ces canaux dans des domaines membranaires spécifiques et l'absence de la Dp71 entraîne une délocalisation de Kir4.1 et d'AQP4 le long des CGM et la rétine est plus sensible à l'ischémie-reperfusion qui se traduit par une mort neuronale accrue (Daloz et al. 2003; Fort et

al. 2008). Il a été montré que le rôle crucial de ces canaux dans le maintien de l'équilibre du K⁺ et de l'eau est altéré dans les CGM issues de rétine pathologiques suite à une ischémie transitoire, une rétinopathie diabétique, une occlusion veineuse ou un décollement de rétine (Daloz et al. 2003; Pannicke et al. 2004; Rehak et al. 2008; Wurm et al. 2006).

Il a été montré que dans les pathologies rétinienne associées à des altérations vasculaires, telles que la rétinopathie diabétique, de multiples et complexes modifications s'opèrent au niveau des neurones et des cellules gliales de la rétine. Ces modifications précèdent cependant les anomalies vasculaires (Fletcher et al. 2005; Ishikawa et al. 1996). De plus, des travaux menés sur des modèles de décollement de rétine ont permis de mettre en évidence des modifications morphologique et fonctionnelle des CGM (Lewis et al. 1995). Chez la souris, ces changements ont également été observés dans les CGM, principalement au niveau du pied, en absence de la Dp71 (Fort et al. 2008).

Nous nous sommes intéressés à la localisation et la distribution de la Dp71, de l'utrophine, des DAPs, de Kir4.1 et d'AQP4 dans un modèle expérimental de décollement de rétine. Nous avons également analysé le rôle de la Dp71 sur les fonctions de la CGM dans un contexte pathologique. L'absence de la Dp71 entraînant des changements importants de la CGM, nous avons aussi étudié les conséquences de cette absence sur la régulation de la perméabilité vasculaire.

9-2 Résultats

Dans un modèle expérimental de décollement de rétine chez la souris C57BL/6, l'immunolocalisation de Kir4.1 et d'AQP4 nous a permis de mettre en évidence une délocalisation du canal potassique et une baisse de l'expression du canal aqueux 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 changé. Ces modifications sont

associées à une forte gliose des CGM dans la rétine décollée. Nous avons 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.

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 perturbée dans les CGM de la rétine de souris Dp71-null avant tout décollement de la rétine. Chez les souris Dp71-null nous avons mis en évidence l'implication de médiateurs inflammatoires dans le gonflement des CGM.

L'étude de la perméabilité des vaisseaux sanguins de la rétine nous 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.

9-3 Conclusion

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.

Ce travail a fait l'objet de la publication suivante :

Functional Implication of Dp71 in Osmoregulation and Retinal Vascular Permeability.

Abdoulaye Sene, Ramin Tadayoni, Thomas Pannicke, Antje Wurm, **Brahim El Mathari**, Romain Benard, Michel Joseph Roux, David Yaffe, Dominique Mornet, Andreas Reichenbach, Jose-Alain Sahel, and Alvaro Rendon. PLoS One. 2009 Oct 7;4(10):e7329. doi: 10.1371/journal.pone.0007329.

Functional Implication of Dp71 in Osmoregulation and Vascular Permeability of the Retina

Abdoulaye Sene^{1,2}, Ramin Tadayoni^{1,2}, Thomas Pannicke³, Antje Wurm³, Brahim El Mathari^{1,2}, Romain Benard^{1,2}, Michel Joseph Roux⁴, David Yaffe⁵, Dominique Mornet⁶, Andreas Reichenbach³, Jose-Alain Sahel^{1,2,7}, Alvaro Rendon^{1,2*}

1 Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, UMR_S 968, Institut de la Vision, Paris, France, **2** Université Pierre et Marie Curie-Paris6, UMR_S 968, Paris, France, **3** Paul Flechsig Institute of Brain Research, Universität Leipzig, Leipzig, Germany, **4** Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Department of Neurobiology and Genetics, CNRS UMR 7104, Université de Strasbourg, Illkirch, France, **5** Department of Molecular Cell Biology, Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israel, **6** Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, ERI 25 "Muscle et Pathologies", Université Montpellier 1, EA 4202, CHU Arnaud de Villeneuve, Montpellier, France, **7** Centre Hospitalier National d'Ophtalmologie des quinze-vingts, Paris, France

Abstract

Functional alterations of Müller cells, the principal glia of the retina, are an early hallmark of most retina diseases and contribute to their further progression. The molecular mechanisms of these reactive Müller cell alterations, resulting in disturbed retinal homeostasis, remain largely unknown. Here we show that experimental detachment of mouse retina induces mislocation of the inwardly rectifying potassium channels (Kir4.1) and a downregulation of the water channel protein (AQP4) in Müller cells. These alterations are associated with a strong decrease of Dp71, a cytoskeleton protein responsible for the localization and the clustering of Kir4.1 and AQP4. Partial (in detached retinas) or total depletion of Dp71 in Müller cells (in Dp71-null mice) impairs the capability of volume regulation of Müller cells under osmotic stress. The abnormal swelling of Müller cells in Dp71-null mice involves the action of inflammatory mediators. Moreover, we investigated whether the alterations in Müller cells of Dp71-null mice may interfere with their regulatory effect on the blood-retina barrier. In the absence of Dp71, the retinal vascular permeability was increased as compared to the controls. Our results reveal that Dp71 is crucially implicated in the maintenance of potassium homeostasis, in transmembraneous water transport, and in the Müller cell-mediated regulation of retinal vascular permeability. Furthermore, our data provide novel insights into the mechanisms of retinal homeostasis provided by Müller cells under normal and pathological conditions.

Citation: Sene A, Tadayoni R, Pannicke T, Wurm A, El Mathari B, et al. (2009) Functional Implication of Dp71 in Osmoregulation and Vascular Permeability of the Retina. PLoS ONE 4(10): e7329. doi:10.1371/journal.pone.0007329

Editor: Christophe Egles, Tufts University, United States of America

Received: June 3, 2009; **Accepted:** September 11, 2009; **Published:** October 7, 2009

Copyright: © 2009 Sene et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. This work was supported by INSERM (Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale) and by grants from the AFM (Association Française contre les Myopathies) and from FAF (Fédération des Aveugles et handicapés visuels de France), by Deutsche Forschungsgemeinschaft (GK1097/1-1, RE849/10 (SSP1172), RE849/12 (FOR748)), Interdisciplinary Centre for Clinical Research at the University of Leipzig (01KS9504, Project C5).

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: alvaro.rendon@inserm.fr

Introduction

Glial cells are crucially implicated in retinal function and integrity. Müller cells, the principal glia of the vertebrate retina are specialized radial glial cells which span the entire thickness of the retina and provide a wealth of functions that require an intimate interaction with the neurons and their synapses [1]. Like astrocytes in the brain, Müller cells in the retina are crucial for tissue homeostasis, particularly in deactivating and recycling neurotransmitters and in maintaining the ionic balance of the extracellular fluid [2–5]. Müller cells are also thought to participate in the induction, maintenance, and proper functioning of the blood-retina barrier (BRB) [6–8].

In the neural retina, potassium buffering and water drainage via Müller cells are mediated by the cooperation of inwardly rectifying potassium channels (Kir), especially Kir4.1, with the selective water transport protein, Aquaporin-4 (AQP4) [9,10]. In healthy retina, Kir4.1 and AQP4 proteins are strongly expressed by

Müller cells where these proteins are particularly enriched in the vitread endfeet and in cell processes abutting the intraretinal blood vessels [10,11]. Proper functioning of Kir4.1 and AQP4 requires such a polarized expression of these channels in the plasma membrane of Müller cells [10–12]. The clustering and precise membrane localization of Kir4.1 and AQP4 are dependent on the dystrophin gene product, Dp71 [13–15]. In the normal retina, the Dp71 protein shows the same expression pattern as Kir4.1 and AQP4; it has been shown to be involved in the targeting of these channels to specific membrane microdomains via a macromolecular protein complex composed by Dp71 and dystrophin-associated proteins (DAPs) [14,15]. Genetic inactivation of Dp71 (in Dp71-null mice) alters Kir4.1 and AQP4 distribution in Müller glial cells and this mislocation increases the vulnerability of retinal nerve cells to transient ischemia which is associated with neuronal cells death [14,15]. Together, these two types of glial channels play a key role in K⁺ and water balance processes; noteworthy, their expression and/or cytotopographical distribution are altered in

many instances of retinal injuries, including transient ischemia/reperfusion, diabetic retinopathy, retinal vein occlusion, and retinal detachment [14,16–19]. Moreover, the early mislocation of Kir4.1 is accompanied by a dramatically decreased K⁺ conductance and a depolarization of the glial cell membrane which, in turn, impairs the function of the electrogenic uptake carriers for glutamate and GABA, subsequent neurotransmitter recycling, and other glia-neuron interactions [1,20]. This may account for the occurrence of multiple and complex changes in neuronal and glial functions even before manifest vascular anomalies in diseases such as diabetic retinopathy can be detected [21–23], and suggests that the vascular pathology may be a consequence of disturbed glial cell functions.

Previous work on mice had shown that the deletion of Dp71 and the concomitant impairments in DAPs localization cause functional alterations of Müller glial cells, particularly in the endfoot region where Dp71 and DAPs are concentrated in wildtype retinas [15]. The purpose of the present study was to investigate the functional implication of Dp71 and the associated protein complex in the Müller cell-mediated maintenance of retinal integrity. For this purpose, we applied experimental retinal detachment as a well-established model of retinal injury [24–28] to both control (C57BL/6) and Dp71-null mice, and studied (i) the expression and cellular localization of the relevant proteins in Müller cells, (ii) the K⁺ currents across the Müller cell membrane, (iii) the swelling of Müller cell somata under osmotic challenge, and (iv) the permeability of retinal blood vessels. We found that experimental retinal detachment causes alterations in water transport and impairments in fluid absorption of Müller cells, associated with a downregulation of Dp71 expression. Similar functional deficits were observed in Müller cells from Dp71-null mice even without experimental retinal detachment; moreover, the permeability of the blood-retinal barrier was dramatically increased already in untreated Dp71-null mice as compared to the controls. These results support the view that Dp71 and the DAPs, by controlling the expression and subcellular distribution of K⁺ and water channels, are essential for crucial glial cell functions such as retinal water homeostasis and maintenance of the BRB.

Results

Experimental Retinal Detachment induces reactive gliosis and alterations in protein expression in Müller cells

To prove the induction of reactive Müller cell gliosis by experimental detachment, the expression of glial fibrillary acidic protein (GFAP) was assessed [29]. In control retinas, GFAP was only localized in astrocytes, at the inner retinal surface (Fig. 1A). Experimental retinal detachment caused an unequivocal upregulation of GFAP expression in Müller glial cells (Fig. 1G, arrowhead). Twenty-four hours after surgery, Western blot analysis confirmed an increased level of GFAP protein expression (Fig. 2A). For a semi-quantitative analysis, immunoblot band densities were quantified and normalized to β -Actin. This showed that in the detached retina, the GFAP level was elevated by a factor of 3 (Fig. 2B).

Immunohistochemistry demonstrated unequivocal Dp71 immunoreactivity mainly in the endfeet of Müller cells (Fig. 1D, open arrowhead) and around blood vessels (Fig. 1D, arrow) of control retinas, as previously reported [14] (Fig. S2) whereas immunolabeling was considerably reduced in detached retinas (Fig. 1J). To determine whether retinal detachment altered the protein and mRNA expression of Dp71 in C57BL/6 mice, we performed Western blot and real-time PCR analysis at 24 hours and 7 days after surgery. By using Western blotting and subsequent semiquantification of band densities of Dp71, we observed a

dramatic reduction of Dp71 protein in detached retinas (Fig. 3A), by about 50% (Fig. 3B). Furthermore, we found that the Dp71 mRNA level in detached retinas was 50% lower than in control retinas, 24 hours after surgery. After 7 days, the Dp71 mRNA appeared to recover, as it was reduced by only 20% if compared to the controls. Together these data show that experimental retinal detachment-induced gliosis affects both gene and protein expression of Dp71 in Müller glial cells.

Kir4.1, the principal K⁺ channel in retina, was localized in the endfeet of Müller cells at the inner limiting membrane and around blood vessels of control retinas, as previously described [12]. In detached retinas, Kir4.1 was distributed all along the Müller cells fibers (Fig. 1H, filled arrowhead). However, Kir4.1 protein levels were not changed in detached retinas (Fig. 2B). Thus, retinal detachment induced a loss of the polarized expression of Kir4.1 but this mislocalization of Kir4.1 was not associated to a decrease of its expression level.

AQP4, the predominant aquaporin channel in retina, was found to be enriched at the endfeet of Müller cells (Fig. 1C, open arrowhead), around blood vessels (Fig. 1C, filled arrow) and in the outer plexiform layer (Fig. 1C, filled arrowhead), similar as previously reported [30]. At twenty-four hours of retinal detachment, the overall pattern of AQP4 distribution was unchanged but the immunolabeling intensity was decreased (Fig. 1I). This observation was confirmed by immunoblot analysis of AQP4 expression, revealing a significant decrease of the AQP4 expression level by 30% as compared to the controls (Fig. 2A,B).

Earlier it had been shown that utrophin, a cytoskeleton protein, shares the common expression pattern of Dp71, Kir4.1, and AQP4. Upregulation of utrophin may partially compensate Dp71 deficiency by interacting with AQP4 and Kir4.1 in retinas and isolated Müller cells of mice [14]. To further characterize utrophin localization and expression in detached retina, we performed immunohistochemistry and Western blot. In control retinas, utrophin was localized around blood vessels and in the inner limiting membrane (Fig. 1E). Retinal detachment induced an increase of utrophin immunolabeling in the inner limiting membrane (Fig. 1K, arrow and arrowhead). Although we observed an increase of utrophin staining, the slightly higher band density of Western blot was not significantly different (Fig. 2A,B).

As previously shown [14], the dystrophin-associated protein, β -dystroglycan (β -DG) is mainly localized in Müller cells endfeet (Fig. 1F, open arrowhead), around blood vessels (Fig. 1F, filled arrow) and in the outer plexiform layer (Fig. 1F, filled arrowhead). Immunolabeling at the inner limiting membrane was considerably reduced in detached retinas (Fig. 1L). Western blotting and subsequent semiquantification of band densities of β -DG revealed that the decrease of the band density of β -DG was not significantly different compared to control (Fig. 2A,B).

Summarizing these results, both gene and protein expression of Dp71 are strongly reduced after experimental retinal detachment in C57BL/6 mice. This may be responsible for the mislocation of Kir4.1 and the downregulation of AQP4, β -DG and syntrophins (Fig. S1) as well as for a compensatory upregulation of utrophin staining. To test this hypothesis, experimental retinal detachment was performed in the eyes of adult Dp71-null mice. As previously reported [14,15], Kir4.1 and AQP4 were already mislocalized/downregulated in untreated Dp71-null mice, and retinal detachment failed to induce any additional alterations of these channels at 24 h or 7 days after surgery (data not shown). Furthermore, GFAP protein level was similar in untreated retinas of C57BL/6 and Dp71-null mice. Thus suggesting that Dp71 depletion did not induce reactive Müller cells gliosis.

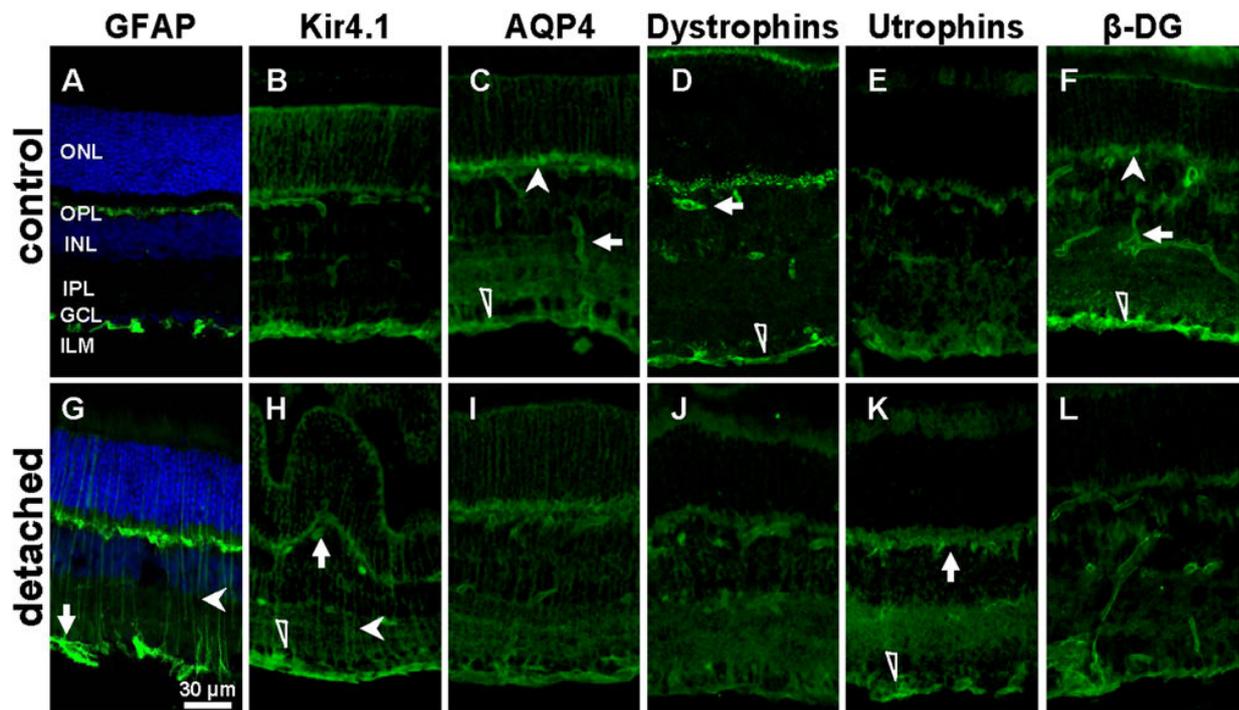


Figure 1. Experimental retinal detachment (RD) changed the expression and immunolocalization of GFAP, Kir4.1, AQP4, Dp71, Utrophin and β -dystroglycan. The slices were derived from control and detached retina of C57BL/6 mice 24 h after surgery. **A,G:** Retinal sections were probed with antibodies against GFAP (green) and for nuclei (Dapi, blue). Note the upregulation of GFAP after RD. **B,H:** Sections were also stained with antibodies against Kir4.1 (green). RD induced a mislocation of Kir4.1 along Müller cells (filled arrowhead) while the staining at the ILM (open arrowhead) and around blood vessels (arrow) remain unchanged. **C,I:** AQP4 staining (green) at the ILM (open arrowhead), around blood vessels (arrow) and at the OPL (filled arrowhead) was reduced in detached retina. **D,J:** Retinal sections were probed with a pan specific antibody against all forms of dystrophins (green). Dystrophin-Dp71 staining is localized at the ILM (open arrowhead) and around blood vessels (arrow), as previously reported [14] (Fig. S2). RD induced a reduction of Dp71 staining. **E,K:** 24 h after surgery Immunoreactivity for Utrophin (green) at the ILM (open arrowhead) was upregulated after RD. In control retina utrophin was localized at the ILM, around blood vessels and in the OPL. **F,L:** Sections were stained with antibodies against β -dystroglycan (β -DG). In control retina, β -DG is localized at the ILM (open arrowhead), around blood vessels (arrow) and at the OPL (filled arrowhead). RD induced a reduction of the staining in the ILM while the staining at the OPL (filled arrowhead) and around blood vessels (arrow) remain unchanged. ONL, outer nuclear layer; OPL, outer plexiform layer; INL, inner nuclear layer; IPL, inner plexiform layer; GCL, ganglion cell layer; ILM, inner limiting membrane. Scale bar = 30 μ m. doi:10.1371/journal.pone.0007329.g001

Retinal Detachment Causes Morphological and Physiological Alterations in C57BL/6 and Dp71-null mice

Müller cells express the inwardly rectifying K^+ channel Kir4.1 and it is well-known from other animal models that Kir-mediated currents may be markedly decreased under pathological conditions [16–18,31]. Thus, we wanted to test whether retinal detachment of the murine retina could alter the K^+ currents of Müller cells in a similar way. Electrophysiological properties (membrane currents, membrane potentials, membrane capacitances) were recorded in whole-cell patch-clamp experiments on isolated cells. Typical current patterns which could be recorded in voltage-clamp experiments are shown in Figure 4A. No remarkable differences in the current kinetics between both mouse strains and between control and detached retina were observed. For a more quantitative analysis, we recorded the inward currents evoked by a 60-mV hyperpolarizing step. As shown in Figure 4B, a weak reduction of inward current amplitudes was found, however, this decrease was not significant for Müller cells from detached retinal areas of Dp71-null mice. In C57BL/6 mice, a significant current decrease was observed although it was less prominent (by about 25%) than reported in rabbit and pig detachment models [27,32]. The data suggest, that (i) the number of functional

channels on the whole Müller cell is not different between wt and Dp71-null mice [14], and (ii) retinal detachment causes only weak, if any, functional inactivation of channels. Moreover, membrane capacitances were recorded after blocking the dominating K^+ conductance by 1 mM Ba^{2+} . The capacitance is a marker of the cell membrane area. There was no significant difference between the capacitance of Müller cells from untreated eyes of C57BL/6 mice as compared to cells from Dp71-null mice. However, Müller cells from the detached retina of the contralateral operated eye displayed a significant increase of their membrane capacitance in both strains (Fig. 4C), demonstrating cellular hypertrophy which is usually found in reactive Müller cells [16,28,32].

The slight decrease of inward current amplitude associated with the significant increase of the membrane capacitance resulted in a clear reduction of inward current densities (i.e., current amplitude divided by membrane capacitance) after retinal detachment (Fig. 4D). The current density is an electrophysiological parameter that describes the abundance of functional channels per membrane area. Its decrease could, in addition to channel mislocation (Fig. 1H), cause a restricted Müller cell function because extrusion of K^+ ions into retinal blood vessels or into the vitreous in the process of spatial buffering should be impeded.

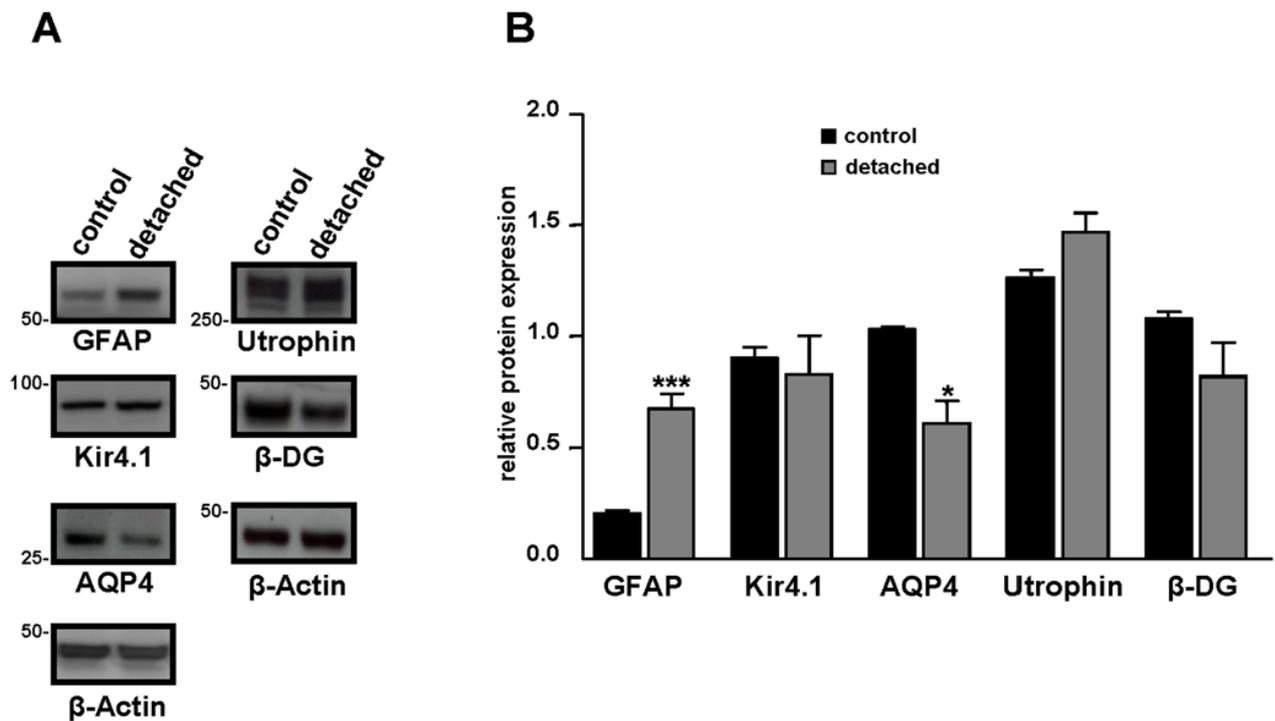


Figure 2. Relative retinal expression level of GFAP, Kir4.1, AQP4, Utrophin and β-dystroglycan after retinal detachment. **A:** 24 h after surgery, proteins of control and detached retina from C57BL/6 mice were extracted and Western blotting was performed. Representative photograph of immunoblots reacted with anti-GFAP, anti-Kir4.1, anti-AQP4, anti utrophins, anti β-dystroglycan (β-DG) and β-Actin antibodies. Numbers on the left refer to the relative electrophoretic mobility of prestained molecular mass standards in kiloDaltons. **B:** The relative protein level is expressed in arbitrary units. Each value represents the ratio of the specific band stain intensity normalized to β-Actin expression (TotalLab TL120, Nonlinear Inc, Durham NC, USA). In detached retina, GFAP expression level was significantly upregulated while AQP4 expression was downregulated. There was no significant difference in Kir4.1, utrophin and β-DG protein expression level after retinal detachment. All experiments were repeated at least three times, and the bars represent means + SE for triplicate data points; n=4. *p<0.05; ***p<0.001 significant differences versus control. doi:10.1371/journal.pone.0007329.g002

Other parameters of Müller cell electrophysiology (membrane potential, outward current amplitude, incidence of cells with fast voltage-dependent Na^+ currents) did not show significant differences between control and detached retinas from both strains of mice.

Osmotic Müller Cell Swelling of C57BL/6 injured and Dp71-null retinæ

Previous work has revealed that reactive Müller cells may display alterations in transmembraneous water transport [16–19]. Thus, the swelling of Müller cell somata was investigated in acutely isolated retinal slices by perfusing the slices with a hypotonic solution containing 60% of control osmolarity. Exposure to hypotonic solution did not alter the size of Müller cell bodies in retinal slices from untreated eyes of C57BL/6 mice ($102.0 \pm 1.0\%$, n=34). However, a 4-min perfusion of slices from detached retinæ of this strain caused an increase in the size of Müller cell somata to $120.7 \pm 2.0\%$ (n=24, $P < 0.001$) (Fig. 5A). Müller cell bodies in slices from control retinæ swelled upon hypotonic stress when K^+ channel-blocking Ba^{2+} ions were present in the bath solution ($111.5 \pm 1.6\%$, n=15; $P < 0.001$). By contrast, Müller cells in retinal slices from untreated eyes of Dp71-null mice already displayed osmotic swelling to $118.0 \pm 2.3\%$ (n=27; $P < 0.001$ as compared to C57BL/6 Müller cells under the same condition) in the absence of Ba^{2+} . Müller cells in the detached retina of Dp71-null mice swelled to an extent that was not significantly different to that of the untreated eye (Fig. 5A; $116.6 \pm 2.0\%$, n=26).

Moreover, the application of Ba^{2+} failed to induce an additional swelling in Müller cells from untreated Dp71-null mice (Fig. 5B; $122.3 \pm 3.6\%$, n=12).

As it had been shown in a pig model of retinal detachment that osmotic Müller cell swelling can be inhibited by the application of adenosine or of blockers of pathways that produce inflammatory mediators [19], the nucleoside adenosine ($10 \mu\text{M}$) was applied with the hypotonic solution onto untreated retinæ from Dp71-null mice. Adenosine significantly blocked somatic swelling ($103.2 \pm 2.2\%$, n=12; in comparison to $120.3 \pm 3.8\%$, n=8, without adenosine; $P < 0.01$). The enzymes, phospholipase A_2 and cyclooxygenase produce the inflammatory mediators arachidonic acid and prostaglandins, respectively. The selective inhibitors of phospholipase A_2 , 4-bromophenacyl bromide ($300 \mu\text{M}$), and of cyclooxygenase, indomethacin ($10 \mu\text{M}$), prevented the swelling of Müller cells from Dp71-null mice (Fig. 5C; $103.3 \pm 2.1\%$, n=8, $P < 0.01$ and $104.4 \pm 1.6\%$, n=7, $P < 0.01$, respectively). These data suggest that deletion of Dp71 modifies the osmotic swelling characteristics of Müller cells, and that inflammatory mediators are involved in this alteration.

Dp71 Deletion in Müller Cells increases the BRB Permeability

There were two previous observations which prompted us to study the effect of Dp71 depletion on BRB integrity. First, Müller glial cells are in close contact with retinal blood vessels and play an important role in the formation and maintenance of the BRB

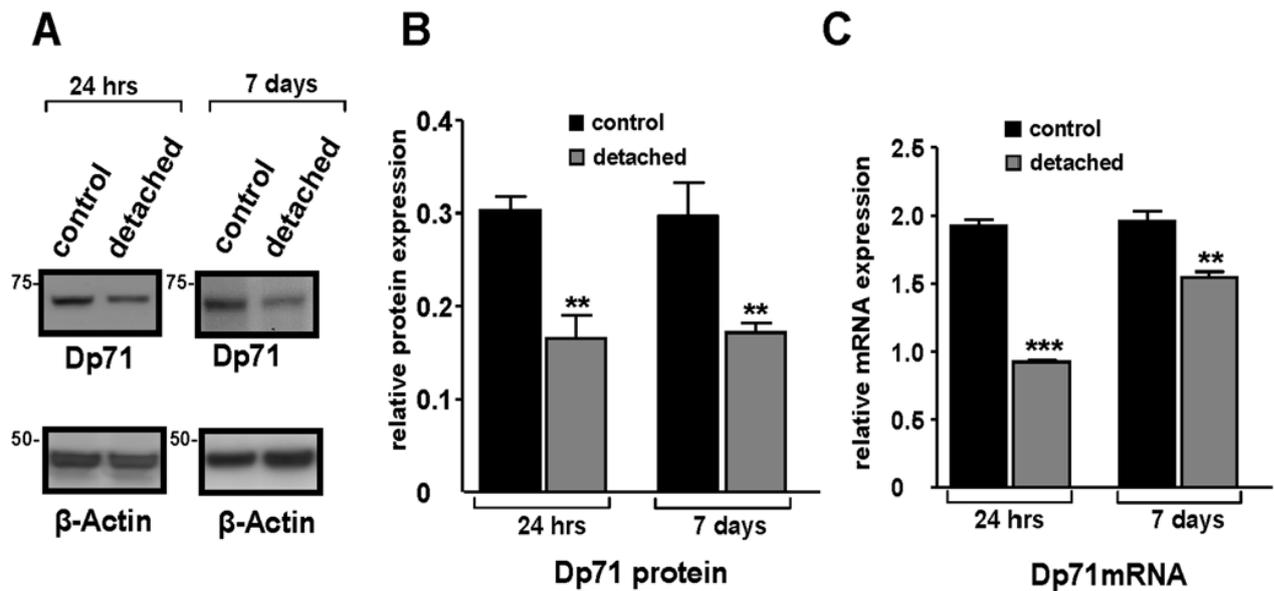


Figure 3. Dramatic reduction of Dystrophin Dp71 expression in detached retina. **A:** Western blot analysis of Dp71 and β -Actin total protein levels in control and detached retina 24 h and 7 days after experimental retinal detachment. Approximate molecular masses are given on the left of each panel in kiloDaltons. **B:** Dp71 and β -Actin expression were quantified by densitometry analysis of Western blots bands using TotalLab TL120 software (Nonlinear Inc, Durham NC, USA). The bar graph shows Dp71/ β -Actin ratio. In detached retina, Dp71 protein level is dramatically reduced after 24 h and this decrease remains 7 days after surgery. **C:** The mRNA expression of Dp71 was determined by real-time PCR in control and detached retina at 24 h and 7 days after surgery and was normalized to the levels of mRNA for β -Actin. The Dp71 mRNA level in detached retina was strongly reduced. Data are expressed as mean + SE; n = 4. **p < 0.01; ***p < 0.001 significant differences versus control. doi:10.1371/journal.pone.0007329.g003

[6,8]. Second, Dp71 immunoreactivity is localized in Müller cell endfeet and processes surrounding retinal blood vessels [14] (Fig. S2). Retinal vascular permeability was assessed in C57BL/6 and Dp71-null adult mice using the Evans blue-dye technique [33]. This revealed that the BRB permeability of Dp71-null mice was up to 4-fold elevated ($p < 0.05$) as compared to C57BL/6 mice (Fig. 6). This shows that the absence of Dp71 in Müller cells is accompanied by an increased permeability of the BRB, and may even be indicative of a causal relation between the two features.

