



HAL
open science

Rôle des caspases au cours de la photodégénérescence rétinienne

Tarek Houri

► **To cite this version:**

Tarek Houri. Rôle des caspases au cours de la photodégénérescence rétinienne. Médecine humaine et pathologie. Université d'Auvergne - Clermont-Ferrand I, 2012. Français. NNT : 2012CLF1PP04 . tel-01166427

HAL Id: tel-01166427

<https://theses.hal.science/tel-01166427>

Submitted on 22 Jun 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.



*ECOLE DOCTORALE
DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE*

N° d'ordre :

Thèse

Présentée à l'Université d'Auvergne
Pour l'obtention du grade de Docteur d'Université
Spécialités : Biophysique Sensorielle/Neurosciences

Soutenue le 10 Septembre 2012

Tarek HOURI

Rôle des Caspases au Cours de la Photodégénérescence Rétinienne

Président : Monsieur Le Professeur M. Doly

Membres : Monsieur Le Professeur J.M. Lobaccaro

Rapporteurs : Monsieur Le Professeur J.Y. Le Guennec
Monsieur Le Docteur L. Bretillon
Monsieur Le Professeur F. Dabboussi

**Laboratoire de Biophysique Neurosensorielle - UMR INSERM 1107
Faculté de Médecine et de Pharmacie
CLERMONT-FERRAND**

Je dédie ce travail

A mes chers parents

A mes sœurs et mon frère

A ma femme et sa famille

A la mémoire de mes Grands-pères et Grands-mères

A la révolution Syrienne

A toute ma famille

A mes amis en France, et au Liban.

Merci pour tout.

Cette thèse a été réalisée dans le laboratoire de **Biophysique Sensorielle - UMR INSERM 1107** de l'Université d'Auvergne, à Clermont-Ferrand.

Je voudrais exprimer toute ma reconnaissance à **Monsieur Le Professeur Michel Doly** pour m'avoir accueilli au sein de son équipe ainsi que pour la confiance qu'il m'a accordée tout au long de ce travail de thèse. Je le remercie aussi de m'avoir donné confiance à travers sa modestie scientifique et ses qualités humaines.

Je remercie tout particulièrement **Madame le Docteur Isabelle Ranchon-Cole** pour son encadrement scientifique et son aide précieuse dans les expériences et la rédaction du texte. Merci d'avoir été disponible et de m'avoir soutenu tout au long de mes travaux. Je te souhaite une bonne continuation dans ton travail et tes études.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude et remerciement pour les membres du Jury d'avoir accepté de juger ma thèse, et plus particulièrement **Mr. Le Professeur Jean Yves Le Guennec** et **Mr. Le Docteur Lionel Breillon** d'avoir eu la gentillesse de se déplacer depuis Montpellier et Dijon. Les plus vifs remerciements aussi à **Mr. Le Professeur Fouad Dabboussi** qui a accepté de venir depuis le Liban pour participer au Jury de ma thèse.

Un énorme remerciement chaleureux à **Mr. Le Professeur Jean Marc Lobacarro** qui a accepté d'être parmi les membres du jury.

Je remercie également **Mr. Le Professeur Paul Avan** pour son soutien et son temps qui m'a donné pour nos discussions scientifiques.

J'exprime mes profondes gratitude à l'ensemble de l'équipe et plus particulièrement : **Sylviane, David, Jacques, Nathalie, Christine, Khawla.**

Sommaire

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX.....	1
ABREVIATIONS.....	3
INTRODUCTION.....	6
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....	8
PARTIE 1 : APOPTOSE.....	8
A. Apoptose.....	8
1) Terminologie.....	8
2) Aspects morphologiques.....	9
3) Fonctions physiologiques de l'apoptose.....	10
4) Mécanismes de l'apoptose.....	11
a) Les différentes voies.....	12
i. Voie extrinsèque.....	12
ii. Voie intrinsèque mitochondriale.....	13
iii. Voie intrinsèque du réticulum endoplasmique.....	15
b) Modulateurs de l'apoptose.....	15
i. Bcl2.....	15
ii. Apaf-1.....	18
iii. Cyt c.....	19
iv. Sphingolipides.....	19
v. IAPS.....	20
5) L'élimination des cellules apoptotiques.....	20
a. Généralités.....	20
b. Signaux de reconnaissance.....	21
PARTIE 2 : CASPASES.....	22
B. Les caspases.....	22
a. Nomenclature.....	23
b. Classification.....	23
c. Structure.....	23
d. Substrats.....	26
e. Rôles des caspases.....	26
- Dans l'apoptose.....	26
- Dans d'autres processus.....	29
f. Régulation des caspases.....	31
i. IAPs.....	32
ii. FLIP.....	32
iii. La phosphorylation.....	32
iv. Les calpaïnes.....	33

v. CrmA.....	33
vi. P35 et p49.....	33
g. Apoptose caspase indépendante.....	34

PARTIE 3 : LA RETINE ET SES AFFECTIONS.....35

A. Généralités.....	35
B. Description générale de l'œil.....	35
C. La rétine.....	36
1. Organisation de la rétine.....	37
a. Couches externes.....	38
b. Couches internes.....	39
2. Photorécepteurs.....	39
3. Renouvellement des disques.....	41
4. Les photopigments.....	42
5. La phototransduction.....	44
i. Activation par la lumière.....	45
α. Activation de la rhodopsine.....	45
β. Interaction rhodopsine transducine.....	46
γ. Interaction transducine-phosphodiesterase.....	46
δ. Interaction GMPc-canal.....	47
ii. Amplification du signal.....	47
iii. Désactivation de la cascade.....	47
α. Inactivation de la rhodopsine.....	47
β. Inactivation de la transducine.....	49
γ. Inactivation de la phosphodiesterase.....	50
δ. Réouverture des canaux GMPc-dépendants.....	50
iv. Régénération du photopigment.....	51
D. Dégénérescence rétinienne.....	52
1. Les principales formes.....	52
a. Le décollement rétinien.....	52
b. Les rétinopathies pigmentaires.....	54
i. Les rétinopathies pigmentaires syndromiques.....	54
ii. Les rétinopathies pigmentaires non syndromiques.....	55
c. La dégénérescence maculaire liée à l'âge.....	57
i. Les différentes formes.....	57
ii. Facteurs génétiques.....	58
d. La rétinopathie diabétique.....	59
2. Apoptose et dégénérescence rétinienne.....	60
E. Modèle de photodégénérescence rétinienne.....	61
a. Mécanismes dégénératifs.....	62
b. Mécanismes moléculaires.....	64

APPROCHE EXPERIMENTALE.....67

I. Rat de laboratoire.....	67
A. Définition.....	67

B. Historique.....	67
C. Modèle de photodégénérescence.....	68
II. Anesthésie.....	68
III. Traitements.....	68
A. Inhibiteurs synthétiques des caspases.....	68
B. Préparation des inhibiteurs des caspases.....	69
C. Injection intravitréenne.....	69
IV. Electrophysiologie.....	70
A. Principe.....	70
1. L'onde a.....	71
2. L'onde b.....	72
3. L'onde c.....	72
4. Autres ondes.....	72
B. Matériels.....	73
1. Stimulation lumineuse.....	73
2. Recueil du signal.....	73
C. Protocole des expérimentations.....	74
1. Préparation de l'animal.....	74
2. Stimulation et enregistrement.....	74
D. Exploitation des ERGs.....	75
V. Histologie.....	76
A. Prélèvement des yeux et fixation.....	76
B. Inclusion en paraffine.....	77
C. Coupes.....	77
D. Coloration.....	77
E. Observation.....	78
VI. Biochimie.....	79
A. Prélèvement des rétines.....	79
B. Préparation des échantillons.....	79
C. Dosage protéique.....	79
D. Mesure de l'activité.....	79
E. Mesure de l'activité des caspases.....	80
VII. Statistiques.....	80

RESULTATS.....81

I. Injections intravitréenne de DMSO et fonction rétinienne.....	81
II. Injection intravitréenne d'inhibiteur de Caspase.....	81
1. La caspase-8.....	82
a. Cinétique d'activation des Caspase.....	82
b. Efficacité de l'inhibiteur de la caspase-8 (0,2 mM).....	82
2. La caspase-9.....	83
a. Inhibiteur de la caspase-9 (0,4 mM).....	83
b. Histologie.....	84
3. La caspase-12.....	85
a. Effet de l'inhibiteur de caspase-12 (0,4 et 0,8 mM).....	85
b. Histologie.....	87
c. Activité de la caspase-12 dans la rétine.....	88

DISCUSSIONS GENERALE, CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....89

REFERENCES.....95

Liste des Figures & Tableaux

Liste des figures

1) Figures de l'étude bibliographique

Figure 1 : Apoptose versus Nécrose.

Figure 2 : *Caenorhabditis elegans*.

Figure 3 : Représentation schématique de la composition du DISC.

Figure 4 : Représentation schématique des voies d'induction de l'apoptose.

Figure 5 : Formation de l'apoptosome.

Figure 6 : Membres de la famille BCL-2.

Figure 7 : L'apoptose, un mécanisme très conservé.

Figure 8 : Représentation schématique de l'activation des caspases.

Figure 9 : Classification des caspases.

Figure 10 : Planche anatomique de l'œil humain et de l'œil d'un rat.

Figure 11 : Coupe histologique de la rétine colorée en Hématéine Eosine Safran.

Figure 12 : Coupe de la rétine.

Figure 13 : Bâtonnet & Cône.

Figure 14 : Mécanisme de renouvellement des segments externe des photorécepteurs.

Figure 15 : La Rhodopsine et la Transducine.

Figure 16 : Mécanismes de la phototransduction.

Figure 17 : Représentation des étapes moléculaire dans la photoactivation.

Figure 18 : Fermeture des canaux GMPC-dépendants.

Figure 19 : Inactivation de la rhodopsine.

Figure 20 : Inactivation de la transducine.

Figure 21 : Inactivation de la phosphodiesterase.

Figure 22 : Réouverture des canaux ioniques suite à l'activation de la Guanylate cyclase.

Figure 23 : Décollement de la rétine.

Figure 24 : Signes cliniques de la rétinite pigmentaire.

Figure 25 : Différentes formes de DMLA.

Figure 26 : Le rat de laboratoire albinos.

Figure 27 : Injection intravitréenne.

Figure 28 : Réponse électrique de la rétine à une stimulation lumineuse brève.

Figure 29 : Chaîne d'acquisition des ERG et schéma de la sphère intégrante.

Figure 30 : Courbe de sensibilité rétinienne chez le rat albinos Wistar.

Figure 31 : B_{max} , K et n .

Figure 32 : Œil d'un rat après coloration.

Figure 33 : Coupe histologique de la rétine après coloration.

2) Figures des résultats

Figure 1 : Injections de la DMSO à 4 et 10%.

Figure 2 : Cinétique d'activité de la caspase-8 sans injection d'inhibiteur.

Figure 3 : Cinétique d'activité de la caspase-8 avec injection de DMSO et Z-IETD-fmk.

Figure 4 : Injection avec Z-LEHD-fmk à 0,4 mM.

Figure 5 : Histologie à D15, Z-LEHD-fmk à 0,4 mM.

Figure 6 : Injection Z-ATAD-fmk à 0,4 mM, non exposés.

Figure 7 : Injection avec Z-ATAD-fmk à 0.4 mM, exposés à 2700 lux.

Figure 8 : Injection avec Z-ATAD-fmk à 0.4 mM, exposés à 3400 lux.

Figure 9 : Injection avec Z-ATAD-fmk à 0.8 mM, exposés à 3400 lux.

Figure 10 : Couche nucléaire externe à D15, Z-ATAD-fmk à 0,4 mM.

Figure 11 : Couche nucléaire externe à D15, Z-ATAD-fmk à 0.8 mM.

Figure 12 : Etude cinétique de l'activité de la caspase-12, Z-ATAD- injecté à 0,4 mM.

Liste des tableaux

Tableau 1 : Caractéristiques morphologiques et biochimiques de l'apoptose et de la nécrose.

Tableau 2 : Localisation subcellulaire de différents membres de la famille BCL-2.

Tableau 3: Caspases de mammifères.

Tableau 4 : Spécificité des substrats des caspases.

Tableau 5 : Invalidation des gènes codant pour les caspases.

Tableau 6 : Les différentes fonctions des caspases indépendantes de l'apoptose.

Abréviations

A1: BCL2-related protein
ABCR: ATP-Binding Cassette transporter, Retina-specific
ABCA4: ATP-Binding Cassette A4
ACAMPS: Apoptotic cell-associated molecular patterns
ADN : Acide DésoxyriboNucléique
AIF : Apoptosis Inducing Factor
AMC : Amino-Méthyl-Coumarine
ANAES : Agence Nationale d'Accréditation et d'Evaluation en Santé
AP1: Activating Protein 1
Apaf-1 : Apoptotic Protease Activating Factor 1
ApoE : Apolipoprotéine E
Apo3L: Apolipoprotéine 3L
ARN : Acide Ribonucléique
ATP : Adénosine TriPhosphate
Bad: BCL-2 Antagonist of cell Death
Bak: Bcl-2-Antagonist/Killer
Bid: BH3-Interacting-domain Death agonist
Bax: BCL-2-Associated X Protein
Bcl-2 : B-cell lymphoma 2
Bcl-xl: BCL-2 related Protein, Long Isoform
Bcl-xs: BCL-2 related Protein, Short Isoform
Bcl w: BCL-2 like 2 Protein
BH : Bcl-2 Homolgy Domain
Bik: BCL62 Interacting Killer
Bim: BCL-2-interacting mediator of cell death
BIR : Baculovirus IAP repeat
Bmf: Bcl-2 modifying factor
Bod: BCL-2 homologue of Ovary
Bok: Bcl-2-related ovarian killer protein
C. Elegans: Caenorhabditis elegans
CAD/ICAD : Caspase Activated DNase / Inhibitor of Caspase Activated DNase
Calpaine : CALcium dependent cystein proteases
CANP : Calcium Activated Neutral Proteases
CARD : Caspase Activation Recruitment Domain
Caspase : Cystéinyl ASpartic specific proteASE
CED : Caenorhabditis Elegans Death
CNE : Couche Nucléaire Externe
CRALB : Cellular RetinALdehyde Binding protein
CRBP : Cellular Retinol Binding Protein
Crma: Cytokine response modifier A
DAB : DiAmino-3,3'Benzydine tétrachlorhydrate
DD : Death Domain
DEAE : DiEthylAminoEthyl
DED : Death Effector Domain
DG : DiacylGlycérole
DHA : Acide DocosaHéxAnoïque
DISC : Death Inducing Signaling Complex
DMLA / ARMD : Dégénérescence Maculaire Liée à l'Age / Age Related Macular Disease
DMSO : DiMethyl SulfOxide
DO : Densité Optique
DR : Death Receptor

DTT : Dithiotreitol
 $\Delta\psi_m$: Potentiel transmembranaire mitochondrial
EDTA : Acide Ethylene-Diamine-Tetra-Acetic
EndoG : Endonucléase G
EORS / ROS : Espèces Réactives Oxygénés / Reactive Oxygen Species
EPR : Epithélium Pigmentaire Rétinien
ERG : ElectroRetinoGramme
FADD : Fas Associated Death Domain
FasL : Fas Ligand
FLICE: FADD-like interleukin-1 β -converting enzyme
FLIP : FLICE Inhibitory Protein
FMK : FluoroMethylKetone
Gas : Growth Arrest Specific Protein
GCAP : Guanylate Cyclase Activating Protein
GDP : Guanosine DiPhosphate
GMP : Guanosine MonoPhosphate
GTP : Guanosine TriPhosphate
HtrA2/Omi: High temperature requirement A2/ Omi stress-regulated endoprotéase
IAP : Inhibitor of Apoptosis Protein
ICE : Interleukin-1 β -Converting Enzyme
IL-2 : InterLeukine-2
INF- γ : Interferon- γ
IP2 : Inositol bisPhosphate
IP3: Inositol trisPhosphate
IRBP : Interstitial Retinoid-Binding Protein
LRAT : Lecithin Retinol AcylTransférase
MI : Métarhodopsine I
MII : Métarhodopsine II
MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase
MLS : Mitochondrial Localization Signal
MPC : Mort Cellulaire Programmée
NF κ B : Nuclear Factor κ B
NGF : Nerve Growth Factor
NO : Oxyde Nitrique
NOS : NOSynthase
OHdG : hydroxydeoxyguanosine
P27 : Jour Postnatal 27
PAMPS : Pathogen-associated molecular patterns
PBS : Phosphate Buffer Saline
PCI : Phénol/Chloroforme/Alcool Isoamylique
PDE : PhosphoDiEstérase
PIP2 : Phospho-Inositol diPhosphate
PK : Proteine Kinase
pNa : p-NitroAlanine
PP2A: Protéien Phosphatase 2A
PS : PhosphatidylSerine
PTP : Pore de Transition de Perméabilité
Puma : p53 upregulated modulator of apoptosis
rd : Souris retinal degeneration
rds : Souris retinal degeneration slow
RD : rétinopathies diabétiques

RBP : Retinol Binding Protein
RCS : rat Royal College of Surgeons
RE : Réticulum Endoplasmique
Rho : Rhodopsine
RhK : Rhodopsine Kinase
RP : Rétinopathies Pigmentaires
RPAD : Rétinopathie Pigmentaire Autosomique Dominante
RPAR : Rétinopathie Pigmentaire Autosomique Récessive
ROS / EORS : Reactive Oxygen Species / Espèces Réactives Oxygénés
S1P : Sphingosine 1-phosphate
SE : Segment Externe
SH : Groupement "SulFhydryl"
SIMP : Soluble Intramembrane Mitochondrial Proteins
Smac/Diablo : Second Mitochondria-derived Activator of Caspase/Direct IAP-Binding protein with LOw Pi
SOD : SuperOxyde Dismutase
TBS : Tris Buffered Saline
TdT : Terminal deoxynucleotidyl Transférase
TM : Domaine TransMembraire
TNF : Tumor Necrosis Factor
TRADD : TNFR-Associated Death Domain
TRAIL : TNF-related-apoptosis-inducing-ligand
TRAF : TNF Receptor-Associated Factor
TTBS : Tween Tris Buffered Saline
TTR : TransThyRétine
TUNEL : Terminal deoxynucleotidyl Transferase Biotin-dUTP Nick End Labeling
Ub : Ubiquitine
UV : Ultra-Violet
VDAC : Voltage Dependent Anion-Chanel
VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor
Z- : benzyloxycarbonyl
Z-ATAD- FMK: z-alanine-thréonine-alanine-aspartate-O-methyl-FMK
Z-IETD- FMK: z-isoleucine-glutamate-thréonine-aspartate-O-methyl-FMK
Z-LEHD- FMK: z-leucine-glutamate-histidine-aspartate-O-methyl-FMK

Introduction

La notion d'apoptose a été introduite en 1972 par Kerr et coll. pour désigner une forme de mort cellulaire totalement différente de la nécrose, tant d'un point de vue morphologique que biochimique. L'apoptose est une forme active de mort cellulaire, qui constitue une réponse de l'organisme à des stimuli physiologiques ou pathologiques. Dans des conditions physiologiques normales, l'apoptose est en équilibre avec la prolifération cellulaire. C'est l'altération de la signalisation et/ou de la régulation de l'apoptose qui est pathologique. Ainsi, un excès d'apoptose peut aboutir à une maladie dégénérative, alors qu'un taux d'apoptose insuffisant peut être impliqué dans les phénomènes de cancérogenèse.

Les maladies neurodégénératives de la rétine telle que les rétinites pigmentaires ou les dégénérescences maculaires liées à l'âge (DMLA) sont caractérisées par une disparition progressive des cellules photoréceptrices (bâtonnets et cônes). La perte de ces neurones spécifiques entraîne de graves perturbations visuelles pouvant à terme aboutir à la cécité. L'étude post mortem de rétine des patients atteints de DMLA, de rétinites pigmentaires, de rétinopathies diabétiques et l'étude de modèles animaux ont permis de mettre en évidence que les photorécepteurs meurent par apoptose.

Il est très difficile d'étudier l'apoptose des cellules photoréceptrices chez l'homme. Aussi, au cours de notre thèse, nous avons utilisé un modèle expérimental de dégénérescence rétinienne. Ce modèle consiste à induire l'apoptose des photorécepteurs par la lumière (modèle de photodégénérescence). L'apoptose est un phénomène séquentiel, organisé temporellement, au cours duquel la cellule exprime un ensemble de gènes entraînant des modifications morphologiques, biochimiques et structurales aboutissant à sa destruction. Alors que ces modifications sont maintenant bien connues, les mécanismes moléculaires dont elles découlent, doivent encore être éclaircis. C'est pourquoi, nous nous sommes intéressés aux voies de signalisation intracellulaires conduisant à la mort des cellules rétiniennes par apoptose, et notre attention s'est portée tout particulièrement sur un groupe de protéases à cystéines, les caspases.

En effet, l'intérêt porté aux caspases a considérablement augmenté depuis les années 1990 où elles sont devenues de potentielles cibles thérapeutiques en raison de leur rôle dans les processus apoptotiques. Les caspases sont présentes dans le cytoplasme sous forme inactive: les procaspases. Ces procaspases vont ensuite être clivées et dimérisées pour former les caspases actives. Une caspase active est capable d'activer les autres caspases.

Au laboratoire, il avait été mis en évidence que la caspase-3 joue un rôle essentiel dans l'apoptose des cellules photoréceptrices induite par la lumière (Perche et al., 2007). Dans la continuité de ces résultats, le but de nos travaux de thèse était d'identifier les molécules

impliquées en amont de la caspase 3. En effet, Cette caspase est une caspase effectrice qui se trouve en bas de la cascade d'activation des caspases. La caspase-3 effectrice est activée par d'autres caspases initiatrices, les caspases -8, 9 et/ou 12, amenant à la mort les cellules photoréceptrices.

Notre stratégie est basée sur l'hypothèse que si une molécule joue un rôle (neuroprotecteur ou dégénératif) dans l'apoptose rétinienne, alors inhiber son action devrait protéger la rétine ou alors aggraver la dégénérescence. Nous avons donc évalué l'effet de l'inhibition des caspases 8, 9 et 12 sur l'apoptose rétinienne induite par la lumière. Les animaux reçoivent une injection intravitréenne d'un inhibiteur spécifique de la caspase 8, de la caspase 9, ou de la caspase 12 avant d'être exposés à la lumière. Les lésions rétiniennes sont quantifiées par deux techniques complémentaires, l'électrorétinographie in-vivo permettant d'évaluer la fonction rétinienne, et l'histologie pour l'analyse de la structure de la rétine. À ces techniques sont associées des techniques classiques de biologie moléculaire. En parallèle, nous avons mesuré l'activité de ces caspases au cours du processus dégénératif.

Etude Bibliographique

Partie 1 : Apoptose

L'apoptose est l'appel de la mort dans une cellule, suite à un signal physiologique ou pathologique. C'est un processus actif utilisé pour éliminer les cellules en excès, endommagées ou infectées, potentiellement dangereuses pour l'organisme. Ce programme de mort est intrinsèque à la cellule elle-même. L'apoptose joue un rôle essentiel dans le développement normal de l'organisme et dans le maintien de l'homéostasie cellulaire chez l'adulte, de façon opposée à la mitose.

A) Apoptose

1) Terminologie

La notion d'apoptose a été introduite en 1972 par Kerr et ses collègues pour désigner une forme morphologiquement distincte de mort cellulaire, totalement différente de la nécrose (Figure 1), bien plus douce et qui ne produit pas d'inflammation (Kerr, 2002 ; Kerr et al., 1972).

L'apoptose est un processus actif et vital, par lequel les cellules indésirables ou inutiles prennent part à leur propre destruction. On parle également de « suicide cellulaire ». Cette mort physiologique, génétiquement programmée, est nécessaire à la survie des organismes pluricellulaires (Wyllie et al., 1980). L'apoptose a d'abord été observée durant la métamorphose des amphibiens, puis dans plusieurs tissus en développement tant chez les invertébrés que chez les vertébrés. Il joue un rôle primordial dans les mécanismes de défense tels que ceux mis en œuvre dans les réactions immunes ou quand les cellules sont endommagées par des agents nocifs (Elmore, 2007; Norbury et Hickson, 2001).

La compréhension des mécanismes impliqués dans le processus d'apoptose dans les cellules de mammifères résulte de l'étude de la mort cellulaire programmée qui a lieu au cours du développement du nématode *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) (Figure 2) (Horvitz, 1999). L'apoptose a depuis été reconnue et acceptée comme un mode distinct et majeur de mort cellulaire "programmée", génétiquement déterminée. C'est un phénomène conservé à travers les espèces et retrouvé dans tous les organismes multicellulaires (Steller, 1995 ; Cicala et al., 1999). Cependant, il est important de noter que d'autres formes de mort cellulaire programmée ont été décrites et que d'autres sont peut être à découvrir (Formigli et al., 2000 ; Sperandio et al., 2000 ; Debnath et al., 2005).

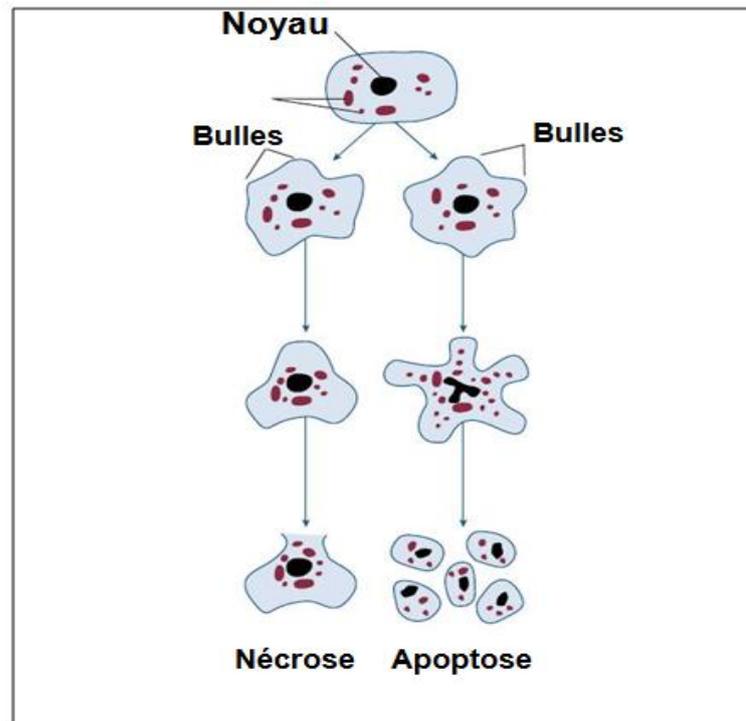


Figure 1: Apoptose versus Nécrose. Source: Goodlett, C.R., et Horn, K.H. Mechanisms of alcohol-induced damage to the developing nervous system. *Alcohol Research & Health* 25(3):175–184, 2001.

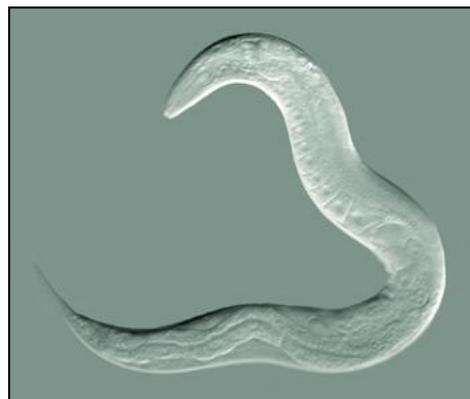


Figure 2: *Caenorhabditis elegans*. Bob Goldstein, UNC Chapel Hill <http://www.bio.unc.edu/Faculty/Goldstein/lab>.

2) Aspects morphologiques

Les cellules mourantes par apoptose montrent des caractéristiques morphologiques communes, et distinctes de celles observées dans les cellules mourantes par nécrose (Tableau 1). Les cellules en apoptose s'isolent des autres cellules. Ensuite, le noyau et le cytoplasme vont subir une importante condensation amenant à une diminution significative du volume

cellulaire (Ziegler et Groscurth, 2004). La membrane plasmique va ensuite bourgeonner et conduire à la formation de corps apoptotiques renfermant une partie du cytoplasme de la cellule. Ces corps apoptotiques seront enfin phagocytés par les cellules environnantes qui les reconnaîtront grâce à un changement de localisation des molécules membranaires. Les phosphatidylsérines passent d'une orientation cytoplasmique vers une orientation extracellulaire. L'intégrité de la membrane plasmique pendant l'apoptose n'est jamais altérée, c'est une des caractéristiques majeures qui permet d'éviter tout déversement du contenu cellulaire qui pourrait endommager les cellules environnantes (Ziegler et Groscurth, 2004).

Apoptose	Nécrose
Une cellule ou un petit groupe de cellules	Souvent des cellules contiguës
Rétrécissement des cellules	Gonflement des cellules
Condensation de la chromatine et fragmentation du noyau dans les corps apoptotiques.	Lyse du noyau, condensation de la chromatine
Membrane cellulaire intacte	Membrane cellulaire rompue
Cytoplasme retenu dans les corps apoptotiques	Cytoplasme libéré
Pas de réaction inflammatoire	Inflammation souvent présente
Processus contrôlé	Processus incontrôlé
Dépendant de l'énergie	Indépendant de l'énergie

Tableau 1: Caractéristiques morphologiques et biochimiques de l'apoptose et de la nécrose. D'après Susan Elmore, Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death, Toxicol Pathol. 2007; 35(4): 495–516.

3) Fonctions physiologiques de l'apoptose

L'apoptose est primordiale comme celui de sa contrepartie physiologique, la mitose. Il est évalué que pour maintenir l'homéostasie dans le corps humain adulte, environ 10 milliards de cellules sont produites chaque jour juste pour équilibrer celles mourant par apoptose (Renehan et al., 2001). Cette quantité peut s'accroître significativement quand le nombre de cellules apoptotiques augmente pendant le développement normal ou le vieillissement et la maladie. Les phénomènes apoptotiques sont particulièrement importants lors des divers processus liés au développement. L'apoptose participe notamment à la morphogenèse des doigts : les cellules de l'espace interdigital d'un embryon disparaissent par apoptose.

La mise en place des systèmes nerveux et immunitaire fait également appel à l'apoptose, où elle assure un nombre correct de différenciation de cellules souches. Pendant le développement embryonnaire, les neurones sont générés en excès. 20 à 80% de ces cellules

vont ensuite mourir par apoptose afin de créer un équilibre entre les neurones et les cibles qu'ils innervent. En effet, les cellules nerveuses embryonnaires ont besoin pour survivre du facteur de survie NGF (Nerve Growth Factor), produit par les cellules cibles des neurones (Clarke et al., 1998). Seuls vont survivre les neurones qui se connecteront correctement à leur cible. Les autres cellules, incapables de recevoir ce signal, vont mourir par apoptose (Nijhawani et al., 2000). De même, pour le développement du système immunitaire, seuls les lymphocytes portant des récepteurs aux antigènes spécifiques vont survivre et le reste sera éliminé par apoptose. En effet, autant le système nerveux que le système immunitaire sont caractérisés dans leur développement initial par la surproduction de cellules. Cet excès initial est ensuite suivi par la mort des cellules qui ont échoué à, respectivement, établir des connexions synaptiques fonctionnelles ou produire des antigènes spécifiques (Opferman et Korsmeyer, 2003). A la fin de la réaction immunitaire, les lymphocytes T activés en surnombre meurent par apoptose, de même que les cellules immunitaires activées ou auto-agressives lors de leur maturation dans les organes lymphoïdes centraux (la moelle osseuse et le thymus) ou dans les tissus périphériques (Osborne, 1996). De même, l'apoptose est un phénomène central lors de l'atrésie des follicules ovariens et dans l'involution de la glande mammaire lors de la phase de sevrage, par exemple (Tilly et al., 1991; Lund et al., 1996).

Le stress oxydatif joue un rôle primordial dans la physiopathologie de l'apoptose induit par l'âge, via l'accumulation de radicaux libres qui altèrent l'ADN mitochondrial (Harman, 1992 ; Ozawa, 1995). Il est clair que l'apoptose doit être fermement régulée car trop peu ou trop de mort cellulaire peut aboutir à des phénomènes pathologiques, comme des défauts de développement, des maladies auto-immunes, neurodégénératives, ou des cancers.

4) Mécanismes de l'apoptose

Le phénomène apoptotique peut être divisé en plusieurs phases : la phase d'induction conduisant à l'apparition de l'apoptose, la phase effectrice qui est caractérisée par la transduction du message avec l'activation des molécules effectrices, et enfin la phase d'exécution qui coordonne et exécute le signal de mort cellulaire.

Des grands progrès ont été faits, ces dernières années, pour la compréhension des mécanismes élémentaires de l'apoptose ainsi que des acteurs moléculaires impliqués. Ainsi, il a été mis en évidence trois voies majeures d'induction de l'apoptose dans la cellule, une voie extrinsèque et deux voies intrinsèques : la voie extrinsèque est la voie des récepteurs à

«domaine de mort» située dans la membrane plasmique, et les voies intrinsèques sont la voie mitochondriale et la voie du réticulum endoplasmique (ER).

a) Les différentes voies

i) La voie extrinsèque ou voie des récepteurs à domaine de mort est déclenchée par la liaison d'un ligand sur son récepteur. Ce récepteur est un membre de la famille du récepteur TNF (Tumour necrosis factor) (Ashkenazi et Dixit, 1998). Ces récepteurs de mort détectent les signaux extracellulaires lorsque l'environnement n'est pas favorable. Ainsi si les récepteurs fixent leur ligand, ils initient une cascade de transduction aboutissant à la mort de la cellule. Les récepteurs de mort les mieux caractérisés sont Fas (ou CD95) activé par son ligand FasL, le récepteur TNF-R1 qui lie le TNF- α , les récepteurs TRAIL-R1 et TRAIL-R2 dont le ligand est TRAIL (Figure 3) et DR3 dont le ligand est Apo3L (Chicheportiche et al., 1997 ; Ashkenazi et Dixit, 1998 ; Peter et Krammer, 1998 ; Rubio-Moscardo et al., 2005 ; Suliman et al., 2001).

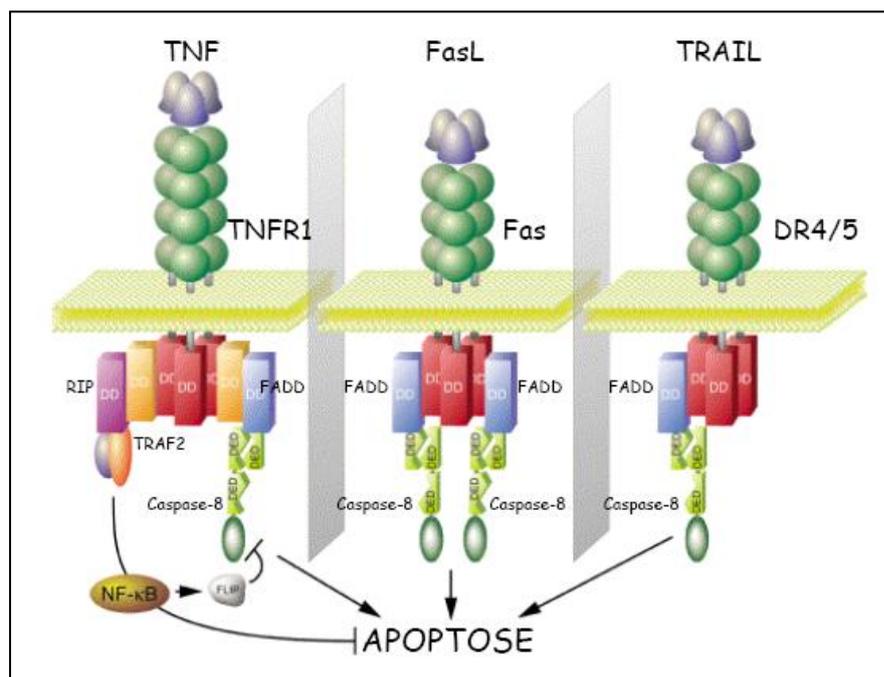


Figure 3: Représentation schématique des récepteurs de mort (Tiré de Danial et Korsmeyer, 2004).

ii) La voie intrinsèque mitochondriale est activée par des stress, tels que des dommages de l'ADN, une infection virale, une privation de facteurs de croissance ou la présence d'agents génotoxiques (irradiations UV, traitements, surcharge calcique). Tous ces

stimuli conduisent à la perméabilisation de la membrane mitochondriale interne qui induit une chute du potentiel transmembranaire mitochondrial ($\Delta\Psi_m$) favorisant la libération dans le cytosol, par les pores de transition de perméabilité (PTP) des protéines proapoptotiques normalement localisées dans l'espace intermembranaire (Figure 4) (Saelens et al., 2004).

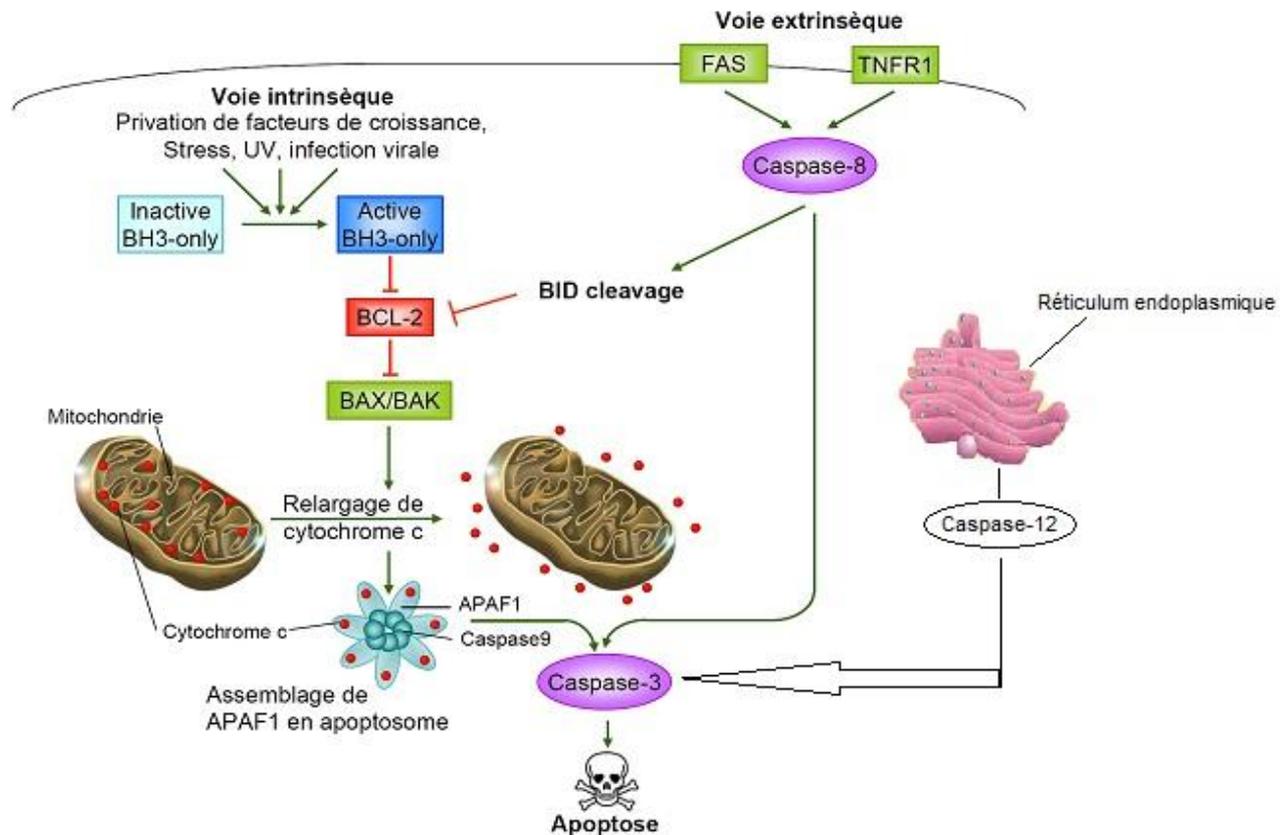


Figure 4: Représentation schématique des voies d'induction de l'apoptose. L'apoptose peut être induite par des récepteurs présents à la surface cellulaire (voie extrinsèque) ou par un ensemble de stimuli génotoxiques, de stress métaboliques ou d'alertes intra-cellulaires (voie intrinsèque). Les deux voies aboutissent à l'activation de caspases effectrices et au démantèlement de la cellule. Modifier d'après (Youle et Strasser, 2008).

Ces protéines peuvent être classées en 2 groupes, le premier groupe de ces molécules pro-apoptotiques comporte le cytochrome c, Smac/DIABLO (second mitochondria-derived activator of caspases), Apaf-1 (Apoptotic peptidase activating factor 1), et la sérine protéase HtrA2/Omi (Cai et al., 1998 ; Du et al., 2000 ; van Loo et al., 2002 ; Garrido et al., 2006). Le cytochrome c et Apaf-1 en présence d'ATP s'oligomérisent pour former un très grand complexe appelé « apoptosome » (700-1400 kDa). Ce complexe recrute la pro-caspase-9 par interactions entre les domaines CARD (domaine de recrutement des caspases) et l'active (Jiang et Wang, 2000 ; Costantini et al., 2002) (Figure 5). Smac/DIABLO et HtrA2/Omi ont

été décrits comme favorisant l'apoptose en inhibant l'activité des iAPs (Inhibitor of Apoptosis Proteins) (Schimmer, 2004).

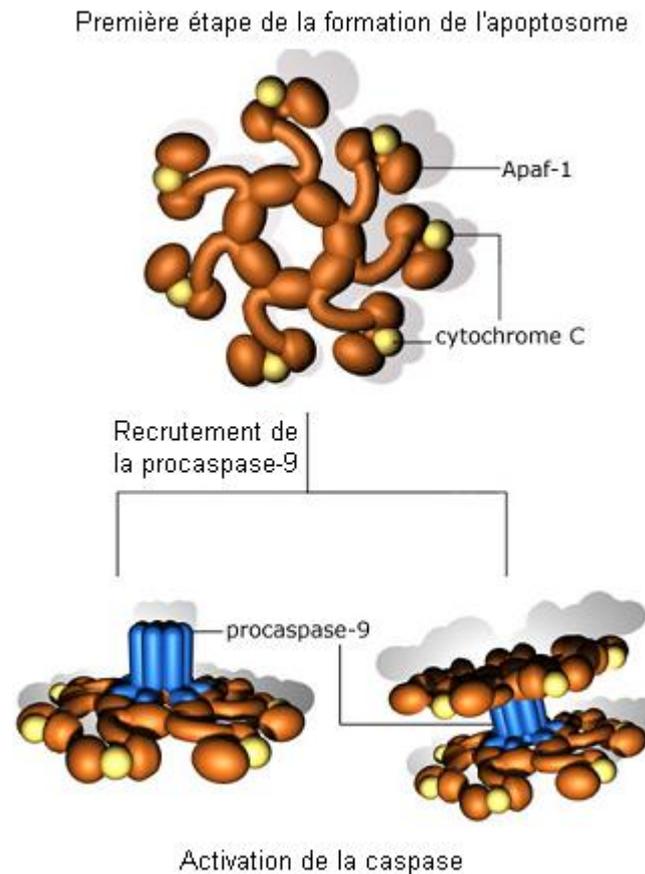


Figure 5: Formation de l'apoptosome. Phil Dash, Basic Medical Sciences, St.George's, University of London.

Le second groupe de protéines pro-apoptotiques comprend le facteur induisant l'apoptose, AIF (Apoptosis Inducing Factor) et l'endonucléase G qui sont libérés par la mitochondrie dans le cytoplasme. La libération de ces protéines est un évènement apoptotique tardif qui n'intervient qu'une fois la cellule engagée dans le processus de mort cellulaire. La perméabilisation des membranes mitochondriales est généralement considérée comme le point de non-retour dans le processus apoptotique.