Discussion

Using an experimental mouse model of retinal detachment, we (i) confirm morpho-functional alterations in reactive Müller glial cells including a mislocation of Kir4.1 potassium channels and a downregulation of AQP4 water channels, accompanied by disturbed volume regulation of the cells; (ii) show a fast and strong decrease of the dystrophin protein, Dp71; and finally (iii) demonstrate an impaired BRB function as evidenced by increased retinal vascular permeability. These findings indicate a key role for glial Dp71 in the maintenance of retinal potassium and water homeostasis and cellular volume regulation, as well as in the control of the BRB.

In our model of experimental detachment in murine retinas, Müller cells became reactive (as indicated by GFAP expression, Fig. 1C) and showed a decrease in potassium currents, similar as found in rabbit and porcine models of retinal detachment [27,32]. Here we show, for the first time, a fast decrease in gene and protein expression of Dp71 (Fig. 3). This may indicate that generally, the mislocation of Kir4.1 channels in reactive Müller cells results from an alteration in Dp71 expression. This hypothesis is supported by earlier data showing that Dp71 is required for proper clustering and precise membrane localization of Kir4.1 and

AQP4 channels [13–15]. Most likely, the function of Dp71 is to stabilize the Kir4.1 and AQP4 channel molecules in specific membrane domains by limiting their lateral diffusion. Our present results confirm that functional expression of Dp71 is necessary for the highly asymmetric expression of the inwardly rectifying potassium channel Kir4.1 in Müller cells, and suggest that Dp71 downregulation is one step upstream of the Kir4.1 and AQP4 channel alterations in the signaling cascade of reactive gliosis.

This idea is further supported if the consequences of Dp71 deficiency are studied one step downstream of the channel alterations, by assessing the swelling properties of Müller cells. We observed a similar anomalous osmotic swelling in Müller cells from untreated Dp71-null mice and in cells from C57BL/6 after detachment-induced gliosis (Fig. 5). This finding shows that partial or total depletion of Dp71 in Müller cells are associated with alterations in transmembraneous water transport.

In addition to failures in Kir4.1 and AQP4 expression and/or membrane insertion, Dp71 deficiency may also induce a chronic inflammation. We found that similar as in a porcine model of retinal detachment [19], inflammatory mediators are implicated in osmotic Müller cell swelling in Dp71-null mice. Inhibition of phospholipase A₂ or cyclooxygenase, enzymes producing arachidonic acid and prostaglandins, respectively, prevent the osmotic swelling of Müller cells from Dp71-null mice. We thus suggest that Müller cells of Dp71-null mice undergo a chronic inflammation which contributes to the alterations in their physiological parameters. Indeed, the gene expression of cyclooxygenase-2, known to play a key role in the pathogenesis of inflammation, was up to 7-fold elevated in retinas of Dp71-null mice at postnatal day 6 as compared to C57BL/6. However, there was no significant difference between the cyclooxygenase-2 level of retinæ from C57BL/6 and those from Dp71-null adult mice (unpublished

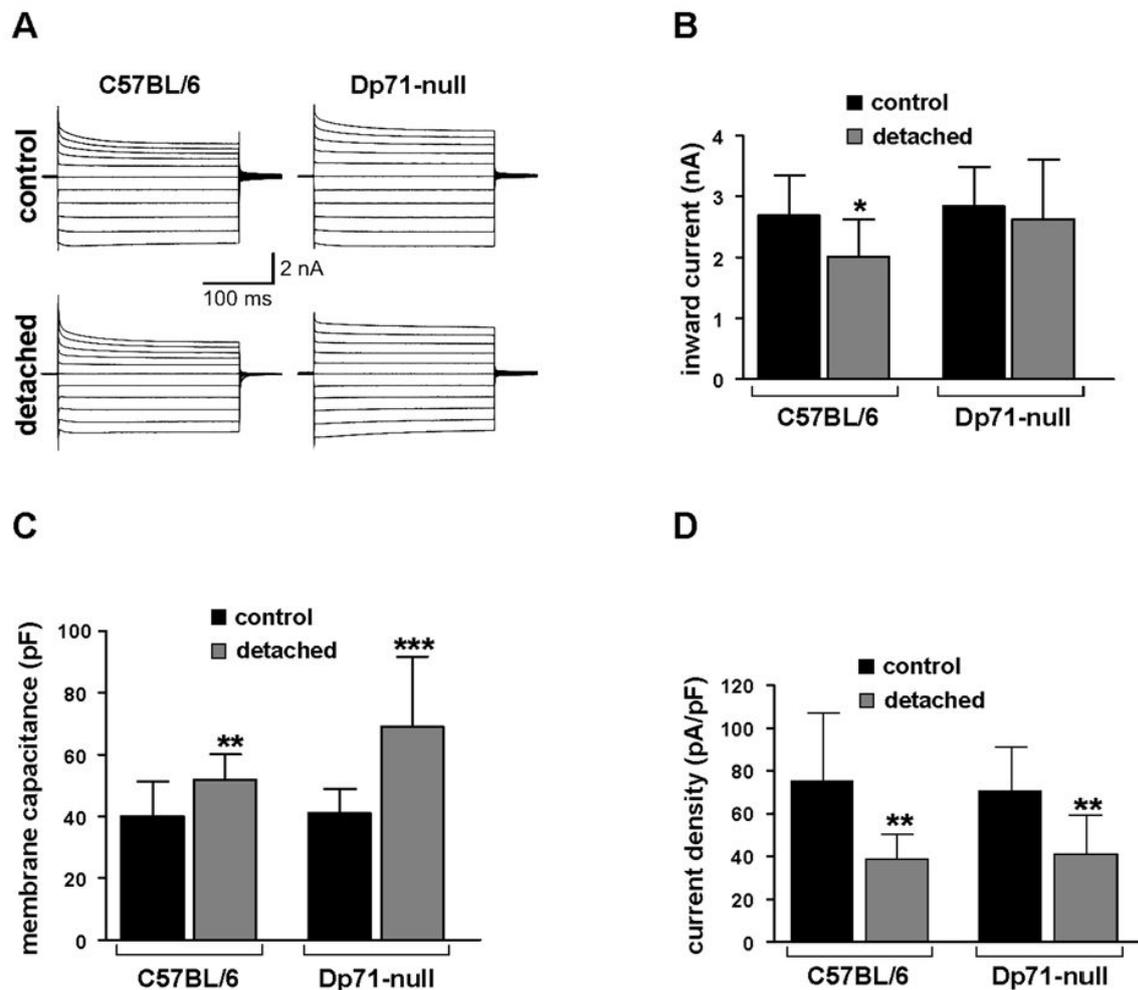


Figure 4. Effect of retinal detachment on electrophysiological properties of Müller cells. The cells were isolated from control and detached retina of wt and Dp71-null mice and were investigated 7 days after surgery. **A:** Examples of membrane currents evoked by depolarizing and hyperpolarizing voltage steps from a holding potential of -80 mV to potentials between -180 and $+20$ mV. No strong alterations of current kinetics were observed. **B:** Inward current amplitudes recorded at a -60 mV hyperpolarizing step. A weakly significant decrease was observed in cells from wt mice. **C:** Membrane capacitances were increased after retinal detachment in Müller cells from wt and Dp71-null mice. **D:** Resulting from decreased currents and increased capacitances, inward current densities were significantly reduced. Current densities were calculated from the data shown in B and C. Each bar represents mean values with standard deviations of 12 cells from 3 mice. Significant differences after retinal detachment versus the respective untreated control: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. doi:10.1371/journal.pone.0007329.g004

data). Further studies are necessary to elucidate the underlying pathomechanisms.

Extracellular accumulation of fluid, resulting in edema, is the most common cause of vision impairment in diabetic retinopathy [34]. Extravascular accumulation of fluid in the subretinal space and the inner retinal tissue is normally prevented by pigment epithelium and Müller cells [35]. Vascular leakage and impaired fluid absorption from the retinal tissue across the glio-vascular interface are major pathogenic events of edema formation [36]. We show here that both pathomechanisms are stimulated by the partial or total absence of Dp71. First, the fluid transport through Müller cell membrane is impaired (Fig. 5) and second, we show here for the first time that Dp71 depletion is accompanied by a significantly increased retinal vascular permeability (Fig. 6). This latter observation is in accordance with previous reports showing that Müller cells participate in the maintenance and the proper functioning of the BRB [6–8]. In the retina, Dp71 is mainly expressed in Müller cells endfeet and processes

surrounding blood vessels. It is thus conceivable that the lack of Dp71 results in morphological and functional alterations of these vitread and perivascular Müller cell compartments and that these impairments lead to a dysregulation of retinal vascular permeability. Presently the underlying molecular signaling cascade of this putative pathomechanism is completely unclear. It may be noteworthy in this context that Müller cells are capable of secreting the vascular endothelial growth factor (VEGF) [37,38], a key player in increasing the retinal vascular permeability. Obviously, the ‘compensatory’ upregulation of utrophin observed at the inner limiting membrane (Fig. 1K) is not functionally compensating the absence of Dp71. Under these circumstances, it appears to be surprising that Dp71-null mice do not show impairments in visual functions nor indications of retina degeneration if not challenged [14]. Very probably, the animals develop partial compensatory mechanisms; however, this remains to be proven by the future generation of conditional Dp71 KO mice.

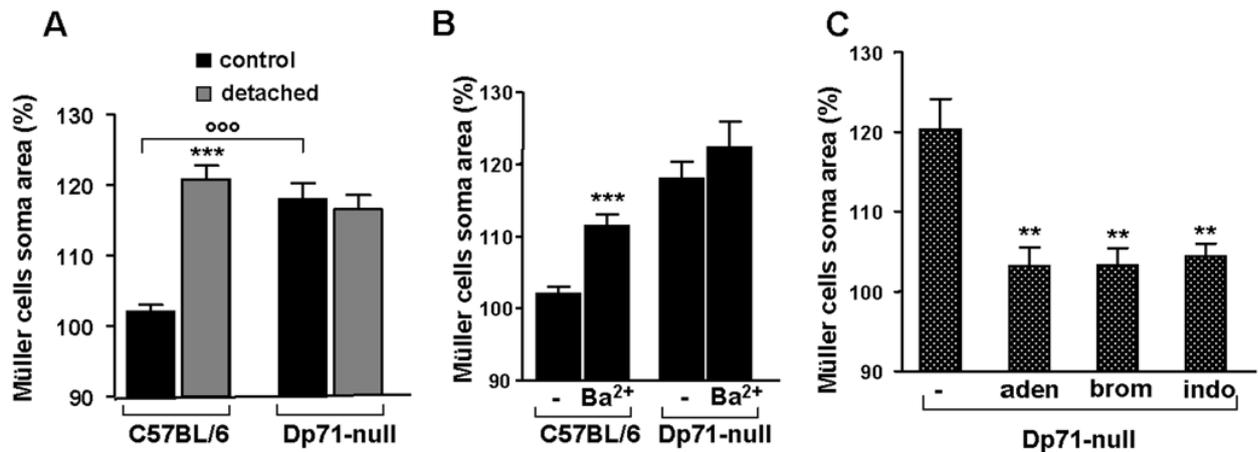


Figure 5. Osmotic swelling properties of Müller glial cells. Müller cell somata were measured after 4 minutes perfusion of retinal slices with a hypotonic solution (60% of control osmolarity). Data were expressed in percentage of the values obtained before hypotonic challenge. **A:** Müller cells of control and detached retina from wt and Dp71-null mice were exposed to hypotonic challenge. In wt mice, only cells of detached retina swell. Note the swelling of Müller cells from control retina of Dp71-null mice. **B:** Müller cells of control retina from wt and Dp71-null mice were exposed to hypotonic challenge in the presence of barium chloride (Ba²⁺). Addition of Ba²⁺ induced a swelling of Müller cells of wt mice and had no effect on the soma area of Müller cells of Dp71-null mice. **C:** Addition of adenosine (aden); inhibitor of phospholipase A₂, 4-bromophenacyl bromide (brom) and inhibitor of cyclooxygenase enzyme, indomethacin (indo) blocked the swelling of Müller cells of control retina from Dp71-null mice. Each bar represents value obtained in 12–34 cells; n = 3 mice for each group. Data are expressed as mean + SE. **p < 0.01; ***p < 0.001 significant differences versus control. ***p < 0.001 significant difference versus wt. doi:10.1371/journal.pone.0007329.g005

In conclusion we show here that depletion of Dp71, a cytoskeleton protein associated to the membrane, leads to physiological alterations in Müller cells similar to those observed in injured or diseased retinas; this involves a mislocation of potassium and water channels (Kir4.1 and AQP4) and a consequent dysregulation of water transport through Müller cells. Furthermore, we show that the early, acute downregulation of Dp71 in normal animals may be an important, decisive step in the development of reactive gliosis, upstream of the physiological

alterations. Finally we show the altered Müller cell properties in Dp71-null mice may increase the retinal vascular permeability, via a hitherto unknown mechanism. Taken together, Dp71-null mice appear as a versatile, promising model to develop novel drugs for the resolution of retinal edemas such as observed in human diabetic retinopathy.

Materials and Methods

Ethics Statement

All animal procedures were conducted in accord with UPMC University and INSERM Institutional Animal Care Committee guidelines. Surgery was carried out and/or directly supervised by persons with appropriate levels of experience and training, and surgery performed on animals that will survive was undertaken with careful attention to aseptic technique and prevention of infection. All surgical procedures were completed under anesthesia that renders the animal insensitive to pain.

Animals

The Dp71-null mice [39] were obtained 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-neomycine-resistance chimeric protein (β -geo). This abolished the expression of Dp71 without interfering with the expression of other products of the DMD (Duchenne Muscular Dystrophy) gene. C57BL/6J mice strain (Charles River, France) was used as controls for this study.

Antibodies

Monoclonal antibodies targeting β -Actin and GFAP were purchased from Sigma-Aldrich (Deisenhofen, Germany) and monoclonal antibodies directed against β -dystroglycan (43 DAG) were purchased from Novocastra Laboratories (Newcastle-upon-Tyne, UK). Polyclonal antibodies directed against dystrophins (H4) and utrophin (K7) were

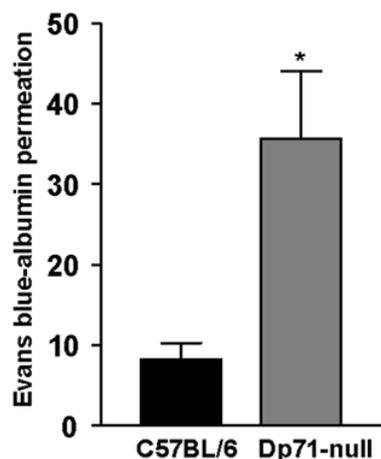


Figure 6. Implication of Dp71 in blood-retinal barrier permeability. Blood-retinal barrier permeability was measured using Evans blue dye vascular permeability assay on wt and Dp71-null adult mice. Vascular permeability was strongly increased in Dp71-null mice compared with C57BL/6 mice. Data are expressed as mean + SE; n = 4. *p < 0.05; significant differences versus control. doi:10.1371/journal.pone.0007329.g006

previously characterized [40], whereas the ones directed against Kir4.1 and AQP4 were from Alomone Labs (Souffelweyersheim, France).

Induction of retinal detachment

Local retinal detachment was induced in the right eye of adult mice, as previously reported with minor modification [41]. Briefly, mice were anesthetized by peritoneal injection of a mixture of 62.5 mg/kg ketamine (Virbac, France) and 12.5 mg/kg xylazine (Bayer, France). The pupils of the eyes were dilated by topical tropicamide 0.5% (Thea, France) and retinal detachment was created by subretinal injection of sodium hyaluronate. The left eye, sham injected, served as control. Animals with lens injury, vitreous hemorrhage and eye infection were excluded from this study.

Immunohistochemistry

Enucleated eyes were dissected to remove lens and cornea, and fixed by immersion in 4% paraformaldehyde for 1 h. Fixed eyes were cryoprotected in 30% sucrose, frozen and embedded in Cryomatrix (Thermo Shandon, Pittsburgh, Pennsylvania, United States), and then cut into 10 μ m cryostat sections and mounted on SuperFrost/Plus slides (O. Kindler, Freiburg, Germany). Sections were permeabilized for 10 minutes with 0.1% PBS (Phosphate Buffer Saline)-Triton X100 and blocked for 1 h with 0.1% normal goat serum, 3% bovine serum albumin, 0.1% Tween 20, and PBS. Sections were then incubated with primary antibody for 2 h at room temperature. After several washes with PBS, secondary antibodies (Interchim, France) coupled to Alexa fluor (Invitrogen, France) were used diluted 1:500 in 0.5% bovine serum albumin for 1 h. Sections were washed, mounted with Fluorsave reagent (Calbiochem, San Diego, CA, USA) and viewed with a DM 5000B microscope (Leica Microsystems SAS, Rueil Malmaison, France) equipped with a Photometrics cool SNAP TM FX camera (Roper Scientific, Tuscon, AZ, USA).

Western blot analysis

Western blot analysis was performed as previously described [42]. 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 0.1% Tween 20, 1% BSA, 5% dry milk (BIO-RAD, Herts, UK) for 1 h at room temperature then incubated 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 of retinal RNA

Total RNA from retina was extracted using Trizol reagent (Invitrogen, France) according to the manufacturer's instructions. Reverse transcription was performed on 1 μ g total RNA using SuperScript II 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 [43]. The following primer pairs were used: Dp71, sense 5'-ACAACCATGAGGGAA-CACCT-3', anti-sense 5'-TCTGGAGCCTTCTGAGCTTC-3'; β -Actin, sense 5'-GCTCTTTTCCAGCCTTCCTT-3', anti-sense 5'-CTTCTGCATCCTGTCAGCAA-3'. For relative comparison, the C_t values of real-time PCR results were analysed using the ΔC_t method according to the manufacturer's instructions. The

amount of Dp71 cDNA was normalized to the standard internal control obtained using primers for β -Actin.

Glial cell isolation

The retinae were isolated and special care was taken to separate detached areas. Retinal pieces were incubated in papain (0.2 mg/ml; Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany)-containing Ca^{2+} - and Mg^{2+} -free phosphate-buffered saline, pH 7.4, for 30 minutes at 37°C, followed by several washing steps with saline. After short incubation in saline supplemented with DNase I (200 U/ml; Sigma, Taufkirchen, Germany) the tissue pieces were triturated by a pipette, to obtain suspensions of isolated cells. The cells were stored at 4 °C in serum-free minimum essential medium (Sigma) until use within three hours after isolation.

Electrophysiological recordings

Membrane currents of acutely isolated glial cells were recorded in the whole-cell configuration of the patch-clamp technique. Voltage-clamp records were performed at room temperature (22–25°C) using the Axopatch 200A amplifier (Axon Instruments, Foster City, CA) and the ISO-2 computer program (MFK, Niedernhausen, Germany). The signals were low-pass filtered at 1, 2, or 6 kHz (eight-pole Bessel filter) and digitized at 5, 10, or 30 kHz, respectively, using a 12-bit A/D converter. Patch pipettes were pulled from borosilicate glass (Science Products, Hofheim, Germany) and had resistances between 4 and 6 M Ω when filled with a solution containing (mM) 10NaCl, 130 KCl, 1 CaCl₂, 2 MgCl₂, 10 ethyleneglycolbis(aminoethylether)tetra-acetate, and 10 *N*-2-hydroxyethyl-piperazine-*N'*-2-ethanesulphonic acid (HEPES) adjusted to pH 7.1 with Tris-base. The recording chamber was continuously perfused with extracellular solution which contained (mM) 135 NaCl, 3 KCl, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂, 1 Na₂HPO₄, 10 HEPES, and 11 glucose; the solution was equilibrated to pH 7.4 with Tris-base.

To evoke membrane currents, de- and hyperpolarizing voltage steps of 250 ms duration, with increments of 10 mV, were applied from a holding potential of -80 mV. The amplitudes of the steady-state inward currents were measured at the end of the voltage step from -80 to -140 mV. To activate transient voltage-dependent currents, a hyperpolarizing prepulse (500 ms, -120 mV) was applied before depolarization. The membrane capacitance of the cells was measured by the integral of the uncompensated capacitive artefact (filtered at 6 kHz) evoked by a hyperpolarizing voltage step from -80 to -90 mV when Ba^{2+} ions (1 mM) were present in the bath solution to block the K^+ conductance. Membrane potentials were measured in the current-clamp mode. Statistical analysis (unpaired Student's *t* test) was performed using the SigmaPlot program (Jandel Corp.); data are expressed as means \pm standard deviation. Cells from the operated and the contralateral control eyes from 3 C57BL/6 and 3 Dp71-null mice were used.

Müller cell swelling

To determine volume changes of Müller glial cells evoked by hypotonic stress, the cross-sectional area of glial cell somata in the inner nuclear layer of retinal slices was measured. Acutely isolated slices (thickness, 1 mm) were prepared from untreated control eyes and from the detached retinal area of operated eyes from C57BL/6 and Dp71-null mice, placed in a perfusion chamber and loaded with the vital dye Mitotracker Orange (10 μ M). This dye is selectively taken up by Müller glial cells whereas retinal neurons, astrocytes, and microglial cells remain unstained [44]. The stock solution of the dye was prepared in dimethylsulfoxide and resolved in saline. The slices were examined with a confocal laser scanning microscope LSM 510 Meta (Zeiss, Oberkochen, Germany). Mitotracker Orange was excited at 543 nm, and emission was recorded with a 560 nm long-pass filter. To assure

that the maximum soma areas were precisely recorded, the focal plane was continuously adjusted in the course of the experiments.

A gravity-fed system with multiple reservoirs was used to perfuse the recording chamber continuously with extracellular solution; the hypotonic solution and test substances were added by rapid change of the perfusate. The extracellular solution consisted of (in mM) 136 NaCl, 3 KCl, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂, 10 HEPES, and 11 glucose, adjusted to pH 7.4 with Tris-base. The hypotonic solution (60% of control osmolarity) was made up by adding distilled water. BaCl₂ (1 mM) was preincubated for 10 minutes in extracellular solution before application within hypotonic solution. Blocking substances were preincubated for 15 to 45 minutes, and adenosine was administered simultaneously with the hypotonic solution. Swelling experiments were performed at room temperature.

To determine the extent of glial soma swelling, the cross-sectional area of Mitotracker Orange-stained cell bodies in the inner nuclear layer of retinal slices was measured off-line using the image analysis software of the LSM. Bar diagrams display the mean (+ SEM) cross-sectional area of cell somata that was measured after 4-minute perfusion with hypotonic solution, in percent of the soma area measured before osmotic challenge (100%). The absolute control values were not different between the several groups and varied in the range between 47 and 51 μm².

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 [33]. 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) prewarmed 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, the absorbance maximum for Evans blue, and 740 nm, the 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 × g wet retina⁻¹ × h⁻¹).

Data analysis

Statistical significance of data obtained from Western blot, RT-PCR and electrophysiological recording was determined by

unpaired Student's t-test with the use of Prism 5 (GraphPad Software, San Diego, CA). To determine the extent of Müller cells soma swelling, significance analysis was made using Mann-Whitney U-test for two groups and analysis of variance followed by comparisons for multiple groups.

Supporting Information

Figure S1 Syntrophin expression after retinal detachment. Proteins were extracted from control and detached retina of C57BL/6 mice, 24 h after surgery. The protein samples were processed through SDS-PAGE and Western blotting, and probed with antibodies: anti-pan-syntrophin (SYN) and β-Actin. Monoclonal antibodies directed against syntrophins (α and β-SYN) and β-Actin were purchased respectively from Abcam (Cambridge, UK) and Sigma-Aldrich (Deisenhofen, Germany). The relative protein expression is expressed in arbitrary units as the mean + SE (n = 4). Each value represents the ratio of the specific band stain intensity normalized to β-Actin expression (TotalLab TL120, Nonlinear Inc, Durham NC, USA). Found at: doi:10.1371/journal.pone.0007329.s001 (0.09 MB TIF)

Figure S2 Immunolocalization of Dp71 in wt and Dp71-null retinal sections. In both mice, retinal sections were probed with a pan-specific antibody recognizing all dystrophin forms. In wt retinas, immunoreactivity with this antibody revealed a staining at the ILM (open arrowhead), around blood vessels (filled arrows), at the OPL (asterisk) and at the OLM (filled arrowhead). In Dp71-null retinas, solely the immunoreactivity at the OPL remains. The immunostaining at the OLM, around blood vessels and at the ILM disappears, confirming the Dp71 localization at these positions. OLM, outer limiting membrane; ONL, outer nuclear layer; OPL, outer plexiform layer; INL, inner nuclear layer; IPL, inner plexiform layer; GCL, ganglion cell layer; ILM, inner limiting membrane. Scale bar = 20 μm.

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0007329.s002 (0.06 MB PDF)

Acknowledgments

We thank Isabelle Renault, Manuel Simonutti and Gérald Hugon, respectively for animal care, skillful technical assistance, and antibody raising.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: AS AR JAS AR. Performed the experiments: AS RT TP AW BEM RB. Analyzed the data: AS RT TP AW MJR. Contributed reagents/materials/analysis tools: DY DM. Wrote the paper: AS.

References

- Newman E, Reichenbach A (1996) The Müller cell: a functional element of the retina. *Trends Neurosci* 19: 307–312.
- Ehinger B (1977) Glial and neuronal uptake of GABA, glutamic acid, glutamine and glutathione in the rabbit retina. *Exp Eye Res* 25: 221–234.
- Brew H, Attwell D (1987) Electrogenic glutamate uptake is a major current carrier in the membrane of axolotl retinal glial cells. *Nature* 327: 707–709.
- Barnett NL, Pow DV, Robinson SR (2000) Inhibition of Müller cell glutamine synthetase rapidly impairs the retinal response to light. *Glia* 30: 64–73.
- Bringmann A, Pannicke T, Biedermann B, Francke M, Iandiev I, et al. (2009) Role of retinal glial cells in neurotransmitter uptake and metabolism. *Neurochem Int* 54: 143–160.
- Tout S, Chan-Ling T, Hollander H, Stone J (1993) The role of Müller cells in the formation of the blood-retinal barrier. *Neuroscience* 55: 291–301.
- Distler C, Dreher Z (1996) Glial cells of the monkey retina II. Müller cells. *Vision Res* 36: 2381–2394.
- Tretiaeh M, Madigan MC, Wen L, Gillies MC (2005) Effect of Müller cell coculture on in vitro permeability of bovine retinal vascular endothelium in normoxic and hypoxic conditions. *Neurosci Lett* 378: 160–165.
- Bringmann A, Francke M, Pannicke T, Biedermann B, Kodal H, et al. (2000) Role of glial K(+) channels in ontogeny and gliosis: a hypothesis based upon studies on Müller cells. *Glia* 29: 35–44.
- Kofuji P, Ceelen P, Zahs KR, Surbeck LW, Lester HA, et al. (2000) Genetic inactivation of an inwardly rectifying potassium channel (Kir4.1 subunit) in mice: phenotypic impact in retina. *J Neurosci* 20: 5733–5740.
- Kofuji P, Biedermann B, Siddharthan V, Raap M, Iandiev I, et al. (2002) Kir potassium channel subunit expression in retinal glial cells: implications for spatial potassium buffering. *Glia* 39: 292–303.
- Nagelhus EA, Horio Y, Inanobe A, Fujita A, Haug FM, et al. (1999) Immunogold evidence suggests that coupling of K⁺ siphoning and water transport in rat retinal Müller cells is mediated by a coenrichment of Kir4.1 and AQP4 in specific membrane domains. *Glia* 26: 47–54.

13. Connors NC, Kofuji P (2002) Dystrophin Dp71 is critical for the clustered localization of potassium channels in retinal glial cells. *J Neurosci* 22: 4321–4327.
14. Daloz C, Sarig R, Fort P, Yaffe D, Bordais A, et al. (2003) Targeted inactivation of dystrophin gene product Dp71: phenotypic impact in mouse retina. *Hum Mol Genet* 12: 1543–1554.
15. Fort PE, Sene A, Pannicke T, Roux MJ, Forster V, et al. (2008) Kir4.1 and AQP4 associate with Dp71- and utrophin-DAPs complexes in specific and defined microdomains of Müller retinal glial cell membrane. *Glia* 56: 597–610.
16. Rehak M, Hollborn M, Iandiev I, Pannicke T, Karl A, et al. (2008) Retinal Gene Expression and Müller Cell Responses after Branch Retinal Vein Occlusion in the Rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci*.
17. Pannicke T, Iandiev I, Uckermann O, Biedermann B, Kutzera F, et al. (2004) A potassium channel-linked mechanism of glial cell swelling in the postischemic retina. *Mol Cell Neurosci* 26: 493–502.
18. Pannicke T, Iandiev I, Wurm A, Uckermann O, vom Hagen F, et al. (2006) Diabetes alters osmotic swelling characteristics and membrane conductance of glial cells in rat retina. *Diabetes* 55: 633–639.
19. Wurm A, Pannicke T, Iandiev I, Buhner E, Pietsch UC, et al. (2006) Changes in membrane conductance play a pathogenic role in osmotic glial cell swelling in detached retinas. *Am J Pathol* 169: 1990–1998.
20. Barnett NL, Pow DV, Bull ND (2001) Differential perturbation of neuronal and glial glutamate transport systems in retinal ischaemia. *Neurochem Int* 39: 291–299.
21. Ishikawa A, Ishiguro S, Tamai M (1996) Accumulation of gamma-aminobutyric acid in diabetic rat retinal Müller cells evidenced by electron microscopic immunocytochemistry. *Curr Eye Res* 15: 958–964.
22. Ishikawa A, Ishiguro S, Tamai M (1996) Changes in GABA metabolism in streptozotocin-induced diabetic rat retinas. *Curr Eye Res* 15: 63–71.
23. Fletcher EL, Phipps JA, Wilkinson-Berka JL (2005) Dysfunction of retinal neurons and glia during diabetes. *Clin Exp Optom* 88: 132–145.
24. Lewis GP, Matsumoto B, Fisher SK (1995) Changes in the organization and expression of cytoskeletal proteins during retinal degeneration induced by retinal detachment. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 36: 2404–2416.
25. Nakazawa T, Takeda M, Lewis GP, Cho KS, Jiao J, et al. (2007) Attenuated glial reactions and photoreceptor degeneration after retinal detachment in mice deficient in glial fibrillary acidic protein and vimentin. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48: 2760–2768.
26. Faude F, Wendt S, Biedermann B, Gartner U, Kacza J, et al. (2001) Facilitation of artificial retinal detachment for macular translocation surgery tested in rabbit. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42: 1328–1337.
27. Francke M, Faude F, Pannicke T, Bringmann A, Eckstein P, et al. (2001) Electrophysiology of rabbit Müller (glial) cells in experimental retinal detachment and PVR. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42: 1072–1079.
28. Pannicke T, Uckermann O, Iandiev I, Biedermann B, Wiedemann P, et al. (2005) Altered membrane physiology in Müller glial cells after transient ischemia of the rat retina. *Glia* 50: 1–11.
29. Lewis GP, Fisher SK (2003) Up-regulation of glial fibrillary acidic protein in response to retinal injury: its potential role in glial remodeling and a comparison to vimentin expression. *Int Rev Cytol* 230: 263–290.
30. Amiry-Moghaddam M, Williamson A, Palomba M, Eid T, de Lanerolle NC, et al. (2003) Delayed K⁺ clearance associated with aquaporin-4 mislocalization: phenotypic defects in brains of alpha-syntrophin-null mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 13615–13620.
31. Bringmann A, Pannicke T, Grosche J, Francke M, Wiedemann P, et al. (2006) Müller cells in the healthy and diseased retina. *Prog Retin Eye Res* 25: 397–424.
32. Iandiev I, Uckermann O, Pannicke T, Wurm A, Tenckhoff S, et al. (2006) Glial cell reactivity in a porcine model of retinal detachment. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47: 2161–2171.
33. Xu Q, Quam T, Adamis AP (2001) Sensitive blood-retinal barrier breakdown quantitation using Evans blue. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42: 789–794.
34. Bresnick GH (1983) Diabetic maculopathy. A critical review highlighting diffuse macular edema. *Ophthalmology* 90: 1301–1317.
35. Bringmann A, Reichenbach A, Wiedemann P (2004) Pathomechanisms of cystoid macular edema. *Ophthalmic Res* 36: 241–249.
36. Cunha-Vaz JG, Travassos A (1984) Breakdown of the blood-retinal barriers and cystoid macular edema. *Surv Ophthalmol* 28 Suppl: 485–492.
37. 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: 3533–3537.
38. Kaur C, Sivakumar V, Foulds WS (2006) Early response of neurons and glial cells to hypoxia in the retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47: 1126–1141.
39. Sarig R, Mezger-Lallemand V, Gitelman I, Davis C, Fuchs O, et al. (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: 1–10.
40. Rivier F, Robert A, Hugon G, Bonet-Kerrache A, Nigro V, et al. (1999) Dystrophin and utrophin complexed with different associated proteins in cardiac Purkinje fibres. *Histochem J* 31: 425–432.
41. Yang L, Bula D, Arroyo JG, Chen DF (2004) Preventing retinal detachment-associated photoreceptor cell loss in Bax-deficient mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45: 648–654.
42. Bordais A, Bolanos-Jimenez F, Fort P, Varela C, Sahel JA, et al. (2005) Molecular cloning and protein expression of Duchenne muscular dystrophy gene products in porcine retina. *Neuromuscul Disord* 15: 476–487.
43. Rozen S, Skaletsky H (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol* 132: 365–386.
44. Uckermann O, Iandiev I, Francke M, Franze K, Grosche J, et al. (2004) Selective staining by vital dyes of Müller glial cells in retinal wholemounts. *Glia* 45: 59–66.

Supporting Information

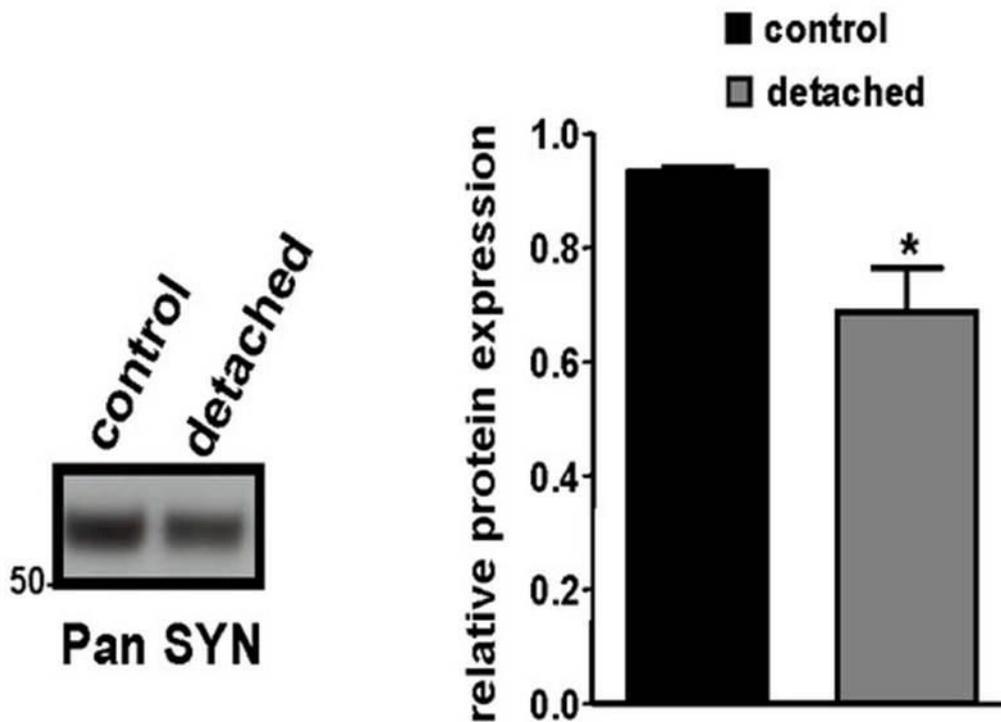


Figure S1. Synaptrophin expression after retinal detachment. Proteins were extracted from control and detached retina of C57BL/6 mice, 24 h after surgery. The protein samples were processed through SDS-PAGE and Western blotting, and probed with antibodies: anti-pan-syntrophin (SYN) and β -Actin. Monoclonal antibodies directed against syntrophins (α and β -SYN) and β -Actin were purchased respectively from Abcam (Cambridge, UK) and Sigma-Aldrich (Deisenhofen, Germany). The relative protein expression is expressed in arbitrary units as the mean + SE (n = 4). Each value represents the ratio of the specific band stain intensity normalized to β -Actin expression (TotalLab TL120, Nonlinear Inc, Durham NC, USA).

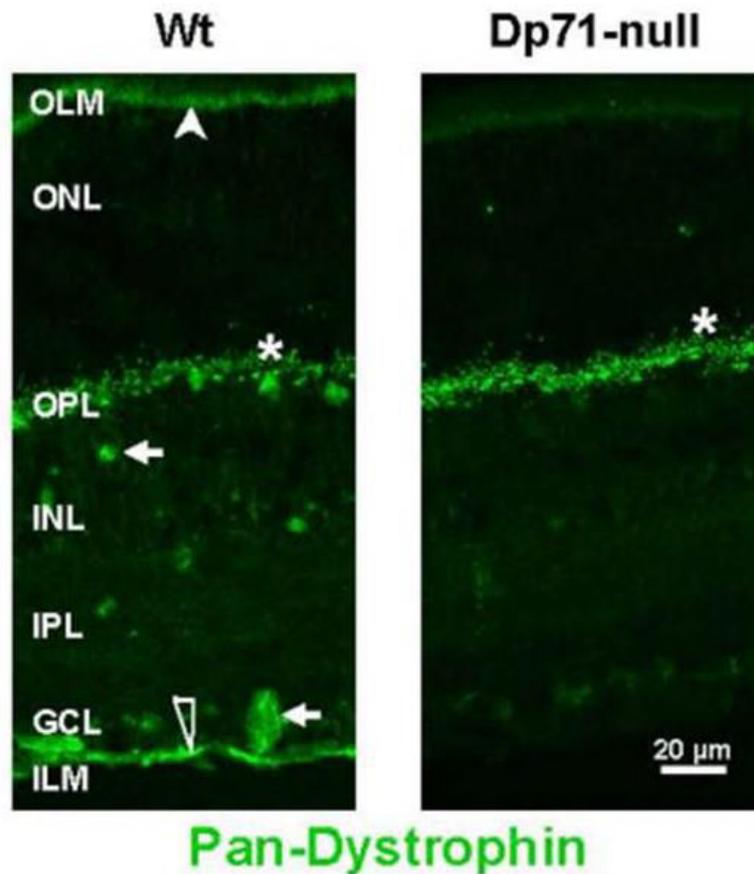


Figure S2. Immunolocalization of Dp71 in wt and Dp71-null retinal sections. In both mice, retinal sections were probed with a pan-specific antibody recognizing all dystrophin forms. In wt retinas, immunoreactivity with this antibody revealed a staining at the ILM (open arrowhead), around blood vessels (filled arrows), at the OPL (asterisk) and at the OLM (filled arrowhead). In Dp71-null retinas, solely the immunoreactivity at the OPL remains. The immunostaining at the OLM, around blood vessels and at the ILM disappears, confirming the Dp71 localization at these positions. OLM, outer limiting membrane; ONL, outer nuclear layer; OPL, outer plexiform layer; INL, inner nuclear layer; IPL, inner plexiform layer; GCL, ganglion cell layer; ILM, inner limiting membrane. Scale bar = 20 μm .

Deuxième article

10- Dp71 et inflammation vasculaire rétinienne

10-1 Introduction

Plus de 80% des patients DMD présentent une forte réduction de l'onde b de l'électrorétinogramme (ERG), liée à une perturbation de la transmission du signal électrique entre les différents neurones de la rétine (Pillers, Bulman et al. 1993). De plus un tiers de ces patients présente aussi des troubles cognitifs associés à des infarctus ischémiques corticales (Rosman and Kakulas 1966). En outre, il a été rapporté plusieurs cas de rétinopathie proliférante avec hémorragie rétinienne et néovascularisation extensive associées à la DMD (Louie, Apte et al. 2004, Fagan, Levy et al. 2012, Hahn, Lin et al. 2013).

Dans la rétine, la dystrophine Dp71 est une protéine du cytosquelette associée à la membrane, c'est le cœur du complexe protéique associé à la dystrophine (DAPs, Dystrophin associated proteins) et elle permet de relier l'actine du cytosquelette intracellulaire de la cellule gliale de Müller à la matrice extracellulaire par l'intermédiaire d'un autre membre du complexe DAPs qui est le β -dystroglycane (Claudepierre, Dalloz et al. 2000). De plus, la délétion du β -dystroglycane induit la réduction de l'amplitude de l'onde b de l'ERG, associée à une déficience visuelle (Satz, Philp et al. 2009). La protéine Dp71 rétinienne est principalement et fortement exprimée dans les cellules gliales de Müller et plus précisément au niveau périvasculaire, associée au canal de potassium à rectification entrante (Kir4.1) et au canal protéique à eau, aquaporine 4 (AQP4) (Fort, Sene et al. 2008). Les cellules gliales de Müller sont les principale cellules gliales de la rétine, qui traversent l'épaisseur de la rétine et contribuent à la formation et à la stabilisation de la barrière hémato-rétinienne (BHR), par le contact et l'enroulement du plexus vasculaire rétinien, et la régulation du flux sanguin rétinien (Paulson and Newman 1987, Tout, Chan-Ling et al. 1993). En effet, il a été rapporté que, après une ablation conditionnelle des cellules gliales Müller, la structure et la fonction

rétinienne sont modifiées avec une perméabilité accrue de la BHB et une néovascularisation intra-rétinienne (Shen, Fruttiger et al. 2012). Les cellules gliales de Müller sont aussi les principales sources de facteurs inflammatoires causant une inflammation rétinienne. L'inflammation rétinienne est impliquée dans de nombreux troubles oculaires cécitantes dont la rétinopathie diabétique, l'uvéite rétinienne et l'occlusion veineuse rétinienne en modifiant la BHB et en provoquant l'occlusion des capillaires. Par exemple, les sources principales de facteurs inflammatoires dans les premiers stades de la rétinopathie diabétique sont les cellules gliales de Müller, produisant de hauts niveaux de facteur de croissance vasculaire endothélial (VEGF), de molécule d'adhésion intercellulaire 1 (ICAM-1) et de facteur de nécrose tumorale- α (TNF - α) (Mizutani, Gerhardinger et al. 1998, Shelton, Distler et al. 2009). Ces réponses inflammatoires induisent l'adhérence des leucocytes et une perméabilité vasculaire accrue, associées à des altérations fonctionnelles et structurelles de la vascularisation rétinienne, comme en témoignent les micro-anévrysmes, la perte des péricytes et la dégénérescence des capillaires (Nunes, Pires et al. 2009).

Il a été rapporté une légère diminution de l'amplitude de l'onde b de l'ERG chez les souris Dp71-null par rapport aux souris contrôles (Cia, Simonutti et al. 2014). De plus, l'absence de la protéine Dp71 diminue l'expression de la protéine AQP4 et induit la délocalisation de la protéine Kir4.1 tout le long de la membrane cellulaire, alors qu'elle est initialement restreinte aux extrémités des pieds des cellules gliales Müller (Fort, Sene et al. 2008). Nous avons précédemment montré que l'absence de la Dp71 conduit également à la diminution de l'expression du β -dystroglycane autour des vaisseaux rétiniens (Fort, Sene et al. 2008). De plus, nous avons précédemment montré que la délétion du gène codant pour la Dp71 est à l'origine d'une forte perméabilité vasculaire rétinienne, due à la rupture de la BHR (Sene, Tadayoni et al. 2009).

Dans cette étude nous avons entrepris d'étudier si la rupture de la perméabilité de la BHR observée chez la souris Dp71-null est associée à une inflammation vasculaire rétinienne. Cette étude a pour objectifs de quantifier plusieurs facteurs inflammatoires, tels que le VEGF, la molécule d'adhésion intracellulaire-1 (ICAM-1), le facteur anti-apoptotique Bcl-2, ainsi que les médiateurs de l'inflammation dérivés des lipides, tels que la prostaglandine PGE2 et l'enzyme participant à la synthèse des leucotriène, ALOX5AP (Arachidonate 5-lipoxygenase Activating Protein). Nous avons quantifié le nombre de leucocytes qui se fixent à l'endothélium vasculaire rétinien. Le recrutement massif des leucocytes est responsable des dommages tissulaires. Nous nous sommes aussi intéressés à la perte des capillaires, la gliose des cellules gliales de Müller, ainsi qu'à la morphologie des cellules microgliales chez les souris Dp71-null et contrôles.

10-2 Résultats

Dans un état inflammatoire, le VEGF est impliqué dans la pathogenèse de diverses maladies oculaires telles que la dégénérescence maculaire liée à l'âge associée à une néovascularisation, l'occlusion veineuse rétinienne, l'œdème maculaire diabétique et la rétinopathie diabétique (Shams and Ianchulev 2006). Nous avons observé que l'absence de Dp71 induit une augmentation significative de l'expression des ARNm et protéique du VEGF dans la rétine. Cependant, l'expression rétinienne du récepteur au VEGF de type 2 (VEGFR-2) n'est pas modifiée par l'absence de la Dp71.

Pour caractériser davantage la contribution du VEGF dans la régulation de l'intégrité vasculaire rétinienne après délétion de la Dp71, nous avons évalué son effet sur ICAM-1, qui est constitutivement produit par les cellules endothéliales. Dans des études antérieures, il a été montré que le VEGF est à l'origine de l'augmentation expression d'ICAM-1 dans la rétine de rat modèle diabétique induit par l'injection de stréptozotocine (Joussen, Poulaki et al. 2002).

Dans cette étude, nous avons observé que l'expression en ARNm et protéique d'ICAM est augmentée en absence de Dp71. Cependant, l'expression du TNF- α n'est pas modifiée par l'absence de Dp71.

Dans le but d'explorer le rôle de la surexpression d'ICAM-1 observée chez la souris Dp71-null, nous avons quantifié le nombre de leucocytes adhérents à l'endothélium vasculaire. Pour réaliser cette quantification, nous avons perfusé les souris Dp71-null et contrôles, avec une solution de FITC conjuguée à de la concanavaline A (Con A), dans le but de marquer les leucocytes adhérents. Les rétines sont ensuite marquées avec l'anticorps CD45, pour confirmer que ces cellules marquées sont bien des leucocytes. Nos résultats, indiquent que les rétines de souris Dp71-null présentent un nombre de leucocytes adhérents significativement élevé comparé aux souris contrôles.

Un recrutement excessif de leucocytes et l'activation de leur adhésion à l'endothélium accompagné d'une obstruction ultérieure du système vasculaire est un événement pathologique déterminant dans de nombreuses maladies rétinienne pouvant entraîner une perte de vision. De plus, il a été démontré qu'une lésion par ischémie-reperfusion chez le rat, conduit à une dégénérescence des capillaires (Wang, Li et al. 2011). Pour déterminer l'effet de l'absence de Dp71 sur la dégénérescence vasculaire, le système vasculaire rétinien des souris a été isolé par digestion par la trypsine, et le nombre de capillaires acellulaire / mm² de surface rétinienne a été quantifié. Le nombre de capillaires dégénérés est significativement plus élevé chez les souris Dp71-null comparé aux souris contrôles.

Nous avons aussi exploré l'impact de cette augmentation du nombre de leucocytes adhérents et la dégénérescence des capillaires, sur la production de médiateurs inflammatoires par la rétine. Les leucotriènes et les prostaglandines sont des lipides biologiquement actifs issus du métabolisme de l'acide arachidonique en réponse à un certain nombre de stimuli

immunologiques et inflammatoires (Samuelsson 1983). La protéine 5-lipoxygénase-activating (FLAP), codée par le gène ALOX5AP, est une enzyme-clé nécessaire à la synthèse des leucotriènes (Dixon, Diehl et al. 1990). La prostaglandine E2 (PGE2) est un médiateur inflammatoire bioactif généré par le métabolisme de l'acide arachidonique impliquant des cyclooxygénases et des isomérase. Pour étudier l'impact de l'absence de la Dp71 dans ces deux voies du métabolisme de l'acide arachidonique, nous avons quantifié l'expression de l'ARNm ALOX5AP par qPCR et l'expression de PEG2 par la méthode ELISA. Nous avons trouvé que l'expression de l'ARNm ALOX5AP est diminuée dans les rétines des souris Dp71-null par rapport aux souris contrôles. En revanche, l'expression de PGE2 ne diffère pas entre les souris Dp71-null et les souris contrôles.

Le facteur anti-apoptotique Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) est exprimé dans la rétine (montré chez les rongeurs) et par les cellules gliales de Müller (montré chez l'homme) (Grosche, Hartig et al. 1995, Mizutani, Gerhardinger et al. 1998). Il a été rapporté que le VEGF induit l'expression de Bcl-2 (Gerber, Dixit et al. 1998, Nor, Christensen et al. 1999). Nos résultats montrent clairement que l'expression rétinienne des ARNm de Bcl-2 est augmentée chez les souris Dp71-null par rapport aux souris contrôles.

L'œdème et l'accumulation de liquide dans la rétine sont souvent associés à des maladies vasculaires de la rétine. Nous avons vérifié si les souris Dp71-null sont touchées au niveau de la régulation de l'équilibre osmotique rétinien. L'aquaporine-4 (AQP4) est une protéine de transport sélectif de l'eau, fortement exprimée dans les zones périvasculaires et dans les pieds en contact avec le vitré des cellules gliales de Müller et des astrocytes de la rétine interne (Nagelhus, Veruki et al. 1998, Goodyear, Crewther et al. 2009). Chez le rat diabétique induit par la streptozotocine, l'expression d'AQP4 est augmentée dans la rétine (Li, Yang et al. 2011). Nous avons montré que l'expression des ARNm AQP4 est deux fois plus forte chez la souris Dp71-null par rapport à la souris contrôle.

Nous avons évalué la gliose des cellules gliales de Müller par un marquage avec l'anticorps anti-GFAP. De manière surprenante, les cellules gliales de Müller chez les souris Dp71-null ne présentent pas d'augmentation de l'expression de la GFAP. De plus, les cellules microgliales marquées avec l'anticorps Iba1, ne sont pas activées et présentent une morphologie normale.

10-3 Conclusion

Cette étude a permis de montrer pour la première fois que l'absence de la Dp71 est à l'origine d'une inflammation rétinienne avec une surexpression de VEGF, d'ICAM-1 et d'AQP4, ainsi qu'une augmentation du nombre de leucocytes adhérents associée à la dégénérescence des capillaires et à la rupture de la barrière hémato-rétinienne. Cependant, la souris Dp71-null présente une augmentation de l'expression de Bcl-2 et une réduction d'ALOX5AP. L'ensemble de ces résultats montrent que la souris Dp71-null pourrait être un bon modèle pour étudier les maladies vasculaires rétiniennes comme la rétinopathie diabétique.

Ce travail a fait l'objet de la publication suivante :

Dystrophin Dp71 gene deletion induces retinal vascular inflammation and capillary degeneration. Brahim El Mathari, Abdoulaye Sene, Hugo Charles-Messance, Xavier Guillonnet, Claudine Grepin, Florian Sennlaub, José-Alain Sahel, Alvaro Rendon, Ramin Tadayoni. Soumis à Human Molecular genetics.

Dystrophin Dp71 gene deletion induces retinal vascular inflammation and capillary degeneration

Brahim El Mathari^{1,2}, Abdoulaye Sene³, Hugo Charles-Messance¹, Xavier Guillonnet¹,
Claudine Grepin², Florian Sennlaub¹; José-Alain Sahel^{4,5,6}, Alvaro Rendon^{1,*}, Ramin
Tadayoni^{1,7,*}

¹Institut de la Vision/INSERM/UPMC, Univ Paris 06/CNRS/CHNO des Quinze-Vingts,
Paris, France; ²Sanofi Fovea - Ophthalmology, Paris, France ; ³Department of Ophthalmology
and Visual Sciences, Washington University School of Medicine, Saint Louis, Missouri,
USA; ⁴Fondation Ophtalmologique Adolphe de Rothschild, Paris, France; ⁵Institute of
Ophthalmology, University College of London, United Kingdom; ⁶Académie des Sciences–
Institut de France, Paris, France ; ⁷Ophthalmology Department, Hôpital Lariboisière,
Université Paris 7 - Sorbonne Paris Cité Paris, France

* These authors contributed equally to this work.

Correspondence:

Ramin TADAYONI

Eye MD, PhD, Professor of Ophthalmology

Université Paris 7 (Sorbonne Paris Cité) Hôpital Lariboisière (AP-HP)

2, rue Ambroise Paré

75010 Paris

Mobile: +33608563347

Fax: +33149956483

Secretary: +33149956488

Email: ramin.tadayoni@lrb.aphp.fr

Abstract

We have previously shown that the deletion of the dystrophin Dp71 gene induces a highly permeable blood retinal barrier (BRB). Given that BRB breakdown is involved in retinal inflammation and the pathophysiology of many blinding eye diseases, here we investigated whether the absence of Dp71 brings out retinal vascular inflammation and vessel loss by using specific retinal Dp71-null mice.

The expression of vascular endothelial growth factor (VEGF), quantified by qPCR and ELISA methods was higher in retinal Dp71-null mice than in wild-type mice. In contrast, no differences were observed in VEGFR-2 and tumor necrosis factor- α (TNF- α) expression. Moreover mRNA expression of water channel, aquaporin 4 (AQP4) was increased after Dp71 deletion. The retinal Dp71 deletion was also associated with the overexpression of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), which is expressed on endothelial cells surface to recruit leukocytes. Consistent with these findings, the total number of adherent leukocytes per retina, assessed after perfusion with FITC-conjugated concanavalin A, was increased in the absence of Dp71. Finally, a significant increase of capillary degeneration quantified after retinal trypsin digestion was observed in mice lacking Dp71.

These data illustrate for the first time that the deletion of Dp71 was associated with retinal vascular inflammation, vascular lesions with increased leukocyte adhesion and capillary degeneration. Thus, dystrophin Dp71 could play a critical role in retinal vascular inflammation disease, and therefore represent a potential therapeutic target.

Key Words: Retinal vascular inflammation, Dystrophin Dp71, Müller glial cells, Capillaries lost, Leukocytes.

Introduction

Duchenne muscular dystrophy (DMD) gene (2.5 Mb), located on X chromosome, is composed of 79 exons.^{1,2} Different mutations in this gene induce progressive wasting of skeletal and cardiac muscles in Duchenne and Becker muscular dystrophies (DMD and BMD) patients.³ A third of these patients present also cognitive impairments associated with cortical ischemic infarcts.⁴ In the retina, when measured in dark-adapted (scotopic) conditions, the electroretinogram (ERG) shows reduced amplitude of the b-wave response in 80% of DMD patients.⁵ Moreover, it has been reported different cases of proliferative retinopathy with retinal haemorrhages and extensive neovascularization associated with DMD.⁶⁻⁸

Different internal cell-specific promoters of the DMD gene (i.e. brain, muscle and Purkinje cells) generate 427 kDa full-length dystrophin and different short dystrophin proteins such as Dp71, which is highly expressed in the brain and the retina.⁹ In the brain, the Dp71 protein is specifically located in the astrocyte perivascular end-feet, participating to the blood-brain barrier (BBB) stabilization.⁹ In the retina, the Dystrophin Dp71 is a cytoskeleton membrane associated protein, that is the core of dystrophin associated protein (DAP) complex and linking the retinal Müller glial intracellular actin cytoskeleton to the extracellular matrix via another member of the DAPs which is the β -dystroglycan.¹⁰ Moreover, the deletion of β -dystroglycan induces the reduction of the ERG b-wave amplitude, associated with visual impairment.¹¹ The Dp71 protein was found to be located in the retinal inner limiting membrane (ILM) and around retinal blood vessels.¹² Precisely, the retinal Dp71 protein is mainly and strongly expressed in Müller glial cell and specifically in perivascular localization associated with the inwardly rectifying potassium channel (Kir4.1) and the water channel protein aquaporin 4 (AQP4).¹³ Müller glial cells are the principal retinal glia, radially spanning the thickness of the retina and contribute to the formation and stabilization of the blood-retinal barrier (BRB) by contacting and ensheathing the retinal vascular plexus; and

regulate retinal blood flow.^{14,15} Indeed, it has been reported that after conditional Müller glial cell ablation, retinal structure and function are altered with increased permeability of the BRB and intraretinal neovascularization.¹⁶ Müller glial cells are also the major sources of inflammatory factors causing retinal vascular inflammation. Retinal vascular inflammation is causative in many blinding eye disorders including diabetic retinopathy, retinal uveitis and retinal vein occlusion by altering the BRB and occluding capillaries. For instance, the major sources of inflammatory factors in early stage of diabetic retinopathy are Müller glial cells, producing high level of retinal vascular endothelial growth factor (VEGF), intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) and tumor necrosis factor- α (TNF- α).^{17,18} These inflammatory responses induce leukocyte adherence and vascular permeability associated with functional and structural alterations of retinal vasculature, as evidenced by microaneurysms, pericyte loss and degenerated capillaries.¹⁹

Biomicroscopic analysis of the eye fundus of Dp71-null mice shows that targeted deletion of Dp71 has no obvious effect on retinal structure and overall vasculature including arteries and veins in Dp71-null adult mice compared to wild-type (WT) mice. Moreover, there is a slight reduction in b-wave amplitude in the ERG of Dp71-null mice compared to WT mice.²⁰ However, the absence of the Dp71 protein decreased the expression of AQP4 protein and induces the redistribution of Kir4.1, initially restricted to the end-feet of Müller glial cell, all along the cell membrane.¹³ We have previously shown that the absence of Dp71 leads also to the decrease of β -dystroglycan expression around retinal vessels.¹³ It has also been demonstrated that the reduction of Dp71 leads to BBB disruption.²¹ In addition, we have previously shown that the deletion of the Dp71 gene results in a highly permeable BRB.²²

In the present study, we address a series of questions raised by the work described in preceding paragraphs. Does Dp71 protein deletion associated with BRB breakdown induce retinal vascular inflammation? If that is the case, what are the inflammatory cells and factors

released in retinal Dp71-null mice? Why retinal neurons, artery and vein do not degenerate dramatically in Dp71-null mice? Are there any specific features of retinal capillary architecture in Dp71-null mice? To address these questions, we have used retinal Dp71-null mice obtained by replacing, via homologous recombination, most of the first and unique exon of the Dp71 and of the small part of the Dp71 first intron with the sequence encoding a β -gal-neomycine-resistance chimeric protein (β -geo). Our data clearly indicate that Dp71 protein deletion induces retinal vascular inflammation with subsequent dysregulation of retinal homeostasis.

Materials and Methods

Mouse model

The Dp71-null mice (Sarig et al., 1999) were obtained by replacing, via homologous recombination, most of the first and unique exon of the Dp71 and of the small part of the Dp71 first intron with the sequence encoding a β -gal-neomycine-resistance chimeric protein (β -geo). This abolished the expression of Dp71 without interfering with the expression of other products of the DMD (Duchenne Muscular Dystrophy) gene. C57BL/6J mouse (WT) strain (JANVIER, France) was used as control for this study. Dp71-null and WT mice, 4 months of age were used for all experiments. 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.

Determination of mRNA levels by quantitative Real-Time PCR

Total RNA was extracted from retinas of wild-type (WT) and Dp71-null mice using RNeasy Mini Kits (Qiagen). The automated purification, QIAcube system (Qiagen) was used for the completion of the RNA isolation. After isolation, concentration and integrity of total RNA were analyzed using the Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies). cDNA was

synthesized from 5 µg of total RNA primed with oligo-dT by use of reverse transcriptase (Super Script II) at 42°C for 1 hour. Real-time quantitative PCR was performed using TaqMan probe-based assay (Applied Biosystems). The following probes were used: VEGFA (Mm01281449_m1), KDR (Mm01222421_m1), BCL2 (Mm00477631_m1), ALOX5AP (Mm00802100_m1), AQP4 (Mm00802131_m1), ICAM-1 (Mm00516023_m1) and ACTB (Mm00607939_s1). For relative comparison, the Ct values of real-time PCR results were analyzed using the $\Delta\Delta C_t$ method according to the manufacturer's instructions. The triplicate outliers were removed. Each value was normalized to that for β -actin.

Protein quantification by ELISA

Proteins were extracted from the retinas by homogenization in RIPA lysis buffer (Sigma). Protein concentration of lysates was determined using the BCA protein assay kit (Thermo Scientific). The quantification of the level of different proteins in retinal homogenate was determined using specific ELISA kit for VEGF-A, ICAM-1 and VEGFR-2 (R&D Systems); TNF- α and PGE2 (Thermo Scientific) according to the manufacturer's instruction. Each sample was measured in triplicate. The triplicate outliers were removed. Plates were read using the Infinite M200 spectrophotometer (TECAN).

Quantification of retinal vascular adherent leukocytes

The retinal vasculature and adherent leukocytes were stained with fluorescein-isothiocyanate FITC-conjugated concanavalin A (ConA) lectin (Vector laboratory) as previously described.²³ In brief, mice were perfused transcardially with PBS to wash out unbound leukocytes, followed by perfusion with FITC-Con A (50µg/ml). Excess Con A lectin was then removed by PBS perfusion. The retinas were removed; flat-mounted, imaged using fluorescence microscope (Zeiss Axiovert 200M) and adherent leukocytes in the retinal vasculature were counted. To confirm that Con A positive adherent cells were leukocytes a double labeling was performed with a specific anti-CD45 antibody (BD PharMingen).

Isolation and assessment of acellular capillaries

The retinal vasculature was isolated by trypsin digestion method previously described with minor modification.²⁴ Briefly, freshly isolated eyes were fixed with 10% buffered formalin overnight. The retinas were carefully removed and incubated in distilled water overnight. Retinas were digested in 2.5% trypsin solution for 2 hours at 37°C on a shaking platform (100 rpm). Retinas were washed in distilled water for 5 min. The isolated retinal vasculature was dried for 30 min at 37°C and stained with periodic acid Schiff and hematoxylin, dehydrated, and coverslipped. Acellular capillaries were quantitated in eight field areas in the mid-retina, identified as capillary-sized vessel tubes having no nuclei anywhere along their length and were reported per square millimeter of retinal area.

Immunohistochemistry

Mouse eyes were fixed in 4% paraformaldehyde for 1 hour. The eyes were then cryoprotected in graded sucrose (10%, 20%, and 30%), embedded in Cryomatrix (Thermo Scientific) and cryostat sectioned. 10 µm thick sections were permeabilized for 5 minutes with 0.1% Triton X-100 in PBS and incubated in a blocking solution containing 1% bovin serum albumin (BSA), and 0.05 % Tween 20 in PBS for 1 hour. Sections were then incubated with rabbit anti-GFAP antibody (1/1000; Millipore) at 4°C overnight. After several washes with PBS, sections were incubated with secondary antibody (goat anti-rabbit) coupled to Alexa fluor 594 (1/500; Invitrogen) for 1 hour. Sections were washed with PBS and mounted with Immu-Mount (Fisher Scientific) for analysis by fluorescence microscopy (Zeiss Axiovert 200M). For the whole mount retina immunohistochemistry; the retinal tissue was fixed in 4% paraformaldehyde. Immunohistochemical staining was performed with Iba-1 (1/400) to label microglia (Wako Pure Chemical Industries, Japan) and analyzed by confocal microscopy (Olympus FV1000 laser-scanning).

Statistical analysis

All data are expressed as mean+ SE. We performed statistical analysis with Prism 4 software (GraphPad, San Diego, CA) using Mann-Whitney U test. A level of P values < 0.05 was considered statistically significant.