Les événements apoptotiques mitochondriaux sont sous le contrôle et la régulation des membres de la famille des protéines Bcl-2 (B-cell lymphoma-2) (Cory et Adams, 2002).

iii) La voie intrinsèque du réticulum endoplasmique (RE) passe par l'activation de la caspase-12 qui abouti à l'activation de la caspase-3. Le RE régule la synthèse et le repliement des protéines et a un rôle dans le maintien de l'homéostasie calcique. Il est essentiel à la survie de la cellule et toute perturbation de sa fonction induit l'apoptose. Les facteurs capables de perturber son fonctionnement sont rassemblés sous le terme « ER stress » (Endoplasmic Reticulum stress). Ces stress incluent l'inhibition de la glycosylation des protéines, la modification de l'homéostasie calcique, le blocage du transport des protéines à l'appareil de Golgi ou l'accumulation de protéines mal repliées ou dénaturées. Un stress prolongé du réticulum endoplasmique semble lié à la pathogenèse de certaines maladies neurodégénératives (Martin, 1999 ; Sherman et Goldberg, 2001 ; Taylor et al., 2002). Comme la mitochondrie, le RE contient des molécules pro-apoptotiques (caspase-12, p28Bap31 et GADD153) (Kaufman, 1999 ; Rao et al., 2001) et anti-apoptotiques (GRP78, calreticuline et DAD1) (Liu et al., 1997). De plus, des études ont montré que des membres de la famille Bcl-2 (Bcl-XL, Bax, Bak et Bik) sont également associés au réticulum endoplasmique pour réguler sa perméabilité, l'homéostasie calcique et la mort cellulaire (Germain et Shore, 2003 ; Scorrano et al., 2003).

La caspase-12 serait activée par la m-calpaïne (*cytosolic calcium-activated neutral cysteine endopeptidase*), par TRAF2 et par la caspase-7 (Nakagawa et Yuan, 2000 ; Yoneda et al., 2001 ; Rao et al., 2001). Ainsi, une augmentation de calcium cytosolique activerait la m-calpaïne, qui à son tour serait responsable de l'activation de la caspase-12 et du membre anti-apoptotique Bcl-XL. La protéine TRAF2 (TNF Receptor-Associated Factor 2) pourrait recruter et activer la caspase-12 (Yoneda et al., 2001). Rao et al. a également décrit la translocation de la caspase-7 au niveau du réticulum endoplasmique après un stress (Rao et al., 2001). Elle pourrait donc activer, par clivage, la caspase-12.

b) Modulateurs de l'apoptose

i) Bcl-2 (les homologues de CED-9)

CED-9 est un gène découvert chez *C. elegans*, qui code pour une protéine inhibitrice de l'apoptose. Son homologue chez l'homme a été mis en évidence à partir d'études sur des lymphomes folliculaires (Vaux et al., 1988). Le 1^{er} membre identifié « Bcl-2 » a donné son nom à cette famille qui regroupe à l'heure actuelle 15 protéines. Bcl-2 est une molécule clef de l'apoptose. Les membres de la famille Bcl-2 sont localisés au niveau de la membrane des

mitochondries, du réticulum endoplasmique, du cytosol ou du noyau cellulaire (Tableau 2) (Monaghan et al., 1992). Sa surexpression bloque l'apoptose (Nicholson et al., 1995) et son inhibition conduit à l'ouverture des méga-pores appelés PTPC (permeability transition pore complex) d'où s'échappent les protéines proapoptotiques (Kluck et al., 1999).

Membres de la famille BCL-2	Localisation dans les cellules saines	Localisation dans les cellules apoptotiques
<i>membres pro-apoptotiques</i>		
BCL-2	Mitochondrie et RE	Mitochondrie et RE
BCL _{XL}	Cytosol, mitochondrie et RE	Mitochondrie et RE
MCL-1	Cytosol, mitochondrie et RE	Mitochondrie
<i>membres anti-apoptotiques</i>		
BAX	Cytosol et Mitochondrie*	Mitochondrie et RE
BAK	Mitochondrie et RE	Mitochondrie et RE
BID	Cytosol	Cytosol et Mitochondrie
BIM	Cytosol et cytosquelette : DLC1	Cytosol et Mitochondrie
BMF	Cytosol et cytosquelette : DLC2	Cytosol et Mitochondrie

Tableau 2: Localisation subcellulaire de différents membres de la famille BCL-2 (D'après Kim et al.). Hierarchical regulation of mitochondrion-dependent apoptosis by BCL-2 subfamilies. Nat Cell Biol. 2006 Dec;8(12):1348-58.

La famille Bcl-2 peut être divisée en deux groupes, selon leurs fonctions (Figure 6) :

- Un groupe anti-apoptotique (pro-survie) qui contient Bcl-2, Bcl-xl, Bcl-w, A1, Mcl-1 (myeloid-cell leukaemia sequence 1) et Bod (BCL-2 homologue of ovary), chacun possédant les 4 domaines d'homologie : BH1, BH2, BH3 et BH4, sauf Mcl-1 (qui a seulement 2 domaines d'homologies).
- Un groupe pro-apoptotique pouvant être subdivisé au moins en deux groupes, selon la structure et la fonction des protéines : Bax, Bok, Bcl-xs et Bak qui contiennent chacun 2 ou 3 domaines d'homologie distincts et les protéines BH3-only : Bad, Bik, Bid, Bim, Noxa, Puma et Bmf, qui n'ont en commun qu'un domaine, qui est le domaine BH3.

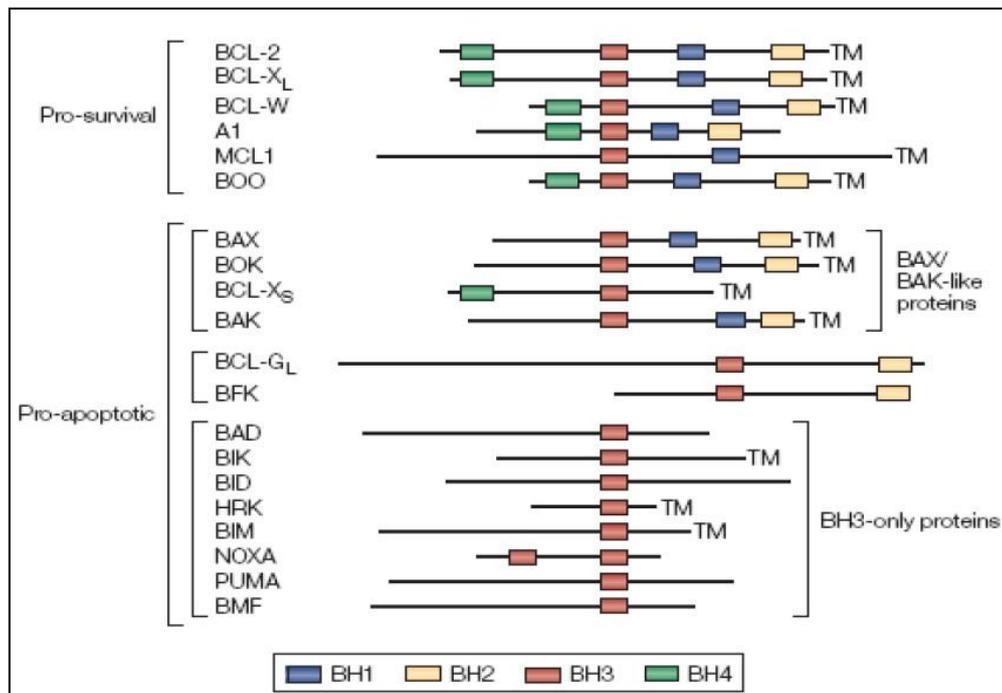


Figure 6: Membres de la famille BCL-2 (D'après Strasser A.). The role of BH3-only proteins in the immune system. Nat Rev Immunol. 2005 Mar;5(3):189-200.

Les protéines BH3-only sont pro-apoptotiques et fonctionnent comme détecteurs des signaux pro-apoptotiques. Dans les cellules de mammifères, les protéines BH3-only sont régulées par des mécanismes transcriptionnels et traductionnels (Puthalakath et Strasser, 2002). Les protéines de la famille Bcl-2 jouent un rôle majeur dans la régulation de la perméabilité mitochondriale. Elles régulent la libération de protéines apoptogènes dans le cytoplasme comme par exemple, le cytochrome c (Mikhailov et al., 2003). Deux hypothèses sont classiquement retenues pour expliquer cette régulation. La première hypothèse propose que les membres de la famille Bcl-2 puissent former eux-mêmes des canaux dans la membrane externe mitochondriale : elle est basée sur la découverte d'homologie structurale entre Bcl-xL et des pores formés par des toxines bactériennes (Muchmore et al., 1996, Minn et al., 1997). Par la suite, il a été mis en évidence que d'autres membres étaient capables de former des canaux dans des membranes artificielles tels que : Bax, (Antonsson et al., 1997), Bcl-2 (Schendel et al., 1997), Bid clivé (Schendel et al., 1999). Bax forme un canal en s'associant en complexes homo-oligomériques dans les membranes mitochondriales (Mikhailov et al., 2001). La deuxième hypothèse propose que les protéines de la famille Bcl-2 interagissent et régulent des canaux existants, tels que le PTP (Permeability Transition Pore) ou le VDAC (*Voltage dependent anion-channel*). Dans des conditions normales, Bcl-xL maintient le VDAC dans sa conformation ouverte permettant ainsi le passage de l'ATP de la matrice mitochondriale vers le cytoplasme. À l'inverse, La fermeture du VDAC par Bax

entraîne une accumulation d'ATP, provoquant au final le relargage du cytochrome c. Il a été montré que le domaine BH4 (de Bcl-x1) était impliqué dans l'interaction et l'inhibition du VDAC par Bcl-xL (Shimizu et al., 2000).

L'activation des protéines proapoptotiques de la famille Bcl-2 peut également se faire par protéolyse. Toutefois, ce mécanisme semble être propre à Bid. En réponse à l'activation d'un récepteur de mort, la caspase 8 est activée et clive la forme cytosolique inactive de Bid en un fragment tronqué actif tBid, qui à son tour migre vers la mitochondrie (Li et al., 1998; Luo et al., 1998) pour libérer le Cytochrome C qui active à son tour la caspase 9.

C'est l'interaction entre les différents membres des sous-familles Bcl-2 qui détermine l'engagement de la cellule vers l'apoptose, ou vers la survie.

ii) L'Apaf-1 (les homologues de CED-4)

Chez *C. Elegans* l'élément CED-4 code pour une protéine ayant des homologies avec la protéine humaine Apaf-1 (Apoptotic Protease Activating Factor 1) (Zou H. et al., 1997). Des études ont montré que CED-4 pouvait interagir à la fois avec CED-3 et CED-9 (Bcl-2) et lorsqu'il était exprimé dans des cellules de mammifères, il se localisait à la membrane mitochondriale en présence de Bcl-2 (Irmeler et al., 1997; Seshagiri & Miller, 1997). De plus, il a été possible d'isoler le complexe Bcl-x1/CED-4/caspase. En fait, il est bien établi que la localisation du complexe à la membrane mitochondriale est inhibitrice de l'apoptose alors que la libération de CED-4 dans le cytoplasme entraîne l'activation des caspases et la mort cellulaire. L'équipe de Zou et coll. a réussi à isoler et à caractériser l'homologue humain de CED-4 (Zou H. et al., 1997).

Tout comme CED-4, Apaf-1 s'est révélé indispensable à l'activation de la caspase 9 (voie mitochondriale). L'action d'Apaf-1 requiert la présence du cytochrome c et de dATP (Li P. et al., 1997). En fait, le dATP va permettre un changement de conformation d'Apaf-1 de telle sorte qu'il puisse lier le cytochrome c libéré de la mitochondrie. Ce pré-complexe peut alors recruter la procaspase 9 et ainsi conduire à son activation. Le complexe multimoléculaire ainsi formé est appelé Apoptosome (Zou H. et al., 1999) (Figure 5). Apaf-1 peut aussi interagir avec d'autres protéines telle que Bcl-x1 et les caspases 4 et 8 (Hu et al., 1998; Pan et al., 1998). L'interaction entre Apaf-1 et Bcl-x1 se fait principalement par le domaine BH4 de Bcl-x1 (Huang et al., 1998). Elle conduit à l'inhibition de l'association Apaf-1/caspase 9 et donc à l'absence d'activation de cette caspase.

iii) Cytochrome c

Etant donné le rôle primordial joué par le cytochrome c (Cyt c) dans la chaîne respiratoire de la mitochondrie permettant l'amplification du signal apoptotique, il n'est pas surprenant que l'inactivation de ce gène conduise à une mort. Le cytochrome c résidant dans l'espace intermembranaire mitochondrial, une fois libéré dans le cytosol participe à la formation de l'apoptosome et à l'activation de la caspase-9 (Liu et al., 1996). Les cellules Cyt c^{-/-} ne peuvent pas induire l'activation de la caspase 3 en réponse à différents stimuli pro-apoptotiques. Les cellules Cyt c^{-/-} sont résistantes à l'apoptose induite par les U.V. ou l'étoposide (molécule qui inhibe la topoisomérase II humaine) et très peu sensibles aux effets pro-apoptotiques de la déprivation en facteur de croissance ou à la staurosporine (Li et al., 2000). Ceci suggère qu'aucune autre protéine cellulaire ne peut remplacer le Cyt c pour l'oligomérisation d'Apaf-1 et pour l'activation de la caspase 3. Les auteurs remarquent que l'apoptose induite par le TNFα n'est pas inhibée mais qu'au contraire, elle est aggravée (Li et al., 2000).

iv) Les sphingolipides

Les sphingolipides sont une classe de lipides complexes présents dans les membranes plasmiques de toutes les cellules eucaryotes (Merrill et al., 1990), ayant une chaîne d'acide gras fixée par une liaison amide à une base à chaîne longue, la sphingosine. Différentes combinaisons forment un nombre important de sphingolipides et de glycosphingolipides. Bien que les sphingolipides aient été considérés pendant de nombreuses années comme seulement des constituants membranaires, il est maintenant bien établi qu'ils interviennent dans beaucoup de processus cellulaires comme la prolifération, la croissance, la migration, la différenciation, la sénescence et l'apoptose. Les sphingolipides intracellulaires sont capables de modifier l'activité de beaucoup de protéines comme les récepteurs, les canaux ioniques, les enzymes (Colombaioni et al., 2004). La majorité des étapes de leur biosynthèse a lieu dans le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi. Le catabolisme lui a lieu en grande partie dans les compartiments acides (Cuvillier et al., 2003). Ainsi l'acylation de la sphingosine conduit à la formation de céramide, en revanche, sa phosphorylation conduit à la sphingosine-1-phosphate (S1P). Alors que le céramide est impliqué dans l'arrêt de la croissance cellulaire et l'apoptose, la S1P est au contraire impliquée dans la prolifération et la survie cellulaire

(Theilmeier et al., 2006). Ainsi, l'équilibre dynamique entre la concentration intracellulaire de céramide et de S1P peut déterminer si la cellule doit vivre ou mourir (Cuvillier et al., 1996).

v) Les IAPs

Les IAPs (inhibitors of apoptosis) sont des protéines capables d'inhiber l'apoptose. Tous les membres de cette famille (XIAP, cIAP1, cIAP2, Survivin, Livin, Ts IAP, NAIP) portent une ou plusieurs copies du motif BIR (Baculovirus IAP Repeats) nécessaire pour lier et inactiver les caspases (Liston et al., 2003). Les IAPs inhibent à la fois l'activité des caspases initiateuses et celle des caspases effectrices. Par exemple, des XIAPs maintiennent la caspase-9 et les caspases effectrices -3, et 7 inactives, selon un mécanisme d'inhibition compétitive (Deveraux et Stennick, 1999). De plus, certaines IAPs favorisent la fixation de l'ubiquitine sur les caspases ce qui induit la dégradation du complexe IAP-Caspase-Ubiquitiné par le protéasome (Yang et Li 2000, Suzuki et al., 2001). Une protéine nommée Diablo ou Smac a été décrite. Cette protéine, une fois synthétisée est importée dans la mitochondrie. Au cours de l'apoptose, Diablo/Smac est libérée et se lie aux IAPs empêchant leur action protectrice et permettant ainsi aux caspases contenue dans l'apoptosome de s'activer. Il est à noter que Diablo/Smac est particulièrement abondant dans le cœur, le foie et les testicules et très peu présent dans les autres tissus, impliquant l'existence probable d'autres protéines homologues (Du et al., 2000).

5) L'élimination des cellules apoptotiques

a) Généralités

Alors que chaque jour des millions de cellules meurent par apoptose, ce processus passe inaperçu du fait de l'élimination rapide des corps apoptotiques. Cette élimination rapide et efficace explique en partie le fait que l'apoptose n'ait été que tardivement identifiée comme un événement physiologique fréquent. Les mécanismes impliqués dans la reconnaissance et la phagocytose des cellules apoptotiques n'ont été étudiés que plus récemment et sont encore loin d'être bien compris.

Les déficiences dans le processus d'élimination des cellules apoptotiques sont souvent associées à des pathologies inflammatoires et auto-immunes (Henson et al., 2001 ; Savill et al., 2002). En exposant des marqueurs de reconnaissance dès l'initiation du programme de

mort, les cellules apoptotiques facilitent leur élimination précoce de façon inoffensive sans perte de l'intégrité membranaire et donc sans libération de contenu cellulaire. Ceci permet de limiter le développement de l'inflammation et de l'auto-immunité. Ainsi, en condition normale, les cellules mourantes sont reconnues, ingérées et dégradées par les phagocytes de façon très précoce, limitant ainsi l'exposition inappropriée des constituants intracellulaires aux tissus adjacents (Savill, 1997).

Les cellules apoptotiques sont éliminées par phagocytose, préférentiellement par les phagocytes professionnels, tels que les macrophages et les cellules dendritiques immatures mais également par des phagocytes de types cellulaires très variés qui peuvent prendre en charge une cellule voisine en train de mourir.

b) Signaux de reconnaissances

La reconnaissance des cellules apoptotiques implique des signaux appelés « eat-me », exposés au cours de l'apoptose et permettant de les distinguer des cellules normales. La redistribution des phospholipides et des sucres de la membrane plasmique est un mécanisme permettant aux cellules apoptotiques d'être reconnues comme cibles des macrophages pour la phagocytose (Fadok et al., 2000). Dans des conditions physiologiques, les groupements phosphatidylsérines, phospholipides anioniques, sont présents uniquement dans le feuillet interne de la membrane des cellules. Dans les cellules apoptotiques ces groupements sont déplacés dans le feuillet externe et externalisés à la surface des cellules (Bratton et al., 1997). Ce phénomène apparaît de façon précoce dans l'apoptose et semble être indépendant du type cellulaire. De même, un changement d'expression des sucres est observé à la surface des cellules apoptotiques (Duvall et al., 1985). Ces sucres sont reconnus par des récepteurs spécifiques des macrophages (Savill et al., 1990; Fadok et al., 1992). Par homologie aux PAMPs (pathogen-associated molecular patterns), ces déterminants du « soi altéré » ont été appelés ACAMPs (apoptotic cell-associated molecular patterns). Par contre, par opposition à l'élimination des pathogènes qui provoque souvent une réponse pro-inflammatoire, l'ingestion des cellules apoptotiques est généralement non inflammatoire (Henson, 2005).

Partie 2 : Caspases

B) Les Caspases

Les caspases, enzymes clés associées à la mort cellulaire, sont une famille de protéases à cystéine qui sont ubiquitaires et hautement conservées chez les organismes multicellulaires (Figure 7).

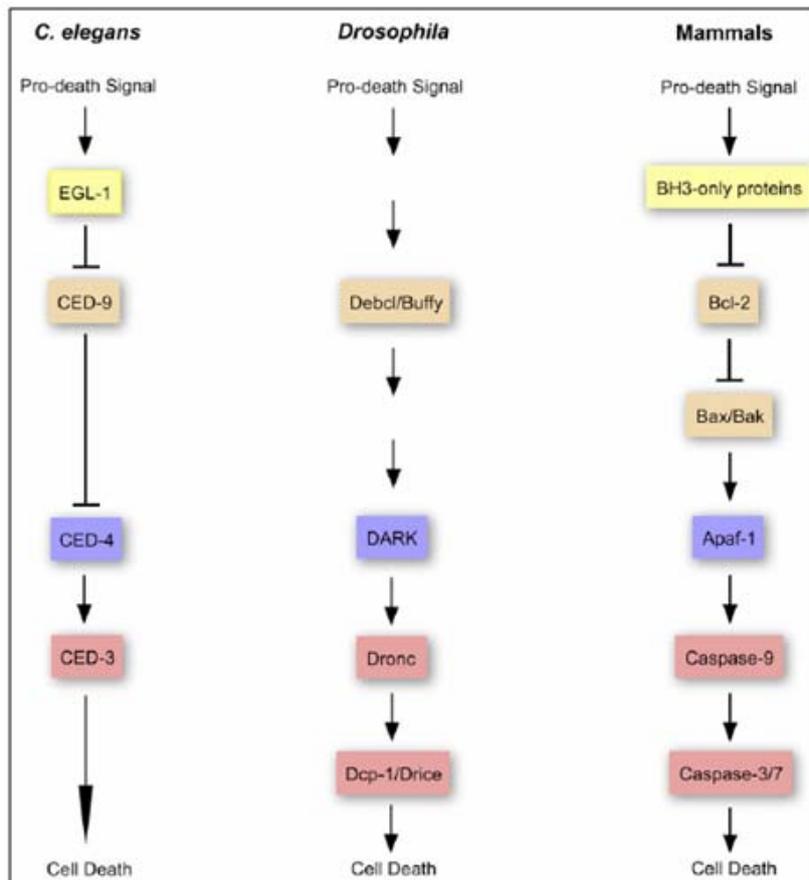


Figure 7: L'apoptose, un mécanisme très conservé chez *C. Elegans*, la drosophile et les Mammifères (Tiré de Yi et Yuan, 2009).

Les caspases ont d'abord été identifiées chez le nématode *Caenorhabditis elegans* (Ellis et Horvitz, 1986; Yuan et al., 1993). La première caspase identifiée chez les mammifères comme un homologue de la CED-3 a été l'ICE (interleukine 1 β -converting enzyme). L'ICE est une cystéine-protéase responsable du développement et de la sécrétion de proIL-1 β (Cerretti et al., 1992 ; Thornberry et al., 1992; Miura et al., 1993). Bien que CED-3 soit la seule caspase requise pour la mort cellulaire programmée chez *C. elegans*, des caspases multiples sont nécessaires pour l'apoptose dans des organismes plus complexes, tels que les mouches et les mammifères.

a) Nomenclature

Le **C** représente la cystéine du centre actif (QACCxG) et *aspase* définit la spécificité stricte de clivage des substrats de cette famille de protéases après un acide aspartique. Une nouvelle nomenclature proposée par (Alnemri et al., 1996) regroupe désormais les protéases apoptogènes sous le nom de CASPASE (Tableau 3). Elles sont présentes constitutivement dans les cellules et sont hautement conservées dans les espèces (Boyce et al., 2004). A ce jour, 14 caspases ont été identifiées chez les mammifères, mais il ne fait aucun doute que cette liste n'est pas achevée. Parmi celles-ci, les caspases-1 à -10 ainsi que la caspase-14, ont été mises en évidence chez l'Homme. Toutes ces caspases présentent des similarités au niveau de leur séquence, de leur structure et de leur spécificité de substrat.

Subfamily	Mammals
CARD containing caspase (initiator caspase)	Caspase-1, Caspase-2, Caspase-4, Caspase-5, Caspase-9, Caspase-11, Caspase-12
DED containing caspase (initiator caspase)	Caspase-8, Caspase-10
Short prodomain caspase (executioner caspase)	Caspase-3, Caspase-6, Caspase-7
Others	Caspase-14

Tableau 3: Caspases de mammifères (tiré de : Caspase signaling in animal development, Kuranaga 2011).

b) Classification

Les caspases peuvent être classées en deux catégories, initiatrices et effectrices (tableau 7). Les caspases initiatrices sont activées au cours de la phase d'initiation de l'apoptose (caspases-2, 8, 9, 10, 12). Les caspases effectrices sont activées par des caspases initiatrices, et impliquées dans la phase de dégradation de l'apoptose (caspases-3, 6, 7).

c) Structure

Toutes les caspases existent dans la cellule en tant que pro-formes latentes inactives comme précurseur zymogène. Les études de structure par cristallographie et les études de séquençages peptidiques ont démontré que les caspases sont synthétisées sous forme de pro-enzymes inactives de 32-55 kDa composées de trois domaines : un grand domaine central de

17-21 kDa (p20) qui contient une grande sous-unité catalytique, un petit domaine C-terminal de 10-13 kDa (p10) aussi appelé petite sous-unité catalytique, et en N-terminal un prodomaine de 3-24 kDa appelé « death domain » (DD) (Figure 8). Dans un certain nombre de procaspases, les sous-unités p20 et p10 sont séparées par une petite séquence intermédiaire.

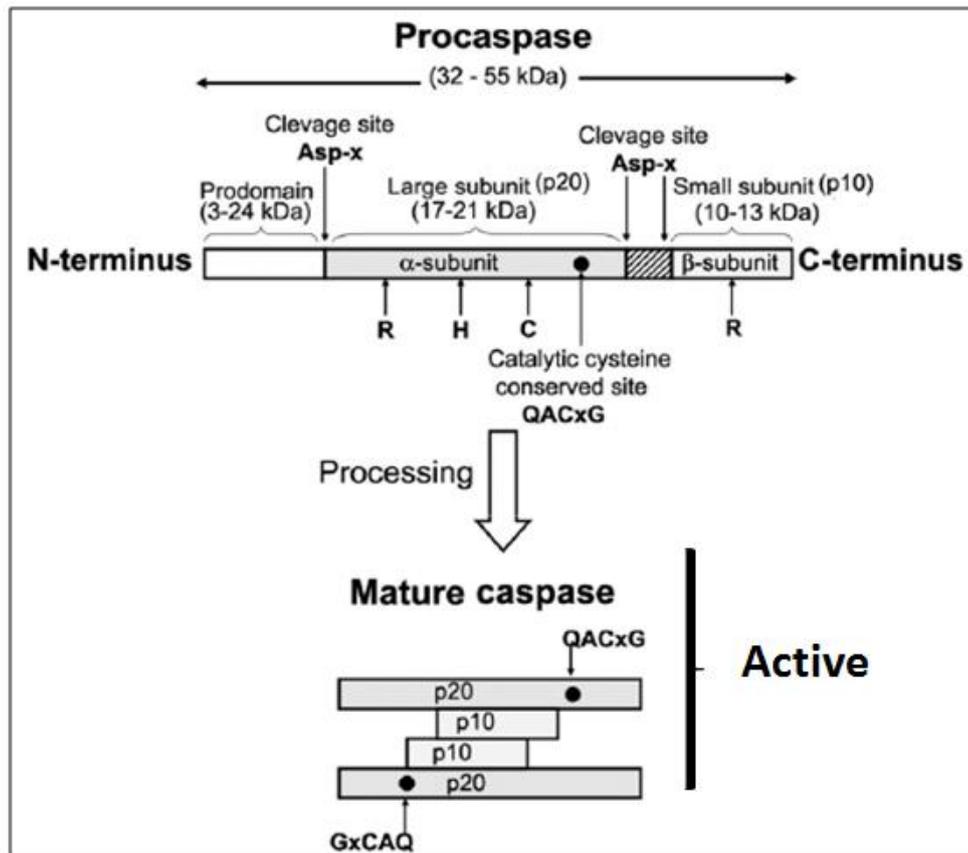


Figure 8: Représentation schématique de l'activation des caspases (Tiré de Chowdhury et al., 2008).

Les Caspases initiatrices ont un long prodomaine N-terminal contenant au moins 103 résidus acides aminés, et jusqu'à 200 résidus pour les caspases-8, et -10. Les caspases effectrices ont un prodomaine court contenant moins de 29 résidus acides aminés. Les prodomaines longs renferment la majeure partie des séquences utiles pour l'interaction protéine-protéine, tel que les domaines effecteurs de mort DED (death effector domain), ou bien encore le domaine de recrutement des caspases CARD (caspase recruitment domain). Le grand prodomaine en N-terminal des procaspases contient des motifs structurels de 80-100 résidus appelés superfamille des «death domain» (DD), et impliqués dans la transduction des signaux apoptotiques (Martinon et al., 2001) (Weber et Vincenz, 2001).

Le domaine de mort comporte un des deux sous-domaines suivants : le « death effector domain » (DED) ou le « caspase-recruitment domain » (CARD) qui jouent un rôle critique dans l'activation des caspases (Fesik, 2000). Sur la base de l'analyse phylogénétique cette famille comprend deux sous-familles majeures qui sont associées soit à ICE (caspase-1) soit à des homologues de CED-3 (Chowdhury et al., 2008).

De nouvelles subdivisions des caspases sont faites selon la taille de leur prodomaine et leurs fonctions. Selon ces caractéristiques, les caspases des mammifères sont classées en 3 groupes (Figure 9) :

- i. Les caspases avec un grand prodomaine (caspases-1, -4, -5, -12, -13 et -14) qui jouent un rôle dans la maturation des cytokines et la réponse inflammatoire sont appelés caspases inflammatoires ou caspases du groupe-I (Deveraux et al., 1998).
- ii. Le deuxième groupe comprend les caspases possédant un long prodomaine (supérieur à 90 acides aminés) avec soit un domaine DED (caspases -8 et -10), soit un domaine CARD (caspases -2 et -9) et sont appelées caspases initiatrices ou caspases du groupe-II.
- iii. Les caspases qui ont un prodomaine court (20-30 acides aminés) sont appelées les caspases exécutrices (caspases-3, -6 et -7) ou caspases du groupe-III (Roy et al., 1997 ; Xu et al., 2001).

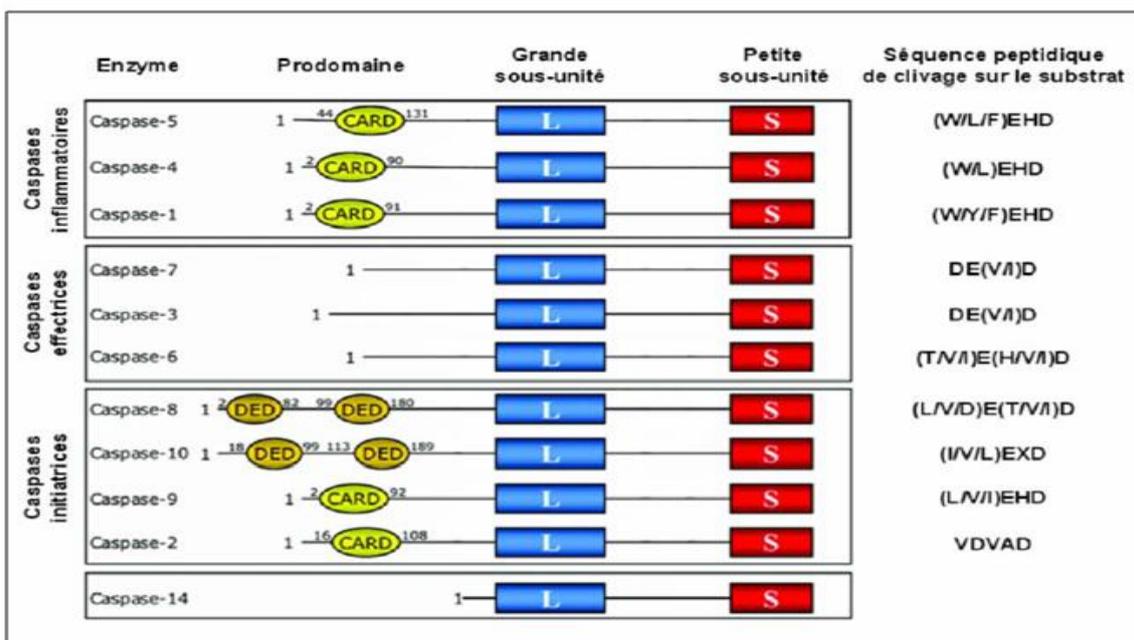


Figure 9: Classification des caspases (Tiré de unilim.fr).

d) Substrats

Une fois activées, les caspases sont capables de cliver un grand nombre de substrats cellulaires. Alors que toutes les caspases possèdent une spécificité stricte de clivage de leur substrat, après un résidu d'acide aspartique (P1), certaines vont avoir d'autres spécificités de clivage (Thornberry et al., 1997). On distingue alors, le groupe I (caspase-1, -4, -5, -9), dont le substrat préférentiel possède en quatrième position (P4) un acide aminé de type hydrophobe ou aromatique, du type [W/L]EHD; le groupe II (caspase-3, -2, -7), qui opte pour un substrat préférentiel avec un résidu acide aspartique en P1 et P4, du type DXXD; et finalement le groupe III (caspase-6, -8, -10, -11), qui sera beaucoup moins stricte sur la position du résidu P4 (Tableau 4).

Groupe	Caspase	Séquence térapeptidique optimale
Groupe I	Caspase 1	WEHD
	Caspase 4	(W/L)EHD
	Caspase 5	(W/L)EHD
	Caspase 12	Not known
	Caspase 14	WEHD
Groupe II	Caspase 3	DEVD
	Caspase 7	DEVD
	Caspase 6	VEHD
Groupe III	Caspase 2	DEHD
	Caspase 8	LETD
	Caspase 9	LEHD
	Caspase 10	LEXD

Tableau 4 : Spécificité des substrats des caspases. D'après Lavrik, I. N. et al. (2005).

e) Rôles des caspases

- Dans l'apoptose

Afin d'étudier le rôle individuel des caspases, des animaux déficients pour l'expression spécifique d'une d'entre elles ont été générées. A ce jour, les gènes codant pour les caspases 1, 2, 3, 8, 9, 11 et 12 ont été invalidés (Tableau 5).

	Développement et expression des cytokines	Apoptose	Références
Caspase 1	Pas d'effet sur le développement, Résistance aux chocs septiques induits par LPS ; Absence d'IL-1 β et IL-18 clivé ; Production altérée d'IL-1 α , IL-6 et IFN- γ .	Sensible normale à la plupart des agents pro-apoptotique ; L'apoptose induite par CD95 est atténuée dans les thymocytes. Les neurones sont résistants à la déprivation en facteur de croissance	Kuida et al, 1995 ; Li et al, 1995 ; Wang et al, 1998.
Caspase 2	Viable pas de problème majeur ; Excès des cellules germinales femelles.	Ovocyte résistants à la mort induite par les drogues ; La mort induite par le granzyme est défectueuse dans les cellules B ; Lymphocytes sensible aux drogues et à L'anti-CD95	Bergeron et al, 1998 ; Wang et al, 1994
Caspase 3	Taille plus petite. Mort entre la 1 ^{ère} et la 3 ^{ème} semaine. Altération du développement du cerveau avec un excès de cellules postmitotiques.	Pas de bourgeonnement et de fragmentation du noyau dans les thymocytes et les hépatocytes ; Clivage des substrats des caspase absent au retardé. Réduction de l'apoptose dans l'AICD et dans des fibroblastes stimulés par des drogues	Kuida et al, 1996 Woo et al 1998
Caspase 8	Létal <i>in utero</i> . Embryons plus petits ; Malformation cardiaque ; Accumulation massive d'érythrocytes et hémorragie massive. Diminution des cellules souches hématopoïétiques.	Fibroblastes résistance à l'apoptose induite par TNF-R _L CD95 et DR3 mais sensible à la plupart des agents proapoptotiques ; activation normale de NF- κ B et de JNK.	Varfolomeev et al 1998
Caspase 9	Létalité périnatale ; Cerveau plus volumineux et mal formé dû à une réduction de l'apoptose au cours du développement du cerveau. Absence d'activation de la caspase 3 dans les cerveaux embryonnaires.	Les cellules souches embryonnaires et les fibroblastes sont résistants à de nombreux stimuli proapoptotique ; les thymocytes sont résistants à l'apoptose induite par radiation γ et dexaméthasone mais sensibles aux U.V. et à CD95. Les splénocytes ne sont pas protégés contre l'apoptose induite par des drogues	Hakem et al, 1998 ; Kuida et al. 1998
Caspase 11	Pas de défauts du développement (similaire à caspase 1). Absence de production d'IL-1 α et β , dû au blocage de l'activation de la caspase 1.	Cellules résistantes à l'apoptose induite par la surexpression de la caspase 1.	Wang et al ; 1998
Caspase 12	Pas de défaut du développement	Souris résistantes à l'apoptose induite par le stress du réticulum endoplasmique mais sensible aux autres stimuli proapoptotiques ; Les neurones corticaux présentent une insensibilité à l'apoptose induite par la protéine β -amyloïde mais pas par la staurosporine ou la déprivation en facteur de croissance.	Nakagawa et al, 2000

Tableau 5 : Invalidation des gènes codant pour les caspases, tiré de (Los et al., 1999).

Ainsi, les souris invalidées pour le gène codant pour la caspase 1 ou la caspase 11 présentent un développement normal (Wang S. et al., 1998), mais ont une production défectueuse d'interleukine-1 α et β , IL-18 et d'interferon- γ . La caspase 1 semble donc jouer un rôle dans la régulation du système immunitaire mais pas ou peu dans les voies apoptotiques (Kuida et al., 1995; Li et al., 1995). Les souris invalidées pour le gène de la caspase 2 présentent un développement normal jusqu'à l'âge adulte et ne présentent aucun phénotype sévère (Bergeron et al., 1998). A la naissance, les souris déficientes en caspase-2 ont une diminution du nombre de motoneurones faciaux suggérant que la caspase 2 n'agit pas simplement comme un effecteur positif de l'apoptose mais qu'elle est aussi capable, selon le type cellulaire, de retarder la mort cellulaire. En effet, la caspase 2 existe sous 2 formes obtenues par épissage alternatif : la forme longue Casp2L qui induit l'apoptose, et la forme petite Casp2S (Small) qui inhibe l'apoptose (Wang L. et al., 1994).

Les souris invalidées pour la caspase 3 furent les premières à présenter de profonds bouleversements de l'apoptose (Kuida et al., 1996; Woo et al., 1998). Elles sont plus petites que les souris contrôles et meurent entre la première et la troisième semaine après la naissance. Il s'est avéré que le phénotype de ces souris est extrêmement restreint. En effet, les anomalies les plus marquées semblent sélectivement localisés au niveau du système nerveux central.

Les souris invalidées pour la caspase 8 se développent normalement durant les 11 premiers jours suivant la fécondation, puis meurent, probablement des suites de malformations cardiaques importantes. Le cœur de ces animaux est hypotrophique, suggérant que la caspase 8 pourrait être impliquée dans la transmission des signaux de survie plutôt que des signaux de mort, au moins au niveau de cet organe. De plus, ces embryons produisent très peu de précurseurs myéloïdes (Varfolomeev et al., 1998). Les fibroblastes embryonnaires de ces souris sont insensibles aux effets cytotoxiques initiés par Fas, TNF-RI ou DR3 mais restent sensibles à la déprivation en facteurs de croissance, aux radiations U.V., au céramide et à l'étoposide (Varfolomeev et al., 1998).

Le phénotype des souris invalidées pour la caspase 9 est semblable à celui des souris caspase 3^{-/-}, mais cependant plus sévère (Hakem, 1998). Elles meurent au 16^{ème} jour de développement. Elles souffrent de malformation cérébrale avec un excès cellulaire au niveau du système nerveux central. On note environ 10 fois moins de marquage des cellules apoptotiques, TUNEL positives (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling), dans les cerveaux des souris invalidées pour la caspase 9 par rapport à des souris contrôles. Ce phénotype est aussi partagé par les souris Apaf-1^{-/-}. De plus, il existe une

absence d'activation de la caspase 3 in vivo dans le cerveau mais cette activation se produit normalement dans les tissus ectodermiques et méningés (Kuida et al., 1998). Contrairement au cerveau, certains organes comme le cœur, le poumon, le foie mais aussi la colonne vertébrale présentent un développement normal. Les cellules ES (embryonic stem cells) ou les fibroblastes embryonnaires de ces souris libèrent le cytochrome c de leurs mitochondries suite à une irradiation aux U.V., mais la caspase 3 n'est pas activée (Hakem et al., 1998).

Les souris invalidées pour la caspase 12 ne présentent aucun défaut apparent du développement. Des études par microscopie confocale suggèrent que la pro-caspase 12 est principalement localisée dans le réticulum endoplasmique (Welihinda et al., 1999). En définitive, la caspase 12 semble être essentielle pour l'apoptose induite par un stress au niveau du RE ou pour la mort neuronale induite par la protéine Ab ce qui en fait une cible pharmacologique potentielle.

-Dans d'autres processus

Les modifications cellulaires observées lors de la différenciation ont des points communs avec les modifications morphologiques décrites dans l'apoptose. Par exemple, les cellules épithéliales du cristallin, les kératinocytes et les érythrocytes perdent leur noyau au cours de leur différenciation terminale et c'est dans ces cellules qu'initialement une activation des caspases a été suspectée, explorée et mise en évidence (Weil et al., 1999 ; Zermati et al., 2001). Le rôle des caspases dans la différenciation en absence de phénomène d'énucléation a également été rapporté dans de nombreux systèmes comme la différenciation des muscles squelettiques (Fernando et al., 2002), des spermatozoïdes de la drosophile (Arama et al., 2003), des mégacaryocytes (De Botton et al., 2002), des plaquettes, des monocytes (Sordet et al., 2002) et des ostéoblastes (Mogi et Togari, 2003).

Les recherches suggèrent que les caspases, enzymes clefs de l'apoptose, sont également indispensables à de nombreux processus de différenciation. Le clivage de certaines cibles, et pas d'autres, par les caspases, déterminerait le choix du destin de la cellule. La description de l'activation des caspases et l'identification de substrats des caspases en l'absence de mort cellulaire ont suscité un grand intérêt pour les fonctions des caspases dans les réponses cellulaires au-delà de l'apoptose. L'étude des souris « knock out » pour les caspases, ou de leurs cellules, confirme les rôles pléiotropiques de ces protéases dans la différenciation cellulaire, la prolifération ou l'activation de NF-KB (Tableau 6). Les fonctions non apoptotiques des caspases suggèrent qu'elles peuvent être activées indépendamment ou sans l'induction de la cascade apoptotique, ce qui entraîne le clivage spécifique de certains

substrats (Lamkanfi et al, 2007). Par exemple, il a été décrit dans les polynucléaires neutrophiles non apoptotiques que le clivage de la caspase-3 par la sérine protéase PR3 (Proteinase 3) donne un fragment activé de 22 kDa qui n'induit pas la mort cellulaire mais dont le rôle reste à préciser (Pederzoli et al., 2005).

ROLE DANS L'APOPTOSE		AUTRES FONCTIONS
Activation des caspases initiatrices	Caspase-1	<ul style="list-style-type: none"> – Production d'IL-1 – Différenciation des muscles squelettiques – Migration cellulaire – Activation de NF-κB
Caspase initiatrice/exécutrice Initiatrice de l'apoptose après la dégradation de l'ADN et pendant la catastrophe mitotique	Caspase-2	<ul style="list-style-type: none"> – Différenciation des érythroblastes, ostéoblastes, macrophages – Réparation de l'ADN – Activation de NF-κB
Caspase exécutrice	Caspase-3	<ul style="list-style-type: none"> – Différenciation des érythroblastes, monocytes, kératinocytes, macrophage, cristallin, spermatozoïdes, muscle squelettiques, ostéoblastes, trophoblastes du placenta – Prolifération des cellules B – Production d'IL-16 – Formation des plaquettes – Différenciation des cellules souches neurales – Inhibition de la maturation des cellules dendritique
Activation des caspases initiatrices	Caspase-5	<ul style="list-style-type: none"> – Production d'IL-1
Caspase exécutrice	Caspase-6	<ul style="list-style-type: none"> – Différenciation du cristallin – Régulation positive du cycle cellulaire des lymphocytes B
Caspase exécutrice	Caspase-7	<ul style="list-style-type: none"> – Différenciation des érythroblastes
Caspase initiatrice de la voie extrinsèque due au récepteur de mort	Caspase-8	<ul style="list-style-type: none"> – Prolifération et activation des lymphocytes T – Régulation positives du cycle cellulaire lymphocyte B – Activation de NF-κB

		<ul style="list-style-type: none"> – Différenciation des trophoblastes, ostéoblastes, érythroblastes, monocytes – Mobilité cellulaire – Développement des embryons de souris : Différenciation des progéniteurs hématopoïétiques
Caspase initiateur de la voie apoptotique intrinsèque mitochondriale	Caspase-9	<ul style="list-style-type: none"> – Idem processus de différenciation de la caspase-3 – Différenciation des cellules épithéliales
Caspase initiateur de la voie des récepteurs de mort	Caspase-10	<ul style="list-style-type: none"> – Impliquée dans l'activation des voies de survie médiées par NF-κB
Caspase initiateur de la voie des récepteurs de mort	Caspase-11	<ul style="list-style-type: none"> – Production d'IL-1 – Migration des macrophages
Caspase initiateur de la voie du réticulum endoplasmique	Caspase-12	<ul style="list-style-type: none"> – Diminution de l'inflammation – Réponse immunitaire innée
Caspase exécutive	Caspase-14	<ul style="list-style-type: none"> – Différenciation des kératinocytes

Tableau 6: Les différentes fonctions des caspases indépendantes de l'apoptose, modifié selon : (Launay et al., 2005) & (Galluzzi, L et al. No death without life: vital functions of apoptotic effectors. Cell Death Differ. 2008, Feb 29).