Results

Impaired retinal VEGF signaling in Dp71 deficient mice

In our previous studies, we showed that deletion of Dp71 is associated with an alteration of the integrity of the BRB further inducing a chronic dysregulation of retinal homeostasis.²² In an inflammatory state, VEGF is involved in the pathogenesis of various ocular diseases, such as neovascular age-related macular degeneration, retinal vein occlusion, diabetic macular edema and diabetic retinopathy.²⁵ VEGF mediates angiogenesis by promoting endothelial cell migration, proliferation and survival. But it is also well known as vascular permeability enhancing factor.²⁶ To evaluate the contribution of VEGF in these retinal vascular changes in the absence of Dp71, we first quantified its expression in the retina of WT and Dp71-null mice by real-time PCR and ELISA methods. We found that the mRNA level of VEGF was significantly higher in Dp71-null mouse retinas as compared to WT (Figure 1A). This upregulation of VEGF gene expression also translated into a significant increase in the production of soluble VEGF (Figure 1B). Next, we analyzed the expression of surface proteins mediating VEGF signaling. Deletion of Dp71 did not alter the mRNA level of VEGF receptors 2 (KDR) (Figure 1C). As expected, no significant difference was observed in VEGFR-2 protein expression in retinal Dp71-null mice compared to WT mice (Figure 1D). Taken together, these findings suggest that alterations in VEGF signaling could be implicated in retinal vascular hyperpermeability observed in Dp71-null mice.

Retinal ICAM-1 expression after Dp71 gene deletion

To further characterize the contribution of VEGF in the regulation of retinal vascular integrity after Dp71 deletion, we evaluated its effect on ICAM-1, which is constitutively produced by endothelial cells. In previous studies, VEGF has been found to increase retinal ICAM-1 expression of Streptozotocin-induced diabetic rat model.²⁷ Using retinas isolated from WT and Dp71-null mice, we have specifically quantified the mRNA and protein levels of ICAM-1 by qPCR and ELISA. As shown in figure 2A-B, ICAM-1 mRNA and protein expression are higher in Dp71-null mice compared to WT mice. Because ICAM-1 expression is also modulated by proinflammatory processes, we next investigated whether deletion of Dp71 induced a secondary inflammatory response in the retina. The cytokine profiling of the retina revealed that in the absence of Dp71 the production of proinflammatory markers such as tumor necrosis factor- α (TNF- α) was unchanged (Figure S1).

Dp71 deficiency increases leukocytes adherence to the retinal vasculature

To explore the functional implication of ICAM-1 overexpression observed in Dp71-deficient mice, we assessed leukocytes adhesion to retinal vessels. WT and Dp71-null mice were perfused with FITC conjugated concanavalin A (con A) to highlight vascular adherent leukocytes. Retinas were further immunostained for CD45, a common leukocyte marker to confirm that Con A-stained cells within the vasculature were leukocytes (Figure 3A). Quantitative analysis of adherent cells revealed that the number of intravascular leukocytes was significantly increased in Dp71-null mice compared to WT mice (Figure 3B). Our data indicate that in the retina of Dp71-null mice at baseline, the upregulation of ICAM-1 correlates with an increased adhesion of leukocytes to vascular wall possibly leading to vascular clumping.

Retinal capillary degeneration is accentuated in Dp71-null mice

Excessive recruitment of leukocytes and activation of their adhesion to retinal vessels with subsequent obstruction of the vascular system is a determinant pathologic event in many retinal disorders that could lead to vision loss. Additionally, it has been demonstrated that transient ischemia of the retina in an acute rat model of ischemia-reperfusion injury resulted in capillary degeneration.²⁸ To determine the impact of Dp71 deficiency in vascular degeneration, mouse retinal vasculatures were isolated by trypsin digestion, and the number of acellular capillaries/mm² retina was quantified (Figure 4A). The number of degenerated capillaries is significantly higher in Dp71-null mice compared to WT mice (Figure 4B). In these mice, Dp71 deletion caused a profound remodeling of the retinal vasculature with a dramatic capillaries degeneration possibly sustaining retinal ischemia as seen in diabetic retinopathy.

Lipid-derived inflammatory mediators expression after Dp71 gene deletion

Our data show that in the absence of Dp71, there are vascular changes associated with chronic retinal leukocyte recruitment. We therefore explored the impact of this intravascular leukocyte aggregation on retinal production of inflammatory mediators. The leukotrienes and prostaglandins are biologically active lipids derived from the metabolism of arachidonic acid in response to a number of immunologic and inflammatory stimuli.²⁹ The 5-lipoxygenase-activating protein (FLAP), encoded by ALOX5AP gene, is a key enzyme required for leukotriene synthesis.³⁰ Prostaglandin E₂ (PGE₂) is a bioactive inflammatory mediator generated from sequential metabolism of arachidonic acid involving cyclooxygenases and isomerases. To investigate the impact of the absence of the Dp71 in these two pathways of arachidonic acid metabolism, we quantified the ALOX5AP mRNA expression by qPCR and PGE₂ expression by ELISA method. We found that ALOX5AP mRNA expression is decreased in retinas of Dp71-null mice compared to WT mice (Figure 5A). In contrast, PGE₂ expression did not differ between Dp71-null mice and WT mice (Figure 5B).

Retinal Bcl-2 expression after Dp71 gene deletion

The anti-apoptotic factors B-cell lymphoma 2 (Bcl-2) is expressed in the retina (shown in rodents) and by Müller glial cells (shown in humans).^{17, 31} It has been reported that VEGF induces expression of Bcl-2.^{32, 33} We have assessed the expression of Bcl-2 by real-time PCR. Our results clearly showed that Bcl-2 mRNA expression is increased in Dp71-null mice compared to WT mice (Figure 6).

Retinal AQP4 expression after Dp71 gene deletion

Retinal edema and fluid accumulation are often associated with retinal vascular diseases. We investigated whether Dp71-null mice are affected in their regulation of retinal osmotic balance. Aquaporin-4 (AQP4) is a water selective transport protein, strongly expressed in the perivascular and vitreal end-feet of Müller glial cells and astrocytes in the inner retina.^{34, 35} AQP4 has been reported to increase in retinal vascular inflammation state such as in streptozotocin-induced diabetic rats and Equine recurrent uveitis.³⁶⁻³⁸ Quantitative analysis of gene expression by real-time PCR demonstrated a two-fold increase of AQP4 mRNA level in Dp71-null mice compared to WT mice (Figure 7).

Discussion

The present study demonstrates for the first time that Dp71 gene deletion increases retinal vascular inflammation. The finding that loss of Dp71 leads to enhanced VEGF signaling pathway and retinal vascular remodeling adds a new dimension to our understanding of the regulation of retinal homeostasis by Müller glial cells.

Elevated VEGF level in the retina is a key pathological feature in both patients with diabetic retinopathy (DR) and experimental animal models of the disease. Our data clearly demonstrate that the absence of the Dp71 leads to increased retinal VEGF expression. Many studies have documented that in the retina, VEGF is mainly expressed in Müller glial cells, endothelial cells, astrocytes, retinal pigment epithelium (RPE), and ganglion cells.³⁹⁻⁴³ It is

now well established that Müller glial cells, as the major source of VEGF, are responsible for its modulation in DR context. Indeed, in response to hypoxia, Müller glial cells secrete large amount of VEGF.⁴⁰ Additionally, it has been demonstrated that conditional deletion of Müller cell-derived VEGF significantly decreases leukostasis, retinal vascular inflammation and vascular leakage in diabetic mice.⁴⁴ It is highly likely that the absence of the Dp71 protein leads to increased Müller cell-derived VEGF expression. The latter confirms that Dp71 deletion promotes an active VEGF signaling through VEGFR-2 that could potentially lead to increased vascular permeability.

In this study, we have demonstrated that ICAM-1 was significantly increased in Dp71-null mouse compared to WT. The level of ICAM-1 found in the retina of Dp71-null mice is sufficient to induce leukocytes adherence and is equivalent to those observed in diabetic mice. Interestingly, previous studies showed that VEGF increases the expression of ICAM-1 in endothelial capillaries and intra-vitreous injection of VEGF upregulates the level of retinal ICAM-1.⁴⁵ Increase of ICAM-1 expression in retinal vessels and leukocyte infiltration were observed in human postmortem eyes with diabetic retinopathy.⁴⁶ Moreover, ICAM-1 inhibition reduces retinal leukostasis and vascular leakage in animal model of diabetic retinopathy.⁴⁷ Our work in Dp71-null mice has also provided insights into the cascade of events that leads to these clinical features of diabetic retinopathy. Beside elevated VEGF and ICAM-1 in the retina of mice lacking Dp71, there is also an increase of the number of retinal adherent leukocytes that could be determinant in subsequent vascular damages observed in these mice. Indeed, adherent leukocytes have been postulated to contribute to occlusion and degeneration of retinal blood vessels in diabetes.⁴⁷ Our work has revealed that leukocytes recruitment and accumulation might be responsible for the increased capillary degeneration observed in Dp71-null mice.

AQP4, mostly expressed in the perivascular and vitreal end-feet of Müller glial cells and in astrocytes of the inner retina, is critically implicated in the pathophysiology of many retinal disorders.^{34, 35} The Dp71 protein has a central role in the molecular scaffold responsible for anchoring AQP4 in Müller glial cell end-feet membranes.¹³ There are also AQP4 pools, which membrane organizations are Dp71-independent.⁴⁸ We have shown in this study that the Dp71 gene deletion induces retinal AQP4 mRNA overexpression. On the other hand, we have previously reported that retinal AQP4 protein expression was reduced in Dp71-null mice compared to WT mice.¹³ This apparent discrepancy can be explained by the fact that the Dp71-dependent AQP4 protein pools could not be properly anchored in the plasma membrane without Dp71 and therefore was degraded in Müller glial cell.

Despite evidence for chronic retinal vascular inflammation in the absence of Dp71, this deleterious tissues context is not associated with dramatic vascular and neuronal degeneration. Immunohistochemistry analysis of GFAP confirmed the lack of glial activation (Figure 8A) and the retinal microglial morphology was unchanged in the retina of Dp71-null mice (Figure 8B). These findings are in line with previous studies showing that even in pathological conditions; deletion of Dp71 did not induce a differential upregulation of GFAP, a glial activation marker well accepted as an indicator of retinal injury due to diseases or local stress.²² Electrophysiological analysis of the retina revealed normal visual functions with a slight reduction in b-wave amplitude and normal a-wave amplitudes in Dp71-null mice compared to WT mice.⁴⁹ All together these findings suggest that inherited Dp71 gene deletion lead to retinal defense (adaptation) against this chronic inflammation. Indeed, there is an increase of the anti-apoptotic factor Bcl-2 mRNA expression in retinal Dp71-null mice compared to WT mice. Further in support of the adaptive response to balance the chronic vascular inflammation, the analysis of inflammatory mediators indicate that long-term deletion of Dp71 translated into activation of defense mechanisms to prevent secondary

retinal inflammation. For instance, it has been demonstrated that the VEGF derived from Müller glial cells increases retinal TNF- α .⁴⁴ By contrast, possibly as a sign of adaptation to a chronic state, in our study; the TNF- α level did not differ between Dp71-null and WT mice. We have also investigated the role of lipid-derived inflammatory mediators in this process. ALOX5AP is involved in inflammatory leukotriene production pathway and its mRNA level is decreased in the retina of Dp71-null mice. This reduced expression could be an attempt to limit vascular damages as 5-lipoxygenase deficiency prevents retinal capillary degeneration in a mouse model of diabetic retinopathy.⁵⁰ Additionally, PGE2 levels did not differ between Dp71-null mice and WT mice. Together these results suggest that the reduction of ALOX5AP and the overexpression of the anti-apoptotic factor Bcl-2 participate to keep the retina of Dp71-null mice in early inflammatory state. ALOX5AP and Bcl-2 could be good therapeutic targets for the treatment of retinal vascular disease such as diabetic retinopathy, retinal uveitis and retinal vein occlusion.

Our findings highlight Dp71 as a player in the mechanisms aiming to maintain the integrity of retinal vasculature and its absence leads to retinal vascular inflammation. We provide evidence that deficiency of Dp71 promotes retinal vascular inflammation and significantly exacerbated degeneration of capillaries. Dp71 may also play a role in retinal mechanisms activated in response to injury. Indeed, previous work from our laboratory has demonstrated that in experimental ischemia-reperfusion injury, retinal damages and neuronal cell death were significantly higher in Dp71-null mice.⁴⁹ Therefore Dp71 could be an important player in other retinal conditions especially ischemic retinopathies. Moreover, we have also previously shown that the experimental retinal detachment in WT mice induces a reduction of Dp71 which is associated with of Kir4.1 mislocation, a downregulation of AQP4 protein and overexpression of GFAP in Müller glial cells.²² In the brain, the reduction of the Dp71 protein

expression in mdx mice induces decreased expression of AQP4 protein with BBB disruption.²¹

In conclusion, these results highlighted that Dp71 protein changes can contribute to retinal vascular inflammation regulated by Müller glial cells. We hypothesize that acute inhibition of Dp71 expression in some pathological conditions, as we have shown in retinal detachment, could lead to much more retinal damage than observed in Dp71-null mice. In these cases, pharmacologic reactivation of Müller glial cell-Dp71 could be an effective therapeutic strategy to prevent damages caused by retinal vascular inflammation.

Acknowledgment: The authors wish to thank Stéphane Fouquet from the Plateforme d'imagerie of the Institut de la Vision.

Sources of Funding: This study was funded by Sanofi.

Disclosures: None.

References:

1. Koenig M, Hoffman EP, Bertelson CJ, Monaco AP, Feener C and Kunkel LM. Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals. *Cell*. 1987;50:509-17.
2. Roberts RG, Coffey AJ, Bobrow M and Bentley DR. Determination of the exon structure of the distal portion of the dystrophin gene by vectorette PCR. *Genomics*. 1992;13:942-50.
3. Moser H. Duchenne muscular dystrophy: pathogenetic aspects and genetic prevention. *Human genetics*. 1984;66:17-40.
4. Rosman NP and Kakulas BA. Mental deficiency associated with muscular dystrophy. A neuropathological study. *Brain : a journal of neurology*. 1966;89:769-88.
5. Pillers DA, Bulman DE, Weleber RG, Sigesmund DA, Musarella MA, Powell BR, Murphey WH, Westall C, Panton C, Becker LE and et al. Dystrophin expression in the human retina is required for normal function as defined by electroretinography. *Nature genetics*. 1993;4:82-6.
6. Louie K, Apte RS, Mori K and Gehlbach P. Severe proliferative retinopathy in a patient with advanced muscular dystrophy. *The British journal of ophthalmology*. 2004;88:1604-5.
7. Fagan XJ, Levy J, Al-Qureshi S and Harper CA. Proliferative retinopathy in Duchenne muscular dystrophy and its response to bevacizumab. *Clinical & experimental ophthalmology*. 2012;40:906-7.
8. Hahn P, Lin P and Fekrat S. Ultra-widefield imaging of Duchenne muscular dystrophy-associated proliferative retinal vasculopathy improved with panretinal laser photocoagulation alone. *Ophthalmic surgery, lasers & imaging retina*. 2013;44:293-5.
9. Blake DJ and Kroger S. The neurobiology of duchenne muscular dystrophy: learning lessons from muscle? *Trends in neurosciences*. 2000;23:92-9.

10. Claudepierre T, Dalloz C, Mornet D, Matsumura K, Sahel J and Rendon A. Characterization of the intermolecular associations of the dystrophin-associated glycoprotein complex in retinal Muller glial cells. *Journal of cell science*. 2000;113 Pt 19:3409-17.
11. Satz JS, Philp AR, Nguyen H, Kusano H, Lee J, Turk R, Riker MJ, Hernandez J, Weiss RM, Anderson MG, Mullins RF, Moore SA, Stone EM and Campbell KP. Visual impairment in the absence of dystroglycan. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2009;29:13136-46.
12. Howard PL, Dally GY, Wong MH, Ho A, Weleber RG, Pillers DA and Ray PN. Localization of dystrophin isoform Dp71 to the inner limiting membrane of the retina suggests a unique functional contribution of Dp71 in the retina. *Human molecular genetics*. 1998;7:1385-91.
13. Fort PE, Sene A, Pannicke T, Roux MJ, Forster V, Mornet D, Nudel U, Yaffe D, Reichenbach A, Sahel JA and Rendon A. Kir4.1 and AQP4 associate with Dp71- and utrophin-DAPs complexes in specific and defined microdomains of Muller retinal glial cell membrane. *Glia*. 2008;56:597-610.
14. Tout S, Chan-Ling T, Hollander H and Stone J. The role of Muller cells in the formation of the blood-retinal barrier. *Neuroscience*. 1993;55:291-301.
15. Paulson OB and Newman EA. Does the release of potassium from astrocyte endfeet regulate cerebral blood flow? *Science*. 1987;237:896-8.
16. Shen W, Fruttiger M, Zhu L, Chung SH, Barnett NL, Kirk JK, Lee S, Coorey NJ, Killingsworth M, Sherman LS and Gillies MC. Conditional Mullercell ablation causes independent neuronal and vascular pathologies in a novel transgenic model. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2012;32:15715-27.
17. Mizutani M, Gerhardinger C and Lorenzi M. Muller cell changes in human diabetic retinopathy. *Diabetes*. 1998;47:445-9.

18. Shelton MD, Distler AM, Kern TS and Mieval JJ. Glutaredoxin regulates autocrine and paracrine proinflammatory responses in retinal glial (muller) cells. *The Journal of biological chemistry*. 2009;284:4760-6.
19. Nunes S, Pires I, Rosa A, Duarte L, Bernardes R and Cunha-Vaz J. Microaneurysm turnover is a biomarker for diabetic retinopathy progression to clinically significant macular edema: findings for type 2 diabetics with nonproliferative retinopathy. *Ophthalmologica Journal internationale d'ophtalmologie International journal of ophthalmology Zeitschrift fur Augenheilkunde*. 2009;223:292-7.
20. Cia D, Simonutti M, Fort PE, Doly M and Rendon A. Slight alteration of the electroretinogram in mice lacking dystrophin dp71. *Ophthalmic research*. 2014;51:196-203.
21. Tamma R, Annese T, Capogrosso RF, Cozzoli A, Benagiano V, Sblendorio V, Ruggieri S, Crivellato E, Specchia G, Ribatti D, De Luca A and Nico B. Effects of prednisolone on the dystrophin-associated proteins in the blood-brain barrier and skeletal muscle of dystrophic mdx mice. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 2013;93:592-610.
22. Sene A, Tadayoni R, Pannicke T, Wurm A, El Mathari B, Benard R, Roux MJ, Yaffe D, Mornet D, Reichenbach A, Sahel JA and Rendon A. Functional implication of Dp71 in osmoregulation and vascular permeability of the retina. *PloS one*. 2009;4:e7329.
23. Ishida S, Yamashiro K, Usui T, Kaji Y, Ogura Y, Hida T, Honda Y, Oguchi Y and Adamis AP. Leukocytes mediate retinal vascular remodeling during development and vaso-obliteration in disease. *Nature medicine*. 2003;9:781-8.
24. Kuwabara T and Cogan DG. Studies of retinal vascular patterns. I. Normal architecture. *Archives of ophthalmology*. 1960;64:904-11.
25. Shams N and Ianchulev T. Role of vascular endothelial growth factor in ocular angiogenesis. *Ophthalmology clinics of North America*. 2006;19:335-44.

26. Dobrogowska DH, Lossinsky AS, Tarnawski M and Vorbrodt AW. Increased blood-brain barrier permeability and endothelial abnormalities induced by vascular endothelial growth factor. *Journal of neurocytology*. 1998;27:163-73.
27. Jousen AM, Poulaki V, Qin W, Kirchhof B, Mitsiades N, Wiegand SJ, Rudge J, Yancopoulos GD and Adamis AP. Retinal vascular endothelial growth factor induces intercellular adhesion molecule-1 and endothelial nitric oxide synthase expression and initiates early diabetic retinal leukocyte adhesion in vivo. *The American journal of pathology*. 2002;160:501-9.
28. Wang L, Li C, Guo H, Kern TS, Huang K and Zheng L. Curcumin inhibits neuronal and vascular degeneration in retina after ischemia and reperfusion injury. *PloS one*. 2011;6:e23194.
29. Samuelsson B. Leukotrienes: mediators of immediate hypersensitivity reactions and inflammation. *Science*. 1983;220:568-75.
30. Dixon RA, Diehl RE, Opas E, Rands E, Vickers PJ, Evans JF, Gillard JW and Miller DK. Requirement of a 5-lipoxygenase-activating protein for leukotriene synthesis. *Nature*. 1990;343:282-4.
31. Grosche J, Hartig W and Reichenbach A. Expression of glial fibrillary acidic protein (GFAP), glutamine synthetase (GS), and Bcl-2 protooncogene protein by Muller (glial) cells in retinal light damage of rats. *Neuroscience letters*. 1995;185:119-22.
32. Gerber HP, Dixit V and Ferrara N. Vascular endothelial growth factor induces expression of the antiapoptotic proteins Bcl-2 and A1 in vascular endothelial cells. *The Journal of biological chemistry*. 1998;273:13313-6.
33. Nor JE, Christensen J, Mooney DJ and Polverini PJ. Vascular endothelial growth factor (VEGF)-mediated angiogenesis is associated with enhanced endothelial cell survival and induction of Bcl-2 expression. *The American journal of pathology*. 1999;154:375-84.

34. Nagelhus EA, Veruki ML, Torp R, Haug FM, Laake JH, Nielsen S, Agre P and Ottersen OP. Aquaporin-4 water channel protein in the rat retina and optic nerve: polarized expression in Muller cells and fibrous astrocytes. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 1998;18:2506-19.
35. Goodyear MJ, Crewther SG and Junghans BM. A role for aquaporin-4 in fluid regulation in the inner retina. *Visual neuroscience*. 2009;26:159-65.
36. Li SY, Yang D, Yeung CM, Yu WY, Chang RC, So KF, Wong D and Lo AC. Lycium barbarum polysaccharides reduce neuronal damage, blood-retinal barrier disruption and oxidative stress in retinal ischemia/reperfusion injury. *PloS one*. 2011;6:e16380.
37. Zhang Y, Xu G, Ling Q and Da C. Expression of aquaporin 4 and Kir4.1 in diabetic rat retina: treatment with minocycline. *The Journal of international medical research*. 2011;39:464-79.
38. Eberhardt C, Amann B, Feuchtinger A, Hauck SM and Deeg CA. Differential expression of inwardly rectifying K⁺ channels and aquaporins 4 and 5 in autoimmune uveitis indicates imbalance in Muller glial cell-dependent ion and water homeostasis. *Glia*. 2011;59:697-707.
39. Pierce EA, Avery RL, Foley ED, Aiello LP and Smith LE. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor expression in a mouse model of retinal neovascularization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1995;92:905-9.
40. Aiello LP, Northrup JM, Keyt BA, Takagi H and Iwamoto MA. Hypoxic regulation of vascular endothelial growth factor in retinal cells. *Archives of ophthalmology*. 1995;113:1538-44.
41. Stone J, Itin A, Alon T, Pe'er J, Gnessin H, Chan-Ling T and Keshet E. Development of retinal vasculature is mediated by hypoxia-induced vascular endothelial growth factor

(VEGF) expression by neuroglia. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 1995;15:4738-47.

42. Miller JW, Adamis AP and Aiello LP. Vascular endothelial growth factor in ocular neovascularization and proliferative diabetic retinopathy. *Diabetes/metabolism reviews*. 1997;13:37-50.

43. Stone J, Chan-Ling T, Pe'er J, Itin A, Gnessin H and Keshet E. Roles of vascular endothelial growth factor and astrocyte degeneration in the genesis of retinopathy of prematurity. *Investigative ophthalmology & visual science*. 1996;37:290-9.

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

45. Lu M, Perez VL, Ma N, Miyamoto K, Peng HB, Liao JK and Adamis AP. VEGF increases retinal vascular ICAM-1 expression in vivo. *Investigative ophthalmology & visual science*. 1999;40:1808-12.

46. McLeod DS, Lefer DJ, Merges C and Luttj GA. Enhanced expression of intracellular adhesion molecule-1 and P-selectin in the diabetic human retina and choroid. *The American journal of pathology*. 1995;147:642-53.

47. Miyamoto K, Khosrof S, Bursell SE, Rohan R, Murata T, Clermont AC, Aiello LP, Ogura Y and Adamis AP. Prevention of leukostasis and vascular leakage in streptozotocin-induced diabetic retinopathy via intercellular adhesion molecule-1 inhibition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1999;96:10836-41.

48. Nicchia GP, Cogotzi L, Rossi A, Basco D, Brancaccio A, Svelto M and Frigeri A. Expression of multiple AQP4 pools in the plasma membrane and their association with the dystrophin complex. *Journal of neurochemistry*. 2008;105:2156-65.

49. Dalloz C, Sarig R, Fort P, Yaffe D, Bordais A, Pannicke T, Grosche J, Mornet D, Reichenbach A, Sahel J, Nudel U and Rendon A. Targeted inactivation of dystrophin gene

product Dp71: phenotypic impact in mouse retina. *Human molecular genetics*. 2003;12:1543-54.

50. Gubitosi-Klug RA, Talahalli R, Du Y, Nadler JL and Kern TS. 5-Lipoxygenase, but not 12/15-lipoxygenase, contributes to degeneration of retinal capillaries in a mouse model of diabetic retinopathy. *Diabetes*. 2008;57:1387-93.

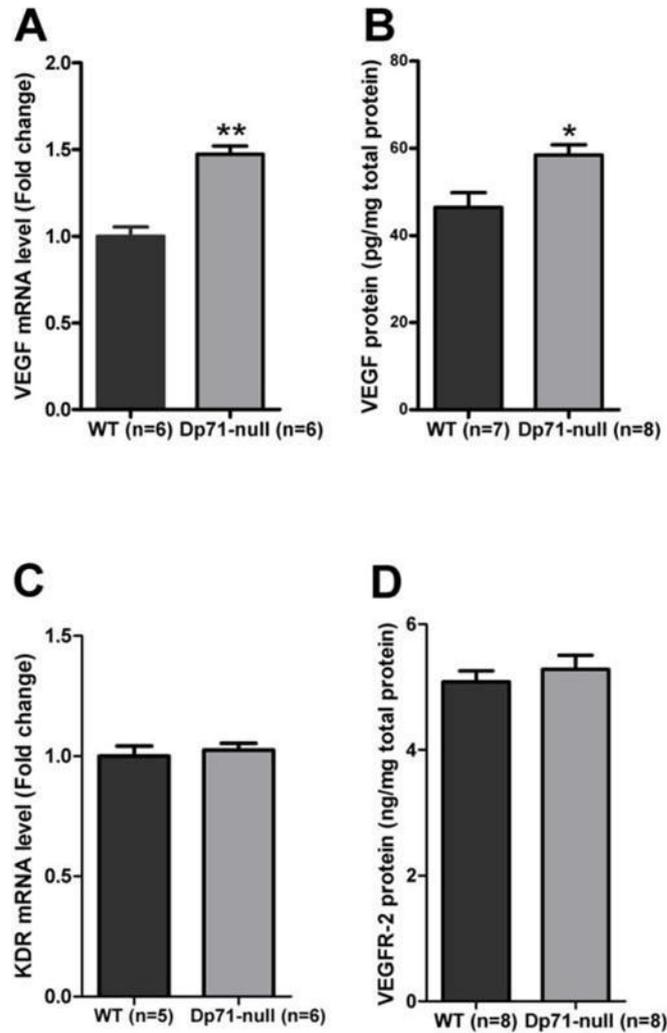


Figure 1. Increased VEGF expression in Dp71-null retina. Total protein and mRNA were extracted from retinas of individual mice. A, Gene expression level of VEGF in retina. VEGF mRNA levels were evaluated by quantitative real-time PCR (qPCR) methods and normalized to endogenous β -actin mRNA levels. B, VEGF protein levels were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and normalized to total protein. C, KDR mRNA levels were evaluated by quantitative real-time PCR and expressed relative to β -actin mRNA levels in WT and Dp71-null retinas. D, VEGFR-2 protein levels were measured by ELISA and normalized to total protein. Results are expressed as mean+ SE. Asterisk (*) indicates statistically significant difference, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

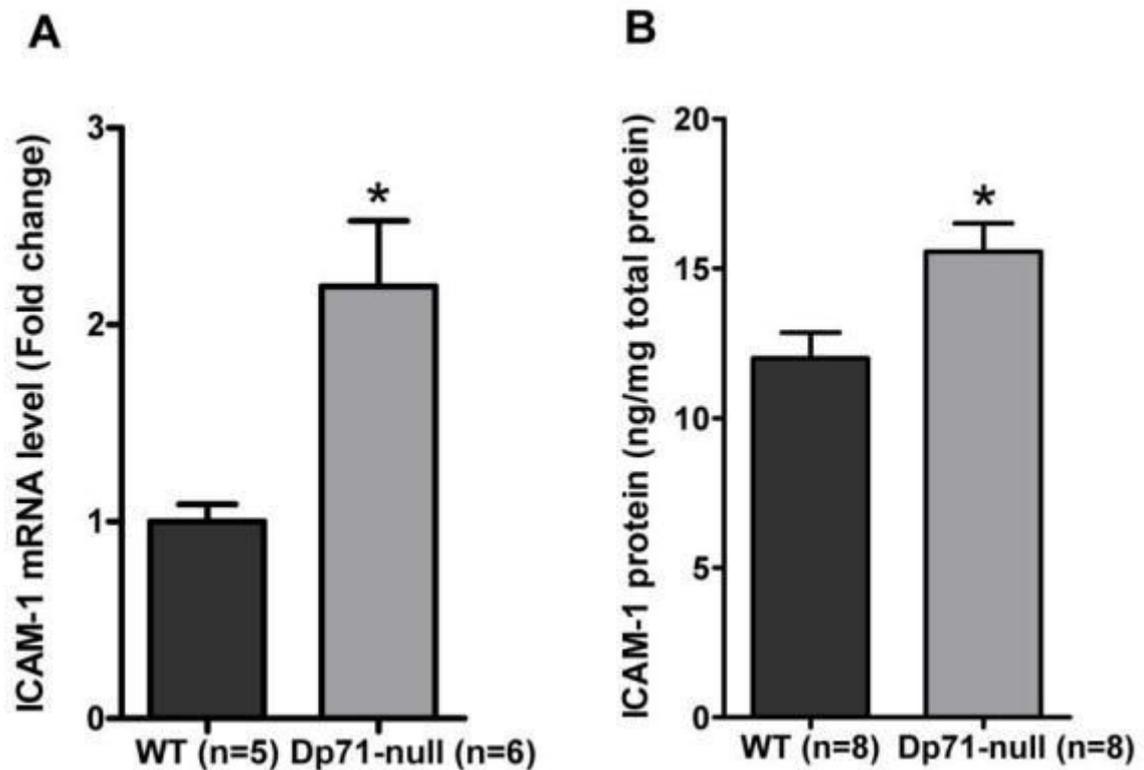


Figure 2. ICAM-1 mRNA and protein levels are upregulated in Dp71-null mice. A, ICAM-1 mRNA levels were evaluated by quantitative real-time PCR methods and expressed relative to β -actin mRNA levels in the retina of WT mice (n=5) and Dp71-null (n=6) mice. B, ICAM-1 protein levels were measured by ELISA and normalized to total protein. Results are expressed as mean+ SE. The asterisk (*) indicates statistically significant difference, $p < 0.05$.

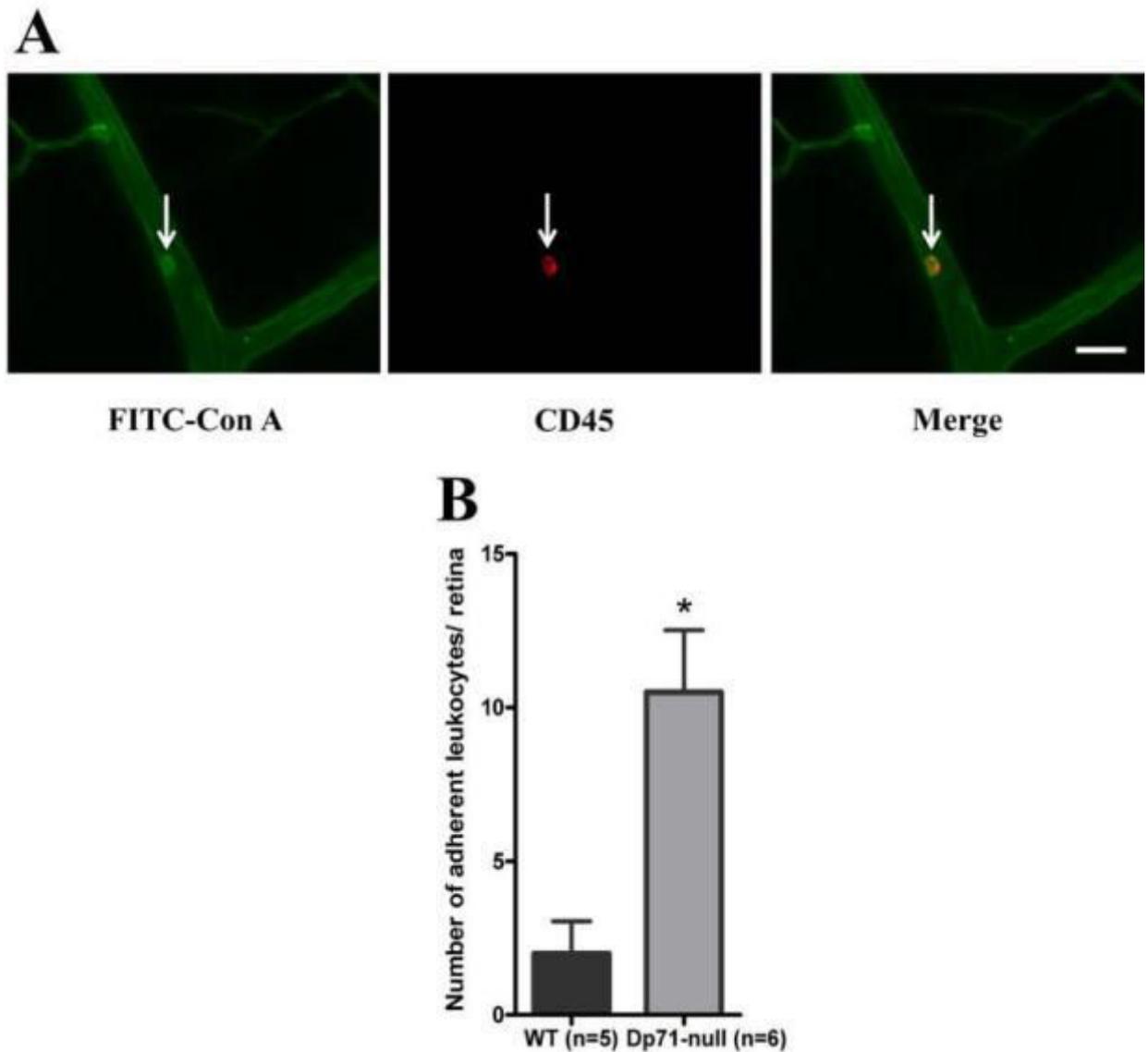


Figure 3. Exacerbated retinal leukostasis in Dp71-null mouse. A, Representative photographs of retinal vasculature and adherent leukocytes (arrows) labeled with FITC-conjugated Con A lectin (green) and an antibody against CD45 (red) to confirm that the adherent cells were leukocytes. Scale bar, 100 μ m. B, Quantitative analysis of leukocyte adhesion in retinal WT mice (n=5) and Dp71-null (n=6) mice. Leukocyte adhesion was assessed by measurement of the number of adherent leukocytes in whole retina. Results are expressed as mean+ SE. The asterisk (*) indicates statistically significant difference, $p < 0.05$.

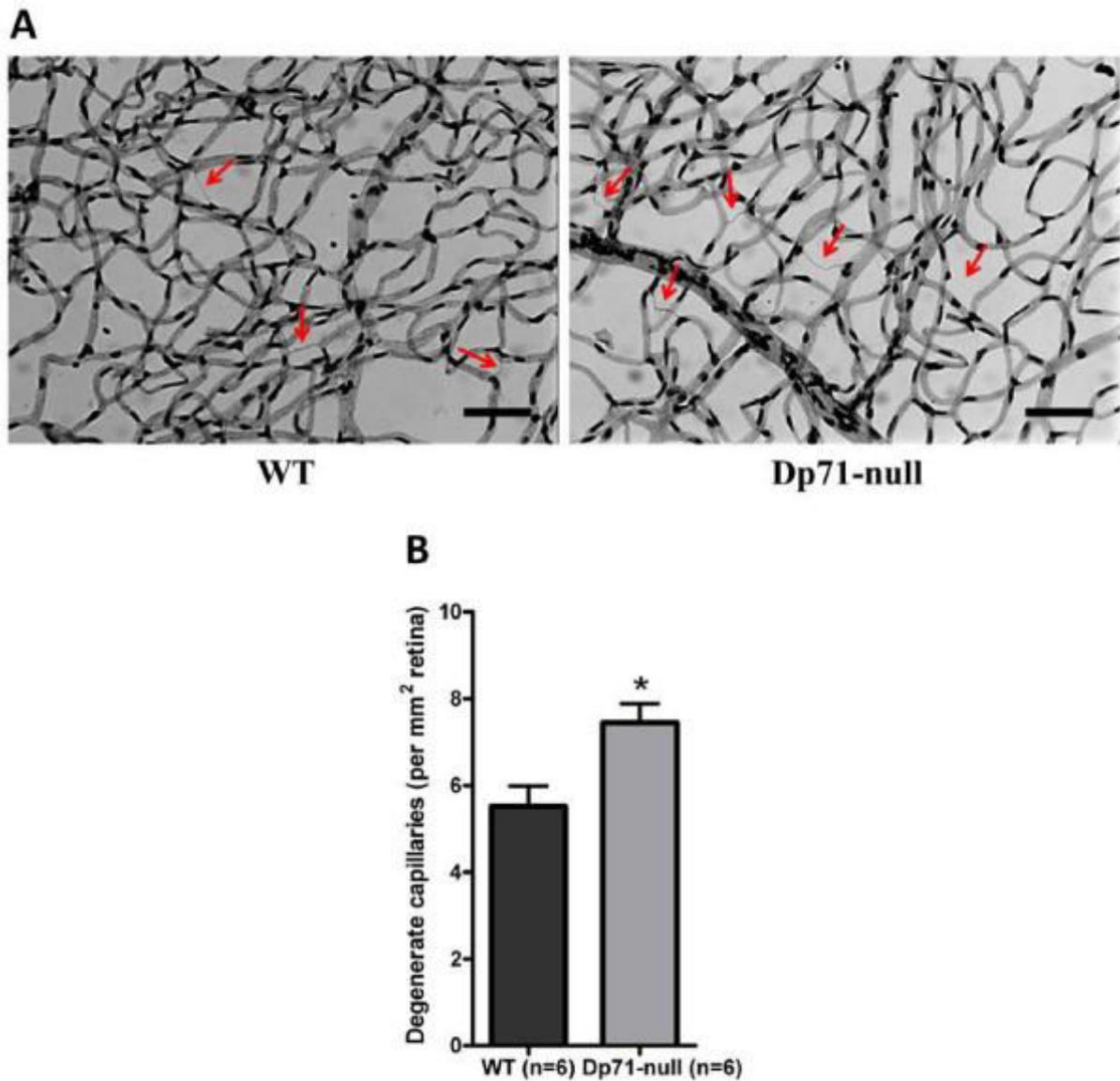


Figure 4. Retinal capillary degeneration is markedly accentuated in Dp71-null mice

A, Retinas were subjected to trypsin digestion to visualize the microvasculature and quantify acellular capillaries (arrows) in WT and Dp71-null mice retinas. Scale bar, 400 μ m. B, Quantification of acellular capillaries normalized by the counting area. Results are expressed as mean+ SE. The asterisk (*) indicates statistically significant difference, $p < 0.05$.

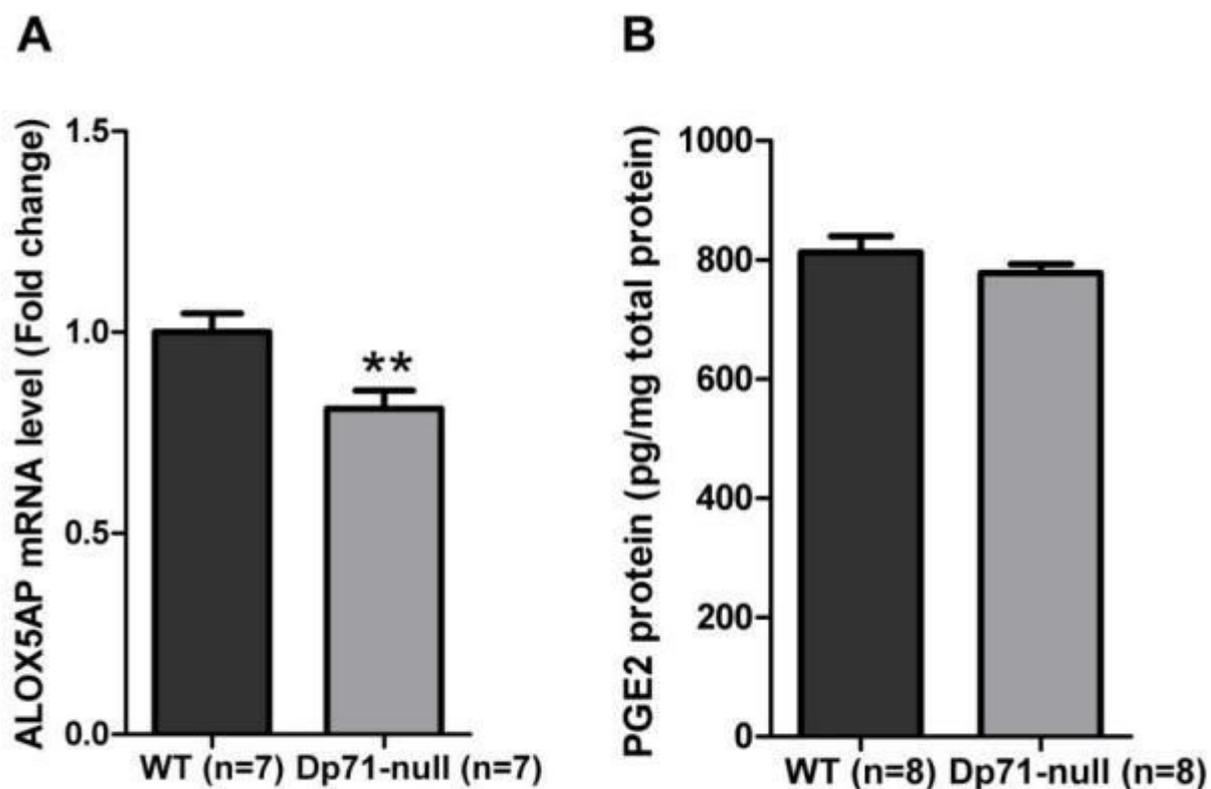


Figure 5. Arachidonic acid metabolism. A, ALOX5AP mRNA levels analyzed by qPCR in retinas of WT and Dp71-null mice. B, PGE2 protein level was measured by ELISA and normalized to total protein for WT and Dp71-null mice. Each sample was measured in triplicate using 7 mice per group. Results are expressed as mean+ SE. The asterisk (*) indicates statistically significant difference, ** $p < 0.01$.

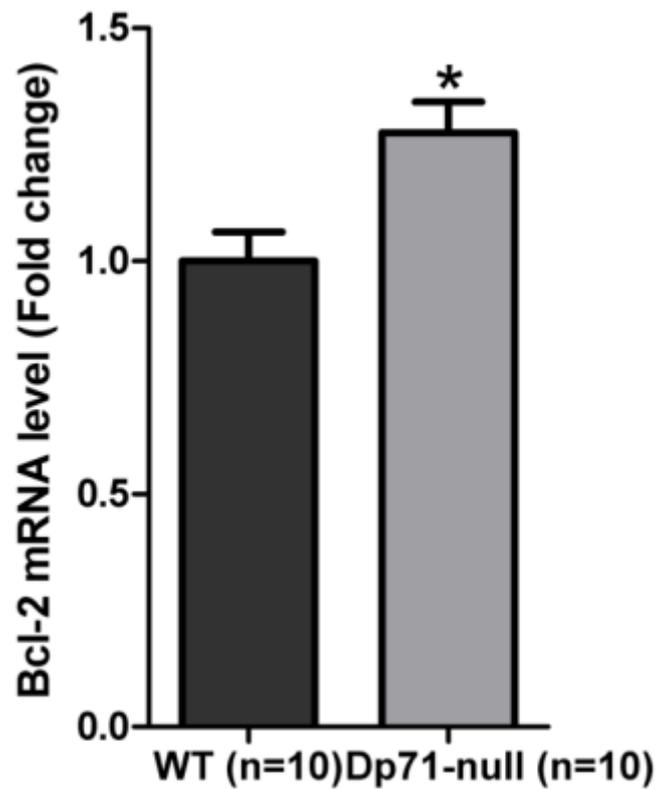


Figure 6. Bcl2 mRNA upregulation in Dp71-null mice. Bcl2 mRNA levels were evaluated by qPCR. Each sample was measured in triplicate using 10 mice per group. Results are expressed as mean+ SE. The asterisk (*) indicates statistically significant difference, $p < 0.05$.

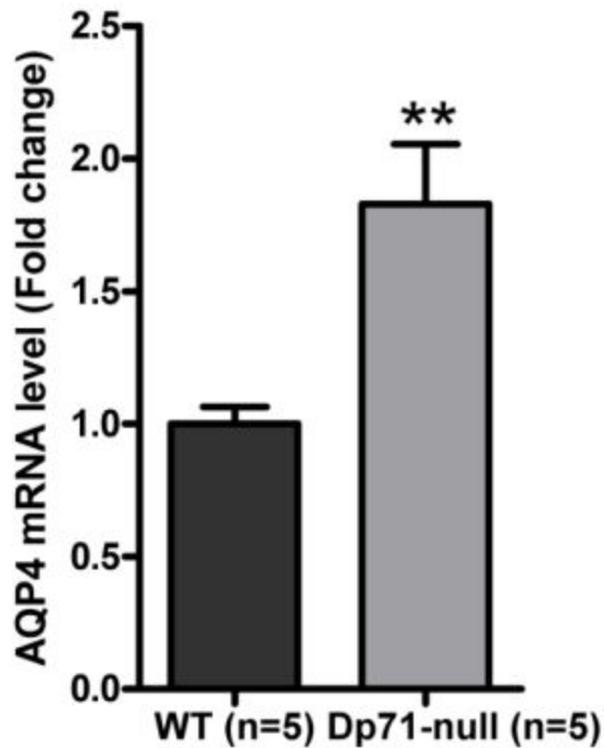


Figure 7. AQP4 mRNA is upregulated in the retina of Dp71-null mice. A, AQP4 mRNA levels were evaluated by quantitative real-time PCR and expressed relative to β -actin mRNA levels in WT and Dp71-null mice retina. Each sample was measured in triplicate using 5 mice in each group. Results are expressed as mean+ SE. The asterisk (*) indicates statistically significant difference, **p < 0.01.

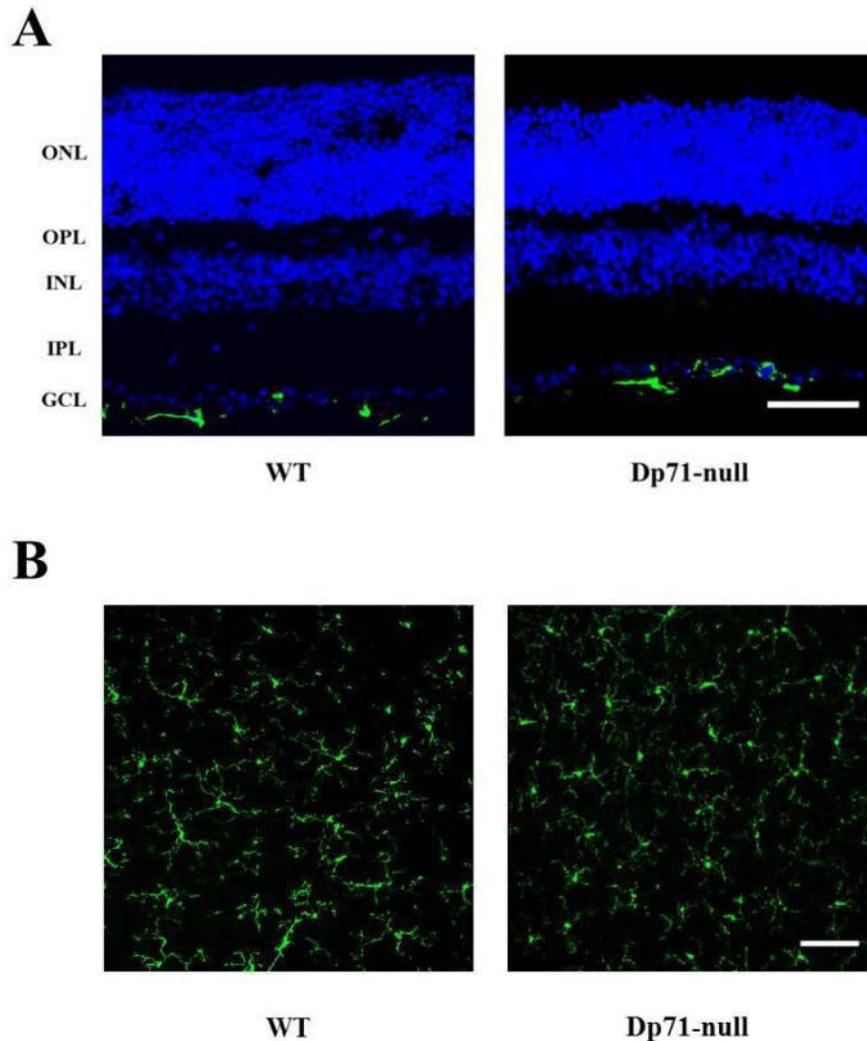


Figure 8. Absence of GFAP upregulation in Müller glial cells and normal microglial morphology in Dp71-null mice. A, GFAP (green) expression is observed only in the ganglion cell layer and nerve fiber layers. Representative photographs of retinal sections prepared from WT and Dp71-null mice (n=5). Nuclei (Dapi, blue). ONL, outer nuclear layer; OPL, outer plexiform layer; INL, inner nuclear layer; IPL, inner plexiform layer; GCL, ganglion cell layer. Scale, 40 μ m. B, Representative confocal images from a retinal wholmount prepared from WT (n=5) and Dp71-null mice (n=5), showing in green the microglial morphology. Scale, 50 μ m.

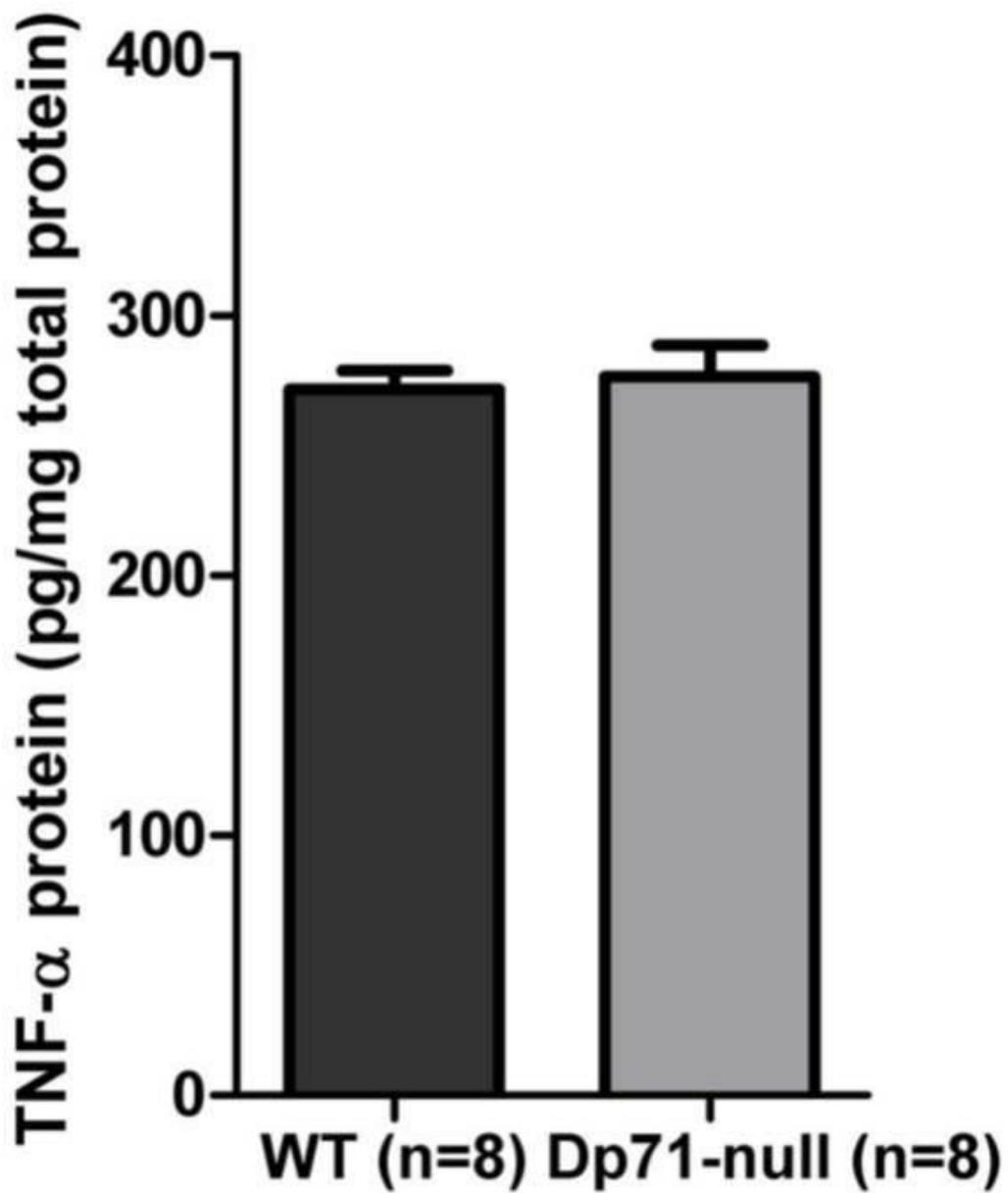


Figure S1. TNF- α expression. TNF- α protein levels in WT (n=8) and Dp71-null (n=8) retinas were measured by ELISA and normalized to total protein content. Results are expressed as mean+ SE.

Troisième article

11- Caractérisation de l'inflammation rétinienne chez la souris mdx^{3Cv} (Article en préparation)

11-1 Introduction

La souris mdx^{3Cv} présente une réduction de l'expression de l'ensemble des dystrophines, dont la protéine Dp71 (Daloz, Claudepierre et al. 2001). A la différence de la souris Dp71-null, la souris mdx^{3Cv} présente une réduction de l'onde b de l'ERG, similaire à celle observée chez les patients DMD. Il a été montré que la souris mdx^{3Cv} présente au niveau rétinien une disparition de la protéine β -dystroglycane dans la couche plexiforme externe, cependant cette protéine est toujours présente au niveau de la membrane limitante interne et autour des vaisseaux rétiens (Blank, Koulen et al. 1999, Daloz, Claudepierre et al. 2001). De plus, une étude de l'angiogenèse rétinienne menée chez la souris mdx^{3Cv}, nous a permis de mettre en évidence un retard de vascularisation rétinienne chez cette souris comparée à la souris littermate (Tadayoni et al, article en préparation). Ce retard persiste jusqu'à l'âge postnatal 6.

Le but de cette étude est de déterminer si un très faible niveau d'expression de la dystrophine Dp71, peut être responsable d'une inflammation rétinienne et d'anomalies vasculaires similaires à celles observées chez la souris Dp71-null. Dans un premier temps nous avons déterminé le pourcentage de Dp71 chez la souris mdx^{3Cv} par rapport à la souris WT littermate. Nous avons quantifié plusieurs facteurs inflammatoires, tels que le VEGF, la molécule d'adhésion intracellulaire-1 (ICAM-1), ainsi que les médiateurs de l'inflammation dérivés des lipides, tels que l'enzyme participant à la synthèse des leucotriène, ALOX5AP (Arachidonate 5-lipoxygénase Activating Protein). Nous avons aussi évalué la perméabilité de la BHR et le nombre de leucocytes adhérents chez la souris mdx^{3Cv} et WT littermate.

11-2 Méthodes

Modèle animal :

Cette étude a été réalisée avec des souris mdx^{3Cv} , de 15 semaines d'âge. Cette souris a été obtenue suite à une expérience de mutagenèse chimique utilisant l'éthylnitrosourée (ENU). Cette souris possède un point de mutation dans l'intron 65 (Cox, Phelps et al. 1993). Des souris de la même portée, ne portant pas la mutation ont été utilisées comme contrôles littermates (Wild Type, WT) dans toutes les expérimentations.

Détermination des niveaux d'ARNm par PCR quantitative en temps réel:

L'ARN total a été extrait à partir de rétines de souris littermates et de souris mdx^{3Cv} en utilisant le RNeasy Mini Kits (Qiagen). La purification automatisée, système QIAcube (Qiagen) a été utilisé pour isoler l'ARN. Après isolement, la concentration et l'intégrité de l'ARN total ont été analysées en utilisant le bioanalyseur Agilent 2100 (Agilent Technologies). L'ADNc a été synthétisé à partir de 5 µg d'ARN total est amorcé au moyen d'oligo-dT en utilisant la transcriptase inverse (Super Script II) à 42 ° C pendant 1 heure. La PCR quantitative en temps réel a été effectuée en utilisant un essai à base de sonde TaqMan (Applied Biosystems). Les sondes suivantes ont été utilisées: VEGFA (Mm01281449_m1), KDR (Mm01222421_m1), FLT-1 (Mm00438980_m1), ALOX5AP (Mm00802100_m1), AQP4 (Mm00802131_m1), ICAM-1 (Mm00516023_m1) et ACTB (Mm00607939_s1). Pour une comparaison relative, les valeurs de Ct des résultats de la PCR en temps réel ont été analysées en utilisant la méthode $\Delta\Delta Ct$ selon les instructions du fabricant. Les valeurs aberrantes des triplicatas ont été retirées. Chaque valeur a été normalisée à celle de la β -actine.

Quantification du VEGF par ELISA

Les protéines ont été extraites à partir de la rétine par homogénéisation dans du tampon de lyse RIPA (Sigma). La concentration en protéines des lysats a été déterminée en utilisant le kit de dosage de protéique BCA (Thermo Scientific). La quantité protéique dans l'homogénat de la rétine a été déterminée en utilisant un kit ELISA spécifique pour le VEGF-A (R & D Systems) conformément aux instructions du fabricant. Chaque échantillon a été mesuré en triplicata. Les valeurs aberrantes des triplicatas ont été retirées. Les plaques ont été lues à l'aide du spectrophotomètre Infinite M200 (TECAN).

Western blot

L'analyse Western blot a été réalisée comme décrit précédemment (Bordais, Bolanos-Jimenez et al. 2005). En bref, les extraits protéiques de la rétine ont été déposés dans des puits de gels Tris-Acétate NuPAGE 4-12% (Life technologies, France) et électrotransférés sur membranes difluorure de polyvinylidène (PVDF) selon les instructions du fabricant. Les membranes de PVDF ont été bloquées dans du PBS contenant 0,1% de Tween 20, 1% BSA, de lait en poudre à 5% (Bio-Rad, Herts, Royaume-Uni) pendant 1 h à température ambiante, puis incubées avec l'anticorps primaire H4 pan-spécifique (qui marque l'ensemble des dystrophines) dans le même tampon de blocage pendant une nuit. Les membranes ont ensuite été lavées et incubées avec l'anticorps secondaire conjugué à la peroxydase de raifort (des laboratoires Jackson Immunoresearch). La chimiluminescence a été réalisée en utilisant l'ECL Western PLUS système de détection blot (GE Healthcare, Allemagne).

Quantification des leucocytes adhérents au niveau des vaisseaux réiniens

Les vaisseaux réiniens et les leucocytes adhérents ont été marqués avec l'isothiocyanate de fluorescéine FITC conjugué à la concanavoline A (ConA) lectine (laboratoire Vector) en utilisant la méthode précédemment décrite (Ishida, Yamashiro et al. 2003). Les souris ont été

perfusées avec du PBS via le cœur pour éliminer les leucocytes non fixés, suivi par une perfusion avec le FITC-Con A (50 µg/ml). L'excès de Con A est ensuite éliminé par perfusion avec du PBS. Les rétines ont été montées à plat et photographiées en utilisant un microscope à fluorescence (Zeiss Axiovert 200M) et les leucocytes adhérents à l'endothélium vasculaire de la rétine ont été comptés. Pour confirmer que les cellules adhérentes Con A positives sont bien des leucocytes, un double marquage a été réalisé avec un anticorps anti-CD45 (BD PharMingen).

Mesure de la perméabilité vasculaire rétinienne :

La perméabilité vasculaire a été quantifiée par la mesure de la fuite de l'albumine à partir des vaisseaux sanguins de la rétine en utilisant la méthode du bleu d'Evans (Xu, Qaum et al. 2001). Brièvement, les souris ont été anesthésiées et bleu Evans (45 mg / kg, Sigma-Aldrich, Allemagne) a été injecté via la veine du pénis. Des échantillons de sang ont été prélevés 3 heures après l'injection du colorant et les souris ont été perfusées par voie intracardiaque, via le ventricule gauche avec 10 ml de tampon citrate (0,05 M, pH 3,5) préchauffé à 37°C. Après la perfusion, les deux yeux ont été énucléés et soigneusement disséqués. Les rétines ont été séchées dans un Speed-Vac pendant 5 h, pesées et le colorant bleu Evans a été extrait par incubation des rétines avec 100 µl de formamide pendant 18 h à 70°C. Le surnageant de chaque rétine est filtré avec des tubes nanosep 30k omega (VWR) à 14 000 g pendant 2h à 4°C. Chaque prélèvement sanguin est centrifugé à 18000 g pendant 15 min. Les deux surnageants ont été utilisés pour mesurer l'absorbance. La mesure de l'absorbance de chaque échantillon est réalisée à la fois à 620 nm, le maximum d'absorption pour le bleu d'Evans, et à 740 nm, l'absorbance minimale (TECAN infinite M1000). L'absorbance (A620-A740) est utilisée pour les calculs. Les concentrations en bleu d'Evans dans le plasma et la rétine ont été calculées à partir d'une courbe standard du bleu d'Evans. La perméabilité de la barrière

hémato-rétinienne a été exprimée en microlitres de bleu d'Evans par gramme de rétine sec par heure.

$$\frac{\text{Evans blue } (\mu\text{g})/\text{Retina dry weight (g)}}{\text{Time-averaged Evans blue concentration } (\mu\text{g})/\text{Plasma } (\mu\text{l}) \times \text{Circulation time (h)}}$$

Analyse statistique

Toutes les données sont exprimées en moyenne + erreur standard de la moyenne. Nous avons effectué une analyse statistique avec le logiciel Prism 4 (GraphPad, San Diego, CA) en utilisant le test de Mann-Whitney. Les valeurs de P <0,05 sont considérées comme statistiquement significatives.

Résultats

La quantification protéique par western blot a permis de mettre en évidence que la souris mdx^{3Cv} présente une expression de 4% de Dp71 (Figure 1). La quantification des ARMm par qPCR est en cours de réalisation.

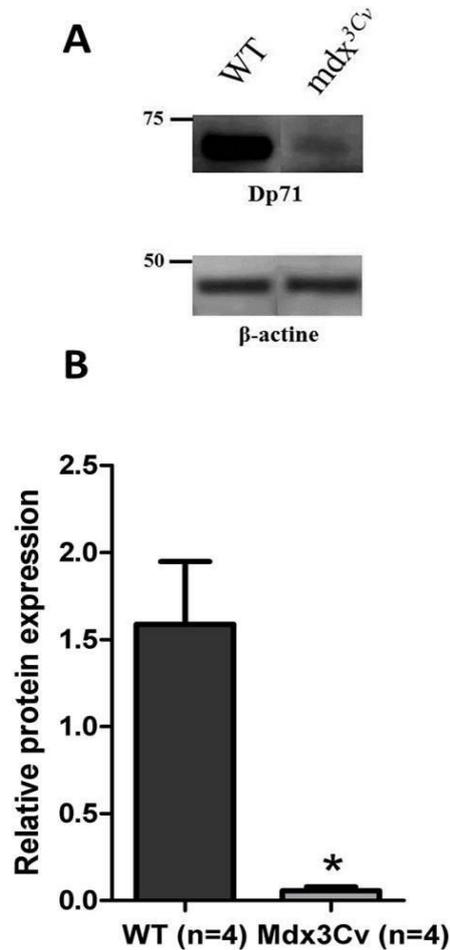


Figure 1. Expression de la protéine Dp71 rétinienne chez la souris littermates (WT) et mdx^{3Cv} . A, le niveau d'expression protéique rétinienne de Dp71 et de β -actine obtenu par Western blot chez la littermates et mdx^{3Cv} . Les masses moléculaires approximatives sont données sur la gauche de chaque panneau dans kiloDaltons. B, l'expression de la Dp71 et de la β -actine a été quantifiée par analyse densitométrique des bandes en utilisant un logiciel Fiji (Fiji Is Just ImageJ). Le graphique montre le rapport Dp71/ β -actine. Les données sont exprimées en moyenne + erreur standard de la moyenne; $p < 0,05$; différences significatives par rapport aux contrôles.