Bien que les caspases soient associée à l'apoptose, les résultats des recherches récentes indiquent qu'elles jouent également un rôle dynamique dans la prolifération compensatoire des cellules voisines et la détermination du destin cellulaire, ainsi que dans la réorganisation du cytosquelette d'actine, ce qui affecte la forme d'une cellule et sa migration (Kuranaga & Miura, 2007; Feinstein-Rotkopf & Arama, 2009).

f) La régulation des caspases

L'activation et l'inactivation des caspases sont physiologiquement et précisément contrôlées dans les cellules par divers mécanismes comportant différents inhibiteurs ou activateurs. Un premier niveau de régulation des caspases est représenté par les mécanismes spécifiques et complexes de leur activation : disponibilité des cofacteurs tels que Apaf-1 et cytochrome c, et l'activation des protéines situées en amont dans la voie de signalisation apoptotique (récepteurs). Une fois activées, il existe au moins six types de régulateurs de l'activité des caspases, qui agissent à différents niveaux.

i) Inhibitor apoptosis protein (IAPs)

Les IAPs sont des protéines inhibitrices de l'apoptose, ce sont une famille de 8 protéines inhibitrices de l'apoptose (Salvesen et Duckett, 2002). La protéine la mieux caractérisée est la protéine inhibitrice de l'apoptose liée au chromosome X (XIAP, X-linked inhibitor of apoptosis protein), elle se lie aux caspases -3, -7 et -9 grâce à un domaine conservé, le BIR (Baculovirus IAP Repeat), et inactivent ces caspases (Takahashi et al., 1998). Les IAPs inhibent à la fois l'activité des caspases initiateuses et celle des caspases effectrices. Par exemple, des XIAPs maintiennent la caspase-9 et les caspases effectrices -3, et 7 inactives, selon un mécanisme d'inhibition compétitive (Deveraux et Stennick, 1999). De plus, certaines IAPs favorisent la fixation de l'ubiquitine sur les caspases ce qui induit la dégradation du complexe IAP-Caspase-Ubiquitine par le protéasome (Yang et Li, 2000 ; Suzuki et al., 2001).

ii) FLIP

La protéine c-FLIP (cellular-FLICE (FADD-like IL-1 β -converting enzyme) inhibitory protein) est l'homologue de la protéine virale v-FLIP connue pour inhiber la signalisation apoptotique médiée par les récepteurs de mort. c-FLIP existe sous forme de deux variants d'épissage alternatif, c-FLIPs (forme courte) et c-FLIPL (forme longue). La forme courte est constituée de deux domaines DED tandis que la forme longue est un homologue de la procaspase-8 protéolytiquement inactif. Les deux formes de c-FLIP préviennent le recrutement des caspases initiateuses-8 et -10 par la protéine FADD et inhibent la formation du DISC (Death Inducing Signaling Complex) (Irmeler et al., 1997). Cependant, alors que la forme courte semble toujours agir en tant qu'inhibiteur, de faibles concentrations de forme longue permettent l'activation protéolytique de la caspase-8 au niveau du DISC grâce à la formation de l'hétérodimère caspase-8/FLIP (Boatright et al., 2004; Chang et al., 2002). Cette observation renforce l'hypothèse selon laquelle la dimérisation des caspases initiateuses est suffisante pour favoriser leur activation.

iii) La phosphorylation

Les caspases sont considérées comme étant des phosphoprotéines, c'est à dire capables d'être régulées par phosphorylation (Martins et al., 1998) et déphosphorylation (Anderson, 1997) sous l'action de kinases telles que Akt (Cardone et al., 1998), la Protéine Kinase (PK) C ou bien encore la PKA (Allan et al., 2003), et de phosphatases telles que la protéine

phosphatase 2 (Alvarado-Kristensson et al., 2004 ; Brady et al., 2005). Par exemple, Akt phosphoryle spécifiquement la caspase-9 inhibant ainsi son clivage et donc son activation. De même, la phosphorylation de la caspase-3 par une MAP Kinase (Mitogen Apoptosis Protein) diminue son activité (Alvarado-Kristensson et Andersson, 2005), et, à l'inverse, sa déphosphorylation par la protéine phosphatase 2, lui permet de se réactiver (Alvarado-Kristensson et Andersson, 2005).

iv) Les calpaïnes

Les calpaïnes représentent une famille de cystéine protéases Ca^{2+} -dépendante de la famille des papaïnases. Les calpaïnes et la caspase-3 partagent certains substrats, comme la fodrine et PARP (Wang, 2000). La calpaïne peut cliver la pro-caspase-3 en un fragment de 29 kDa favorisant ainsi son activation (Blomgren et al., 2001).

v) CrmA

La CrmA (Cytokine response modifier A), est une serpine, c'est-à-dire un inhibiteur de sérine protéase, produite par le virus cowpox (maladie infectieuse des bovidés). Elle prévient les réponses inflammatoires et apoptotiques en inhibant préférentiellement l'activité des caspases-1 et -8 (Zhou et al., 1997). La fixation de CrmA sur le site catalytique des caspases entraîne l'inhibition irréversible de leur activité par dissociation du tétramère composant la caspase active et perte de la petite sous-unité catalytique (Dobo et al., 2006). Ainsi, CrmA inhibe l'apoptose induite par Fas dans des lymphocytes, suggérant un rôle important de la caspase-8 dans cette signalisation (Smith et al., 1996). Malgré son effet inhibiteur sur la caspase-9 in vitro, CrmA n'a aucun effet sur la mort médiée par la voie intrinsèque qui implique la caspase-9 (Ryan et al., 2002).

vi) p35 et p49

La protéine p35 produite par le Baculovirus et son homologue p49 inhibent l'activité d'un spectre large de caspases incluant la caspase-1, -3, -6, -7, -8, -9 et -10 (Callus et Vaux, 2007). Le clivage de p35 par les caspases entraîne la formation d'un complexe caspase/p35 qui bloque le site catalytique des caspases (Zhou et al., 1998).

g) Apoptose caspase indépendante

Des mécanismes apoptotiques caspases indépendantes ont été mis en évidence. La mitochondrie semble jouer un rôle important dans la signalisation caspase indépendante. En effet, la surexpression de Bcl-2 protège les cellules de la mort de type nécrose-like induite par le TNF- α (Thon et al., 2005). De plus, des fibroblastes déficients pour la protéine Apaf-1, qui participe à la formation de l'apoptosome, meurent en réponse à la surexpression de tBid, tandis que des fibroblastes doubles déficients pour les protéines Bax et Bak sont résistants. Ces résultats suggèrent que les événements mitochondriaux induits par tBid impliquent les membres pro-apoptotiques Bax et Bak et participent à une mort caspase indépendante (Cheng et al., 2001; Wei et al., 2001).

En outre, certaines protéines mitochondriales peuvent être relarguées en l'absence d'activation de caspases. Par exemple, la sérine protéase HtrA2/Omi pourrait agir en tant que protéine effectrice dans une mort de type nécrose-like grâce à son activité sérine protéase (Hegde et al., 2002). EndoG est capable d'induire une fragmentation de l'ADN de manière caspase-indépendante sur des noyaux isolés (Li et al., 2001).

En revanche, la mort caspase indépendante semble être importante en cancérologie. Le succès des traitements anticancéreux repose notamment sur leur capacité à induire la mort des cellules cancéreuses et en particulier par l'induction de l'apoptose dépendante de l'activation des caspases. Cependant, l'activation de voie de signalisation caspase indépendante semble prometteuse en thérapie anticancéreuse. La mort de cellules cancéreuses pulmonaires induite par le taxol, un inhibiteur du fuseau mitotique, n'est pas inhibée en présence de z-VAD (Huisman et al., 2002). En réponse à ce même agent, des cellules cancéreuses ovariennes meurent en l'absence d'activation de caspases vraisemblablement par un mécanisme dépendant d'AIF (Ahn et al., 2004). En effet, AIF est impliqué dans la mort caspase-indépendante induite par la staurosporine dans des cellules cancéreuses pulmonaires chimiorésistantes (Gallego et al., 2004).

Partie 3 : La Rétine & ses Affections

A. Généralités

De nombreux types de systèmes visuels existent dans la nature. Les yeux les plus simples sont assimilables à de simples capteurs optiques, c'est le cas des fleurs qui s'orientent naturellement en direction du soleil. Néanmoins, certaines espèces vivantes possèdent des yeux « formateurs d'images » qui sont évidemment bien plus compliqués. Un tel système visuel est réalisé à partir de capteurs de lumière couplés à un cerveau performant capable de construire des représentations élaborées de son environnement. Ce capteur perçoit la lumière et la transforme en messages nerveux à destination du cerveau qui en assure le traitement. En comparaison avec d'autres espèces animales, le capteur visuel de l'humain n'est pas le plus simple ni le plus compliqué des vertèbres. Par contre, cet œil est couplé avec le cerveau le plus performant des espèces vivantes, et la moitié de ce cerveau est associé au traitement visuel (Gregory et al., 1998). De plus, l'œil n'est pas qu'un simple capteur de lumière, l'œil possède une structure spécifique, la rétine qui est constitué de neurones capables de réaliser déjà à ce stade un traitement compliqué de l'information.

B. Description générale de l'œil

Tous les yeux des vertébrés sont organisés sur un plan structural commun dans lequel la lumière passe à travers la cornée, l'humeur aqueuse, le cristallin et l'humeur vitrée avant d'atteindre la rétine (Figure 10).

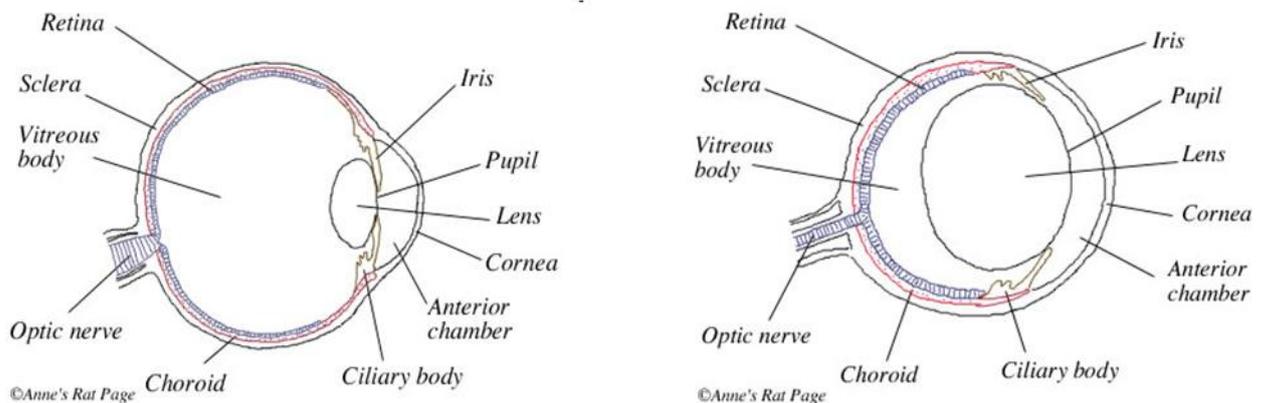


Figure 10: Planche anatomique de l'œil humain et de l'œil d'un rat (Adapté de Fry, 1949).

L'œil réalise plusieurs fonctions: tout d'abord c'est un appareil optique très perfectionné, capable de s'adapter à plusieurs niveaux de luminosité, à une grande gamme de focalisation. C'est également un appareil optique mobile, capable de suivre un objet en mouvement et de fixer plusieurs objets en quelques centaines de millisecondes. Pour chacune des espèces animales douées de vision, les stratégies visuelles sont différentes, privilégiant plutôt une vision nocturne et une détection des objets en mouvement pour le chat, ou la vision des couleurs pour l'abeille ou l'homme, ou encore une vision à 360° pour les oiseaux.

Chaque globe oculaire est équipé de trois paires de muscles externes qui le maintiennent en position dans son orbite, et orientent le regard dans n'importe quelle direction. La quantité de lumière, traversant la cornée puis l'humeur aqueuse, est limitée par l'iris. L'iris est un muscle annulaire opaque formant la pupille. Par analogie avec un appareil photographique, la pupille représenterait alors l'obturateur. Quand la lumière est vive, l'iris se contracte, ce qui diminue l'intensité lumineuse qui vient frapper le centre de la rétine, et inversement. La surface de l'iris varie dans un rapport de un à seize. La contraction et la dilatation de l'iris est un réflexe physiologique pour adapter la vision à la luminosité ambiante. De plus, l'iris se contracte également lorsque les yeux convergent en direction d'un objet proche. Ces différents asservissements de la pupille par l'intermédiaire de l'iris sont réalisés par le pretectum (le prolongement de l'axe optique de l'œil) (Buser & Imbert, 1987), et garantissent un niveau d'éclairement constant sur la fovéa (zone centrale de la macula). Le cristallin permet la mise au point d'images nettes sur la rétine. Le cristallin non déformé permet la vision de loin. Un ligament, la zonule de Zinn, le relie au muscle ciliaire. En se contractant, le zonule de Zinn déforme et modifie ainsi son pouvoir de convergence du cristallin, permettant la vision de près. La première partie de l'œil consiste donc à créer une image nette sur la rétine.

C. La Rétine

La rétine est essentielle pour garantir une vision efficace. Elle permet de transformer l'information lumineuse en information électrophysiologique traitable par les neurones. Tapissant le fond de l'œil (Figure 11), la rétine est le lieu de traduction du message lumineux en signal nerveux.

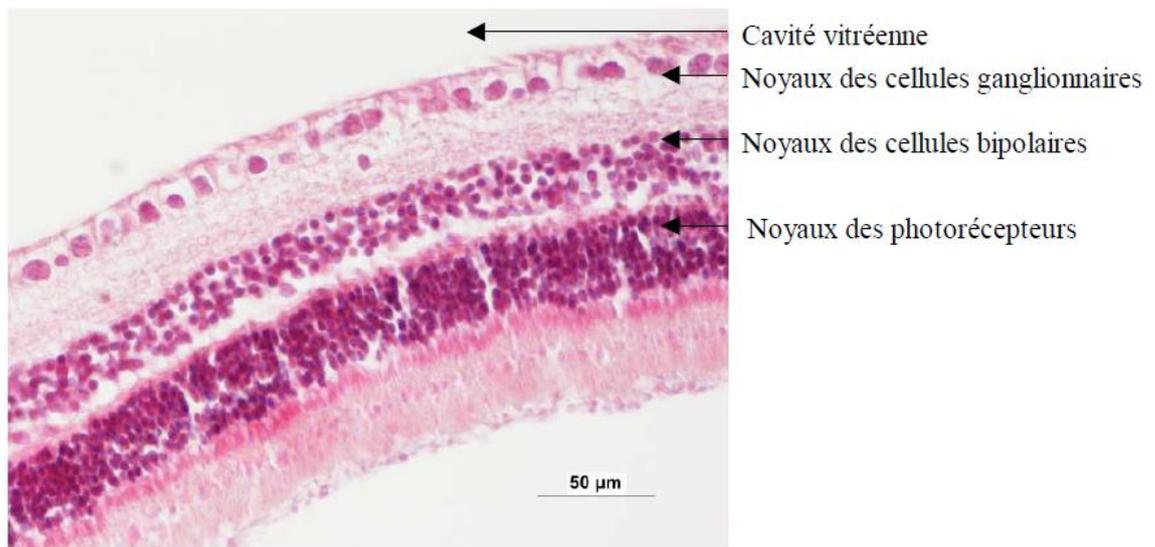


Figure 11 : Coupe histologique de la rétine colorée en Hématéine Eosine Safran.

1. Organisation de la rétine

La rétine se subdivise en un feuillet externe l'**épithélium pigmentaire rétinien (EPR)**, et un feuillet interne la **rétine neurale**. L'EPR joue un rôle essentiel dans la protection et la survie de la rétine neurale. Ainsi L'EPR est capable d'absorber les photons qui n'ont pas été absorbés par les photorécepteurs évitant leur propagation ou réflexion. La rétine neurale est le lieu des fonctions de photoréception et de transmission de l'information lumineuse. La rétine neurale est un tissu très fin, de 100 à 500 μm d'épaisseur, organisé en sept couches cellulaires (Figure 12) : 1/ **les cellules photoréceptrices** responsables d'absorber la lumière et de la transformer d'un signal lumineux en un signal électrophysiologique, 2/ **les cellules bipolaires**, premiers neurones d'association qui modulent l'information électrophysiologique venant des cellules photoréceptrices, 3/ **les cellules ganglionnaires**, qui correspondent aux seconds neurones d'association dont l'axone appartient au nerf optique, 4/ **les cellules amacrines**, 5/ **les cellules horizontales**, et 6/ **les cellules interplexiformes** qui participent toutes à la mise en forme de la réponse électrophysiologique initiale générée par les cellules photoréceptrices, et 7/ **les cellules gliales** dont les principales sont les cellules de Müller qui s'étendent de la surface vitrée (ou membrane limitante interne de la rétine) jusqu'à la membrane limitante externe où elles entourent les segments internes des photorécepteurs. Chez le rat, comme chez l'homme, le singe, le chat, le chien, la souris ou bien encore la grenouille, les photorécepteurs reçoivent leur apport sanguin (70-80% de l'oxygène consommé par la rétine) de la circulation choroïdienne au travers de l'épithélium pigmentaire, alors que la rétine interne reçoit son apport sanguin de la circulation rétinienne. Les neurones

de chaque couche sont reliés entre eux par des synapses réalisant un filtrage spatial de l'information lumineuse (Wu, 1994 ; Shah & Levin, 1996).

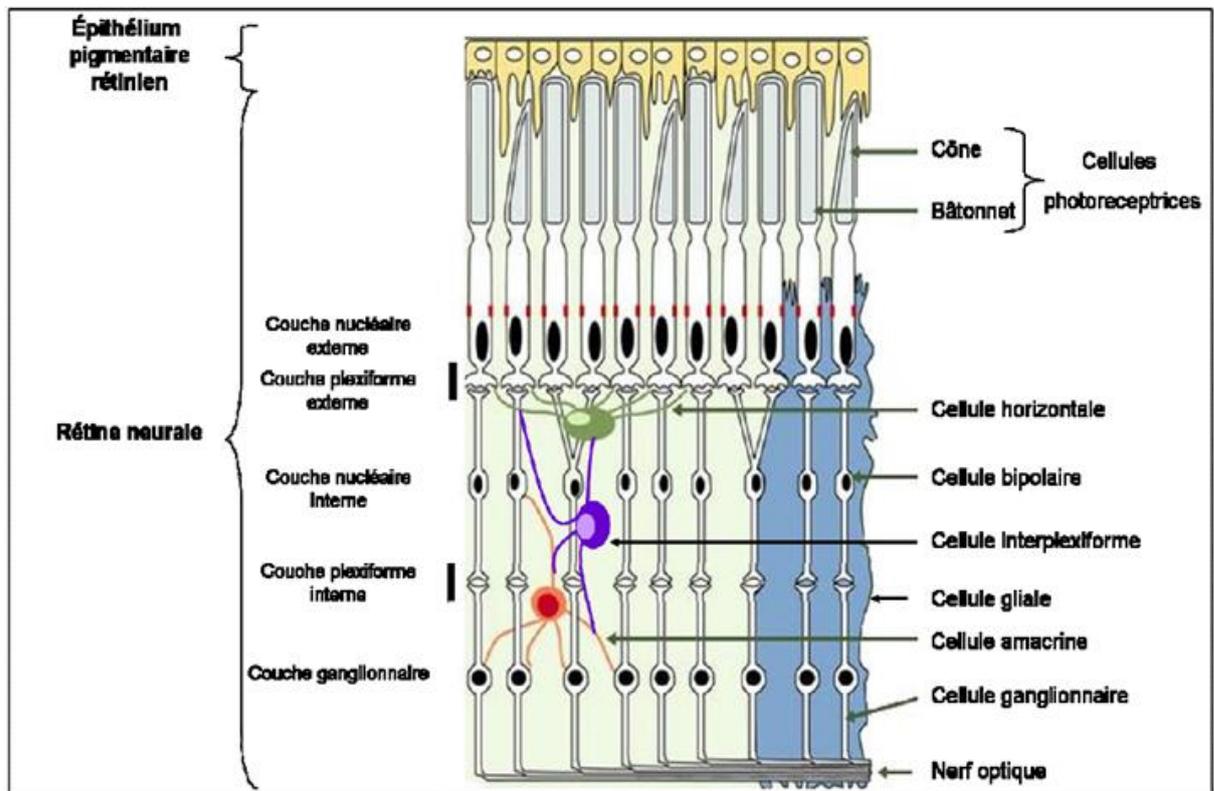


Figure 12: Coupe de la rétine.

a) Couches externes

Les corps cellulaires des cellules photoréceptrices, cônes et bâtonnets, sont regroupés dans la couche nucléaire externe. Il existe des connexions synaptiques de type électrique, entre ces deux types de neurones. Il existe également des couplages entre cônes. Chez la tortue, on a identifié que les connexions synaptiques sont réalisées entre cônes de même type (Detwiler & Hodgkin, 1979). Ces connexions réalisent un lissage du signal lumineux pour améliorer le rapport signal sur bruit. La couche nucléaire externe est le lieu de la triade synaptique cône-cellule horizontale et bipolaire. Les cellules horizontales sont comme leur nom l'indique des cellules dont les connexions sont horizontales. On compte trois types dans la rétine humaine, selon les types de cônes et les bâtonnets auxquelles elles sont connectées (Ahnelt & Kolb, 1994).

b) Couches internes

La couche nucléaire interne comprend les corps cellulaires de cellules bipolaires et amacrines. Il existe plusieurs sortes de cellules amacrines dans la rétine des primates. L'anatomie montre qu'il existe au moins 25 sortes de ces cellules, classées principalement en fonction de leur projection dendritique. Les cellules amacrines ont un peu le rôle des cellules horizontales dans la couche externe, elles réalisent un traitement spatial étendu, mais la fonction précise de ces cellules n'est pas bien connue. La couche nucléaire interne est le lieu des connexions entre les cellules bipolaires, amacrines et ganglionnaires. Les cellules bipolaires sont chargées de transmettre l'information de la couche externe vers la couche interne. Ces cellules sont reliées à différents types de cellules amacrines, ainsi qu'à diverses cellules ganglionnaires.

2. Les photorécepteurs

Les photorécepteurs se décomposent en deux classes, les cônes et les bâtonnets (Figure 13 A, B). L'origine embryonnaire de ces deux types cellulaires est identique, et ils présentent une morphologie générale similaire. Ils sont constitués d'un segment externe, d'un segment interne, d'un noyau cellulaire et d'une terminaison synaptique. Le segment externe de la cellule est la partie sensible à la lumière, il est rempli de structures lamellaires orientées perpendiculairement à l'axe des photorécepteurs ainsi que de photopigments. Le segment interne contient des mitochondries en paquet dense dans l'ellipsoïde. L'appareil de Golgi et le réticulum endoplasmique sont localisés dans le myoïde. La terminaison synaptique est une région complexe qui permet à la cellule d'établir des contacts synaptiques avec les cellules horizontales et bipolaires. Les bâtonnets ont un segment externe cylindrique et un segment interne fin alors que les cônes ont un segment externe effilé et un segment interne plus épais. La partie apicale des segments externes des bâtonnets, comme des cônes, est entourée par les invaginations de l'épithélium pigmentaire. Dans les cônes, la structure lamellaire consiste en un repli de la membrane plasmique (1000 à 2000 replis) tout le long du segment externe alors que, dans les bâtonnets, il s'agit d'un empilement de saccules (ou disques) (700 à 1000 disques), complètement séparées de la membrane plasmique (Figure 13). Chaque disque fait 10 à 15 μm d'épaisseur.

La distinction porte sur la fonction et la structure de ces deux types de photorécepteurs. Les bâtonnets sont très sensibles à la lumière, un photon suffit à les exciter, par contre, ils sont

saturés en lumière du jour. A l'opposé, les cônes sont moins sensibles que les bâtonnets mais fonctionnent parfaitement en lumière du jour. Chez l'homme, la couche des photorécepteurs est épaisse de 40 μm et présente un aspect strié. Elle contient 120 millions de bâtonnets et 6,3 à 6,8 millions de cônes. Chez le rat, on dénombre environ 1 cône pour 100 bâtonnets. Les bâtonnets sont les récepteurs à la lumière de faible intensité (vision de nuit ou scotopique) et ne distinguent pas les couleurs. Les cônes nécessitent une lumière plus intense pour fonctionner (vision de jour ou photopique, au-dessus de 10 cd.m^{-2}) et permettent la vision des couleurs.

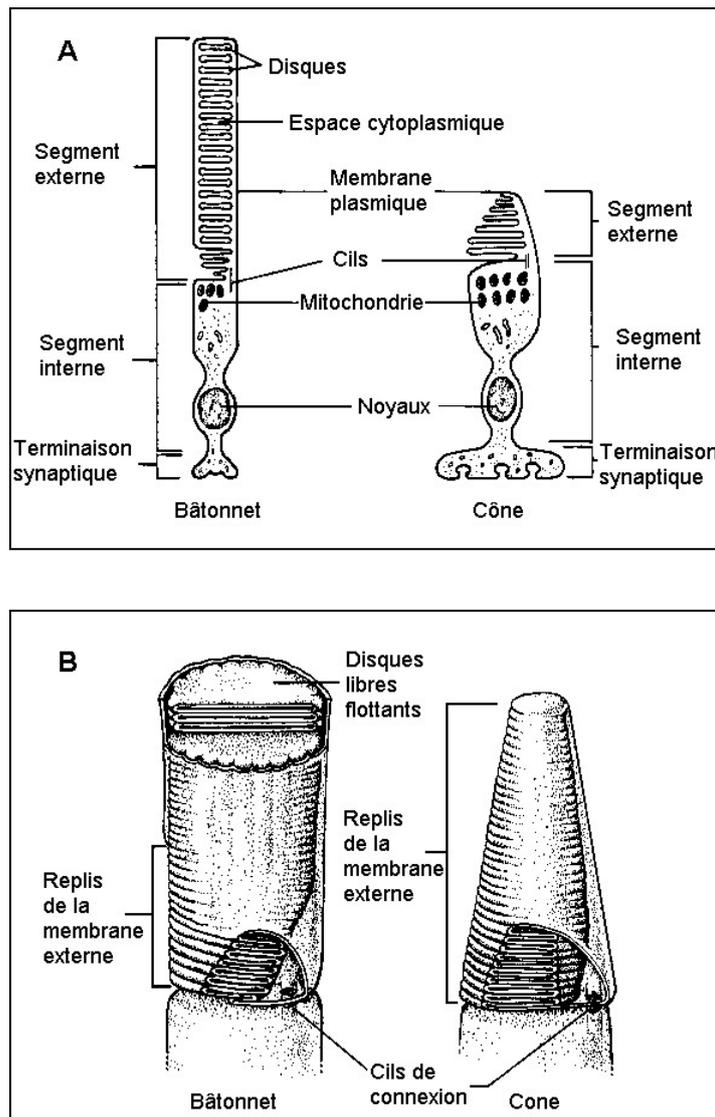
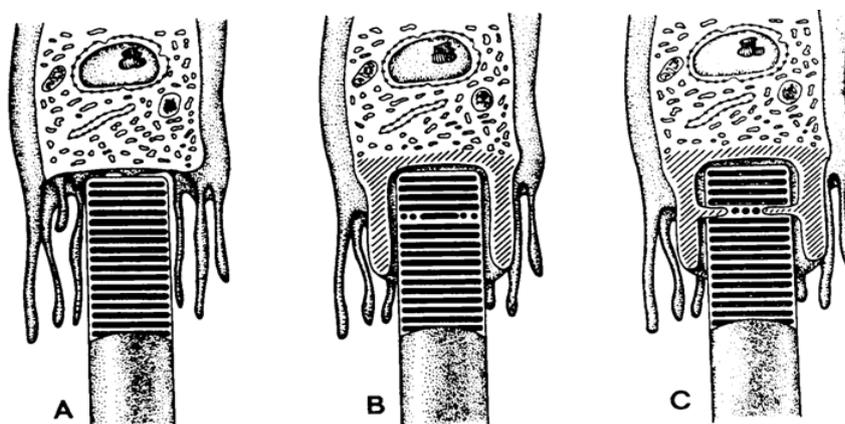


Figure 13: Bâtonnet & Cône.

Chez les vertébrés, il existe trois types fondamentaux de rétines: les rétines diurnes à cônes, les rétines nocturnes à bâtonnets et les rétines mixtes. Ces dernières sont les plus fréquentes. Toutefois, elles comprennent le plus souvent une telle prédominance de cônes ou de bâtonnets qu'il est habituel de les rattacher aux rétines de l'un ou l'autre type. Pendant de nombreuses années, la rétine de rat a été considérée à bâtonnets mais Cicérone (Cicérone, 1976) montre qu'il existe trois types de cônes chez le rat albinos. Plus tard, des études immunohistochimiques ont confirmé la présence de deux types de cônes, dont une majorité (93%) est sensible au vert et une minorité au bleu (Skoog, 1985).

3. Renouvellement des disques

Un renouvellement constant des segments externes existe chez les bâtonnets et les cônes (Figure 14). La perte des disques les plus externes (au sommet du photorécepteur) suivie de leur phagocytose et de leur dégradation par l'épithélium pigmentaire est équilibrée par l'assemblage de nouveaux disques à la base du segment externe (Yau et Nakatani, 1985). Cet équilibre est nécessaire pour le maintien d'une longueur constante des segments externes. La perte des disques chez le rat se produit suivant un cycle circadien (Goldman et al., 1980 ; Lavail, 1976). Dans le bâtonnet, le passage de l'obscurité à la lumière stimule la perte des disques alors que dans le cône la perte se produit lors de la transition lumière/obscurité. Il apparaît donc que l'enchaînement lumière/obscurité est essentiel pour maintenir le métabolisme des photorécepteurs de telle sorte que l'addition de disques à la base des segments externes soit équilibrée avec la perte au sommet (Szel et Rohlich, 1992 ; Lavail et Ward, 1978 ; Goldman et al., 1980). Il faut environ 10 jours pour un renouvellement de la totalité du segment externe (Wyse, 1980). La perte des disques et leur renouvellement ne sont pas nécessairement couplés et peuvent être régulés séparément (Schremser et Williams, 1995).



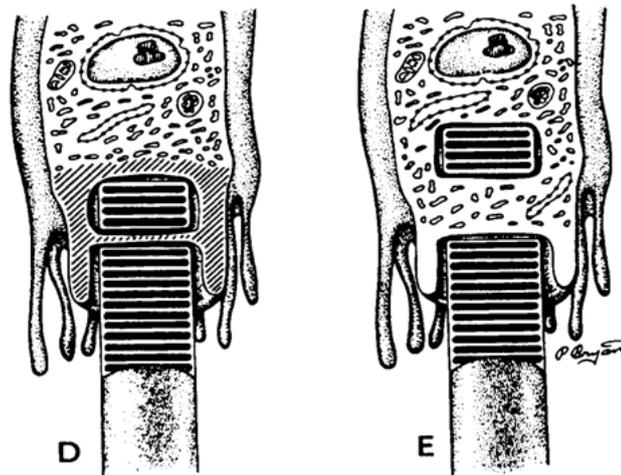


Figure 14 : Mécanisme de renouvellement des segments externe des photorécepteurs par excision et de phagocytose des segments externes des bâtonnets. (A) la partie distale des segments externes est entourée par les microvillosités apicales des cellules de l'EPR. (B) (C) après initiation de la phagocytose, les cellules épithéliales (hachuré) clive et sépare le paquet de disques membranaires. (D) la fusion des extrémités conduit à (E) l'individualisation d'un phagosome qui migre dans le cytoplasme de la cellule d'EPR pour fusionner avec des lysosomes (d'après Matsumoto et al., 1987).

4. Les Photopigments

Les photopigments sont des pigments instables qui subissent un changement chimique quand ils absorbent la lumière. Il existe quatre types différents de photopigments : un pour chaque type de cônes et un pour les bâtonnets. Le pigment visuel du bâtonnet est la molécule de rhodopsine. La rhodopsine est la protéine majeure des membranes des disques, également connu sous le nom de pourpre visuel. C'est un pigment visuel protéique photosensible présent dans les bâtonnets (Figure 15). La rhodopsine appartient à la famille des récepteurs couplés aux protéines-G, extrêmement sensibles à la lumière, et permettant la vision en conditions de faible lumière (Litmann, 1996).

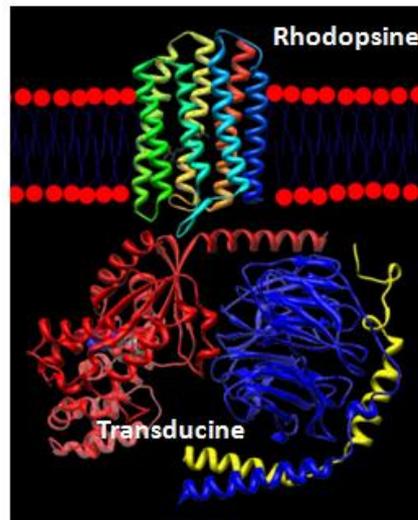


Figure 15: La Rhodopsine et la Transducine (modifié de : <http://en.wikipedia.org/wiki/File:Rhodopsin-transducin>).

Structure

La rhodopsine se compose de la fraction protéique « opsine » et un cofacteur réversible lié de façon covalente, « rétinol ». L'opsine est constituée de sept hélices α transmembranaires reliés entre eux par des boucles de protéines, elle lie le rétinol (un chromophore photoréactif), qui se trouve dans une poche centrale sur la septième hélice, à un résidu lysine. Le rétinol se trouve à l'horizontal par rapport à la membrane. Chaque disque de segments externes contient des milliers de molécules de pigment visuel. Environ la moitié des opsines est dans la bicouche lipidique. Le rétinol est produite dans la rétine à partir de la vitamine A, et de la bêta-carotène.

La rhodopsine absorbe plus fortement la lumière bleue-verte et apparaît donc rouge-violet, c'est pour cela qu'elle est aussi appelé "pourpre visuelle". Elle est responsable de la vision monochromatique dans l'obscurité (Stuart et Brige, 1996). Au niveau des cônes, les photopigments (iodopsines, aussi dénommé photopsines) sont composés de l'isomère 11-cis du rétinol relié à différentes molécules d'opsine. La spécificité de la molécule liée au chromophore, confère au photopigment un maximum d'absorption à ≈ 450 nm (iodopsine S), ≈ 520 nm (iodopsine M) ou ≈ 560 nm (iodopsine L), responsable de la sensibilité du cône à la lumière bleue (cônes "*Short*"), verte (cônes "*Medium*") ou rouge (cônes "*Long*") (Cicérone, 1976 ; Oprian et al., 1991 ; Merbs et Nathans., 1992).

5. La phototransduction

C'est la transformation de l'information lumineuse en signal électrophysiologique. Ce phénomène englobe l'ensemble des étapes qui vont de l'absorption du photon par un pigment photosensible jusqu'à l'initiation de la réponse électrophysiologique (Figure 16). La phototransduction a lieu exclusivement au niveau des segments externes des photorécepteurs. Le schéma de phototransduction des cônes est similaire à celui des bâtonnets mais avec des isoformes protéiques spécifiques des cônes. A l'obscurité, les canaux ioniques situés au niveau du segment externe sont maintenus ouverts grâce au guanosyl monophosphate cyclique (GMPc), localisé sur la face interne de la membrane plasmique. Les ions Na^+ et Ca^{2+} sont donc capable de passer à l'intérieur du photorécepteur. Ces cations, entrés dans la cellule, sont ensuite évacués au niveau du segment interne, par un mécanisme actif sous dépendance de l'hydrolyse de l'ATP, la pompe ionique Na^+/K^+ ATPase (Figure 16). A l'obscurité, les photorécepteurs sont donc traversés en permanence par un courant de cations, et, sont donc en permanence dépolarisés. Cet état, entraîne alors une libération continue de neurotransmetteur, le glutamate, au niveau de la fente synaptique entre le photorécepteur et les cellules plus internes de la rétine (cellules bipolaires).

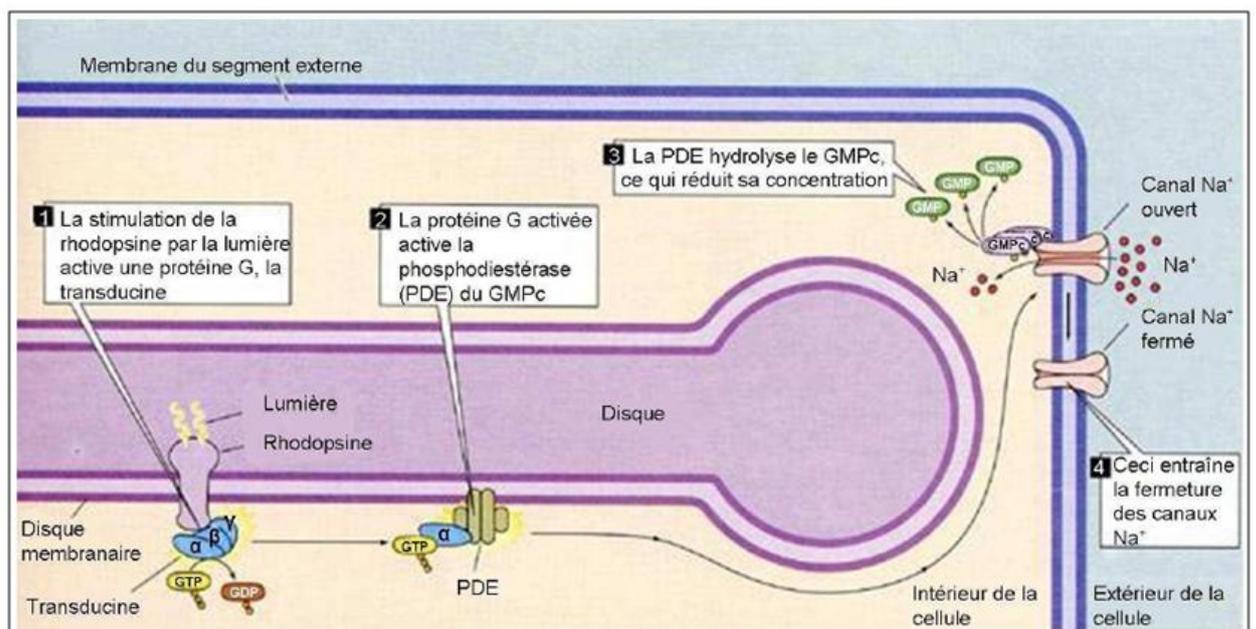


Figure 16: Mécanismes de la phototransduction. D'après Purves, Neurosciences (2001).

i. Activation par la lumière

α . Activation de la rhodopsine

Les événements photochimiques sont une étape indispensable de l'activation de la phototransduction et conduisent à l'isomérisation du pigment visuel (Figure 17). En effet, d'un point de vue purement physique, la rétine fonctionne comme un détecteur de photons. Or, quelle que soit la longueur d'onde des photons considérés, leur détection implique leur absorption. *In-vivo*, la manière la plus simple d'absorber des photons est de faire appel à une molécule photosensible. Ainsi, l'absorption de la lumière par la rhodopsine conduit rapidement à l'isomérisation *cis-trans* du rétinol. Les intermédiaires de cette isomérisation ont été définis par leurs spectres d'absorption, ce qui reflète des modifications structurales. Ces modifications prennent place vers le centre chromophore et sont ensuite propagées à la périphérie de la molécule, aboutissant à la séparation de l'opsine et du tout-*trans* rétinol.

Les états métarhodopsine I (M I, 480 nm) et métarhodopsine II (M II, 380 nm) sont atteints dès les premières millisecondes après l'absorption de la lumière (Kühn, 1984). Dans l'état M II, le chromophore est dans sa configuration tout-*trans* encore lié à la protéine par une base de Schiff. Cet état est stable pendant plusieurs secondes avant que le tout-*trans* rétinol ne se dissocie de la protéine. La rhodopsine photoexcitée (M II : Rh*) diffuse dans le plan de la membrane et rencontre une ou plusieurs molécules de transducine. Dans l'état M II, les domaines cytoplasmiques de l'opsine sont démasqués, permettant ainsi l'interaction avec d'autres protéines impliquées dans la cascade de phototransduction. C'est donc au cours de la transition M I à M II que l'information visuelle est transmise. Une succession d'événements électriques est alors initiée.

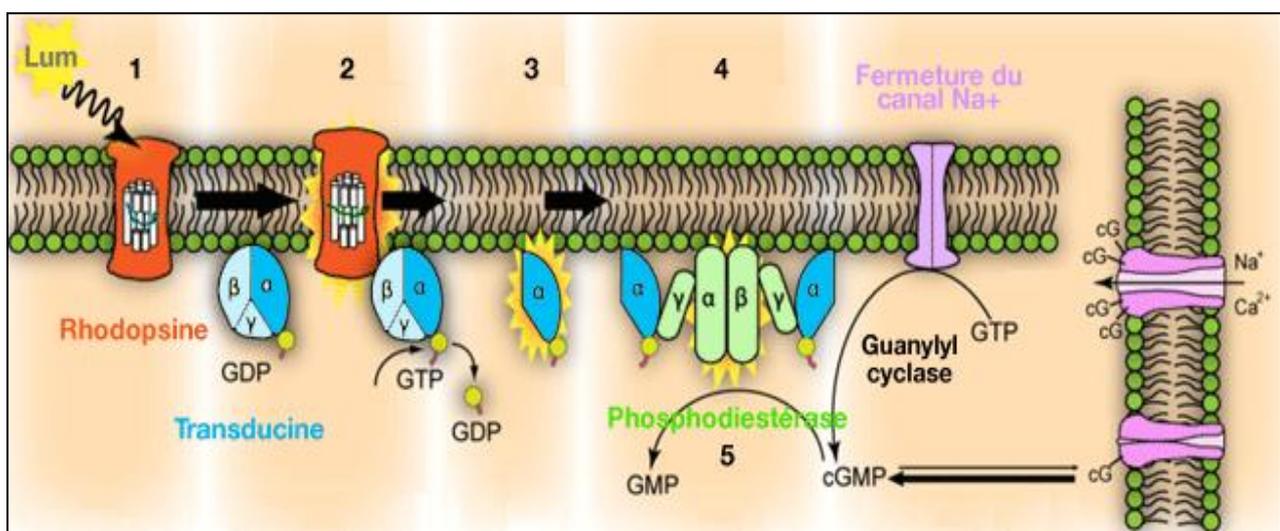


Figure 17: Représentation des étapes moléculaire dans la photoactivation. La rhodopsine activée (2) dévoile un site qui fixe une protéine G, la transducine composée de trois sous-unités (α , β et γ). La transducine activée, en fixant un GTP, libère sa fraction α (3). La fraction α de la transducine active à son tour la phosphodiesterase, composée elle-même de trois sous-unités (4), qui hydrolyse le GMP cyclique (Guanosine 3'-5' monophosphate cyclique) en 5' GMP (5). (Leskov et al., 2000).

β . Interaction rhodopsine-transducine

La transducine est une protéine G (aussi appelée protéine Gt) activée par la rhodopsine lorsque cette dernière est excitée par la lumière. Dans sa forme inactive, la sous-unité α de la transducine ($T\alpha$) est liée au GDP (Figure 17). Son interaction avec la rhodopsine activée catalyse l'échange du GDP en GTP entraînant une modification de la conformation de $T\alpha$. $T\alpha$ liée au GTP se dissocie alors des sous-unités $\beta\gamma$ de la transducine ainsi que de la rhodopsine pour donner la transducine activée (GTP- $T\alpha$) qui peut ainsi se lier à la phosphodiesterase. La rapidité et l'efficacité avec laquelle GTP- $T\alpha$ interagit avec la phosphodiesterase est fortement favorisée par sa dissociation des membranes discales.