La quantification des ARNm par qPCR, montre une réduction de l'expression du VEGF chez les souris mdx^{3Cv} par rapport aux souris littermates (Figure 2A). Cependant, la quantification protéique du VEGF ne montre pas de différences significatives entre les souris littermates et les souris mdx^{3Cv} (Figure 2B). De plus, nous n'avons pas trouvé de différences significatives au niveau de l'expression des récepteurs aux VEGF, VEGFR-1 et -2 en comparant les souris littermates aux souris mdx^{3Cv} (Figure 2C et 2D).

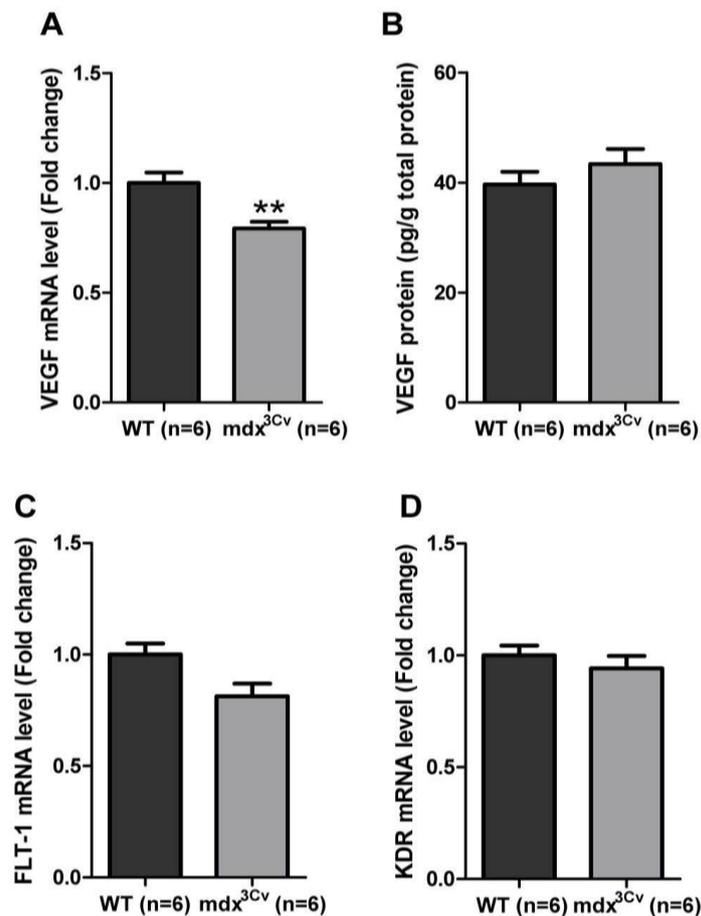


Figure 2. Expression du VEGF et de ses récepteurs chez la souris mdx^{3Cv} et littermate (WT). A, les niveaux d'ARNm du VEGF ont été évalués par PCR en temps réel (qPCR) et normalisés par rapport à aux niveaux d'ARNm de la β -actine endogène. B, les taux de protéine VEGF ont été mesurés par dosage immuno-enzymatique (ELISA) et normalisés par rapport aux protéines totales. C, les niveaux d'ARNm de FLT-1 (VEGFR-1) ont été évalués par PCR en temps réel (qPCR) et normalisés par rapport aux niveaux d'ARNm de la β -actine endogène. D, les niveaux d'ARNm de KDR (VEGFR-2) ont été évalués par PCR en temps réel (qPCR) et normalisés par rapport aux niveaux d'ARNm de la β -actine endogène. Les données sont exprimées en moyenne + erreur standard de la moyenne; $p < 0,05$; différences significatives par rapport aux contrôles.

Comme le montre la figure 3A, l'expression des ARNm d'ICAM-1 n'est pas modifiée chez les souris mdx^{3Cv} comparées aux souris WT littermates.

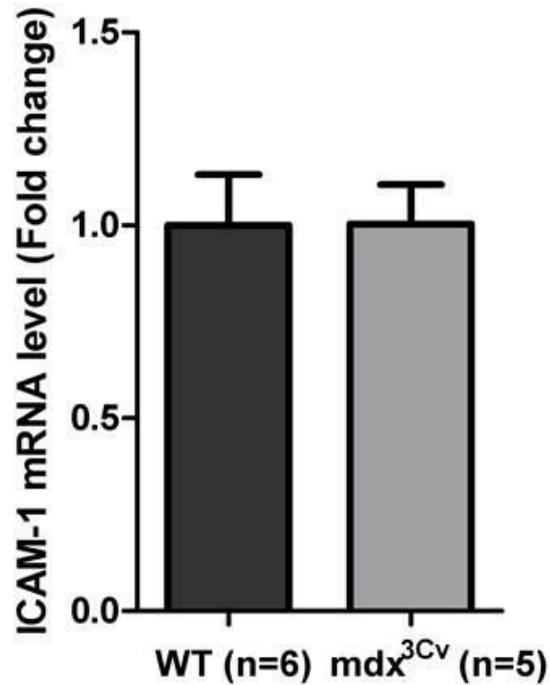


Figure 3. Expression d'ICAM-1 chez la souris mdx^{3Cv} et littermates (WT). Les niveaux d'ARNm d'ICAM-1 ont été évalués par PCR en temps réel (qPCR) et normalisés par rapport aux niveaux d'ARNm de la β -actine endogène. Les données sont exprimées en moyenne + erreur standard de la moyenne; souris WT littermate n=6 ; souris mdx^{3Cv} n=5 p <0,05; différences significatives par rapport aux contrôles.

L'expression d'ALOX5AP n'est pas modifiée chez les souris mdx^{3Cv} comparées aux souris WT littermates (Figure 4).

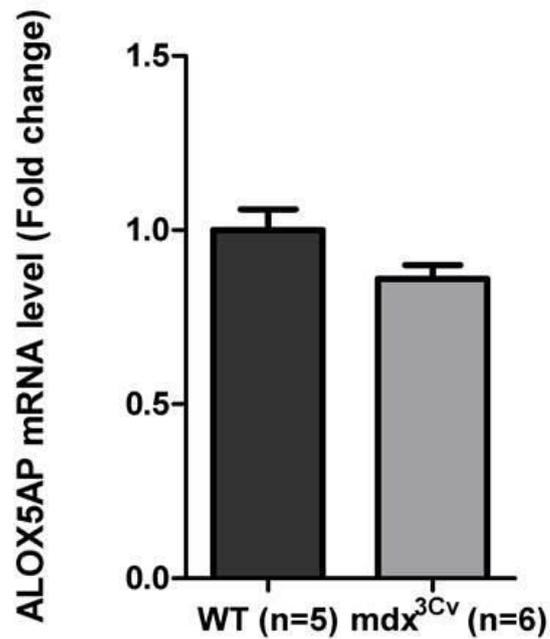


Figure 4. Métabolisme de l'acide arachidonique. Les niveaux d'ARNm d'AQP4 ont été évalués par PCR en temps réel (qPCR) et normalisés par rapport aux niveaux d'ARNm de la β -actine endogène. Les données sont exprimées en moyenne + erreur standard de la moyenne; souris littermate (WT) n=5 ; souris mdx^{3Cv} n=6 ; $p < 0,05$; différences significatives par rapport aux contrôles.

L'expression des ARNm d'AQP4 dans la rétine n'est pas modifiée chez les souris mdx^{3Cv} comparées aux WT littermates (Figure 5).

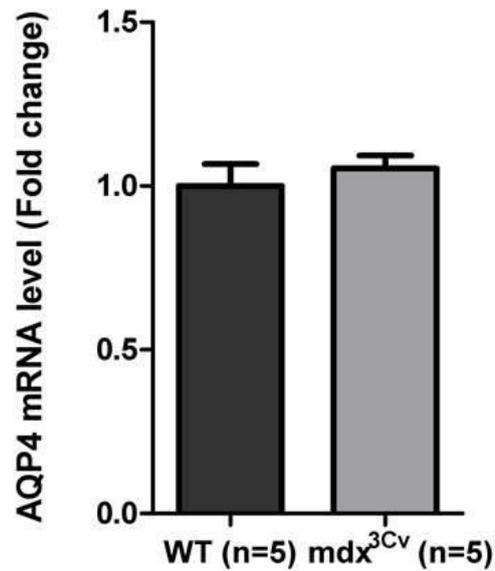


Figure 5. Expression d'AQP4 chez la souris mdx^{3Cv} et littermate (WT). Les niveaux d'ARNm d'AQP4 ont été évalués par PCR en temps réel (qPCR) et normalisés par rapport aux niveaux d'ARNm de la β -actine endogène. Les données sont exprimées en moyenne + erreur standard de la moyenne; n=5 ; p <0,05; différences significatives par rapport aux contrôles.

La quantification du nombre de leucocytes adhérents, en utilisant la méthode de perfusion intracardiaque de concanavalin A couplé au FITC, ne montre pas de différence significative entre les souris mdx^{3Cv} et les souris WT littermates (Figure 6).

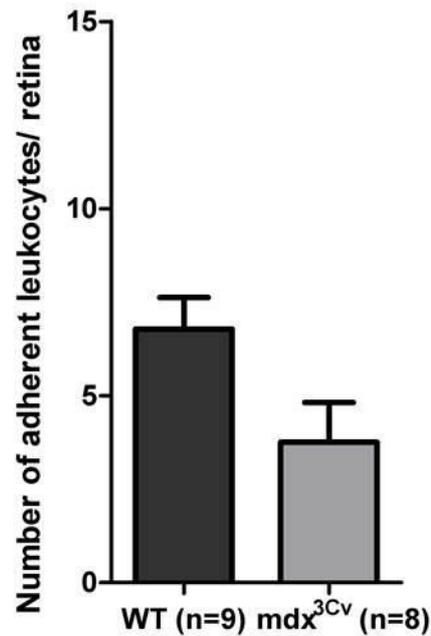


Figure 6. Nombre de leucocytes adhérents au système vasculaire rétinien des souris mdx^{3Cv} et littermate (WT). L'analyse quantitative de l'adhérence des leucocytes chez les souris WT rétinie de souris (n = 9) mdx^{3Cv} (n = 8). L'adhésion des leucocytes a été évaluée par la mesure du nombre de leucocytes adhérents à l'endothélium vasculaire de la rétine entière. Les données sont exprimées en moyenne + erreur standard de la moyenne; p <0,05; différences significatives par rapport aux contrôles.

Dans les troubles oculaires humains avec œdème maculaire tels que la rétinopathie diabétique, l'occlusion veineuse rétinienne et l'uvéite, l'augmentation de la perméabilité vasculaire rétinienne est un élément majeur. La perméabilité vasculaire rétinienne a été mesurée par la méthode du bleu d'Evans. Chez la souris mdx^{3Cv} nos résultats ne montrent pas de différences significatives entre les souris mdx^{3Cv} et les souris littermates (Figure 7).

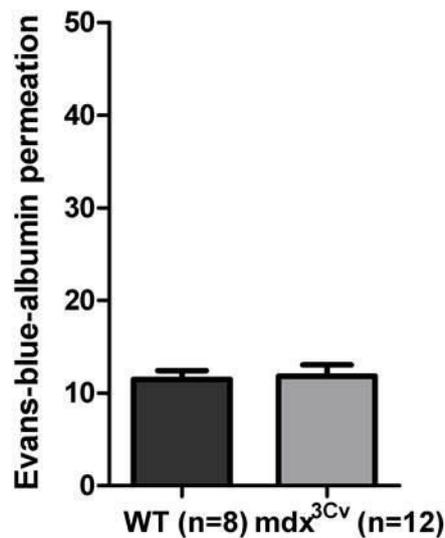


Figure 7. La perméabilité de la barrière hémato-rétinienne a été mesurée à l'aide du bleu d'Evans chez les souris WT littermates (n=8) et les souris mdx^{3Cv} (n=12). Les rétines de souris mdx^{3Cv} ne présentent pas d'augmentation de la perméabilité vasculaire par rapport aux souris littermates. Les données sont exprimées en moyenne + erreur standard de la moyenne; $p < 0,05$; différences significatives par rapport aux contrôles.

11-3 Conclusion

La souris Dp71-null, présente une augmentation de l'expression de VEGF, d'ICAM-1 associée à un fort recrutement des leucocytes. Cette absence de Dp71 est aussi à l'origine de la perte des capillaires et à une augmentation de la perméabilité vasculaire. Cependant, la réduction très importante de l'expression de l'ensemble des dystrophines, dont la protéine Dp71, chez la souris mdx^{3Cv} n'induit pas les anomalies vasculaires et l'inflammation rétinienne retrouvées chez la souris Dp71-null. Comparée aux souris WT littermates, les souris mdx^{3Cv} présentent une expression de 4% de Dp71 au niveau de la rétine. En effet, chez la souris mdx^{3Cv} l'expression du VEGF est réduite, alors qu'elle est augmentée chez la souris Dp71-null. De plus, l'expression des récepteurs au VEGF n'est pas modifiée chez la souris mdx^{3Cv} . L'expression d'ICAM est augmentée en absence de Dp71, alors qu'elle n'est pas modifiée chez la souris mdx^{3Cv} . Le nombre de leucocytes adhérents est augmenté chez la souris Dp71-null, mais n'est pas modifié chez la souris mdx^{3Cv} . De plus, l'absence de Dp71 provoque une augmentation de la perméabilité vasculaire rétinienne, qui n'est pas observée chez la souris mdx^{3Cv} .

L'ensemble de ces résultats montrent qu'une forte réduction de l'expression de la Dp71 et des autres dystrophines n'est pas suffisante pour induire une inflammation et une perméabilité vasculaire rétinienne. Ces résultats suggèrent qu'une expression de 4% de Dp71 est suffisante pour le maintien de la barrière hémato-rétinienne et pour protéger la rétine de l'inflammation retrouvée chez la souris Dp71-null.

Discussion & Perspectives

12- Discussion générale

La présente étude montre pour la première fois que la délétion du gène Dp71 augmente l'inflammation et la perméabilité vasculaire rétinienne. La mise en évidence que l'absence de la Dp71 conduit à l'augmentation de l'expression du VEGF et au remodelage vasculaire rétinien ajoute une nouvelle dimension à notre compréhension de la régulation de l'homéostasie de la rétine par les cellules gliales de Müller.

Un niveau élevé de VEGF dans la rétine est une caractéristique pathologique clé à la fois chez les patients atteints de rétinopathie diabétique (RD), ainsi que chez les modèles animaux expérimentaux de la maladie. Nos données montrent clairement que l'absence de la Dp71 entraîne une augmentation de l'expression du VEGF de la rétine. De nombreuses études ont montrées que dans la rétine, le VEGF est principalement exprimé dans les cellules gliales de Müller, les cellules endothéliales, les astrocytes, l'épithélium pigmentaire rétinien (EPR), et les cellules ganglionnaires (Aiello, Northrup et al. 1995, Pierce, Avery et al. 1995, Stone, Itin et al. 1995, Stone, Chan-Ling et al. 1996, Miller, Adamis et al. 1997). Il est maintenant bien établi que les cellules gliales de Müller, en tant que principale source de VEGF, sont responsables de sa modulation dans la RD. En effet, en réponse à l'hypoxie, les cellules gliales de Müller sécrètent de grandes quantités de VEGF (Aiello, Northrup et al. 1995). En outre, il a été montré que la délétion conditionnelle du VEGF, dérivé des cellules gliales de Müller diminue de manière significative la leucostase, l'inflammation vasculaire rétinienne et la perméabilité vasculaire chez la souris diabétique (Wang, Xu et al. 2010). Il est donc très probable que l'absence de la protéine Dp71 entraîne une augmentation de l'expression du VEGF dérivé des cellules gliales de Müller, induisant ainsi une augmentation de la perméabilité vasculaire.

Dans cette étude, nous avons montré qu'ICAM-1 est significativement augmenté chez les souris Dp71-null par rapport aux littermates. Le niveau d'ICAM-1 trouvé dans la rétine de souris Dp71-null est suffisant pour induire l'adhésion des leucocytes et est équivalent à ceux observés chez les souris diabétiques. Fait intéressant, des études antérieures ont montré que le VEGF augmente l'expression d'ICAM-1 dans l'endothélium des capillaires et que l'injection intra-vitréenne de VEGF régule à la hausse le niveau rétinien d'ICAM-1 (Joussen, Poulaki et al. 2002). L'augmentation de l'expression d'ICAM-1 dans les vaisseaux rétiens et l'infiltration des leucocytes ont été observées dans les yeux post-mortem humains avec une rétinopathie diabétique (McLeod, Lefer et al. 1995). De plus, l'inhibition d'ICAM-1 réduit le nombre de leucocytes adhérents et la perméabilité vasculaire au niveau de la rétine du modèle animal de rétinopathie diabétique (Miyamoto, Khosrof et al. 1999). Notre travail chez les souris Dp71-null a également donné un aperçu de la cascade d'événements qui conduit à ces caractéristiques cliniques de la rétinopathie diabétique. A côté de l'augmentation du VEGF et d'ICAM-1 dans la rétine de souris dépourvues de Dp71, nous avons également une augmentation du nombre de leucocytes adhérents rétiens qui peut être déterminant dans les dommages vasculaires ultérieurs observés chez ces souris. En effet, les leucocytes adhérents contribuent à l'occlusion et à la dégénérescence des vaisseaux sanguins rétiens de diabétiques (Miyamoto, Khosrof et al. 1999). Notre travail a révélé que le recrutement et l'accumulation de leucocytes peuvent être responsables de la dégénérescence des capillaires observée chez les souris Dp71-null.

AQP4, principalement exprimé dans la zone périvasculaire et au niveau des pieds des cellules gliales de Müller en contact du vitré et dans les astrocytes de la rétine interne, est impliqué dans la pathophysiologie de nombreux troubles rétiens (Nagelhus, Veruki et al. 1998, Goodyear, Crewther et al. 2009). La protéine Dp71 joue un rôle central dans l'échafaudage moléculaire responsable de l'ancrage d'AQP4 dans la membrane des pieds des cellules gliales

de Müller (Fort, Sene et al. 2008). Il existe aussi des pools d'AQP4 dont l'organisation membranaire est Dp71-indépendante (Ben-Nun, Alder et al. 2000). Nous avons montré dans cette étude que la délétion du gène de la Dp71 induit une surexpression de l'ARNm AQP4 rétinien. D'autre part, nous avons précédemment montré que l'expression protéique d'AQP4 rétinien est réduite chez les souris Dp71-null par rapport aux souris littermates (Fort, Sene et al. 2008). Cette contradiction apparente peut être expliquée par le fait que les pools protéiques d'AQP4 qui sont Dp71-dépendants ne pourraient pas être correctement ancrés dans la membrane cytoplasmique et sont donc, sans Dp71, dégradés dans les cellules gliales de Müller.

Malgré ces preuves d'inflammation vasculaire rétinienne chronique en absence de Dp71, ce contexte délétère pour le tissu n'est pas associé à une forte dégénérescence vasculaire et neuronale. L'analyse immunohistochimique avec un anticorps anti-GFAP a confirmé l'absence d'activation gliale. De plus, la morphologie de la microglie rétinienne n'est pas modifiée chez la souris Dp71-null. Ces résultats sont en lien avec nos études antérieures montrant que, même dans des conditions pathologiques, la délétion de Dp71 n'induit pas une augmentation de GFAP, un marqueur de l'activation des cellules gliales bien accepté comme étant un indicateur de lésion de la rétine due à des maladies ou à des contraintes locales (Sene, Tadayoni et al. 2009). L'analyse électrophysiologique de la rétine révèle une fonction visuelle normale avec une légère réduction de l'amplitude de l'onde b et une amplitude de l'onde a normale chez les souris Dp71-null par rapport aux souris contrôles (Cia, Simonutti et al. 2014). L'ensemble de ces résultats suggèrent que la délétion héréditaire du gène Dp71 mène à une défense et à une adaptation de la rétine à cette inflammation chronique. En effet, on observe une augmentation de l'expression des ARNm du facteur anti-apoptotique Bcl-2 rétinien chez les souris Dp71-null par rapport aux souris contrôles. De plus, il a été démontré que le VEGF dérivé des cellules gliales de Müller augmente le TNF- α rétinien (Wang, Xu et

al. 2010). Cependant, dans notre étude, le taux de TNF- α ne diffère pas entre les souris Dp71-null et les souris contrôles, ce qui peut être un autre signe d'adaptation à un état chronique. Nous avons également étudié le rôle des médiateurs inflammatoires dérivés des lipides. ALOX5AP est impliqué dans la voie de production des leucotriènes inflammatoires et nous avons trouvé que son niveau d'ARNm est réduit dans la rétine de souris Dp71-null. Cette expression réduite pourrait être une tentative de limiter les dommages vasculaires, car la délétion de la 5-lipoxygénase empêche la dégénérescence des capillaires rétiens dans le modèle souris de rétinopathie diabétique (Gubitosi-Klug, Talahalli et al. 2008). En outre, les taux de PGE2 ne diffèrent pas entre les souris Dp71-null et contrôles. Ensemble, ces résultats suggèrent que la réduction d'ALOX5AP et la surexpression du facteur anti-apoptotique Bcl-2 participent au maintien de la rétine de souris Dp71-null dans un état inflammatoire précoce. ALOX5AP et Bcl-2 pourraient être des cibles thérapeutiques pour le traitement des maladies vasculaires rétiennes comme la rétinopathie diabétique, l'uvéite rétinienne et l'occlusion veineuse rétinienne.

Nos résultats mettent en évidence le rôle de la Dp71 dans les mécanismes visant à maintenir l'intégrité de la vascularisation rétinienne et que son absence conduit à l'inflammation rétinienne, ainsi qu'à une dégénérescence des capillaires. La Dp71 peut également jouer un rôle dans les mécanismes activés en réponse à une lésion de la rétine. En effet, des travaux antérieurs de notre laboratoire ont montré que la lésion expérimentale de la rétine par ischémie-reperfusion provoque une mort des cellules neuronales significativement plus élevées chez les souris Dp71-null (Daloz, Sarig et al. 2003). Par conséquent la Dp71 pourrait être un acteur important dans d'autres troubles de la rétine, en particulier les rétinopathies ischémiques. Par ailleurs, nous avons également montré que le décollement expérimental de la rétine chez les souris contrôles induit une diminution de la Dp71 qui est associée à une délocalisation de Kir4.1, une réduction de l'expression protéique d'AQP4 et à la

surexpression de la GFAP dans les cellules gliales de Müller (Sene, Tadayoni et al. 2009). Dans le cerveau, la réduction de l'expression de la protéine Dp71 induit chez les souris mdx une diminution de l'expression de la protéine AQP4 associée à une rupture de la BHE (Tamma, Annese et al. 2013).

De plus, nous avons montré qu'une faible expression de la Dp71 (4%) et des autres dystrophines chez la souris mdx^{3Cv} peut protéger la rétine contre l'inflammation observée chez la souris sans Dp71. Cette préservation de la rétine de souris mdx^{3Cv} pourrait être due à une compensation moléculaire. Cependant, à la différence de la souris Dp71-null, la souris mdx^{3Cv} présente une réduction de l'onde b de l'ERG, similaire à celle observée chez les patients DMD.

En conclusion, ces résultats mettent en évidence que la délétion de la protéine Dp71 peut contribuer à l'inflammation vasculaire rétinienne, associée à une perméabilité vasculaire via les cellules gliales de Müller. Nous émettons l'hypothèse que l'inhibition aiguë de l'expression de la Dp71 dans certaines conditions pathologiques, comme nous l'avons montré dans le décollement rétinien, pourrait conduire à beaucoup plus de perturbations dans la rétine que ceux observés chez les souris Dp71-null. Dans des situations de ce type, la réactivation pharmacologique de Dp71 dans les cellules gliales de Müller pourrait être une stratégie thérapeutique efficace pour prévenir les dommages causés par l'inflammation vasculaire rétinienne.

13- Perspectives

Nous avons mis en évidence une augmentation de la perméabilité vasculaire associée à un état inflammatoire et une dégénérescence des capillaires rétiniens chez la souris Dp71-null.

Dans notre laboratoire, nous avons montré qu'il est possible de restaurer l'expression de la Dp71 dans les cellules gliales de Müller 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 (Vacca Ophélie, 2014). En perspective de ces résultats, il serait intéressant d'analyser si les facteurs inflammatoires, tels que le VEGF, ICAM-1 et le nombre de leucocytes adhérents, retrouvent leur situation normale par cette restauration de la Dp71.

Une inhibition temporaire ou définitive de l'expression de la Dp71 à l'âge adulte pourrait ne pas induire l'adaptation à l'inflammation comme retrouvée chez la souris Dp71-null. La création d'une souris knock-out conditionnelle inductible étant difficile à développer en raison de la régulation très complexe du gène DMD, nous avons choisi d'utiliser la méthode d'interférence ARN associée aux AAV (ShH10) pour inhiber la Dp71 spécifiquement dans les cellules gliales de Müller. Notre équipe a 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 (Vacca Ophélie, 2014).

Il serait aussi important de déterminer quels sont les mécanismes et cascades moléculaires permettant la mise en place de cette inflammation et ces troubles vasculaires. Des expériences de co-immunoprécipitation de la protéine Dp71 ou d'autres protéines du complexe DAPs avec des récepteurs impliqués dans l'inflammation, tels que le récepteur au TNF- α et au VEGF, pourraient donner des explications mécanistiques à cette induction inflammatoire. Il serait aussi intéressant de quantifier les protéines participantes aux jonctions cellulaires endothéliales, telles que zonula occluden-1 (ZO-1) et Claudin-5. De plus, plusieurs études ont montré que l'expression de ces protéines de jonctions est réduite chez des modèles animaux de rétinopathie diabétique (Bucolo, Ward et al. 2009, Leal, Martins et al. 2010).

De plus nous n'avons pas observé le phénotype inflammatoire rétinien de la souris Dp71-null, chez la souris mdx^{3Cv}, malgré la forte réduction de l'expression de Dp71. L'ARNm de la

Dp71 subit plusieurs événements d'épissage alternatif complexe (Feener, Koenig et al. 1989, Bies, Phelps et al. 1992, Lumeng, Phelps et al. 1999, Jin, Tan et al. 2007). Les différents transcrits identifiés à ce jour peuvent être répartis en 4 sous-populations : Dp71d, Dp71f, Dp71e et Dp40. Il serait donc important d'identifier l'isoforme ou les isoformes de la Dp71 qui font partie des 4% de protéine Dp71 totale restante chez la souris mdx^{3Cv}.

Bibliographie

14- Bibliographies

- Adams, J. M. and S. Cory (1998). "The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival." Science **281**(5381): 1322-1326.
- Agre, P., S. Sasaki and M. J. Chrispeels (1993). "Aquaporins: a family of water channel proteins." Am J Physiol **265**(3 Pt 2): F461.
- Ahn, A. H. and L. M. Kunkel (1993). "The structural and functional diversity of dystrophin." Nat Genet **3**(4): 283-291.
- Aiello, L. P., R. L. Avery, P. G. Arrigg, B. A. Keyt, H. D. Jampel, S. T. Shah, L. R. Pasquale, H. Thieme, M. A. Iwamoto, J. E. Park and et al. (1994). "Vascular endothelial growth factor in ocular fluid of patients with diabetic retinopathy and other retinal disorders." N Engl J Med **331**(22): 1480-1487.
- Aiello, L. P., J. M. Northrup, B. A. Keyt, H. Takagi and M. A. Iwamoto (1995). "Hypoxic regulation of vascular endothelial growth factor in retinal cells." Arch Ophthalmol **113**(12): 1538-1544.
- Andreasson, K. I., A. Savonenko, S. Vidensky, J. J. Goellner, Y. Zhang, A. Shaffer, W. E. Kaufmann, P. F. Worley, P. Isakson and A. L. Markowska (2001). "Age-dependent cognitive deficits and neuronal apoptosis in cyclooxygenase-2 transgenic mice." J Neurosci **21**(20): 8198-8209.
- Armulik, A., G. Genove and C. Betsholtz (2011). "Pericytes: developmental, physiological, and pathological perspectives, problems, and promises." Dev Cell **21**(2): 193-215.
- Barnett, N. L. and D. V. Pow (2000). "Antisense knockdown of GLAST, a glial glutamate transporter, compromises retinal function." Invest Ophthalmol Vis Sci **41**(2): 585-591.
- Behl, Y., P. Krothapalli, T. Desta, A. DiPiazza, S. Roy and D. T. Graves (2008). "Diabetes-enhanced tumor necrosis factor-alpha production promotes apoptosis and the loss of retinal microvascular cells in type 1 and type 2 models of diabetic retinopathy." Am J Pathol **172**(5): 1411-1418.
- Behl, Y., P. Krothapalli, T. Desta, S. Roy and D. T. Graves (2009). "FOXO1 plays an important role in enhanced microvascular cell apoptosis and microvascular cell loss in type 1 and type 2 diabetic rats." Diabetes **58**(4): 917-925.
- Ben-Nun, J., V. A. Alder and I. J. Constable (2000). "The effects of induced acute hyperglycemia in the cat on the retinal capillary blood flow." Ophthalmic Res **32**(4): 143-150.
- Bies, R. D., S. F. Phelps, M. D. Cortez, R. Roberts, C. T. Caskey and J. S. Chamberlain (1992). "Human and murine dystrophin mRNA transcripts are differentially expressed during skeletal muscle, heart, and brain development." Nucleic Acids Res **20**(7): 1725-1731.
- Bignami, A. and D. Dahl (1979). "The radial glia of Muller in the rat retina and their response to injury. An immunofluorescence study with antibodies to the glial fibrillary acidic (GFA) protein." Exp Eye Res **28**(1): 63-69.
- Blake, D. J., R. Hawkes, M. A. Benson and P. W. Beesley (1999). "Different dystrophin-like complexes are expressed in neurons and glia." J Cell Biol **147**(3): 645-658.
- Blake, D. J. and S. Kroger (2000). "The neurobiology of duchenne muscular dystrophy: learning lessons from muscle?" Trends Neurosci **23**(3): 92-99.