γ . Interaction transducine-phosphodiesterase

La phosphodiesterase (PDE) est constituée de quatre sous-unités (α , β et 2γ). Les deux sous-unités γ sont des sous-unités inhibitrices. La forme native de la PDE ($PDE\alpha\beta\gamma_2$) est liée aux membranes des disques (Figure 17). En présence de son activateur, c'est-à-dire la transducine active (GTP- $T\alpha$), il se produit une diminution de l'affinité entre les sous-unités $PDE\gamma_2$ et $PDE\alpha\beta$ ainsi qu'une augmentation de l'affinité entre les sous-unités $PDE\gamma$ et $T\alpha$. Un complexe GTP- $T\alpha$ - $PDE\gamma_2$ se forme et se sépare de $PDE\alpha\beta$. Le complexe actif de PDE existe sous deux formes : une forme $PDE\alpha\beta$ dans laquelle l'enzyme active est totalement dissociée de la sous-unité inhibitrice, et une forme $PDE\alpha\beta-\gamma$ dans laquelle elle présente toujours une liaison avec un des inhibiteurs. Les 2 sous-unités inhibitrices ont des affinités différentes vis à vis de $PDE\alpha\beta$ (Deterre et al., 1987). La PDE active ($PDE\alpha\beta$) ou semi-active ($PDE\alpha\beta-\gamma$) hydrolyse le GMPc cytoplasmique en 5'-GMP entraînant ainsi une réduction de la concentration cytoplasmique en GMPc.

δ. Interaction GMPc-canal

La diminution de la concentration en GMPc cytoplasmique entraîne la fermeture des canaux GMPc-dépendants de la membrane plasmique (Figure 18). Les cations tels que Na^+ et Ca^{2+} ne peuvent plus circuler librement de l'espace extracellulaire vers le cytoplasme. Cette diminution de la perméabilité ionique entraîne une hyperpolarisation membranaire au niveau du segment externe qui se propage ensuite vers la terminaison synaptique. La conséquence est une diminution de la libération de glutamate au niveau synaptique.

ii. Amplification du signal

L'ensemble des événements de la phototransduction dure environ 100 ms et reste principalement localisé dans les disques membranes. Chaque cycle a son coefficient d'amplification : un photon active une molécule de rhodopsine qui peut activer jusqu'à 10^2 molécules de transducine. Ces molécules de transducine, à leur tour, activent 10^2 molécules de PDE qui sont responsables de l'hydrolyse de 10^5 molécules de GMPc (Bavik et al., 1992). L'hydrolyse du GMPc provoque la fermeture de 10^3 canaux Na^{2+} . Ainsi, un seul photon peut bloquer l'entrée de 10^6 ions Na^{2+} (Baylor et al., 1979).

iii. Désactivation de la cascade

La désactivation de la cascade de phototransduction nécessite une inactivation rapide de la PDE. Cette inactivation dépend de la durée de vie de la rhodopsine excitée et de la libération de la sous-unité inhibitrice de la PDE par la transducine.

α. Inactivation de la rhodopsine

Elle se déroule en deux étapes (Figure 19), dans la première étape, la rhodopsine activée (Rh^*) est phosphorylée sur plusieurs sites par la rhodopsine kinase (RhK) et une protéine kinase C (PKC) (Ohguro et al., 1995). Cette phosphorylation diminue la capacité de la rhodopsine à activer la transducine (Wilden, 1995). La phosphorylation de la rhodopsine est nécessaire pour bloquer la cascade enzymatique mais n'est pas suffisante.

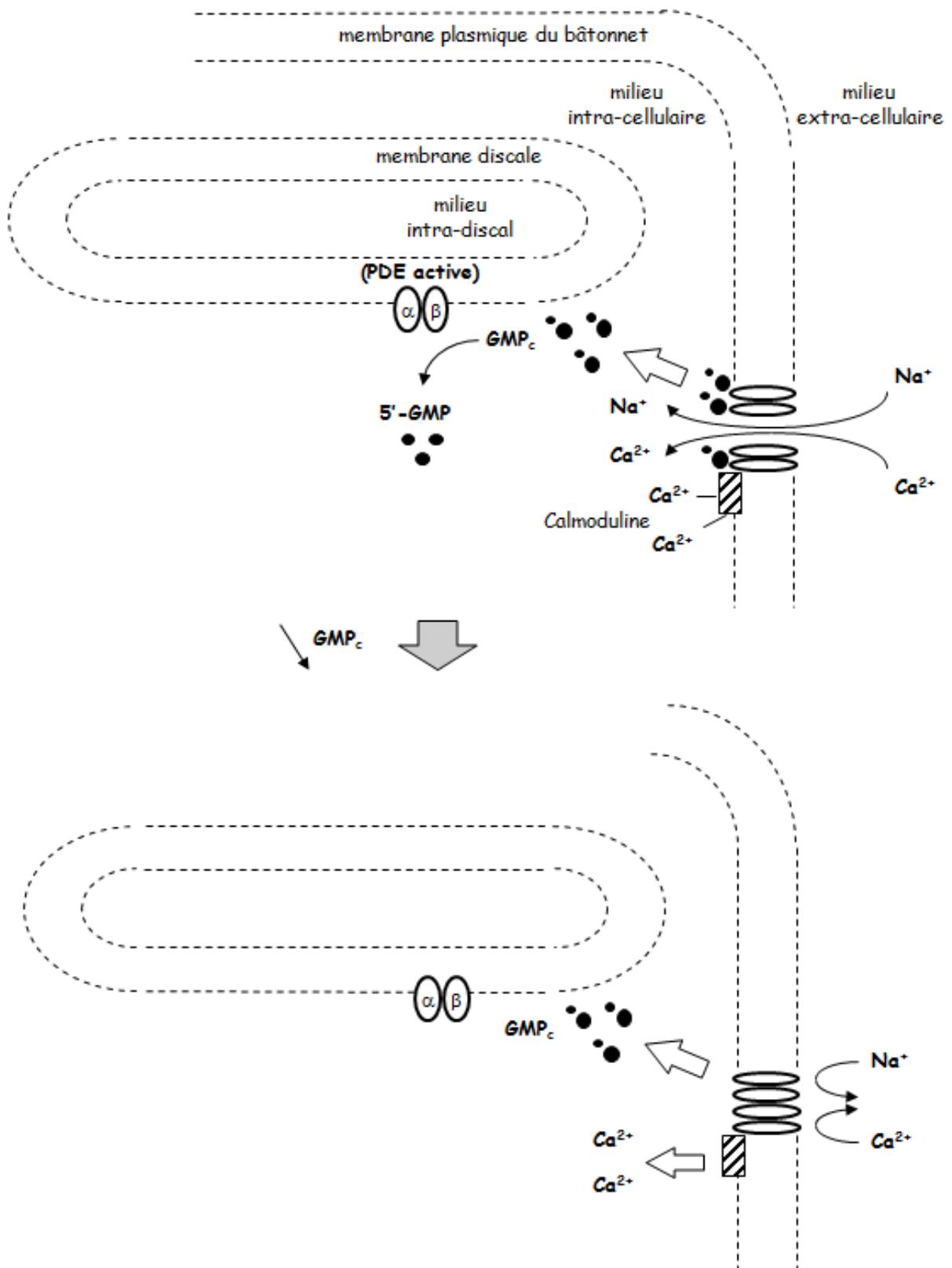


Figure 18 : Fermeture des canaux GMPC-dépendants.

Dans une deuxième étape, l'inactivation complète de la rhodopsine est assurée par sa liaison d'une protéine cytosolique, l'arrestine ou rétinol S-antigen (Wilden et al., 1986). Cette liaison empêche l'interaction de la rhodopsine avec la transducine.

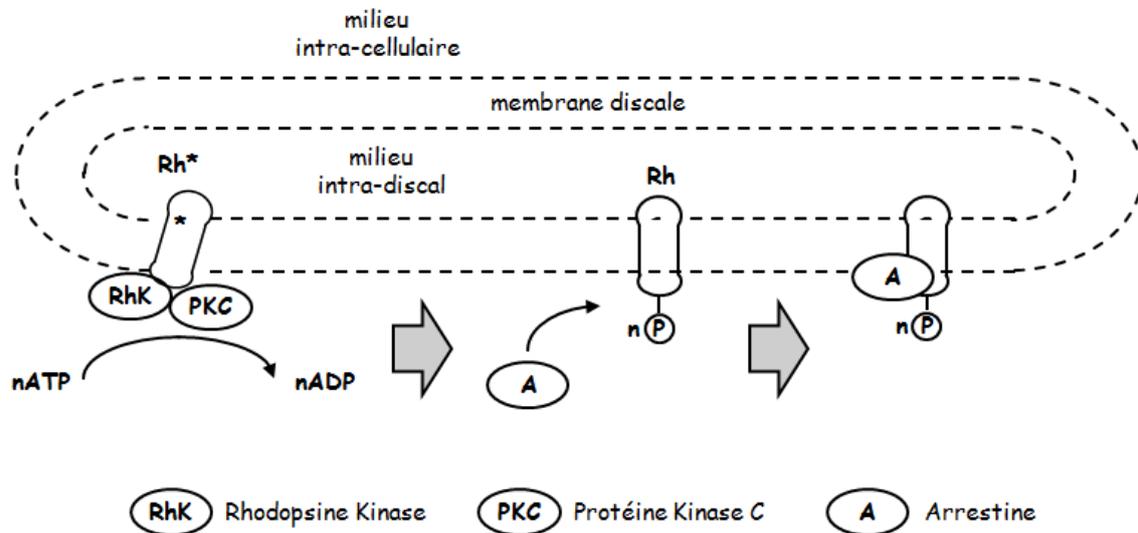


Figure 19 : Inactivation de la rhodopsine (Rh).

β. Inactivation de la transducine

Elle s'inactive elle-même par l'activité GTPase intrinsèque de sa sous-unité $T\alpha$. C'est l'interaction entre la transducine et les sous-unités γ de la PDE qui stimule l'activité GTPase (Figure 20). Après hydrolyse du GTP en GDP, la forme $T\alpha$ -GDP libère les sous-unités inhibitrices de la PDE. $T\alpha$ -GDP peut se recombinaison au complexe $T\beta\gamma$ pour redonner la transducine inactive prête à l'activation. Pour éviter le recyclage de la transducine régénérée, la rhodopsine doit être désactivée.

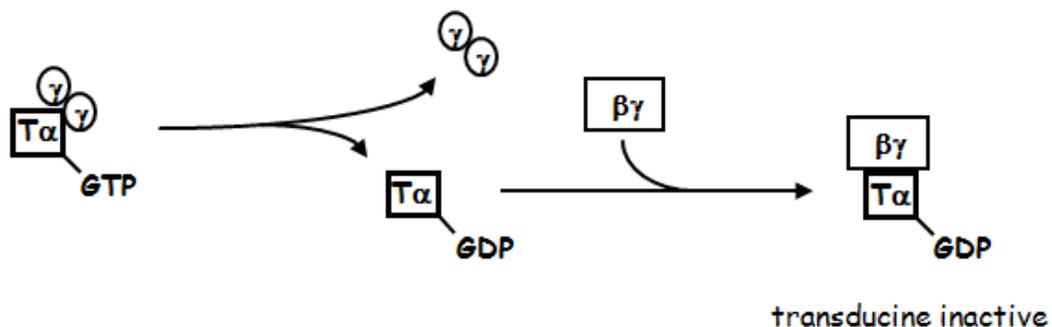


Figure 20 : Inactivation de la transducine (T).

γ. Inactivation de la phosphodiesterase

Cette inactivation nécessite une phosphorylation par la protéine kinase C (PKC) (Figure 21). L'activation de la PKC se fait via le système phosphoinositide. L'excitation par la lumière aboutirait à l'activation d'une phospholipase C. Cette enzyme hydrolyse le phosphatidylinositol, 4,5 biphosphate (PIP₂) en diacyl glycérol (DG) et inositol 1,4,5 triphosphate (IP₃). IP₃ agit en stimulant la libération de Ca²⁺ du réticulum endoplasmique. Le DG est un activateur de la PKC en augmentant son affinité pour les ions Ca²⁺.

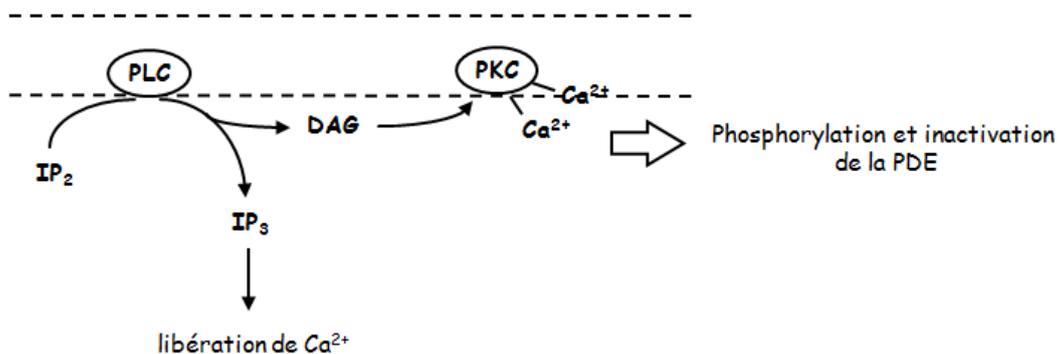


Figure 21: Inactivation de la phosphodiesterase (PDE).

δ. Réouverture des canaux GMPc-dépendants

Elle dépend de la restauration du taux de GMPc après l'inhibition de la PDE et l'activation de la guanylate cyclase ainsi que de la modification de l'affinité des canaux vis à vis du GMPc (Figure 22). Ces deux derniers phénomènes sont étroitement liés à la concentration en ions Ca²⁺. En effet, après la fermeture des canaux GMPc-dépendants, les ions Ca²⁺ ne peuvent plus pénétrer dans la cellule mais l'échangeur Na²⁺/ (Ca²⁺, K⁺) continue d'expulser des ions Ca²⁺. Il en résulte donc une diminution de la concentration cytoplasmique en Ca²⁺ qui aura deux conséquences :

1) la "Guanylate Cyclase Activating Protein" (GCAP) devient fonctionnelle et va activer la guanylate cyclase qui synthétise du GMPc à partir du GTP. La concentration cytoplasmique en GMPc augmente, le GMPc se lie aux canaux conduisant ainsi à leur ouverture.

2) la libération du Ca²⁺ par la calmoduline qui se dissocie du canal. Cette dissociation conduit à une augmentation de l'affinité du canal pour le GMPc, conduisant à la réouverture des canaux même à faible concentration en GMPc.

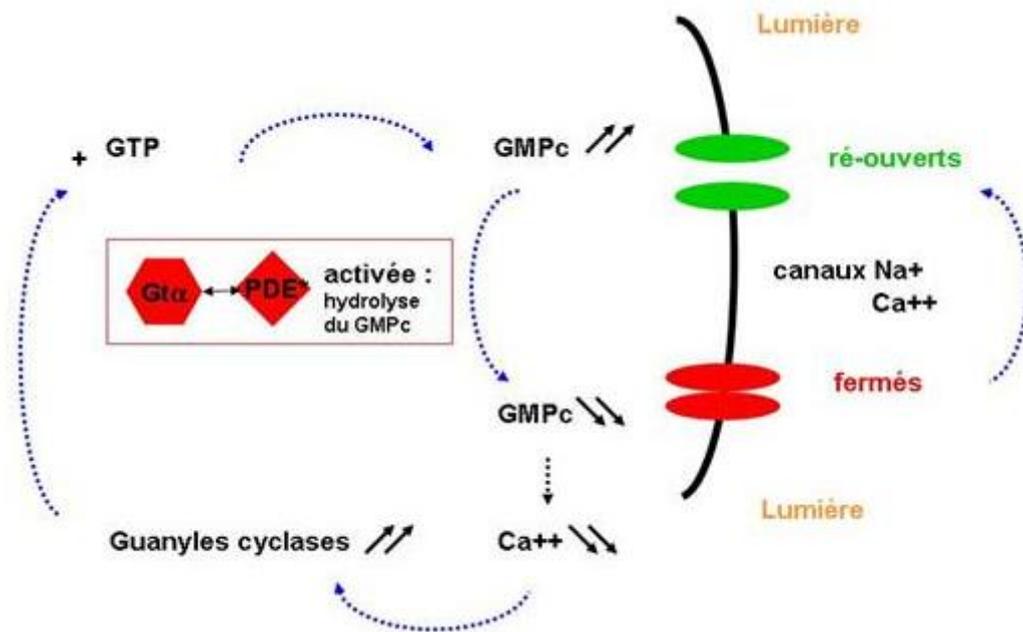


Figure 22 : Réouverture des canaux ioniques suite à l'activation de la Guanylate cyclase (GC) (d'après Florence Rigaudière et Jean-François Le Gargasson, La physiologie rétinienne, <http://lodel.demo.inist.fr/oeilephysiologiedelavision/index.php?id=215>)

iv. Régénération du photopigment

Le 11-*cis* rétinol est isomérisé en tout-*trans* rétinol, lors de l'absorption de la lumière par la rhodopsine dans le photorécepteur. Le tout-*trans* rétinol est alors externalisé dans le cytoplasme des segments externes via les protéines transporteur *ATP-Binding cassette retina* (ABCR), où il est alors rapidement réduit en tout-*trans* rétinol. Le tout-*trans* rétinol est véhiculé, lié à la *Cellular Retinol Binding Protein* (CRBP) avant d'être relargué dans la matrice interphotoréceptrice où il s'associe à une *Interstitial Retinol-Binding Protein* (IRBP). Cette protéine permet le transport du tout-*trans* rétinol jusqu'à l'épithélium pigmentaire et son internalisation dans les cellules épithéliales. Dans l'épithélium pigmentaire, le tout-*trans* rétinol est pris en charge par une CRBP. Il est alors estérifié par une *Lecithin Retinol Acyl Transferase* (LRAT). Les rétinyl esters servent de forme de stockage de la vitamine A et, selon les besoins, subir l'action d'un complexe enzymatique qui les hydrolyse en rétinol. L'énergie ainsi libérée est utilisée pour isomériser le tout-*trans* rétinol en 11-*cis* rétinol. Ce dernier est alors oxydé en 11-*cis* rétinol qui se lie à une *Cellular Retinal-Binding Protein* (CRALBP), puis à une IRBP pour être transféré dans les segments externes des bâtonnets, et

va enfin s'associer spontanément avec l'opsine et ainsi régénérer une molécule de rhodopsine (Saari et Bredberg, 1982 ; Saari et al., 1982).

A ce cycle viennent s'ajouter deux autres apports de rétinoïdes dans l'épithélium pigmentaire : 1) le tout-*trans* rétinol apporté par l'alimentation passe dans la circulation sanguine et peut être capté par l'épithélium pigmentaire. Dans la circulation systémique le rétinol est lié à un complexe protéique spécifique composé de la *Retinol-Binding Protein* (RBP) et de la Transthyrétine (TTR). La concentration sanguine du rétinol est extrêmement bien régulée et s'établit autour de 2 μM . Le rétinol lié à la RBP est internalisé par un récepteur protéique membranaire spécifique localisé sur la membrane baso-latérale des cellules de l'épithélium pigmentaire (Bavik et Busch, 1992 ; Kawaguchi et al., 2007), 2) le phénomène de phagocytose des disques des segments externes des bâtonnets par l'épithélium pigmentaire a pour conséquence un apport supplémentaire en rétinoïdes sous forme d'aldéhydes. Le temps de régénération dépend de la durée de blanchiment (Lewis, 1957 ; Perlman, 1978). Pendant la période de blanchiment la concentration en pigment visuel chute jusqu'à un état d'équilibre pour lequel la constante de régénération est égale à la constante de blanchiment. La régénération de la rhodopsine chez le rat nécessite 3 à 4 heures d'obscurité après un blanchiment complet (Perlman, 1978). Les réactions dans le cycle de l'iodopsine (pigment des cônes) sont très similaires à celles du cycle de la rhodopsine, seule la phase de récupération est beaucoup plus rapide.

D. Dégénérescences rétiniennes

Les dégénérescences rétiniennes sont caractérisées par une disparition lente et progressive des cellules photoréceptrices conduisant à une perte de vision et pouvant à terme aboutir à la cécité.

1) Les principales formes

a) Le décollement rétinien

Le décollement de la rétine (DR) est une pathologie peu connue du grand public (Figure 23). Son incidence a été estimée entre 8 et 12 pour 100 000 habitants/an (Haimann et al., 1982).

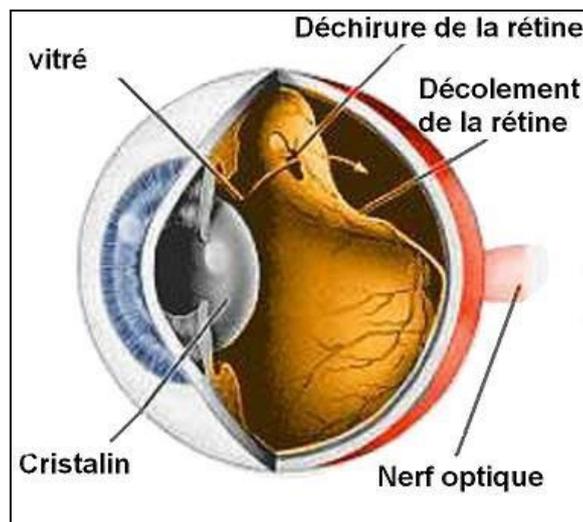


Figure 23: Décollement de la rétine.

Son évolution spontanée est grave car sans traitement la cécité est inévitable (Bonnet, 1989). Cette pathologie fut décrite pour la première fois en 1722 par Charles de Saint Yves, mais il faudra attendre le siècle suivant pour visualiser le Dr. Iwanoff au 19^{ème} siècle avance une théorie qui explique déjà toute la physiopathologie du décollement de rétine. Il pense que la condensation du vitré est la lésion primitive, et que son mouvement de retrait entraîne une blessure de la rétine, permettant au liquide vitréen de diffuser derrière la rétine et de la décoller. La connaissance des pathologies rétiniennes augmente parallèlement à l'amélioration des moyens pour examiner le fond de l'œil. Ainsi, en 1851 von Helmholtz (physiologiste et acousticien) découvre l'ophtalmoscope et permet ainsi un accès plus aisé à la rétine et deux ans plus tard, Coccius (ophtalmologiste allemand) rapporte que des déchirures rétiniennes sont présentes lors des décollements de rétine. Une fois sur deux, la déchirure donne des signes cliniques, le sujet perçoit un éclair lumineux dans son champ de vision ou des points noirs qui témoignent d'une petite hémorragie. Dans ce cas, il faut absolument consulter un spécialiste d'urgence.

Quand l'ophtalmologiste aperçoit une fragilité de la rétine chez des patients à risque, il peut alors "souder" les zones fragiles au laser pour éviter que la rétine ne se décolle. Mais il arrive que la déchirure ne donne aucun symptôme. C'est seulement quand la rétine commence à se décoller que la vision se modifie. Une partie du champ visuel devient noire ou grise, le plus souvent en bas, ce qui donne l'impression que la paupière remonte. A ce stade, il faut recourir à la chirurgie. Le succès de l'opération chirurgicale dépend de la rapidité d'exécution. Quand la rétine, décollée depuis moins de quinze jours, est encore souple, le patient récupère sa qualité de vision antérieure dans 95% de cas. Si l'on intervient plus tard, les cellules de la

macula risquent d'être altérées provoquant, de façon irréversible, la baisse visuelle ou la cécité.

b) Les rétinopathies pigmentaires

La découverte en 1989 du gène responsable de la RP d'une famille irlandaise, localisé sur le bras long du chromosome 3 marquait le point de départ de l'étude génétique et chromosomique des Rétinopathies Pigmentaires. Les rétinopathies pigmentaires (RP) sont des dégénérescences rétiniennes héréditaires. Elles peuvent être classées en deux groupes : les rétinopathies pigmentaires syndromiques, et les rétinopathies pigmentaires non syndromiques. En France, la rétinite pigmentaire touche quarante milles personnes environ, la rétine périphérique est détruite dans l'affection, contrairement à la dégénérescence maculaire. Il s'agit d'une mauvaise vision dès que la lumière est un peu faible, l'héméralopie est le premier signe ressenti par le patient. La baisse progressive du champ visuel qui va rétrécir, est le deuxième élément. Les symptômes sont bilatéraux. L'évolution va être très variable dans le temps et dans la gravité, chaque malade ayant une évolution particulière (Figure 24).

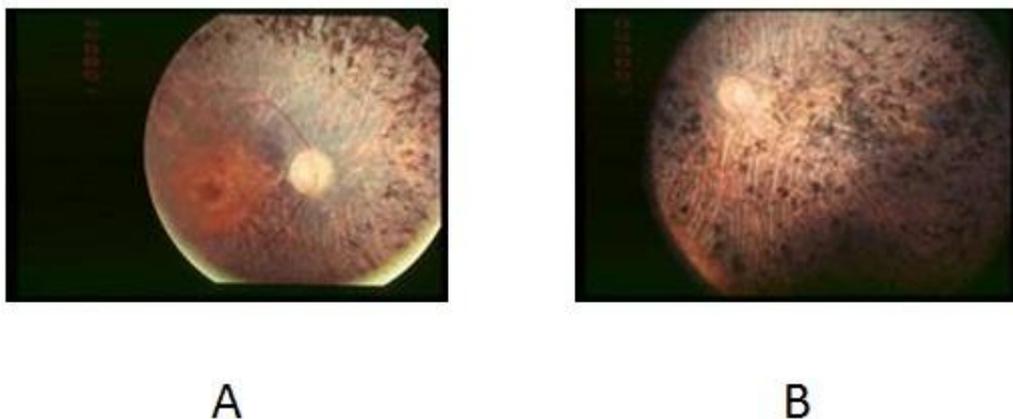


Figure 24 : Signes cliniques de la rétinite pigmentaire.

A: Vue d'une rétinite évoluée.

B: Vue d'une rétinite ultime.

i) Les rétinopathies pigmentaires syndromiques

Les rétinopathies pigmentaires syndromiques sont des RP associées à d'autres troubles d'origine génétique, elles représentent 15% des cas.

- **Le syndrome d'Uscher :** c'est une surdité est associ e   la rétinite pigmentaire qui va s'associer dans un deuxième temps   une perte de vision caus e par une r tinoopathie

pigmentaire. Ce syndrome se voit dans 12 % de l'ensemble des rétinopathies pigmentaires. L'existence de cette double déficience sensorielle à d'abord été observée dans des familles consanguines et plusieurs travaux ont, par la suite montré une hétérogénéité clinique qui déboucha sur une classification selon trois types en fonction du degré de surdité, de l'existence ou non de troubles de l'équilibre et du moment de l'apparition de la gêne visuelle fonctionnelle. On trouve 1/ le type I : surdité congénitale profonde bilatérale associée à des troubles vestibulaires importants, et le discours de ces patients est difficilement ou non compréhensible. La rétinopathie pigmentaire se manifeste à la fin de la première décennie de la vie. 2/ le type II : la surdité est entre modérée et profonde, le langage est en règle générale intelligible, avec absence de troubles vestibulaires. La rétinopathie pigmentaire se manifeste à la fin de l'adolescence. 3/ le type III : surdité progressive post-linguale, accompagnés de troubles vestibulaires (oreilles) variables et une RP dans la deuxième décennie de la vie du patient. Le syndrome de Usher touche environ 1 individu sur 25 000 et, est à l'origine de 3 à 6 % des surdités congénitales. Le syndrome de Usher représente 50% de la population sourde-aveugle aux USA (Boughman et al., 1983). L'hérédité du syndrome de Usher est autosomique récessive. Elle est définie lorsque la maladie atteint plusieurs enfants des deux sexes d'une même génération, alors que leurs parents (porteurs du gène) ne présentent pas l'affection. Seuls les individus ayant les deux allèles anormaux (paternel et maternel) sont malades.

- **Le syndrome de Bardet-Biedl :** associe une rétinite pigmentaire, un retard mental, une obésité, un hypogonadisme et une déformation des doigts. L'affection se transmet sur le mode autosomique récessif.

- **Le Fundus Albipunctatus :** on observe, à l'examen du fond de l'œil, de nombreux points jaunâtres, la cécité nocturne congénitale est précoce.

ii) Les rétinopathies pigmentaires non syndromiques

Les rétinopathies pigmentaires non syndromiques représentent 65% à 85% des cas suivant les auteurs. Leur prévalence est d'environ 1/4225 naissances en France (Puech et al., 1991) et 1/4000 aux USA (Berson et al., 1993) ce qui en fait l'une des principales causes de malvoyance. Les premiers symptômes de RP sont des troubles de la vision nocturne (héméralopie), ou, au contraire, une gêne à la lumière du jour. Le processus dégénératif va alors diminuer l'acuité visuelle (scotome). Sur un plan électrophysiologique, l'électrorétinogramme met en évidence une diminution progressive de la fonction rétinienne. Les signaux électrophysiologiques générés par la rétine en réponse à des stimulations

lumineuses sont réduits, et les temps de réponses ralentis (Berson et al., 1968). La plupart des RP sont transmises sur un mode mendélien, mais quelques unes sont transmises par des mutations mitochondriales ou par digénisme.

- **La rétinopathie pigmentaire autosomique dominante** (RPAD) représente 40 à 45% des cas. Elle est définie lorsque la maladie affecte plusieurs individus des deux sexes, sur deux générations au moins et, à fortiori, lorsqu'il existe une transmission père-fils. Un des deux allèles (gène paternel ou maternel) est anormal et suffit à l'expression de la maladie.

- **La rétinopathie pigmentaire autosomique récessive** (RPAR) représente aussi 40 à 45% des cas. Elle est définie lorsque la maladie atteint plusieurs enfants des deux sexes d'une même génération, alors que leurs parents (porteurs du gène) ne présentent pas l'affection. Seuls les individus ayant les deux gènes alléliques anormaux (paternel et maternel) sont malades.

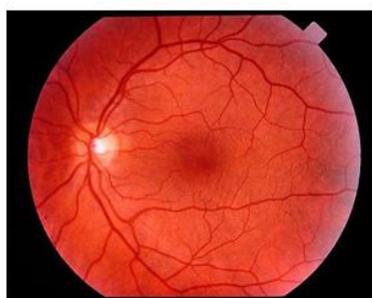
- **La rétinopathie pigmentaire récessive liée à l'X** représente moins de 10% des RP. Elle est définie lorsque la maladie affecte des sujets uniquement de sexe masculin, sur au moins deux générations, avec transmission dans la branche maternelle. Il n'y a jamais de transmission d'un père à son fils. Le gène anormal responsable de l'affection est porté par un chromosome X et est transmis par la mère.

- **La rétinopathie pigmentaire autosomique digénique** représente 1 à 2% des RP. Un enfant ne peut être affecté de la maladie que si deux différents gènes responsables de la RP, lui sont transmis simultanément. Le risque que les descendants d'une personne atteintes de la RP autosomique digénique soient rétinopathes est minime.

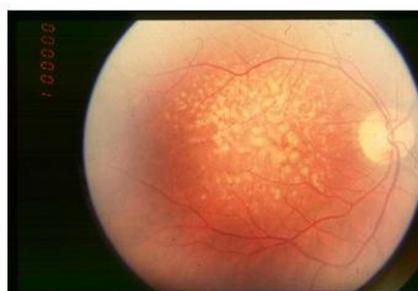
- **La rétinopathie pigmentaire mitochondriale** représente aussi un faible pourcentage des RP. Les mitochondries sont des organelles contenues dans le cytoplasme cellulaire. Le matériel génétique de ces organites provient toujours de la mère car les spermatozoïdes n'en contiennent pas. Certaines pathologies sont dues à des mutations de cet ADN mitochondrial, comme l'atrophie congénitale de Leber. (Wallace., 1988 ; Schwartz et Vissing, 2002).

c) La Dégénérescence Maculaire Liée à l'Age (DMLA)

C'est une altération maculaire qui se traduit par une baisse progressive de la vision centrale. La métamorphopsie (sensation de déformation des objets) est souvent le premier signe décrit par les patients (Figure 25). Les symptômes peuvent aussi se traduire par une baisse de l'acuité visuelle (Parier et al., 2008). Le nombre de cas de dégénérescences maculaires liées à l'âge augmente parallèlement avec l'augmentation de la longévité, atteignant 4% de la population entre 55 et 65 ans, 12% entre 65 et 75 ans et 30% après 75 ans (Coscas et al., 1991). C'est une affection qui débute après 50 ans, et qui atteint de façon sélective la partie centrale de la rétine, en donnant une destruction des cellules qui la composent. L'affection est souvent précédée par la constitution de petites taches jaunâtres ou "drusens" qui se trouvent disposées au centre de la rétine.



a) Fond d'œil d'un sujet sain.



b) DMLA présymptomatique: rétine d'un patient qui a de fortes probabilités de développer la maladie.



c) DMLA exsudative: DMLA avérée.



d) DMLA atrophique: DMLA évoluée.

Figure 25: Différentes formes de DMLA.

i) Les différentes formes

- La forme sèche ou atrophique qui représente 85-90% des cas. Il s'agit de la forme la moins grave. Elle laisse souvent persister une acuité visuelle de 2 à 3/10. A l'examen du fond de l'œil, on observe un amincissement très important de la rétine centrale. L'évolution de cette forme est lente. Elle est caractérisée histologiquement par la disparition progressive des

cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien (EPR), et par une atrophie de la macula issue de dépôt de Drusen (dépôts extracellulaires) au fond de l'œil. Ces Drusen apparaissent comme des amas ronds blanchâtres, localisés entre la membrane de Bruch et les cellules EPR. Elle se traduit à l'examen du fond d'œil par des plages d'atrophie des cellules EPR au sein desquelles les vaisseaux choroïdiens deviennent anormalement visibles. Elle évolue inexorablement, mais de façon très progressive, vers une extension des lésions qui vont englober la fovéa et entraîner une baisse de l'acuité visuelle sévère avec scotome (tâche aveugle dans le champ visuel) central (Figure 25, d). Il n'existe actuellement aucun traitement médical ayant démontré son efficacité dans la forme atrophique de la DMLA.

- **La forme exsudative** représente environ 10-15% des cas. A l'examen du fond de l'œil, elle se caractérise par l'existence d'hémorragies centrales. L'acuité visuelle est souvent limitée à 1/100 ou moins. L'évolution peut-être très rapide. Elle est caractérisée par la formation de néovaisseaux choroïdiens qui franchissent Les cellules EPR et se développent sous la rétine maculaire. Ces néovaisseaux entraînent un décollement exsudatif de la rétine maculaire, et étant plus fragiles que des vaisseaux sanguins classiques, ils conduisent à des hémorragies sous-rétiniennes et également des exsudats secs (Figure 25, c). Ainsi, la rupture de la communication entre les photorécepteurs et les cellules EPR conduit à la mort des cellules photoréceptrices. La forme exsudative de la DMLA est nettement moins fréquente que la forme atrophique mais entraîne des complications fonctionnelles plus sévères. En absence de traitement, la destruction des photorécepteurs est responsable d'une baisse d'acuité visuelle sévère et d'un scotome central définitif. Les traitements de la forme exsudative de la DMLA ont pour but de détruire les néovaisseaux ou de ralentir leur formation: la photocoagulation au laser consiste à utiliser un laser thermique pour coaguler les néovaisseaux ; le photothérapie dynamique utilise un laser (froid) en association avec l'administration par voie intraveineuse d'une molécule photosensible, la vertéporfine et les anti-angiogéniques tel que les anticorps monoclonaux (anti-VEGF) agissent sur des facteurs de croissance impliqués dans la formation des néovaisseaux (Parier et al., 2008). Toutefois, ces traitements restent limiter dans leur utilisation et peuvent avoir des effets secondaires non négligeables.

ii) Facteurs génétiques

Aucun gène spécifique n'a été identifié comme étant à l'origine des DMLA. Toutefois, certaines prédispositions génétiques semblent favoriser le développement de la maladie. En

effet le risque d'être atteint de DMLA est multiplié par quatre lorsqu'une personne de la famille proche est atteinte (klaver et al., 1998).

- Le gène de l'apolipoprotéine E : L'apoE, impliquée dans le transport des lipides, pourrait aussi intervenir, comme dans la maladie d'Alzheimer ou la maladie de Parkinson, avec certains allèles conférant un risque variable de développement de la DMLA. En effet, la comparaison de 116 patients présentant une DMLA exsudative avec une population témoin (168 personnes) a montré une différence de fréquence de porteurs de l'allèle E4 de l'ApoE. Ainsi, la fréquence de porteurs de cet allèle chez les patients atteints de DMLA exsudative (12,1%) est moindre par rapport au groupe témoin (28,6%). Un individu porteur de cet allèle présente donc un risque relatif d'être atteint 4,8 fois moindre qu'un individu non porteur de cet allèle E4 (Souied et al., 1998).

- Le gène de la Fibuline : Les fibulines sont identifiées comme étant une famille de protéines extracellulaire, largement exprimés dans les membranes épithéliales et dans les capillaires sanguins, elles sont responsables du développement de l'élasticité tissulaire. La fibuline-3 est reconnue responsable de la maculopathie dite « drusen dominants ». Une analyse systématique de fibulines 1 à 6 chez 402 patients atteints de DMLA a révélé 7 changements de codons dans la population DMLA contre 0 dans la population contrôle (Stone et al., 2004). Les auteurs concluent donc que la fibuline-5 est impliquée dans 1.7% des cas de DMLA.

- Le gène ABCR : Les protéines ABCR (ATP-Binding cassette retina) sont une famille de protéine transporteur nécessaire au déroulement du cycle visuel. ABCA4 est un membre de cette famille qui a pour rôle de permettre le transfert rapide, en fin de cascade de transduction, du tout trans rétinale libéré de l'opsine depuis le disque du photorécepteur vers le cytoplasme, où il rejoindra l'épithélium pigmentaire rétinien, siège de son renouvellement. Au cours des années 90, des mutations du gène ABCA4 ont été identifiées chez des patients atteints de DMLA. Certaines de ces mutations pourraient avoir un rôle de prédisposition à la DMLA exsudative.

d) La Rétinopathie Diabétique

Le diabète est une des principales causes de cécité en Europe. La prévalence est de 2% à 2,5% de la population française, 90% des patients ayant un diabète de type 2. Il y a diabète quand la glycémie à jeun est supérieure ou égale à 1,26 g.l⁻¹ à deux reprises (normes de l'ANAES). On estime qu'environ 40% des diabétiques sont porteurs d'une rétinopathie (90 à

95 % des diabétiques de type 1 ; et 20 % des diabétiques de type 2), ce qui représenterait environ 1 000 000 de patients en France. La rétinopathie diabétique (RD) est issue de la « maladie » du capillaire rétinien qui devient anormal et va avoir un comportement responsable de la pathologie oculaire. En effet, sous l'effet d'une hyperglycémie constante, des lésions sont induites au niveau des petits vaisseaux sanguins. Ce phénomène est appelé microangiopathie. Elle se caractérise par des anomalies structurales, telles qu'une disparition des péricytes (cellules qui entourent les capillaires) et un épaissement de la membrane basale des microvaisseaux, mais aussi par des anomalies fonctionnelles telles que l'augmentation de la perméabilité des vaisseaux (rupture de la barrière hémato-rétinienne) qui s'accompagne d'une fuite de protéines plasmatiques. Tout ceci entraîne l'apparition d'un œdème rétinien (généralement maculaire) qui va être responsable de la baisse de vision et une ischémie rétinienne entraînant l'apparition de néovaisseaux. Ces néovaisseaux seront responsables d'hémorragies dans le vitré, de voiles gliaux, de décollements de rétines, de cécité.

2) Apoptose et dégénérescence rétinienne

Mise en évidence

La perte de vision causée par des maladies dégénératives de la rétine est due à la mort des cellules rétiniennes. L'étude post-mortem de rétine de patients atteints de maladies neurodégénératives a permis de mettre en évidence que les photorécepteurs meurent par apoptose. L'accumulation de corps apoptotiques au niveau de la couche nucléaire externe a été mise en évidence par des techniques de microscopie électronique sur des rétines de patients atteints de DMLA (Nickells et al., 1996), de rétinopathies pigmentaire (Nickells et al., 1996 ; Carella et al., 2003) ou diabétiques (Bloodworth, 1962). La fragmentation internucléosomale de l'ADN, visualisée *in situ* par le marquage TUNEL a été observée sur des rétines de patients atteints de ces pathologies (Hammes et al., 1995 ; Xu et al., 1996 ; Dunaief et al., 2002). Elle est accompagnée d'une augmentation de l'immunomarquage de Fas (Dunaief et al., 2002). L'apoptose apparaît donc comme une voie commune de mort des photorécepteurs au cours des dégénérescences rétiniennes.

Dans le but de comprendre le mécanisme de la mort des cellules photoréceptrices par la lumière, Shahinfar et al. étudient les modifications morphologiques précoces des cellules rétiniennes et montrent, par microscopie électronique, qu'après exposition de rat Lewis albinos pendant 8, 16 ou 24 h à 1600 – 1800 lux, il y a densification du cytoplasme et

condensation de la chromatine (Shahinfar et al., 1991). Ces observations, ainsi que l'absence de réactions inflammatoires et l'effet protecteur de la cycloheximide (inhibiteur de la synthèse protéique) suggèrent un mécanisme apoptotique. Plus tard, le marquage *in situ* des fragments d'ADN (marquage TUNEL) confirment l'apoptose des cellules photoréceptrices au cours des dégénérescence rétinienne induites par la lumière (Abler et al., 1996).

E. Modèle de photodégénérescence rétinienne

Nous nous sommes intéressés à un modèle expérimental qui est le modèle de dégénérescence rétinienne induite par la lumière (photodégénérescence). Chez le rat, O'Steen et Donnelly ont montré que les rats albinos Wag/Rij présentent une réduction plus importante de la couche nucléaire externe que les rats albinos Sprague-Dawley suite à une exposition de 24h à une lumière de 4500 lux (O'Steen et Donnelly, 1982). La souche Wag/Rij est également plus sensible que la souche Fischer (F344) (Lavail et al., 1987). Les rats Lewis et Buffalo sont moins sensibles que les souches Wistar et Fisher (Borges et al., 1990). O'Steen et al., ont montré que les lésions rétinienne induites par la lumière dépendent de l'âge du rat au moment de l'exposition. Alors que des rats âgés de 3 à 4 semaines ne sont pas sensibles aux lésions induites par la lumière, des rats âgés de 6 à 7 semaines présentent des modifications de structure de la rétine centrale. A 8 semaines les rats présentent une altération des photorécepteurs dans 80% de la rétine périphérique, et, chez le rat de 16 à 23 semaines 95% des photorécepteurs sont altérés par l'exposition à la lumière (O'Steen et al., 1974). Chez le singe, une forte sensibilité à la lumière est observée pour des rétines de nouveau nés (Messner et al., 1978). Il semble que pendant la phase de maturation, la rétine soit très sensible aux effets induits par la lumière, puis cette sensibilité diminue pour réaugmenter avec l'âge (Malik et al., 1986 ; Penn et al., 1985 ; Rapp et al., 1990).

En revanche, les conditions d'élevage avant l'exposition à la lumière jouent un rôle important dans la sensibilité de la rétine à la lumière (Penn et al., 1987). En effet, des animaux élevés en lumière cyclique sont beaucoup plus résistants aux agressions par la lumière que ceux élevés à l'obscurité (Noell, 1971). Des animaux élevés en lumière cyclique faible (300 lux) sont plus sensibles que des animaux élevés en lumière cyclique plus intense (800 lux) (Penn et al., 1987). Cette variation de sensibilité est attribuée à la variation de la composition biochimique des photorécepteurs en fonction des conditions d'éclairage. Ainsi, les effets délétères de la lumière sur la rétine dépendent de la température du corps de l'animal au moment de l'exposition. Des lésions plus graves sont observées lorsque cette température est

élevée au dessus de la normale (Noell et al., 1966 ; Rinkoff et al., 1986). Néanmoins, il a été montré qu'une hyperthermie 10 à 24 heures avant l'exposition entraînait la production de "heat shock protein" et fournissait une protection contre les atteintes induites par la lumière (Remé et al., 1991 ; Tytel et al., 1989).

a. Mécanismes dégénératifs

La lumière peut affecter les tissus biologiques par trois mécanismes différents : 1) *les effets mécaniques* qui sont liés à une exposition courte d'une intensité élevée, 2) *les effets thermiques* qui augmentent l'énergie de rotation et/ou de vibration au niveau moléculaire. Quand la quantité d'énergie libérée par l'exposition à la lumière est supérieure à la quantité d'énergie qui peut être dissipée par le milieu environnant, il se produit une augmentation de la température. Si celle-ci est supérieure à 10°C, elle entraîne la dénaturation des protéines et des lésions tissulaires (Clarke et al., 1969 ; Ham et al., 1979). 3) *les effets photochimiques* qui se produisent lors d'exposition prolongée aux longueurs d'onde de la région UV proche et visible du spectre. Ils n'induisent pas d'augmentation de la température de plus de quelques degrés Celsius au dessus de la normale.

C'est en 1966 que Noell (Noell et al., 1966) met en évidence chez le rat des lésions rétiniennes non thermiques après une exposition à la lumière. Pour initier une réaction photochimique, un photon de longueur d'onde spécifique doit être absorbé par une molécule (chromophore). Cette absorption conduit la molécule à un état excité instable et pour revenir à un état stable, cette molécule interagit avec d'autres molécules entraînant la formation de radicaux libres. Les radicaux libres sont des molécules ayant un électron non apparié sur leur orbitale électronique, ce qui les rend très instables. Leur pathogénicité provient de leur rôle de médiateur entre l'oxygène et les biomolécules. Dans des conditions physiologiques normales, les radicaux libres sont pris en charge par des systèmes de défense enzymatique (Superoxyde Dismutase ou SOD, Catalase, Glutathion peroxydase) et non enzymatiques (antioxydants tels que les vitamines E, C ou A). Dans des conditions de surproduction de radicaux libres, qui conduisent à un stress oxydant, comme c'est le cas lors d'une exposition à la lumière, les systèmes de défenses sont dépassés et les radicaux libres exercent leurs effets néfastes conduisant à l'oxydation des lipides, des protéines et de l'ADN.

La rétine est tout particulièrement sensible au stress oxydant car 1/ elle contient de nombreux chromophores; 2/ elle est en permanence exposée à la lumière, de part sa fonction

3/ c'est une grande consommatrice d'oxygène (Braun et al., 1995a, b), et, 4/ elle est riche en acides gras polyinsaturés qui sont des cibles privilégiées des radicaux libres (Bazan et al., 1990 ; Sykes et al., 1981). L'implication des radicaux libres dans la photodégénérescence rétinienne a été confirmée indirectement par l'utilisation de piègeurs de radicaux libres ou d'antioxydants tels que la diméthylthiourée (Organisciak et al., 1992 ; Ranchon et al., 1999), l'EGb 761 (Ranchon et al., 1999) le Phényl-n-ter-Butyl-Nitrone (Ranchon et al., 2001 ; Ranchon et al., 2003) qui protègent à la fois la structure et la fonction de la rétine contre les lésions induites par la lumière.

La rétine possède un taux d'acides gras polyinsaturés (lipides) particulièrement élevé. Les acides gras polyinsaturés représentent 60% des acides gras rétinien et, l'acide docosahéxanoïque (DHA) est le plus abondant (Daemen et al., 1973 ; Anderson et al., 1972). En effet, le DHA représente 50% des lipides totaux des membranes des segments externes des photorécepteurs (Fliesler et al., 1983). L'enchaînement malonique () caractéristique de ces acides gras polyinsaturés confère aux atomes d'hydrogène di-allyliques de -CH₂-malonique, une très grande mobilité les rendant particulièrement sensibles aux attaques par les radicaux libres. Il se forme alors des radicaux lipidiques L[•] (LH + R[•] (ou hν) → L[•] + RH) qui en captant une molécule d'oxygène, deviennent des radicaux lipoperoxydes (L[•] + O₂ → LOO[•]) qui captent un atome d'hydrogène sur une chaîne lipidique voisine intacte (LOO[•] → LH → LOOH + L[•]). Un cycle d'autoxydation lipidique est ainsi amorcé, destructeur de biomembranes. La peroxydation conduit à des pontages covalents anarchiques intra et inter molécules, lipide-protéine ou lipide-acide nucléique, à la formation d'isomères d'acides gras polyinsaturés, à la formation de dérivés multioxygénés et à la dislocation de chaîne carbonée. On conçoit sans peine que de tels pontages puissent entraîner des désordres considérables dans les propriétés physico-chimiques des couches lipidiques qui subissent de telles oxydations ainsi que dans les propriétés fonctionnelles des macromolécules avoisinantes. La peroxydation lipidique a été mise en évidence dans la dégénérescence rétinienne induite par la lumière. En effet, l'exposition à la lumière entraîne une diminution des taux de DHA rétinien (Pepe et al., 1994 ; Wihlmark et al., 1997). Une alimentation riche en acide gras polyinsaturés (n-3) augmenterait la sensibilité de la rétine à la lumière (Koutz et al., 1995), mais une étude plus récente ne semble pas confirmer ces premières observations (Wang et Saito, 2001). Plus récemment, Demontis et al. ont montré que cette peroxydation a lieu à la fois dans le segment externe et interne de photorécepteurs (Demontis et al., 2002).

Les **protéines** sont aussi des cibles de ces oxydations radicalaires. Les protéines les plus sensibles aux attaques radicalaires sont surtout celles qui comportent un groupement

sulfhydryle (SH). C'est le cas de nombreuses enzymes cellulaires et protéines de transport qui vont ainsi être oxydées et inactivées. La méthionine, l'histidine, le tryptophane, la tyrosine et la cystéine sont les principaux acides aminés affectés dans tous les cas, que ce soit comme acides aminés libres ou dans les peptides. L'oxydation des acides aminés à des sites clés conduit à la perte de la stabilité conformationnelle entraînant une inactivation de certaines enzymes ou à leur destruction. L'oxydation des protéines rétiniennes peut aussi être due à l'action de certains métabolites de dégradation des lipides oxydés, tel que le 4-Hydroxynonanal (4-HNE) suite à l'oxydation du DHA (Hartley et al., 1997). Lors d'une exposition à la lumière, le taux de protéines oxydées par le 4-HNE augmentent (Tanito et al., 2005 ; Tanito et al., 2006) parmi lesquelles est retrouvée la protéine G transducine (Tanito et al., 2002). L'ADN est la mémoire de toute la composition biochimique des êtres vivants. Il s'agit d'une molécule très sensible à l'attaque par les radicaux de l'oxygène. Parmi les acides nucléiques, la guanine est la principale base détruite. En effet, une exposition à la lumière induit la production de 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) qui est une guanine oxydée (Organisciak et al., 1998).

b. Mécanismes moléculaires

Il est maintenant reconnu que la lumière induit la mort des photorécepteurs par apoptose. Bien que les mécanismes moléculaires ne soient pas encore totalement identifiés, certains points ont été mis en évidence.

L'implication **des caspases** dans la photodégénérescence reste aussi très controversée. Par exemple, chez la souris albinos Balb/c, une exposition à une lumière blanche de 2 heures à 13000 lux induit une augmentation de l'expression de la caspase-1, alors qu'une exposition de même spectre et de même durée à 5000 lux ne montre aucune activation des caspases, mais plutôt une activation des calpaines (Donovan et al., 2001 ; Donovan et Cotter, 2002). Par ailleurs, chez les même souris Balb/c, une exposition à la lumière verte de 3500 lux, augmente l'expression de la caspase-1 (Wu et al., 2003). Alors que l'expression de la caspase-3 ne varie pas lors d'une exposition à la lumière blanche (Li et al., 2003), elle augmente lors d'une exposition de même durée à la lumière bleue et, est accompagnée d'une augmentation de son activité (Wu et al., 2002). Il est donc vraisemblable que l'implication de l'une ou de l'autre des familles de protéases soit dépendante du modèle utilisé (intensité/spectre de la lumière et souche animale).

L'élévation de la concentration intracellulaire du **calcium** peut être responsable de la mort neuronale (Shimohama et al., 1991 ; Lee et al., 2000 ; Yanagisawa et al., 1983). Dans la rétine, la concentration intracellulaire du calcium augmente lors d'une exposition à la lumière (Donovan et al., 2001). Cette augmentation aurait pour origine la synthèse d'oxyde nitrique (NO) suite à l'activation de la NOSynthase (NOS). Le NO, ainsi synthétisé, activerait la guanylate cyclase qui est à l'origine de la production de GMPc et de l'augmentation de sa concentration. Ce dernier se fixe sur les canaux membranaires GMPc-dépendant des segments externes des photorécepteurs, et entraîne leur ouverture et donc l'entrée de calcium. Le calcium intracellulaire est un puissant messager secondaire qui affecte de nombreuses molécules sensibles au calcium, comme par exemple les calpaines (Cong et al., 1989). Le rôle du calcium dans la photodégénérescence rétinienne a été confirmé par l'utilisation d'un inhibiteur exogène de canaux calciques le D-diltiazem (Frasson et al., 1999 ; Vallazza-Deschamps et al., 2005). Ce dernier injecté avant l'exposition à la lumière, permet de réduire le nombre de noyaux apoptotique dans la couche nucléaire externe (Donovan et Cotter, 2002).

La famille Bcl-2, qui est connu pour contrôler la perméabilité (Sharpe et al., 2004) et l'intégrité de la mitochondrie (Donovan et Cotter, 2004), jouerait un rôle important dans l'apoptose des photorécepteurs induits par la lumière. Bcl-x_L, membre anti-apoptotique de la famille Bcl-2, est surexprimé dans les photorécepteurs de souris exposés à la lumière vive et, sa suppression conduit à une augmentation de la sensibilité de la rétine à la lumière suggérant que Bcl-x_L est impliquée dans la survie des photorécepteurs (Zheng et al., 2006). La suppression conjointe des gènes de Bax et Bak, qui sont des membres pro-apoptotiques de la famille Bcl-2, a un effet protecteur sur la photodégénérescence supérieur à une simple suppression de Bax. Bax et Bak jouent donc un rôle dans l'induction de l'apoptose (Hahn et al., 2004). L'expression ectopique de Bcl-2 sous direction du promoteur de la rhodopsine protège contre une exposition de 1500 lux pendant 14 jours (Chen et al., 1996). Toutefois, par la suite, il a été suggéré que cette protection était due à une diminution de la quantité de rhodopsine (Joseph et Li., 1996). Plus récemment, la surexpression d'un inhibiteur de Bcl-2 (EAT/Mcl-1) dans la rétine sont moins sensibles aux effets délétères induits par une exposition à la lumière (Shinoda et al., 2001).

AP-1 est un facteur de transcription dimérique composé de deux membres de la famille Jun (Jun, JunD), ou d'un hétérodimère résultant d'un membre de la famille des protéines Jun et un membre de la famille c-Fos (c-Fos) (Eferl et Wagner, 2003). Il n'entre pas directement en jeu dans la cascade de l'apoptose mais, de par son activité de transcription, AP-1 est capable de réguler certains gènes pro ou anti-apoptotiques. Lors d'une exposition à

la lumière, il y a augmentation de la synthèse de deux protéine de AP-1, Jun et Fos (Grimm et al., 2000) ainsi que de la fixation d'AP-1 sur l'ADN (Hafezi et al., 1999 ; Wenzel et al., 2000). Les souris *c-fos*^{-/-} présentent une structure et une fonction rétinienne normale (Kueng-Hitz et al., 2000) ainsi qu'une très grande résistance à la lumière (Hafezi et al., 1997 ; Wenzel et al., 2000). Fos semble donc être un membre essentiel à l'activité d'AP-1. Des mutations invalidantes sur JunD ou Jun ne modifient pas la sensibilité de la rétine à la lumière (Grimm et al., 2000).

Approche Expérimentale

I. Rat de laboratoire

A. Définition

Un rat de laboratoire est un rat de l'espèce *Rattus norvegicus* qui est élevé et détenu pour la recherche scientifique (Figure 26). Des rats de laboratoire ont servi comme modèle animal important pour la recherche en psychologie, en médecine, et d'autres domaines. Les expérimentations dans notre laboratoire sont réalisées sur des rats albinos Wistar, avec pour chaque expérimentation un sexe ratio de 50:50. Les animaux sont élevés en lumière cyclique faible (<10 lux ; 12 heures de lumière/12 heures d'obscurité) (Photomètre S 350, United detector Technology, USA) et sont libres dans les cages où ils disposent de nourriture et d'eau à volonté.



Figure 26: Le rat de laboratoire albinos.

B. Historique

Les rats ont été utilisés dans la recherche scientifique depuis 1906, à l'initiative du physiologiste américain Henry Donaldson. Il a créé une lignée nombreuse et facilement reconnaissable d'albinos (poil blanc, oeil rouge), robuste, en tout point identique à ses cousins européens (pour que ses les expériences menées sur eux soient également reconnues en Europe). L'idée d'utiliser des rats est venue des manifestations parfois violentes des défenseurs des animaux, à l'encontre de la vivisection menée sur des chats ou des chiens. Le Rat, petit, peu cher, se multipliant vite, et sans défenseurs acharnés, s'est imposé comme le cobaye idéal. Les chercheurs réalisent vite quel est le potentiel de ces petites bêtes : elles se reproduisent rapidement, s'adaptent très rapidement à n'importe quel environnement, sont intelligentes, s'élèvent facilement en captivité, ce qui a amené à les mettre au profit de la science. Le rat serait le premier animal élevé en captivité dans un but expérimental. Il en est

devenu l'une des espèces les mieux connues scientifiquement. Avec la souris commune (*Mus musculus*), il fait même partie des très rares espèces dont le génome a été totalement séquencé, ce qui contraste avec la situation de la plupart des autres murinés (sous-famille de la famille des Muridés), qui sont au contraire très peu étudiés.

C. Modèle de Photodégénérescence

Âgés de 45 jours, les rats albinos Wistar sont adaptés à l'obscurité une nuit avant d'être exposés à la lumière. Ils sont placés dans une cage située dans une boîte à lumière dont les parois sont peintes en blanc. Cette boîte est équipée de quatre tubes fluorescents (blanc industrie de 18 W, température de couleur de 4100°K) placés sur la face supérieure. La lumière fluorescente utilisée fournit un éclairage de 2700 lux (4 lampes) ou de 3400 lux (5 lampes) dans le plan de la pupille du rat. Cette valeur est une moyenne de quatre mesures effectuées dans quatre directions différentes (Photomètre S 350, United detector Technology, USA). Deux ouvertures en haut et en bas de la boîte à lumière permettent une circulation d'air et le maintien de la température à 25 ± 1 °C. Les animaux sont libres dans les cages où ils disposent de nourriture et d'eau à volonté. La durée d'exposition varie en fonction des expérimentations et, est au maximum de 24 heures.

II. Anesthésie

Les rats sont anesthésiés par injection intramusculaire d'un mélange de kétamine (Imalgène®) à raison de 150 mg/kg et de Xylazine® à 6 mg/kg.

III. Traitements

A. Inhibiteurs synthétiques des caspases

Ils sont composés de groupements chimiques du type benzyloxycarbonyl (z) ou acétyl (Ac) et aldéhyde (CHO) ou fluorométhylcétone (fmk). Les deux premiers groupements, z et Ac, rendent les inhibiteurs capables de franchir les membranes cellulaires en bloquant les fonctions NH₂ et COOH terminales des protéases cibles, alors que les dérivés aldéhydes (CHO) rendent les inhibiteurs réversibles. Tandis que les composés fluorométhylcétones (fmk), qui réagissent avec la cystéine du site actif des protéases, rendent les inhibiteurs irréversibles. Les inhibiteurs synthétiques des caspases sont généralement constitués de 4 résidus d'acides aminés dont l'aspartate en position P1, imitant ainsi le site de clivage des

substrats naturels des caspases. La structure générale des ces inhibiteurs peptidiques peut être ainsi décrite: z/Ac-XXXD-CHO/fmk (X définissant un résidu d'acide aminé). La spécificité d'inhibition des caspases est déterminée par la composition en acide aminé de l'inhibiteur (Garcia-Calvo et al., 1998). Il faut noter que seules les caspases activées sont capables d'être inhibées. Il existe une compétition entre le substrat des caspases et l'inhibiteur.

B. Préparation des inhibiteurs des caspases

Les inhibiteurs des caspases que nous avons utilisés proviennent de Calbiochem (VWR, France) ou Biovision. Ces inhibiteurs se présentent sous forme de poudre et sont solubilisés dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) pur selon les critères du fabricant. Les solutions ainsi obtenues sont alors diluées dans du PBS1X afin d'obtenir une concentration finale de DMSO de 2 ou 4 %. En effet, nous avons préalablement démontré que la DMSO à 2, 4 et 10 % n'a pas d'effet toxique sur la rétine.

- **Z-IETD-FMK** : inhibiteur spécifique de la caspases-8 (0,2 mM)
- **Z-LEHD-FMK** : inhibiteur spécifique de la caspases-9 (0,2-0,4 mM)
- **Z-ATAD-FMK** : inhibiteur spécifique de la caspases-12 (0,4-0,8 mM)

Tous ces inhibiteurs sont irréversibles et franchissent les membranes cellulaires.

C. Injection intravitréenne

Le rat est tout d'abord anesthésié, puis une goutte d'antiseptique (Bétadine Ophtalmique à 5%) est appliquée sur les yeux et leurs pourtours. Tous les injections intravitréennes sont réalisées sous une loupe binoculaire: une aiguille de 30 gauge montée sur une seringue Hamilton de 5 μ l (VWR, France) est insérée dans la chambre vitrénne en traversant la pars plana du côté temporal du globe oculaire, à 1 mm du limbe sur une profondeur d'environ 2 mm (Figure 27). Un volume de 2 μ L de solution (moins de 10% du volume du vitré) est administré à l'intérieur de la chambre postérieure de l'œil (vitré). L'aiguille est délicatement retirée et une pommade antibiotique (Tobrex, Alcon, France) est appliquée sur l'œil injecté.

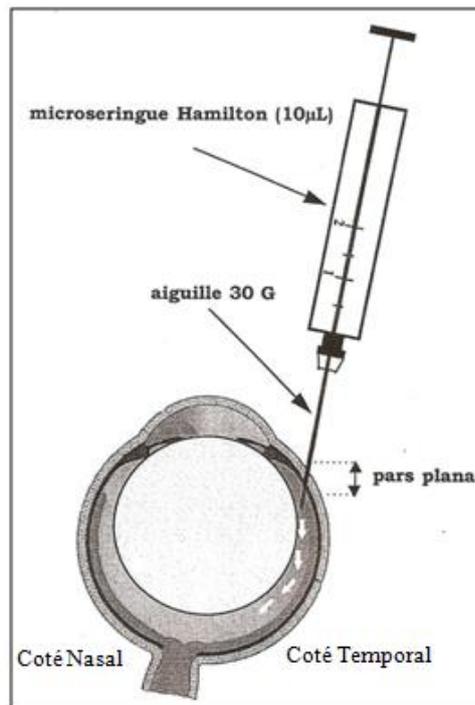


Figure 27 : Injection intravitréenne.

IV. Electrophysiologie

L'électrorétinographie mesure les réponses électriques de divers types de cellules dans la rétine, y compris les photorécepteurs (cônes et bâtonnets), l'intérieur des cellules rétinienne (cellules bipolaires et amacrines), et les cellules ganglionnaires. Il est réalisé dans des services spécialisés de neurophysiologie clinique ou en ophtalmologie et permet de diagnostiquer certaines anomalies de la rétine. L'ERG est le reflet direct de la fonction rétinienne.

A. Principe

Toutes les catégories de cellules de la rétine (les cellules photoréceptrices, les neurones transrétiniens, les cellules de Müller et les cellules de l'épithélium pigmentaire) participent à la formation de l'ERG, c'est un signal global et complexe. Toutefois, les réponses électriques des neurones de la rétine interne sont variables et aléatoires ce qui fait que leur sommation ne participe pratiquement pas à l'ERG. En d'autres termes, on ne retrouve pas dans l'ERG une onde caractéristique d'un type de neurone. Par contre, ces cellules sont responsables de dépolarisations ou d'hyperpolarisations des cellules de Muller en faisant varier la concentration extracellulaire en ions K^+ . Les composantes majeures de l'ERG qui sont celles sur lesquelles reposent la plupart des interprétations en exploration clinique,

sont donc essentiellement générées par les cellules photoréceptrices les cellules de Muller et l'EPR.

1. L'onde a

L'ERG est caractérisé par plusieurs ondes. Le premier signal électrophysiologique généré par la rétine photostimulée est l'onde a. Elle est une onde négative et est le reflet direct de l'hyperpolarisation des segments externes des cellules photoréceptrices en réponse à la lumière. En effet, l'excitation des photorécepteurs par la lumière déclenche la cascade enzymatique qui conduit à la fermeture des canaux ioniques et donc à la chute de la perméabilité membranaire des segments externes aux ions Na^+ . Dans ces conditions, les ions Na^+ s'accumulent dans l'espace extracellulaire le long de la cellule provoquant une hyperpolarisation de la membrane plasmique des segments externes des photorécepteurs. Le courant ainsi créé correspond à une réduction du courant d'obscurité et varie avec le stimulus lumineux. Au niveau global de la rétine, cette première traduction électrique de la détection de photons conditionne l'apparition d'un pôle positif au niveau distal (segments externes des photorécepteurs) (Figure 28).

L'amplitude de l'onde a et sa durée, sont conditionnées par l'apparition de l'onde b. C'est la raison pour laquelle l'onde a n'apparaît que pour des intensités de stimulation suffisantes. Dans le cas contraire, elle est complètement masquée par l'onde b. L'onde a est très résistante aux altérations métaboliques de la rétine et c'est la dernière onde à disparaître, en fin de survie, sur organe isolé (Doly et al., 1994). Elle est également dénommée PIII rapide car elle correspond au tout début du processus PIII décrit par Granit (Granit, 1933).

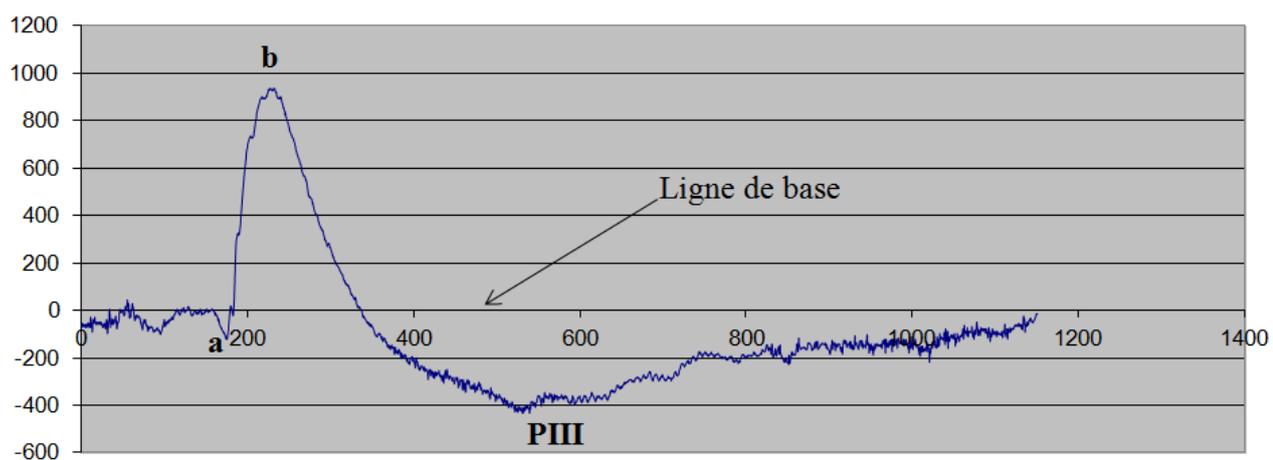


Figure 28 : Réponse électrique de la rétine à une stimulation lumineuse brève (10 ms).

2. L'onde b

L'onde b (Figure 28) peut être générée aussi bien par le système des cônes que celui des bâtonnets. Bien que l'origine cellulaire de l'onde b et son mécanisme de formation ne soient pas encore totalement compris, il est généralement accepté que cette composante de l'ERG est générée en grande partie par les cellules de Müller. La source de l'augmentation de K^+ extracellulaire distale est la dépolarisation des cellules bipolaires qui libèrent le K^+ suite à une stimulation lumineuse (Dick et Miller, 1985). Le courant de retour circulant dans l'espace extracellulaire à partir de la rétine proximale vers la rétine distale génère un potentiel transrétinien positif : l'onde b. L'onde b est la réponse gliale (des cellules de Müller) reflétant l'activité des cellules bipolaires dépolarisantes. L'onde b est donc le reflet de la transmission du signal des cellules photoréceptrices aux cellules bipolaires. Cette onde est très sensible à la qualité du métabolisme rétinien.

3. L'onde c

L'onde c est la somme de deux composantes de latence et de durée similaires : une composante cornéenne négative générée par la rétine neurale et une composante positive générée par l'épithélium pigmentaire. L'amplitude de l'onde c reflète essentiellement la différence d'amplitude entre les deux composantes et si ces deux composantes sont égales, l'onde c est absente. L'onde c est absente chez certains animaux tels que le chien, le singe et le rat albinos élevés en lumière cyclique (Organisciak et al., 1991 ; Weidner, 1976).

4. Autre ondes

Il existe d'autres ondes telles que l'onde d, caractéristique de l'ERG photopique, ou l'onde e qui apparaît après l'arrêt de la stimulation lumineuse. Les ondes d et e n'apparaissent pas distinctement dans un tracé standard et c'est la raison pour laquelle elles ne sont pas utilisées pour caractériser l'ERG.

B. Matériels

Le matériel utilisé est constitué d'un système de stimulation lumineuse et d'un système de recueil (Figure 29).

1. Stimulation lumineuse

Le stimulus lumineux est généré par un photostimulateur Type PS 33 (Grass, USA). Le flash lumineux, acheminé par une fibre optique à une sphère intégrante (Labsphère, North Sutton) éclaire de manière uniforme la totalité de la rétine.

2. Recueil du signal

Les trois électrodes (électrode de mesure, électrode de référence et l'électrode de terre) sont généralement placées respectivement sur la cornée, la langue et sous l'animal. Lors d'un enregistrement, les yeux de l'animal sont exposés à des stimuli standardisés et le signal résultant est affiché montrant l'évolution temporelle de l'amplitude du signal (tension). Les signaux sont très petits, et sont généralement mesurée en microvolts ou nanovolts. L'ERG est composé de potentiels électriques qui sont contribués par différentes types de cellules dans la rétine.

L'électrode de mesure est constituée d'un fil d'argent (AgCl) en forme d'anneau et est fixée à la sphère intégrante. L'électrode de référence est une pastille de 4 mm de diamètre également en argent/chlorure d'argent, maintenue sur la langue de l'animal. Une électrode de terre, sous forme de grille de cuivre reliée à la terre, est par ailleurs placée sous l'animal. Les trois électrodes sont reliées à un amplificateur différentiel (Model 1700, AM Systems, Paris). Le gain est réglé sur 1000 et la bande passante de 0,1 à 1 kHz (la bande passante pour l'enregistrement d'un ERG doit englober les fréquences comprises entre 0,3 et 300 Hz) (Marmor et Zrenner, 1993). Le signal ainsi amplifié, est envoyé vers un système informatique permettant de convertir le signal analogique ERG en valeurs numériques.

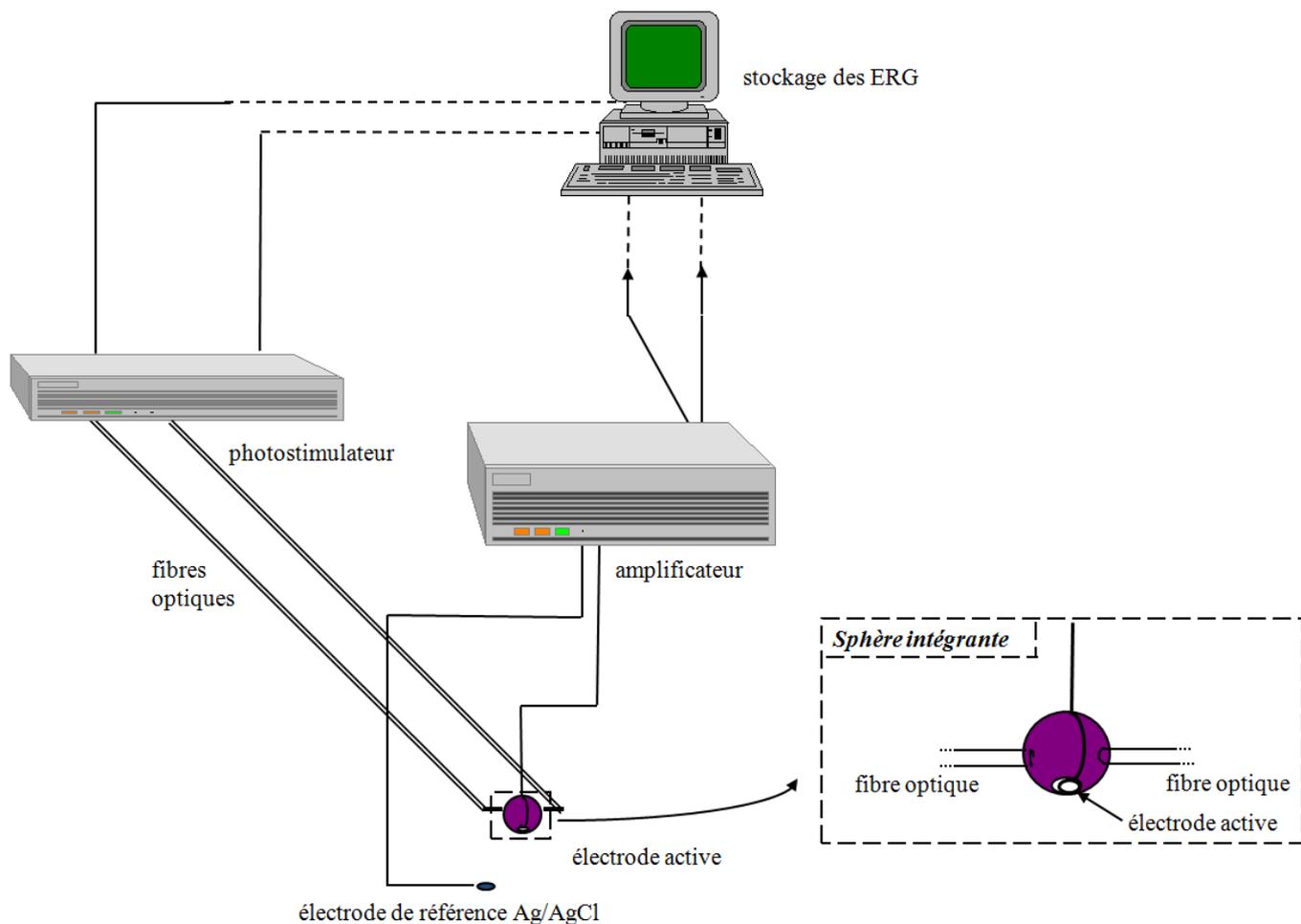


Figure 29 : Chaîne d'acquisition des ERG et schéma de la sphère intégrante.

C. Protocole des expérimentations

1. Préparation de l'animal

L'animal est adapté une nuit à l'obscurité avant le recueil d'un ERG. Sa mise en place se fait en lumière rouge inactinique (> 650 nm). Le rat est anesthésié, puis positionné dans une boîte de contention. Les pupilles sont dilatées par une goutte de Tropicamide[®] (Novartis Pharma). L'électrode de référence est placée sur la langue et maintenue ainsi par la gueule fermée du rat. L'œil est exorbité et l'électrode active, est posée sur la cornée. Une fois le dispositif mis en place, la lumière rouge est éteinte.

2. Stimulation et enregistrement

Un ordinateur dans la pièce voisine de celle où est installé l'animal, pilote le déclenchement du flash. L'intensité des flashes est modulée par des filtres neutres de densité variable placés entre la source et la fibre. L'ERG est enregistré pour 20 flashes (10 μ s)

d'intensité croissante commençant en dessous du seuil de réponse. L'intervalle entre deux flashes est de 10s. Toutefois, après avoir mis en évidence qu'un intervalle entre les flashes de 10 secondes ne modifiait pas les résultats (Figure 30), nous avons ensuite travaillé avec cet interval de temps (10s).

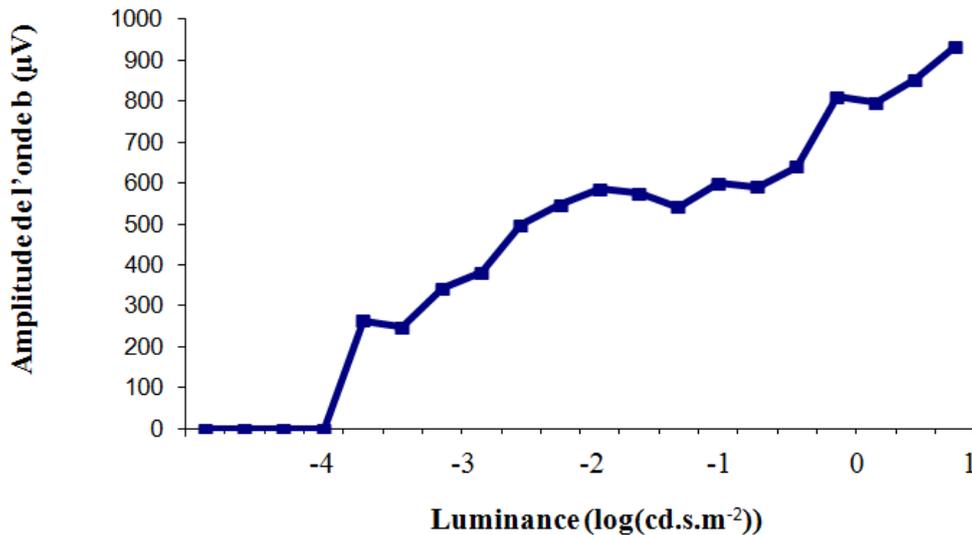


Figure 30: Courbe de sensibilité rétinienne chez le rat albinos Wistar (B_{max}).

D. Exploitation des ERGs

Le graphique de la variation de l'amplitude de l'onde b en fonction de la luminance du flash de stimulation est appelé courbe de sensibilité rétinienne. Les données expérimentales de l'amplitude de l'onde b sont lissées à l'aide du logiciel Origin 6 (Microcal Software, USA) selon une fonction analytique. L'intérêt d'une telle fonction est que, d'une part, elle représente bien les données expérimentales et, d'autre part, les trois paramètres ont une signification fonctionnelle simple (Ranchon et al., 1998). B_{max} est l'amplitude de saturation. K est la luminance qui induit l'amplitude $B_{max}/2$, et n représente la pente de la courbe dans sa partie ascendante (Figure 31).

L'amplitude de « l'onde a » a été étudiée de la même façon que l'amplitude de l'onde b, et, les variations étant similaires à celles de l'onde b, nous avons choisi de ne présenter que les résultats de l'onde b, classiquement admise comme étant le reflet de la fonction rétinienne. De plus, dans nos expériences, n'ayant observé aucune variation significative de K ou de n nous ne présenterons donc pas les résultats relatifs à ces paramètres.

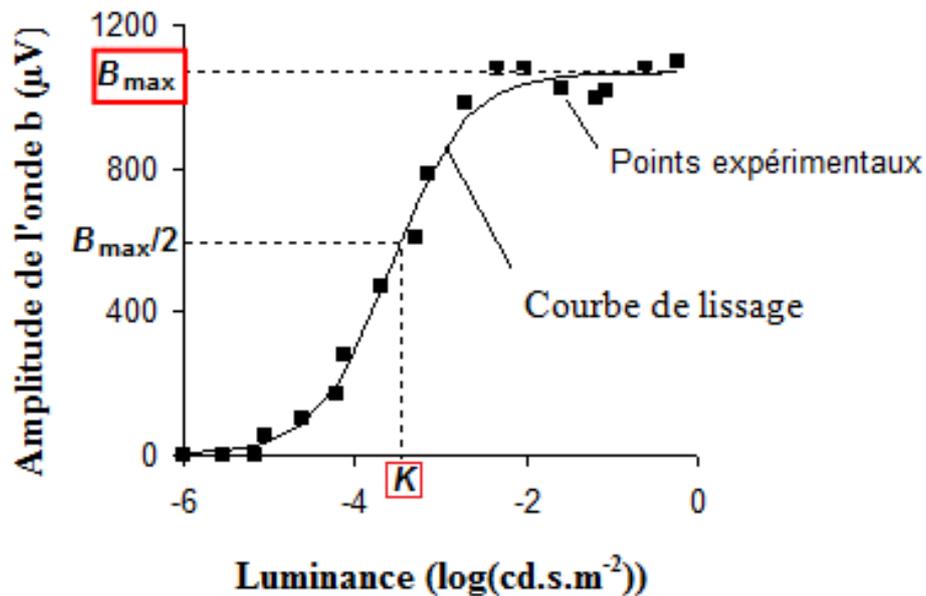


Figure 31: B_{max} , K et n .

V. Histologie

L'étude morphologique a probablement été la technique la plus utilisée pour étudier les atteintes rétiniennes. Elle est basée sur la répartition anatomique en couches des cellules dans la rétine. Elle permet de localiser les lésions rétiniennes.

A. Prélèvement des yeux et fixation

Les animaux sont anesthésiés, puis décérébrés. L'œil est exorbité et son pôle supérieur est marqué à l'aide d'un marqueur tissulaire de couleur afin de conserver le repérage de l'orientation au cours des différentes étapes. Il est ensuite excisé après section du nerf optique et nettoyé des tissus musculaires et conjonctifs. L'œil est alors placé dans 10 mL de fixateur (Perfix ou Paraformaldéhyde 4%) pendant 4 heures avec une légère agitation. Le fixateur est remplacé par de l'alcool à 70% et les échantillons sont placés à 4°C toute la nuit. Le lendemain, les globes oculaires sont sortis un après l'autre et positionnés sous la loupe binoculaire de manière à avoir la cornée vers soi, et la marque du pôle supérieur vers le plafond. Avec un rasoir, on coupe environ 1/3 de l'œil sur la droite de la marque du pôle supérieur. Les yeux sont remplacés de nouveau dans l'alcool 70%.

B. Inclusion en paraffine

Les échantillons sont déshydratés par des bains successifs d'alcool avec une légère agitation (5 min alcool 70%, 45 min alcool 95%, 4 x 30 min alcool 100%), de toluène 3 x 30 min, et finalement dans la paraffine liquide dans une étuve à 56°C (2 x 45 min), avant d'être inclus dans la paraffine (bloc) en prenant soin de l'orientation (côté coupé vers le bas, la marque du pôle supérieur vers le haut et par conséquent le nerf optique vers la gauche). Les blocs sont laissés figer au réfrigérateur, et le lendemain les blocs sont démoulés.

C. Coupes

A partir des blocs, des coupes transversales de 5 µm passant par le pôle supérieur, le nerf optique et le pôle inférieur, sont effectuées et étalées sur des lames silanisées (5 min acétone 100%, 5 min silane 1%, 5 min acétone 100%). Les lames blanches ainsi obtenues sont séchées à l'étuve à 37 °C pendant 24 heures. Elles peuvent alors être conservées à température ambiante.

D. Coloration

Afin d'améliorer l'adhésion lames-coupes, les lames blanches sont placées 30 min dans une étuve à 54°C. La paraffine est ensuite dissoute dans des bains de xylène 100% (3x15 min). Les échantillons sont alors rehydratés (5 min alcool 100%, 5 min alcool 95%, 5 min alcool 70 %, 2 – 5 min eau courante). Les coupes peuvent alors être colorées : 1 min dans l'hématoxyline pour colorer les noyaux, 2 – 5 min dans l'eau courante pour rincer, 30 sec dans le carbonate de lithium saturé dans l'eau, afin de permettre la fixation de l'hématoxyline, 2 – 5 min dans l'eau courante pour rincer, 1 min dans l'érythrosine (4g/L d'eau distillée), pour colorer les autres structures, 2 – 5 min dans l'eau courante pour rincer, 30 s dans l'alcool 100% pour déshydrater avant un bain dans le safran de 5-10 s (solution à 1% dans de l'alcool absolu) pour fixer l'érythrosine. Les lames sont enfin rincées (30 s alcool 70%, 2x30s alcool 100% et 2x30s xylène 100%). Une lamelle est collée sur la coupe grâce à une résine synthétique (Mounting Medium, Surgipath, Bretton, UK) et la lame est séchée à température ambiante (Figure 32).

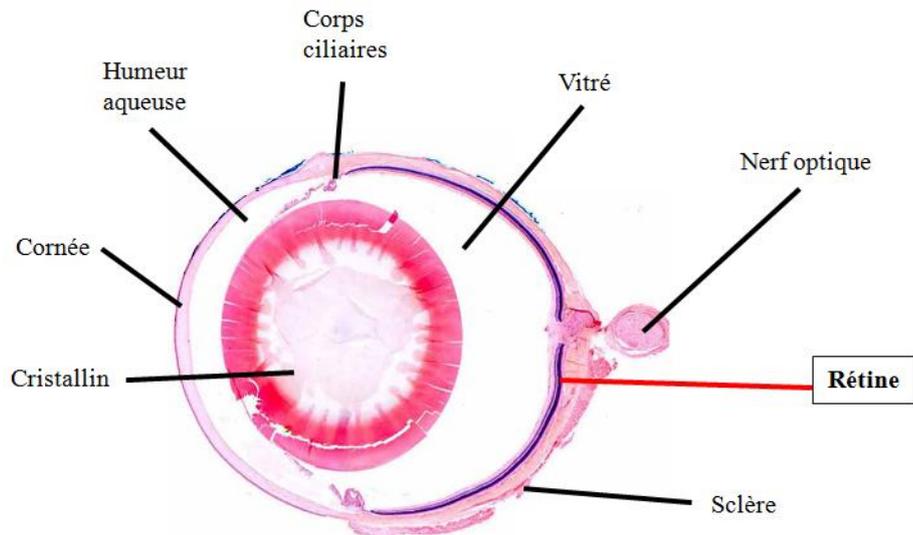


Figure 32 : Œil d'un rat après coloration.

E. Observation

Les mesures de l'épaisseur de la couche nucléaire externe (CNE) de la rétine sont réalisées sous microscopes tous les 0,36 mm à partir du nerf optique jusqu'à l'ora serata supérieure et jusqu'à l'ora serata inférieure. La CNE étant constituée des noyaux des cellules photoréceptrices, la mesure de son épaisseur est une évaluation du nombre de cellules photoréceptrices présentes dans la rétine (Figure 33).

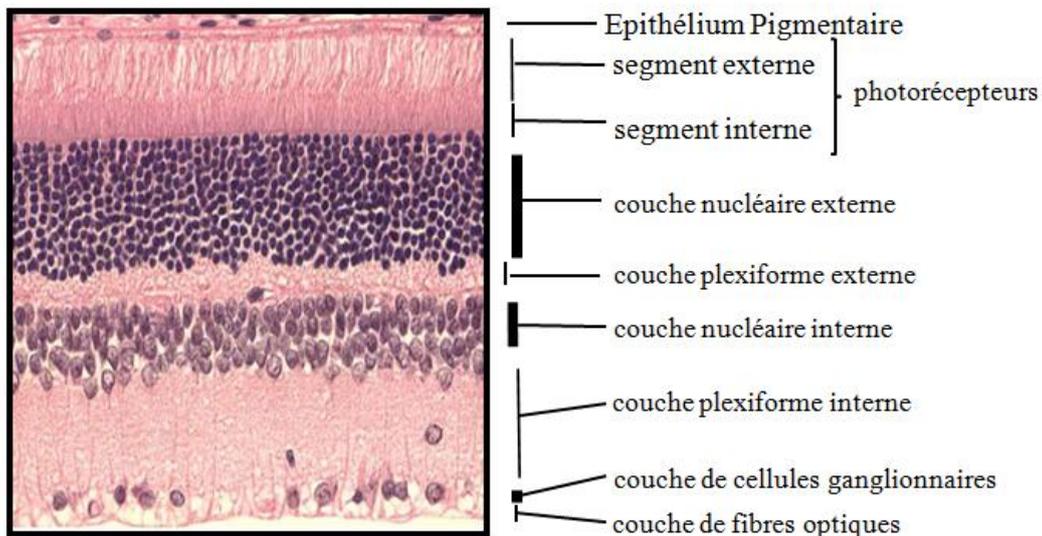


Figure 33 : Coupe histologique de la rétine d'un rat après coloration à l'hématoxyline-érythrosine (microscopie optique).

VI. Biochimie

A. Prélèvement des rétines

Les rats sont décérébrés après l'anesthésie. Une pince est placée sous l'œil, la cornée est incisée, et par pression, la rétine est extraite. Elle est alors placée dans un tube eppendorf[®] et congelée dans l'azote liquide puis conservée à -80°C.

B. Préparation des échantillons

Les deux rétines d'un même rat sont broyées dans 200 µl de tampon de Lyse fourni par le kit de dosage (composition inconnue) et incubées sur la glace pendant 20 minutes. Après avoir passés au vortex[®], les échantillons sont centrifugés pendant 20 minutes à 11 000 g à 4°C. Les protéines sont dosées, puis le surnageant est récupéré, aliquoté et conservé à -80°C jusqu'à l'analyse.