- Blank, M., P. Koulen, D. J. Blake and S. Kroger (1999). "Dystrophin and beta-dystroglycan in photoreceptor terminals from normal and mdx3Cv mouse retinae." Eur J Neurosci **11**(6): 2121-2133.
- Bonet-Kerrache, A., E. Fabbriozio and D. Mornet (1994). "N-terminal domain of dystrophin." FEBS Lett **355**(1): 49-53.
- Bordais, A., F. Bolanos-Jimenez, P. Fort, C. Varela, J. A. Sahel, S. Picaud and A. Rendon (2005). "Molecular cloning and protein expression of Duchenne muscular dystrophy gene products in porcine retina." Neuromuscul Disord **15**(7): 476-487.
- Bosco, A., K. Cusato, G. P. Nicchia, A. Frigeri and D. C. Spray (2005). "A developmental switch in the expression of aquaporin-4 and Kir4.1 from horizontal to Muller cells in mouse retina." Invest Ophthalmol Vis Sci **46**(10): 3869-3875.
- Bringmann, A., B. Biedermann, U. Schnurbusch, V. Enzmann, F. Faude and A. Reichenbach (2000). "Age- and disease-related changes of calcium channel-mediated currents in human Muller glial cells." Invest Ophthalmol Vis Sci **41**(9): 2791-2796.
- Bringmann, A., T. Pannicke, J. Grosche, M. Francke, P. Wiedemann, S. N. Skatchkov, N. N. Osborne and A. Reichenbach (2006). "Muller cells in the healthy and diseased retina." Prog Retin Eye Res **25**(4): 397-424.
- Bringmann, A. and A. Reichenbach (2001). "Role of Muller cells in retinal degenerations." Front Biosci **6**: E72-92.
- Bucolo, C., K. W. Ward, E. Mazzon, S. Cuzzocrea and F. Drago (2009). "Protective effects of a coumarin derivative in diabetic rats." Invest Ophthalmol Vis Sci **50**(8): 3846-3852.
- Byers, T. J., H. G. Lidov and L. M. Kunkel (1993). "An alternative dystrophin transcript specific to peripheral nerve." Nat Genet **4**(1): 77-81.
- Byrum, R. S., J. L. Goulet, R. J. Griffiths and B. H. Koller (1997). "Role of the 5-lipoxygenase-activating protein (FLAP) in murine acute inflammatory responses." J Exp Med **185**(6): 1065-1075.
- Caspi, R. R. and F. G. Roberge (1989). "Glial cells as suppressor cells: characterization of the inhibitory function." J Autoimmun **2**(5): 709-722.
- Cia, D., M. Simonutti, P. E. Fort, M. Doly and A. Rendon (2014). "Slight alteration of the electroretinogram in mice lacking dystrophin dp71." Ophthalmic Res **51**(4): 196-203.
- Cibis, G. W., K. M. Fitzgerald, D. J. Harris, P. G. Rothberg and M. Rupani (1993). "The effects of dystrophin gene mutations on the ERG in mice and humans." Invest Ophthalmol Vis Sci **34**(13): 3646-3652.
- Claudepierre, T., C. Dalloz, D. Mornet, K. Matsumura, J. Sahel and A. Rendon (2000). "Characterization of the intermolecular associations of the dystrophin-associated glycoprotein complex in retinal Muller glial cells." J Cell Sci **113 Pt 19**: 3409-3417.
- Claudepierre, T., D. Mornet, T. Pannicke, V. Forster, C. Dalloz, F. Bolanos, J. Sahel, A. Reichenbach and A. Rendon (2000). "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., F. Rodius, M. Frasson, V. Fontaine, S. Picaud, H. Dreyfus, D. Mornet and A. Rendon (1999). "Differential distribution of dystrophins in rat retina." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **40**(7): 1520-1529.
- Connors, N. C., M. E. Adams, S. C. Froehner and P. Kofuji (2004). "The potassium channel Kir4.1 associates with the dystrophin-glycoprotein complex via alpha-syntrophin in glia." *J Biol Chem* **279**(27): 28387-28392.
- Connors, N. C. and P. Kofuji (2006). "Potassium channel Kir4.1 macromolecular complex in retinal glial cells." *Glia* **53**(2): 124-131.
- Cotinet, A., O. Goureau, B. Thillaye-Goldenberg, M. C. Naud and Y. de Kozak (1997). "Differential tumor necrosis factor and nitric oxide production in retinal Muller glial cells from C3H/HeN and C3H/HeJ mice." *Ocul Immunol Inflamm* **5**(2): 111-116.
- Couturier, A., E. Bousquet, M. Zhao, M. C. Naud, C. Klein, L. Jonet, R. Tadayoni, Y. de Kozak and F. Behar-Cohen (2014). "Anti-vascular endothelial growth factor acts on retinal microglia/macrophage activation in a rat model of ocular inflammation." *Mol Vis* **20**: 908-920.
- Cox, G. A., S. F. Phelps, V. M. Chapman and J. S. Chamberlain (1993). "New mdx mutation disrupts expression of muscle and nonmuscle isoforms of dystrophin." *Nat Genet* **4**(1): 87-93.
- D'Souza, V. N., T. M. Nguyen, G. E. Morris, W. Karges, D. A. Pillers and P. N. Ray (1995). "A novel dystrophin isoform is required for normal retinal electrophysiology." *Hum Mol Genet* **4**(5): 837-842.
- Da, T. and A. S. Verkman (2004). "Aquaporin-4 gene disruption in mice protects against impaired retinal function and cell death after ischemia." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **45**(12): 4477-4483.
- Dalloz, C., T. Claudepierre, F. Rodius, D. Mornet, J. Sahel and A. Rendon (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): 908-920.
- Dalloz, C., R. Sarig, P. Fort, D. Yaffe, A. Bordais, T. Pannicke, J. Grosche, D. Mornet, A. Reichenbach, J. Sahel, U. Nudel and A. Rendon (2003). "Targeted inactivation of dystrophin gene product Dp71: phenotypic impact in mouse retina." *Hum Mol Genet* **12**(13): 1543-1554.
- Daoud, F., N. Angeard, B. Demerre, I. Martie, R. Benyaou, F. Leturcq, M. Cossee, N. Deburgrave, Y. Saillour, S. Tuffery, A. Urtizberea, A. Toutain, B. Echenne, M. Frischman, M. Mayer, I. Desguerre, B. Estournet, C. Reveillere, B. Penisson, J. M. Cuisset, J. C. Kaplan, D. Heron, F. Rivier and J. Chelly (2009). "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): 3779-3794.
- Daoud, F., A. Candelario-Martinez, J. M. Billard, A. Avital, M. Khelfaoui, Y. Rozenvald, M. Guegan, D. Mornet, D. Jaillard, U. Nudel, J. Chelly, D. Martinez-Rojas, S. Laroche, D. Yaffe and C. Vaillend (2009). "Role of mental retardation-associated dystrophin-gene product Dp71 in excitatory synapse organization, synaptic plasticity and behavioral functions." *PLoS One* **4**(8): e6574.
- De Venecia, G., M. Davis and R. Engerman (1976). "Clinicopathologic correlations in diabetic retinopathy. I. Histology and fluorescein angiography of microaneurysms." *Arch Ophthalmol* **94**(10): 1766-1773.

Delaey, C. and J. Van De Voorde (2000). "Regulatory mechanisms in the retinal and choroidal circulation." Ophthalmic Res **32**(6): 249-256.

Demircan, N., B. G. Safran, M. Soyulu, A. A. Ozcan and S. Sizmaz (2006). "Determination of vitreous interleukin-1 (IL-1) and tumour necrosis factor (TNF) levels in proliferative diabetic retinopathy." Eye (Lond) **20**(12): 1366-1369.

Diabetic Retinopathy Clinical Research, N., M. J. Elman, L. P. Aiello, R. W. Beck, N. M. Bressler, S. B. Bressler, A. R. Edwards, F. L. Ferris, 3rd, S. M. Friedman, A. R. Glassman, K. M. Miller, I. U. Scott, C. R. Stockdale and J. K. Sun (2010). "Randomized trial evaluating ranibizumab plus prompt or deferred laser or triamcinolone plus prompt laser for diabetic macular edema." Ophthalmology **117**(6): 1064-1077 e1035.

Dixon, R. A., R. E. Diehl, E. Opas, E. Rands, P. J. Vickers, J. F. Evans, J. W. Gillard and D. K. Miller (1990). "Requirement of a 5-lipoxygenase-activating protein for leukotriene synthesis." Nature **343**(6255): 282-284.

Du, Y., V. P. Sarthy and T. S. Kern (2004). "Interaction between NO and COX pathways in retinal cells exposed to elevated glucose and retina of diabetic rats." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **287**(4): R735-741.

Dubois-Dauphin, M., C. Poitry-Yamate, F. de Bilbao, A. K. Julliard, F. Jourdan and G. Donati (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.

Eberhardt, C., B. Amann, A. Feuchtinger, S. M. Hauck and C. A. Deeg (2011). "Differential expression of inwardly rectifying K⁺ channels and aquaporins 4 and 5 in autoimmune uveitis indicates misbalance in Muller glial cell-dependent ion and water homeostasis." Glia **59**(5): 697-707.

Ehmsen, J., E. Poon and K. Davies (2002). "The dystrophin-associated protein complex." J Cell Sci **115**(Pt 14): 2801-2803.

Eisenfeld, A. J., A. H. Bunt-Milam and P. V. Sarthy (1984). "Muller cell expression of glial fibrillary acidic protein after genetic and experimental photoreceptor degeneration in the rat retina." Invest Ophthalmol Vis Sci **25**(11): 1321-1328.

El-Asrar, A. M., L. Missotten and K. Geboes (2008). "Expression of cyclo-oxygenase-2 and downstream enzymes in diabetic fibrovascular epiretinal membranes." Br J Ophthalmol **92**(11): 1534-1539.

Emery, A. E. (1991). "Population frequencies of inherited neuromuscular diseases--a world survey." Neuromuscul Disord **1**(1): 19-29.

Emery, A. E. and M. L. Emery (1993). "Edward Meryon (1809-1880) and muscular dystrophy." J Med Genet **30**(6): 506-511.

Fagan, X. J., J. Levy, S. Al-Qureshi and C. A. Harper (2012). "Proliferative retinopathy in Duchenne muscular dystrophy and its response to bevacizumab." Clin Experiment Ophthalmol **40**(9): 906-907.

Feener, C. A., M. Koenig and L. M. Kunkel (1989). "Alternative splicing of human dystrophin mRNA generates isoforms at the carboxy terminus." Nature **338**(6215): 509-511.

Fitzgerald, K. M., G. W. Cibis, A. H. Gettel, R. Rinaldi, D. J. Harris and R. A. White (1999). "ERG phenotype of a dystrophin mutation in heterozygous female carriers of Duchenne muscular dystrophy." J Med Genet **36**(4): 316-322.

Fort, P. E., A. Sene, T. Pannicke, M. J. Roux, V. Forster, D. Mornet, U. Nudel, D. Yaffe, A. Reichenbach, J. A. Sahel and A. Rendon (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., F. Makarov, J. Kacza, J. Seeger, S. Wendt, U. Gartner, F. Faude, P. Wiedemann and A. Reichenbach (2001). "Retinal pigment epithelium melanin granules are phagocytosed by Muller glial cells in experimental retinal detachment." J Neurocytol **30**(2): 131-136.

Fukuda, M., Y. Nakanishi, M. Fuse, N. Yokoi, Y. Hamada, M. Fukagawa, A. Negi and M. Nakamura (2010). "Altered expression of aquaporins 1 and 4 coincides with neurodegenerative events in retinas of spontaneously diabetic Torii rats." Exp Eye Res **90**(1): 17-25.

Gardner, T. W., E. Lieth, S. A. Khin, A. J. Barber, D. J. Bonsall, T. Leshner, K. Rice and W. A. Brennan, Jr. (1997). "Astrocytes increase barrier properties and ZO-1 expression in retinal vascular endothelial cells." Invest Ophthalmol Vis Sci **38**(11): 2423-2427.

Gerber, H. P., V. Dixit and N. Ferrara (1998). "Vascular endothelial growth factor induces expression of the antiapoptotic proteins Bcl-2 and A1 in vascular endothelial cells." J Biol Chem **273**(21): 13313-13316.

Goodyear, M. J., S. G. Crewther and B. M. Junghans (2009). "A role for aquaporin-4 in fluid regulation in the inner retina." Vis Neurosci **26**(2): 159-165.

Gorecki, D. C. and E. A. Barnard (1995). "Specific expression of G-dystrophin (Dp71) in the brain." Neuroreport **6**(6): 893-896.

Grant, M. B., A. Afzal, P. Spoerri, H. Pan, L. C. Shaw and R. N. Mames (2004). "The role of growth factors in the pathogenesis of diabetic retinopathy." Expert Opin Investig Drugs **13**(10): 1275-1293.

Grosche, J., W. Hartig and A. Reichenbach (1995). "Expression of glial fibrillary acidic protein (GFAP), glutamine synthetase (GS), and Bcl-2 protooncogene protein by Muller (glial) cells in retinal light damage of rats." Neurosci Lett **185**(2): 119-122.

Gubitosi-Klug, R. A., R. Talahalli, Y. Du, J. L. Nadler and T. S. Kern (2008). "5-Lipoxygenase, but not 12/15-lipoxygenase, contributes to degeneration of retinal capillaries in a mouse model of diabetic retinopathy." Diabetes **57**(5): 1387-1393.

Hahn, P., P. Lin and S. Fekrat (2013). "Ultra-widefield imaging of Duchenne muscular dystrophy-associated proliferative retinal vasculopathy improved with panretinal laser photocoagulation alone." Ophthalmic Surg Lasers Imaging Retina **44**(3): 293-295.

Harada, T., C. Harada, N. Nakayama, S. Okuyama, K. Yoshida, S. Kohsaka, H. Matsuda and K. Wada (2000). "Modification of glial-neuronal cell interactions prevents photoreceptor apoptosis during light-induced retinal degeneration." Neuron **26**(2): 533-541.

Hoffman, E. P., C. A. Garcia, J. S. Chamberlain, C. Angelini, J. R. Lupski and R. Fenwick (1991). "Is the carboxyl-terminus of dystrophin required for membrane association? A novel, severe case of Duchenne muscular dystrophy." Ann Neurol **30**(4): 605-610.

Honjo, M., H. Tanihara, N. Kido, M. Inatani, K. Okazaki and Y. Honda (2000). "Expression of ciliary neurotrophic factor activated by retinal Muller cells in eyes with NMDA- and kainic acid-induced neuronal death." Invest Ophthalmol Vis Sci **41**(2): 552-560.

Huang, H., J. K. Gandhi, X. Zhong, Y. Wei, J. Gong, E. J. Duh and S. A. Vinore (2011). "TNFalpha is required for late BRB breakdown in diabetic retinopathy, and its inhibition prevents leukostasis and protects vessels and neurons from apoptosis." Invest Ophthalmol Vis Sci **52**(3): 1336-1344.

Hubbard, A. K. and R. Rothlein (2000). "Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression and cell signaling cascades." Free Radic Biol Med **28**(9): 1379-1386.

Ishida, S., K. Yamashiro, T. Usui, Y. Kaji, Y. Ogura, T. Hida, Y. Honda, Y. Oguchi and A. P. Adamis (2003). "Leukocytes mediate retinal vascular remodeling during development and vaso-obliteration in disease." Nat Med **9**(6): 781-788.

Jancsik, V. and F. Hajos (1999). "The demonstration of immunoreactive dystrophin and its developmental expression in perivascular astrocytes." Brain Res **831**(1-2): 200-205.

Jin, H., S. Tan, J. Hermanowski, S. Bohm, S. Pacheco, J. M. McCauley, M. J. Greener, Y. Hinitz, S. M. Hughes, P. T. Sharpe and R. G. Roberts (2007). "The dystrotelin, dystrophin and dystrobrevin superfamily: new paralogues and old isoforms." BMC Genomics **8**: 19.

Joussen, A. M., S. Doehmen, M. L. Le, K. Koizumi, S. Radetzky, T. U. Krohne, V. Poulaki, I. Semkova and N. Kociok (2009). "TNF-alpha mediated apoptosis plays an important role in the development of early diabetic retinopathy and long-term histopathological alterations." Mol Vis **15**: 1418-1428.

Joussen, A. M., V. Poulaki, M. L. Le, K. Koizumi, C. Esser, H. Janicki, U. Schraermeyer, N. Kociok, S. Fauser, B. Kirchhof, T. S. Kern and A. P. Adamis (2004). "A central role for inflammation in the pathogenesis of diabetic retinopathy." FASEB J **18**(12): 1450-1452.

Joussen, A. M., V. Poulaki, N. Mitsiades, B. Kirchhof, K. Koizumi, S. Dohmen and A. P. Adamis (2002). "Nonsteroidal anti-inflammatory drugs prevent early diabetic retinopathy via TNF-alpha suppression." FASEB J **16**(3): 438-440.

Joussen, A. M., V. Poulaki, W. Qin, B. Kirchhof, N. Mitsiades, S. J. Wiegand, J. Rudge, G. D. Yancopoulos and A. P. Adamis (2002). "Retinal vascular endothelial growth factor induces intercellular adhesion molecule-1 and endothelial nitric oxide synthase expression and initiates early diabetic retinal leukocyte adhesion in vivo." Am J Pathol **160**(2): 501-509.

Kern, T. S., Y. Du, C. M. Miller, D. A. Hatala and L. A. Levin (2010). "Overexpression of Bcl-2 in vascular endothelium inhibits the microvascular lesions of diabetic retinopathy." Am J Pathol **176**(5): 2550-2558.

Kim, I., S. O. Moon, S. K. Park, S. W. Chae and G. Y. Koh (2001). "Angiopietin-1 reduces VEGF-stimulated leukocyte adhesion to endothelial cells by reducing ICAM-1, VCAM-1, and E-selectin expression." Circ Res **89**(6): 477-479.

Kim, S. Y., M. A. Johnson, D. S. McLeod, T. Alexander, B. C. Hansen and G. A. Lutty (2005). "Neutrophils are associated with capillary closure in spontaneously diabetic monkey retinas." Diabetes **54**(5): 1534-1542.

King, L. S., D. Kozono and P. Agre (2004). "From structure to disease: the evolving tale of aquaporin biology." Nat Rev Mol Cell Biol **5**(9): 687-698.

- Klaassen, I., C. J. Van Noorden and R. O. Schlingemann (2013). "Molecular basis of the inner blood-retinal barrier and its breakdown in diabetic macular edema and other pathological conditions." Prog Retin Eye Res **34**: 19-48.
- Koenig, M., E. P. Hoffman, C. J. Bertelson, A. P. Monaco, C. Feener and L. M. Kunkel (1987). "Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals." Cell **50**(3): 509-517.
- Koenig, M., A. P. Monaco and L. M. Kunkel (1988). "The complete sequence of dystrophin predicts a rod-shaped cytoskeletal protein." Cell **53**(2): 219-228.
- Kofuji, P., B. Biedermann, V. Siddharthan, M. Raap, I. Iandiev, I. Milenkovic, A. Thomzig, R. W. Veh, A. Bringmann and A. Reichenbach (2002). "Kir potassium channel subunit expression in retinal glial cells: implications for spatial potassium buffering." Glia **39**(3): 292-303.
- Kofuji, P., P. Ceelen, K. R. Zahs, L. W. Surbeck, H. A. Lester and E. A. Newman (2000). "Genetic inactivation of an inwardly rectifying potassium channel (Kir4.1 subunit) in mice: phenotypic impact in retina." J Neurosci **20**(15): 5733-5740.
- Kuiper, E. J., A. N. Witmer, I. Klaassen, N. Oliver, R. Goldschmeding and R. O. Schlingemann (2004). "Differential expression of connective tissue growth factor in microglia and pericytes in the human diabetic retina." Br J Ophthalmol **88**(8): 1082-1087.
- Leal, E. C., J. Martins, P. Voabil, J. Liberal, C. Chiavaroli, J. Bauer, J. Cunha-Vaz and A. F. Ambrosio (2010). "Calcium dobesilate inhibits the alterations in tight junction proteins and leukocyte adhesion to retinal endothelial cells induced by diabetes." Diabetes **59**(10): 2637-2645.
- Lee, Y., C. Rodriguez and R. A. Dionne (2005). "The role of COX-2 in acute pain and the use of selective COX-2 inhibitors for acute pain relief." Curr Pharm Des **11**(14): 1737-1755.
- Li, S. Y., D. Yang, C. M. Yeung, W. Y. Yu, R. C. Chang, K. F. So, D. Wong and A. C. Lo (2011). "Lycium barbarum polysaccharides reduce neuronal damage, blood-retinal barrier disruption and oxidative stress in retinal ischemia/reperfusion injury." PLoS One **6**(1): e16380.
- Lidov, H. G. and L. M. Kunkel (1997). "Dp140: alternatively spliced isoforms in brain and kidney." Genomics **45**(1): 132-139.
- Limb, G. A., R. D. Hollifield, L. Webster, D. G. Charteris and A. H. Chignell (2001). "Soluble TNF receptors in vitreoretinal proliferative disease." Invest Ophthalmol Vis Sci **42**(7): 1586-1591.
- Liu, X. Q., H. Kobayashi, Z. B. Jin, A. Wada and I. N. Nao (2007). "Differential expression of Kir4.1 and aquaporin 4 in the retina from endotoxin-induced uveitis rat." Mol Vis **13**: 309-317.
- Louie, K., R. S. Apte, K. Mori and P. Gehlbach (2004). "Severe proliferative retinopathy in a patient with advanced muscular dystrophy." Br J Ophthalmol **88**(12): 1604-1605.
- Lu, M., V. L. Perez, N. Ma, K. Miyamoto, H. B. Peng, J. K. Liao and A. P. Adamis (1999). "VEGF increases retinal vascular ICAM-1 expression in vivo." Invest Ophthalmol Vis Sci **40**(8): 1808-1812.
- Lumeng, C. N., S. F. Phelps, J. A. Rafael, G. A. Cox, T. L. Hutchinson, C. R. Begy, E. Adkins, R. Wiltshire and J. S. Chamberlain (1999). "Characterization of dystrophin and utrophin diversity in the mouse." Hum Mol Genet **8**(4): 593-599.

- Mano, T. and D. G. Puro (1990). "Phagocytosis by human retinal glial cells in culture." Invest Ophthalmol Vis Sci **31**(6): 1047-1055.
- McLeod, D. S., D. J. Lefer, C. Merges and G. A. Luty (1995). "Enhanced expression of intracellular adhesion molecule-1 and P-selectin in the diabetic human retina and choroid." Am J Pathol **147**(3): 642-653.
- Meleth, A. D., E. Agron, C. C. Chan, G. F. Reed, K. Arora, G. Byrnes, K. G. Csaky, F. L. Ferris, 3rd and E. Y. Chew (2005). "Serum inflammatory markers in diabetic retinopathy." Invest Ophthalmol Vis Sci **46**(11): 4295-4301.
- Miller, J. W., A. P. Adamis and L. P. Aiello (1997). "Vascular endothelial growth factor in ocular neovascularization and proliferative diabetic retinopathy." Diabetes Metab Rev **13**(1): 37-50.
- Miyamoto, K., S. Khosrof, S. E. Bursell, R. Rohan, T. Murata, A. C. Clermont, L. P. Aiello, Y. Ogura and A. P. Adamis (1999). "Prevention of leukostasis and vascular leakage in streptozotocin-induced diabetic retinopathy via intercellular adhesion molecule-1 inhibition." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(19): 10836-10841.
- Mizutani, M., C. Gerhardinger and M. Lorenzi (1998). "Muller cell changes in human diabetic retinopathy." Diabetes **47**(3): 445-449.
- Monaco, A. P., R. L. Neve, C. Colletti-Feener, C. J. Bertelson, D. M. Kurnit and L. M. Kunkel (1986). "Isolation of candidate cDNAs for portions of the Duchenne muscular dystrophy gene." Nature **323**(6089): 646-650.
- Montanaro, F., S. Carbonetto, K. P. Campbell and M. Lindenbaum (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): 528-538.
- Muntoni, F., S. Torelli and A. Ferlini (2003). "Dystrophin and mutations: one gene, several proteins, multiple phenotypes." Lancet Neurol **2**(12): 731-740.
- Nagelhus, E. A., Y. Horio, A. Inanobe, A. Fujita, F. M. Haug, S. Nielsen, Y. Kurachi and O. P. Ottersen (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.
- Nagelhus, E. A., M. L. Veruki, R. Torp, F. M. Haug, J. H. Laake, S. Nielsen, P. Agre and O. P. Ottersen (1998). "Aquaporin-4 water channel protein in the rat retina and optic nerve: polarized expression in Muller cells and fibrous astrocytes." J Neurosci **18**(7): 2506-2519.
- Neely, J. D., M. Amiry-Moghaddam, O. P. Ottersen, S. C. Froehner, P. Agre and M. E. Adams (2001). "Syntrophin-dependent expression and localization of Aquaporin-4 water channel protein." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(24): 14108-14113.
- Newman, E. and A. Reichenbach (1996). "The Muller cell: a functional element of the retina." Trends Neurosci **19**(8): 307-312.
- Newman, E. A. (2003). "Glial cell inhibition of neurons by release of ATP." J Neurosci **23**(5): 1659-1666.

- Newman, E. A., D. A. Frambach and L. L. Odette (1984). "Control of extracellular potassium levels by retinal glial cell K⁺ siphoning." Science **225**(4667): 1174-1175.
- Nicchia, G. P., B. Nico, L. M. Camassa, M. G. Mola, N. Loh, R. Dermietzel, D. C. Spray, M. Svelto and A. Frigeri (2004). "The role of aquaporin-4 in the blood-brain barrier development and integrity: studies in animal and cell culture models." Neuroscience **129**(4): 935-945.
- Nico, B., P. Corsi, R. Ria, E. Crivellato, A. Vacca, A. M. Roccaro, D. Mangieri, D. Ribatti and L. Roncali (2006). "Increased matrix-metalloproteinase-2 and matrix-metalloproteinase-9 expression in the brain of dystrophic mdx mouse." Neuroscience **140**(3): 835-848.
- Nico, B., P. Corsi, A. Vacca, L. Roncali and D. Ribatti (2002). "Vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptor-2 expression in mdx mouse brain." Brain Res **953**(1-2): 12-16.
- Nico, B., A. Frigeri, G. P. Nicchia, P. Corsi, D. Ribatti, F. Quondamatteo, R. Herken, F. Girolamo, A. Marzullo, M. Svelto and L. Roncali (2003). "Severe alterations of endothelial and glial cells in the blood-brain barrier of dystrophic mdx mice." Glia **42**(3): 235-251.
- Nico, B., R. Tamma, T. Annese, D. Mangieri, A. De Luca, P. Corsi, V. Benagiano, V. Longo, E. Crivellato, A. Salmaggi and D. Ribatti (2010). "Glial dystrophin-associated proteins, laminin and agrin, are downregulated in the brain of mdx mouse." Lab Invest **90**(11): 1645-1660.
- Nor, J. E., J. Christensen, D. J. Mooney and P. J. Polverini (1999). "Vascular endothelial growth factor (VEGF)-mediated angiogenesis is associated with enhanced endothelial cell survival and induction of Bcl-2 expression." Am J Pathol **154**(2): 375-384.
- Nunes, S., I. Pires, A. Rosa, L. Duarte, R. Bernardes and J. Cunha-Vaz (2009). "Microaneurysm turnover is a biomarker for diabetic retinopathy progression to clinically significant macular edema: findings for type 2 diabetics with nonproliferative retinopathy." Ophthalmologica **223**(5): 292-297.
- Orlova, A., I. N. Rybakova, E. Prochniewicz, D. D. Thomas, J. M. Ervasti and E. H. Egelman (2001). "Binding of dystrophin's tandem calponin homology domain to F-actin is modulated by actin's structure." Biophys J **80**(4): 1926-1931.
- Otori, Y., S. Shimada, K. Tanaka, I. Ishimoto, Y. Tano and M. Tohyama (1994). "Marked increase in glutamate-aspartate transporter (GLAST/GluT-1) mRNA following transient retinal ischemia." Brain Res Mol Brain Res **27**(2): 310-314.
- Otrock, Z. K., J. A. Makarem and A. I. Shamseddine (2007). "Vascular endothelial growth factor family of ligands and receptors: review." Blood Cells Mol Dis **38**(3): 258-268.
- Pannicke, T., A. Wurm, I. Iandiev, M. Hollborn, R. Linnertz, D. K. Binder, L. Kohen, P. Wiedemann, C. Steinhauser, A. Reichenbach and A. Bringmann (2010). "Deletion of aquaporin-4 renders retinal glial cells more susceptible to osmotic stress." J Neurosci Res **88**(13): 2877-2888.
- Papadopoulos, M. C., S. Krishna and A. S. Verkman (2002). "Aquaporin water channels and brain edema." Mt Sinai J Med **69**(4): 242-248.
- Paques, M., R. Tadayoni, R. Sercombe, P. Laurent, O. Genevois, A. Gaudric and E. Vicaut (2003). "Structural and hemodynamic analysis of the mouse retinal microcirculation." Invest Ophthalmol Vis Sci **44**(11): 4960-4967.

- Paulson, O. B. and E. A. Newman (1987). "Does the release of potassium from astrocyte endfeet regulate cerebral blood flow?" Science **237**(4817): 896-898.
- Pierce, E. A., R. L. Avery, E. D. Foley, L. P. Aiello and L. E. Smith (1995). "Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor expression in a mouse model of retinal neovascularization." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(3): 905-909.
- Pillers, D. A., D. E. Bulman, R. G. Weleber, D. A. Sigesmund, M. A. Musarella, B. R. Powell, W. H. Murphey, C. Westall, C. Panton, L. E. Becker and et al. (1993). "Dystrophin expression in the human retina is required for normal function as defined by electroretinography." Nat Genet **4**(1): 82-86.
- Pillers, D. A., K. M. Fitzgerald, N. M. Duncan, S. M. Rash, R. A. White, S. J. Dwinell, B. R. Powell, R. E. Schnur, P. N. Ray, G. W. Cibis and R. G. Weleber (1999). "Duchenne/Becker muscular dystrophy: correlation of phenotype by electroretinography with sites of dystrophin mutations." Hum Genet **105**(1-2): 2-9.
- Pillers, D. A., R. G. Weleber, D. G. Green, S. M. Rash, G. Y. Dally, P. L. Howard, M. R. Powers, D. C. Hood, V. M. Chapman, P. N. Ray and W. R. Woodward (1999). "Effects of dystrophin isoforms on signal transduction through neural retina: genotype-phenotype analysis of duchenne muscular dystrophy mouse mutants." Mol Genet Metab **66**(2): 100-110.
- Pillers, D. A., R. G. Weleber, W. R. Woodward, D. G. Green, V. M. Chapman and P. N. Ray (1995). "mdxCv3 mouse is a model for electroretinography of Duchenne/Becker muscular dystrophy." Invest Ophthalmol Vis Sci **36**(2): 462-466.
- Pow, D. V. and D. K. Crook (1996). "Direct immunocytochemical evidence for the transfer of glutamine from glial cells to neurons: use of specific antibodies directed against the d-stereoisomers of glutamate and glutamine." Neuroscience **70**(1): 295-302.
- Rao, N. A., T. Kimoto, E. Zamir, R. Giri, R. Wang, S. Ito, G. Pararajasegaram, R. W. Read and G. S. Wu (2003). "Pathogenic role of retinal microglia in experimental uveoretinitis." Invest Ophthalmol Vis Sci **44**(1): 22-31.
- Rasier, R., U. Gormus, O. Artunay, E. Yuzbasioglu, M. Oncel and H. Bahcecioglu (2010). "Vitreous levels of VEGF, IL-8, and TNF-alpha in retinal detachment." Curr Eye Res **35**(6): 505-509.
- Rehak, M., M. Hollborn, I. Iandiev, T. Pannicke, A. Karl, A. Wurm, L. Kohen, A. Reichenbach, P. Wiedemann and A. Bringmann (2009). "Retinal gene expression and Muller cell responses after branch retinal vein occlusion in the rat." Invest Ophthalmol Vis Sci **50**(5): 2359-2367.
- Renley, B. A., I. N. Rybakova, K. J. Amann and J. M. Ervasti (1998). "Dystrophin binding to nonmuscle actin." Cell Motil Cytoskeleton **41**(3): 264-270.
- Roberts, D. M., J. B. Kearney, J. H. Johnson, M. P. Rosenberg, R. Kumar and V. L. Bautch (2004). "The vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor Flt-1 (VEGFR-1) modulates Flk-1 (VEGFR-2) signaling during blood vessel formation." Am J Pathol **164**(5): 1531-1535.
- Rosman, N. P. and B. A. Kakulas (1966). "Mental deficiency associated with muscular dystrophy. A neuropathological study." Brain **89**(4): 769-788.
- Samuelsson, B. (1983). "Leukotrienes: mediators of immediate hypersensitivity reactions and inflammation." Science **220**(4597): 568-575.

- Sarig, R., V. Mezger-Lallemand, I. Gitelman, C. Davis, O. Fuchs, D. Yaffe and U. Nudel (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.
- Sarthy, V. P., L. Pignataro, T. Pannicke, M. Weick, A. Reichenbach, T. Harada, K. Tanaka and R. Marc (2005). "Glutamate transport by retinal Muller cells in glutamate/aspartate transporter-knockout mice." Glia **49**(2): 184-196.
- Satz, J. S., A. R. Philp, H. Nguyen, H. Kusano, J. Lee, R. Turk, M. J. Riker, J. Hernandez, R. M. Weiss, M. G. Anderson, R. F. Mullins, S. A. Moore, E. M. Stone and K. P. Campbell (2009). "Visual impairment in the absence of dystroglycan." J Neurosci **29**(42): 13136-13146.
- Schnitzer, J. (1987). "Retinal astrocytes: their restriction to vascularized parts of the mammalian retina." Neurosci Lett **78**(1): 29-34.
- Schroder, S., W. Palinski and G. W. Schmid-Schonbein (1991). "Activated monocytes and granulocytes, capillary nonperfusion, and neovascularization in diabetic retinopathy." Am J Pathol **139**(1): 81-100.
- Sene, A., R. Tadayoni, T. Pannicke, A. Wurm, B. El Mathari, R. Benard, M. J. Roux, D. Yaffe, D. Mornet, A. Reichenbach, J. A. Sahel and A. Rendon (2009). "Functional implication of Dp71 in osmoregulation and vascular permeability of the retina." PLoS One **4**(10): e7329.
- Shams, N. and T. Ianchulev (2006). "Role of vascular endothelial growth factor in ocular angiogenesis." Ophthalmol Clin North Am **19**(3): 335-344.
- Shao, X. D., X. Z. Guo, L. N. Ren and H. Lin (2014). "The mechanism of COX-2 regulating HERG channel in gastric cancer cells." Bratisl Lek Listy **115**(8): 487-491.
- Shelton, M. D., A. M. Distler, T. S. Kern and J. J. Mieyal (2009). "Glutaredoxin regulates autocrine and paracrine proinflammatory responses in retinal glial (muller) cells." J Biol Chem **284**(8): 4760-4766.
- Shen, W., M. Fruttiger, L. Zhu, S. H. Chung, N. L. Barnett, J. K. Kirk, S. Lee, N. J. Coorey, M. Killingsworth, L. S. Sherman and M. C. Gillies (2012). "Conditional Muller cell ablation causes independent neuronal and vascular pathologies in a novel transgenic model." J Neurosci **32**(45): 15715-15727.
- Shibuya, M. (2006). "Differential roles of vascular endothelial growth factor receptor-1 and receptor-2 in angiogenesis." J Biochem Mol Biol **39**(5): 469-478.
- Sigesmund, D. A., R. G. Weleber, D. A. Pillers, C. A. Westall, C. M. Panton, B. R. Powell, E. Heon, W. H. Murphey, M. A. Musarella and P. N. Ray (1994). "Characterization of the ocular phenotype of Duchenne and Becker muscular dystrophy." Ophthalmology **101**(5): 856-865.
- Simon, L. S. (1999). "Role and regulation of cyclooxygenase-2 during inflammation." Am J Med **106**(5B): 37S-42S.
- Stone, J., T. Chan-Ling, J. Pe'er, A. Itin, H. Gnessin and E. Keshet (1996). "Roles of vascular endothelial growth factor and astrocyte degeneration in the genesis of retinopathy of prematurity." Invest Ophthalmol Vis Sci **37**(2): 290-299.

- Stone, J., A. Itin, T. Alon, J. Pe'er, H. Gnessin, T. Chan-Ling and E. Keshet (1995). "Development of retinal vasculature is mediated by hypoxia-induced vascular endothelial growth factor (VEGF) expression by neuroglia." J Neurosci **15**(7 Pt 1): 4738-4747.
- Takahashi, H. and M. Shibuya (2005). "The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions." Clin Sci (Lond) **109**(3): 227-241.
- Talahalli, R., S. Zarini, N. Sheibani, R. C. Murphy and R. A. Gubitosi-Klug (2010). "Increased synthesis of leukotrienes in the mouse model of diabetic retinopathy." Invest Ophthalmol Vis Sci **51**(3): 1699-1708.
- Tamma, R., T. Annese, R. F. Capogrosso, A. Cozzoli, V. Benagiano, V. Sblendorio, S. Ruggieri, E. Crivellato, G. Specchia, D. Ribatti, A. De Luca and B. Nico (2013). "Effects of prednisolone on the dystrophin-associated proteins in the blood-brain barrier and skeletal muscle of dystrophic mdx mice." Lab Invest **93**(5): 592-610.
- Tang, J. and T. S. Kern (2011). "Inflammation in diabetic retinopathy." Prog Retin Eye Res **30**(5): 343-358.
- Tenckhoff, S., M. Hollborn, L. Kohen, S. Wolf, P. Wiedemann and A. Bringmann (2005). "Diversity of aquaporin mRNA expressed by rat and human retinas." Neuroreport **16**(1): 53-56.
- Theodossiadis, P. G., N. N. Markomichelakis and P. P. Sfikakis (2007). "Tumor necrosis factor antagonists: preliminary evidence for an emerging approach in the treatment of ocular inflammation." Retina **27**(4): 399-413.
- Tolentino, M. J., J. W. Miller, E. S. Gragoudas, F. A. Jakobiec, E. Flynn, K. Chatzistefanou, N. Ferrara and A. P. Adamis (1996). "Intravitreal injections of vascular endothelial growth factor produce retinal ischemia and microangiopathy in an adult primate." Ophthalmology **103**(11): 1820-1828.
- Tout, S., T. Chan-Ling, H. Hollander and J. Stone (1993). "The role of Muller cells in the formation of the blood-retinal barrier." Neuroscience **55**(1): 291-301.
- Tsacopoulos, M. and P. J. Magistretti (1996). "Metabolic coupling between glia and neurons." J Neurosci **16**(3): 877-885.
- Tyler, K. L. (2003). "Origins and early descriptions of "Duchenne muscular dystrophy"." Muscle Nerve **28**(4): 402-422.
- Usui, T., S. Ishida, K. Yamashiro, Y. Kaji, V. Poulaki, J. Moore, T. Moore, S. Amano, Y. Horikawa, D. Dartt, M. Golding, D. T. Shima and A. P. Adamis (2004). "VEGF164(165) as the pathological isoform: differential leukocyte and endothelial responses through VEGFR1 and VEGFR2." Invest Ophthalmol Vis Sci **45**(2): 368-374.
- van Deutekom, J. C. and G. J. van Ommen (2003). "Advances in Duchenne muscular dystrophy gene therapy." Nat Rev Genet **4**(10): 774-783.
- Venero, J. L., A. Machado and J. Cano (2004). "Importance of aquaporins in the physiopathology of brain edema." Curr Pharm Des **10**(18): 2153-2161.
- Verkman, A. S. (2005). "More than just water channels: unexpected cellular roles of aquaporins." J Cell Sci **118**(Pt 15): 3225-3232.

- Waite, A., S. C. Brown and D. J. Blake (2012). "The dystrophin-glycoprotein complex in brain development and disease." Trends Neurosci **35**(8): 487-496.
- Wang, A. L., A. C. Yu, L. T. Lau, C. Lee, M. Wu le, X. Zhu and M. O. Tso (2005). "Minocycline inhibits LPS-induced retinal microglia activation." Neurochem Int **47**(1-2): 152-158.
- Wang, J., X. Xu, M. H. Elliott, M. Zhu and Y. Z. Le (2010). "Muller cell-derived VEGF is essential for diabetes-induced retinal inflammation and vascular leakage." Diabetes **59**(9): 2297-2305.
- Wang, L., C. Li, H. Guo, T. S. Kern, K. Huang and L. Zheng (2011). "Curcumin inhibits neuronal and vascular degeneration in retina after ischemia and reperfusion injury." PLoS One **6**(8): e23194.
- Wu, D. M., H. Kawamura, K. Sakagami, M. Kobayashi and D. G. Puro (2003). "Cholinergic regulation of pericyte-containing retinal microvessels." Am J Physiol Heart Circ Physiol **284**(6): H2083-2090.
- Xu, Q., T. Qaum and A. P. Adamis (2001). "Sensitive blood-retinal barrier breakdown quantitation using Evans blue." Invest Ophthalmol Vis Sci **42**(3): 789-794.
- Yamada, E. (1969). "Some structural features of the fovea centralis in the human retina." Arch Ophthalmol **82**(2): 151-159.
- Zhang, Y., G. Xu, Q. Ling and C. Da (2011). "Expression of aquaporin 4 and Kir4.1 in diabetic rat retina: treatment with minocycline." J Int Med Res **39**(2): 464-479.
- Zheng, L., B. Gong, D. A. Hatala and T. S. Kern (2007). "Retinal ischemia and reperfusion causes capillary degeneration: similarities to diabetes." Invest Ophthalmol Vis Sci **48**(1): 361-367.

Annexes

Liste des publications

In vivo observation of the locomotion of microglial cells in the retina. Paques M, Simonutti M, Augustin S, Goupille O, El Mathari B, Sahel JA. *Glia*. 2010 Nov 1,58(14):1663-8.

Functional implication of Dp71 in osmoregulation and vascular permeability of the retina. Sene A, Tadayoni R, Pannicke T, Wurm A, El Mathari B, Benard R, Roux MJ, Yaffe D, Mornet D, Reichenbach A, Sahel JA, Rendon A. *PLoS One*. 2009 Oct 7,4(10):e7329.

USING ADENO-ASSOCIATED VIRUS AS A TOOL TO STUDY RETINAL BARRIERS IN DISEASE. VACCA Ophélie, EL MATHARI Brahim, DARCHE Marie, SAHEL José-Alain, RENDON Alvaro and DALKARA Deniz. *Jove*, 2014. In-press

AAV-MEDIATED GENE THERAPY IN DYSTROPHIN-Dp71 DEFICIENT MOUSE LEADS TO BLOOD-RETINAL BARRIER RESTORATION. Ophélie Vacca, Hugo Charles-Messance, Brahim El-Mathari, Peggy Barbe, Stéphane Fouquet, Marie Darche, Michel Paques, José-Alain Sahel, Ramin Tadayoni, Deniz Dalkara, Alvaro Rendon. **Submission to JCI in progress.**

Poster et communications

Poster ARVO 2014. Dystrophin-Dp71-null mouse presents retinal vascular inflammation. Brahim El Mathari, Hugo Charles-Messance, Claudine Grepin, Michel J. Roux, Jose A. Sahel, Ramin Tadayoni, Alvaro Rendon. Vision Institute, Sanofi-Fovea, Paris, France.

Poster ARVO 2014. Collagen 4a1 deficiency induces a vascular leakage in the retina. Alix Trouillet¹, Emmanuelle Plaisier², Brahim El Mathari¹, Henri Lorach¹, Ivana Ivkovic¹, Julie Degardin¹, Michel Paques¹, Pierre Ronco², Jose A. Sahel¹ and Serge A. Picaud¹. ¹Institut de la Vision, Paris, France; ²APHP- Hopital Tenon, Paris, France.

Paper ARVO 2014. AAV-mediated gene therapy in Dystrophin-Dp71 deficient mouse leads to blood-retinal barrier permeability restoration. Ophélie Vacca, Brahim El Mathari, Marie Darche, Peggy Barbe, David V. Schaffer, John G. Flannery, Jose A. Sahel, Ramin Tadayoni, Deniz Dalkara, Alvaro Rendon. Vision Institute, Paris, France.

Poster ARVO 2011. A New Quantifiable Blood Retinal Barrier Breakdown Model In Mice. Romain Benard, Audrey Giocanti-Auregan, Brahim El-Mathari, Ophélie Vacca, José-Alain Sahel, Alvaro Rendon, Ramin Tadayoni. Institut de la Vision; **Fovea Pharma, Sanofi-Aventis group**, Paris, France.

Poster ARVO 2011. Interaction Between Dystrophin Protein 71 (dp71), Inner Blood Retinal Barrier And Dexamethasone. Audrey Giocanti-Auregan^{1,2}, Romain Benard³, Gilles Chaine¹, Brahim El-Mathari⁴, Ophélie Vacca³, José-Alain Sahel³, Alvaro Rendon³, Ramin Tadayoni⁶. ¹Ophthalmology, Avicenne Hospital, Bobigny, France; ²Institut

de la Vision, Paris, France; ³Ophthalmology, INSERM, U968; UPMC Univ Paris 06, UMR_S 968, Institut de la Vision; ⁴Fovea Pharma, Sanofi-Aventis group, Paris, France; ⁶Ophthalmology, Hôpital Lariboisière, AP-HP, Université Paris Diderot, Paris, France.

Poster ARVO 2010. In vivo Observation of the Locomotion of Microglial Cells in the Retina of Wild-Type Rodents. M. Paques, M. Simonutti, **B. El Mathari**, J.-A. Sahel. Vision Institute, Paris, France.

ISOPT 2009. Role of The Kallikrein-Kinin System in Diabetic Retinopathy. J-A Sahel¹, R Couture², S Talbot², E Vaucher², **B El-Mathari**³, A Bemelmans³, P Bélichard³ and D Pruneau³. 1, Institut de la Vision ; 2, Ecole d'Optométrie et Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada ; 3, Fovea Pharmaceuticals, Paris, France.

Poster ARVO 2008. Clinical and Experimental Neuroglial Remodelling Following Resolution of Post-Retinal Vein Occlusion Macular Edema. S.M. Tick, **B. El Mathari**, C. Bachelin, J.-F. Girmens, J.-A. Sahel, M. Paques. Vision Institute, Paris, France.

Poster ARVO 2008. Retinal Vein Occlusion in Pigs as a Model of Acute Retinal Edema. J. Combal, D. Pruneau, **B. El-Mathari**, M. Paques, A.-J. Sahel. R&D, FOVEA Pharmaceuticals, Paris, France, INSERM U592, Paris, France.

TSE Forum Neuro Prion Meeting 2005. **Adaptation of the Bovine Spongiform Encephalopathy to the Primate *Microcebus murinus* by Oral Route.** N Mestre-Frances, **B El Mathari**, C Crozet, V Pascal, S Rouland, S Lehmann, S Picaud, JL Berge-Lefranc, JM Verdier. INSERM U710, Paris, France.

Liste des figures

Introduction

Figure 1. Anatomie de l'œil (http://baladesnaturalistes.hautetfort.com/archive/2012/07/28/des-cellules-souches-dans-la-retine.html).	11
Figure 2. Fond d'œil (http://lecerveau.mcgill.ca/flash/a/a_02/a_02_cr/a_02_cr_vis/a_02_cr_vis.html).	12
Figure 3. Anatomie de la rétine (http://journals.cambridge.org/fulltext_content/ERM/ERM6_15/S1462399404008129sup006.htm). .	15
Figure 4. Représentation schématique des interactions entre la cellule gliale de Müller et les autres neurones de la rétine. c: cône, b: bâtonnet, h: cellules horizontales, B: cellules bipolaires, A: cellules amacrines, M: cellule gliale de Müller, G: cellule ganglionnaire. (http://webvision.med.utah.edu/book/part-ii-anatomy-and-physiology-of-the-retina/glia-cells-of-the-retina/)	17
Figure 5. Représentation schématique de l'architecture vasculaire et de la circulation du sang de la rétine. A: artériole; V: veinule; flèches: circulation du sang. Figure adaptée de (Paques, Tadayoni et al. 2003).....	22
Figure 6. A, Représentation schématique du gène DMD. Les barres verticales représentent les 79 exons. Les flèches indiquent les différents promoteurs tissus spécifiques : Cérébral (B), musculaire (M), des cellules de Purkinje (P), de la rétine (R), des cellules de Schwann (S) et du promoteur général Dp71 (G) spécifique de plusieurs tissus, sauf le muscle. B, Les structures des différentes protéines dystrophines, codées par les différents promoteurs sont représentées. Le domaine N-terminal est suivie par le domaine « spectrin like », le domaine riche en cystéine et le domaine C-terminal (Muntoni, Torelli et al. 2003).....	26
Figure 7. Structure de la protéine dystrophine (van Deutekom and van Ommen 2003).	27
Figure 8. Représentation schématique du complexe Dp71-DAPs, localisé dans le cerveau, au niveau des prolongements des astrocytes entourant les vaisseaux sanguins (Waite, Brown et al. 2012).	28
Figure 9. Représentation schématique du complexe Dp71-DAPs, localisé dans la rétine, au niveau des cellules gliales de Müller. Adaptée de (Fort, Sene et al. 2008).....	29
Figure 10. Représentation schématique de la barrière hémato-encéphalique (Waite, Brown et al. 2012).	31
Figure 11. Représentation schématique de la barrière hémato-rétinienne. E: cellule endothéliale; P: péricyte ; G: prolongements des cellules gliales ; ZO: protéine zonula occludens. (David A. Antonetti et al, 2008) http://rd.springer.com/chapter/10.1007/978-1-59745-563-3_14	33
Figure 12. Représentation schématique du recrutement des leucocytes au site inflammatoire. http://www.cours-pharmacie.com/immunologie/limmunite-innee.html	38

Figure 13. Microvaisseaux rétiniens isolées d'un patient diabétique montrant de nombreux micro-anévrysmes (flèches épaisses) et des capillaires dégénérés (flèches minces). (Tang and Kern 2011)... 40

Figure 14. Le remplacement d'une partie du premier exon du gène de la Dp71 par le gène β -geo. Le premier exon et unique de la Dp71 et l'initiation de la transcription de la Dp71 (flèche coudée) sont situés dans l'intron entre les exons 62 et 63 du gène de la DMD. Les cadres indiquent les exons. Les parties sombres, les régions 5'- ou 3'-non traduites; parties vides, les régions traduites; les lignes fines horizontales, les introns (pas à l'échelle). Les lignes en gras indiquent les deux épissages alternatifs: trait gras continu, l'épissage de la transcription initiée par le promoteur de la Dp71; ligne en gras pointillé, l'épissage des transcrits initiés en amont (tous les autres produits connus du gène DMD). ATG, codon d'initiation de la Dp71 chez les souris contrôles; TGA, codon stop du gène chimérique de la β -gal-néomycine (b-géo). Le gène β -geo inséré est décrit schématiquement ci-dessus. Le remplacement est indiqué par des lignes fines pointillées..... 46

Figure 15. Localisation rétinienne de la Dp71 chez la souris. Marquage immunohistochimique des dystrophines sur des coupes de rétines avec l'utilisation de l'anticorps pan-spécifique H4 (qui marque l'ensemble de dystrophines) en vert et les noyaux en bleu (Fort, Sene et al. 2008)..... 47

Figure 16. Localisation de la Dp71 dans les cellules gliales de Müller. Marquage immunohistochimique de la dystrophine Dp71 (H4, en rouge) et de la glutamine synthases (GS, en vert) sur des cellules gliales de Müller isolées (Fort, Sene et al. 2008). 48

Figure 17. Localisation rétinienne de la Dp71 chez l'homme, le porc et la souris. A : Marquage immunohistochimique des dystrophines sur des coupes de rétines avec l'utilisation de l'anticorps pan-spécifique Dys2. B : détection des différentes dystrophines par western blot et l'utilisation de l'anticorps Dys2 (Bordais, Bolanos-Jimenez et al. 2005). 49

Figure 18. 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. En absence de Dp71 (souris Dp71-null), le sous-complexe Utrophin-DAPs, l' α -Syn est associée uniquement à Kir4.1a. L' α -DB (α -dystrobrevine) 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)..... 51

Figure 19. Vascularisation postnatale de P0 à P12. A : vascularisation postnatale de la rétine (P6). B : 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 contrôle de P3 à P9. La plus forte différence entre la rétine de souris Dp71-null et la souris contrôle est observée à P6. A P12, les rétines deux groupes sont complètement recouvertes par le réseau vasculaire (Tadayoni et al, article en préparation)..... 54

Figure 20. Modèle d'hyperoxie-normoxie. Effet anti-angiogénique de l'absence de la 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 et al, article en préparation) 55

Article 2: Dystrophin Dp71 gene deletion induces retinal vascular inflammation and capillary degeneration

Figure 1. Increased VEGF expression in Dp71-null retina. Total protein and mRNA were extracted from retinas of individual mice. A, Gene expression level of VEGF in retina. VEGF mRNA levels were evaluated by quantitative real-time PCR (qPCR) methods and normalized to endogenous β -actin mRNA levels. B, VEGF protein levels were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and normalized to total protein. C, KDR mRNA levels were evaluated by quantitative real-time PCR and expressed relative to β -actin mRNA levels in WT and Dp71-null retinas. D, VEGFR-2 protein levels were measured by ELISA and normalized to total protein. Results are expressed as mean+ SE. Asterisk (*) indicates statistically significant difference, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ 105

Figure 2. ICAM-1 mRNA and protein levels are upregulated in Dp71-null mice. A, ICAM-1 mRNA levels were evaluated by quantitative real-time PCR methods and expressed relative to β -actin mRNA levels in the retina of WT mice (n=5) and Dp71-null (n=6) mice. B, ICAM-1 protein levels were measured by ELISA and normalized to total protein. Results are expressed as mean+ SE. The asterisk (*) indicates statistically significant difference, $p < 0.05$ 106

Figure 3. Exacerbated retinal leukostasis in Dp71-null mouse. A, Representative photographs of retinal vasculature and adherent leukocytes (arrows) labeled with FITC-conjugated Con A lectin (green) and an antibody against CD45 (red) to confirm that the adherent cells were leukocytes. Scale bar, 100 μ m. B, Quantitative analysis of leukocyte adhesion in retinal WT mice (n=5) and Dp71-null (n=6) mice. Leukocyte adhesion was assessed by measurement of the number of adherent leukocytes in whole retina. Results are expressed as mean+ SE. The asterisk (*) indicates statistically significant difference, $p < 0.05$ 107

Figure 4. Retinal capillary degeneration is markedly accentuated in Dp71-null mice. 108

Figure 5. Arachidonic acid metabolism. A, ALOX5AP mRNA levels analyzed by qPCR in retinas of WT and Dp71-null mice. B, PGE2 protein level was measured by ELISA and normalized to total protein for WT and Dp71-null mice. Each sample was measured in triplicate using 7 mice per group. Results are expressed as mean+ SE. The asterisk (*) indicates statistically significant difference, ** $p < 0.01$ 109

Figure 6. Bcl2 mRNA upregulation in Dp71-null mice. Bcl2 mRNA levels were evaluated by qPCR. Each sample was measured in triplicate using 10 mice per group. Results are expressed as mean+ SE. The asterisk (*) indicates statistically significant difference, $p < 0.05$ 110

Figure 7. AQP4 mRNA is upregulated in the retina of Dp71-null mice. A, AQP4 mRNA levels were evaluated by quantitative real-time PCR and expressed relative to β -actin mRNA levels in WT and Dp71-null mice retina. Each sample was measured in triplicate using 5 mice in each group. Results are expressed as mean+ SE. The asterisk (*) indicates statistically significant difference, ** $p < 0.01$ 111

Figure 8. Absence of GFAP upregulation in Müller glial cells and normal microglial morphology in Dp71-null mice. A, GFAP (green) expression is observed only in the ganglion cell layer and nerve fiber layers. Representative photographs of retinal sections prepared from WT and Dp71-null mice (n=5). Nuclei (Dapi, blue). ONL, outer nuclear layer; OPL, outer plexiform layer; INL, inner nuclear layer; IPL, inner plexiform layer; GCL, ganglion cell layer. Scale, 40 μ m. B, Representative confocal images from a retinal wholemount prepared from WT (n=5) and Dp71-null mice (n=5), showing in green the microglial morphology. Scale, 50 μ m. 112

Article 3: Caractérisation de l'inflammation rétinienne chez la souris mdx^{3Cv}

Figure 1. Expression de la protéine Dp71 rétinienne chez la souris littermates (WT) et mdx^{3Cv}. A, le niveau d'expression protéique rétinienne de Dp71 et de β -actine obtenu par Western blot chez la littermates et mdx^{3Cv}. Masses moléculaires approximatives sont données sur la gauche de chaque panneau dans kiloDaltons. B, l'expression de la Dp71 et de la β -actine à été quantifiées par analyse densitométrique des bandes en utilisant un logiciel Fiji (Fiji Is Just ImageJ). Le graphique montre le rapport Dp71/ β -actine. Les données sont exprimées en moyenne + erreur standard de la moyenne; $p < 0,05$; différences significatives par rapport aux contrôles..... 120

Figure 2. Expression du VEGF et de ses récepteurs chez la souris mdx^{3Cv} et WT littermate. A, les niveaux d'ARNm du VEGF ont été évalués par PCR en temps réel (qPCR) et normalisés par rapport à aux niveaux d'ARNm de la β -actine endogène. B, les taux de protéine VEGF ont été mesurés par dosage immuno-enzymatique (ELISA) et normalisés par rapport aux protéines totales. C, les niveaux d'ARNm de FLT-1 (VEGFR-1) ont été évalués par PCR en temps réel (qPCR) et normalisés par rapport aux niveaux d'ARNm de la β -actine endogène. D, les niveaux d'ARNm de KDR (VEGFR-2) ont été évalués par PCR en temps réel (qPCR) et normalisés par rapport aux niveaux d'ARNm de la β -actine endogène. Les données sont exprimées en moyenne + erreur standard de la moyenne; $p < 0,05$; différences significatives par rapport aux contrôles..... 121

Figure 3. Expression d'ICAM-1 chez la souris mdx^{3Cv} et littermates (WT). Les niveaux d'ARNm d'ICAM-1 ont été évalués par PCR en temps réel (qPCR) et normalisés par rapport aux niveaux d'ARNm de la β -actine endogène. Les données sont exprimées en moyenne + erreur standard de la moyenne; souris WT littermate n=6 ; souris mdx^{3Cv} n=5 $p < 0,05$; différences significatives par rapport aux contrôles..... 122

Figure 4. Métabolisme de l'acide arachidonique. Les niveaux d'ARNm d'AQP4 ont été évalués par PCR en temps réel (qPCR) et normalisés par rapport aux niveaux d'ARNm de la β -actine endogène. Les données sont exprimées en moyenne + erreur standard de la moyenne; souris littermate (WT) n=5 ; souris mdx^{3Cv} n=6 ; $p < 0,05$; différences significatives par rapport aux contrôles. 123

Figure 5. Expression d'AQP4 chez la souris mdx^{3Cv} et littermate. Les niveaux d'ARNm d'AQP4 ont été évalués par PCR en temps réel (qPCR) et normalisés par rapport aux niveaux d'ARNm de la β -

actine endogène. Les données sont exprimées en moyenne + erreur standard de la moyenne; n=5 ; p <0,05; différences significatives par rapport aux contrôles..... 124

Figure 6. Nombre de leucocytes adhérents au système vasculaire rétinien des souris mdx^{3Cv} et WT littermate. L'analyse quantitative de l'adhérence des leucocytes chez les souris WT rétine de souris (n = 9) mdx^{3Cv} (n = 8). L'adhésion des leucocytes a été évaluée par la mesure du nombre de leucocytes adhérents à l'endothélium vasculaire de la rétine entière. Les données sont exprimées en moyenne + erreur standard de la moyenne; p <0,05; différences significatives par rapport aux contrôles. 125

Figure 7. La perméabilité de la barrière hémato-rétinienne a été mesurée à l'aide du bleu d'Evans chez les souris WT littermates (n=8) et les souris mdx^{3Cv} (n=12). Les rétines de souris mdx^{3Cv} ne présentent pas d'augmentation de la perméabilité vasculaire par rapport aux souris littermates. Les données sont exprimées en moyenne + erreur standard de la moyenne; p <0,05; différences significatives par rapport aux contrôles. 126

Résumé

Dans la rétine, la protéine dystrophine Dp71 est principalement exprimée dans les cellules gliales de Müller et plus particulièrement dans la zone périvasculaire associée au canal potassique à rectification entrante (Kir4.1) et au canal aqueux aquaporine 4 (AQP4). Les cellules gliales de Müller (CGM) sont les principales cellules gliales de la rétine, qui s'étendent sur toute l'épaisseur de la rétine et contribuent à la formation et à la stabilisation de la barrière hémato-rétinienne (BHR), et à la régulation du flux sanguin rétinien. Les CGM sont aussi les principales sources de facteurs inflammatoires causant une inflammation des vaisseaux rétiens. L'inflammation vasculaire rétinienne est impliquée dans de nombreux troubles oculaires dont la rétinopathie diabétique, l'uvéite rétinienne et l'occlusion veineuse rétinienne en perturbant la BHR et en provoquant l'occlusion des capillaires. Ainsi, nous avons étudié les effets de l'absence de l'expression de la Dp71 sur l'homéostasie potassique et aqueuse, ainsi que sur l'expression de médiateurs de l'inflammation, l'adhésion des leucocytes et la perméabilité vasculaire rétinienne.

L'absence de la protéine Dp71 diminue l'expression de la protéine AQP4 et induit la redistribution de Kir4.1 tout le long de la membrane cellulaire des cellules CGM, alors qu'elle est initialement restreinte aux extrémités et autour des vaisseaux. Nous avons montré que l'absence de Dp71 conduit également à la diminution de l'expression du β -dystroglycane autour des vaisseaux rétiens. Par ailleurs, nous avons également constaté que le décollement expérimental de la rétine chez les souris WT induit une diminution de Dp71 associée à une délocalisation de Kir4.1, une régulation à la baisse de la protéine AQP4 et la surexpression de la GFAP dans les cellules gliales de Müller.

Nos données montrent clairement que l'absence de la Dp71 entraîne une augmentation de l'expression du VEGF et d'ICAM-1 rétinien chez la souris Dp71-null par rapport à la souris WT. Il existe également une augmentation du nombre de leucocytes adhérents rétiens qui pourrait être déterminant dans les dommages vasculaires ultérieurs observés chez ces souris. Nos travaux suggèrent également que le recrutement et l'accumulation des leucocytes pourraient être responsables de la dégénérescence accrue des capillaires observée chez les souris Dp71-null associée à une forte perméabilité de la BHR.

L'ensemble de nos résultats a mis en évidence le rôle important de la Dp71 dans les mécanismes visant à réguler l'homéostasie de la rétine; à maintenir l'intégrité du système vasculaire rétinien et à assurer la stabilisation de la BHR. Nous apportons la preuve que la perte de Dp71 favorise l'inflammation vasculaire rétinienne et la dégénérescence des capillaires associée à une perméabilité de la BHR. Ensemble, ces observations suggèrent que la souris Dp71-null serait un modèle approprié pour étudier les pathologies vasculaires rétiennes associées à la rupture de la BHR telles que la rétinopathie diabétique, l'uvéite rétinienne, l'occlusion veineuse rétinienne ou la DMLA.

Mots clés: inflammation vasculaire rétinienne, dystrophine Dp71, cellules gliales de Müller, perte des capillaires, leucocytes.

Abstract

In the retina, the Dp71 dystrophin protein is mainly expressed in Müller glial cells and specifically in perivascular localization associated with the inwardly rectifying potassium channel (Kir4.1) and the water channel protein aquaporin 4 (AQP4). Müller glial cells (MGC) are the major retinal glial cells, which extend over the entire thickness of the retina and contribute to the formation and stabilization of the blood-retinal barrier (BRB), and regulate retinal blood flow. Müller glial cells are also the main sources of inflammatory factors causing retinal vascular inflammation. Retinal vascular inflammation is involved in many blinding eye disorders including diabetic retinopathy, retinal uveitis and retinal vein occlusion by altering the BRB and occluding capillaries. Thus, in our thesis project we studied the effects of the absence of the Dp71 protein on potassium and water homeostasis, as well as the expression of inflammatory mediators, leukocyte adhesion and retinal vascular permeability.

The absence of the Dp71 protein decreased the expression of AQP4 protein and induces the redistribution of Kir4.1, initially restricted to the end-feet of MGC and around vessels, all along the cell membrane. We have shown that the absence of Dp71 leads also to the decrease of β -dystroglycan expression around retinal vessels. Moreover, we have also shown that the experimental retinal detachment in WT mice induces a reduction of Dp71 which is associated with Kir4.1 mislocation, a down regulation of AQP4 protein and overexpression of GFAP in MGC.

Our data clearly demonstrate that the absence of the Dp71 leads to increased retinal VEGF and ICAM-1 expression in Dp71-null mouse compared to WT mouse strain. There is also an increase of the number of retinal adherent leukocytes that could be determinant in subsequent vascular damages observed in these mice. Our work has revealed that leukocytes recruitment and accumulation might be responsible for the increased capillary degeneration observed in Dp71-null mice associated with high BRB permeability.

Our findings highlight Dp71 as an important component in the mechanisms leading to the regulation of retinal homeostasis; and to the maintaining of the integrity of retinal vasculature and the BRB stabilization. We provide evidence that deficiency of Dp71 promotes retinal vascular inflammation and significantly exacerbated degeneration of capillaries and BRB breakdown. Together these results suggest that the Dp71-null mouse could be a good model to study retinal vascular diseases associated with BRB breakdown such as diabetic retinopathy, retinal uveitis and retinal vein occlusion and AMD.

Key Words: Retinal vascular inflammation, Dystrophin Dp71, Müller glial cells, Capillaries lost, Leukocytes.