C. Dosage protéique

Les deux rétines d'un rat sont broyées au potter[®] dans 200 µl de solution d'homogénéisation (20 mM TrisHCl, pH 7,6, 5mM EDTA, 5 mM β-Mercaptoethanol pH 8.0) contenant un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Complete EDTA free, Roche). L'homogénat est ensuite centrifugé (10 000g) pendant 20 min. Un aliquot est dilué au dixième puis au vingtième dans du NaCl 0,9% (volume final de 50 µl) et incubé 30 minute à 37°C avec 0,95 ml de solution A (BCA Réactif A, Pierce) et 50 ml de la solution B (BCA réactif B, Pierce). Une gamme étalon est réalisée en parallèle à partir d'une solution d'albumine à 1 mg/ml. Après incubation, la lecture de la densité optique (DO) est effectuée à 582 nm. Les échantillons sont aliquotés à raison de 20 µl puis stockés à -80°C.

D. Mesure de l'activité

A 150 µg de protéines sont ajoutés 100 µl de tampon (DTT 1 mM, milieu de réaction). Les échantillons sont incubés à 37°C, pendant 1 h30, avec 5 µl de substrat peptidique spécifique : IETD-pNa (pour la caspase-8), LEHD-pNa (pour la caspase-9), et ATADD-pNa (pour les caspase-12) (Calbiochem, Strasbourg, France). Pour les kits colorimétriques la libération de pNa (p-nitroalanine) est mesurée à une densité optique de 405 nm, et, pour les substrats fluorescents les échantillons sont mesurés grâce aux couples émission/excitation à 450 nm/350 nm. Les valeurs de DO ou de fluorescence sont directement proportionnelles à l'activité de l'échantillon.

E. Mesure de l'activité des caspases

La mesure de l'activité enzymatique des caspases est basée sur l'utilisation d'un substrat spécifique de ces protéases. Le clivage d'un substrat conduit à la libération d'un chromophore colorimétrique (pNa ou p-Nitroalanine) ou fluorescent (AMC ou Amino-Méthyl-Coumarine) selon le kit de dosage utilisé. Le dosage des activités caspase est réalisé avec les kits *Caspase-8 Activity Assay kit Fluorometric* (Calbiochem), et *Caspase-9 Activity Assay kit Fluorometric* (Calbiochem), et *Caspase-12 Activity Assay kit Fluorometric* (Calbiochem).

VII. Statistiques

L'analyse de la variance (ANOVA) est effectuée avec un degré de significativité p de 0,05. Si l'analyse de variance est significative, des comparaisons multiples sont réalisées afin de connaître quelles paires de valeurs moyennes sont différentes. Les différences significatives entre les groupes sont estimées par le test post-hoc de Newman-Keuls avec un degré de significativité $p = 0,05$.

Résultats

I. Injections intravitréenne de DMSO et fonction rétinienne

Le diméthylsulfoxyde (DMSO) est le véhicule utilisé pour solubiliser les inhibiteurs de caspases. Toutefois, le DMSO ayant des propriétés antioxydantes, nous avons tout d'abord étudié l'effet de l'injection intravitréenne de DMSO, contre les lésions rétinienne induites par la lumière.

Des électrorétinogrammes (ERGs) contrôles sont enregistrés sur cinq rats. Les animaux sont ensuite non traités (n=1) ou injectés avec 2 μ l de DMSO à 4 % (n=2) ou à 10 % (n=2). Après adaptation une nuit à l'obscurité, les animaux sont exposés à une lumière de 3400 lux pendant 24 heures. À la fin de l'exposition, ils sont placés au noir et le lendemain, des ERGs sont enregistrés. La Figure 1 représente les courbes de sensibilité rétinienne, c'est-à-dire, l'amplitude de l'onde b des ERGs en fonction de l'intensité du flash de stimulation. L'amplitude de l'onde b augmente en augmentant l'intensité des flashes. Les courbes sont lissées par une fonction mathématique permettant ainsi de calculer l'amplitude maximale de saturation B_{\max} . La courbe de sensibilité contrôle donne un B_{\max} de $750 \pm 131 \mu\text{V}$.

Lorsque les animaux ont été exposés à la lumière, il y a un abaissement des courbes de sensibilité rétinienne. B_{\max} est alors réduit de 53% pour l'animal non traité, de $43 \pm 4\%$ pour les animaux ayant reçu le DMSO à 4%, et de $51 \pm 16\%$ pour les animaux ayant reçu le DMSO à 10%.

L'injection de DMSO à 4 ou 10 % n'a pas d'effet neuroprotecteur contre les lésions rétinienne induites par la lumière.

II. Injection intravitréenne d'inhibiteur de Caspases

L'objectif de ces expérimentations est d'évaluer le rôle des caspases dans la dégénérescence rétinienne induite par la lumière. Ce travail est basé sur l'hypothèse que si une caspase est impliquée dans la photodégénérescence rétinienne, alors inhiber cette caspase devrait réduire la dégénérescence.

Dans le laboratoire, il avait été mis en évidence que l'inhibition de la caspase-3 protègent contre la photodégénérescence rétinienne (Perche et al., 2007). Afin de définir quelle voie est impliquée en amont de la caspase-3, nous avons testé l'inhibiteur de la caspase-8, de la caspase-9 et de la caspase-12.

1) La Caspase-8

La caspase-8 est activée suite à la fixation d'un ligand sur son récepteur. Elle appartient à la voie membranaire d'activation des caspases. Des expérimentations réalisées par le doctorant précédent montraient que l'injection de l'inhibiteur de la caspase-8, Z-IETD-fmk à raison de 0,2 mM ne protégeait ni la fonction (ERG) ni la structure (histologie) rétinienne contre les lésions induites par la lumière (Perche Olivier, thèse 2008).

Dans la continuité de son travail, la question était alors de déterminer : 1) qu'elle était la cinétique d'activation de la caspase-8 au cours de la dégénérescence induite par la lumière, et 2) est ce que la concentration d'inhibiteur utilisée était suffisante pour inhiber sa cible ?

Par conséquent, pour répondre à ces questions, nous avons étudié : a) la cinétique d'activation de la caspase-8 dans la rétine au cours de la photodégénérescence rétinienne, et b) l'efficacité de l'inhibiteur de la caspase-8 à 0,2 mM.

a) Cinétique d'activation des caspases

Des prélèvements de rétine ont été réalisés à différents temps : avant le début de l'exposition à la lumière (0 h), au cours de l'exposition à la lumière (30', 1h, 2h, 4h, 6h, 12h), à la fin de l'exposition à la lumière (24h), et un jour après la fin de l'exposition à la lumière (D1). Nous avons alors mesuré l'activité de la caspase-8 dans la rétine (Figure 2). **L'activité de la caspase-8 reste stable quelque soit le temps considéré.**

b) Efficacité de l'inhibiteur de caspase-8, Z-IETD-fmk à raison de 0,2mM

La concentration de l'inhibiteur qui avait été utilisé par Perche O. était de 0,2 mM. Cette concentration correspondait à une concentration de DMSO de 2%. Par conséquent, afin d'évaluer l'efficacité de l'inhibiteur, nous avons mesuré l'activité de la caspase-8 dans des rétines d'animaux non traités ou ayant reçus une injection de DMSO 2% ou d'inhibiteur de caspase-8, Z-IETD-fmk à 0,2 mM (Figure 3). Les animaux ont été sacrifiés à différents temps : avant le début de l'exposition (0h), à 2h et 24h d'exposition à la lumière.

Comme déjà observé précédemment, chez les animaux non traités, il n'y a pas de variation de l'activité de la caspase-8 (0h, n=2 ; 2h, n=4 ; 24h, n=4).

La diminution de l'activité à 0h dans le groupe ayant reçu le DMSO 2% n'est pas interprétable car n=1.

À 2h et 24h, l'activité de la caspase-8 est similaire entre le groupe DMSO et non traité. Lorsque les animaux ont reçu Z-IETD-fmk, l'activité de la caspase-8 est diminuée de façon significative ($p=0.008$) de $33 \pm 9 \%$ à 0h (n=4) par rapport au non traités. Les diminutions de $20 \pm 2 \%$ à 2h (n=3) et de $18 \pm 5 \%$ à 24h (n=3) ne sont pas significative (Figure 3).

Il semble donc que l'injection intravitréenne de l'inhibiteur de caspase-8 Z-IETD-fmk à 0,2 mM inhibe faiblement et seulement transitoirement sa cible.

2) La caspase-9

La caspase-9 appartient à la voie mitochondriale d'activation des caspases. La libération du cytochrome-c par la mitochondrie active l'Apaf-1 qui, à son tour clive le pro-enzyme de la caspase-9 en sa forme active.

Des expérimentations réalisées par le doctorant précédent avaient montré que l'expression et l'activité de la caspase-9 est affectée par l'exposition à la lumière. Ainsi, après une diminution de son activité de 45% entre 2 et 4 heures d'exposition à la lumière dans les 1^{ères} heures suivant le début de l'exposition, il y avait une augmentation importante de son activité atteignant 165% du niveau basal un jour après la fin de l'exposition. Ces résultats suggéraient alors l'implication de la caspase-9 dans le processus apoptotique induit par la lumière. Toutefois, l'injection intravitréenne de l'inhibiteur de la caspase-9 à raison de 0,2 mM ne protégeait ni la fonction (ERG) ni la structure de la rétine (histologie) contre les lésions induites par la lumière (Perche Olivier ; thèse 2008).

Dans la continuité de ce travail, nous avons voulu déterminer si l'augmentation de la concentration d'inhibiteur permettait de protéger contre les lésions induites par la lumière. Pour cela, nous avons donc doublé la concentration d'inhibiteur injectée dans le vitré, et sommes passés de 0,2 mM à 0,4 mM. Ceci nous a donc amené à augmenter aussi la concentration en DMSO de 2 à 4%.

a) Inhibiteur de la caspase-9, Z-LEHD-fmk à 0,4 mM

Des ERGs contrôles ont été enregistrés avant traitement et/ou exposition à la lumière sur les deux yeux de chaque rat (n=9). Les animaux sont alors non traités ou reçoivent une injection intravitréenne de 2 µl d'inhibiteur de caspase-9, Z-LEHD-fmk à 0,4 mM ou de DMSO 4%. Après injections, les animaux sont placés au noir et le lendemain ils sont exposés pendant 24 heures à la lumière. Des ERGs sont enregistrés 1 jour et 15 jours après la fin de l'exposition. Les courbes de sensibilité rétinienne sont présentées sur la Figure 4.

Les courbes de sensibilité rétinienne obtenues à partir des ERGs contrôles donnent un B_{\max} moyen de 1122 ± 247 µV.

Lorsque les animaux ne sont pas traités et exposés à la lumière (n=2), il y a un abaissement des courbes de sensibilité rétinienne. B_{\max} est réduit à 457 ± 265 µV à D1 et à 283 ± 129 µV à D15. La différence entre D1 et D15 n'est pas significative. Un abaissement similaire des courbes de sensibilité rétinienne est observé que les animaux aient reçu le DMSO ou Z-LEHD-fmk. Il n'y a pas de différence significative entre D1 et D15.

Par conséquent, l'injection de l'inhibiteur de la caspase-9 à une concentration de 0,4 mM ne protège pas la fonction rétinienne contre les dommages induits par la lumière.

b) Histologie

Après les électrorétinogrammes réalisés à D15, les animaux sont sacrifiés pour l'étude histologique. Après coloration des échantillons, nous mesurons l'épaisseur de la couche nucléaire externe (CNE) (Figure 5). Cette couche correspondant aux noyaux des cellules photoréceptrices, la mesure de son épaisseur donne une estimation du nombre de cellules photoréceptrices encore présentes dans la rétine. Lorsque les animaux n'ont pas été exposés à la lumière (n=1), l'épaisseur de la CNE est d'environ 40-45 µm. Les animaux non traités et exposés à la lumière (n=2) présentent une réduction importante de la CNE avec une atteinte plus prononcée dans le pôle supérieur de la rétine, en particulier à 1,2 mm du nerf optique.

Les animaux ayant reçu le DMSO (n=3) ont une CNE plus épaisse que les animaux non traités. L'épaisseur de la CNE chez les animaux ayant reçu l'inhibiteur de caspase-9 (n=3) est similaire à celle des animaux ayant reçu le DMSO.

Par conséquent, l'inhibiteur de la caspase-9 à 0,4 mM n'a pas d'effet protecteur sur la structure de la rétine contre les lésions induites par la lumière.

3) La caspase-12

La caspase-12 appartient à la voie du réticulum endoplasmique. Elle est activée suite à un stress du réticulum endoplasmique. Ce stress peut être dû à une augmentation du taux de calcium dans la cellule qui activerait les calpaïnes qui elles-mêmes activeraient la caspase-12. Le doctorant précédent avait montré une activation importante des calpaïnes dès les 1^{ères} heures d'exposition à la lumière.

Par conséquent, nous avons voulu évaluer le rôle de la caspase-12 dans la dégénérescence rétinienne induite par la lumière. Nous avons donc : 1) Evaluer l'effet neuroprotecteur de l'inhibiteur de caspase-12, Z-ATAD-fmk, contre les lésions induites par la lumière, 2) Déterminer la cinétique d'activation de la caspase-12 au cours de la photodégénérescence rétinienne en présence ou non de l'inhibiteur.

a) Effet de l'inhibiteur de caspase-12 à 0,4 et 0,8 mM

Des ERGs contrôles sont enregistrés avant traitement et/ou exposition à la lumière sur les deux yeux de chaque rat. Les animaux sont alors non traités (n=12) ou reçoivent une injection intravitréenne de 2 µl d'inhibiteur de caspase-12 (Z-ATAD-fmk) à raison de 0,4 mM ou de DMSO 2%. Après injection, les animaux sont placés au noir et le lendemain, ils sont exposés pendant 24 heures à la lumière. Des ERGs sont enregistrés 1 jour (D1) et 15 jours (D15) après la fin de l'exposition à la lumière.

Dans une 1^{ère} série d'expérimentation, les animaux étaient exposés à **2700 lux**. Les courbes de sensibilité rétinienne obtenues à partir des ERGs contrôles sont similaires entre les différents groupes et les B_{\max} ne sont pas significativement différentes. Ces courbes sont donc moyennées pour obtenir une courbe de sensibilité contrôle donnant un B_{\max} contrôle de 1246 ± 232 µV. Lorsque les animaux ne sont pas exposés à la lumière, les courbes de sensibilité rétinienne des groupes DMSO (2% ; n=2) ou Z-ATAD-fmk (0,4 mM ; n=2) sont similaires à celle des animaux non traités (n=2) que ce soit à D1 ou à D15. Les B_{\max} ne sont pas significativement différentes (Figure 6).

Par conséquent, le DMSO à 2% ou l'inhibiteur de la caspase-12 ZATAD-fmk à 0,4 mM n'ont pas d'effet toxique sur la fonction rétinienne.

Lorsque les animaux sont exposés à la lumière (Figure 7A), à D1 B_{\max} est réduit significativement ($p=0.039$) de 33 ± 9 % chez les animaux non traités, et non significativement de 22 ± 7 % chez les animaux ayant reçu le DMSO 2%, par rapport à la valeur contrôle. B_{\max} n'est pas réduit chez les animaux ayant reçu l'inhibiteur Z-ATAD-fmk.

Quinze jours plus tard, la courbe de sensibilité rétinienne des animaux non traités-Exposés est identique à celle obtenue à D1. Les animaux exposés traités au DMSO 2% ou avec Z-ATAD-fmk 0,4 mM ont des courbes de sensibilité plus basses à D15 qu'à D1. Entre D1 et D15, B_{\max} est réduit de $31 \pm 17\%$ chez les animaux traités avec le DMSO 2% et de 42 ± 10 % chez les animaux traités avec ZATAD-fmk 0,4mM (Figure 7B).

Par conséquent, l'inhibiteur Z-ATAD-fmk injecté à une concentration de 0,4 mM tend à protéger transitoirement la fonction rétinienne contre les dommages induits par une lumière de 2700 lux.

Dans une 2^{ème} série d'expérimentation, les animaux sont exposés à **3400 lux**.

Les animaux non exposés ont des courbes de sensibilité rétinienne similaires qu'ils aient été non traités ($n=4$), traités au DMSO 2% ($n=4$) ou traités avec Z-ATAD-fmk 0,4 mM ($n=4$). L'exposition à la lumière entraîne une réduction significative ($p<0.004$) de B_{\max} à D1 de 53 ± 22 % chez les animaux non traités, de 38 ± 19 % chez les animaux traités avec le DMSO 2%, et de 46 ± 15 % chez les animaux traités avec Z-ATAD-fmk 0,4 mM par rapport aux animaux non exposés respectifs (Figure 8). Il n'y a pas de différence significative entre les groupes exposés.

À D15, les animaux ayant été exposés à 3400 lux présentent une réduction de la fonction rétinienne de 64 ± 42 %, 56 ± 19 % et 49 ± 23 % pour les animaux non traités, traités avec le DMSO 2% ou traités avec Z-ATAD-fmk 0,4mM, respectivement (Figure 8). Les différences de B_{\max} ne sont pas significatives entre D1 et D15.

L'injection intravitréenne de Z-ATAD-fmk à raison de 0,4 mM ne préserve pas la fonction rétinienne contre les lésions induites par une lumière de 3400 lux.

Dans une 3^{ème} série d'expérimentation, les animaux sont non traités, injectés avec l'inhibiteur de caspase-12 à **0,8 mM** ou avec le DMSO à 4% avant d'être exposés à 3400 lux. Les courbes de sensibilité rétinienne obtenues à partir des ERGs contrôles ne sont pas

significativement différentes entre les groupes. Ces courbes de sensibilité sont donc moyennées pour obtenir une courbe de sensibilité contrôle donnant un B_{\max} contrôle de $1000 \pm 207 \mu\text{V}$ (Figure 9).

L'exposition à la lumière entraîne une réduction significative ($p < 0,003$) de B_{\max} à D1 de $87 \pm 37 \%$ chez les animaux non traités ($n=2$), de $41 \pm 18 \%$ chez les animaux traités avec le DMSO à 4% ($n=3$), et de $48 \pm 20 \%$ chez les animaux traités avec Z-ATAD-fmk à 0,8 mM ($n=3$). La fonction rétinienne ne varie pas entre D1 et D15.

Malgré l'augmentation de la concentration de l'inhibiteur de caspase-12 Z-ATAD-fmk, il n'y a pas d'effet protecteur de la fonction rétinienne contre la dégénérescence rétinienne induite par la lumière.

b) Histologie

Après le dernier ERG à D15, les animaux sont sacrifiés pour l'étude histologique. Les mesures de l'épaisseur de la couche nucléaire externe (CNE) pour les animaux non exposés qu'ils soient non traités, traités avec le DMSO à 2% ou avec Z-ATAD-fmk à **0,4 mM**, sont similaires les unes aux autres et les aires sous les courbes ne sont pas significativement différentes (Figure 10A).

Par conséquent le DMSO 2% et Z-ATAD-fmk (0,4mM) n'ont pas d'effet toxique sur la structure rétinienne.

Lorsque les animaux sont exposés à la lumière que ce soit à 2700 lux (Figure 10B) ou 3400 lux (Figure 10C), l'épaisseur de la CNE est réduite dans le pôle supérieur de la rétine avec une réduction maximal à 1.2 mm du nerf optique. Lorsque les animaux sont exposés à 2700 lux, la CNE du groupe ZATAD-fmk (0,4mM) est plus épaisse que celle du groupe DMSO 2% mais la différence n'est pas significative. L'augmentation de l'intensité de l'exposition à la lumière à 3400 lux entraîne une réduction de la CNE similaire dans le groupe DMSO et Z-ATAD-fmk (Figure 10C).

L'augmentation de la concentration de l'inhibiteur de la caspase-12 à 0,8 mM n'a pas d'effet neuroprotecteur sur la structure de la rétine contre les lésions induites par la lumière (Figure 11).

Par conséquent, l'injection intravitréenne de Z-ATAD-fmk à 0,4 mM ou 0,8 mM n'a pas d'effet neuroprotecteur contre la dégénérescence rétinienne induite par la lumière.

c) Activité de la caspase 12 dans la rétine

L'activité de la caspase-12 a été mesurée dans la rétine des animaux non traités, traités au DMSO 2% ou avec Z-ATAD-fmk à 0,4 mM à différent temps (Figure 12).

Chez les animaux non traités, l'activité de la caspase-12 avant exposition à la lumière est définie comme le 100%. 2 heures d'exposition à la lumière (n=3) entraîne une réduction non significative de l'activité de la caspase-12 de 38%, et à la fin de l'exposition (24h), la caspase-12 retrouve une activité basale.

L'injection de DMSO à 2% n'a pas d'effet significatif à 0 heure mais entraîne une augmentation significative ($p=0,03$) de 25% à 2 heures. À 24h, il y a un retour à la normale de l'activité de la caspase-12.

L'injection de Z-ATAD-fmk à 0,4 mM entraîne une réduction de 50% de l'activité de la caspase-12 à 0h (n=2) et à 2h (n=1) mais n'a plus d'effet à 24h (n=2).

Par conséquent, l'injection intravitréenne de l'inhibiteur de caspase-12 à 0,4 mM inhibe sa cible au moins au début de l'exposition à la lumière.

Discussions Générale, Conclusions, et Perspectives

Les dystrophies et dégénérescences rétiniennes humaines ainsi que les dégénérescences rétiniennes dans les modèles animaux partagent un élément important de fonctionnalité: la mort des cellules visuelles par apoptose. Etudier l'apoptose peut donc fournir une compréhension importante des mécanismes de mort cellulaire et ainsi permettre d'élaborer des stratégies de sauvetage potentiel pour les maladies rétiniennes (Wenzel et al., 2005).

L'apoptose ou mort cellulaire programmée est une réponse cellulaire fondamentale qui régit l'homéostasie des tissus en éliminant les cellules non désirées, et joue un rôle crucial dans la sculpture des cellules visuelles de la rétine. Toutefois, un excès d'apoptose peut aboutir à une maladie dégénérative alors qu'un taux d'apoptose insuffisante peut-être impliquée dans les phénomènes de cancérogénèse. Alors que CED-3 (caspase-3) est la seule caspase requise pour la mort cellulaire programmée chez *C. elegans*, des caspases multiples sont nécessaires pour l'apoptose dans des organismes plus complexes, tels que les mammifères. Ainsi, les Caspases (cysteinyl aspartate-specific proteases) représentent une famille de cystéine protéases qui sont ubiquitaires et hautement conservées chez les organismes multicellulaires, et fonctionnent comme des régulateurs centraux de l'apoptose. Les **Caspases** sont synthétisées sous forme de zymogènes, et leur activation nécessite un clivage spécifique au niveau de résidus aspartate. Le développement initial de la caspase inactif sépare les deux sous-unités : la grande (p20) et la petite (p10), après quoi le domaine N-terminal est enlevé pour former la protéase catalytique active (Degterev et al., 2003).

Les caspases peuvent être classées en deux catégories, initiatrices et effectrices. Les caspases initiatrices sont activées au cours de la phase d'initiation de l'apoptose (caspases-1, 2, 4, 5, 8, 9, 10, 11, 12). Les caspases effectrices sont activées par des caspases initiatrices, et impliquées dans la phase de dégradation de l'apoptose (caspases-3, 6, 7).

Dans le cadre de notre travail de thèse, nous nous sommes intéressés au rôle des caspases dans la dégénérescence rétinienne. Pour cela nous avons utilisé le modèle expérimental de dégénérescence rétinienne induite par la lumière ou modèle de photodégénérescence rétinienne. Ce modèle consiste à exposer les animaux à une lumière fluorescente intense pendant 24 heures. Par son action sur la rhodopsine, la lumière déclenche la cascade de transduction visuelle, mais peut aussi induire des lésions et la mort des cellules rétiniennes par un mécanisme phototoxique (Noëll et al., 1966).

Il a été mis en évidence que les cellules meurent par apoptose (Abler et al., 1996 ; Tso et al., 1994). Le modèle de photodégénérescence est largement utilisé comme modèle d'étude de la dégénérescence rétinienne. Ce modèle présente l'avantage 1) d'induire l'apoptose de manière très synchronisée permettant ainsi la détection de marqueurs biochimiques et leur assignation aux différentes phases de l'apoptose, 2) la dégénérescence se produit plus rapidement que dans la plupart des modèles animaux, 3) les lésions peuvent être modulées en terme de sévérité en faisant varier l'intensité ou la durée d'exposition (Wenzel et al., 2005).

Dans notre laboratoire, des expériences ont montré que l'inhibition de la caspase-3, une caspase effectrice de l'apoptose, protège la rétine contre les lésions induites par la lumière (Perche et al., 2007). Dans la suite logique de ces expérimentations, **nous avons étudié les mécanismes en amont de la caspase-3**, et avons choisi de travailler sur trois caspases : la **caspase-8** impliquée dans la voie membranaire extrinsèque, la **caspase-9** qui joue un rôle essentiel dans la voie mitochondriale et la **caspase-12** qui intervient dans la voie du réticulum endoplasmique. Notre raisonnement de travail est basé sur l'hypothèse que si une caspase est impliquée dans le processus dégénératif alors, inhiber cette caspase devrait réduire ou bloquer la mort des cellules photoréceptrices. Au contraire, si une des caspases inhibées est impliquée dans le mécanisme de protection alors, l'inhibition de cette molécule devrait augmenter la mort des cellules photoréceptrices. Par conséquent, nous avons injecté des inhibiteurs spécifiques des caspases-8,9 ou 12 à différentes concentrations et nous avons évalué leur effet neuroprotecteur sur la rétine.

Les inhibiteurs utilisés devaient être solubilisés dans le diméthylsulfoxyde (DMSO). Le **DMSO** est un composé organo-sulfuré polaire, largement utilisé comme véhicule (Silverman C., 1983 ; Perche et al., 2007) de composés inorganiques (Rubin, 1975 ; Santos et al., 2003). Toutefois, le DMSO ne peut pas être injecté pur et doit donc être dilué dans le PBS1X. Les concentrations d'inhibiteurs utilisés nous ont amenés à travailler avec des solutions finales de DMSO de 2 et 4%. Dans une première étape, nous avons vérifié que le DMSO n'a pas d'effet toxique ou neuroprotecteur sur la rétine. En effet, on sait que dans la photodégénérescence rétinienne, les piègeurs des radicaux libres et les antioxydants (Organisciak et al., 1999 ; Ranchon et al., 2003) protègent la rétine contre les lésions induites par la lumière, et le DMSO a des propriétés antioxydantes (Casali et al., 1999 ; Sanmartin-Suarez et al., 2011).

Au cours de ces expérimentations préliminaires nous n'avons pas observé d'effet neuroprotecteur du DMSO contre les altérations fonctionnelles induites par la lumière, ce qui était en d'accord avec les résultats obtenus par Mikolka et al (Mikolka et al., 2012). Toutefois, il s'est avéré par la suite que dans certaines expérimentations, bien que réaliser dans les mêmes conditions, le DMSO pouvait avoir un effet neuroprotecteur aussi bien sur la structure que sur la fonction rétinienne. Cet effet neuroprotecteur avait déjà été observé (Perche et al., 2007). Par conséquent, les résultats obtenus avec les inhibiteurs de caspases seront comparés à ceux obtenus avec le DMSO.

Dans la deuxième étape de notre travail, nous avons évalué l'effet de l'injection des inhibiteurs de caspases-8, 9 ou 12 sur la dégénérescence rétinienne induite par la lumière.

Il avait été montré que l'injection de l'inhibiteur de **caspase-8 à raison de 0,2 mM** ne protégeait ni la fonction (ERG) ni la structure (histologie) rétinienne contre les lésions induites par la lumière (Perche Olivier, thèse 2008). La concentration finale d'inhibiteur dans la vitrée est estimée à 20 μ M. Cette concentration correspond à ce qui est normalement utilisé en culture de cellule (Weishaupt J.H. et al., 2003 ; Monnier et al., 2011). Toutefois, il restait à déterminer si à cette concentration l'inhibiteur atteignait bien sa cible et surtout inhibait bien sa cible dans la rétine. Ainsi, nous avons montré que l'injection intravitréenne d'inhibiteur de caspase-8 Z-IETD-fmk à 0,2 mM inhibe faiblement et de façon transitoire la caspase-8 dans la rétine. Par conséquent, pour augmenter et prolonger l'effet de l'inhibiteur, il aurait fallu injecter l'inhibiteur soit à plus forte concentration soit éventuellement à un temps plus proche du début de l'exposition à la lumière. Mais, comme nous avons montré en parallèle que l'activité de la caspase-8 n'est pas affectée par l'exposition à la lumière, nous n'avons pas été plus loin dans l'investigation.

Au laboratoire, il avait été montré que la **caspase-9** suit une cinétique d'activation au cours de la photodégénérescence rétinienne similaire à celle de la caspase-3 impliquée dans le processus dégénératif (Perche et al., 2007). Ces résultats suggéraient donc un rôle de la caspase-9 dans le processus dégénératif (Perche Olivier, thèse 2008). Toutefois, l'inhibiteur de la caspase-9 à raison de 0,2 mM dans la DMSO à 2% n'avait pas d'effet neuroprotecteur. La caspase-9 étant connue pour son rôle dans l'apoptose induite via la voie mitochondriale et l'augmentation de la perméabilité mitochondriale ayant été impliquée dans le mécanisme dégénératif induit par la lumière (Sun et al., 1998), cette caspase attirait particulièrement notre attention. Par conséquent, nous avons émis l'hypothèse que l'absence de protection par

l'inhibiteur de caspase-9 était due à une concentration insuffisante d'inhibiteur dans la rétine. Suivant cette hypothèse, nous avons donc doublé la concentration d'inhibiteur injecté dans le vitré pour passer à 0,4 mM soit une concentration finale estimée dans le vitré à 40 μ M. Même à cette concentration, aucun effet neuroprotecteur n'a pu être mis en évidence. Toutefois, il reste à vérifier qu'à cette concentration l'inhibiteur atteint et inhibe sa cible dans la rétine après injection dans le vitré.

Plus récemment, le réticulum endoplasmique a été impliqué dans de nombreuses pathologies neurodégénératives (Katayama et al., 2004 ; Silva et al., 2005 ; Ghosh et al., 2012). Le réticulum endoplasmique est une organelle multifonctionnelle impliquée dans le repliement des protéines, l'homéostasie calcique et l'activation des mécanismes de mort cellulaire (Baumann et Walz, 2001). Certaines conditions telles que la perturbation de l'homéostasie calcique ou du statut redox ou l'accumulation de protéines non correctement repliées dans le réticulum endoplasmique, active le réticulum endoplasmique (Kaufman, 1999). Dans des conditions de stress du réticulum endoplasmique prolongé, la cellule peut s'orienter vers l'apoptose. La caspase-12 est l'une des protéines du stress du réticulum endoplasmique, et cette caspase est capable d'activer la caspase-3 (Yang et al., 2008).

Par conséquent, l'utilisation d'un inhibiteur de caspase-12 tel que Z-ATAD-fmk était pertinent pour évaluer l'implication de la caspase-12 dans le processus dégénératif. Nous avons montré que l'activité de la caspase-12 au cours de la photodégénérescence rétinienne semble suivre une cinétique similaire à celle de la caspase-9 et de la caspase-3, caractérisée par une diminution au début de l'exposition à la lumière et un retour au niveau basal à la fin de l'exposition. Il aurait été intéressant d'étudier cette activité à un jour après la fin de l'exposition afin de voir si on observait aussi l'augmentation d'activité (Perche et al., 2007).

L'injection de l'inhibiteur de caspase-12 à raison de 0,4 mM inhibe sa cible au moins au début de l'exposition sans pour autant avoir un effet neuroprotecteur sur la fonction ou la structure rétinienne. L'augmentation de la concentration d'inhibiteur à 0,8 mM ne permet pas non plus de préserver la rétine contre les lésions induites par la lumière. Il reste à déterminer si l'augmentation de la concentration de l'inhibiteur injectée conduit réellement à une augmentation de l'inhibition et/ou un prolongement de l'effet inhibiteur. Le rôle de la caspase-12 dans le processus apoptotique induit par la lumière avait été suggéré par Yang et al. (2008). Toutefois, l'augmentation de l'expression de la caspase-12 avait été étudiée après

la fin de l'exposition à la lumière et non au cours de l'exposition à la lumière, par des techniques de western blot et immunohistochimie.

En conclusion, la caspase-8 ne semble pas jouer un rôle dans le processus dégénératif induit par la lumière dans la rétine. Pour ce qui est de la caspase-9 et 12, elles sont affectées par l'exposition à la lumière et leur activité suit une cinétique similaire à celle de la caspase-3. Toutefois, nous n'avons pas pu mettre en évidence l'implication réelle de ces caspases dans le processus dégénératif.

Perspectives :

1) Mécanismes dégénératifs :

a) Les caspases

Les concentrations d'inhibiteur de caspase-9 et 12 utilisées (respectivement 0,4 et 0,8 mM) sont largement inférieure à celle de l'inhibiteur de caspase-3 (2,2 mM) qui avait montré un effet neuroprotecteur en inhibant de 50% l'activité de la caspase-3 pendant toute la durée de l'exposition à la lumière. Par conséquent, il serait intéressant d'évaluer l'effet neuroprotecteur des inhibiteurs à plus forte concentration. Ces inhibiteurs doivent être solubilisé dans la DMSO, et nous avons montré que la DMSO à 10% n'est pas toxique et/ou neuroprotecteur. Ainsi, nous pouvons tester l'effet inhibiteur et neuroprotecteur de la caspase-9 à 1 mM et de la caspase-12 à 2 mM. En parallèle nous évaluerons l'effet de la DMSO à 10% mais également 20% pour pouvoir éventuellement augmenter les concentrations utilisées.

b) Autres voies

La caspase-3 impliquée dans le processus dégénératif peut être activée par les caspases mais également par d'autres processus tels que les cathepsines. Ainsi, l'activation des calpaïnes (Perche et al., thèse 2008) compromettrait l'intégrité des membranes lysosomales entraînant la libération des cathepsines dans le cytoplasme conduisant à l'activation des caspases (Yamashima et al., 2004). Par conséquent, il serait intéressant d'évaluer le rôle des cathepsines dans le processus dégénératif induit par la lumière. Pour cela, nous pouvons utiliser des inhibiteurs spécifiques des différentes cathepsines en suivant un protocole identique à celui que nous avons utilisé pour les caspases. CA-074(N-(L-3-trans-carboxy

oxirane-2-carbonyl)-L-isoleucyl-L-proline) inhibe la cathepsine B, 10 000 à 30 000 fois plus que la cathepsine H ou L (Murata M. et al., 1991) et E-64C(N-(L-3 trans-carboxy oxirane-2 carbonyl)-L-leucine-3 methylbutylamide) inhibe les cathepsines H,L et B (Hashida S. et al., 1980 ; 1982).

2) Modèles expérimentaux

Le modèle de photodégénérescence rétinienne que nous avons utilisé est très drastique puisque environ 80% de la fonction rétinienne est perdue en 24 heures. À l'inverse, dans les pathologies neurodégénératives humaines, les cellules meurent progressivement et lentement. Par conséquent, il serait intéressant de déterminer si les mécanismes dégénératifs déjà identifiés dans la mort drastique des cellules photoréceptrices sont toujours valables lors d'une mort progressive. L'avantage du modèle de photodégénérescence rétinienne est qu'il permet de moduler la mort des cellules photoréceptrices et donc la dégénérescence rétinienne. Ainsi, les animaux pourraient être en lumière cyclique dont l'intensité serait telle qu'elle n'induirait une dégénérescence des cellules photoréceptrices qu'à long terme. C'est l'accumulation des effets néfastes de la lumière qui serait fatal pour les cellules. Ce modèle de photodégénérescence rétinienne progressive permettrait également de tester l'efficacité des inhibiteurs à différents stades d'évolution de la dégénérescence.

Références

A

- Abler, A. S., C. J. Chang, et al.** (1996). "Photoc injury triggers apoptosis of photoreceptor cells". Res Commun Mol Pathol Pharmacol 92(2): 177-89.
- Ahn, H.J., Y.S. Kim, et al.** (2004). "Mechanism of taxol-induced apoptosis in human SKOV3 ovarian carcinoma cells". J Cell Biochem 91: 1043-1052.
- Ahnelt, P. and H. Kolb** (1994). "Horizontal cells and cone photoreceptors in human retina: A golgi-electron microscopic study of spectral connectivity". The Journal of Comparative Neurology 343: 406-427.
- Allan, L. A., N. Morrice, et al.** (2003). "Inhibition of caspase-9 through phosphorylation at Thr 125 by ERK MAPK." Nat Cell Biol 5(7): 647-54.
- Alnemri, E.S., D.J. Livingston, et al.** (1996). "Human ICE/CED-3 protease nomenclature". Cell 87: 171.
- Alvarado-Kristensson, M., F. Melander, et al.** (2004). "p38-MAPK signals survival by phosphorylation of caspase-8 and caspase-3 in human neutrophils." J Exp Med 199(4): 449-58.
- Alvarado-Kristensson, M. and T. Andersson** (2005). "Protein phosphatase 2A regulates apoptosis in neutrophils by dephosphorylating both p38 MAPK and its substrate caspase 3." J Biol Chem 280(7): 6238-44.
- Anderson, P.** (1997). "Kinase cascades regulating entry into apoptosis". Microbiol Mol Biol Rev 61: 33-46.
- Anderson, R. E. and M. B. Maude** (1972). "Lipids of ocular tissues. 8. The effects of essential fatty acid deficiency on the phospholipids of the photoreceptor membranes of rat retina." Arch Biochem Biophys 151(1): 270-6.
- Antonsson, B., F. Conti, et al.** (1997). "Inhibition of Bax channel-forming activity by Bcl-2" Science 277(5324): 370-2.
- Arama, E., J. Agapite, J., et al.** (2003). "Caspase activity and a specific cytochrome C are required for sperm differentiation in Drosophila". Dev Cell 4: 687-697.
- Ashkenazi, A., and V.M. Dixit** (1998). "Death receptors: signaling and modulation". Science 28: 1305-1308.

B

- Bavik, C. O., C. Busch, et al.** (1992). "Characterization of a plasma retinol-binding protein membrane receptor expressed in the retinal pigment epithelium." J Biol Chem 267(32): 23035-42.
- Baumann O. and Walz B.** (2001). "Endoplasmic reticulum of animal cells and its organization into structural and functional domains". Int. Rev. Cytol 205:149–214.
- Baylor, D. A., T. D. Lamb, et al.** (1979). "Responses of retinal rods to single photons." J Physiol 288: 613-34.
- Bazan, N. G. and B. L. Scott** (1990). "Dietary omega-3 fatty acids and accumulation of docosahexaenoic acid in rod photoreceptor cells of the retina and at synapses." Ups J Med Sci Suppl 48: 97-107.
- Bergeron, L., G. I. Perez, et al.** (1998). "Defects in regulation of apoptosis in caspase-2-deficient mice". Genes Dev 12: 1304-14.
- Berson, E. L., P. Gouras, et al.** (1968). "Rod responses in retinitis pigmentosa, dominantly inherited." Arch Ophthalmol 80(1): 58-67.
- Berson, E. L.** (1993). "Retinitis pigmentosa. The Friedenwald Lecture." Invest Ophthalmol Vis Sci 34(5): 1659-76.
- Blomgren, K., C. Zhu, et al.** (2001). "Synergistic activation of caspase-3 by m-calpain after neonatal hypoxia–ischemia". J. Biol. Chem. 276:10191–10198.
- Bloodworth, J. M., Jr.** (1962). "Diabetic retinopathy." Diabetes 11: 1-22.
- Boatright, K.M., C. Deis, et al.** (2004). "Activation of caspases-8 and -10 by FLIP(L)". Biochem J 382 : 651-657.
- Bonnet, M.** (1989). "Décollement de la rétine « idiopathique » : s miologie clinique et traitement". Encycl. M d Chir (Paris-France) Ophtalmologie 21245: A10- 4.
- Borges, J. M., D. P. Edward, et al.** (1990). "A comparative study of photic injury in four inbred strains of albino rats." Curr Eye Res 9(8): 799-803.
- Boughman, J. A., M. Vernon, et al.** (1983). "Usher syndrome: definition and estimate of prevalence from two high-risk populations." J Chronic Dis 36(8): 595-603.
- Boyce, M., A. Degterev, et al.** (2004). "Caspases: an ancient cellular sword of Damocles." Cell Death Differ 11(1): 29-37.
- Brady, S.C., L.A. Allan, et al.** (2005). "Regulation of caspase 9 through phosphorylation by protein kinase C zeta in response to hyperosmotic stress". Mol Cell Biol 25: 10543–10555.

- Bratton, D. L., V. A. Fadok, et al.** (1997). "Appearance of phosphatidylserine on apoptotic cells requires calcium-mediated nonspecific flip-flop and is enhanced by loss of the aminophospholipid translocase." J Biol Chem 272(42): 26159-65.
- Braun, R. D. and R. A. Linsenmeier** (1995a). "Retinal oxygen tension and the electroretinogram during arterial occlusion in the cat." Invest Ophthalmol Vis Sci 36(3): 523-41.
- Braun, R. D., R. A. Linsenmeier, et al.** (1995b). "Oxygen consumption in the inner and outer retina of the cat." Invest Ophthalmol Vis Sci 36(3): 542-54.
- Buser, P., and M. Imbert** (1987). "Neurophysiologie Fonctionnelle". Hermann, Paris.

C

- Cai, J., J. Yang, et al.** (1998). "Mitochondrial control of apoptosis: the role of cytochrome c". Biochim Biophys Acta 1366: 139-149.
- Casali F., V. Burgat, et al.** (1999). "Le diméthylsulfoxyde (DMSO) : principales propriétés et usages autorisés propriétés et usages autorisés". Revue de Medecine Vétérinaire Volume 3 : 207-220.
- Cardone, M. H., N. Roy, et al.** (1998). "Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation." Science 282(5392): 1318-21.
- Carella, G.** (2003). "Introduction to apoptosis in ophthalmology." Eur J Ophthalmol 13 Suppl 3: S510.
- Callus, B.A. and D.L. Vaux** (2007). "Caspase inhibitors: viral, cellular and chemical". Cell Death Differ 14: 73-78.
- Cerretti, D.P., C.J. Kozlosky, et al.** (1992). "Molecular cloning of the interleukin-1 beta converting enzyme". Science 256: 97-100.
- Chang, D.W., Z. Xing, et al.** (2002). "c-FLIP(L) is a dual function regulator for caspase-8 activation and CD95-mediated apoptosis". Embo J 21: 3704-3714.
- Cheng, E.H., M.C. Wei, M.C., et al.** (2001). "BCL-2, BCL-X(L) sequester BH3 domain-only molecules preventing BAX- and BAK-mediated mitochondrial apoptosis". Mol Cell 8: 705-711.
- Chicheportiche, Y., P.R. Bourdon, et al.** (1997). "TWEAK, a new secreted ligand in the tumor necrosis factor family that weakly induces apoptosis". J Biol Chem 272: 32401-32410.
- Chowdhury, I., B. Tharakan, et al.** (2008). "Caspases-An update". Comparative biochemistry and physiology 151(1): 10-27.

- Cicerone, C. M.** (1976). "Cones survive rods in the light-damaged eye of the albino rat." Science 194(4270): 1183-5.
- Cikala, M., B. Wilm, et al.** (1999). "Identification of caspases and apoptosis in the simple metazoan Hydra". Curr Biol 9: 959-962.
- Clarke, P.G.** (1990). "Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms". Anat Embryol 181(3):195-213.
- Clarke, A. M., W. T. Ham, Jr., et al.** (1969). "Laser effects on the eye." Arch Environ Health 18(3): 424-7.
- Colombaioni, L. and M. Garcia-Gil** (2004). "Sphingolipid metabolites in neural signalling and function". Brain Res Rev 46(3): 328-55.
- Cory, S., and J.M. Adams** (2002). "The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch". Nat Rev Cancer 2: 647-656.
- Coscas, G., W.E. Green, et al.** (1991). "Dégénérescences maculaires acquises liées à l'âge et néovaisseaux sous-rétiniens". Paris: Masson 191-258.
- Costantini, P., J.M. Bruey, et al.** (2002). "Pre-processed caspase-9 contained in mitochondria participates in apoptosis". Cell Death Differ 9: 82-88.
- Cuvillier, O., G. Pirianov, et al.** (1996). "Suppression of ceramide-mediated programmed cell death by sphingosine-1-phosphate". Nature 381(6585):800-3.
- Cuvillier, O., N. Andrieu-Abadie, et al.** (2003). "Voies de signalisation de l'apoptose médiées par les sphingolipides". J Soc Biol 197:217-21.

D

- Danial, N., and S.J. Korsmeyer** (2004). "Cell death: critical control points". Cell 116:205–219.
- Daemen, F. J.** (1973). "Vertebrate rod outer segment membranes." Biochim Biophys Acta 300(3): 255-88.
- Debnath, J., E.H. Baehrecke, et al.** (2005). "Does autophagy contribute to cell death?" Autophagy 1: 66-74.
- De Botton, S., S. Sabri, et al.** (2002). "Platelet formation is the consequence of caspase activation within megakaryocytes". Blood 100:1310-1317.
- Degterev A., M. Boyce, et al.** (2003). "A decade of caspases". Oncogene 22: 8543– 8567.
- Demontis, G. C., B. Longoni, et al.** (2002). "Molecular steps involved in light-induced oxidative damage to retinal rods." Invest Ophthalmol Vis Sci 43(7): 2421-7.

- Deterre, P., C. Pfister, et al.** (1987). "The retinal phototransduction process: enzymatic cascade and regulation". Biochimie 69(4): 365-70.
- Detwiler, P.B. and A.L. Hodgkin** (1979). "Electrical coupling between cones in the turtle retina". J. Physiol. 291: 75-100.
- Deveraux, Q.L., N. Roy, et al.** (1998). "IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases". Embo J 17: 2215-2223.
- Deveraux, Q. L., H. R. Stennicke, et al.** (1999). "Endogenous inhibitors of caspases". J Clin Immunol 19(6): 388-98.
- Dick, E. and R. F. Miller** (1985). "Extracellular K⁺ activity changes related to electroretinogram components. I. Amphibian (I-type) retinas." J Gen Physiol 85(6): 885-909.
- Dobo, J., R. Swanson, et al.** (2006). "Cytokine response modifier a inhibition of initiator caspases results in covalent complex formation and dissociation of the caspase tetramer". J Biol Chem 281 :38781-38790.
- Doly, M., B. Bonhomme, et al.** (1994). "Analyse élémentaire de l'électrorétinogramme (ERG) ". Les seminaires ophtalmologiques d'IPSEN, Vision et adaptation Tome 5 : 109-120.
- Donovan, M., R. J. Carmody, et al.** (2001). "Light-induced photoreceptor apoptosis in vivo requires neuronal nitric-oxide synthase and guanylate cyclase activity and is caspase-3-independent." J Biol Chem 276(25): 23000-8.
- Donovan, M. and T. G. Cotter** (2002). "Caspase-independent photoreceptor apoptosis in vivo and differential expression of apoptotic protease activating factor-1 and caspase-3 during retinal development". Cell Death Differ 9(11): 1220-31.
- Donovan, M. and T. G. Cotter** (2004). "Control of mitochondrial integrity by Bcl-2 family members and caspase-independent cell death." Biochim Biophys Acta 1644(2-3):133-47.
- Du, C., M. Fang, et al.** (2000). "Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition". Cell 102: 33-42.
- Dunaief, J. L., T. Dentchev, et al.** (2002). "The role of apoptosis in age-related macular degeneration." Arch Ophthalmol 120(11): 1435-42.
- Duvall, E., A. H. Wyllie, et al.** (1985). "Macrophage recognition of cells undergoing programmed cell death (apoptosis)." Immunology 56(2): 351-8.

Ellis, H. and H.R. Horvitz (1986). "Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*". Cell 44:817-829.

Elmore, S. (2007). "Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death". Toxicol Pathol 35(4): 495–516.

F

Fadok, V. A., D. R. Voelker, et al. (1992). Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages." J Immunol 148(7): 2207-16.

Fadok, V.A., D.L. Bratton, et al. (2000)."A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells". Nature 405:85–90.

Feinstein-Rotkopf, Y. and E. Arama (2009). "Can't live without them, can live with them: roles of caspases during vital cellular processes". Apoptosis 14:980–995.

Fernando, P., J.F. Kelly, et al. (2002). "Caspase 3 activity is required for skeletal muscle differentiation". Proc Natl Acad Sci USA 99:11025-11030.

Fesik, S.W. (2000). "Insights into programmed cell death through structural biology". Cell 103:273-282.

Fliesler, S. J. and R. E. Anderson (1983). "Chemistry and metabolism of lipids in the vertebrate retina." Prog Lipid Res 22(2): 79-131.

Formigli, L., L. Papucci, et al. (2000). "Aponecrosis: morphological and biochemical exploration of a syncretic process of cell death sharing apoptosis and necrosis". J Cell Physiol 182:41-49.

G

Gallego, M.A., B. Joseph, et al. (2004). "Apoptosis-inducing factor determines the chemoresistance of non-small-cell lung carcinomas". Oncogene 23:6282-6291.

Galluzzi, L., C. Brenner, et al. (2008). "Viral control of mitochondrial apoptosis". PLoS Pathog 4:e1000018.

Garrido, C., L. Galluzzi, et al. (2006). "Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria". Cell Death Differ 13:1423-1433.

Germain, M. and G.C. Shore (2003)."Cellular Distribution of Bcl-2 Family Proteins". Sci. STKE pe10.

- Goldman, A. I., P. S. Teirstein, et al.** (1980). "The role of ambient lighting in circadian disc shedding in the rod outer segment of the rat retina". Invest Ophthalmol Vis Sci 19(11): 1257-67.
- Goodlett, C.R., and K.H. Horn** (2001). "Mechanisms of alcohol-induced damage to the developing nervous system". Alcohol Research & Health 25(3):175–184.
- Ghosh A.P., B.J. Klocke, et al.** (2012). "CHOP Potentially Co-Operates with FOXO3a in Neuronal Cells to Regulate PUMA and BIM Expression in Response to ER Stress". PLoS One. 7(6):e39586.
- Granit, R.** (1933). "The components of the retinal action potential in mammals and their relation to the discharge in the optic nerve". J Physiol 77(3): 207-39.
- Gregory, R. L.** (1998). "Eye and Brain, The psychology of Seeing". University Press, Oxford.

H

- Haimann, MH., T.C. Burton, et al.** (1982). "Epidemiology of retinal detachment". Arch Ophthalmol 100:289-92.
- Hakem, R., A. Hakem, et al.** (1998). "Differential requirement for caspase 9 in apoptotic pathways in vivo". Cell 94:339-52.
- Ham, W. T., Jr., H. A. Mueller, et al.** (1979). "Sensitivity of the retina to radiation damage as a function of wavelength." Photochem Photobiol 29(4): 735-43.
- Hashida, S., T. Towatari, et al.** (1980). "Inhibitions by E-64 derivatives of rat liver cathepsin B and cathepsin L in vitro and in vivo". J.Biochem. 88: 1805-1811.
- Hashida, S., E. Kominami, et al.** (1982). "Inhibitions of cathepsin B and cathepsin L by E-64 in vivo. II. Incorporation of [3H] E-64 into rat liver lysosomes in vivo". J.Biochem. 91(4):1373-80.
- Harman, D.** (1992). "Role of free radicals in aging and disease". Ann N Y Acad Sci 673:126-141.
- Hammes, H. P., H. J. Federoff, et al.** (1995). "Nerve growth factor prevents both neuroretinal programmed cell death and capillary pathology in experimental diabetes." Mol Med 1(5): 527-34.
- Hartley, D. P., D. J. Kroll, et al.** (1997). "Prooxidant-initiated lipid peroxidation in isolated rat hepatocytes : detection of 4-hydroxynonenal and malondialdehyde-protein adducts" Chem Res Toxicol 10: 895-905.

Hegde, R., S.M. Srinivasula, et al. (2002). "Identification of Omi/HtrA2 as a mitochondrial apoptotic serine protease that disrupts inhibitor of apoptosis protein-caspase interaction". J Biol Chem 277:432-438.

Henson, P.M., D.L. Bratton, et al. (2001). "Apoptotic cell removal". Curr. Biol 11:R795–R805.

Henson, P.M. (2005). "Dampening inflammation, Nat Immunol". Dec 6(12):1179-81.

Horvitz, H.R. (1999). "Genetic control of programmed cell death in the nematode *Caenorhabditis elegans*". Cancer Res 59:1701s-1706s.

Hu, Y., M.A. Benedict, et al. (1998). "Bcl-XL interacts with Apaf-1 and inhibits Apaf-1-dependent caspase-9 activation". Proc Natl Acad Sci USA 95: 4386-91.

Huang, D. C., J. M. Adams, et al. (1998). "The conserved N-terminal BH4 domain of Bcl-2 homologues is essential for inhibition of apoptosis and interaction with CED-4". Embo J 17:1029-39.

Huisman, C., C.G. Ferreira, et al. (2002). "Paclitaxel triggers cell death primarily via caspase-independent routes in the non-small cell lung cancer cell line NCI-H460". Clin Cancer Res 8:596-606.

I

Irmiler, M., M. Thome, et al. (1997). "Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP". Nature 388:190-195.

J

Jiang, X., and X. Wang (2000). "Cytochrome c promotes caspase-9 activation by inducing nucleotide binding to Apaf-1". J Biol Chem 275:31199-31203.

K

Kaufman, R.J. (1999). "Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum: coordination of gene transcriptional and translational controls". Genes Dev 13 :1211-1233.

Katayama T., K. Imaizumi, et al. (2004). "Induction of neuronal death by ER stress in Alzheimer's disease". J. Chem. Neuroanat. 28(1-2): 67-78.

Kawaguchi, R., J. Yu, et al. (2007). "A membrane receptor for retinol binding protein mediates cellular uptake of vitamin A". Science 315(5813): 820-5.

Kerr, J. F. (2002). "History of the events leading to the formulation of the apoptosis

Concept". Toxicology 181-182, 471-4.

Kerr, J. F., A. H. Wyllie, et al. (1972). "Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics". Br J Cancer 26(4): 239-57.

Kim, H., M. Rafiuddin-Shah, et al. (2006). "Hierarchical regulation of mitochondrion-dependent apoptosis by BCL-2 subfamilies". Nat Cell Biol 8:1348-58.

Klaver, C. C., M. Kliffen, et al. (1998). "Genetic association of apolipoprotein E with age-related macular degeneration". Am J Hum Genet 63(1): 200-6.

Kluck, R.M., M. Degli Esposti, et al. (1999). "The proapoptotic proteins, Bid and Bax, cause a limited permeabilization of the mitochondrial outer membrane that is enhanced by cytosol". J. Cell Biol 147:809-822.

Kühn, H. (1984). "Interaction between photoexcited rhodopsin and light-activated enzymes in rods." Prog Retin Res 3: 123-156.

Kuida, K., T. S. Zheng, et al. (1996). "Decreased apoptosis in the brain and premature lethality in CPP32-deficient mice". Nature 384:368-72.

Kuida, K., J. A. Lippke, et al. (1995). "Altered cytokine export and apoptosis in mice deficient in interleukin-1 beta converting enzyme". Science 267: 2000-3.

Kuida, K., T. F. Haydar, et al. (1998). "Reduced apoptosis and cytochrome c-mediated caspase activation in mice lacking caspase 9". Cell 94:325-37.

Kuranaga, E., and M. Miura (2007). "Nonapoptotic functions of caspases: caspases as regulatory molecules for immunity and cell-fate determination". Trends Cell Biol 17:135–144.

Kuranaga, E. (2011). "Caspase signaling in animal development". Develop. Growth Differ. 53:137–148.

L

Lamkanfi, M., N. Festjens, et al. (2007). "Caspases in cell survival, proliferation and differentiation". Cell Death Differ 14:44-55.

Launay, S., O. Hermine, et al. (2005). "Vital functions for lethal caspases". Oncogene 24:5137-5148.

Lavrik, I.N., A. Golks, et al. (2005). "Caspases: pharmacological manipulation of cell death". J Clin Invest 115 :2665-72.

LaVail, M. M. (1976). "Rod outer segment disk shedding in rat retina: relationship to cyclic lighting." Science 194(4269): 1071-4.

- LaVail, M. M. and P.A. Ward** (1978). "Studies on the hormonal control of circadian outer segment disc shedding in the rat retina." Invest Ophthalmol Vis Sci 17(12): 1189-3.
- LaVail, M. M., D. S. Papermaster, et al.** (1987). "Absence of an inherited retinal degeneration in the WAG/Rij rat." Exp Eye Res 44(3): 465-9.
- Leskov, I.B., V.A. Klenchin, et al.** (2000). "The gain of rod phototransduction: reconciliation of biochemical and electrophysiological measurements". Neuron. 27:525–537.
- Lewis, D. M.** (1957). "Regeneration of rhodopsin in the albino rat." J Physiol 136(3): 624-31.
- Li, P., H. Allen, et al.** (1995). "Mice deficient in IL-1 beta-converting enzyme are defective in production of mature IL-1 beta and resistant to endotoxic shock". Cell 80:401-11.
- Li, H., H. Zhu, et al.** (1998). "Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis". Cell 94:491-501.
- Li, P., D. Nijhawan, et al.** (1997). "Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade". Cell 91:479-89.
- Li, K., Y. Li, et al.** (2000). "Cytochrome c deficiency causes embryonic lethality and attenuates stress-induced apoptosis [In Process Citation]". Cell 101:389-99.
- Li, L.Y., X. Luo, et al.** (2001). "Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria". Nature 412: 95-99.
- Liston, P., W. G. Fong, et al.** (2003). "The inhibitors of apoptosis: there is more to life than Bcl2". Oncogene 22(53): 8568-80.
- Litmann, B.J., and D.C. Mitchell** (1996). "Rhodopsin structure and function". Greenwich, Conn: JAI Press. pp. 1–32. ISBN 1-55938-659-2.
- Liu, X.S., C.N. Kim, et al.** (1996). "Purification and characterization of an interleukin-1b converting enzyme family of protease that activates cysteine protease p32 (CPP32)." J. Biol. Chem 271:13371–13376.
- Liu, H., R. C. Bowes, et al.** (1997). "Endoplasmic reticulum chaperones GRP78 and calreticulin prevent oxidative stress, Ca²⁺ disturbances, and cell death in renal epithelial cells." J Biol Chem 272(35): 21751-9.
- Los, M., S. Wesselborg, et al.** (1999). "The role of caspases in development, immunity, and apoptotic signal transduction: lessons from knockout mice". Immunity 10:629-39.
- Lund, L.R., J. Romer, et al.** (1996). "Two distinct phases of apoptosis in mammary gland involution: proteinase independent and -dependent pathways". Development 122:181-193.

Luo, X., I. Budihardjo, et al. (1998). "Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors". Cell 94: 481-90.

M

Malik, S., D. Cohen, et al. (1986). "Light damage in the developing retina of the albino rat: an electroretinographic study." Invest Ophthalmol Vis Sci 27(2): 164-7.

Martinon, F., K. Hofmann, et al. (2001). "The pyrin domain: a possible member of the death domain-fold family implicated in apoptosis and inflammation". Curr Biol 11:R118-120.

Martinon, F., and J. Tschopp (2004). "Inflammatory caspases: linking an intracellular innate immune system to autoinflammatory diseases". Cell 117:561-574.

Martin, J. B. (1999). "Molecular basis of the neurodegenerative disorders." N Engl J Med 340(25): 1970-80.

Martins, L. M., T. J. Kottke, et al. (1998). "Phosphorylated forms of activated caspases are present in cytosol from HL-60 cells during etoposide-induced apoptosis". Blood 92 :3042-9.

Matsumoto, B., D. M. Defoe, et al. (1987). "Membrane turnover in rod photoreceptors: ensheathment and phagocytosis of outer segment distal tips by pseudopodia of the retinal pigment epithelium." Proc R Soc Lond B Biol Sci 230(1260): 339-54.

Merbs, S. L., and J. Nathans (1992). "Absorption spectra of human cone pigments." Nature 356(6368): 433-5.

Merrill, A.H. Jr., and D.D. Jones (1990). "An update of the enzymology and regulation of sphingomyelin Metabolism". Biochim Biophys Acta 1044:1-12.

Messner, K. H., M. J. Maisels, et al. (1978). "Phototoxicity to the newborn primate retina." Invest Ophthalmol Vis Sci 17(2): 178-82.

Mikhailov, V., M. Mikhailova, et al. (2001). "Bcl-2 prevents Bax oligomerization in the mitochondrial outer membrane". J Biol Chem 276(21): 18361-74.

Mikhailov, V., M. Mikhailova, et al. (2003). "Association of Bax and Bak homo-oligomers in mitochondria. Bax requirement for Bak reorganization and cytochrome c release". J Biol Chem 278(7): 5367-76.

Mikolka, P., D. Mokra, et al. (2012). "Dimethyl sulfoxide in a 10% concentration has no effect on oxidation stress induced by ovalbumin-sensitization in a guinea-pig model of allergic asthma". J. Physiol. Pharmacol. 63(2):179-86.

- Minn, A. J., P. Velez, et al.** (1997). "Bcl-x(L) forms an ion channel in synthetic lipid membranes." Nature 385(6614): 353-7.
- Miura, M., H. Zhu, et al.** (1993). "Induction of apoptosis in fibroblasts by IL-1 beta-converting enzyme, a mammalian homolog of the *C. elegans* cell death gene *ced-3*". Cell 75(4):653-60.
- Monaghan, P., D. Robertson, et al.** (1992). "Ultrastructural localization of bcl-2 protein. J Histochem Cytochem 40(12):1819-25.
- Mogi, M., and A. Togari** (2003). "Activation of caspases is required for osteoblastic Differentiation". J Biol Chem 278:47477-47482.
- Monnier P., P. Philippe, et al.** (2011). "Involvement of Caspase-6 and Caspase-8 in Neuronal Apoptosis and the Regenerative Failure of Injured Retinal Ganglion Cells". The Journal of Neuroscience 31(29):10494 –10505.
- Muchmore, S. W., M. Sattler, et al.** (1996). "X-ray and NMR structure of human Bcl-xL, an inhibitor of programmed cell death." Nature 381(6580): 335-41.
- Murata, M., S. Miyashita, et al.** (1991). "FEBS Lett". 280: 307-310.

N

- Nakagawa, T., and J. Yuan** (2000). "Cross-talk between two cysteine protease families. Activation of caspase-12 by calpain in apoptosis." J Cell Biol 150(4): 887-94.
- Nicholson, DW., A. Ali, et al.** (1995). "Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis". Nature 376(6535):37-43
- Nickells, R. W.** (1996). "Retinal ganglion cell death in glaucoma: the how, the why, and the maybe." J Glaucoma 5(5): 345-56.
- Nijhawan, D., N. Honarpour, et al.** (2000). "Apoptosis in neural development and Disease". Annu Rev Neurosci 23:73-87.
- Norbury, C. J. and I.D. Hickson** (2001). "Cellular responses to DNA damage". Annu Rev Pharmacol Toxicol 41 : 367-401.
- Noell, W. K., V. S. Walker, et al.** (1966). "Retinal damage by light in rats." Invest Ophthalmol 5(5): 450-73.

O

- O'Steen, W. K., K. V. Anderson, et al.** (1974). "Photoreceptor degeneration in albino rats: dependency on age." Invest Ophthalmol 13(5): 334-9.

- O'Steen, W. K. and J. E. Donnelly** (1982). "Chronologic analysis of variations in retinal damage in two strains of rats after short-term illumination." Invest Ophthalmol Vis Sci 22(2): 252-5.
- Ohguro, H., J. P. Van Hooser, et al.** (1995). "Rhodopsin phosphorylation and dephosphorylation in vivo". J Biol Chem 270(24): 14259-62.
- Opferman, J.T., and S.J. Korsmeyer** (2003). "Apoptosis in the development and maintenance of the immune system". Nat Immunol 4:410-415.
- Oprian, D. D., A. B. Asenjo, et al.** (1991). "Design, chemical synthesis, and expression of genes for the three human color vision pigments". Biochemistry 30(48): 11367-72.
- Organisciak, D. T., A. Xie, et al.** (1991). "Adaptive changes in visual cell transduction protein levels: effect of light". Exp Eye Res 53(6): 773-9.
- Organisciak, D. T., R. M. Darrow, et al.** (1992). "Protection by dimethylthiourea against retinal light damage in rats." Invest Ophthalmol Vis Sci 33(5): 1599-609.
- Organisciak, D. T., R. M. Darrow, et al.** (1998). "Light history and age-related changes in retinal light damage." Invest Ophthalmol Vis Sci 39(7): 1107-16.
- Organisciak, D.T., M. Li, et al.** (1999). "Photoreceptor cell damage by light in young Royal College of Surgeons rats". Curr Eye Res 19: 188 –196.
- Osborne, B.A.** (1996). "Apoptosis and the maintenance of homeostasis in the immune system". Curr Opin Immunol 8:245-254.
- Ozawa, T.** (1995). "Mechanism of somatic mitochondrial DNA mutations associated with age and diseases". Biochim Biophys Acta 1271:177-189.

P

- Pan, G., K. O'Rourke, et al.** (1998). "Caspase-9, Bcl-XL, and Apaf-1 form a ternary complex". J Biol Chem 273:5841-5.
- Parier, V. and G. Soubrane** (2008). "Age-related macular degeneration". Rev Med Interne. 29(3): 215-23.
- Pederzoli, M., C. Kantari, et al.** (2005). "Proteinase-3 induces procaspase-3 activation in the absence of apoptosis: potential role of this compartmentalized activation of membrane-associated procaspase-3 in neutrophils". J Immunol 174: 6381-6390.
- Penn, J. S., B. N. Baker, et al.** (1985). "Retinal light-damage in albino rats: lysosomal enzymes, rhodopsin, and age." Exp Eye Res 41(3): 275-84.
- Penn, J. S., M. I. Naash, et al.** (1987). "Effect of light history on retinal antioxidants and light damage susceptibility in the rat." Exp Eye Res 44(6): 779-88.

- Pepe, S., K. Bogdanov, et al.** (1994). "Omega 3 polyunsaturated fatty acid modulates dihydropyridine effects on L-type Ca²⁺ channels, cytosolic Ca²⁺, and contraction in adult rat cardiac myocytes." Proc Natl Acad Sci U S A 91(19): 8832-6.
- Perlman, I.** (1978). "Kinetics of bleaching and regeneration of rhodopsin in abnormal (RCS) and normal albino rats in vivo". J Physiol 278: 141-59.
- Perche, O., M. Doly, et al.** (2007). "Caspase-dependent apoptosis in light-induced retinal degeneration". Invest Ophthalmol Vis Sci 48(6): 2753-9.
- Peter, M.E., and P.H. Kramer** (1998). "Mechanisms of CD95 (APO-1/Fas)-mediated apoptosis". Curr Opin Immunol 10:545-551.
- Puech, B., B. Kostrubiec, et al.** (1991). "[Epidemiology and prevalence of hereditary retinal dystrophies in the Northern France]". J Fr Ophthalmol 14(3): 153-64.
- Puthalakath, H. and A. Strasser** (2002). "Keeping killers on a tight leash: transcriptional and post-translational control of the pro-apoptotic activity of BH3-only proteins". Cell Death Differ 9:505-12.

R

- Ranchon, I., S. Chen, et al.** (2001). "Systemic administration of phenyl-N-tert-butyl nitronone protects the retina from light damage." Invest Ophthalmol Vis Sci 42(6): 1375-9.
- Ranchon, I., J. M. Gorrard, et al.** (1998). "Light-induced variations of retinal sensitivity in rats". Curr Eye Res 17(1): 14-23.
- Ranchon, I., J. M. Gorrard, et al.** (1999). "Functional protection of photoreceptors from light-induced damage by dimethylthiourea and Ginkgo biloba extract." Invest Ophthalmol Vis Sci 40(6): 1191-9.
- Ranchon, I., M. M. LaVail, et al.** (2003). "Free radical trap phenyl-N-tert-butyl nitronone protects against light damage but does not rescue P23H and S334ter rhodopsin transgenic rats from inherited retinal degeneration." J Neurosci 23(14): 6050-7.
- Rao, R. V., E. Hermel, et al.** (2001). "Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. Mechanism of caspase activation". J Biol Chem 276(36): 33869-74.
- Rapp, L. M., B. L. Tolman, et al.** (1990). "Separate mechanisms for retinal damage by ultraviolet-A and mid-visible light." Invest Ophthalmol Vis Sci 31(6): 1186-90.
- Reme, C. E., U. F. Braschler, et al.** (1991). "Light damage in the rat retina: effect of a radioprotective agent (WR-77913) on acute rod outer segment disk disruptions." Photochem Photobiol 54(1): 137-42.

- Renehan, A.G., C. Booth, et al.** (2001). "What is apoptosis, and why is it important?" Bmj 322:1536-1538.
- Rinkoff, J., R. Machemer, et al.** (1986). "Temperature-dependent light damage to the retina." Am J Ophthalmol 102(4): 452-62.
- Roy, N., Q.L. Deveraux, et al.** (1997). "The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases". Embo J 16:6914-6925.
- Rubin, L.** (1975). "Toxicity of dimethyl sulfoxide, alone and in combination". Ann N Y Acad Sci. 27; 243: 98-103.
- Rubio-Moscardo, F., D. Blesa, et al.** (2005). "Characterization of 8p21.3 chromosomal deletions in B-cell lymphoma: TRAIL-R1 and TRAIL-R2 as candidate dosage-dependent tumor suppressor genes". Blood 106:3214-3222.
- Ryan, C.A., Stennicke, H.R., et al.** (2002). "Inhibitor specificity of recombinant and endogenous caspase-9". Biochem J, 366:595-601.

S

- Saelens, X., N. Festjens, et al.**(2004). "Toxic proteins released from mitochondria in cell death". Oncogene 23:2861-2874.
- Salvesen, G.S., and C.S. Duckett** (2002). "IAP proteins: blocking the road to death's door." Nat Rev Mol Cell Biol 3:401-410.
- Saari, J. C., and L. Bredberg** (1982). "Enzymatic reduction of 11-cis-retinal bound to cellular retinal-binding protein". Biochim Biophys Acta 716(2): 266-72.
- Saari, J. C., L. Bredberg, et al.** (1982). "Identification of the endogenous retinoids associated with three cellular retinoid-binding proteins from bovine retina and retinal pigment epithelium". J Biol Chem 257(22): 13329-33.
- Sanmartín-Suárez C., R. Soto-Otero, et al.** (2011). "Antioxidant properties of dimethyl sulfoxide and its viability as a solvent in the evaluation of neuroprotective antioxidants". J Pharmacol Toxicol Methods 63(2):209-215.
- Santos, N.C., J. Figueira-Coelho, et al.** (2003). "Multidisciplinary utilization of dimethyl sulfoxide: pharmacological, cellular, and molecular aspects". Biochem Pharmacol. 1; 65(7):1035-41.
- Savill, J., I. Dransfield, et al.** (1990). "Vitronectin receptor-mediated phagocytosis of cells undergoing apoptosis". Nature 343(6254): 170-3.
- Savill, J.** (1997). "Recognition and phagocytosis of cells undergoing apoptosis". Br Med Bull 53:491–508.

- Savill, J., I. Dransfield et al.** (2002). "A blast from the past: clearance of apoptotic cells regulates immune responses". Nature Reviews Immunology 2:965-975.
- Schimmer, A.D.** (2004). "Inhibitor of apoptosis proteins: translating basic knowledge into clinical practice". Cancer research 64:7183-7190.
- Scorrano, L., S. A. Oakes, et al.** (2003). "BAX and BAK regulation of endoplasmic reticulum Ca²⁺: a control point for apoptosis". Science 300(5616): 135-9.
- Seshagiri, S., and L.K. Miller** (1997). "Caenorhabditis elegans CED-4 stimulates CED-3 processing and CED-3-induced apoptosis". Curr Biol 7:455-60.
- Schendel, S. L., Z. Xie, et al.** (1997). "Channel formation by antiapoptotic protein Bcl-2". Proc Natl Acad Sci USA 94(10): 5113-8.
- Schendel, S. L., R. Azimov, et al.** (1999). "Ion channel activity of the BH3 only Bcl-2 family member, BID". J Biol Chem 274(31): 21932-6.
- Schremser, J.L., and T.P. Williams** (1995). "Rod outer segment renewal as a mechanism for adaptation to a new intensity environment. II. Rhodopsin synthesis and packing density". Experimental Eye Research 61:25–32.
- Schwartz, M., and J. Vissing** (2002). "Paternal inheritance of mitochondrial DNA". N Engl J Med 347(8): 576-80.
- Shah, S., and M.D. Levin** (1996). "Visual information processing in primate cone pathways-part i: A model". IEEE Transactions on Systems, Man and Cybernetics 26(2): 259-274.
- Sherman, M.Y., and A.L. Goldberg** (2001). "Cellular Defenses against Unfolded Proteins: A Cell Biologist Thinks about Neurodegenerative Diseases". Neuron 29 pp. 15–3.
- Shimizu, S., A. Konishi, et al.** (2000). "BH4 domain of antiapoptotic Bcl-2 family members closes voltage-dependent anion channel and inhibits apoptotic mitochondrial changes and cell death". Proc Natl Acad Sci USA 97(7): 3100-5.
- Silva, R.M., V. Ries, et al.** (2005). "CHOP/GADD153 is a mediator of apoptotic death in substantia nigra dopamine neurons in an in vivo neurotoxin model of Parkinsonism". J Neurochem, 95: 974–986.
- Silverman C.** (1983). "Ocular Toxicity of Experimental Intravitreal DMSO". Retina Division Jules Steine Eye Institute Department of Ophthalmology Vol. 2, No. 2-3: 193-200
- Skoog, K. O.** (1985). "Fast and slow artificial diurnal rhythms (light-darkness-light) and the rate of progression of retinal degeneration in dystrophic RCS rats. An electroretinographic study". Br J Ophthalmol 69 (6): 468-70.

- Smith, K. G., A. Strasser, et al.** (1996). "CrmA expression in T lymphocytes of transgenic mice inhibits CD95 (Fas/APO-1)-transduced apoptosis, but does not cause lymphadenopathy or autoimmune disease". Embo J 15:5167-76.
- Sordet, O., C. Rebe, et al.** (2002). "Specific involvement of caspases in the differentiation of monocytes into macrophages". Blood 100:4446-4453.
- Souied, E. H., P. Benlian, et al.** (1998). "The epsilon4 allele of the apolipoprotein E gene as a potential protective factor for exudative age-related macular degeneration." Am J Ophthalmol 125(3): 353-9.
- Sperandio, S., I. de Belle, et al.** (2000). "An alternative, nonapoptotic form of programmed cell death". Proc Natl Acad Sci USA 97:14376-14381.
- Steller, H.** (1995). "Mechanisms and genes of cellular suicide". Science 267:1445-1449.
- Strasser, A.** (2005). "The role of BH3-only proteins in the immune system". Nat Rev Immunol. 5(3):189-200.
- Stone, E. M., T. A. Braun, et al.** (2004). "Missense variations in the fibulin 5 gene and age-related macular degeneration." N Engl J Med 351(4): 346-53.
- Stuart, J.A., and R.R. Brige** (1996). "Characterization of the primary photochemical events in bacteriorhodopsin and rhodopsin". In Lee AG. Rhodopsin and G-Protein Linked Receptors, Part A (Vol 2, 1996) (2 Vol Set). Greenwich, Conn: JAI Press. pp. 33–140. ISBN 1-55938-659-2.
- Suliman, A., A. Lam, et al.** (2001). "Intracellular mechanisms of TRAIL: apoptosis through mitochondrial-dependent and -independent pathways". Oncogene 20:2122-2133.
- Sun, X.M., M. MacFarlane, et al.** (1998). "Distinct Caspase Cascades Are Initiated in Receptor-mediated and Chemical-induced Apoptosis". J. Biochem. 274, 8: 5053–5060.
- Suzuki, Y., Y. Nakabayashi, et al.** (2001). "Ubiquitin-protein ligase activity of X-linked inhibitor of apoptosis protein promotes proteasomal degradation of caspase-3 and enhances its anti-apoptotic effect in Fas-induced cell death". Proc Natl Acad Sci USA 98(15): 8662-7.
- Sykes, S. M., W. G. Robison, Jr., et al.** (1981). "Damage to the monkey retina by broad-spectrum fluorescent light." Invest Ophthalmol Vis Sci 20(4): 425-34.
- Szel, A., and P. Rohlich** (1992). "Two cone types of rat retina detected by anti-visual pigment antibodies". Exp Eye Res 55(1): 47-52.

- Takahashi, R., Q. Deveraux, Q., et al.** (1998). "A single BIR domain of XIAP sufficient for inhibiting caspases". J Biol Chem 273:7787-90.
- Taylor, J. P., J. Hardy, et al.** (2002). "Toxic proteins in neurodegenerative disease". Science 296 (5575): 1991-5.
- Tanito, M., M. H. Elliott, et al.** (2005). "Protein modifications by 4-hydroxynonenal and 4-hydroxyhexenal in light-exposed rat retina." Invest Ophthalmol Vis Sci 46(10): 3859-68.
- Tanito, M., H. Haniu, et al.** (2006). "Identification of 4-hydroxynonenal-modified retinal proteins induced by photooxidative stress prior to retinal degeneration." Free Radic Biol Med 41(12): 1847-59.
- Tanito, M., A. Nishiyama, et al.** (2002). "Change of redox status and modulation by thiol replenishment in retinal photooxidative damage." Invest Ophthalmol Vis Sci 43(7): 2392-400.
- Theilmeier, G., C. Schmidt, et al.** (2006). "High-density lipoproteins and their constituent, sphingosine-1-phosphate, directly protect the heart against ischemia/reperfusion injury in vivo via the S1P3 lysophospholipid receptor". Circulation 26; 114(13):1403-9.
- Thon, L., H. Mohlig, et al.** (2005). "Ceramide mediates caspase-independent programmed cell death". Faseb J 19:1945-1956.
- Thornberry, N. A., H. G. Bull, et al.** (1992). "A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes". Nature 356:768-74.
- Thornberry, N.A., T.A. Rano, et al.** (1997). "A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B. Functional relationships established for key mediators of apoptosis". J Biol Chem 272:17907-17911.
- Tilly, J.L., K.I. Kowalski, et al.** (1991). "Involvement of apoptosis in ovarian follicular atresia and postovulatory regression". Endocrinology 129:2799-2801.
- Tso, MO., C. Zhang, et al.** (1994). "Apoptosis leads to photoreceptor degeneration in inherited retinal dystrophy of RCS rats". Invest Ophthalmol Vis Sci 35:2693-9.
- Tytell, M., M. F. Barbe, et al.** (1989). "Photoreceptor protection from light damage by hyperthermia." Prog Clin Biol Res 314: 523-38.

Van Loo, G., M. Van Gurp, et al. (2002). "The serine protease Omi/HtrA2 is released from mitochondria during apoptosis. Omi interacts with caspase-inhibitor XIAP and induces enhanced caspase activity". Cell Death Differ 9: 20-26.

Varfolomeev, E. E., M. Schuchmann, et al. (1998). "Targeted disruption of the mouse Caspase 8 gene ablates cell death induction by the TNF receptors, Fas/Apo1, and DR3 and is lethal prenatally". Immunity 9:267-76.

Vaux, D. L., S. Cory, et al. (1988). "Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells". Nature 335(6189): 440-2.

W

Wallace, D. C., G. Singh, et al. (1988). "Mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy". Science 242(4884): 1427-30.

Wang, H. G., T. Miyashita, et al. (1994). "Apoptosis regulation by interaction of Bcl-2 protein and Raf-1 kinase". Oncogene 9:2751-6.

Wang, S., M. Miura, et al. (1998). "Murine caspase-11, an ICE-interacting protease, is essential for the activation of ICE". Cell 92:501-9.

Wang, K.K. (2000). "Calpain and caspase: can you tell the difference?" Trends Neurosci 23: 20-26.

Wang, J. Y. and M. Saito (2001). "Dietary supplementation of N-3 fatty acids and hydroperoxide levels in rat retinas." Free Radic Res 35(4): 367-75.

Weber, C.H., and C. Vincenz (2001). "The death domain superfamily: a tale of two interfaces?" Trends Biochem Sci 26:475-481.

Wei, M.C., W.X. Zong, et al. (2001). "Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death". Science 292:727-730.

Weidner, C. (1976). "The c-wave in the ERG of albino rat." Vision Res 16(7): 753-63.

Weil, M., M.C. Raff, et al. (1999). "Caspase activation in the terminal differentiation of human epidermal keratinocytes". Curr Biol 9:361-364.

Weishaupt, J.H., R. Diem, et al. (2003). "Contribution of caspase-8 to apoptosis of axotomized rat retinal ganglion cells in vivo". Neurobiology of Disease 13: 124-135.

Welihinda, A. A., W. Tirasophon, et al. (1999). "The cellular response to protein misfolding in the endoplasmic reticulum". Gene Expr 7: 293-300.

- Wenzell, A., C. Grimm, et al.** (2005). "Molecular mechanisms of light-induced photoreceptor apoptosis and neuroprotection for retinal degeneration". Progress in Retinal and Eye Research 24: 275–306.
- Wihlmark, U., A. Wrigstad, et al.** (1997). "Lipofuscin accumulation in cultured retinal pigment epithelial cells causes enhanced sensitivity to blue light irradiation." Free Radic Biol Med 22(7): 1229-34.
- Wilden, U.** (1995). "Duration and amplitude of the light-induced cGMP hydrolysis in vertebrate photoreceptors are regulated by multiple phosphorylation of rhodopsin and by arrestin binding". Biochemistry 34(4): 1446-54.
- Wilden, U., S. W. Hall, et al.** (1986). "Phosphodiesterase activation by photoexcited rhodopsin is quenched when rhodopsin is phosphorylated and binds the intrinsic 48-kDa protein of rod outer segments". Proc Natl Acad Sci USA 83(5): 1174-8.
- Woo, M., R. Hakem, et al.** (1998). "Essential contribution of caspase 3/CPP32 to apoptosis and its associated nuclear changes". Genes Dev 12:806-19.
- Wu, S.M.** (1994). "Synaptic transmission in the outer retina". Annual Reviews on Physiology 56: 141-168.
- Wyllie, A. H.** (1980). "Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation". Nature 284:555-6.
- Wyse, J. H. P.** (1980). "Renewal of rod outer segments following light-induced damage of the retina". Can J Ophthalmol 15: 4.

X

- Xu, G., M. Cirilli, et al.** (2001). "Covalent inhibition revealed by the crystal structure of the caspase-8/p35 complex". Nature 410(6827): 494-7.
- Xu, G. Z., W. W. Li, et al.** (1996). "Apoptosis in human retinal degenerations." Trans Am Ophthalmol Soc 94: 411-30; discussion 430-1.

Y

- Yamashima et al.** (2004). "Ca²⁺-dependent proteases in ischemic neuronal death A conserved 'calpain–cathepsin cascade' from nematodes to primates". Cell Calcium 36: 285–293.
- Yang, Y. L. and X.M. Li** (2000). "The IAP family: endogenous caspase inhibitors with multiple biological activities". Cell Res 10(3): 169-77.

- Yang L., L. Wu, et al.** (2008). "Endoplasmic Reticulum Stress Is Activated in Light-Induced Retinal Degeneration". J. of Neuroscience Research 86: 910–919.
- Yau, K. W., and K. Nakatani** (1995). "Light-induced reduction of cytoplasmic free calcium in retinal rod outer segment". Nature 313(6003): 579-82.
- Yi, C.H., and J. Yuan** (2009). "The Jekyll and Hyde functions of caspases". Dev Cell 16: 21-34.
- Yoneda, T., K. Imaizumi, et al.** (2001). "Activation of caspase-12, an endoplasmic reticulum (ER) resident caspase, through tumor necrosis factor receptor-associated factor 2-dependent mechanism in response to the ER stress". J Biol Chem 276(17): 13935-40.
- Youle, R. J. and A. Strasser** (2008). "The bcl-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. Nat Rev Mol". Cell Biol 9(1): 47-59.
- Yuan, J., Shaham, S. et al.** (1993). "The C. elegans cell death gene ced-3 encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme". Cell 75:641-52.

Z

- Zermati, Y., C. Garrido, et al.** (2001). "Caspase activation is required for terminal erythroid Differentiation". J Exp Med 193:247-254.
- Ziegler, U. and P. Groscurth** (2004). "Morphological features of cell death. News Physiol". Sci 19:124–128.
- Zou, H., W. J. Henzel, et al.** (1997). "Apaf-1, a human protein homologous to C. elegans CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3". Cell 90:405-13.
- Zou, H., Y. Li, et al.** (1999). "An APAF-1.cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9". J Biol Chem 274:11549-56.
- Zhou, Q., Snipas, S., et al.** (1997) Target protease specificity of the viral serpin CrmA. Analysis of five caspases". J Biol Chem 272 :7797-7800.
- Zhou, Q., J.F. Krebs, et al.** (1998). "Interaction of the baculovirus anti-apoptotic protein p35 with caspases. Specificity, kinetics, and characterization of the caspase/p35 complex". Biochemistry 37:10757-10765.

HOURI TAREK – Rôle des Caspases au Cours de la Photodégénérescence Rétinienne

Thèse pour le Doctorat d'Université, Faculté de Médecine et de Pharmacie, Clermont-Ferrand - 2012

Résumé :

Quelque soit le type de dégénérescences rétiniennes, les cellules photoréceptrices à l'origine de la genèse du signal lumineux, meurent par un mécanisme commun : l'apoptose. Au laboratoire, nous avons mis en évidence que l'inhibition de la caspase-3, une caspase effectrice de l'apoptose, permet de réduire l'apoptose des cellules photoréceptrices (Perche et al. 2007). Dans la continuité de ces résultats, le but de nos travaux de thèse est d'identifier les molécules impliquées en amont de la caspase-3.

Pour mener à bien notre projet, nous avons utilisées un modèle expérimentale de dégénérescence rétinienne induite par une exposition à la lumière (modèle de photodégénérescence rétinienne). Les atteintes rétiniennes sont quantifiées par : l'électrorétinographie in-vivo permettant d'évaluer la fonction rétinienne, l'histologie pour l'analyse morphométrique de la rétine aux quelles sont associés des dosages enzymatiques. Ainsi, nous avons montré que l'injection d'un inhibiteur de la caspase-12 à 0,4 ou à 0,8 mM, de la caspase-9 à 0,2 ou à 0,4 mM, ou de la caspase-8 à 0,2 mM, injecté dans le vitré n'a aucun effet toxique sur la rétine et n'a aucun effet protecteur contre l'apoptose des cellules photoréceptrices induites par la lumière. Ces résultats suggèrent que les caspases-8, 9 et 12 ne sont pas impliquées dans l'activation de la caspase-3 et donc dans l'initiation de l'apoptose des photorécepteurs induite par la lumière.

Toutefois, après injection dans le vitré, les inhibiteurs inhibent leur cible respective uniquement transitoirement. Par conséquent, pour pouvoir conclure sur le rôle de ces caspases dans le processus dégénératif, il faudrait pouvoir inhiber les caspases de façon plus persistante.

Il serait donc intéressant de reproduire des expérimentations similaires en augmentant la concentration de l'inhibiteur injecté ou en réduisant le délai entre l'injection de l'inhibiteur et l'induction du stress. De plus, la caspase-3 peut être activée indépendamment des caspases initiatrices, comme par exemple : les céramides, les cathepsines et les calpaïnes.

Mots clés : Apoptose ; Photodégénérescence ; Rat Wistar ; Rétine; Caspases ; Electrorétinographie.

Jury : Président : Monsieur Le Professeur M. Doly

Membres : Monsieur Le Professeur J.Y. Le Guennec
Monsieur Le Docteur L. Bretillon
Monsieur Le Professeur F. Dabboussi
Monsieur le Professeur J.M. Lobacarro

Date de soutenance : 10 Septembre 2012

Adresse de l'auteur : Laboratoire de Biophysique Neurosensorielle-UMR INSERM 1107
Faculté de Médecine et de Pharmacie
28 Place Henri Dunant (P38)
63001 Clermont-Ferrand CEDEX

ANNEXES

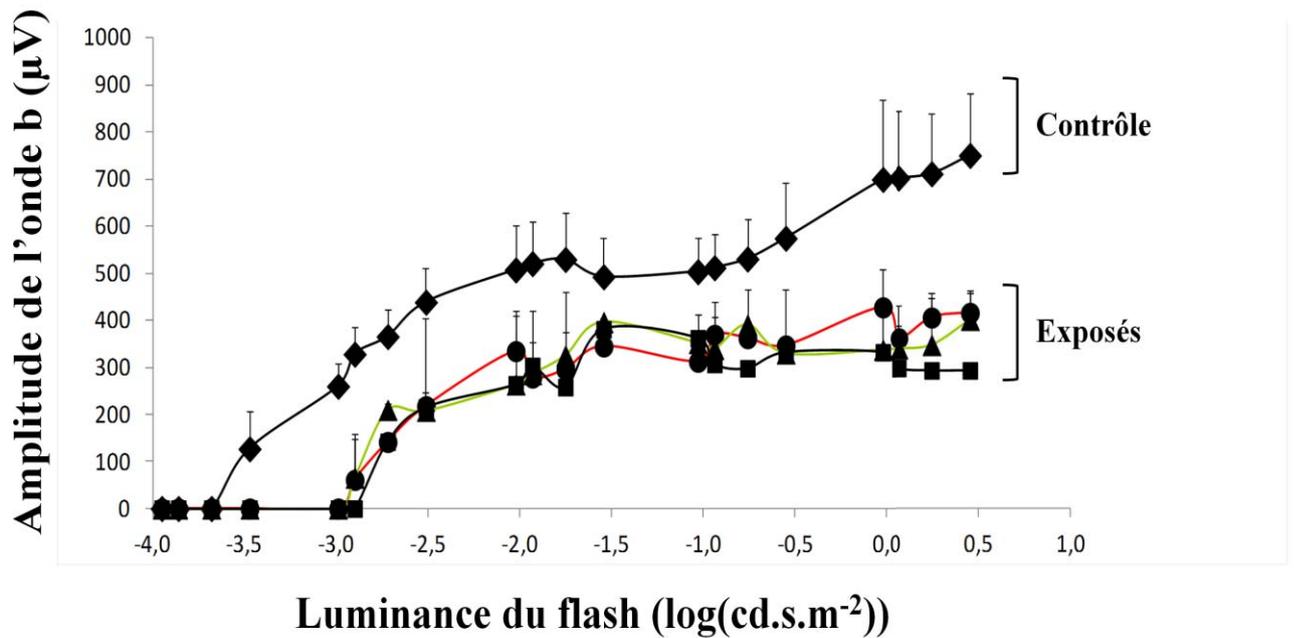


Figure 1: Injection intravitréenne du DMSO et fonction rétinienne. Des courbes de sensibilité rétinienne sont obtenues à partir des électrorétinogrammes enregistrés avant traitement et/ou exposition à la lumière (n=5; contrôle ; \blacklozenge), ou à un jour après la fin de l'exposition à la lumière chez des animaux non-traités (n=1; \blacksquare); ayant reçu le DMSO 4% (n=2; \bullet) ou le DMSO 10% (n=2; \blacktriangle). L'injection du DMSO à 4 ou 10% n'a pas d'effet neuroprotecteur contre les lésions rétinienne induites par la lumière.

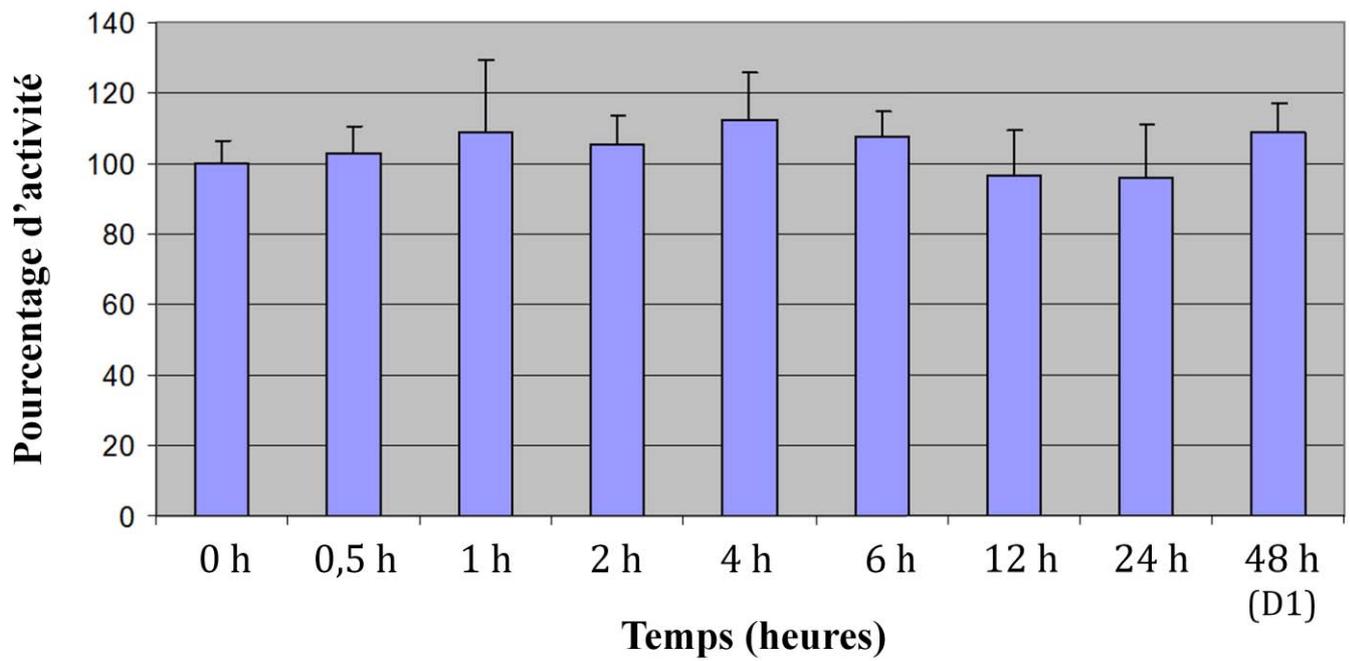


Figure 2 : Activité de la caspase-8 au cours de la photodégénérescence rétinienne. Des rétines sont prélevées à différents temps pour mesurer l'activité de la caspase-8: avant le début de l'exposition à la lumière (0h), au cours de l'exposition (30 min, 1h, 2h, 12h), à la fin de l'exposition (24h), et un jour après la fin de l'exposition à la lumière (D1).

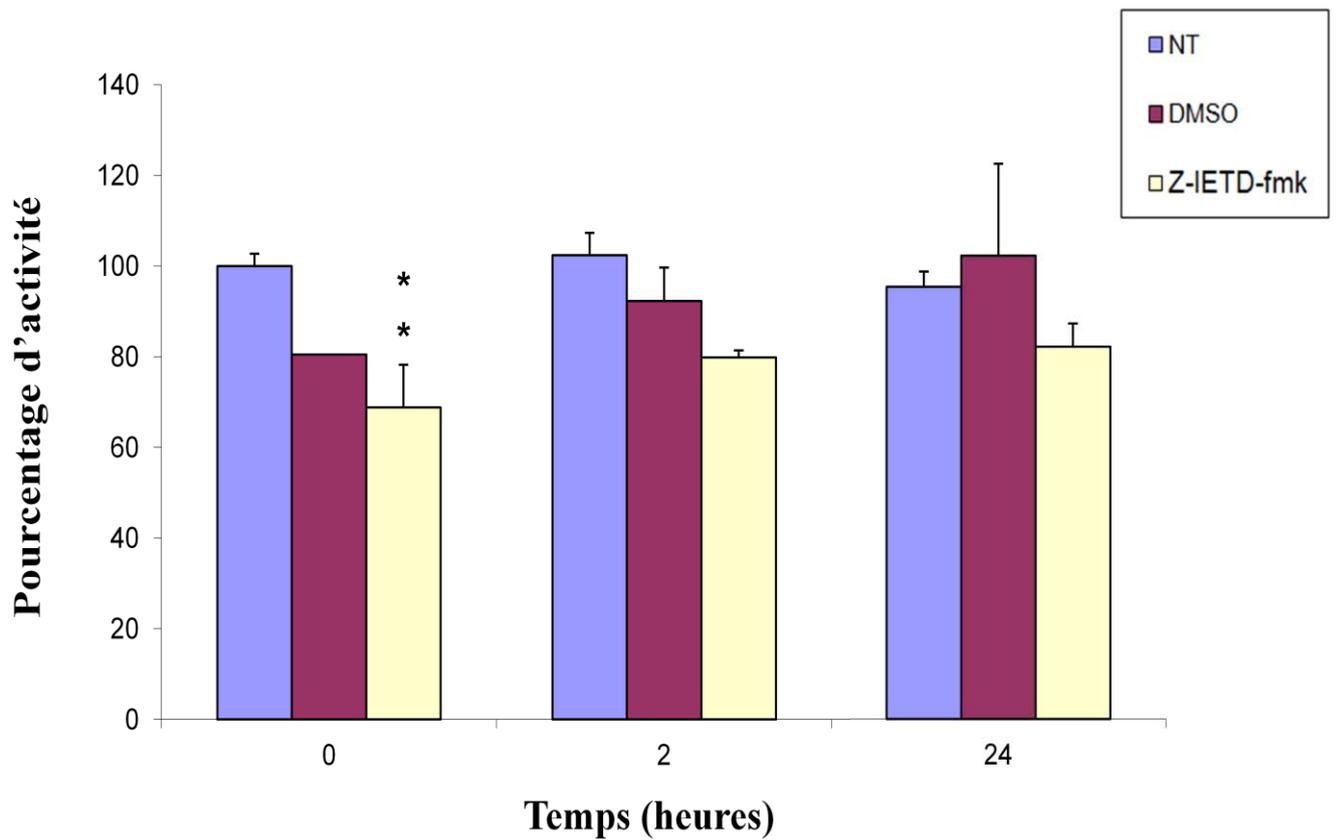


Figure 3 : Activité de la Caspase-8 au cours de la photodégénérescence rétinienne chez des animaux non traités (NT), ayant reçu une injection intravitréenne du DMSO à 2% (DMSO) ou d'inhibiteur de caspase-8 Z-IETD-fmk à raison de 0,2 mM dans DMSO à 2% (Z-IETD-fmk). Les animaux sont sacrifiés avant le début de l'exposition à la lumière (0h), à 2h d'exposition à la lumière ou à la fin de l'exposition à la lumière (24h). L'activité de la caspase-8 est mesurée. Les résultats sont présentés en pourcentage d'activité \pm écartype. * significativité par rapport à Non-traités.

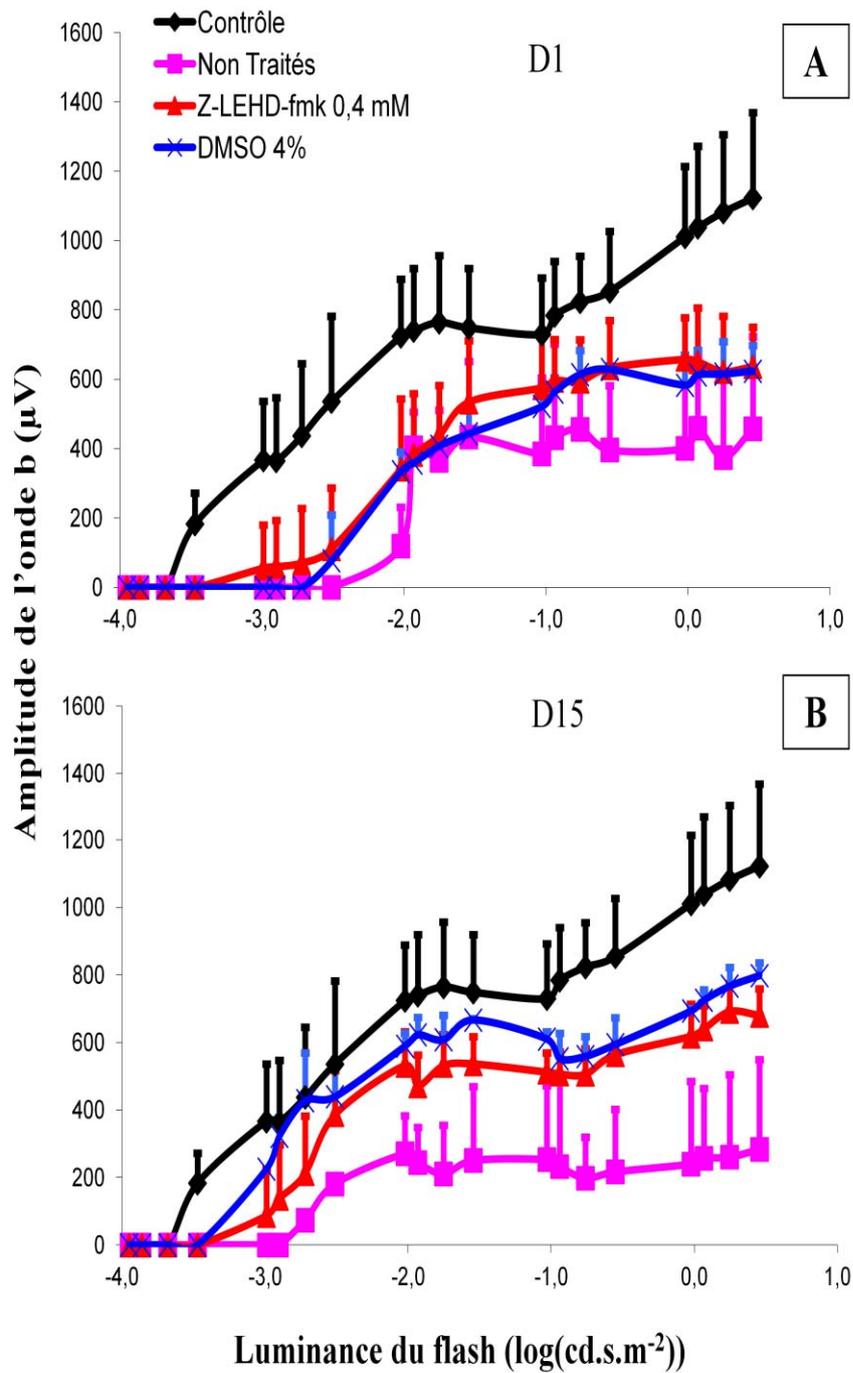


Figure 4 : Effet de l'inhibiteur de caspase-9 Z-LEHD-fmk. Les courbes de sensibilité rétinienne contrôle (◆) sont obtenues à partir des électrorétinogrammes enregistrés sur chaque rat avant traitement et/ou exposition à la lumière. Les animaux sont ensuite non traités (■); injectés intravitréalement avec 2 μl du DMSO à 4% (x), ou avec 2 μl de LEHD-fmk à 0,4 mM (▲). Ils sont alors exposés pendant 24h à une lumière fluorescente de 3400 lux. Les électrorétinogrammes sont enregistrés A/ un jour après la fin de l'exposition à la lumière (D1) et B/ 15 jours plus tard (D15).

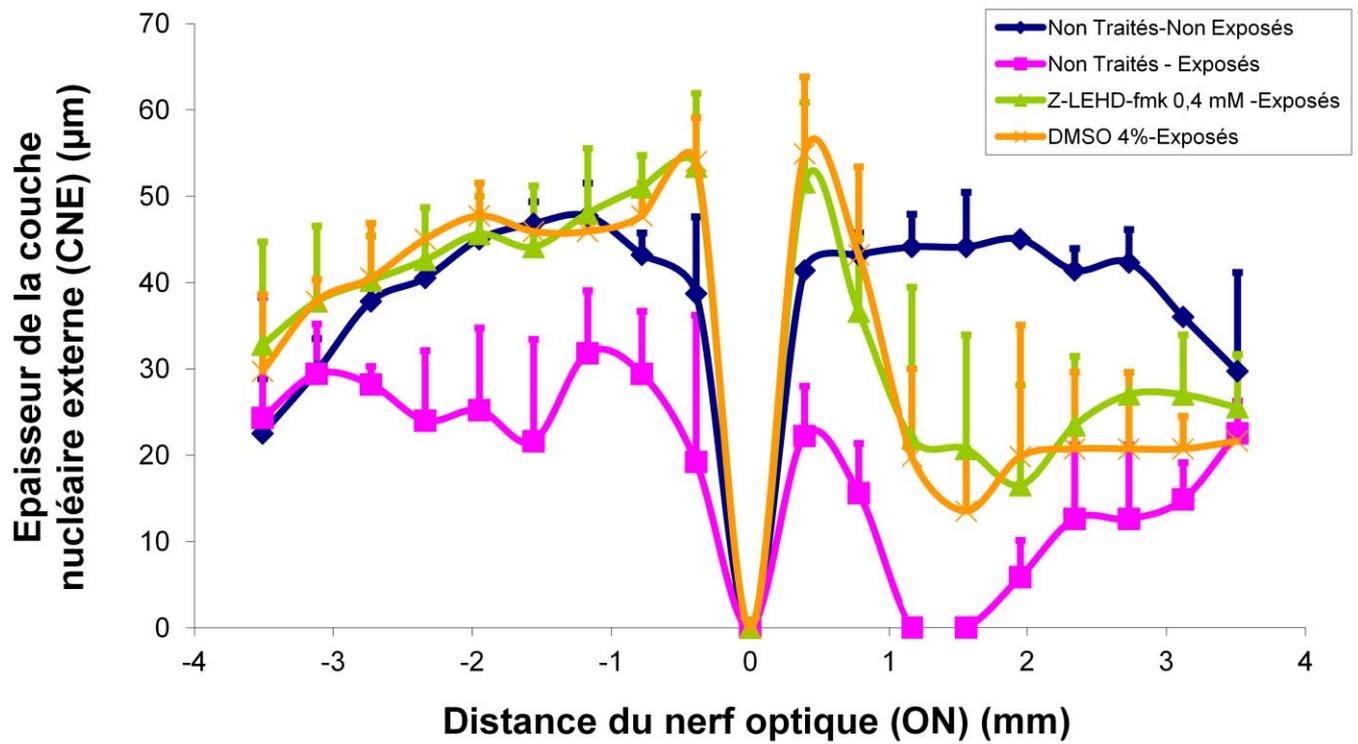


Figure 5: Epaisseur de la couche nucléaire externe (CNE) mesurée 15 jours après la fin de l'exposition à la lumière. Les animaux sont non traités-non exposés (♦; n=1), non traités-exposés (■; n=2), injectés avec le DMSO 4% (x; n=3), ou injectés avec Z-LEHD-fmk 0,4 mM-exposés (▲; n=3).

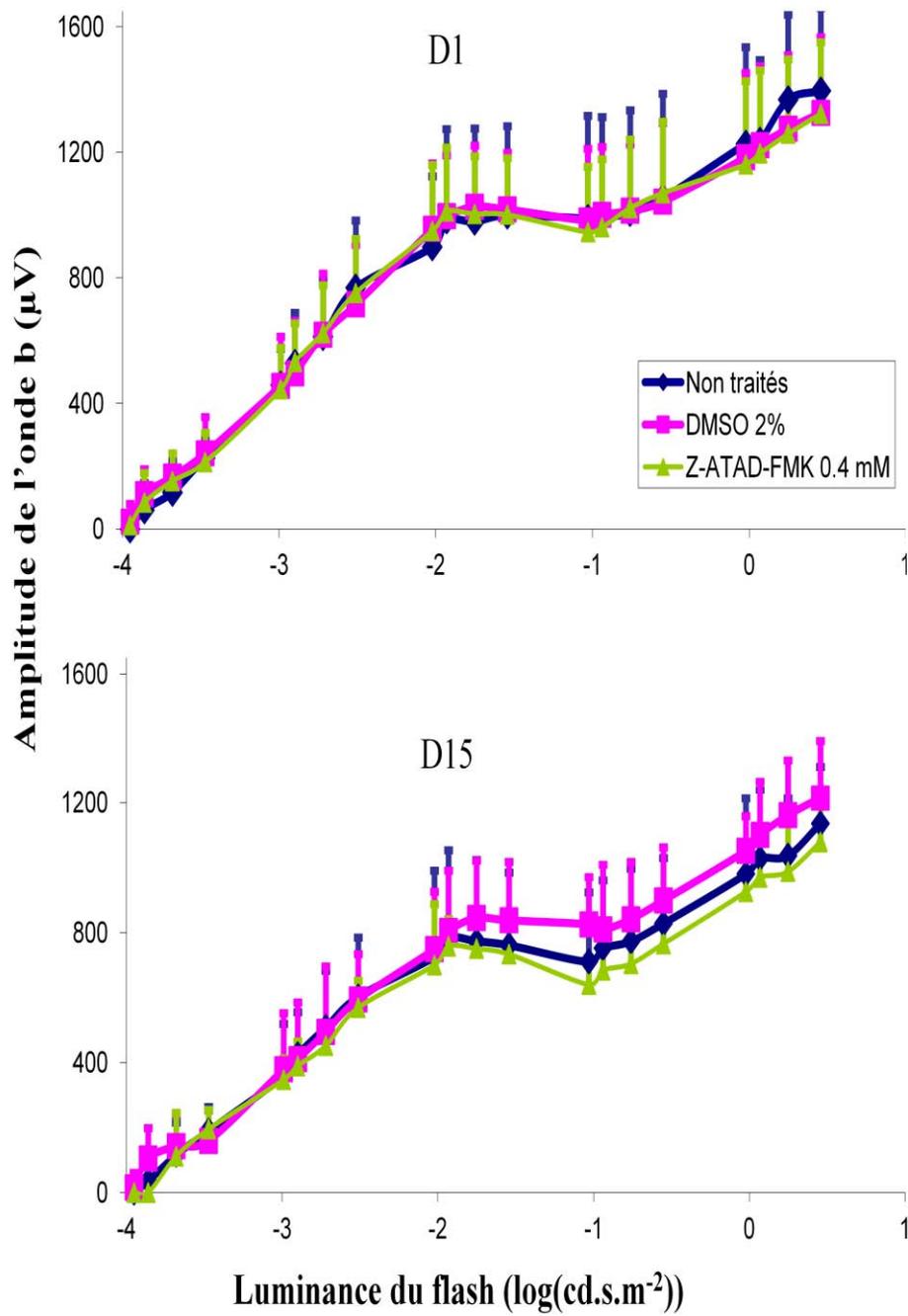


Figure 6: Courbes de sensibilité rétinienne obtenues à partir des ERGs enregistrés à D1 et D15, et non exposés à la lumière. Les animaux sont non traités (◆), traités au DMSO 2% (■) ou traités avec l'inhibiteur de la caspase-12 Z-ATAD-fmk à 0.4 mM (▲).

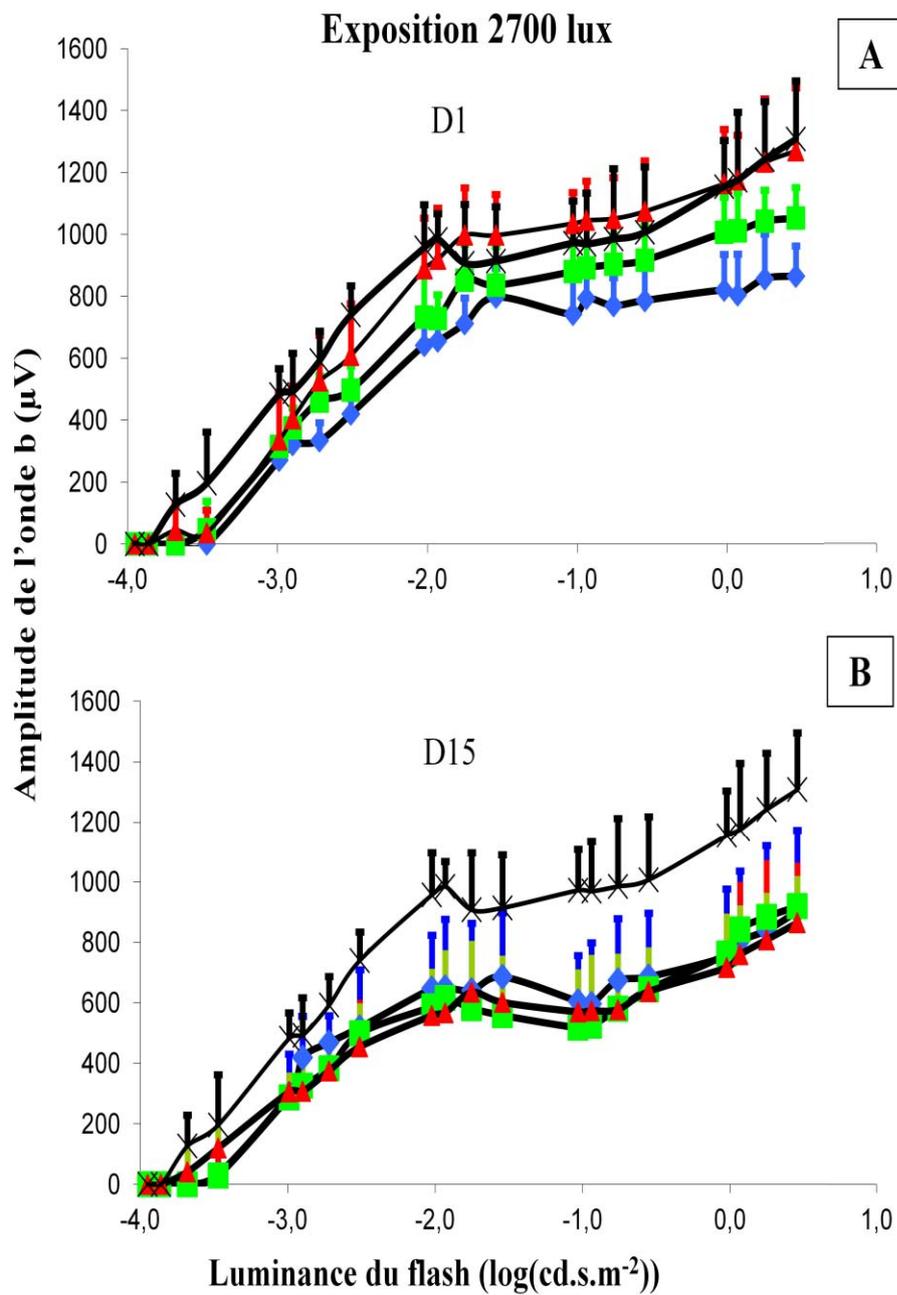


Figure 7: Courbe de sensibilité rétinienne. Les courbes de sensibilité rétinienne contrôle (x) sont obtenues à partir des électrorétinogrammes enregistrés sur chaque rat avant traitement et/ou exposition. Les animaux sont ensuite non traités (\diamond); injectés dans la vitrée avec 2 μl du DMSO à 2% (\blacksquare), ou injectés avec 2 μl de Z-ATAD-fmk à 0,4 mM (\blacktriangle). Ils sont alors exposés pendant 24h à une lumière fluorescente de 2700 lux. Les électrorétinogrammes sont enregistrés A/ un jour après la fin de l'exposition, et B/ 15 jours plus tard.

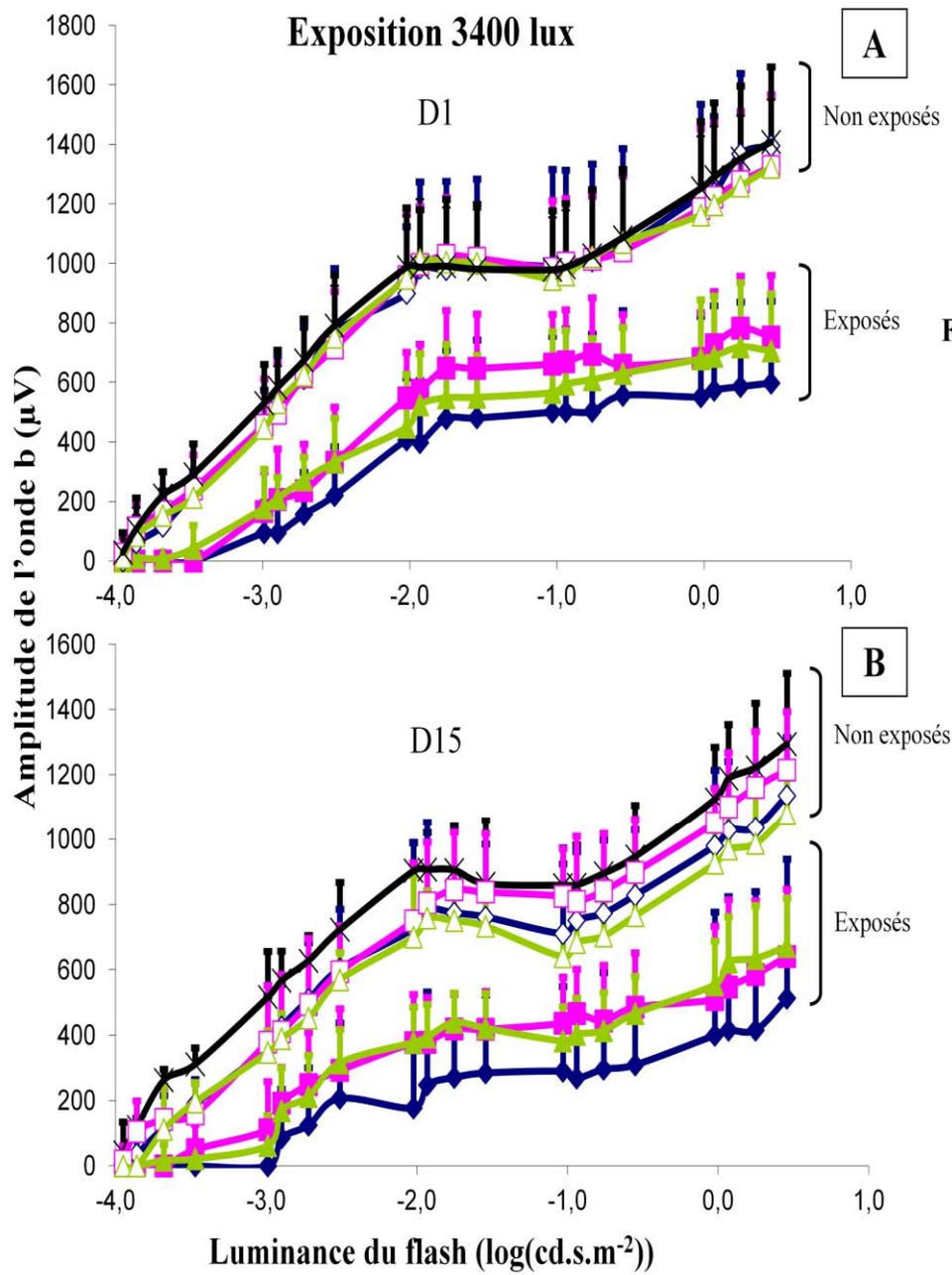


Figure 8: Courbe de sensibilité rétinienne. Les courbes de sensibilité rétinienne contrôle (x) sont obtenues à partir des électrorétinogrammes enregistré sur chaque rat avant traitement et/ou exposition. Les animaux sont ensuite non traités (♦) ou injectés intravitréalement avec 2 μl d'inhibiteur de caspase-12 (Z-ATAD-fmk) (Δ) à 0,4 mM, de 2 μl du DMSO à 2% (\square). Ils sont alors non-exposés ou exposés pendant 24 h à lumière fluorescente de 3400 lux.

Les électrorétinogrammes sont enregistrés A/ un jour après la fin de l'exposition, et B/ 15 jours plus tard.

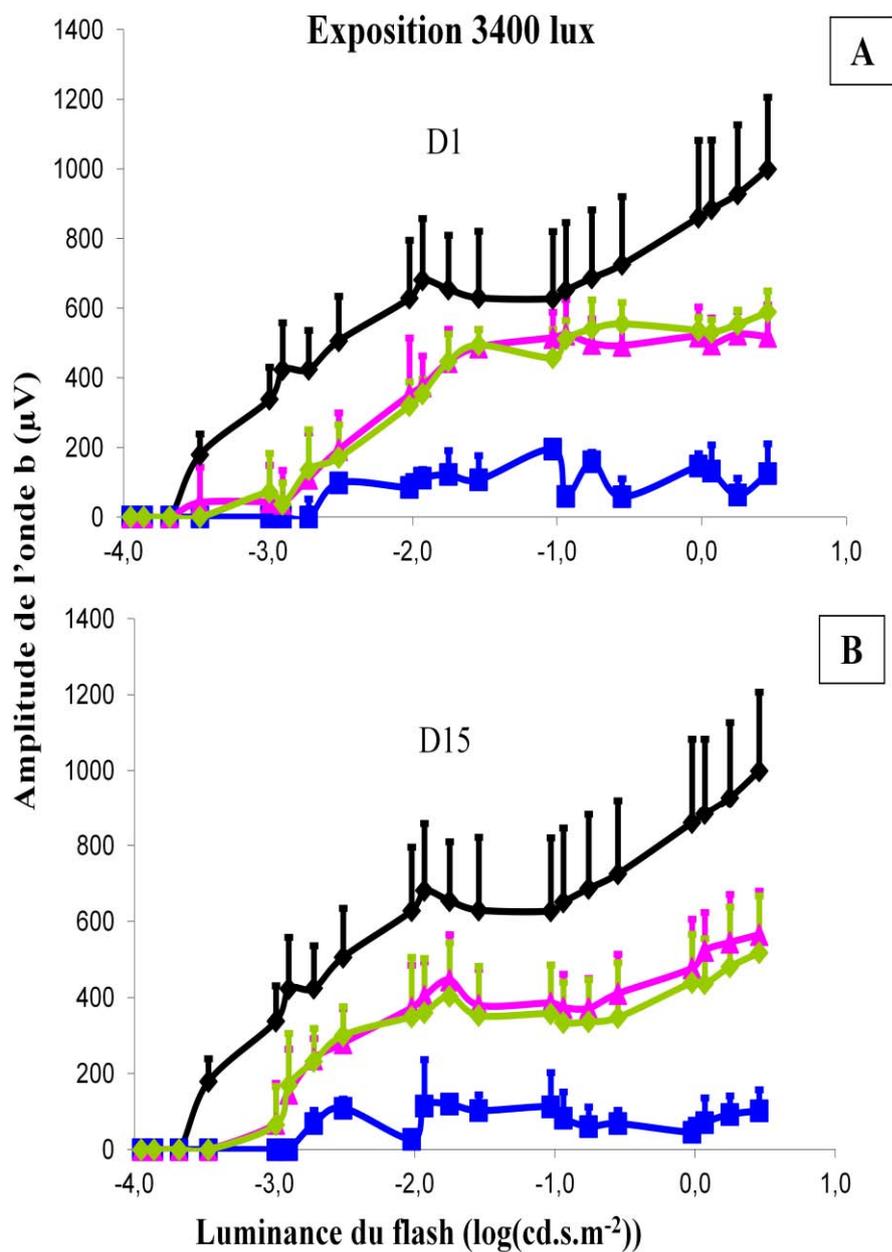


Figure 9: Courbe de sensibilité rétinienne. Les courbes de sensibilité rétinienne contrôle (\blacklozenge) sont obtenues à partir des électrorétinogrammes enregistré sur chaque rat avant traitement et/ou exposition. Les animaux sont ensuite non traités (\blacksquare), ou injectés intravitréalement avec $2\ \mu\text{l}$ d'inhibiteur de caspase-12 (ZATAD-fmk) (\blacktriangle) à $0,8\ \text{mM}$, de $2\ \mu\text{l}$ du DMSO à 4% (\blacklozenge). Ils sont alors exposés pendant $24\ \text{h}$ à lumière fluorescente de $3400\ \text{lux}$. Les électrorétinogrammes sont enregistrés A/ un jour après la fin de l'exposition, et B/ 15 jours plus tard.

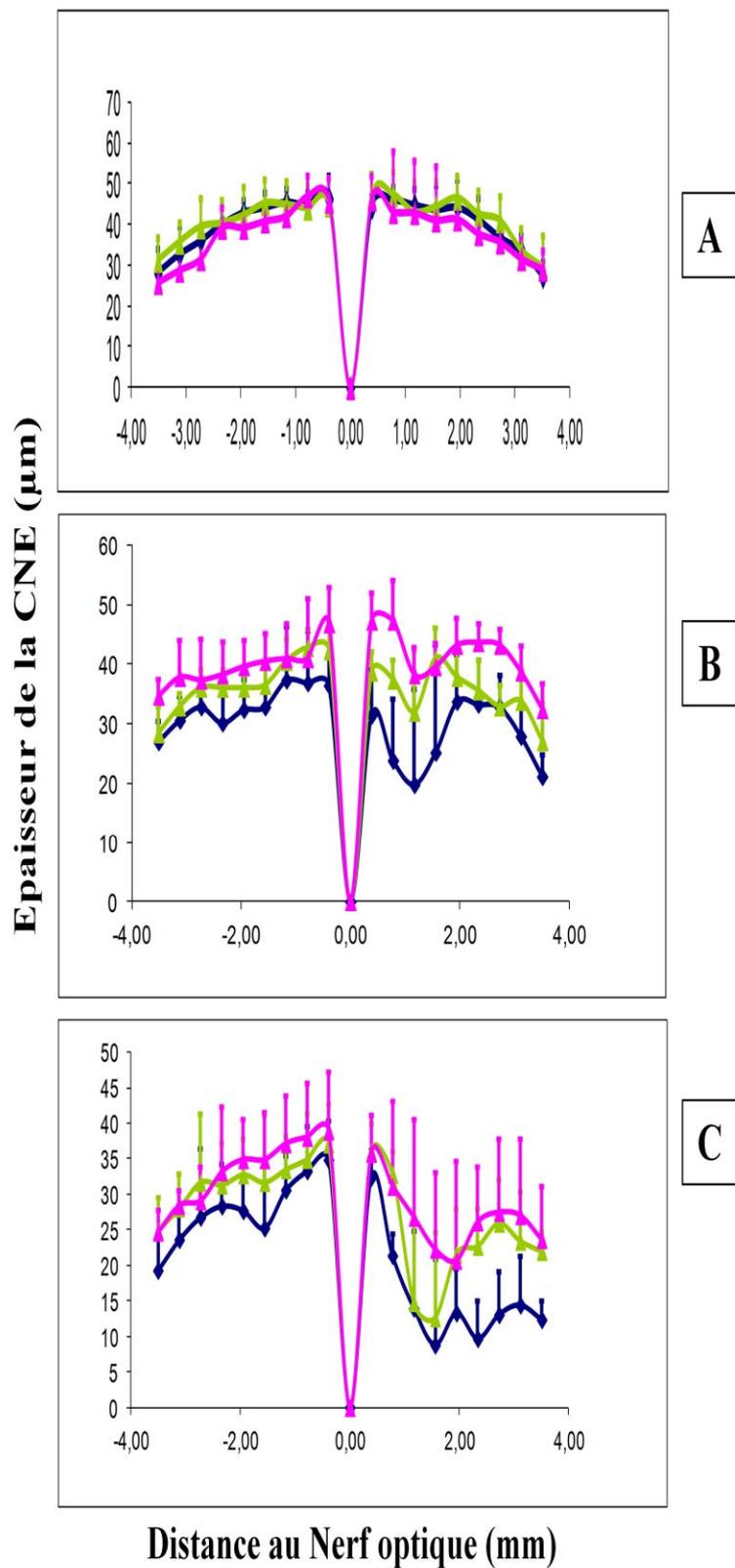


Figure 10: Epaisseur de la couche nucléaire externe (CNE). La CNE est mesurée tout les 0.36 mm du Nerf Optique à l'ora serrata supérieure à D15. Les animaux sont non-traités (\blacklozenge) ou reçoivent une injection intravitréenne (2 μl) du DMSO 2% (\blacktriangle) ou d'inhibiteur de caspase-12, ZATAD-fmk à 0,4 mM (\blacktriangle). Ils sont ensuite A/ non-exposés à la lumière, B/ exposés 24 h à 2700 lux ou C/ exposés 24 h à 3400 lux.

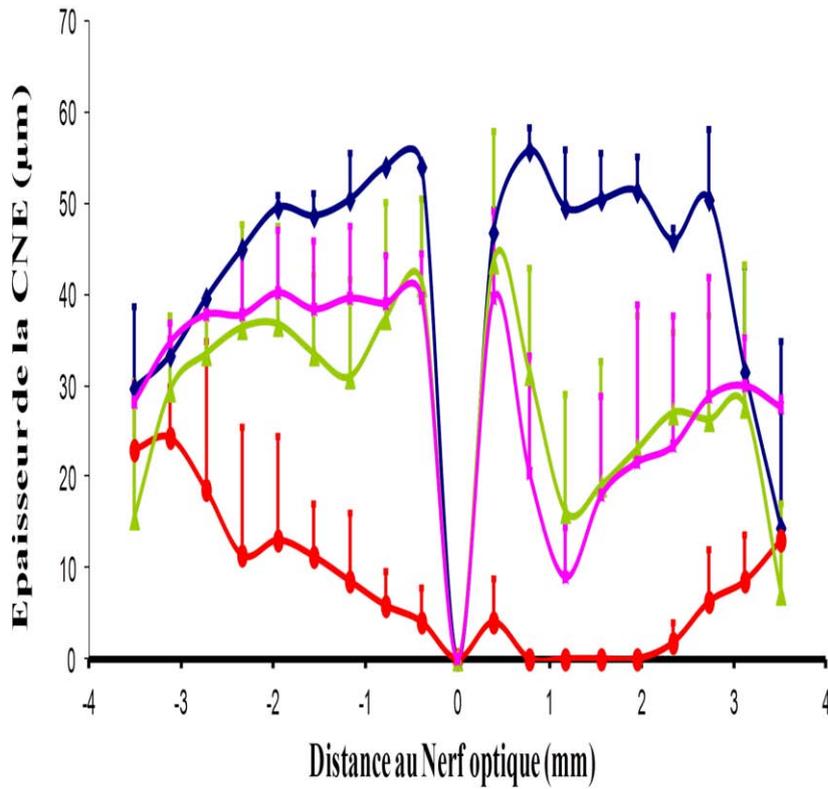


Figure 11: Epaisseur de la couche nucléaire externe (CNE) mesurée à D15. Les animaux exposés à 3400 lux sont : non traités-non exposés (♦; n=1), non traités-exposés (●; n=2), injectés avec le DMSO 4%-exposés (▲; n=3) ou injectés avec ZATAD-fmk 0,8 mM-exposés (■; n=3).

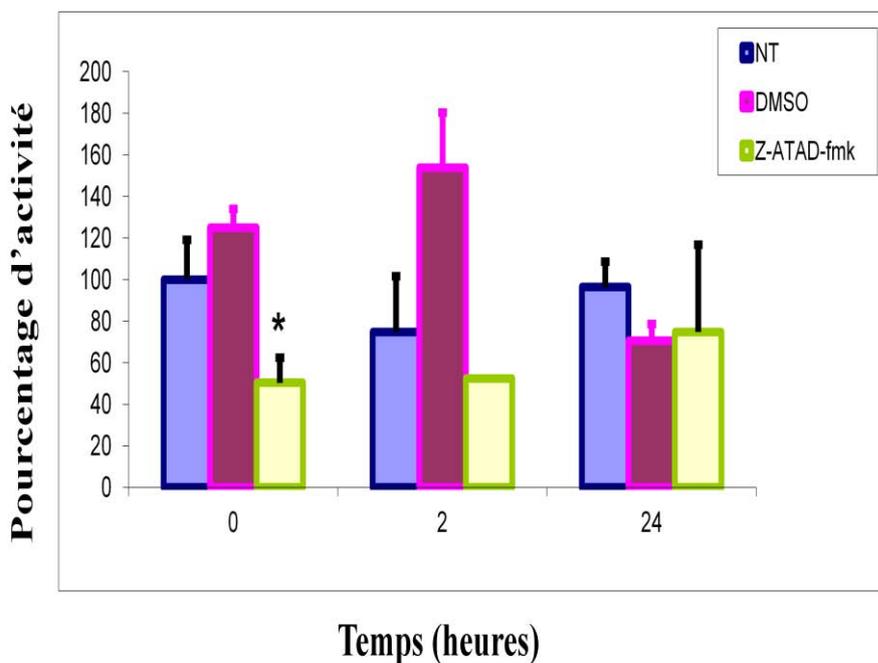


Figure 12: Activité de la Caspase-12 dans la rétine des animaux non traités, ayant reçu une injection du DMSO 2% ou d'inhibiteur de caspase-12 Z-ATAD-fmk à 0,4 mM.

Les rétines ont été prélevées avant le début de l'exposition à la lumière (0h; n=2 non traités; n=2 DMSO; n=2 Z-ATAD-fmk); à 2h d'exposition (2h; n=3 non traités; n=3 DMSO; n=1 Z-ATAD-fmk) ou à la fin de l'exposition à la lumière (24h; n=4 non traités; n=3 DMSO; n=2 Z-ATAD-fmk). Exposition à la lumière de 3400 lux.